

Relazione conclusiva sulle attività condotte dal personale del Laboratorio di Ittiopatologia del Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie dell'Università di Bologna nell'ambito del contratto di ricerca commissionata stipulata con la Provincia Autonoma di Bolzano su "INDAGINE SUL POSSIBILE IMPATTO DELLA MALATTIA PROLIFERATIVA RENALE (MPR) DEI SALMONIDI SULLE POPOLAZIONI DI TROTA FARIO (*SALMO TRUTTA*) DELL'ALTO ADIGE"

1 settembre 2014



M. Letizia Fioravanti

Responsabile del Laboratorio di Ittiopatologia
Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie (DIMEVET)
Alma Mater Studiorum Università di Bologna

Indice

Premessa.....	Pag. 2
Metodologia.....	Pag. 4
Risultati.....	Pag. 10
Discussione e considerazioni.....	Pag. 14
Conclusioni e raccomandazioni.....	Pag. 20
Referenze bibliografiche.....	Pag. 22
Allegato 1.....	Pag. 25

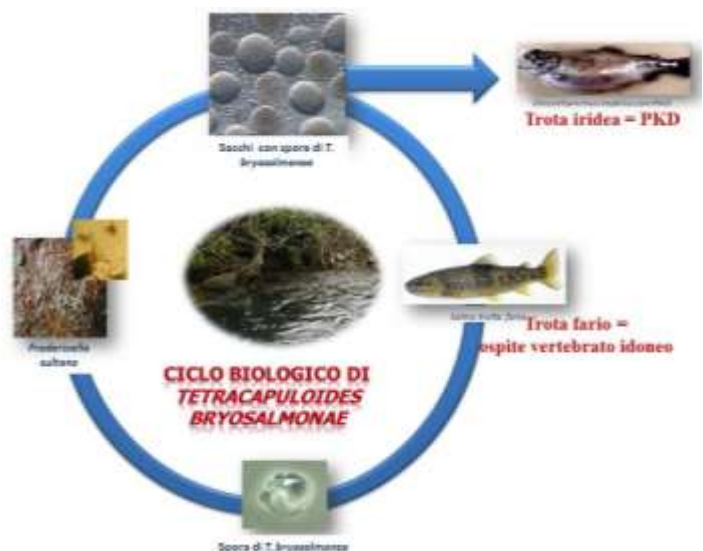
PREMESSA

La Malattia Proliferativa Renale (MPR) o Proliferative Kidney Disease (PKD) è un'importante malattia parassitaria dei salmonidi sostenuta dall'endoparassita *Tetracapsuloides bryosalmonae* (Myxozoa, Malacosporea). Anche se pressoché tutti i salmonidi sono ritenuti suscettibili all'infezione, la Malattia Proliferativa Renale è stata studiata e descritta soprattutto nella trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*) d'allevamento, che manifesta gravi forme cliniche di malattia soprattutto a temperature >15°C. Per tale motivo questa malattia ha rappresentato ed ancora talvolta rappresenta un fattore limitante le produzioni delle trota colture di pianura alimentate da acque superficiali, dove le elevate temperature estive consentono lo sviluppo di tale patologia. Alcune indagini effettuate in passato sul territorio nazionale hanno permesso di individuare l'areale endemico della MPR nel versante settentrionale del fiume Po, delimitato ad ovest dal fiume Ticino e ad est dal bacino composto dai fiumi Stella, Corno ed Ausa, in Friuli Venezia-Giulia.

Nonostante questa malattia fosse descritta da lungo tempo in Europa ed in Nord America, solo nel 1985 ne è stata accertata l'eziologia di natura parassitaria (Kent & Hedrick, 1985) e nel 1999 la biologia, individuando nei briozoi gli ospiti naturali del parassita (Anderson *et al.*, 1999). Nell'ultimo decennio numerosi studi hanno definitivamente chiarito il ciclo biologico di *T. bryosalmonae* e studiato in maggior dettaglio l'epidemiologia del parassita.

Attualmente è dimostrato che la trasmissione di *T. bryosalmonae* ai salmonidi avviene mediante infezione con spore rilasciate nell'acqua da diverse specie di briozoi naturalmente presenti in ambienti dulciacquicoli e che alcune specie di salmonidi sono in grado di eliminare spore infettanti per i briozoi (Morris & Adams, 2006; Grabner & El-Matbouli, 2008), permettendo la perpetuazione del ciclo biologico in alternanza tra ospite invertebrato (briozoo) ed ospite vertebrato (salmonide).

In particolare alcune specie di salmonidi fungerebbero da serbatoio del parassita in natura (*Salmo trutta* e *Salvelinus alpinus*), mentre altre, fra cui *in primis* la trota iridea,



rappresenterebbero ospiti meno adattati al parassita e svilupperebbero quindi in modo più marcato la malattia, a temperature superiori ai 15°C.

I segni clinici della malattia dipendono dalla severità dell'infezione e comprendono una gamma piuttosto ampia di segni che spesso accomunano la Malattia Proliferativa Renale a svariate altre malattie. In caso di infezioni massive ed in presenza di fattori predisponenti quali alte temperature (>15°C), condizioni stressanti di natura ambientale o gestionale ed infezioni intercorrenti (Hedrick *et al.*, 1993) si possono raggiungere mortalità molto elevate. Fra i segni aspecifici vanno annoverati: ipermelanosi cutanea, esoftalmo bilaterale, iperdistensione addominale e pallore branchiale correlabile ad anemia. Per quanto concerne le lesioni anatomopatologiche riferibili alla Malattia Proliferativa Renale si evidenziano ingrossamento ed alterazioni di colore del rene medio-posteriore e della milza, accompagnati talvolta da lesioni anche in altri organi, ed anemia sistemica (Hedrick *et al.*, 1993).

Nei pesci il parassita compie inizialmente una fase di sviluppo extrasporogonico, responsabile delle lesioni e dei sintomi della malattia, a livello del tessuto interstiziale renale e di altri organi interni e successivamente una fase di sviluppo sporogonico a livello del lume dei tubuli renali che porta alla produzione ed alla eliminazione di spore infettanti per i briozoi (Morris & Adams, 2006). Le manifestazioni cliniche e le lesioni anatomo-patologiche della MPR sono correlabili alla



massiva risposta infiammatoria causata dalla proliferazione cellulare del parassita in fase extrasporogonica a livello del tessuto interstiziale di rene e milza (Okamura *et al.*, 2011).

La Malattia Proliferativa Renale rappresenta un serio problema per gli allevamenti di trote e per le avannotterie che si alimentano con acque superficiali dove sono presenti briozoi, determinando perdite elevate (mortalità e ritardo nella crescita) anche a seguito delle infezioni secondarie che facilmente si instaurano nei pesci parassitati, in genere immunodepressi. Se da un lato la presenza e gli effetti delle infezioni da *T. bryosalmonae* in salmonidi allevati è ben documentata, dall'altro ancora poco si sa dell'impatto di questa malattia parassitaria sulle popolazioni selvatiche di salmonidi (Okamura *et al.*, 2011) anche se in base alle informazioni scientifiche disponibili *T. bryosalmonae* sarebbe molto diffuso negli ambienti dulciacquicoli naturali sia per la presenza ubiquitaria dei briozoi (Wood, 2002) sia per la presenza di ospiti vertebrati idonei quali i salmonidi (Sterud *et al.*,

2007). Per quanto concerne il continente europeo, alcuni recenti studi hanno posto in relazione l'infezione da *T. bryosalmonae* con il declino delle popolazioni selvatiche di salmone atlantico (*Salmo salar*) in Norvegia (Sterud *et al.*, 2007) e di trota fario (*Salmo trutta*) in Svizzera (Wahli *et al.*, 2002; 2007) ed in Danimarca (Skovgaard e Buchmann, 2012).

L'importanza di *T. bryosalmonae* per lo stato sanitario dei salmonidi selvatici andrà quindi studiata con maggiore attenzione, anche in considerazione dei cambiamenti climatici ed ambientali in corso, al fine di stabilirne l'effettivo impatto sullo stato di salute e sull'entità delle popolazioni (Okamura *et al.*, 2011; Skovgaard e Buchmann, 2012).

In questa ricerca, commissionata dalla Provincia di Bolzano, è stata quindi effettuata nel 2013 un'indagine sul possibile ruolo della Malattia Proliferativa Renale sostenuta da *T. bryosalmonae* nel declino delle popolazioni selvatiche di salmonidi dei fiumi della Provincia di Bolzano.

METODOLOGIA

Le ricerche sono state condotte da aprile a novembre 2013, in modo da prendere in considerazione i mesi in cui la malattia ha maggiore probabilità di manifestarsi.

Nel corso del periodo d'indagine sono stati effettuati 4 campionamenti (aprile, giugno, luglio e settembre) per ognuno dei fiumi Adige, Passirio, Isarco e Rienza, scelti quali aree di studio in accordo con le Autorità competenti locali (Azienda Unità Sanitaria Locale di Merano, Ufficio Caccia e Pesca della Provincia di Bolzano).

Nella figura sottostante vengono indicati i punti di campionamento, dove si può osservare come per i due fiumi più lunghi, Adige ed Isarco, siano stati scelti due punti di prelievo, mentre per Passirio e Rienza si sia deciso, in accordo con la Provincia, di considerarne uno solo.



Siti di campionamento presi in considerazione nella Provincia di Bolzano nel corso dell'indagine

Al momento del campionamento in ogni sito venivano rilevati tramite sonda multi-parametrica i valori di temperatura ($^{\circ}\text{C}$), ossigeno disciolto (pO_2 , espresso in ppm) e saturazione da ossigeno dell'acqua ($\text{O}_2\%$).

Ad ogni campionamento venivano prelevati da ogni fiume mediante elettrostorditore fino a 15 soggetti di *Salmo trutta* appartenenti ai morfotipi *fario* e *marmorata*, alla luce della suscettibilità a *T. bryosalmonae* che caratterizza entrambi. In accordo con le Autorità locali (Azienda Unità Sanitaria Locale di Merano, Ufficio Caccia e Pesca della Provincia di Bolzano) si è deciso in questo screening di monitorare entrambe le popolazioni per non correre il rischio di ottenere un numero di trote fario troppo esiguo per avere dei dati statisticamente significativi, anche alla luce della frequente presenza di soggetti ibridi che non consente su base fenotipica di distinguere con assoluta certezza le trote fario geneticamente “pure”. Ove possibile sono state campionate le trote nate nella stagione di campionamento (0+) che avrebbero quindi dovuto entrare in contatto con il parassita per la prima volta nel corso dell’anno d’indagine.



In due casi è stato possibile campionare solo 14 pesci dai siti Adige 2 (Basso Adige) e Rienza e in un caso è stato prelevato un soggetto di trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*) dal fiume Passirio.

Nella tabella seguente si evince il numero di pesci campionati in base al sito ed al mese di campionamento.

Fiumi e stazioni di campionamento	Adige		Passirio	Isarco		Rienza	Totale pesci
	1	2	1	1	2	1	
Coordinate geografiche	46°37.301N 10°51.994E	46°17.186N 11°14.252E	46°41.251N 11°10.668E	46°31.979N 11°29.361E	46°44.569N 11°38.779E	46°48.607N 11°45.261E	-
Altitudine	625 mt	213 mt	367 mt	374 mt	602 mt	751 mt	-
Aprile	10	4	15	10	5	15	59
Giugno	10	5	15	7	8	15	60
Luglio	10	5	15	10	5	15	60
Settembre	8	7	15	8	7	14	59
Totale pesci	59		60	60		59	238

Numero di pesci esaminati per ogni fiume in base al mese di campionamento

In base alle indicazioni fornite dalle Autorità locali sono stati inoltre sottoposti a campionamento tre allevamenti di trote situati in bacini idrografici siti nella Provincia di Bolzano (Allevamento 1 e 2: Passirio; Allevamento 3: Isarco) che sono stati oggetto di analisi con le stesse modalità adottate per i salmonidi selvatici in base alla disponibilità dei gestori degli impianti (l’adesione era su base volontaria). Gli allevamenti 1 e 3 hanno

fornito solo trote marmorate, mentre l'allevamento 2 ha fornito avannotti di trota marmorata nel primo campionamento e trote fario a fine ciclo nel secondo campionamento.

Nel corso della ricerca si è deciso di posticipare al mese di luglio anche le attività di campionamento previste presso gli allevamenti nel mese di giugno in modo da sfruttare il momento teoricamente più propizio per il rilevamento della Malattia Proliferativa Renale; in luglio sono stati quindi prelevati 30 soggetti per ogni allevamento, ad eccezione dell'allevamento 2 che non ha potuto partecipare all'indagine per motivi contingenti in quel periodo. L'ultimo campionamento è stato eseguito a novembre in modo da coprire l'intero arco del periodo d'indagine.

Nella tabella seguente viene riportato il numero di pesci prelevato ed esaminato per ogni allevamento in base al mese.

	Allevamento 1	Allevamento 2	Allevamento 3
Aprile	15	20 (avannotti)	15
Luglio	30	-	30
Novembre	15	14	15
Totale	60	34	60

Numero di pesci esaminati nei 3 allevamenti oggetto di indagine



Rilevamento di peso e lunghezza totale dei pesci campionati

I pesci venivano sottoposti a rilievo della lunghezza totale e del peso, venivano identificati fenotipicamente e sottoposti ad esame anatomico-patologico per rilevare eventuali lesioni riferibili a PKD.

Ad ogni individuo veniva assegnato un codice univoco indicante il fiume di origine e una numerazione progressiva. Tutti i dati sono stati registrati su apposita scheda unitamente ai parametri ambientali relativi ad ogni sito di campionamento.

Ogni esemplare veniva sottoposto ad esame anatomico-patologico al fine di rilevare eventuali lesioni riferibili a Malattia Proliferativa Renale.

Per l'esame microscopico volto alla ricerca di *T. bryosalmonae*, da ogni soggetto venivano eseguite sul campo impronte di rene e milza su vetrino portaoggetto successivamente colorate in laboratorio con la metodica di May-Grünwald-Giemsa; parallelamente porzioni di rene, milza, fegato, branchie, cervello ed intestino venivano fissate in formalina tamponata al 10% per la conduzione dell'esame istologico, mantenendo il medesimo codice univoco.

L'esame istologico veniva condotto mediante metodiche di laboratorio standard utilizzando la colorazione con Ematossilina-eosina.

Per la diagnosi molecolare, condotta mediante Polymerase Chain Reaction (PCR), una piccola porzione di rene posteriore veniva prelevata da ogni pesce tramite lama da bisturi sterile monouso e posta in un microtubo univocamente contrassegnato e subito refrigerato. Una volta giunti in laboratorio tutti i campioni venivano congelati a $-21^{\circ}\pm 3^{\circ}\text{C}$ in attesa della processazione.



Operazioni di prelievo del tessuto renale dai pesci campionati per le successive indagini di laboratorio

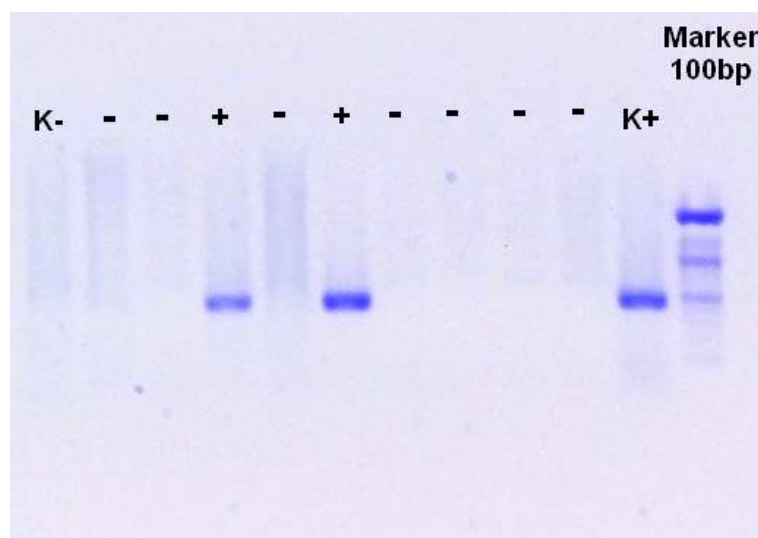
Per quanto concerne i campionamenti di settembre e novembre si è deciso di condurre le analisi complete presso il Laboratorio di Ittiopatologia al fine di eseguire anche l'esame parassitologico completo per la ricerca di altri agenti parassitari e l'esame batteriologico secondo Procedure Operative Standard in applicazione presso il laboratorio di Ittiopatologia, che opera nell'ambito di un Sistema di Gestione della Qualità ISO 9001.

Analisi molecolare

La ricerca di *Tetracapsuloides bryosalmonae* mediante PCR veniva inizialmente condotta su pool e, in caso di positività, sui campioni prelevati dai singoli esemplari, secondo le modalità di seguito riportate. I primers utilizzati sono stati quelli indicati da Saulnier e de Kinkelin (1997).

L'estrazione del DNA è stata condotta con kit del commercio seguendo le indicazioni riportate dal produttore. La Master Mix di amplificazione conteneva: Buffer 1x, dNTP's [200 µM], primers forward [20 pmol/µ], primers reverse [20 pmol/µ], MgCl₂ [2 mM] e Taq [1.25 U]. I cicli di reazione impiegati prevedevano un primo step di denaturazione a 94°C per 5' seguito da 30 cicli di denaturazione a 94°C per 1', annealing a 50°C per 1', estensione a 72°C per 1' seguiti da un'estensione finale a 72°C per 5'. Il prodotto di PCR è stato visualizzato mediante corsa elettroforetica in gel di agarosio al 1% in TBE 0.5X a cui è stato aggiunto come intercalante Sybr Safe DNA gel stain.

Al termine della corsa elettroforetica il gel è stato visualizzato mediante transilluminatore. L'esito positivo della prova, relativo alla presenza di *Tetracapsuloides bryosalmonae* nei tessuti sottoposti a PCR, veniva stabilito evidenziando una banda di 436 bp (come da figura sottostante).



RISULTATI

Nel corso della ricerca sono state esaminate in totale 238 trote selvatiche, di cui 65 *S. trutta fario* (F), 70 *S. trutta marmorata* (M), e 102 soggetti ibridi (H). A questi si somma un unico esemplare di trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*) pescato nel fiume Passirio.

Per quanto riguarda gli allevamenti sono stati esaminati 154 pesci, di cui 140 trote marmorate e 14 trote fario.

Osservazioni anatomo-patologiche

Durante l'esame necroscopico, effettuato sul campo e/o in laboratorio su tutti gli esemplari campionati, non si sono mai evidenziate alterazioni patologiche di rilievo e nel complesso tutti gli esemplari si mostravano in buono stato di salute.

In particolare nessuno dei soggetti sia selvatici che allevati ha mostrato all'esame necroscopico lesioni anatomo-patologiche riferibili alla Malattia Proliferativa Renale.

Osservazioni microscopiche e istologiche

La presenza di stadi di sviluppo o spore di *T. bryosalmonae* non è mai stata evidenziata nelle impronte di rene e milza effettuate dai salmonidi sottoposti ad indagine e colorate secondo la metodica di May-Grünwald-Giemsa.

Anche all'esame istologico tutti gli esemplari esaminati sono risultati negativi per *T. bryosalmonae*, non presentando mai né stadi di sviluppo o spore del parassita né lesioni riferibili alla Malattia Proliferativa Renale.

In alcuni casi è stato possibile osservare a livello renale la presenza di piccoli calcoli nel lume dei tubuli, degenerazione vacuolare o a gocce ialine dell'epitelio dei tubuli, aumento del numero dei centri melanomacrofagici, atrofia glomerulare con dilatazione del lume. Queste lesioni non sono state riferite ad un'eziologia definita ma non erano comunque riconducibili a quadri di Malattia Proliferativa Renale.

Analisi molecolare

Le analisi molecolari hanno permesso di evidenziare la positività per *Tetracapsuloides bryosalmonae* in 11 (4,6%) delle 238 trote selvatiche esaminate, in particolare in 4 esemplari (2 ibridi, una trota fario ed una trota marmorata) prelevati dal Basso Adige (6,8% sul totale di 59 trote campionate da questo fiume) ed in 7 esemplari (3 trote fario, 3 ibridi e 1 trota marmorata) prelevati dal Basso Isarco (11,7% sul totale di 60 trote campionate da

questo fiume). Tutti i salmonidi campionati dai fiumi Passirio e Rienza sono risultati negativi (per i risultati in dettaglio vedi Tabelle in Allegato).

Nel fiume Adige le 4 positività si sono osservate nel mese di aprile, con 2 pesci su 14 esaminati (14,3%), a giugno e a settembre, con 1 pesce su 15 esaminati (6,6%) per ogni periodo.

Per quanto riguarda il fiume Isarco le positività si sono osservate solo nei mesi di aprile e settembre, rispettivamente con 2 (13,3%) e 5 (33,3%) pesci positivi.

Le osservazioni microscopiche condotte su impronte di rene e milza colorate con May-Grünwald-Giemsa non hanno evidenziato in nessun caso la presenza di stadi di sviluppo riferibili al parassita nei soggetti risultati positivi alla PCR.

Uguualmente, all'esame istologico i soggetti positivi alla PCR non hanno mai evidenziato la presenza di stadi di sviluppo del parassita nè lesioni riferibili alla Malattia Proliferativa Renale.

Nelle Tabelle di seguito riportate si può apprezzare l'andamento dei parametri ambientali rilevati nelle due stazioni del fiume Adige nel corso dei campionamenti. In rosso sono evidenziati i parametri rilevati in concomitanza con le positività.

Temperatura	Aprile	Giugno	Luglio	Settembre
Alto Adige	8,8°C	10,5°C	11,6°C	12,3°C
Basso Adige	10,0°C	14,2°C	12,7°C	10,2°C

pO ₂ (ppm)	Aprile	Giugno	Luglio	Settembre
Alto Adige	11.2	10.5	11.7	10.6
Basso Adige	13.2	12.0	10.1	10.0

%O ₂	Aprile	Giugno	Luglio	Settembre
Alto Adige	97	106	115	104
Basso Adige	122	106	99	92

Di seguito sono riportate le tabelle con l'andamento dei parametri dell'acqua rilevati nel corso dei campionamenti sul fiume Isarco. In rosso sono evidenziati i parametri rilevati in concomitanza con le positività.

Temperatura	Aprile	Giugno	Luglio	Settembre
Alto Isarco	6,8°C	9,1°C	11,5°C	9,2°C
Basso Isarco	8,1°C	9,6°C	11,6°C	11,3°C

pO ₂ (ppm)	Aprile	Giugno	Luglio	Settembre
Alto Isarco	12.3	10.1	10.8	11.4
Basso Isarco	12.0	10.6	11.7	11.1

%O ₂	Aprile	Giugno	Luglio	Settembre
Alto Isarco	106	91	115	100
Basso Isarco	103	96	115	103

Nelle tabelle successive sono riportati i valori dei parametri dell'acqua rilevati nel corso dei campionamenti effettuati presso i fiumi Passirio e Rienza, dove non si sono mai riscontrate positività per *T. bryosalmonae*.

Passirio	Aprile	Giugno	Luglio	Settembre
T°C	6,4°C	8,9°C	11,9°C	10,0°C
pO ₂ (ppm)	12.3	11.9	9.6	10.0
%O ₂	105	103	95	96

Rienza	Aprile	Giugno	Luglio	Settembre
T°C	7,2°C	9,3°C	11,1°C	9,1°C
pO ₂ (ppm)	12.2	10.4	9.8	11.2
%O ₂	107	93	92	103

Per quanto riguarda gli allevamenti presi in considerazione nell'ambito della presente ricerca, due impianti su tre sono risultati negativi sia alla PCR sia all'esame microscopico condotto su impronte di rene e milza colorate con May-Grünwald-Giemsa ed all'esame istologico per la presenza di *T. bryosalmonae*, mentre in un impianto (Allevamento 2) sono risultate positive 6 (42,9%) delle 14 trote fario esaminate nel mese di novembre.

Di seguito sono riportate le tabelle con i parametri dell'acqua rilevati nel corso dei campionamenti effettuati presso i tre allevamenti sottoposti ad indagine. In rosso sono evidenziati i parametri rilevati in concomitanza con le positività.

Allevamento 1	Aprile	Luglio	Novembre
Temperatura	7°C	11,5°C	10,8°C
pO ₂ (ppm)	12.3	10.8	8.6
%O ₂	113	106	92

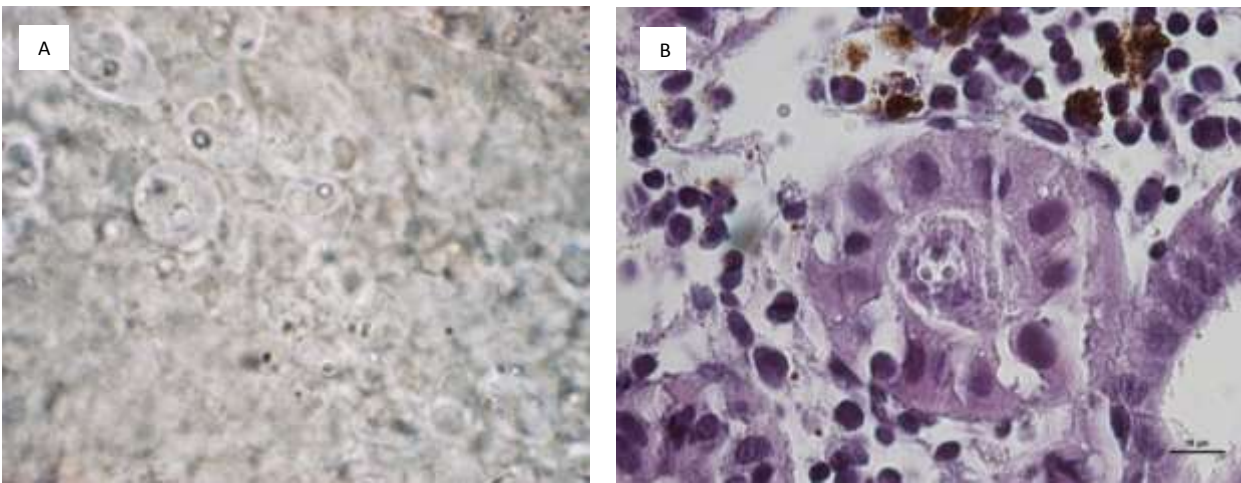
Allevamento 2	Aprile	Novembre
Temperatura	6.2°C	6.7°C
pO ₂ (ppm)	10.6	11.0
%O ₂	101	103

Allevamento 3	Aprile	Luglio	Novembre
Temperatura	8,7°C	11,0°C	8,1°C
pO ₂ (ppm)	11.7	9.8	6.3
%O ₂	105	102	89

Altri reperti patologici

In numerosi esemplari di trota fario e trota marmorata provenienti da tutti i fiumi sottoposti a campionamento è stato possibile rilevare la presenza di *Sphaerospora truttae*, un parassita Myxozoa comunemente descritto nel rene dei Salmonidi. La presenza di questo parassita non è stata comunque mai associata ad alterazioni macroscopiche o a lesioni microscopiche di rilievo del tessuto renale.

L'esame batteriologico effettuato sui pesci prelevati durante i campionamenti di settembre e novembre ha dato sempre esito negativo.



Rene di *S. trutta marmorata*: presenza all'esame microscopico a fresco (A) e all'esame istologico (B) di stadi di sviluppo e spore di *S. truttae*

DISCUSSIONE E CONSIDERAZIONI

Analizzando i risultati ottenuti nel corso dell'indagine si possono effettuare diverse considerazioni.

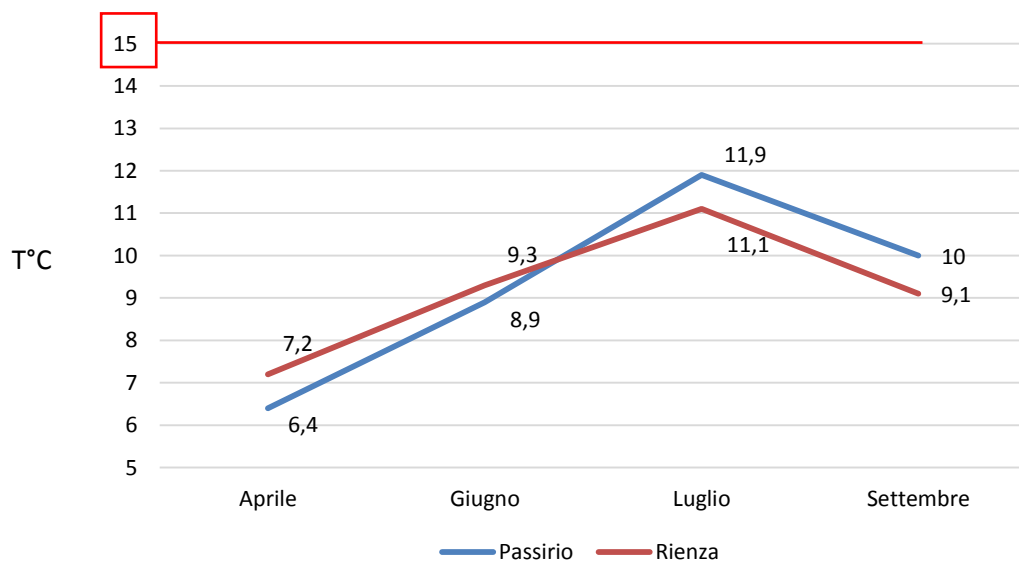
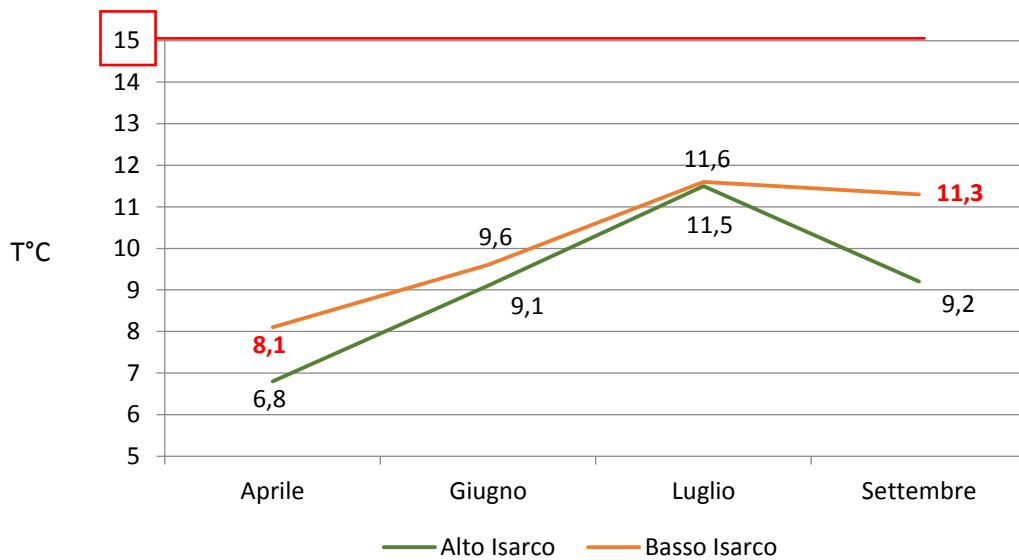
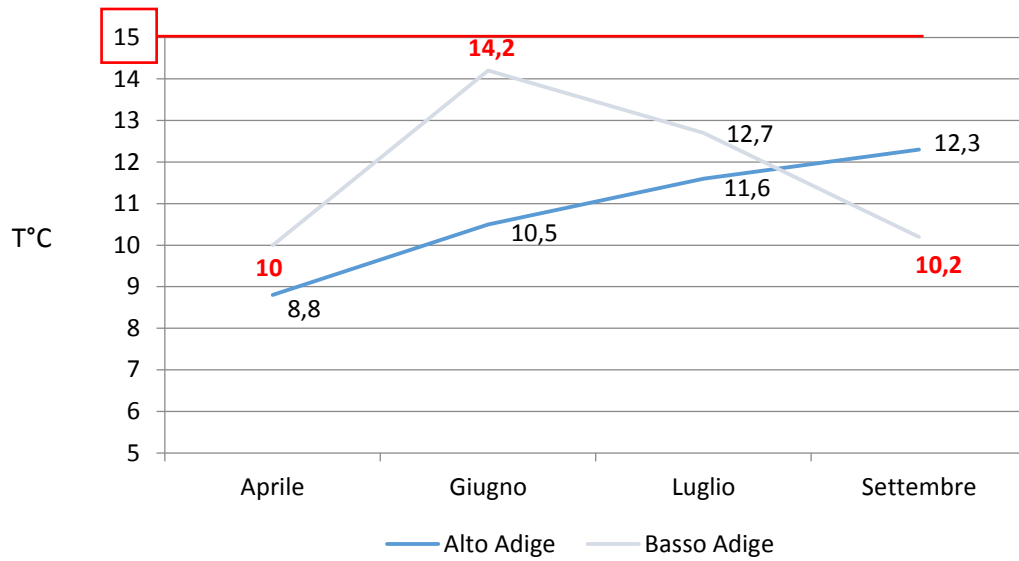
Nonostante le analisi molecolari abbiano permesso di evidenziare la positività per *Tetracapsuloides bryosalmonae* in 11 (4,6%) delle 238 trote selvatiche esaminate (solo in esemplari prelevati da siti del Basso Adige e del Basso Isarco) ed in alcune trote fario dell'Allevamento 2, in nessun caso si sono osservate all'esame anatomo-patologico lesioni e/o alterazioni riferibili alla Malattia Proliferativa Renale. Inoltre la presenza di stadi di sviluppo o spore di *T. bryosalmonae* non è mai stata rilevata all'esame microscopico delle impronte di rene e milza colorate con May-Grünwald-Giemsa o all'esame istologico, che non ha peraltro mai evidenziato quadri istopatologici riferibili alla Malattia Proliferativa Renale.

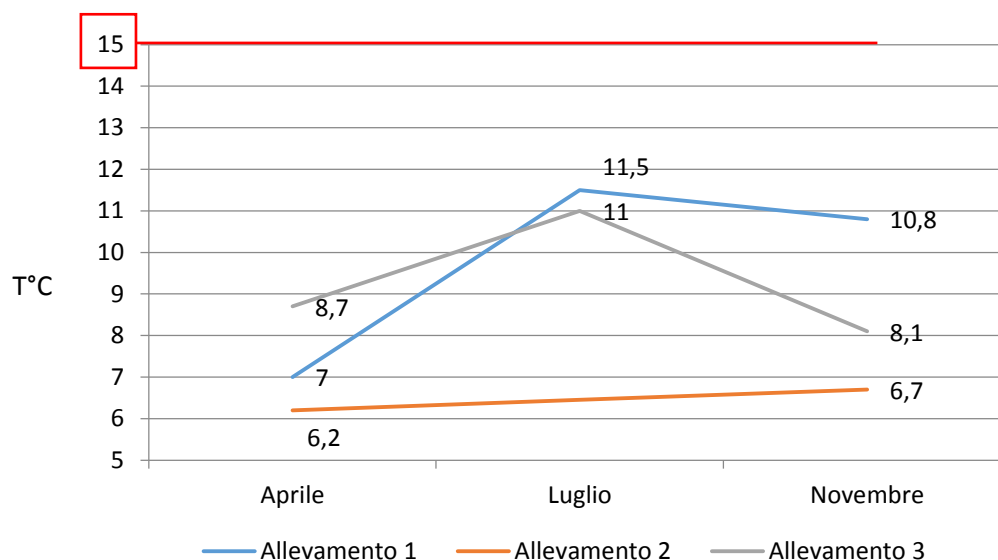
Il mancato rilievo del parassita mediante esami diagnostici basati sull'osservazione microscopica anche in pesci risultati positivi alla PCR potrebbe essere comunque ascrivibile a diversi motivi, fra cui *in primis* la difficoltà a rilevare la presenza del parassita in piccole porzioni d'organo soprattutto in caso di intensità d'infezione molto basse (Skovgaard e Buchmann, 2012). Quest'ultimo fattore spiegherebbe anche il mancato rilievo di lesioni anatomo-patologiche ed istologiche in questi esemplari, tenendo conto che le manifestazioni cliniche della Malattia Proliferativa Renale sono in genere associati ad elevate intensità d'infezione da *T. bryosalmonae* ed a diversi fattori ambientali fra cui in particolare la temperatura e la diversa suscettibilità delle specie di Salmonidi alla malattia. Infatti attualmente si ritiene che *Salmo trutta*, insieme a *Salvelinus alpinus*, possa essere considerata l'ospite ittico naturale di *T. bryosalmonae*, in grado di perpetuare il ciclo del parassita in alternanza con i briozoi e quindi meno suscettibile alla Malattia Proliferativa Renale rispetto a specie di Samonidi quali *in primis* la trota iridea.

Per quanto concerne la temperatura, in base a studi effettuati da numerosi autori questo fattore ha un'importanza determinante sia per quanto riguarda lo sviluppo del parassita nei briozoi, ospiti alternati di *T. bryosalmonae*, sia per quanto concerne l'effetto patogeno del parassita sull'ospite pesce (Ferguson, 1981; Morris *et al.*, 2005; Clifton-Hadley *et al.*, 1987; Sterud *et al.*, 2007; Bettge *et al.*, 2009). Solitamente i 15°C sono considerati un valore soglia oltre il quale la PKD comincia a manifestarsi in maniera più grave (Hedrick *et al.*, 1993; Gustinelli *et al.*, 2005; Tops *et al.*, 2006).

Nel corso della presente indagine i valori di temperatura rilevati sono stati sempre notevolmente inferiori a 15°C, anche se nel mese di giugno nel Basso Adige si è

evidenziata una temperatura pari a 14,2°C. Nei grafici sottostanti sono riportati i valori di temperatura rilevati nel corso dei campionamenti condotti nei diversi mesi dell'indagine.





Va tenuto presente comunque che, in caso di infezione massiva dovuta ad un ingente rilascio di spore da parte dei briozoi, anche le basse temperature non sono in grado di arginare episodi anche gravi di mortalità, soprattutto in ospiti suscettibili alla Malattia Proliferativa Renale quali le trote iridee, come osservato da Gustinelli *et al.* nel 2005 in un allevamento di pianura di trote iridee dove si è verificato un grave episodio della malattia durante la stagione invernale.

Alla luce di quanto finora considerato, nei bacini idrografici della Provincia di Bolzano oggetto dell'indagine non sembrano attualmente sussistere le condizioni ambientali idonee all'espressione clinica della Malattia Proliferativa Renale, con specifico riferimento a trota fario, trota marmorata e forme ibride.

Ciò nonostante, in seguito ai fenomeni di *climate change* e riscaldamento globale a cui si sta assistendo, non va trascurata la possibilità che l'aumento delle temperature medie stagionali anche nei corsi d'acqua storicamente "freddi" dell'Alto-Adige possa in un prossimo futuro permettere l'emergenza della Malattia Proliferativa Renale nei salmonidi selvatici ed allevati in questi siti (Okamura *et al.*, 2011). Peraltro negli ultimi anni sono stati osservati episodi di Malattia Proliferativa Renale anche in salmoni e trote selvatiche in areali in genere caratterizzati da acque dolci fredde a seguito di fenomeni eccezionali di siccità o di interventi antropici (Sterud *et al.*, 2007; Okamura *et al.*, 2011) o comunque in tratti fluviali caratterizzati da temperature medie annuali più alte e contenuto organico più

elevato rispetto ai tratti degli stessi fiumi situati a maggiore altitudine (Whali *et al.*, 2002; 2007; Jenčič *et al.*, 2013).

Seppur con valori di prevalenza estremamente variabili, attualmente la presenza di *T. bryosalmonae* è stata evidenziata in Europa in numerose popolazioni selvatiche di *Salmo trutta* [es. 2,5-36% in Galles (Peeler *et al.*, 2008), 12,5-75% in Slovenia (Jenčič *et al.*, 2013), 3-90% in Danimarca (Skovgaard e Buchmann, 2012), 1-100% in Estonia (Dash e Vasemägi, 2014) e Svizzera (Whali *et al.*, 2002; 2007; Schmidt-Posthaus *et al.*, 2013)], riscontrando però lesioni anatomo ed istopatologiche solo in alcuni casi (Skovgaard e Buchmann, 2012; Schmidt-Posthaus *et al.*, 2013). Si ritiene quindi al momento che l'infezione da *T. bryosalmonae* sia diffusa ampiamente in questa specie su tutto il territorio europeo, ad eccezione dell'Austria (Lahnsteiner *et al.*, 2011), ma con emergenza della malattia solo a seguito della complessa interazione di diversi fattori ambientali, ecologici ed antropici.

La presente indagine ha permesso di rilevare la positività per *T. bryosalmonae* solo nei tratti più bassi dell'Adige, con valori di prevalenza del 6,8%, e dell'Isarco, con valori del 11,7%, laddove le temperature sono mediamente più elevate durante tutto l'anno pur con valori sempre inferiori a 15°C (vedi Grafici precedenti). Nei tratti più settentrionali dei due fiumi e nei fiumi Passirio e Rienza, localizzati anch'essi nella parte più settentrionale dell'Alto-Adige, tutti i pesci sono risultati negativi. Va però evidenziato come in nessun esemplare, compresi quelli risultati positivi alla PCR, siano stati osservati segni clinici, anatomo-patologici e istopatologici riferibili alla Malattia Proliferativa Renale, la cui manifestazione sembra essere strettamente correlata a temperature superiori a 15°C.

Inoltre, i valori di prevalenza riscontrati nel Basso Adige e nel Basso Isarco risultano poco elevati, soprattutto se comparati ai dati riportati in letteratura in altri paesi europei. La negatività per *T. bryosalmonae* riscontrata nei tratti più settentrionali dell'Adige e dell'Isarco, nonché nei fiumi Passirio e Rienza potrebbe essere correlata, oltre che alla temperatura, anche alle notevoli differenze di altitudine in quanto la presenza/abbondanza dei briozoi, ospiti invertebrati necessari alla trasmissione degli stadi infettanti per le trote, sembra essere strettamente correlata a questo elemento.

Gli esemplari positivi presentavano taglie diverse riferibili a classi d'età da 0+ a >1+. L'esiguità dei campioni positivi non consente un confronto di questi dati con quelli riportati in letteratura al fine di una loro interpretazione.

Il fatto che la positività per *T. bryosalmonae* sia stata riscontrata in pesci del fiume Adige anche a temperature di 10°C e di 10,2°C (oltre che a 14,2°C) e nell'Isarco a temperature

di 8,1°C e 11,3°C non sorprende in quanto in passato si sono registrate infezioni a temperature sovrapponibili a quelle rilevate nel corso dell'indagine (Gay *et al.*, 2001). Ciò sembra essere correlato al fatto che alcune specie di briozoi, quale *in primis Fredericella sultana*, molto diffusa nei nostri sistemi fluviali, sono in grado di eliminare gli stadi infettanti per i salmonidi durante tutto l'arco dell'anno, anche a temperature rigide (Gay *et al.*, 2001). Inoltre non si può escludere che le trote positive provenissero da attività di ripopolamento, in quanto in alcuni casi la presenza di accorciamento delle pinne pettorali e della pinna caudale permetteva di ipotizzare un'origine non selvatica del pesce campionato.

Tra le trote d'allevamento solo le trote fario provenienti dall'Allevamento 2 sono risultate positive per *T. bryosalmonae* alla PCR (6 positive su 14 esaminate, con una prevalenza del 42,9%), ma essendo stabulate alla temperatura di 6,2°C non hanno mostrato segni di alterazioni patologiche né alla necropsia né all'esame istologico, sebbene non si possa escludere una precedente esposizione a *T. bryosalmonae* con mantenimento dell'infezione post-guarigione. Le trote fario positive erano comunque di grandi dimensioni e destinate al consumo, non a pratiche di ripopolamento. Tutti gli altri pesci d'allevamento esaminati sono risultati negativi per *T. bryosalmonae*, rassicurando riguardo ai possibili rischi legati alla loro introduzione in acque libere a scopo di ripopolamento. Non va infatti sottovalutata la potenziale importanza delle attività di *restocking* in relazione alla possibile introduzione di agenti patogeni che, pur non essendo a trasmissione diretta come nel caso di *T. bryosalmonae*, potrebbero comunque andare ad infettare popolazioni indenni di ospiti invertebrati (in questo caso i briozoi) idonei all'amplificazione ed alla trasmissione dell'infezione ai pesci. Oltre alle attività di sorveglianza sanitaria previste per le malattie notificabili contemplate dalla Direttiva 2006/88/CE, andrebbe quindi aumentato il livello di attenzione nei confronti di altre malattie trasmissibili che, pur non essendo notificabili, possono rappresentare un importante potenziale rischio sanitario per le popolazioni selvatiche di salmonidi.

In riferimento alla presente indagine, vanno poi evidenziate le numerose difficoltà insite nella valutazione dell'impatto di una patologia quale la Malattia Proliferativa Renale in popolazioni ittiche selvatiche.

Innanzitutto risulta estremamente difficoltoso stimare la mortalità di pesci selvatici in seguito a focolai di malattia, a meno che questa non si manifesti in maniera eclatante con elevati numeri di pesci coinvolti. La sottostima di questi episodi deriva anche dalla naturale presenza dei cosiddetti *scavengers* che, nutrendosi delle carcasse dei pesci morti, ne impediscono spesso il rilievo (Okamura *et al.*, 2011). Un altro problema è rappresentato

dalla scarsa sostenibilità che il campionamento di un elevato numero di pesci selvatici comporterebbe, portando ad effettuare prelievi di entità poco significativa dal punto di vista statistico soprattutto in zone d'indagine caratterizzate da prevalenze di PKD molto basse (Okamura *et al.*, 2011).

Inoltre il numero di fattori e variabili che possono influenzare il declino di una popolazione ittica in ambiente selvatico è estremamente elevato e necessita di un approccio multidisciplinare che possa tenere conto di tale complessità. Peraltro il verificarsi della Malattia Proliferativa Renale nelle popolazioni selvatiche di salmonidi sembra essere condizionato da numerosi fattori abiotici e biotici che ne influenzerebbero il grado d'impatto (diretto ed indiretto) sul singolo ospite e sulla popolazione intera. A tal riguardo negli anni recenti nell'ambito del Progetto Fishnetz sono stati effettuati numerosi studi con lo scopo di individuare, anche in termini predittivi, le cause del declino delle popolazioni ittiche nei fiumi svizzeri (Borsuk *et al.*, 2006; Bettge *et al.*, 2009a;b), giungendo alla conclusione che la Malattia Proliferativa Renale rientra tra i fattori di maggiore importanza nel poter determinare un impatto diretto e rilevante sull'entità delle popolazioni di salmonidi.

La comprensione del ruolo che può avere una malattia, e nel caso specifico la Malattia Proliferativa Renale, nel declino delle popolazioni ittiche selvatiche può essere complicata anche da altri fattori, quali ad esempio le numerose attività di ripopolamento che vengono in genere condotte e la presenza di uccelli ittiofagi.

A tal proposito, per quanto riguarda la massiva predazione da parte di uccelli ittiofagi e cormorani in particolare, in base a quanto riportato da ricercatori che hanno operato nell'ambito del Progetto Fishnetz in Svizzera, i dati attualmente sarebbero piuttosto scarsi e non consentirebbero una stima attendibile dell'impatto di questo fenomeno sul declino delle popolazioni ittiche (Burkhardt-Holm & Scheurer, 2007). La Provincia di Bolzano in questo senso fa eccezione in quanto l'impatto della presenza del cormorano sull'entità delle popolazioni ittiche del territorio è stato preso in considerazione nell'ambito del progetto CORMAN avviato in Trentino Alto-Adige a partire dal 2012. Al momento il cormorano sarebbe imputato del sensibile decremento della popolazione di temolo sul fiume Adige, tale da ipotizzare che al momento la predazione sia stata dirottata verso la trota fario e la trota marmorata che, assieme al temolo stesso, rappresentano le specie ittiche maggiormente predate da questo uccello nella provincia altoatesina. Inoltre alcuni fattori antropici, quali ad esempio i frequenti interventi di manutenzione dei corsi d'acqua per mettere in sicurezza gli argini, portano inevitabilmente a smantellare quegli ambienti

che costituiscono fonte di riparo e rifugio per i pesci, salmonidi *in primis*, facilitando enormemente la predazione da parte del cormorano.

Il fatto che alcuni pesci provenienti dai nostri campionamenti presentassero chiare lesioni superficiali da becco d'uccello, come si evince dall'immagine qui riportata, sembrano corroborare ulteriormente tale considerazione.



CONCLUSIONI E RACCOMANDAZIONI

- *Impatto della Malattia Proliferativa Renale sulle popolazioni di Salmo trutta in Provincia di Bolzano*

Alla luce di quanto finora considerato, nei bacini idrografici oggetto dell'indagine, nelle condizioni ambientali registrate durante la ricerca e nelle realtà ambientali/fluviali prese in esame non sembrano attualmente sussistere le condizioni tali da rendere la Malattia Proliferativa Renale impattante negativamente sulle popolazioni di salmonidi presenti, anche se il cambiamento climatico cui si sta assistendo in questi ultimi anni potrebbe nel prossimo futuro predisporre l'ambiente in studio all'emergenza della malattia, come già osservato in alcuni paesi europei.

- *Presenza di Tetracapsuloides bryosalmonae in salmonidi dell'Alto Adige.*

I risultati della presente indagine rappresentano le prime segnalazioni di positività per *T. bryosalmonae* sul territorio altoatesino sia in pesci selvatici che allevati. Fino ad oggi la Provincia di Bolzano non era stata mai considerata all'interno della zona geografica endemica per la presenza di *T. bryosalmonae*, e questo rappresenta un ampliamento dell'areale di diffusione della parassitosi in Italia. Inoltre le positività evidenziate mediante le metodiche molecolari, comunque sempre in assenza di sintomatologia e quadri anatomico ed istopatologici riferibili a Malattia Proliferativa Renale, rappresentano uno dei pochi dati relativi alla presenza di *T. bryosalmonae* in popolazioni selvatiche sul territorio italiano.

In base a quanto osservato nel corso della presente ricerca si raccomanda:

- il mantenimento di un'elevata soglia di attenzione per quanto riguarda le morie di pesci selvatici, in particolare i salmonidi, in modo da poter individuare tempestivamente l'eventuale emergenza della Malattia Proliferativa Renale, soprattutto in caso di

innalzamento delle temperature medie annuali o di situazioni metereologiche o di impatto antropico particolari;

- il monitoraggio dello stato sanitario delle partite ittiche immesse a scopo di ripopolamento, non solo in relazione alle malattie notificabili incluse nella Direttiva 2006/88/CE ma anche a tutte le malattie trasmissibili che potrebbero avere un impatto rilevante sulla salute delle popolazioni selvatiche, come dimostrato per la Malattia Proliferativa Renale;
- l'approfondimento delle conoscenze sull'epidemiologia di *T. bryosalmonae* nei sistemi fluviali della Provincia di Bolzano prendendo in considerazione anche i briozoi, ospiti invertebrati naturali del parassita e fonte di infezione per i salmonidi.

REFERENZE BIBLIOGRAFICHE

- Bettge K., Segner H., Burki R., Schmidt-Posthaus H. & Wahli T. (2009b). Proliferative kidney disease (PKD) of rainbow trout: temperature- and time related changes of *Tetracapsuloides bryosalmonae* DNA in the kidney. *Parasitology*, 136, 615–625.
- Bettge K., Wahli T., Segner H. & Schmidt-Posthaus H. (2009a). Proliferative kidney disease in rainbow trout: time- and temperature-related renal pathology and parasite distribution. *Diseases of Aquatic Organisms*, 83, 67–76.
- Borsuk M.E., Reichert P., Peter A., Schager E. & Burkhardt-Holm P. (2006). Assessing the decline of brown trout (*Salmo trutta*) in Swiss rivers using a Bayesian probability network. *Ecological Modelling*, 192, 224–244.
- Bucke D., Feist S.W. & Clifton-Hadley R.S. (1991). The occurrence of proliferative kidney disease (PKD) in cultured and wild fish: further investigations. *Journal of Fish Diseases*, 14, 583–588.
- Burkhardt-Holm P. & Scheurer K. (2007). Application of the weight-of-evidence approach to assess the decline of brown trout (*Salmo trutta*) in Swiss rivers. *Aquatic Sciences*, 69, 51–70.
- Chilmonczyk S., Monge D. & de Kinkelin P. (2002). Proliferative kidney disease: cellular aspects of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), response to parasitic infection. *Journal of Fish Diseases*, 25, 217–226.
- Clifton-Hadley R.S., Richards R.H. & Bucke D. (1986). Proliferative kidney disease (PKD) in rainbow trout *Salmo gairdneri*: further observations on the effects of water temperature. *Aquaculture*, 55, 165–171.
- Dash M. & Vasemägi A. (2014). Proliferative kidney disease (PKD) agent *Tetracapsuloides bryosalmonae* in brown trout populations in Estonia. *Diseases of Aquatic Organisms*, 109, 139–148.
- Direttiva 2006/88/CE relativa alle condizioni di polizia sanitaria applicabili alle specie animali d'acquacoltura e ai relativi prodotti
- El-Matbouli M. & Hoffman R.W. (2002). Influence of water quality on the outbreak of proliferative kidney disease – field studies and exposure experiments. *Journal of Fish Diseases*, 25, 459–467.
- Feist S.W., Peeler E.J., Gardiner R., Smith E. & Longshaw M. (2002). Proliferative kidney disease and renal myxosporidiosis in juvenile salmonids from rivers in England and Wales. *Journal of Fish Diseases*, 25, 451–458.
- Gay M., Okamura B. & de Kinkelin P. (2001). Evidence that infectious stages of *Tetracapsula bryosalmonae* for rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* are present throughout the year. *Diseases of Aquatic Organisms*, 46, 31-40.
- Grabner D.S. & El-Matbouli M. (2008) Transmission of *Tetracapsuloides bryosalmonae* (Myxozoa: Malacosporea) to *Fredericella sultana* (Bryozoa: Phylactolaemata) by various fish species. *Diseases Aquatic Organisms*, 79, 133–139.
- Grabner D.S. & El-Matbouli M. (2009). Comparison of the susceptibility of brown trout (*Salmo trutta*) and four rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) strains to the myxozoan *Tetracapsuloides bryosalmonae*, the causative agent of proliferative kidney disease (PKD). *Veterinary Parasitology*, 165, 200–206.
- Hedrick R.P., Mac Connell E. & de Kinkelin P. (1993). Proliferative Kidney Disease of salmonid fish. *Annual Review on Fishery Diseases*, 277-290.

- Lahnsteiner F., Haunschmid R. & Mansour N. (2011). Possible reason for late summer brown trout (*Salmo trutta* Linnaeus 1758) mortality in Austrian prealpine river system. *Journal of Applied Ichthyology*, 27: 83–93.
- Morris D.J. & Adams A. (2008). Sporogony of *Tetracapsuloides bryosalmonae* in the brown trout *Salmo trutta* and the role of tertiary cell during the vertebrate phase of myxozoan life cycles. *Parasitology*, 135, 1075–1092.
- Morris D.J., Adams A. (2006) Transmission of *Tetracapsuloides bryosalmonae* (Myxozoa: Malacosporea), the causative organism of salmonid proliferative kidney disease, to the freshwater bryozoan *Fredericella sultana*. *Parasitology*, 133, 701–709.
- Okamura B., Hartikainen H., Schmidt-Posthaus H. & Wahli T. (2011) Life cycle complexity, environmental change and the emerging status of salmonid proliferative kidney disease. *Freshwater Biology* 56, 735–753.
- Peeler E.J., Feist S.W., Longshaw M., Thrush M.A. & St-Hilaire S. (2008). An assessment of the variation in the prevalence of renal myxosporidiosis and epatiti in wild brown trout, *Salmo trutta* L., within and between rivers in South-West England. *Journal of Fish Diseases*, 31, 719–728.
- Saulnier D. & de Kinkelin P. (1997). Polymerase chain reaction primers for investigation on the causative agent of proliferative kidney disease of salmonids. *Journal of Fish Diseases*, 20, 467–470.
- Schager E., Peter A. & Burkhardt-Holm P. (2007). Status of young-of-the-year brown trout (*Salmo trutta fario*) in Swiss streams: factors influencing YOY trout recruitment. *Aquatic Sciences*, 69, 41–50.
- Schmidt-Posthaus H, Steiner P, Müller B, Casanova-Nakayama A (2013) Complex interaction between proliferative kidney disease, water temperature and concurrent nematode infection in brown trout. *Diseases of Aquatic Organisms*, 104: 23–34.
- Skovgaard A. & Buchmann K (2012) *Tetracapsuloides bryosalmonae* and PKD in juvenile wild salmonids in Denmark. *Diseases Aquatic Organisms* 101, 33-42.
- Sterud E., Forseth T., Ugedal O., Poppe T.T., Jørgensen A., Bruheim T., Fjeldstad H.-P. & Mo T.A. (2007). Severe mortality in wild Atlantic salmon *Salmo salar* due to proliferative kidney disease (PKD) caused by *Tetracapsuloides bryosalmonae* (Myxozoa). *Diseases of Aquatic Organisms*, 77, 191–198.
- Tops S., Lockwood W. & Okamura B. (2006). Temperature-driven proliferation of *Tetracapsuloides bryosalmonae* in bryozoan hosts portends salmonid declines. *Diseases of Aquatic Organisms*, 70, 227–236.
- Wahli T., Bernet D., Segner H. & Schmidt-Posthaus H. (2008). Role of altitude and water temperature as regulating factors for the geographical distribution of *Tetracapsuloides bryosalmonae* infected fishes in Switzerland. *Journal of Fish Biology*, 73, 2184–2197.
- Wahli T., Bernet D., Steiner P.A. & Schmidt-Posthaus H. (2007). Geographic distribution of *Tetracapsuloides bryosalmonae* infected fish in Swiss rivers: an update. *Aquatic Sciences*, 69, 3–10.
- Wahli T., Knuesel R., Bernet D., Segner H., Pugovkin D., Burkhardt-Holm P., Escher M. & Schmidt-Posthaus H. (2002). Proliferative kidney disease in Switzerland: current state of knowledge. *Journal of Fish Diseases*, 25, 491–500.

Wood, T.S., 2002. Freshwater bryozoans: a zoogeographical reassessment. In: WyseJackson, P.N., Buttler, C.J., SpencerJones, M.E. (Eds.), *Bryozoan Studies 2001*. Swets and Zeitlinger, Lisse, pp. 339–345.

Wootton R. & McVicar A.H. (1982). Some preliminary observations on proliferative kidney disease in wild brown trout, *Salmo trutta* L., in a Scottish stream. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 2, 60–62.

Zimmerli S., Bernet D., Burkhardt-Holm P., Schmidt Posthaus H., Vonlanthen P., Wahli T. & Segner H. (2007). Assessment of fish health status in four Swiss rivers showing a decline of brown trout catches. *Aquatic Sciences*, 69, 11–25.

ALLEGATO 1

Tabelle dei risultati delle analisi molecolari condotte per la ricerca di *Tetracapsuloides bryosalmonae* (F = trota fario; M = trota marmorata; H = ibridi)

Sito	Data	Lunghezza	Peso	Specie	Codice	Pool	PCR pool	PCR singola
Alto Adige (Adige 1)	Aprile 2013	9,5	10	H	A1	AP1	Negativo	-
		16	35	F	A2			-
		12	20	H	A3			-
		13	21	H	A4			-
		25	168	F	A5			-
		15	30	H	A6			-
		16	37	H	A7			-
		11	10	M	A8			-
		11	10	M	A9			-
		13	18	F	A10			-
Basso Adige (Adige 2)		12	14	H	A11	AP2	Positivo	Negativo
		13	26	H	A12			Negativo
		11	14	H	A13			Positivo
		13	20	F	A14			Positivo
Sito	Data	Lunghezza	Peso	Subsp.	Codice	Pool	PCR pool	PCR singola
Alto Adige (Adige 1)	Giugno 2013	14	21	H	A16	AP3	Negativo	-
		11	10	H	A17			-
		15	23	M	A18			-
		18	46	H	A19			-
		13	22	F	A20			-
		15	26	M	A21			-
		17	39	M	A22			-
		15	25	F	A23			-
		15	23	F	A24			-
		11	14	M	A25			-
Basso Adige (Adige 2)		17	45	M	A26	AP4	Positivo	Positivo
		15	30	F	A27			Negativo
		15	27	H	A28			Negativo
		14	23	H	A29			Negativo
		12	14	F	A30			Negativo
Sito	Data	Lunghezza	Peso	Subsp.	Codice	Pool	PCR pool	PCR singola
Alto Adige (Adige 1)	Luglio 2013	19	64	H	A31	AP5	Negativo	-
		17,5	25	M	A32			-
		18	53	M	A33			-
		15	32	F	A34			-
		21	66	H	A35			-
		15	24	H	A36			-
		17,5	45	F	A37			-
		13,5	20	F	A38			-
		13	20	M	A39			-
		13	18	H	A40			-
Basso Adige (Adige 2)		20	44	M	A41	AP6	Negativo	-
		17	28	F	A42			-
		17	30	M	A43			-
		16	28	H	A44			-
		14	22	H	A45			-

Sito	Data	Lunghezza	Peso	Subsp.	Codice	Pool	PCR pool	PCR singola
Basso Adige (Adige 2)	Settembre 2013	22,5	122	F	A46	AP7	Positivo	Negativo
		21,5	87	M	A47			Negativo
		19,5	68	H	A48			Negativo
		18	63	H	A49			Positivo
		11,5	15	H	A50			Negativo
		9	9	F	A51			Negativo
		8,5	6	M	A52			Negativo
		7,8	5	H	A53			Negativo
Alto Adige (Adige 1)		36	732	M	A54	AP8	Negativo	-
		33	350	H	A55			-
		29	250	H	A56			-
		25	150	M	A57			-
		14	30	F	A58			-
		8,5	7	F	A59			-
		8	6	M	A60			-
Sito	Data	Lunghezza	Peso	Subsp.	Codice	Pool	PCR pool	PCR singola
Isarco 1	Aprile 2013	20,5	82	M	I1	IP1	Positivo	Negativo
		18	56	H	I2			Negativo
		22	97	H	I3			Positivo
		18	60	H	I4			Negativo
		19	67	M	I5			Negativo
		17	43	M	I6			Negativo
		15	31	F	I7			Negativo
		12,5	17	H	I8			Negativo
		12,5	18	F	I9			Positivo
		12	20	F	I10			Negativo
Isarco 2		21	80	H	I11	IP2	Negativo	-
		12	20	H	I12			-
		15,5	28	M	I13			-
		11	10	M	I14			-
		9	11	F	I15			-
Sito	Data	Lunghezza	Peso	Subsp.	Codice	Pool	PCR pool	PCR singola
Isarco 1	Giugno 2013	20	74	H	I16	IP3	Negativo	-
		19	55	H	I17			-
		12	19	M	I18			-
		18	52	F	I19			-
		20	67	H	I20			-
		19	58	M	I21			-
		12	10	H	I22			-
		16	35	H	I23			-
		15	27	F	I24			-
		10	8	M	I25			-
Isarco 2		13	15	M	I26	IP4	Negativo	-
		12	13	H	I27			-
		22	88	M	I28			-
		13	19	H	I29			-
		15	27	F	I30			-

Sito	Data	Lunghezza	Peso	Subsp.	Codice	Pool	PCR pool	PCR singola
Isarco 1	Luglio 2013	22	85	H	I31	IP5	Negativo	-
		21,5	78	F	I32			-
		22	98	H	I33			-
		29,5	244	F	I34			-
		28,5	250	H	I35			-
		19	59	H	I36			-
		22,5	111	M	I37			-
		25	127	M	I38			-
		23,5	100	F	I39			-
		24	129	H	I40			-
Isarco 2		20	62	H	I41	IP6	Negativo	-
		18	46	F	I42			-
		14	22	H	I43			-
		23	46	M	I44			-
		13	23	M	I45			-
Sito	Data	Lunghezza	Peso	Subsp.	Codice	Pool	PCR pool	PCR singola
Isarco 1	Settembre 2013	34	386	F	I46	IP7	Positivo	Negativo
		33.5	402	F	I47			Positivo
		32.2	328	H	I48			Positivo
		34.3	316	F	I49			Positivo
		29.8	251	H	I50			Positivo
		19.1	76	M	I51			Positivo
		11.4	15	H	I52			Negativo
		9.2	8	F	I53			Negativo
		12	17	H	I54			-
		11.8	16	F	I55			-
Isarco 2		10.4	12	M	I56	IP8	Negativo	-
		10.1	13	H	I57			-
		9.4	8	H	I58			-
		9.5	10	H	I59			-
		9.2	9	M	I60			-
Sito	Data	Lunghezza	Peso	Subsp.	Codice	Pool	PCR pool	PCR singola
Passirio	Aprile 2013	23	135	M	P1	PP1	Negativo	-
		15	28	H	P2			-
		18	52	H	P3			-
		33	434	H	P4			-
		25,5	176	M	P5			-
		20	103	M	P6			-
		15,5	40	F	P7			-
		28	243	F	P8	PP2	Negativo	-
		11,5	14	H	P9			-
		15	33	H	P10			-
		15	28	H	P11			-
		14,5	28	M	P12			-
		11	14	H	P13			-
		12,5	20	H	P14			-
		24	138	M	P15			-

Sito	Data	Lunghezza	Peso	Subsp.	Codice	Pool	PCR pool	PCR singola
Passirio	Giugno 2013	15,5	30	F	P16	PP3	Negativo	-
		7	3	H	P17			-
		13	22	H	P18			-
		16	40	H	P19			-
		15	25	M	P20			-
		13	18	M	P21			-
		27	138	H	P22			-
		18	47	M	P23	PP4	Negativo	-
		16	34	M	P24			-
		18	53	H	P25			-
		15	26	M	P26			-
		19	60	F	P27			-
		17	39	Iridea	P28			-
		11	11	F	P29			-
		15	20	H	P30			-
		Sito	Data	Lunghezza	Peso	Subsp.	Codice	Pool
Passirio	Luglio 2013	24	157	F	P31	PP5	Negativo	-
		17	50	H	P32			-
		15	24	H	P33			-
		20	80	M	P34			-
		18	50	F	P35			-
		16	35	F	P36			-
		13	20	H	P37			-
		15,5	37	H	P38	PP6	Negativo	-
		15	34	H	P39			-
		14	24	M	P40			-
		14	22	M	P41			-
		12	11	F	P42			-
		14	26	H	P43			-
		12	12	M	P44			-
		12	14	H	P45			-
		Sito	Data	Lunghezza	Peso			Subsp.
Passirio	Settembre 2013	33,5	375	F	P46	PP7	Negativo	-
		21	94	H	P47			-
		20,5	89	H	P48			-
		17,5	54	M	P49			-
		11,5	16	F	P50			-
		11	16	F	P51			-
		13,5	29	M	P52			-
		10	11	H	P53	PP8	Negativo	-
		10	8	M	P54			-
		7,5	3	H	P55			-
		36,5	654	H	P56			-
		32,5	371	H	P57			-
		31	358	H	P58			-
		31	370	M	P59			-
		31	391	F	P60			-

Sito	Data	Lunghezza	Peso	Subsp.	Codice	Pool	PCR pool	PCR singola
Rienza	Aprile 2013	20	9	M	R1	RP1	Negativo	-
		10	10	H	R2			-
		13,5	25	F	R3			-
		11	11	F	R4			-
		10	12	M	R5			-
		23,5	129	H	R6			-
		20	61	H	R7	RP2	Negativo	-
		12	13	F	R8			-
		12	15	H	R9			-
		12	13	M	R10			-
		13	17	M	R11			-
		11	13	F	R12			-
		12,5	17	F	R13			-
		14	23	H	R14			-
		10	9	H	R15			-
Sito	Data	Lunghezza	Peso	Subsp.	Codice	Pool	PCR pool	PCR singola
Rienza	Giugno 2013	29	202	F	R16	RP3	Negativo	-
		10	9	M	R17			-
		13	19	M	R18			-
		12	10	M	R19			-
		15	23	H	R20			-
		14	22	F	R21			-
		13,5	26	H	R22	RP4	Negativo	-
		10	10	H	R23			-
		13	18	F	R24			-
		13	13	F	R25			-
		13	16	M	R26			-
		11	14	F	R27			-
		10	8	M	R28			-
		12	14	M	R29			-
		10,5	14	H	R30			-
Sito	Data	Lunghezza	Peso	Subsp.	Codice	Pool	PCR pool	PCR singola
Rienza	Luglio 2013	19	61	H	R31	RP5	Negativo	-
		14	21	F	R32			-
		14	21	M	R33			-
		18	44	H	R34			-
		11	11	M	R35			-
		14	25	F	R36			-
		21	77	F	R37	RP6	Negativo	-
		15	35	F	R38			-
		13	25	M	R39			-
		12	14	H	R40			-
		12	11	F	R41			-
		14	25	H	R42			-
		10	10	H	R43			-
		11	14	M	R44			-
		9	9	M	R45			-

Sito	Data	Lunghezza	Peso	Subsp.	Codice	Pool	PCR pool	PCR singola
Rienza	Settembre 2013	8	6	F	R46	RP7	Negativo	-
		8	9	F	R47			-
		7,5	6	M	R48			-
		9	8	H	R49			-
		10	8	H	R50			-
		8	6	F	R51			-
		7,5	5	H	R52			-
		30	264	M	R53	RP8	Negativo	-
		19	95	F	R54			-
		19	82	F	R55			-
		16,5	56	M	R56			-
		17,5	67	H	R57			-
		15,5	42	H	R58			-
		15	34	H	R59			-
		-	-	-	R60			-

Sito	Data	Lunghezza	Peso	Subsp.	Codice	Pool	PCR pool	PCR singola
Allevamento 1	Aprile 2013	18	76	M	W1	WP1	Negativo	-
		17	48		W2			-
		17	56		W3			-
		19	50		W4			-
		20	60		W5			-
		23	120		W6			-
		19	69		W7			-
		20	90		W8			-
		21	96		W9			-
		20	89		W10			WP2
		20	92		W11	-		
		18	62		W12	-		
		16	46		W13	-		
		18	67		W14	-		
		13	15		W15	-		
	Luglio 2013	22	76	M	W16	WP3	Negativo	-
		21	93		W17			-
		20	43		W18			-
		22	110		W19			-
		22	112		W20			-
		21	101		W21	-		
		20	81		W22	-		
		21	88		W23	WP4	Negativo	-
		21	77		W24			-
		21	92		W25			-
		22	101		W26			-
		22	117		W27			-
		22	88		W28	-		
		21	81		W29	-		
		22	105		W30	WP5	Negativo	-
	Luglio 2013	23	111	M	W31			-
		23	87		W32			-
		22	114		W33			-
		24	120		W34			-
		22	103		W35	-		
		16	32		W36	-		
		19	54		W37	-		
		23	109		W38	WP6	Negativo	-
		21	95		W39			-
		13	50		W40			-
	14	25	W41	-				
	16	35	W42	-				
	20	75	W43	-				
	23	108	W44	-				

Sito	Data	Lunghezza	Peso	Subsp.	Codice	Pool	PCR pool	PCR singola
Allevamento 1	Novembre 2013	11,5	16	M	W45	WP7	Negativo	
		11,3	15		W46			-
		10	10		W47			-
		9,4	6		W48			-
		12	14		W49			-
		11,7	16		W50			-
		9,4	7		W51			-
		12,5	17		W52			-
		11,5	11		W53	WP8	Negativo	-
		10,8	8		W54			-
		12,5	16		W55			-
		11,5	10		W56			-
		10,3	9		W57			-
		10,6	10		W58			-
		11,6	14		W59			-
		11,4	13		W60			-

Sito	Data	Lunghezza	Peso	Subsp.	Codice	Pool	PCR pool	PCR singola	
Allevamento 2	Aprile 2013	Avannotti		M	X1	XP1	Negativo	-	
					X2			-	
					X3			-	
					X4			-	
					X5			-	
					X6			-	
					X7			-	
					X8			-	
					X9			-	
					X10	XP2	Negativo	-	
					X11			-	
					X12			-	
					X13			-	
					X14			-	
					X15			-	
	Novembre 2013				F	X16	XP3	Positivo	Positivo
						X17			Negativo
						X18			Positivo
						X19			Negativo
						X20			Positivo
						X21			Positivo
						X22			Negativo
						X23			XP4
						X24	Negativo		
						X25	Positivo		
						X26	Positivo		
						X27	Negativo		
						X28	Negativo		
						X29	Negativo		

Sito	Data	Lunghezza	Peso	Subsp.	Codice	Pool	PCR pool	PCR singola				
Allevamento 3	Aprile 2013	15,5	29	M	Y1	YP1	Negativo	-				
		15,5	16		Y2			-				
		15,5	37		Y3			-				
		15,5	34		Y4			-				
		15,5	66		Y5			-				
		15,5	21		Y6			-				
		15,5	34		Y7			-				
		15,5	26		Y8			-				
		15,5	34		Y9			-				
		15,5	18		Y10			YP2	Negativo	-		
		15,5	36		Y11	-						
		15,5	18		Y12	-						
		15,5	15		Y13	-						
		15,5	44		Y14	-						
		Luglio 2013	Luglio 2013		13,5	13	M	Y15	YP3	Negativo	-	
	12			20	Y16	-						
	12			22	Y17	-						
	15			42	Y18	-						
	15			41	Y19	-						
	16			48	Y20	-						
	16,5			55	Y21	-						
	14			22	Y22	-						
	14			33	Y23	YP4		Negativo			-	
	12			16	Y24						-	
	13			13	Y25				-			
	12			19	Y26				-			
	13			22	Y27				-			
	Luglio 2013			Luglio 2013	8,5	6		M	Y28	YP5	Negativo	-
					14,5	29			Y29			-
		13	25		Y30	-						
		12	17		Y31	-						
		12	19		Y32	-						
		12	17		Y33	-						
		11	18		Y34	-						
		11,5	18		Y35	-						
		9,5	8		Y36	-						
		10	12		Y37	-						
		11	17		Y38	YP6	Negativo		-			
		9	10		Y39				-			
		11	17		Y40				-			
		10	9		Y41				-			
		8	5		Y42				-			
	Luglio 2013	Luglio 2013	9,5	8	M	Y43	YP6	Negativo	-			
			9	5		Y44			-			
			8	6		Y45			-			

Sito	Data	Lunghezza	Peso	Subsp.	Codice	Pool	PCR pool	PCR singola		
Allevamento 3	Novembre 2013	18,3	48	M	Y45	YP7	Negativo			
		16,4	41		Y46			-		
		13,6	18		Y47			-		
		17,6	50		Y48			-		
		15,8	39		Y49			-		
		16,4	38		Y50			-		
		12,3	14		Y51			-		
		14,8	33		Y52			-		
		13,2	17		Y53	-				
		12,7	18		Y54	-				
		11,8	14		Y55	-				
		13,9	21		Y56	-				
		14,4	27		Y57	-				
		10,5	10		Y58	-				
		12,4	15		Y59	-				
		18,3	48		Y60	-				
								YP8	Negativo	