



Università degli Studi di Cagliari

DOTTORATO DI RICERCA

Biologia e Biochimica dell'Uomo e dell'Ambiente

Ciclo XXVI

**PROTOZOI ED ELMINTI PARASSITI DEI
MOLLUSCHI CEFALOPODI DELLE ACQUE
CIRCOSTANTI LA SARDEGNA
MORFOLOGIA, SISTEMATICA, EPIDEMIOLOGIA,
POSSIBILE UTILIZZO DEI PARASSITI COME
INDICATORI BIOECOLOGICI**

Bio/05

Presentata da: Jacopo Culurgioni

Coordinatore Dottorato: Prof. Emanuele Sanna

Tutor: Prof.ssa Anna Maria Deiana

Esame finale anno accademico 2012 – 2013

Indice

1. INTRODUZIONE.....	10
2. CARATTERISTICHE GENERALI DEI CEFALOPODI. EVOLUZIONE, MORFOLOGIA, BIOLOGIA, PESCA	14
3. I CEFALOPODI DELLE ACQUE CIRCOSTANTI LA SARDEGNA.....	19
3.1 Superordine OCTOPODIFORMES Berthold & Engeser, 1987 o OCTOBRACHIA Fioroni, 1881	21
3.2 Superordine DECAPODIFORMES Young, Vecchione & Donovan, 1998 o DECABRACHIA Boettger, 1952.....	26
4. I PARASSITI DEI CEFALOPODI.....	42
4.1 Funghi, Dicyemidi	43
4.2 Regno Protozoa.....	44
4.2.1 Phylum Apicomplexa	45
4.3 Regno Metazoa	47
4.3.1 Phylum Platyhelminthes	47
4.3.2 Phylum Nematoda.....	51
4.4 I parassiti come indicatori biologici.....	53
5. MATERIALI E METODI	56
5.1 Campionamento degli ospiti.....	56
5.2 Ricerca ed estrazione dei parassiti	61
5.3 Osservazioni al microscopio ottico	62
5.4 Identificazione dei parassiti	62
5.5 Dati statistici	63
5.6 Osservazioni istologiche.....	63
6. RISULTATI GENERALI	66
7. PROTOZOI DEL GENERE <i>AGGREGATA</i> (APICOMPLEXA: EUCCOCCIDIORIDA) PARASSITI DI CEFALOPODI DELLE ACQUE CIRCOSTANTI LA SARDEGNA	72
7.1 Introduzione	72
7.2 Materiali e metodi	74
7.3 Risultati.....	76
7.3.1 <i>Aggregata octopiana</i> in <i>O. vulgaris</i>	76
7.3.2 <i>Aggregata sagittata</i> in <i>Todarodes sagittatus</i>	79
7.3.3 <i>Aggregata</i> sp. inq. in <i>Histioteuthis reversa</i> e <i>H. bonnellii</i>	82
7.3.4 <i>Aggregata</i> spp. in altre specie di cefalopodi.....	85
7.3.5 Discussione	86
8. LARVE DI NEMATODI PARASSITI DEI CEFALOPODI DELLE ACQUE CIRCOSTANTI LA SARDEGNA	100

8.1 Introduzione	100
8.2 Materiali e metodi	102
8.3 Risultati.....	106
8.3.1 Larve al terzo stadio di <i>Lappetascaris</i> sp.	107
8.3.2 Larve al terzo stadio del genere <i>Anisakis</i>	114
8.3.3 Larve di nematodi individuate in microscopia.....	119
8.4 Discussione	121
9. STADI LARVALI DI PLATELMINTI PARASSITI DEI CEFALOPODI NELLE ACQUE CIRCOSTANTI LA SARDEGNA	142
9.1 Introduzione	142
9.2 Materiali e Metodi.....	144
9.3 Risultati.....	145
9.4 Discussione	146
10. DISCUSSIONE GENERALE E CONCLUSIONI	154
BIBLIOGRAFIA	171
Ringraziamenti.....	194
Annesso – pubblicazioni e contributi a congressi durante il periodo di Dottorato.....	195

Indice delle Figure

Figura 1.1 - Raffigurazioni artistiche con al centro cefalopodi. A - Brocchetta minoica conservata nel museo di Palaikastro (Creta); B - Illustrazione di A. de Neuville presente nella prima edizione di “20000 leghe sotto i mari” di J. Verne. (fonte Wikimedia)	13
Figura 2.1 - Raffigurazione schematica dell'anatomia di un cefalopode (<i>Sepia</i>). (Fonte Wikimedia/Citron)	15
Figura 4.1 – Ciclo di <i>Aggregata eberthi</i> (Apicomplexa)	46
Figura 4.2 – Cestoda. Struttura di un adulto e varietà di forme larvali. (Caira & Reyda, 2005)	49
Figura 4.3 – Sottoclasse Digenea. A sinistra, stadi biologici. A: uovo; B: miracidio; C: sporocisti; D: cercaria; E: metacercaria; F: adulto. A destra, morfotipi larvali di Didymozoidae. A: <i>Torticaecum</i> ; B: <i>Monilicaecum</i> . (Grabda, 1991; Nikolaeva, 1970).	51
Figura 4.4 – Nematoda. A sinistra, caratteristiche generali. A: maschio, B: femmina. a, ano; bc, capsula boccale; nr, anello nervoso; ep, poro escretore; mo, esofago; go, ventricolo; i, intestino; t, testicolo; u, utero; s, spicole; v, vulva; va, vagina. In alto, distinzione per genere di larve anisakidi in base alla posizione del poro escretore e alla presenza di appendice e ventricolo (Moravec, 1994). A: <i>Anisakis</i> ; B: <i>Phocanema</i> ; C: <i>Porrocaecum</i> ; D: <i>Contracaecum</i> ; E: <i>Hysterothylacium</i> ; F: <i>Raphidascaris</i> (Grabda, 1991). In basso, schematizzazione del ciclo di <i>Anisakis simplex</i> , valido anche per <i>A. pegreffii</i> ma anche per altri <i>Anisakis</i> in senso generale (Grabda, 1991, modificato).	53
Figura 5.2 - Localizzazione delle pescate al polpo con le nasse effettuate dagli operatori della marineria di Su Pallosu nell'ambito del progetto CAMP (Cau et al. 2013).	59
Figura 6.1 – Composizione della parassitofauna elmintica in cefalopodi Oegopsida, nella quale dominano i nematodi Anisakidae. A – <i>Illex coindetii</i> ; B – <i>Todarodes sagittatus</i> ; C – <i>Histioteuthis reversa</i> ; D – <i>Histioteuthis bonnellii</i> ; E – <i>Todaropsis eblanae</i> ; F – <i>Ancistroteuthis lichtensteini</i>	71
Figura 5.1 – <i>Aggregata octopiana</i> : evidenze macroscopiche dell'infezione, a diversi gradi di intensità, in <i>O. vulgaris</i> . A – infezione di intensità 1; B – infezione di intensità 2; C – infezione di intensità 3 con coinvolgimento delle branchie; D – intensità 3 con oocisti di grandi dimensioni nelle membrane del sacco viscerale.	89
Figura 7.2 - <i>Aggregata octopiana</i> : stadi sporogonici al microscopio ottico (obiettivi 2x-100x). A – Oocisti nel cieco, in una infezione di livello 3; B – Oocisti (sinistra), zigote (in alto) e sporonte; C – sporocisti gigante (aal centro) con un numero elevato di sporozoitii all'interno, e focus sulla superficie delle sporocisti (riquadro); D – sporozoitii all'interno di una sporocisti aperta.	90
Figura 7.3 - <i>Aggregata octopiana</i> : sezioni istologiche di tessuti di <i>O. vulgaris</i> infetti. A – oocisti intorno alle quali si verificano compressione e distrazione della sottomucosa; B – macrogamonte; C – fase iniziale di partizione di un microgamonte; D – sporonte in fase iniziale, visibili i ripiegamenti della membrana, le partizioni citoplasmatiche e i numerosi nuclei dei futuri sporoblasti.	91
Figura 7.4 - <i>Aggregata sagittata</i> : osservazioni macro- e microscopiche in <i>T. sagittatus</i> . A – piccole oocisti visibili dall'esterno dello stomaco; B – oocisti, sporonti e macrogamonti; C – disposizione ordinata delle sporocisti in vari strati, in una oocisti sotto leggera pressione; D – sporocisti con visibile il corpo residuo e la disposizione degli sporozoitii.	92

- Figura 7.6 – *Aggregata* sp.: osservazioni macro- e microscopiche in *H. reversa*. A – basso ingrandimento di oocisti nel lume del cieco spirale; B – macrogamonti, oocisti e zigoti nello stesso organo (microscopio ottico); C, D – sporocisti e sporozoiti. Notare le dimensioni ridotte delle prime e grandi di questi ultimi, correlate al loro numero ridotto all'interno di ciascuna. 94
- Figura 7.7 – *Aggregata* sp.: osservazioni morfologiche dai preparati istologici di tessuti di *H. reversa* e *H. bonnellii*. A – Macrogamonte; B – microgamonte in fase iniziale; C – sporonte con sporoblasti visibili; D – oocisti della quale è visibile la superficie granulosa; D – sporocisti (notare la parete sottile) e disposizione dei 3 sporozoiti. 95
- Figura 7.8 - *Aggregata* sp.: osservazioni istopatologiche da tessuti di *H. reversa* e *H. bonnellii*. A – discontinuità della mucosa del cieco e destrutturazione della sottomucosa in presenza delle forme parassite; B – strato pericistico di origine connettivale intorno ad una oocisti; C – infiltrazione di cellule ematiche e fagociti intorno ad un macrogamonte destinato ad essere distrutto..... 96
- Figura 7.9 – *Aggregata* spp.: forme sporogoniche osservate una tantum in cefalopodi. A, B – oocisti immatura e sporocisti mature da stomaco di *A. lichtensteini*; C, D – sporocisti estratte da una oocisti nello stomaco di *Rossia macrosoma*..... 97
- Figura 7.10 - *A. octopiana*. in *O. vulgaris*. A – Percentuale di infezione per organo; B – correlazione tra grado di intensità dell'infezione e condizioni di maturazione delle gonadi... 98
- Figura 7.11 – *A. sagittata* in *T. sagittatus*. A – Percentuale di infezione per organo; B – correlazione tra grado di intensità dell'infezione e condizioni di maturazione delle gonadi. C – prevalenza del parassita per classe di taglia dell'ospite; D – prevalenza del parassita per grado di maturazione delle gonadi. Come specificato nel testo, i totani infetti sono tutti di sesso femminile..... 98
- Figura 7.12 – *Aggregata* sp. inq. in *H. reversa*. A – Percentuale di infezione per organo; B – correlazione tra grado di intensità dell'infezione e condizioni di maturazione delle gonadi. C – prevalenza del parassita per sesso dell'ospite (0u = indifferenziato); D – prevalenza del parassita per grado di maturazione delle gonadi..... 99
- Figura 7.13 - *Aggregata* sp. inq. in *H. bonnellii*. A – Percentuale di infezione per organo; B – correlazione tra grado di intensità dell'infezione e condizioni di maturazione delle gonadi. C – prevalenza del parassita per sesso dell'ospite (0u = indifferenziato); D – prevalenza del parassita per grado di maturazione delle gonadi..... 99
- Figura 8.1 – Immagini macroscopiche di larve al terzo stadio di *Lappetascaris* sp. Tipo A. A – Mantello di *T. sagittatus* con numerose lesioni biancastre essudative nella muscolatura dovute alla presenza di cavità contenenti larve. Si noti la pigmentazione in corrispondenza di alcune lesioni; B – larva nell'atto di fuoriuscire da una lesione di incistamento; C – inusuale localizzazione di una larva nel corpo vitreo dell'occhio di *H. bonnellii*. 128
- Figura 8.2 – Disegni descrittivi delle larve di *Lappetascaris* sp. Tipo A. A – esemplare in toto. Si nota l'estremo sviluppo dell'appendice ventricolare (av) e la conformazione della parte posteriore dell'intestino (i). B – porzione anteriore della larva, con in evidenza il cieco intestinale, il ventricolo, l'anello nervoso e il poro escretore..... 129
- Figura 8.3 - *Lappetascaris* sp. Tipo A, larva L3 al microscopio ottico. A – esemplare in toto. B – porzione cefalica che evidenzia la struttura chitinoso di rivestimento degli abbozzi delle labbra; C – Porzione caudale con minuto aculeo terminale. 130

- Figura 8.4 - *Lappetascaris* sp., immagini al SEM. A – porzione anteriore, con la posizione del poro escretore (nel riquadro); B – terminazione cefalica, si nota il cappuccio chitinoso che riveste interamente le labbra. La freccia indica i processi laterali in rilievo; C – porzione caudale conico-digitiforme. Si nota la lieve anulatura della cuticola; D – aculeo terminale che appare diviso in due articoli di circa 3 e 4 μm ; E – anulatura della cuticola nella porzione mediana del corpo, a forte ingrandimento; F – superficie della cuticola, non anulata ma ruvida, in corrispondenza dell'estremità cefalica. 131
- Figura 8.5 – Larve di *Lappetascaris* sp. Tipo B (sensu Nagasawa e Moravec, 2002). A – larve di diverse dimensioni nella mucosa gastrica di *I. coindetii*; B – esemplare in toto nel quale è visibile la lunga appendice ventricolare; C – estremità anteriore, visibile la capsula boccale tipica di *Lappetascaris*; D – estremità caudale con aculeo terminale..... 132
- Figura 8.6 – Osservazioni macroscopiche di larve al terzo stadio di *Anisakis*. A – *Anisakis* Type 2 (= *A. physeteris*) in gonadi di *T. sagittatus*; B – *Anisakis* Type 2 in membrana intorno alla massa viscerale di *H. bonnellii*; C - *Anisakis* Type 1 (*A. pegreffii*) in parete gastrica di *I. coindetii*..... 133
- Figura 8.7 – *Anisakis* L3 Type 1, corrispondente alla specie *A. pegreffii*. A – esemplare *in toto*; B – estremità cefalica con poro escretore (freccia) e dente; C – ventricolo allungato; D – estremità caudale con mucron. 134
- Figura 8.8 - *Anisakis* L3 Type 2, corrispondente alla specie *A. physeteris*. A – esemplare intero; B – porzione anteriore nella quale si distinguono il dente perforatore e il ventricolo corto; C – estremità caudale, si nota la forma conica e l'assenza di mucron. 135
- Figura 8.9 – *Spinitectus* sp., larva al terzo stadio: unico esemplare da stomaco di *I. coindetii*. A – la larva *in toto* nella quale si notano la lunghezza della parte ghiandolare del tratto digerente e gli abbozzi delle gonadi (follicoli circolari disposti in lunghe serie); B – porzione anteriore includente l'esofago; C – porzione caudale; D – dettaglio sugli aculei che compongono gli anelli cuticolari. 136
- Figura 8.10 – Sezioni istologiche raffiguranti infezioni da anisakidi in cefalopodi. A – *A. physeteris* in *H. bonnellii*. Nell'immagine, ad alto contrasto, si nota la scarsa colorazione della capsula fibrosa intorno al verme, che ne indica la natura elastica; B – *Lappetascaris* sp. Tipo A in mantello di *H. bonnellii*. Si nota l'estensione della lesione e lo spazio occupato dalla resina che nella lesione *in vivo* contiene l'essudato infiammatorio; C – dettaglio sulla concentrazione di emociti crescente in prossimità della lesione e sulla disposizione concentrica di fibre esternamente al fenomeno infiammatorio; D – destrutturazione del tessuto muscolare in prossimità della lesione vera e propria. 137
- Figura 8.11 - PCR della regione ITS; M: Molecular weight marker; 1: controllo positivo; 12: controllo negativo (Foto M.C. Piras, 2014)..... 138
- Figura 8.12 - RFLP patterns della regione ITS con l'enzima di restrizione HinfI. M: Molecular weight marker; 1: Uncut; 2, 4, 5, 7, *A. pegreffii*; 8-11, *A. physeteris*; 3, 6, genotipo ibrido tra *A. pegreffii* e *A. simplex* (s.s.) (Foto M.C. Piras, 2014) 138
- Figura 8.13 – *Lappetascaris* Tipo A. Specificità d'organo, in percentuale. A – in *H. bonnellii*; B – in *H. reversa*; C – in *T. sagittatus*; D – in *I. coindetii*..... 139
- Figura 8.14 – *Anisakis pegreffii*. Specificità d'organo, in percentuale. A – in *I. coindetii*; B – in *T. sagittatus*. 139
- Figura 8.15 - *Anisakis physeteris*. Specificità d'organo, in percentuale. A – in *T. sagittatus*; B – in *I. coindetii* e *T. eblanae*; C – in *H. bonnellii*. 139

Figura 8.16 – <i>Lappetascaris</i> sp. Tipo A. Grafici a dispersione che confrontano l'intensità dell'infezione con la taglia dell'ospite. A – in <i>H. reversa</i> ; B – in <i>H. bonnellii</i> ; C – in <i>I. coindetii</i> ; D – in <i>T. sagittatus</i>	140
Figura 8.17 – <i>Anisakis pegreffii</i> . Grafici a dispersione che confrontano l'intensità dell'infezione con la taglia dell'ospite. A – in <i>T. sagittatus</i> ; B – in <i>I. coindetii</i>	140
Figura 8.18 - <i>Anisakis physeteris</i> . Grafici a dispersione che confrontano l'intensità dell'infezione con la taglia dell'ospite. A – in <i>T. sagittatus</i> ; B – in <i>H. bonnellii</i>	140
Figura 8.19 – Prevalenza delle infezioni da larve di Anisakidi per sesso dell'ospite. A – in <i>H. bonnellii</i> ; B – in <i>H. reversa</i> ; C – in <i>I. coindetii</i> ; D – in <i>T. sagittatus</i>	141
Figura 8.20 – Prevalenza delle infezioni da larve Anisakidi per classe di taglia dell'ospite. A – in <i>H. bonnellii</i> ; B – in <i>H. reversa</i> ; C – in <i>I. coindetii</i> ; D – in <i>T. sagittatus</i>	141
Figura 9.1 – Stadi larvali di cestodi in Cefalopodi. A, B – da <i>H. bonnellii</i> ; C – da <i>O. vulgaris</i> ; D – da <i>I. coindetii</i> ; E – <i>Nybelinia</i> sp. (Trypanorhyncha) da <i>T. sagittatus</i> ; F – da <i>H. bonnellii</i>	150
Figura 9.2 – Stadi larvali di Digenea in Cefalopodi. A-E, Didymozoidae. A – porzione di stomaco di <i>I. coindetii</i> infestato da forme di <i>Neomonilicaecum</i> ; B – <i>Allomonilicaecum</i> da <i>A. lichtensteini</i> e <i>T. sagittatus</i> ; C – <i>Torticaecum</i> da <i>H. bonnellii</i> ; D – <i>Neomonilicaecum</i> da <i>I. coindetii</i> ; E – <i>Neomonilicaecum</i> da <i>H. bonnellii</i> ; F – <i>Derogenes varicus</i> (Derogenidae) immaturo da <i>E. cirrhosa</i>	151
Figura 9.3 – Platelmini in <i>Illex coindetii</i> . A – Prevalenza per classi di taglia; B – confronto tra la taglia dell'ospite e l'intensità delle infezioni da Tetrphyllidea; C – confronto tra la taglia dell'ospite e l'intensità delle infezioni da Didymozoidae.	152
Figura 9.4 – Platelmini in <i>Todarodes sagittatus</i> . A – Prevalenza per classi di taglia; B – confronto tra la taglia dell'ospite e l'intensità delle infezioni da Tetrphyllidea; C – confronto tra la taglia dell'ospite e l'intensità delle infezioni da <i>Nybelinia</i> sp.....	153
Figura 10.1 - Confronto tra le prevalenze delle infezioni nelle zone geografiche di pesca circostanti la Sardegna.	168
Figura 10.2 - Confronto tra le abbondanze delle infezioni nelle zone geografiche di pesca circostanti la Sardegna.	168
Figura 10.3 – Confronto tra le prevalenze delle infezioni nelle fasce batimetriche D ed E. Si nota come tutti i valori calino nei fondali di profondità maggiore, eccetto la P di <i>Lappetascaris</i> sp.	169
Figura 10.4 - Confronto tra le abbondanze delle infezioni nelle fasce batimetriche D ed E. Si nota come tutti i valori calino nei fondali di profondità maggiore, eccetto la A di <i>Lappetascaris</i> sp. e quella delle metacercarie Didymozoidae.....	169
Figura 10.5 – Rappresentazione schematica delle relazioni biotiche tra i cefalopodi Oegopsida e gli organismi della rete trofica ad essi correlati, secondo un modello generale suggerito dalle analisi parassitologiche. Le linee tratteggiate ricostruiscono i cicli dei principali gruppi di parassiti, mentre le linee continue indicano il rapporto preda →predatore. Legenda: U = uovo; L1, L2, L3 = larve al primo, secondo e terzo stadio; C = cisticerco; P = procercoide; PL = plerocercoide; o.i. = ospite intermedio; o.p. = ospite paratenico; o.d. = ospite definitivo; ? = ospite non identificato per mancanza di informazioni sul ciclo del parassita.	170

Indice delle Tabelle

Tabella 5.1 – Dati sul campionamento delle specie di cefalopodi in acque circostanti la Sardegna oggetto dello studio parassitologico.	60
Tabella 5.2 - Scala di valutazione della maturazione sessuale dei cefalopodi utilizzata nell'ambito del progetto Medits (Lipinski, 1979).....	65
Tabella 6.1 – Cefalopodi delle acque intorno alla Sardegna e parassiti in essi riscontrati nel presente studio.	68
Tabella 6.2 – Protozoi (Apicomplexa) parassiti di cefalopodi delle acque intorno alla Sardegna.	69
Tabella 6.3 – Nematodi parassiti di cefalopodi delle acque intorno alla Sardegna.	69
Tabella 6.4 – Platelmini (Digenei e Cestodi) parassiti di cefalopodi delle acque intorno alla Sardegna.	70
Tabella 7.1. Confronto tra i dati morfometrici degli stadi sporogonici per le specie di <i>Aggegata</i> descritte da ospiti cefalopodi (Gestal et al., 2005; 2010, integrata con dati del presente lavoro). Le specie osservate in <i>A. lichtensteini</i> e <i>R. macrosoma</i> non sono state inserite per mancanza di adeguata descrizione dovuta al poco materiale disponibile. Tutte le misure sono espresse in μm	88
Tabella 8.1 – <i>Lappetascaris</i> sp. L3. Misure morfometriche, in μm	126
Tabella 8.2 – <i>Anisakis</i> sp. Tipo 1 (<i>A. pegreffii</i>). Misure morfometriche, in μm	127
Tabella 8.3 – <i>Anisakis</i> sp. Tipo 2 (<i>A. physeteris</i>). Misure morfometriche, in μm	127

1. INTRODUZIONE

I Cephalopoda sono una classe appartenente al phylum Mollusca, istituita da Schneider nel 1784 e confermata da Cuvier nel 1798. Si tratta di un gruppo relativamente poco numeroso, con meno di 800 specie finora conosciute (Hastie et al., 2009), tutte esclusivamente marine.

Le origini molto remote della conoscenza dei cefalopodi sono senza dubbio legate alla loro importanza alimentare, dovuta alle elevate proprietà organolettiche e nutrizionali note dai tempi delle antiche civiltà del Mediterraneo: le prime testimonianze di questo rapporto sono le frequenti raffigurazioni di ottopodi nell'arte ceramica Minoico-Micenea risalenti al 1500 a. C. circa (Fig. 1A). In seguito, anche l'immaginario artistico dei popoli nordici che vivevano il mare è stato popolato da cefalopodi, tanto che il mitologico *Kraken* assunse intorno al 1700 le sembianze di un gigantesco e minaccioso polpo/calamaro, cui fanno riferimento anche alcuni dei mostri marini (Fig. 1B) presenti nel celebre *Ventimila Leghe sotto i Mari* di Jules Verne (1870). Lo studio scientifico vero e proprio sulla teutofauna mediterranea inizia con Aristotele che descrive alcune forme ancora riscontrabili tra le più note specie moderne, come il polpo e la seppia (Capponi, 1972). Ma i maggiori progressi nella teutologia si osservano da circa 150 anni grazie ai contributi iniziali di studiosi come Delle Chiaje, De Ferussac, D'Orbigny, Jatta, Naef soprattutto riguardo alla sistematica, la morfologia e l'embriologia delle specie Mediterranee. Nel contesto più moderno del dopoguerra si inserisce l'importantissima opera di Mangold-Wirtz (1963) incentrata sulla biologia delle principali specie di cefalopodi di interesse commerciale.

Eccetto che in Mediterraneo e in Giappone, a livello globale i cefalopodi sono stati trascurati per molti secoli come risorsa alimentare, nonostante la loro abbondanza e le loro proprietà nutritive. Questo fino all'apertura negli ultimi decenni di alcuni mercati mondiali come quello degli USA, capaci di vincere diffidenze soprattutto di tipo culturale (Boyle, 1990; Sartor et al., 1998). In seguito, l'interesse verso i cefalopodi si è accresciuto considerevolmente

principalmente a seguito del loro massiccio ingresso sui mercati mondiali come una delle principali risorse della pesca, sia nel prelievo diretto che nel bycatch (Bello 2004; Pierce & Guerra, 1994). Le particolarità biologiche dei cefalopodi, come i cicli biologici molto brevi e la riproduzione che si protrae a lungo, rendono le loro popolazioni sia vulnerabili rispetto alla sovrapesca, sia capaci di riprese molto rapide. Ciò rende discontinuo il prelievo, e problematica la conoscenza dei ritmi di reclutamento e la gestione degli stock e (Boyle & Boletzky, 1996; Dawe et al. 1984; Guerra et al., 2010; Pierce & Guerra, 1994). È quindi comprensibile la necessità di approfondire ogni aspetto della conoscenza sulla biologia dei cefalopodi, in particolare delle specie commercialmente più importanti, che sono circa 45 (Rathjen & Voss, 1987). Un aspetto molto interessante è quello delle relazioni trofiche tra i cefalopodi e gli altri organismi marini: essi infatti rivestono un ruolo chiave sia come prede che come predatori nell'ambiente marino (Abollo et al., 1998; Clarke, 1996; Croxall, 1996; Piatkowski et al., 2001; Smale, 1996). Nonostante l'importanza dei cefalopodi dai punti di vista alimentare, ecologico e scientifico, una delle discipline che fino ad oggi ha avuto meno spazio è sicuramente lo studio della parassitologia di questi molluschi (Kinne, 1990; Pascual & Guerra, 2001). Questo vale in modo particolare nell'ambito del Mar Mediterraneo, dove le stesse lacune costituiscono diversi spunti di approfondimento che necessitano di essere colmati sotto diversi aspetti (Gestal et al., 1999). Ad esempio, la centralità dei cefalopodi nelle reti trofiche viene sfruttata da numerose specie di parassiti, che li utilizzano come ospiti intermedi e/o di trasporto nei loro complessi cicli biologici, in modo particolare quelli che hanno come ospiti definitivi elasmobranchi e mammiferi marini (Hochberg, 1990). Alcuni di questi, come i nematodi anisakidi, non solo sono tra i più importanti negli ecosistemi oceanici, ma hanno un ruolo non trascurabile come agenti zoonotici, quindi la caratterizzazione della loro presenza nei cefalopodi può costituire un contributo alle informazioni di base nella pianificazione della sanità alimentare riguardante il consumo di

prodotti marini crudi. Inoltre la conoscenza delle specie parassite dei cefalopodi, della loro trasmissione e delle malattie da esse determinate, può contribuire, in un approccio multidisciplinare, al miglioramento della gestione degli stock intesi sia in senso ecologico che alieutico (Guerra et al., 2010; Pascual et al., 1996b).

Il presente lavoro riguarda principalmente lo sviluppo di ricerche sulla morfologia e la tassonomia dei protozoi e degli elminti presenti nei cefalopodi delle acque circostanti la Sardegna, utili per ottenere un inventario il più accurato possibile. Inoltre ci si propone di analizzare i diversi complessi ospite-parassita dal punto di vista epidemiologico investigando sulle eventuali relazioni tra le infezioni e il sesso, la taglia e l'habitat. Nell'insieme, da queste informazioni si mira a ricavare nuovi elementi per valutare l'uso dei parassiti come indicatori della biologia e sull'ecologia degli ospiti, con particolare riferimento alla struttura delle reti trofiche in cui essi sono coinvolti. In questo modo si intende fornire un contributo che possa essere complementare negli studi multidisciplinari sulle biocenosi, e su alcune dinamiche in esse presenti, di cui fanno parte risorse soggette a sfruttamento e che quindi necessitano di profonda conoscenza e gestione accurata. Per ottenere le finalità indicate, ci si propone di raggiungere degli obiettivi specifici, di seguito descritti:

Prima di tutto è fondamentale raggiungere il più avanzato livello possibile nell'identificazione dei parassiti. Questo obiettivo può essere ottenuto soltanto su base morfologica con l'ausilio di tecniche di microscopia ottica, di microscopia elettronica, ed istologiche, ma anche mediante tecniche di biologia molecolare. Il successivo obiettivo è valutare e confrontare i livelli di infezione delle specie parassite di maggior rilievo sulla base delle caratteristiche fisiche dell'ospite (specie, sesso, taglia), e su base geografica, ovvero secondo la zona e la profondità di pesca.

I dati raccolti permetteranno di descrivere le comunità di elminti e protozoi parassiti presenti nelle specie esaminate di cefalopodi delle acque circostanti la Sardegna (Mediterraneo

occidentale): tale obiettivo è sintetizzabile nell'elaborazione di una checklist delle specie/taxon identificate nei cefalopodi esaminati.

L'analisi degli stessi dati, utilizzando i parassiti come indicatori biologici delle relazioni che coinvolgono i cefalopodi sia come prede che come predatori, sarà finalizzata a teorizzare un modello di rete trofica che enfatizzi la centralità ecologica dei cefalopodi e fornisca elementi di comprensione dei rapporti tra questi e gli altri organismi delle biocenosi di cui fanno parte.



Figura 1.1 - Raffigurazioni artistiche con al centro cefalopodi. **A** - Brocchetta minoica conservata nel museo di Palaikastro (Creta); **B** - Illustrazione di A. de Neuville presente nella prima edizione di “20000 leghe sotto i mari” di J. Verne. (fonte Wikimedia)

2. CARATTERISTICHE GENERALI DEI CEFALOPODI. EVOLUZIONE, MORFOLOGIA, BIOLOGIA, PESCA

L'inizio dell'evoluzione dei Cephalopoda risale al Cambriano Superiore, circa 500 milioni di anni fa, fino a quando nel Paleozoico si consolidarono i due raggruppamenti principali conosciuti oggi, e distinguibili in base alla posizione della conchiglia: essa è esterna nella Sottoclasse Nautiloidea Agassiz, 1847 e interna nella Sottoclasse Coleoidea Bather, 1888. Ad eccezione del genere *Nautilus* Blainville, 1825, tutte le specie viventi appartengono alla Sottoclasse Coleoidea. Essa è suddivisa in due superordini (Decapodiformes e Octopodiformes) e 7 ordini, formatisi tra il Triassico Superiore e il Giurassico Inferiore: Sepiida, Sepiolida, Spirulida, Myopsida, Oegopsida (questi due costituenti i Teuthida, che in molti schemi di classificazione vengono considerati come ordine unico), Octopoda, Vampyromorphida, quest'ultimo rappresentato dalla sola specie *Vampyroteuthis infernalis* Chun, 1903 (Capua 2004; Jereb & Roper, 2005, 2010).

Ai cefalopodi coleoidei appartengono molluschi di taglia variabile ma le cui dimensioni raggiungibili sono le più notevoli osservabili negli invertebrati. Infatti la lunghezza del mantello può essere inferiore a 15 mm come nel piccolo loliginide *Pickfordiateuthis* Voss, 1953, o si possono raggiungere lunghezze totali di 20 o più metri nei totani giganti come *Architeuthis* Steenstrup, 1857 e *Onykia* Lesueur, 1821. Seppure la loro struttura fondamentale sia rimasta molto vicina a quella primitiva dei molluschi, ad esempio con la conservazione della simmetria bilaterale, d'altra parte l'entità del livello evolutivo dei Cefalopodi è quanto di più elevato abbia raggiunto la Natura nell'ambito dell'intero Phylum (Capua, 2004, 2009). Le peculiarità dei cefalopodi si possono riassumere in 5 punti sintetici (Young et al., 2012), alcuni dei quali individuabili nella Fig. 2.1:

1. presenza dell'imbuto, derivante dal piede o dalla regione del collo;
2. presenza di braccia circumorali derivate dal capo o dal piede;

3. becco chitinoso all'interno della capsula boccale;
4. presenza di una conchiglia esterna, interna o vestigiale;
5. occhi complessi capaci di formare immagini.

In accompagnamento alla marcata cefalizzazione e alla cerebralizzazione del sistema nervoso, nei cefalopodi attuali si possono distinguere tendenze evolutive decisamente peculiari, come un allungamento del corpo in direzione dorsoventrale, fino alla distinzione di due parti principali distinte: il *cefalopodio*, costituito dal piede e dal capo, e il *complesso paleoviscerale* formato dal mantello e da tutti gli organi interni che esso avvolge (Fig. 2.1).

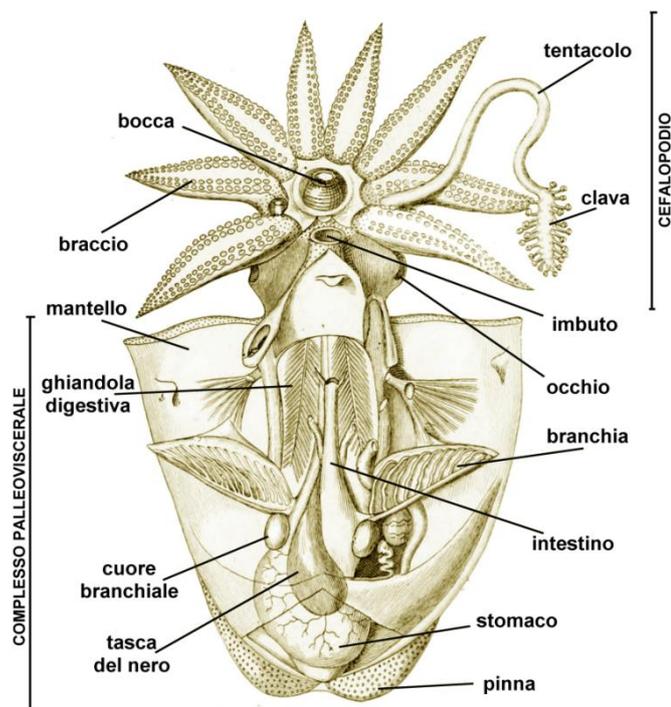


Figura 2.1 - Rappresentazione schematica dell'anatomia di un cefalopode (*Sepia*). (Fonte Wikimedia/Citron)

Le maggiori espressioni del livello di evoluzione sono date certamente dal sistema nervoso centrale, differenziato morfologicamente in lobi cerebrali con distinte funzioni e capace di modificare rapidamente il comportamento dell'animale in seguito ad apprendimento e memoria. Anche il sistema nervoso periferico è molto evoluto, la presenza di fibre giganti garantisce altissima efficienza motoria e velocità. Tra gli organi di senso, soprattutto la struttura degli occhi dei Coleoidea è talmente evoluta da essere paragonabile a quella degli

occhi dei vertebrati. Strettamente connessa alla sensibilità del sistema nervoso nei confronti dell'ambiente circostante è la capacità di mimetismo mostrata da numerose specie di cefalopodi, che è garantita dalla presenza di sofisticati cromatofori nel tessuto cutaneo. Essi permettono cambiamenti di colore istantanei in base alle stimolazioni ricevute, incluse quelle legate alla predazione o alla riproduzione.

Peculiare dei cefalopodi è anche il sistema circolatorio, che è costituito da un cuore sistemico e due cuori branchiali che garantiscono costante distribuzione di sangue ad alta pressione per sostenere elevate richieste metaboliche. Tale sistema è in diretto contatto con il celoma, che si divide in pericardio, sacche renali e cavità genitali.

L'apparato digerente inizia con un "becco" formato da mandibole cornee, nella bocca si trova una radula e annesse all'esofago grosse ghiandole salivari. Seguono lo stomaco, un cieco generalmente a spirale e una grossa ghiandola digestiva con funzioni enzimatico/escretorie.

I sessi dei cefalopodi sono separati e l'accoppiamento avviene per trasferimento di spermatofores, prodotte in ghiandole annesse alle gonadi, che il maschio trasferisce alla femmina mediante un braccio modificato, l'ectocotile. Le femmine possiedono un ovario e strutture annesse. Certe specie dopo la deposizione delle uova le assistono fino alla schiusa, quando nascono individui con organi già sviluppati.

Grazie alla consistenza e alla forma del corpo, che è abbastanza omogenea nei vari gruppi, i cefalopodi non hanno uguali riguardo alla motilità e alla complessità dei loro comportamenti. Sono predatori attivi e occupano una grande varietà di habitat in tutti i mari, eccetto il Mar Nero (Salman et al., 2002), dalla fascia costiera fino alla batimetrica dei 7400 metri delle profondità abissali (Rathjen & Voss, 1987). Si possono quindi trovare sia i nuotatori pelagici (neritici ed oceanici) come i Teuthida, sia forme necto-bentoniche (Sepiida, Sepiolida), sia forme strettamente bentoniche come gli Octopodida. Le forme bentoniche sono spesso solitarie, quelle pelagiche formano spesso raggruppamenti di numerosi individui lungo la

colonna d'acqua, oppure (soprattutto quelle neritiche) in molti casi migrano in banchi dalla piattaforma continentale verso acque meno profonde.

In qualità di prede i Cefalopodi hanno enorme importanza in termini di biomassa e di centralità nelle reti trofiche, essendo fonte di alimento per grandi pesci e mammiferi marini. In relazione a questo aspetto, anche le specie di cefalopodi di scarso o nullo valore commerciale (es. la famiglia Histiotteuthidae, *Vulcanoctopus hydrothermalis*) ricevono negli ultimi decenni l'attenzione della ricerca in misura non trascurabile, anche grazie allo sviluppo della tecnologia che permette lo studio delle profondità abissali. Gli studi che interessano queste specie "trascurate" trattano sia gli aspetti sistematici inclusa la descrizione di nuove specie (es. Gonzalez et al., 1998), sia quelli etologici (es. Hanlon & Messenger, 1996; Rocha et al., 2002), biogeografici e di distribuzione (Bello, 2003; Belcari et al., 2002; Kaspiris & Tsiambaos, 1984; Torchio, 1967; Voliani et al 2009), fisiologici, riproduttivi (es. Kotsoubas & Boyle, 1999; Pörtner et al., 1994; Rocha et al., 2001). Molti cefalopodi, similmente ad altri rappresentanti di diversi Phyla, suscitano grande interesse per il fatto di possedere caratteristiche di grande valore faunistico, biologico ed ecologico, ad esempio quelle dotate di bioluminescenza, o che vivono in habitat particolari come siti idrotermali di fondali oceanici (Gonzalez et al., 1998, 2008; Rocha et al., 2002; Voight, 2005). In questo senso è comprensibile come anche le specie non direttamente oggetto di pesca meritino di essere conosciute e salvaguardate. Anche l'utilizzo dei cefalopodi (ottopodi in particolare) come animali sperimentali per ricerche biomediche e comportamentali ne aumenta progressivamente il peso nella letteratura scientifica (Johansen & Houston, 1962; Juorio et al., 1974; van Dijk et al., 2000). In letteratura, le informazioni che erano molto frammentarie hanno trovato nel tempo un numero crescente di spazi organici su un saldo "scheletro" conoscitivo. Ad esempio, specie bentoniche dei generi *Octopus* e *Eledone*, e forme epibentoniche come *Sepia* spp. sono state ampiamente studiate, e anche membri di generi di

calamari e totani come i neritici *Loligo*, *Illex* e *Todarodes* sono conosciuti con buon dettaglio sia in larga scala che a livello locale perché sono facilmente disponibili nelle acque delle piattaforme continentali (es. Cuccu et al., 2009a; Dawe et al. 1984; Haimovici et al., 1998; Quetglas et al., 1998). Più in generale, oltre ad opere storiche come quelle citate nel capitolo precedente, costituiscono dei riferimenti fondamentali i cataloghi FAO delle specie di cefalopodi del mondo (Jereb & Roper 2005; Jereb & Roper 2010; Roper et al. 1984; Roper & Voss 1983). In essi è offerta una panoramica esauriente e aggiornata dei principali progressi nella ricerca sui cefalopodi dei quali gli autori trattano molteplici aspetti, come sistematica, morfologia, habitat, distribuzione e cicli di vita.

Diversi studi stimano che gli stock di specie di piattaforma e di scarpata possano essere compresi tra 8 e 12 milioni di tonnellate (Guerra & Perez Gandaras, 1983; Clarke, 1996) e quelli di cefalopodi oceanici potrebbero ammontare addirittura a 500 milioni di tonnellate (Voss, 1979). Secondo le prime statistiche sull'industria mondiale della pesca dei cefalopodi, il settore produceva 500000 tonnellate nel 1945, 1 milione nel 1970, circa 2 milioni intorno alla fine degli anni '80 e 3,65 milioni di tonnellate nel 2010 con un picco di 4,25 nel 2007 (Hochberg, 1983, 1990; Roper & Jereb, 2010). Le quantità indicate sono molto inferiori sia alla totalità degli stock potenzialmente disponibili, sia rispetto allo sbarcato mondiale totale del quale rappresentano il 2,5% ogni anno, ma si deve considerare che il numero di specie sfruttate è relativamente ridotto e che la pesca ai cefalopodi è ancora oggi concentrata in poche aree mondiali (Sartor et al, 1998). D'altro canto rispetto all'incremento percentuale annuo dello sbarcato di cefalopodi è stato stimato che esso sia superiore all'incremento dello sbarcato di pesci di fondale (Caddy & Rodhouse, 1998). Nel loro insieme questi numeri dimostrano un rapido e costante aumento, dovuto a diversi fattori: aumento della richiesta di mercato, incremento generale dello sforzo di pesca, miglioramento delle metodiche e tecnologie di cattura e ampliamento delle aree di pesca (Guerra, 1991).

3. I CEFALOPODI DELLE ACQUE CIRCOSTANTI LA SARDEGNA

Le specie di Cefalopodi censite nel Mar Mediterraneo sono attualmente 66, tutte appartenenti alla sottoclasse dei Coleoidea, di cui 58 presenti nelle acque italiane; qui sono rappresentati tutti gli ordini eccetto Vampyromorphida e Spirulida (Bello, 2008). I dati si devono considerare in continuo aggiornamento, anche in relazione ai nuovi ingressi di specie aliene nel Mediterraneo che vengono registrati periodicamente (es. Galil, 2007).

Per quel che concerne la Sardegna, dagli studi effettuati dal Dipartimento di Scienze della Vita e dell'Ambiente, presso il quale è stato svolto anche il presente studio, emerge che le specie di cefalopodi presenti nei mari sardi sono 43, così distribuite nei diversi ordini: 3 Sepiida (seppie), 5 Sepiolida (seppiette), 12 Octopoda (polpi), 8 Myopsida (calamari) e 13 agli Oegopsida (totani). Ad una prima checklist di 33 specie fornita nel 2003 oggi si aggiungono anche altre specie segnalate successivamente e considerate di difficile reperimento attraverso i normali sistemi di pesca (Cuccu et al., 2003a; 2006; 2009d; 2010b; 2011a; 2013a; Mereu et al., 2012). Gli studi condotti dal gruppo di ricerca su questo taxa sono inoltre volti all'approfondimento della morfologia, biologia ed ecologia delle specie (Belcari et al., 2002; Cuccu et al., 2007a, 2009a, 2009b). Particolare attenzione è stata data nella valutazione dei pattern riproduttivi di alcuni sepiolidi (Cuccu et al., 2007a, 2009c, 2010a, 2011b), loliginidi (Mereu et al., 2013) e Histiotteuthidi (Cuccu et al., 2007b; 2014 submitted).nonchè del polpo comune *Octopus vulgaris* (Cuccu et al., 2013b, 2013c), specie oggetto anche di un importante progetto di sperimentazione gestionale in un'area pilota della costa occidentale dell'isola (Cau & Cuccu, 2013; Mereu et al., 2010).

Nei successivi paragrafi sono riportate le informazioni principali riguardanti i 15 taxa (14 specie e un genere) di Cefalopodi oggetto di indagine parassitologica durante il percorso di dottorato. Esse comprendono la classificazione, la morfologia, la bioecologia, le eventuali tipologie e il grado di sfruttamento. Tra esse sono presenti alcune di quelle con maggior

interesse alimentare per l'uomo, soprattutto nell'area atlantico-mediterranea, quali i generi *Octopus* Cuvier, 1797, *Eledone* Leach, 1817, *Sepia* Linnaeus, 1758, *Loligo* Lamarck, 1798, *Todarodes* Steenstrup, 1880, *Illex* Steenstrup, 1880, *Todaropsis* Girard, 1890, ed altre specie non commerciali ma che rivestono un ruolo di grande rilievo negli ecosistemi marini di come ad esempio quelle dei generi *Ancistrocheirus* Gray, 1849, *Ancistroteuthis* Gray, 1849, *Histioteuthis* d'Orbigny, 1841, *Pteroctopus* P. Fischer, 1882, (es. Clarke, 1996; Croxall & Prince, 1996).

Lo schema classificativo riportato riflette quello adottato da Young et al. (2012) in particolar modo riguardo alla collocazione degli Oegopsida e dei Myopsida come ordini piuttosto che sottordini dei Teuthida come riporta la maggior parte degli schemi. D'altra parte la classificazione dei livelli superiori dei cefalopodi è da sempre instabile e per essa sono stati proposti diversi modelli, tutti comunque validi (Capua 2004; Hastie et al. 2009; Jereb & Roper 2005; Jereb & Roper 2010; Mangold 1989; Pierce et al. 2010; Roper et al. 1984; Roper & Voss 1983).

3.1 Superordine OCTOPODIFORMES Berthold & Engeser, 1987 o OCTOBRACHIA Fioroni, 1881

Per le caratteristiche di questo superordine vale quanto sotto riportato per gli Octopoda, dal momento che l'altro unico ordine, Vampyromorphida, non è rappresentato in Mediterraneo.

Ordine Octopoda Leach, 1818

Gli ottopodi sono cefalopodi con testa e mantello fusi insieme nella regione nucale, quest'ultimo è relativamente tozzo, sacciforme e privo di pinne ma talvolta con alette. Non ci sono braccia tentacolari come nei decapodiformi: le braccia circumorali sono 8, connesse da una membrana robusta e fornite, lungo tutta la loro lunghezza, di ventose sessili e prive di anello chitinoso. La conchiglia è vestigiale o per lo più assente, così come sono assenti le appendici velari filamentose in corrispondenza della base del primo e secondo braccio (riscontrabili soltanto nei Vampyromorphida). Possiedono il sistema dei lobi inferiori frontali nel cervello. Gli ottopodi comprendono 2 sottordini e 5 famiglie e sono quasi tutti animali bentonici che abitano i fondali dalla linea di costa fino agli abissi oceanici.

Sottordine Incirrina Grimpe, 1916

Gli Octopoda Incirrina si distinguono dai Cirrina (rappresentati dalla sola famiglia Opistoteuthidae) per avere gli occhi muniti di cornea e per essere dotati di ectocotile; per essere privi di cirri brachiali, di pinne, di conchiglia. Inoltre possiedono una o due file di ventose nelle braccia, anziché una sola fila, e una membrana interbrachiale ridotta invece che ampia.

Soltanto gli Incirrata hanno interesse commerciale, con alcune specie di *Octopus* che costituiscono il principale oggetto in molte industrie della pesca ai cefalopodi (Roper et al., 1984)

Famiglia Octopodidae d'Orbigny, 1839

Octopus vulgaris Cuvier, 1797



Caratteristiche: Il polpo comune è un cefalopode di dimensioni medio-grandi, massiccio e di colorazione di base giallastra bruna e/o rossastra. Ma le capacità mimetiche di questa specie le consentono di adattarsi al fondale sia mutando il colore dell'epidermide che regolandone la rugosità della superficie, fino a produrre escrescenze che ricordano alcune alghe.

Le braccia sono robuste e portano 2 file di ventose. Le braccia laterali sono leggermente più grandi delle altre. La lunghezza massima del mantello misurata nei mari italiani è di 270 mm per le femmine (Ragonese & Jereb, 1990) e 250 mm per i maschi (Cuccu et al., 2013b).

Distribuzione: *O. vulgaris*, di probabile origine atlantico-mediterranea, è una specie diffusa in tutte le acque temperate e tropicali e in numerosi habitat. Tali differenze fanno supporre l'esistenza di diverse sottospecie e per appurare l'ipotesi sono in corso vari studi anche di tipo genetico (Warnke et al., 2004).

Habitat e biologia: È una specie bentonica che di norma si trova in tutte le profondità fino a 150 m, in Sardegna è catturato occasionalmente a 196 m (Cuccu et al., 2003a) ma può trovarsi anche a 500 (Belcari et al., 2002). Specie semelpara come moltissimi altri cefalopodi, nel bacino del Mediterraneo si riproduce in primavera-estate (es. Belcari et al, 2002; Cuccu et al., 2013b). In questo periodo le uova vengono deposte in all'interno di tane o rifugi, per un periodo che va da una settimana ad un mese. Si osservano cure parentali, quindi la femmina protegge la covata fino alla schiusa delle uova e in seguito muore. *O. vulgaris* compie migrazioni stagionali, in inverno in acque profonde e in estate in acque più superficiali dove si

accregono più rapidamente in vista della deposizione. È un attivo predatore che si nutre di un'amplessima varietà di crostacei, pesci, molluschi e cefalopodi inclusi gli stessi suoi simili all'occorrenza. A sua volta, il polpo è preda di numerosi animali marini, dai cetacei odontoceti a molti pesci predatori bentonici come *Murena helena*, *Conger conger*, *Epinephelus* spp..

Pesca: Il polpo è uno dei cefalopodi di maggiore pregio alimentare, per questo è oggetto di pesca sia dilettantistica che professionale ed ha una grande importanza commerciale. I metodi di pesca più frequenti nel Mediterraneo sono lo strascico per i fondali più alti e le nasse innescate con il granchio vivo per quelli a profondità inferiore. Vista la loro estrema curiosità i polpi attaccano facilmente anche esche artificiali (polpare), generalmente verniciate di bianco, calate con lenze.

***Octopus macropus* Risso, 1826**



Caratteristiche: Rispetto al simile polpo comune, la cosiddetta “polpessa” ha aspetto meno robusto, con mantello più piccolo, membrana interbrachiale ridotta, braccia più esili e molto lunghe le cui dorsali sono più grandi. *Octopus macropus* ha una colorazione costante rossa più o meno scura con numerose macchie sparse, di colore bianco ceruleo. Le dimensioni massime possono essere di 150 cm, braccia comprese.

Distribuzione: È una specie presente, anche se poco frequente, in tutti i fondali costieri poco profondi dalle fasce temperate a quelle tropicali.

Habitat e biologia: La scarsa abbondanza almeno apparente di *O. macropus* è causa del fatto che si conosca poco sulla sua bioecologia e vi siano pochissime osservazioni nell'ambiente

naturale. La profondità di cattura, in Sardegna, raggiunge i 100 m (Cuccu et al., 2003a). Uno dei più recenti studi descrive la deposizione delle uova su substrato duro e le cure parentali della femmina, fino allo sviluppo degli embrioni (Von Boletsky et al., 2001).

Pesca: Anche il settore della pesca conosce *O. macropus* esclusivamente come cattura occasionale, e per quanto sia una specie localmente apprezzata ha scarso valore commerciale e non può essere oggetto di pesca mirata.

***Eledone cirrhosa* (Lamarck, 1798)**



Caratteristiche: il mantello è ovoidale e corto, le braccia sono corte e con una sola fila di ventose; la membrana copre il 30% della loro lunghezza. La colorazione è chiara, gallastro-arancione-bruno con una cresta laterale chiara intorno al mantello. La cute è ricoperta da fini granulazioni alternate a verruche piatte. Per le acque

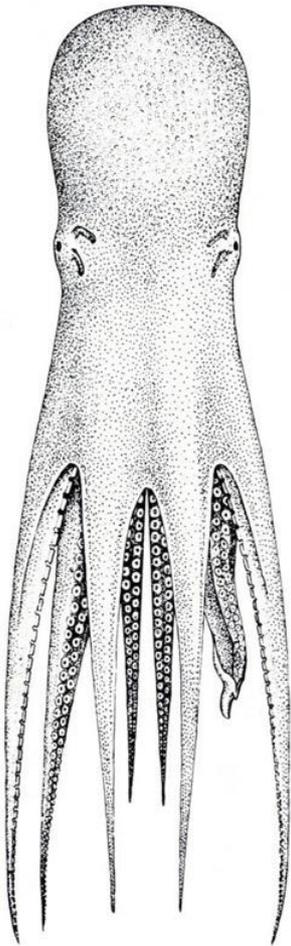
italiane la taglia massima di 170 mm di LM è stata riscontrata in alcune femmine catturate nelle acque sarde (Cuccu et al., 2003b).

Distribuzione: è diffuso nell'Atlantico orientale dall'Islanda al Marocco, e nel Mare Mediterraneo.

Habitat e biologia: Il polpo bianco è una specie bentonica euribate, reperibile in fondali strascicabili, da 30 a 650 metri di profondità dove si nutre di molluschi, pesci e crostacei come granchi, scampi e gamberi (Boyle et al., 1986). La riproduzione, in seguito alla quale gli adulti muoiono, avviene tra la primavera e l'estate.

Pesca: Di grande interesse commerciale, *E. cirrhosa* viene pescato con reti a strascico e talvolta con nasse. Nel periodo estivo sono particolarmente ricercati gli esemplari giovani, detti moscardini bianchi.

***Pteroctopus tetracirrhus* (Delle Chiaje, 1830)**



Caratteristiche: Questo polpo di profondità è caratterizzato dal mantello globoso e dalla membrana interbrachiale molto ampia che dà alla specie il nome comune di “polpo incamicciato” poiché si estende per tutta la lunghezza delle braccia, le quali hanno una doppia fila di ventose; per via della consistenza gelatinosa dei tessuti viene anche chiamato “polpo d’acqua”. Un altro elemento peculiare è la presenza di due cirri sopra ciascun occhio. Il colore di *P. tetracirrhus* è arancio chiaro, le dimensioni massime del mantello sono di 157 mm nella femmina e 115 nel maschio.

Distribuzione: è presente nelle acque temperate dell’Atlantico orientale dalla Spagna alla zona equatoriale incluso tutto il Mediterraneo a profondità elevate, fino a 750 metri. Inoltre si ritrova dal Golfo del Messico fino circa al livello della foce del Rio de la Plata.

Habitat e biologia: *P. tetracirrhus* Preferisce i fondali molli, dove si nutre soprattutto di crostacei, ma anche di pesci, gasteropodi e cefalopodi. In Sardegna si trova tra 52 e 620 metri (Cuccu et al., 2003a) compie migrazioni notturne verso la superficie e stagionali tra acque più profonde in autunno e primavera e meno profonde in estate e inverno, con la particolarità che in estate femmine e maschi tendono a separarsi perché la deposizione avviene in acque più profonde (Quetglas et al., 2009).

Pesca: pur essendo commestibile, questa è una delle poche specie di polpi senza alcun valore commerciale, e anche per via della consistenza flaccida della sua carne viene quasi sempre scartata nonostante talvolta con la pesca a strascico se ne catturino discrete quantità (Capua, 2004).

3.2 Superordine DECAPODIFORMES Young, Vecchione & Donovan, 1998 o DECABRACHIA Boettger, 1952

Tra le caratteristiche principali del secondo superordine dei Coleoidea vi è innanzitutto la presenza di due braccia tentacolari oltre alle otto braccia che sono proprie anche degli Octopodiformes. I due tentacoli di solito possiedono ventose o uncini soltanto sulle due estremità espanse, dette clave, che hanno essenzialmente funzione raptatoria e possono essere suddivise in carpus, manus e dactilus. Le ventose sono di solito peduncolate e munite di un anello chitinoso. Il capo è sempre separato dal mantello, lateralmente a questo si trovano due pinne simmetriche, da allungate a semicircolari o triangolari. Inoltre possiedono una conchiglia interna al mantello, che può essere completa o ridotta, cornea e in forma di gladio o calcificata. Il sistema nervoso dei decapodiformi manca del sistema dei lobi frontali. I Decapodiformes in Mediterraneo sono rappresentati da 5 ordini, 15 famiglie e numerose specie di seppie, totani e calamari.

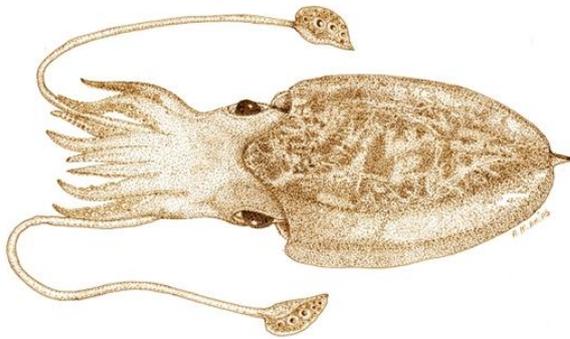
Ordine Sepiida Zittel, 1895

Questo ordine, al quale nel Mediterraneo appartiene la sola famiglia delle seppie, è caratterizzato da corpo appiattito dorsoventralmente, testa e mantello liberi, non fusi nella zona nucale e da pinne laterali al mantello e completamente separate posteriormente. Le braccia circumorali portano 2 o più serie di ventose molto muscolari e con anelli cornei, e la clava del tentacolo non è distinta in manus e dactilus. Sono presenti tasche in cui i tentacoli si

ritraggono. La conchiglia interna è calcificata ma può anche essere rudimentale. Gli organi luminosi sono assenti, mentre è presente una cospicua tasca del nero. Le seppie sono cefalopodi nectobentonici che vivono lungo la fascia costiera a profondità contenute, generalmente entro i 200 metri. Sono di grande importanza per la pesca e vengono catturate con l'uso di reti a strascico ma anche con reti da posta o nasse.

Famiglia Sepiidae Keferstein, 1866

***Sepia (Rhombosepion) orbignyana* Férussac in Orbigny, 1826**



Caratteristiche: il corpo è appiattito, di colore rosato e con pinne che si estendono per tutta la lunghezza ma rimangono separate posteriormente. La conchiglia, calcificata e laminare (osso), anche negli adulti presenta un

caratteristico rostro posteriore visibile anche in vivo, che le dà il nome di “seppia pizzuta” (in *S. officinalis* è visibile solo negli esemplari giovani). Le ventose sono disposte in 4 file nelle braccia e nella clava tentacolare in una fila con 3 ventose grandi e 2 piccole. Il mantello raggiunge i 12 cm nelle femmine.

Distribuzione: *Sepia orbignyana* è presente nell'Atlantico orientale dall'Irlanda all'Angola, nel Mediterraneo e nel Mare di Marmara.

Habitat e biologia: Specie demersale, si trova su fondali sabbiosi e fangosi, più di frequente tra 50 e 200 metri (Belcari, 1999a) ma anche oltre, es. fino a 565 metri in Sardegna (Cuccu et al., 2003a). La riproduzione avviene principalmente tra la primavera e l'autunno, con deposizione delle uova in grappoli attaccati a spugne. Le prede favorite di *S. orbignyana* sono crostacei, seguiti da pesci e altri cefalopodi.

Pesca: rappresenta una cattura accessoria ma relativamente frequente e non trascurabile nella pesca di fondo a strascico, ed è commercializzata insieme alla seppia comune.

Ordine Sepiolida Fioroni, 1981

Vi appartengono Cefalopodi molto simili alle seppie, ma di dimensioni ridotte rispetto ad esse e con corpo generalmente globoso anziché compresso, pinne laterali arrotondate/lobate e tasche tentacolari assenti. Possono avere una conchiglia chitinoso e rudimentale anziché calcarea. I Sepiolida sono rappresentati da una sola famiglia e in Mediterraneo da 3 sottofamiglie, 7 generi e 16 specie bentoniche e/o nectoniche, che si possono ritrovare a varie profondità dalla linea di costa a 700 m circa. Sono reperibili abbastanza comunemente anche sui mercati dello strascico di fondale durante le campagne di pesca a scampi, gamberi, naselli o ad altri cefalopodi come i moscardini.

Famiglia Sepiolidae Leach, 1817

***Rossia macrosoma* (Delle Chiaje, 1830)**



Caratteristiche: È la maggiore specie della famiglia, potendo raggiungere gli 85 mm di lunghezza palleale, viene pertanto chiamata “seppiola grossa”. Ha il corpo globoso, con pinne laterali tondeggianti. La sutura nucale tra testa e mantello è assente, le braccia hanno 4 file di ventose pedunculato e sferiche e la clava dei tentacoli ha più di 8 file di

ventose. Il colore dell’animale è chiaro con cromatofori bruni sparsi tranne che sulla testa e sul sifone.

Distribuzione: Si trova Atlantico settentrionale e orientale dal Mare del Nord al Senegal, Mediterraneo, escluso il Nord Adriatico e il settore sudorientale.

Habitat e biologia: vive su fondali fangosi tra 200 e 400 m, raggiungendo in inverno livelli ancora inferiori, ad esempio in acque sarde è stata catturata fino a 660 metri di profondità (Cuccu et al., 2003a). È predata spesso da piccoli squaliformi bentonici. La riproduzione avviene durante tutto l'arco dell'anno, le uova vengono deposte in grappoli su supporti duri, come conchiglie.

Pesca: viene catturata con reti a strascico, pur non essendo bersaglio di pesca specifica ha un valore commerciale discreto ed è venduta fresca o congelata.

Ordine Myopsida Naef, 1916

Quest'ordine, rappresentato quasi esclusivamente dalla famiglia Loliginidae, è diffuso largamente nelle vicinanze della fascia costiera di tutti i mari del mondo. Queste le caratteristiche fondamentali: l'occhio è coperto da una membrana corneale nella quale spesso è presente un poro anteriore, e manca di palpebra secondaria. Nel capo si trova una tasca per i tentacoli. Braccia e tentacoli sono provvisti di ventose e mai di uncini, e nell'estremità tentacolare manca la struttura carpale; anche la membrana boccale presenta ventose; La conchiglia dei Myopsida è un gladio corneo esteso per tutta la lunghezza del mantello. L'ovidotto è impari, sinistro, e sono presenti ghiandole nidamentali accessorie.

Appartengono ai Myopsida specie di calamari molto piccole e altre relativamente grandi come *Loligo forbesii*, la cui lunghezza del mantello può superare i 900 mm.

Tutti i myopsidi sono demersali, vivendo sulla piattaforma continentale, e si nutrono frequentemente sul fondo. Molte specie mostrano migrazioni da e verso la costa rispettivamente in autunno e primavera, svernando in acque più profonde. La riproduzione

avviene diffusamente in tutto l'anno ma con picchi generalmente estivi e autunnali, le uova sono deposte sul substrato, incapsulate in masse nastriformi.

Due sole famiglie appartengono ai Myopsida: quella monotipica degli Australiteuthidae Lu, 2005, presenti nell'Australia settentrionale con la sola piccola specie *Australiteuthis aldrichi* Lu, 2005, e quella numerosa dei Loliginidae, che attualmente comprende 10 generi e 47 specie. Di queste, quelle principalmente soggette a pesca appartengono al genere *Loligo* (98%), con circa 300000 tonnellate catturate nel 2011 a livello globale (Roper *et al.* 1984; FAO, 2013).

Famiglia Loliginidae Lesueur, 1821

***Loligo forbesii* Steenstrup, 1856**



Caratteristiche: Questa specie è comunemente chiamata calamaro venato, per via delle strisce longitudinali sinuose, costituite da cromatofori viola che si trovano sulle superfici anteriori, ventrale e ventrolaterale del mantello. Le pinne, romboidali, sono lunghe il 75% del mantello. Sulle clave si trovano ventose di misura subeguale, a differenza della specie affine *L. vulgaris* che ha ventose mediane di grandi dimensioni (Jereb *et al.* 2010).

Distribuzione: *L. forbesii* è un cefalopode neritico e demersale, anche costiero, presente nel Mare del Nord, nell'Atlantico orientale fino alle Canarie e le Azzorre, e nel Mar Mediterraneo (Roper *et al.*, 1984).

Habitat e Biologia: *Loligo forbesii* vive tra 40 e 620 metri di profondità stando ai dati raccolti in acque sarde (Cuccu et al., 2003a). Specie semelpara, ha un ciclo annuale con picchi di riproduzione in aprile ed agosto. Le femmine muoiono in breve tempo dopo la deposizione, che può essere intermittente e prolungata (Rocha et al., 2001); le uova vengono deposte su substrati rocciosi, conchiglie, alghe, e spesso strumenti della pesca come corde, nasse, reti. Pesci, crostacei e policheti costituiscono la dieta del calamaro venato *L. forbesii*, a sua volta preda di vari cetacei, pinnipedi e pesci demersali (Pierce & Guerra, 1994, Pierce and Santos, 1996; Santos et al., 1999, 2001; De Pierrepont et al., 2005).

Pesca: In base alla sua abbondanza regionale, *L. forbesii* assume importanza variabile nell'industria della pesca, risultando più spesso componente del bycatch nello strascico sia in acque atlantiche che mediterranee (Pierce et al., 2010), ma anche oggetto di pesca mirata con reti o esche artificiali come nelle Azzorre o in Grecia.

Ordine Oegopsida d'Orbigny, 1845

Appartengono agli Oegopsida tutti i cefalopodi comunemente detti totani. A differenza dei Myopsida, in questo gruppo la membrana corneale di rivestimento degli occhi è assente, essi sono quindi direttamente esposti all'ambiente acquatico. Nella membrana boccale non ci sono ventose. Braccia e tentacoli provvisti di ventose e/o uncini, con estremità tentacolari dotate di carpo. Anche la conchiglia degli Oegopsida è un gladio corneo esteso per tutta la lunghezza. L'imbuto è privo di muscoli laterali adduttori. I gonodotti femminili sono appaiati e non ci sono ghiandole nidamentali accessorie.

A questo gruppo di cefalopodi, cosmopolita, appartengono totani di dimensioni che possono essere da ridottissime, circa 2 cm di lunghezza del mantello (*Abralia* e *Abraliopsis*, Enoploteuthidae), fino a gigantesche come *Architeuthis* (Architeuthidae) o *Onychoteuthis* (Onychoteuthidae), il cui mantello nei maschi non di rado raggiunge la lunghezza di 2 metri.

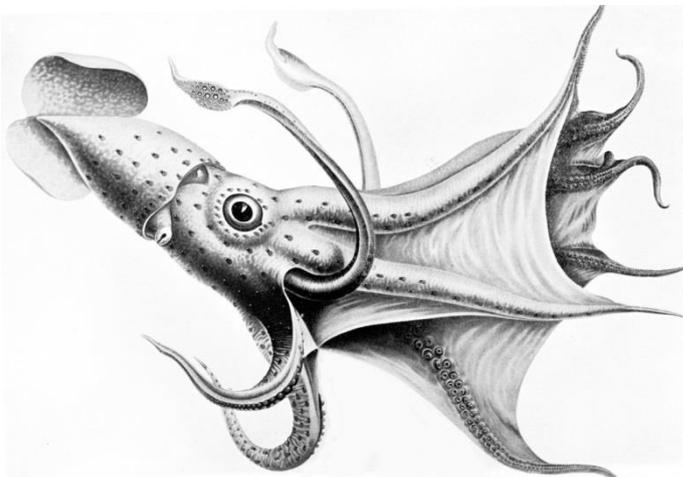
Gli Oegopsida abitano profondità fino a 4000-5000 metri, molte specie migrano verticalmente occupando di giorno profondità elevate e di notte batimetrie più superficiali. La maggior parte delle specie è pelagica ma molte si trovano associate a rilievi sottomarini.

Questi totani sono in genere predatori aggressivi, spesso facilitati dalle loro dimensioni ragguardevoli. Molte specie sfruttano la bioluminescenza che è pressoché presente in tutte le specie di profondità. La riproduzione negli Oegopsida avviene in tutto l'arco dell'anno, con la frequente presenza di picchi nella deposizione delle uova, che avviene in masse pelagiche.

Gli Oegopsida, in particolare alcune specie della famiglia Ommastrephidae (*Dosidicus gigas* dell'Oceano Pacifico orientale, *Illex argentinus* dell'Atlantico sudoccidentale e *Todarodes pacificus* del Pacifico nordoccidentale), rappresentano di gran lunga la maggior parte dei Cefalopodi (circa il 65%) pescati a livello mondiale, con circa 650000 tonnellate nel 2011 (FAO, 2013). Attualmente, appartengono agli Oegopsida oltre 250 specie e 72 generi, distribuiti in 26 famiglie, ma spesso si hanno scarse conoscenze dovute allo scarso o nullo interesse commerciale della maggior parte delle specie (Roper et al., 1984; Roper & Jereb, 2010; Sweeney & Roper, 1998).

Famiglia Histoteuthidae Verrill, 1881

***Histoteuthis bonnellii* (Ferussac, 1834)**



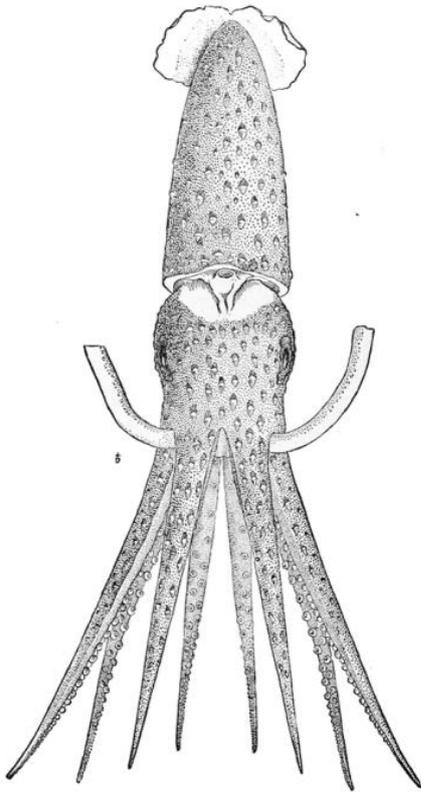
Caratteristiche: È la specie-tipo del genere *Histoteuthis*, l'unico di questa famiglia cosmopolita che comprende 13 specie diversamente distribuite negli oceani, tutte molto importanti dal punto di vista ecologico in quanto estremamente presenti nella dieta

soprattutto dei capodogli oltre che di delfini, pinnipedi, pesci ossei, squali, uccelli marini ed altri cefalopodi. Commercialmente, nessun *Histioteuthidae* riveste interesse in quanto le carni di questi totani, oltre a deteriorarsi rapidamente, hanno un elevato contenuto di ammoniaca e non risultano commestibili (Roper & Jereb, 2010a). Sono comunque molto rappresentate nel bycatch della pesca a strascico di profondità. *Histioteuthis bonnellii* è anche la maggiore delle specie conosciute. Possiede mantello corto, conico, che può raggiungere i 33 cm di lunghezza, e ali ovali. Sulla superficie ventrale del mantello si trovano 7-8 file di fotofori scuri, i quali sono presenti anche lateralmente, sul capo e lungo le braccia; un fotoforo si trova anche sulla punta di ciascun braccio. Queste ultime sono lunghe fino al 300% del mantello e sono connesse da un'amplissima e profonda membrana di colore bruno che vale a *H. bonnellii* il nome comune inglese di umbrella squid e quello italiano di totano ingioiellato palmato. La membrana boccale è formata da 6 elementi; intorno all'occhio si trovano 17 fotofori.

Distribuzione geografica: Comune nel Mar Mediterraneo, largamente distribuita lungo tutta la metà orientale dell'Oceano Atlantico, nell'Oceano Indiano meridionale e nel Pacifico sudoccidentale, tra l'Australia e la Nuova Zelanda.

Habitat e biologia: *Histioteuthis bonnellii* vive solitamente a profondità comprese tra 500 e 1500 m, prevalentemente associata ai fondi in cui sono presenti i gamberi rossi (Cuccu et al, 2007b). Anche se più spesso gli esemplari sono catturati singolarmente o in scarso numero nelle reti di campionamento, si sospetta dai resti ritrovati in stomaci di capodogli che sia una specie gregaria. È anche preda importante di *Alepisaurus ferox*, *Prionace glauca*, e specie commercialmente importanti come *Thunnus alalunga*, *Xiphias gladius* e il gambero *Aristaeomorpha foliacea* (Bello & Pipitone, 2002).

***Histioteuthis reversa* (Verrill, 1880)**



Caratteristiche: il mantello è allungato, può raggiungere i 200 mm di lunghezza nelle femmine mature, e come quello della specie precedente presenta numerosi fotofori nelle superfici ventro-laterali, che danno alla specie il nome di totano ingioiellato. Le pinne sono arrotondate e di taglia media, il capo è spesso più largo del mantello. Le braccia sono robuste, lunghe fino al 150% del mantello, non presentano fotofori sulle estremità e sono unite da un velo corto, quasi vestigiale, i tentacoli sono più fragili e lunghi fino a 4 volte il mantello. La membrana boccale è formata da 7 elementi; intorno all'occhio si trovano 17 fotofori grandi e uno piccolo.

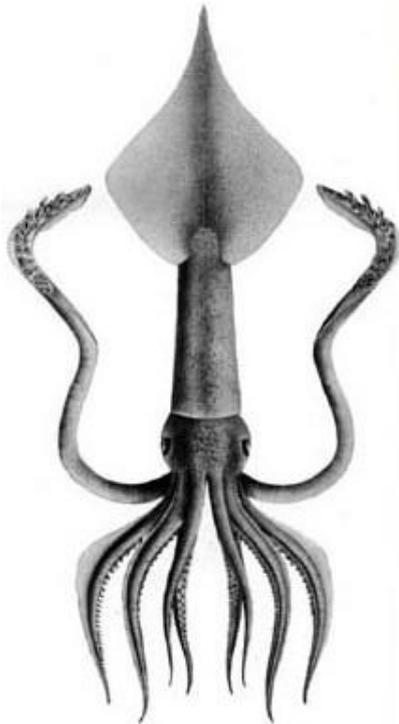
Distribuzione geografica: *Histioteuthis reversa* vive in acque temperate, subtropicali e tropicali della zona atlantico-mediterranea, ma sembra essere assente nel golfo del Messico, nell'area caraibica e nel settore sudoccidentale.

Habitat e biologia: Questa specie viene catturata occasionalmente con reti a circuizione o a strascico. In base alle catture si è osservato che gli individui giovanili vivono dapprima entro i 200 metri in maniera costante, e in seguito migrano a profondità maggiori seguendo però una migrazione circadiana fino a 630 m di giorno e 260 m di notte. Gli adulti invece maturano tra i 500 e i 1000 metri di profondità e le femmine risalgono per la deposizione che avviene negli strati superficiali, più ricchi di nutrimento (Quetglas et al., 2010). Uno studio condotto nel nord Atlantico evidenzia come questa specie, insieme con altri cefalopodi di profondità, accumuli inquinanti organici e tributina, di origine antropica (Unger et al., 2006), il cui accumulo può avere implicazioni negative non solo per i predatori come capodogli e altri

odontoceti o squali, ma anche per l'uomo dal momento che tra i maggiori predatori di *H. reversa* vi sono anche sgombridi, pesci spada, gamberi rossi.

Famiglia Onychoteuthidae Gray, 1849

***Ancistroteuthis lichtensteini* (Férussac, 1835)**



Caratteristiche: I totani di questa famiglia sono caratterizzati da tentacoli che all'estremità portano 2 serie di robusti uncini, che nella serie ventromediale sono di maggiori dimensioni. La specie in oggetto, nome volgare totano angelo, presenta mantello molto allungato (lunghezza max 300 mm) e appuntito posteriormente, pinne lanceolate e con margine posteriore concavo. Le estremità dei tentacoli sono molto sviluppate, fino a 1/3 della lunghezza del mantello, e portano delle ventose sul carpo, l'area sita posteriormente agli uncini.

Distribuzione geografica: Attualmente la specie è conosciuta nell'Atlantico orientale e sudoccidentale, nel Mediterraneo, nel Golfo del Messico e nel Pacifico sudoccidentale.

Habitat e biologia: *A. lichtensteini* vive generalmente tra la superficie e i 250 m, spesso in associazione con i fondali. In Sardegna è stato pescato a 550 metri di profondità (Cuccu et al., 2003a). Si nutre di pesci e crostacei ed è predato da cetacei odontoceti, pesci predatori pelagici e demersali, oltre che dal gambero rosso *Aristaeomorpha foliacea* (Bello & Pipitone, 2002). Non avendo carni ammoniacali, questa specie è da ritenersi commestibile e potrebbe diventare una specie bersaglio della pesca ma pochissimo si conosce della sua distribuzione quantitativa, e attualmente fa parte esclusivamente del bycatch nello strascico di profondità (Roper & Jereb, 2010b).

Famiglia Octopoteuthidae Berry, 1912

Octopoteuthis sp. Rüppell, 1844



Caratteristiche: Le 7 specie appartenenti a questo genere hanno carni dalla consistenza alquanto gelatinosa. Le braccia tentacolari si trovano soltanto nelle paralarve e sono tipicamente assenti negli adulti, per cui restano soltanto le 8 braccia e il nome comune degli *Octopoteuthis* è totano-polpo. Il mantello è corto, conico, e le pinne, fuse insieme alla base, sono molto lunghe (90% del mantello) e larghe (più della lunghezza del mantello), muscolose. Sono presenti fotofori nella parte posteriore del corpo, alla base

dell'imbuto e singoli alle estremità di tutte le braccia. Alla stessa famiglia appartiene il genere simile *Taningia* (Roper & Jereb, 2010c).

Distribuzione geografica: Il genere *Octopoteuthis* è diversamente rappresentato dalle sue specie in acque tropicali, subtropicali e subtemperate di tutti gli oceani, Mediterraneo compreso.

Habitat e biologia: La distribuzione verticale è da mesopelagica a batipelagica, fino a 2000 metri, con migrazioni notturne verso profondità inferiori. Le catture interessano maggiormente individui giovanili in quanto migratori planctonici. Tra i predatori di *Octopoteuthis* spp. sono numerose specie oceaniche come pesci spada, sgombridi, capodogli, delfini e uccelli marini, oltre ad altri cefalopodi. Oltre alla rarità con cui capitano nel bycatch della pesca a strascico, vista la consistenza poco appetibile della carne queste specie non hanno alcun interesse alimentare. Ad oggi, la cattura di 3 individui di cui una femmina “spenta” hanno aperto degli interrogativi sulla validità delle attuali chiavi di classificazione e

sulla necessità di unire l'approccio investigativo morfologico a quello molecolare (Cuccu et al., 2013a; Jereb et al., 2012).

Famiglia Ancistrocheiridae Pfeffer, 1912

***Ancistrocheirus lesueurii* (d'Orbigny, 1842)**



Caratteristiche: Questa specie, finora unico rappresentante della famiglia, ha mantello conico, largo e lungo fino a 410 mm, posteriormente allungato a formare la coda. Le pinne sono subterminali e molto sviluppate, fino all'80% della lunghezza del mantello. Le braccia sono robuste e non presentano ventose ma 2 serie di uncini, così come le estremità dei tentacoli; la superficie ventrale del mantello è punteggiata di 20-24 fotofori, presenti anche sullo stesso lato nella testa e nelle pinne.

Distribuzione geografica: è una specie cosmopolita, il cui areale è compreso tra il 40° parallelo N e il 30° S.

Habitat e biologia: *A. lesueurii* è una specie neritico-oceanica da epipelagica a batiale, che compie migrazioni verticali giornaliere e migrazione ontogenica fino ad almeno 680 metri. In base alla profondità regola la sua bioluminescenza. Esiste una forma di dimorfismo sessuale, in quanto i maschi vivono un anno e le femmine maturano a 1,5 anni. I principali predatori di *A. lesueurii* sono pesci pelagici come gli sgombridi, *Xiphias gladius*, squali, uccelli marini, odontoceti come capodogli e globicefali.

Date le dimensioni considerevoli questa specie ha un potenziale commerciale, ma perché su di essa si concentri uno sforzo di pesca non ci sono ancora sufficienti conoscenze sulla sua distribuzione (geografica e verticale) e sulle strutture di popolazione (Roper & Jereb, 2010d).

Famiglia Ommastrephidae Steenstrup, 1857

Sottofamiglia Illicinae Posselt, 1891

Illex coindetii (Verany, 1839)



Caratteristiche: il totano comune ha mantello lungo e stretto, più largo anteriormente, e posteriormente appuntito, che può misurare fino a 380 mm. Le pinne, lunghe fino al 60% del mantello, formano un rombo. Sulla parte terminale (dactylus) dell'estremità del tentacolo si trovano 8 file trasversali di minute ventose.

Distribuzione: È distribuito nel Mare Mediterraneo eccetto l'Alto Adriatico, nell'Oceano Atlantico orientale, in quello occidentale dal Golfo del Messico al Venezuela (Roper et al., 1984; Belcari, 1999b).

Habitat e biologia: specie demersale e neritica, si trova tra la superficie e i 1000 m di profondità, fino alla scarpata continentale superiore. In Mediterraneo è più frequente tra 60 e 400 metri, con migrazioni notturne verso la superficie. Si trova comunemente in fondali molli a *Funiculina*, spesso associato a specie di grande interesse per la pesca a strascico come *Aristaeomorpha foliacea*, *Parapeneus longirostris*, *Nephrops norvegicus*, *Micromesistius poutassou*, *Merluccius merluccius*, *Todaropsis eblanae*.

La deposizione avviene al termine del ciclo vitale si può protrarre da pochi giorni ad alcune settimane, durante tutto l'anno.

Come i cefalopodi in generale, ma in particolare come gli Ommastrephidae, *I. coindetii* è un predatore opportunistico e vorace, con un ampio spettro di prede comprendente soprattutto crostacei (eufasiacei) nei giovani, mentre gli individui di taglia maggiore sembrano preferire pesci e cefalopodi sia pelagici che demersali, senza escludere il cannibalismo in caso di alta

densità di popolazione o di scarsità di altro cibo. Numerosi sono anche i predatori di *I. coindetii*: tra questi, odontoceti come delfini, globicefali, grampi e tursiopi, pesci cartilaginei e ossei sia pelagici che demersali, e cefalopodi di maggiori dimensioni come *Todarodes sagittatus* e *Loligo* spp..

Non esistono statistiche specifiche sulla pesca di *I. coindetii* perchè si trova principalmente come bycatch nello strascico soprattutto in autunno e primavera per quanto riguarda gli adulti. Il totano è generalmente sbarcato e venduto insieme con altre specie di Ommastrephidae, di cui probabilmente costituisce la frazione maggiore particolarmente nel Mediterraneo centrale dove può essere una risorsa potenzialmente considerevole.

Sottofamiglia Todarodinae Adam, 1960

***Todarodes sagittatus* (Lamarck, 1798)**



Caratteristiche: Il mantello del totano viola è robusto, spesso, lungo e stretto con pinne ampie e robuste, lunghe quasi metà del mantello. Le ventose sono dotate di un robusto anello che in quelle delle braccia ha 7-9 denti e in quelle dei tentacoli 17-20 denti. Il colore di *T. sagittatus* è porpora scuro, senza fotofori. La taglia massima registrata per le femmine è di 640 mm nell'Atlantico e di 600 mm nelle acque circostanti la Sardegna per il Mediterraneo (Cuccu et al. 2005).

Distribuzione: Questa specie neritico-oceanica è diffusa in quasi tutto l'Atlantico orientale, dal mare Artico al golfo di Guinea, e in tutto il Mediterraneo incluso il Mare di Marmara.

Habitat e biologia: Compie migrazioni verticali giornaliere tra gli strati superficiali e i 1000 metri di profondità, ma alcune catture sono state effettuate a oltre 4500 metri; alcune

popolazioni soprattutto settentrionali effettuano anche migrazioni trofiche stagionali, passando in inverno dalla piattaforma alla scarpata continentale. La deposizione in *T. sagittatus* è annuale e avviene in acque profonde adiacenti alla scarpata continentale, in periodi diversi a seconda dell'area: a fine inverno in acque europee, tra settembre e novembre nel Mediterraneo occidentale. Generalmente le femmine sono più numerose dei maschi, oltre che più grandi. *Todarodes sagittatus* è molto vorace e attacca qualunque preda sia in grado di sopraffare. Si nutre principalmente di pesci ossei, secondariamente di crostacei e cefalopodi (Piatkowski et al., 1998; Quetglas et al., 1999). A sua volta è cacciato dai maggiori predatori del mare come tonni, pesci spada, squali, foche e cetacei, in particolar modo delfini e capodogli per i quali costituisce l'alimento più importante.

T. sagittatus ha un buon valore commerciale ed è localmente apprezzato, infatti è bersaglio di pesca a strascico, in particolare in Nord Atlantico, e nel Mediterraneo costituisce una parte rilevante del bycatch nel periodo estivo, difficilmente quantificabile poiché catturato insieme con altre specie di totani. Altre modalità di pesca includono l'uso di totanare e di reti a circuizione.

***Todaropsis eblanae* (Ball, 1841)**



Caratteristiche: Questa specie di totano ha mantello robusto e spesso, testa larga e grande, pinne larghe con margine anteriore più convesso di quello posteriore e lunghe meno della metà del mantello. Clava con 6 file trasversali di 4 tentacoli dei quali i

mediani sono di maggiore diametro rispetto ai laterali e hanno anelli con 30 denti minuti; le

ventose maggiori delle braccia hanno anelli con un dente mediano più sviluppato degli altri 3 o 4. La lunghezza massima del mantello è di 29 cm.

Distribuzione: *T. eblanae* è discontinuamente diffuso, trovandosi in Mediterraneo, e negli oceani Atlantico orientale (da 61°N a 40°N), Pacifico e Indiano sudoccidentali.

Habitat e biologia: è una specie demersale associata a fondali sabbiosi e fangosi tra 20 e 780 m, più frequentemente si trova intorno ai 200 m, tipicamente nei pressi del limite della piattaforma continentale dove le correnti garantiscono ricchezza di cibo. Non si registrano migrazioni di alcun tipo, tanto che *T. eblanae* è considerato il meno mobile tra gli Ommastrephidae, in questo somigliando ai Loliginidae. È un predatore opportunistico che si nutre lungo la colonna d'acqua di pesci e crostacei, e occasionalmente mostra cannibalismo; a sua volta è preda di numerosi cetacei e pesci ossei e cartilaginei.

Come per *Illex coindetii*, nemmeno per *T. eblanae* esistono statistiche di pesca specifiche, in quanto si ritrova principalmente nel bycatch insieme ad altre specie di totani. Comunque, a parte la discontinuità della sua distribuzione, esistono zone dove la sua presenza nelle catture è abbastanza costante e cospicua, come il canale di Sicilia o le acque atlantiche africane (Roper et al., 2010).

4. I PARASSITI DEI CEFALOPODI

Il parassitismo è una forma di associazione molto intima tra due organismi, nella quale uno (il parassita) dipende strettamente dall'altro (l'ospite) ricevendo da esso vantaggio, senza necessariamente apportargli dei danni; esso è uno dei più comuni, se non addirittura il più comune tra gli stili di vita sul Pianeta (Rhode, 2005), sebbene sia poco visibile perché spesso si svolge in modalità endosimbiotica e/o perché i parassiti hanno dimensioni ridotte (sovente microscopiche) e sono quasi sempre privi di pigmentazione.

Considerando in generale le patologie dei Cefalopodi causate da altri organismi, è importante sottolineare come le peculiarità nel piano strutturale di sviluppo nel comportamento e nei cicli vitali di questi animali rispetto agli altri appartenenti al phylum dei Molluschi abbiano avuto grande influenza sulla loro suscettibilità all'ingresso di patogeni. Ad esempio, tra queste caratteristiche si possono ricordare:

- a) la perdita della conchiglia esterna, che determina una maggiore esposizione agli agenti negativi;
- b) l'evoluzione di un rivestimento corporeo delicato e sofisticato (epitelio monostratificato con microvilli e coperto da muco) rispetto al contatto del cefalopode con il mondo esterno, che è di certo progettato perfettamente per la locomozione (e forse la respirazione), ma poco adatto a sopportare impatti fisici (Hochberg, 1990).

Quindi non è una sorpresa che le patologie più evidenti documentate in cefalopodi coinvolgono alterazioni della pelle seguite da invasione di patogeni opportunisti, come riportato di seguito nel presente paragrafo.

Indubbiamente ci sono molte lacune riguardo alle malattie descritte in cefalopodi raccolti in natura, probabilmente perché gli individui feriti o malati vengono consumati in fretta dai loro predatori ed è difficile che siano catturati. Nel 1990, Kinne considerava ancora “primitivo” lo

stato delle nostre conoscenze sulle malattie dei cefalopodi, soprattutto per via di quanto poco si sapesse circa i loro meccanismi di difesa interni.

La crescente importanza dei cefalopodi sia dal punto di vista commerciale che scientifico riveste un ruolo importante nello sviluppo degli studi sulla loro parassitologia. Alcune delle ragioni di questo sviluppo si trovano nel fatto che la comprensione della trasmissione dei parassiti e quindi delle malattie parassitarie attraverso la rete trofica possono contribuire, insieme con altre discipline, al miglioramento della gestione delle risorse alieutiche in generale e quindi di quelle rappresentate dai cefalopodi. Inoltre, visto il sempre più diffuso consumo di pesci e molluschi crudi, la conoscenza di parassiti zoonotici nei cefalopodi svolge un ruolo basilare nella pianificazione della sanità alimentare.

Nel presente capitolo sono descritte le caratteristiche generali dei gruppi di parassiti che interessano i cefalopodi con riferimento particolare a quelli cui appartengono i generi e/o le specie che sono stati individuati negli ospiti esaminati durante il presente lavoro, e che verranno trattati in dettaglio nei capitoli specifici.

4.1 Funghi, Dicyemidi

Le infezioni micotiche o dovute ad organismi simili a funghi sono molto rare: gli unici casi sono quelli riportati da Polglase (1980) e Polglase et al. (1984) che riguardano rispettivamente *Labyrinthula* sp. in *Eledone cirrhosa* pescati in Scozia e *O. vulgaris* del Golfo di Napoli, e miceli della specie *Cladosporium sphaerospermum* associati a lesioni della pelle in *E. cirrhosa*; inoltre, Jones & O'Dor (1983) descrissero lesioni probabilmente di origine micotica (ma anche contenenti altri organismi estranei) nelle branchie di *Illex illecebrosus*. In tutti questi casi gli animali erano stati pescati e tenuti in vasche di allevamento, quindi è anche possibile che le lesioni e le successive infezioni siano determinate dallo stress di laboratorio e

dal trascorso periodo riproduttivo degli esemplari, dopo il quale diminuiscono le capacità di rigenerazione e guarigione delle lesioni (Hanlon & Foresythe, 1990).

I Dicyemida sono un gruppo di metazoi esclusivo dei cefalopodi e secondo diversi autori molto abbondante in essi, tanto da interessare il maggior numero di osservazioni di tipo parassitologico (es. Hochberg, 1989, 1990; Pascual, 1996a). Il nome Dicyemida si riferisce ai due stadi espressi nel ciclo biologico di questi animali: il nematogeno (vermiforme, asessuale) e il rombogeno (sessuale). Questi organismi hanno un numero ridotto e costante di cellule e una organizzazione semplice, tanto che per essi e per gli Ortonectidi fu proposta da Van Beneden, (1876) la categoria dei Mesozoa, in quanto si riteneva che fossero l'anello mancante tra protozoi e metazoi (Hochberg, 1983, 1990). Ma alcune caratteristiche osservate di recente come certe giunzioni cellulari tipiche di animali pluricellulari li fanno ritenere dei metazoi primitivi, coevolutisi con i loro ospiti in funzione della vita strettamente endosimbiotica vista anche la loro specificità (Furuya & Tsuneki, 2003; Castellanos-Martínez & Gestal, 2013). I Dicyemida infatti vivono, senza apparentemente provocare visibili alterazioni funzionali né patologiche, esclusivamente negli organi escretori come le appendici renali, il pericardio, i cuori renali, di diverse specie di cefalopodi in particolare Octopoda e Sepiida (incluso *Octopus vulgaris*) in Europa e Mediterraneo (Gestal et al., 1997), Australia, Giappone (Furuya, 2010), Messico (Castellanos-Martínez & Gestal, 2013).

4.2 Regno Protozoa

I Protozoi sono un gruppo polifiletico di organismi eucarioti unicellulari che esistono come unità strutturalmente e funzionalmente indipendenti, avendo specializzazione intracellulare, seppure in alcuni casi si osservano organizzazioni di tipo coloniale. Generalmente hanno strutture deputate al movimento, come ciglia, flagelli o pseudopodi. I protozoi si ritrovano in tutti gli ambienti terrestri con forme sia a vita libera, autotrofe o eterotrofe, che parassitaria.

Complessivamente, i protozoi parassiti dei cefalopodi conosciuti sono pochi e gli studi più approfonditi riguardano i coccidi, appartenenti al phylum degli Apicomplexa.

Tra le più antiche osservazioni su infezioni da protisti si trovano quelle di Dobell (1909), che studiò alcune specie di Ciliati in ottopodi e decapodi. Ad oggi, nei cefalopodi sono presenti membri di 5 famiglie di ciliati. Secondo quanto osserva Hochberg (1990), curiosamente questi parassiti si trovano soltanto in specie di cefalopodi pelagici, come totani e calamari, o che pur essendo bentonici abbiano almeno stadi larvali planctonici (come alcuni ottopodi), o si nutrano sovente in prossimità della superficie (Sepiidae). Ciò indicherebbe che le infezioni da Ciliati non avvengano mai in prossimità del fondo.

Le infezioni da Flagellati sono decisamente più rare, però se questi parassiti sono presenti in abbondanza possono determinare lesioni importanti in pelle e branchie, come osservato da Hochberg (1990) in ottopodi infetti da *Ichthyobodo* sp..

Nei cefalopodi sono conosciute due specie di Microsporidia, tra cui *Steinhausia spraguei* che infetta le appendici renali di *Sepia elliptica*, riportata in India da Kalavati & Narasimhamurti (1977), e una specie osservata ma non descritta da Nagasawa & Nakata (1984) in *Ommastrephes bartrami* in Giappone. Infine, McLean et al. (1987) descrivono infezioni in Oegopsida da parte di forme cistiche di protisti “giganti” di collocazione tassonomica sconosciuta.

4.2.1 Phylum Apicomplexa

Questo gruppo di protozoi è formato interamente da parassiti endocellulari per tutto il loro ciclo biologico o parte di esso. Questa caratteristica principale è garantita da una struttura, il complesso apicale, presente negli stadi infettanti di merozoite e sporozoite. Essa ha la funzione di favorire la penetrazione del parassita nella cellula ospite mediante la

combinazione di azioni chimiche e meccaniche. Un altro adattamento alla vita intracellulare è l'assenza di ciglia e flagelli (Grabda, 1991).

Il ciclo di questi parassiti intracellulari si svolge di solito tra due ospiti. In quello intermedio avviene la fase asessuata, con riproduzione per scissione multipa (schizogonia) e produzione di merozoiti infettanti per l'ospite definitivo. Nell'ospite definitivo avviene invece la fase sessuale o gamogonica, nella quale i macro- e microgametociti si fondono formando zigoti, che per sporogonia generano gli sporozoiti, stadi infettanti per l'ospite intermedio. Generalmente questi sono contenuti in forme cistiche, le sporocisti, a loro volta raggruppate in oocisti, ciascuna derivata da uno zigote (Fig. 4.1).

Le due classi che compongono questo phylum sono i Piroplasma e gli Sporozoa. A questi ultimi appartengono diversi taxa parassiti di vertebrati ed invertebrati marini, tra cui l'unico che coinvolge i cefalopodi, la famiglia Aggregatidae rappresentata dal genere *Aggregata* (Lieberkün, 1854) Frenzel, 1885.

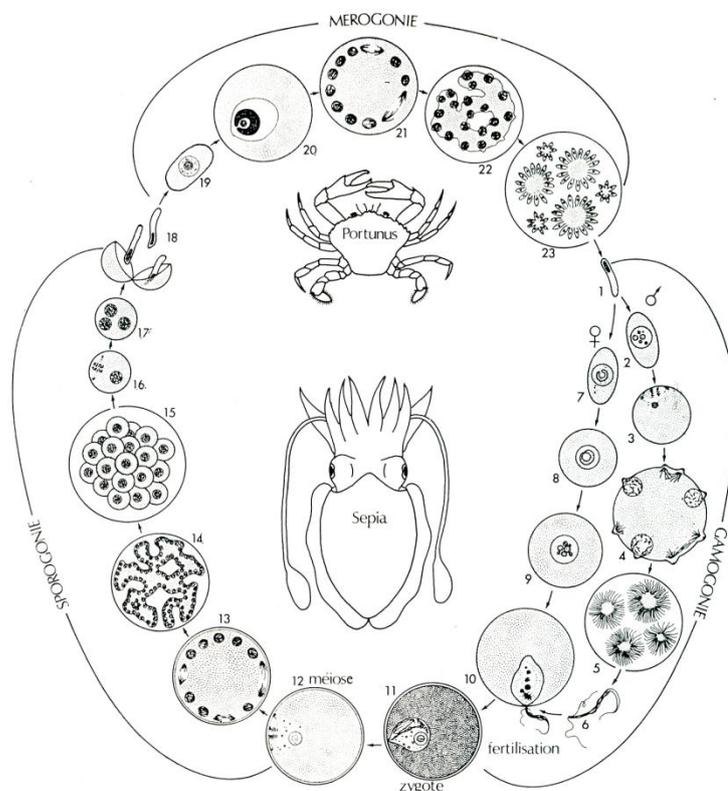


Figura 4.1 – Ciclo di *Aggregata eberthi* (Apicomplexa)

4.3 Regno Metazoa

I metazoi (Animalia) sono organismi eucarioti multicellulari ed eterotrofi, privi di pareti cellulari rigide e provvisti di tessuti differenziati inclusi nervi e muscoli che originano da foglietti germinativi (Grabda, 1991). Questo gruppo comprende un gran numero di parassiti dei cefalopodi, la maggior parte dei quali appartiene a platelminti e nematodi, rispetto ai quali i molluschi svolgono quasi esclusivamente il ruolo di secondo ospite intermedio o ospite paratenico, e in un ridotto numero di casi quello di ospite definitivo (Reimer, 1971; Ovestreet & Hochberg, 1975).

4.3.1 Phylum Platyhelminthes

I platelminti, o vermi piatti, sono il più numeroso raggruppamento tra i metazoi. La loro organizzazione strutturale è semplice: hanno corpo appiattito in senso dorso-ventrale, sono acelomati, ermafroditi e il loro apparato digerente è incompleto (sono aprocti), talvolta assente.

Essi includono quattro classi, di cui tre composte da organismi parassiti: Cestoda, Trematoda (con le sottoclassi Digenea e Aspidogastrea), Monogenea. I Turbellaria invece sono per lo più a vita libera con solo alcuni rappresentanti parassiti o commensali. Nelle forme parassite, senza eccezione, il tegumento è un derma sinciziale con connessioni citoplasmatiche connesse alle regioni nucleate sotto la membrana basale (Williams & Jones, 1994).

Molti platelminti parassiti di animali acquatici hanno enorme importanza ecologica ed economica: i digenei sono il gruppo di endoparassiti dei pesci più ricco in specie, e possono avere cicli estremamente complessi che coinvolgono numerose specie ospiti; i monogenei possono generare ingenti danni in acquacoltura con casi di mortalità di massa anche nei sistemi d'allevamento in mare (Rohde, 2005).

Cestoda

I Cestodi sono endoparassiti obbligati, con cicli a due o più ospiti. Sono generalmente nastriformi, privi di sistema digerente e assorbono nutrienti attraverso il tegumento ricoperto di microvilli. Essi si dividono in due sottoclassi principali: i Cestodaria, con due soli ordini, e gli Eucestoda (tenie) con 11 ordini. Questi hanno corpo costituito da una catena di numerose unità ripetitive dette proglottidi, ciascuna delle quali ha un (o più di uno) sistema riproduttivo maschile e uno femminile, l'insieme dei segmenti si chiama strobila. Essi vengono prodotti dalle cellule germinative che si trovano nel collo che è vicino all'estremità anteriore. Quest'ultima è detta scolice ed è l'organo di adesione e ancoraggio ai tessuti dell'ospite; esso porta ventose, pieghe adesive (dette botrie o botridi) e/o uncini (Schmidt, 1986).

I cestodi adulti vivono nel tratto digestivo dei vertebrati, mentre i loro ospiti intermedi possono essere artropodi, molluschi e altri vertebrati.

Tra i cestodi parassiti dei cefalopodi in acque mediterranee ed europee si possono annoverare stadi larvali appartenenti agli ordini Tetracystida, e Trypanorhyncha (Stunkard, 1977), i primi rappresentati dai generi *Phyllobothrium*, *Pelichnibothrium* e *Dinobothrium*, i secondi dai Tentaculariidae *Nibelunia lingualis* e *N. yamagutii* (Dawe et al., 1984; Pascual et al., 1995a; 1996a,b; Petric et al., 2011). Gli ospiti definitivi di tutti i cestodi menzionati sono generalmente pesci cartilaginei squaliformi o raiformi, o teleostei predatori pelagici (Williams, 1968; Schmidt, 1986; Hochberg, 1990; Scholz et al, 1998; Mladineo, 2006a; Healy et al., 2009; Pollerspöck, 2012; Caira & Pickering, 2013).

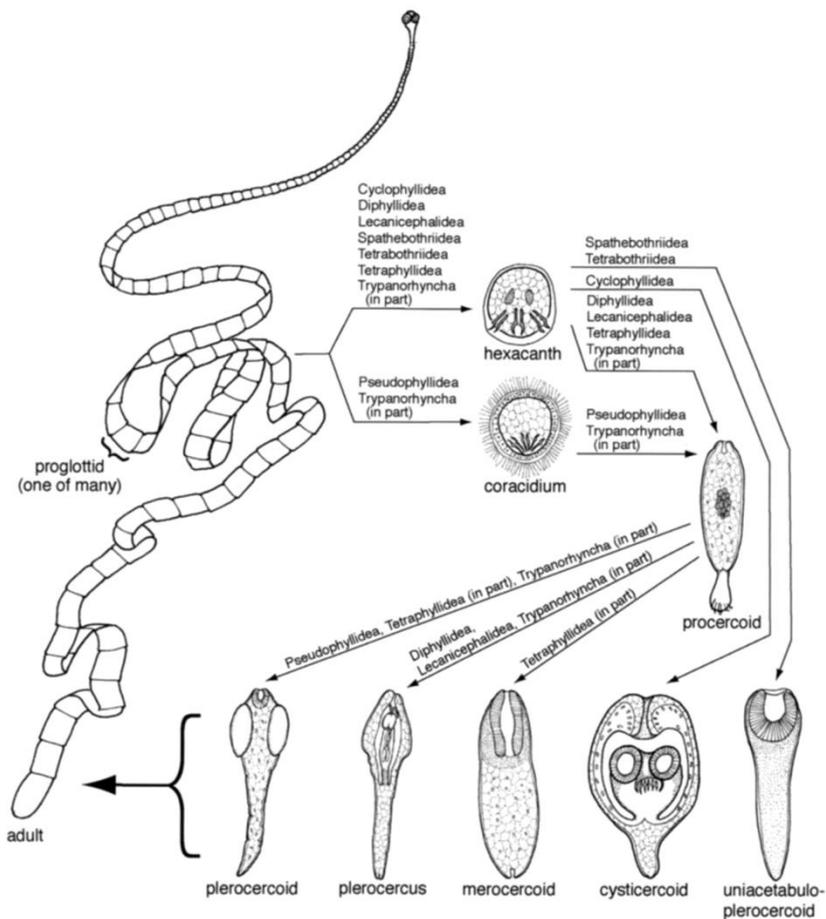


Figura 4.2 – Cestoda. Struttura di un adulto e varietà di forme larvali. (Caira & Reyda, 2005)

Trematoda

La classe dei Trematoda comprende due sottoclassi: gli Aspidogastrea, che sono parassiti monoxeni e hanno un organo ventrale di ancoraggio composto da diversi loculi o ventose, e i Digenea, parassiti eteroxeni che interessano anche i cefalopodi. I digenei devono il loro nome al fatto che sono eterogenetici, ovvero capaci di riprodursi sessualmente nello stadio adulto ed asessualmente, mediante una sorta di gemmazione interna tipica di alcuni particolari stadi larvali. I Digenea hanno corpo fogliaceo, una ventosa orale anteriore connessa con un apparato digerente a fondo cieco, e una ventosa ventrale o postero-ventrale, che risulta assente in alcune specie (Gibson, 2002).

I Digenea adulti sono prevalentemente parassiti dell'intestino dei vertebrati, ma possono anche trovarsi in altri organi o incapsulati nei tessuti. Hanno cicli di vita complessi con numerosi stadi larvali alcuni dei quali, come detto sopra, si moltiplicano in ospiti intermedi. Gli adulti, infettano tutte le classi di vertebrati marini. La moltiplicazione asessuata avviene invece in molluschi gasteropodi o lamellibranchi, e le metacercarie si trovano in molti gruppi di invertebrati e vertebrati (Cribb, 2005).

Nei cicli a due o a tre ospiti, gli stadi larvali si possono trovare nei tessuti di uno o più ospiti intermedi. Nei cicli a due ospiti il primo ospite intermedio è un mollusco (o raramente un anellide), nel quale il miracidio (stadio infettante per il primo ospite) si trasforma in sporocisti o redia, questa si replica asessualmente producendo sporocisti o redie figlie che a loro volta generano le cercarie (stadio infettante per l'ospite definitivo). Nei cicli a tre ospiti, le cercarie infettano un secondo ospite intermedio che può essere un pesce, un crostaceo, un mollusco o un cnidario. Qui esse si trasformano in metacercarie, che sono lo stadio infettante per l'ospite definitivo (Fig. 4.3).

Solo alcune famiglie di digenei interessano i cefalopodi, e quasi esclusivamente allo stadio larvale di metacercaria. Le osservazioni più esaurienti sono riportate per varie specie di cefalopodi delle acque americane da Overstreet & Hochberg (1975) che segnalano metacercarie di *Stephanochasmus* sp., Lepocreadiidae, Opecoelidae, Hemiuridae, inclusa la forma adulta di *Derogenes varicus* osservato anche da Brickle et al. (2001) in *Loligo gahi* nelle Falkland. La famiglia di digenei più rappresentata nei cefalopodi è senz'altro quella dei Didymozoidae, le cui forme larvali più osservate sono quelle definite come *Monilicaecum* sp. (Fig. 4.3) (Naidenova et al., 1985; Vidal & Haimovici, 1999; Overstreet & Hochberg, 1975); ma più spesso vengono indicate più genericamente come forme larvali di didimozoidi (Céspedes et al. 2011). I cicli biologici di questa famiglia di digenei che si svolgono in 3 o 4 ospiti diversi, sono in gran parte sconosciuti (Nikolaeva, 1985) e la morfologia delle larve è

completamente differente da quella degli adulti tanto da meritare studi dedicati e chiavi dicotomiche peculiari (Pozdnyakov, 1990; Pozdnyakov & Gibson, 2008).

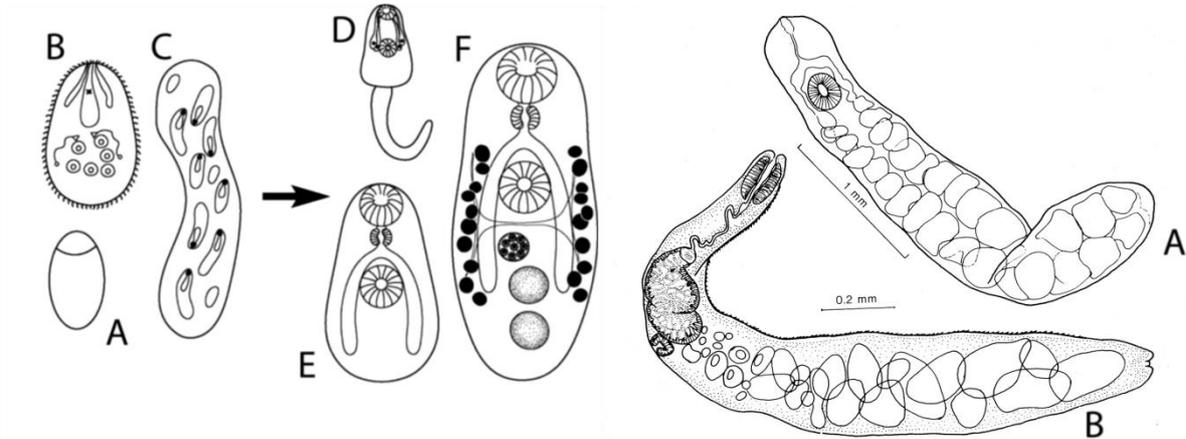


Figura 4.3 – Sottoclasse Digenea. A sinistra, stadi biologici. A: uovo; B: miracidio; C: sporocisti; D: cercaria; E: metacercaria; F: adulto. A destra, morfotipi larvali di Didymozoidae. A: *Torticaecum*; B: *Monilicaecum*. (Grabda, 1991; Nikolaeva, 1970).

4.3.2 Phylum Nematoda

I nematodi sono vermi pseudocelomati, provvisti dunque di una cavità celomatica piena di liquido e cellule che per tutta la lunghezza dell'animale si trova tra lo strato muscolare e gli organi interni, fungendo da scheletro idrostatico (Maggenti, 1981; McClellan, 2005). Il corpo dei nematodi è cilindrico, allungato, coperto da una cuticola pluristratificata formata da collagene, prodotta dallo strato epidermico intermedio, al di sotto del quale si trova lo strato muscolare, che è esclusivamente formato da fibre longitudinali. I nematodi sono organismi proctodeati, quindi il loro apparato digerente è completo, inizia con un'apertura boccale e termina con l'ano che si apre posteriormente. Sono privi di ciglia, protonefridi, apparati respiratorio e circolatorio; hanno sessi separati e gonadi che si aprono in corrispondenza del retto nel maschio e separatamente nella femmina (Moravec, 1994).

Questo Phylum è diviso in due classi, Adenophorea e Secernentea, che insieme comprendono oltre 250 famiglie e circa 40000 specie di vermi. Quelle a vita libera sono capaci di

colonizzare qualunque ambiente dalle profondità oceaniche alle vette più alte, dall'Artide all'Antartide (Maggenti, 1981; Williams & Jones, 1994). I nematodi parassiti infettano numerosissime forme vegetali ed animali. Le specie che interessano gli animali marini, quasi tutte appartenenti alla classe Secernentea, hanno cicli generalmente eteroxeni, in quanto da adulti occupano il tratto digerente o alcuni tessuti soprattutto di vertebrati, mentre gli stadi larvali si trovano nelle cavità corporee dei loro ospiti intermedi o paratenici, tra cui si distinguono pesci e cefalopodi, in particolare dell'ordine Oegopsida (Mattiucci & Nascetti, 2008).

La famiglia di nematodi più diffusa nei cefalopodi è senz'altro quella degli Anisakidae (Ascaridida) con gli stadi larvali dei generi *Anisakis*, *Hysterothylacium*, *Contracaecum* (Hochberg, 1989, 1990). Queste larve, di solito incapsulate in tessuto connettivo, infettano principalmente il tratto digerente e le gonadi (Pascual et al., 2007), ma anche il mantello (Nagasawa & Moravec, 1995, 2002).

Le descrizioni delle infezioni dovute a larve di Anisakidi sono numerose in tutti i mari e gli oceani, incluso il Mediterraneo (es. Angelucci et al., 2011; Culurgioni et al., 2010; Gestal et al., 1999; Giuffrida et al., 2002; Mattiucci et al., 2001; Petric et al., 2011) e le acque europee atlantiche (Abollo et al., 1998, 2001; Gonzalez et al., 2003; Pascual et al., 1995b; 1996a,c).

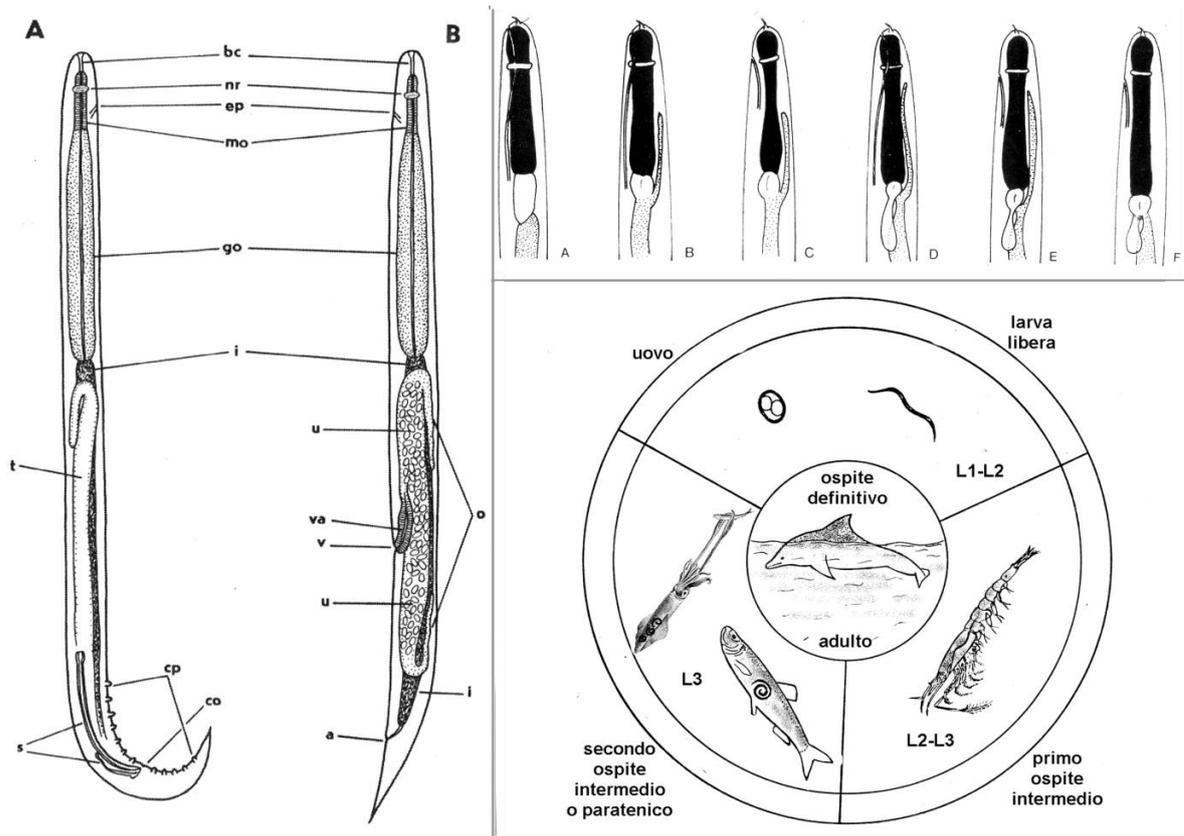


Figura 4.4 – Nematoda. A sinistra, caratteristiche generali. **A**: maschio, **B**: femmina. a, ano; bc, capsula boccale; nr, anello nervoso; ep, poro escretore; mo, esofago; go, ventricolo; i, intestino; t, testicolo; u, utero; s, spicole; v, vulva; va, vagina. In alto, distinzione per genere di larve anisakidi in base alla posizione del poro escretore e alla presenza di appendice e ventricolo (Moravec, 1994). **A**: *Anisakis*; **B**: *Phocanema*; **C**: *Porrocaecum*; **D**: *Contraecum*; **E**: *Hysterothylacium*; **F**: *Raphidascaris* (Grabda, 1991). In basso, schematizzazione del ciclo di *Anisakis simplex*, valido anche per *A. pegreffii* ma anche per altri *Anisakis* in senso generale (Grabda, 1991, modificato).

4.4 I parassiti come indicatori biologici

La gestione delle risorse marine sottoposte a sfruttamento è tanto più efficiente e può avere carattere di sostenibilità, quanto più corposa è la conoscenza della struttura di popolazione delle suddette risorse. Nel caso dei Cefalopodi questi studi presentano delle difficoltà peculiari che dipendono sia dal ciclo vitale generalmente breve con tassi di crescita variabili e con stagioni riproduttive che spesso si protraggono nel tempo, dando origine a popolazioni composte da multiple classi di età. Ciò rende difficoltosa la gestione delle risorse che sono così più soggette a sovrappesca con esiti imprevedibili nel reclutamento (Boyle & Boletzky, 1996; Pierce & Guerra, 1994). A questo scopo in un'ottica multidisciplinare di studi

bioecologici è possibile applicare un importante aspetto applicativo della parassitologia marina, che prevede l'utilizzo dei parassiti come indicatori biologici (o marche biologiche, o *biological tags*) delle specie ospiti di interesse (MacKenzie & Abaunza, 2005), in questo approccio, i parassiti vengono considerati come caratteri fenotipici depositari non solo di varie informazioni sulla biologia dell'ospite, ma anche sull'intera biocenosi di cui esso fa parte, evidenziando relazioni trofiche tra specie (Pascual et al., 1996c), distribuzioni zoogeografiche, associazioni intraspecifiche e migrazioni stagionali (Pascual & Hochberg, 1996). In ciò, i parassiti come marche biologiche rispondono a domande come altri tipi di marcatori fenotipici non fanno (Catalano et al., 2013). È pur vero che ogni tipo di indicatore ha i suoi aspetti positivi e quelli negativi, ed è questo uno dei motivi che li rendono complementari (MacKenzie & Abaunza, 2005). Principi di utilizzo dei parassiti come marche biologiche sono già stati utilizzati nello studio dei cefalopodi: nel primo caso, i livelli di anisakidi e cestodi abbinati a marcatori morfometrici e di maturità sessuale, sono stati applicati alla distinzione di stock di *Illex illecebrosus* (Dawe et al., 1984); nel secondo caso, in combinazione con tecniche di biologia molecolare, addirittura nell'identificazione di sottospecie di *Nototodarus sloani* (Smith et al., 1981). Gli stessi due gruppi di parassiti, anisakidi e cestodi, sono stati utilizzati anche da Bower & Margolis (1991) and Nagasawa et al. (1998) in indagini sugli stock di *Ommastrephes bartrami* nel Pacifico settentrionale, e da González & Kroeck (2000) che hanno studiato la struttura degli stock di *Illex argentinus* nel sud est dell'Atlantico, in base alle differenze tra gli indici parassitologici. Il principio di base di questa metodologia è che l'ospite può contrarre una particolare specie di parassita solo all'interno dell'area endemica di quel parassita, dove per area endemica si intende la regione geografica nella quale sussistono le condizioni per la trasmissione del parassita e il completamento del suo ciclo biologico (MacKenzie & Abaunza, 2005). Ciò dipende sia da condizioni ambientali adatte (soprattutto temperatura e salinità), sia dalla presenza di tutte le

specie ospiti necessarie per i diversi stadi del parassita. Perciò, se si trova un ospite di una determinata specie di parassita all'esterno della sua area endemica, si può affermare che quell'individuo si sia trovato in quell'area in un variabile lasso di tempo. È quindi possibile distinguere componenti a differenti gradi di separazione, ad esempio gruppi che condividono l'areale di caccia ma non quello di accoppiamento, o popolazioni separate in maniera spazio-temporalmente più ampia. In questo modo tale approccio è utilizzato da diversi decenni soprattutto per specie di pesci di particolare interesse commerciale, quasi sempre insieme ad altri tipi di marcatura, con i quali risulta complementare (Dogiel & Bychovsky, 1939; Herrington et al., 1939; Williams et al., 1992; MacKenzie & Abaunza, 2005; Mele et al., 2010a; Culurgioni, Mele et al., 2014).

5. MATERIALI E METODI

In questo capitolo sono illustrate prima di tutto le modalità e le località di campionamento, e in seguito il trattamento dei campioni, la ricerca dei parassiti e le modalità di osservazione in microscopia ottica sia a fresco che dopo procedure istologiche. Questi sono gli aspetti metodologici validi genericamente per tutte le specie ospiti esaminate e per tutte le categorie di parassiti protozoi e metazoi ricercate durante il periodo di dottorato, che perciò non verranno ripetuti nei successivi capitoli.

Nei capitoli specifici sono invece descritte le eventuali metodiche particolari, come quelle, utilizzate per i nematodi, di microscopia elettronica (svolta nel Dipartimento di Citomorfologia dell'Università di Cagliari) e di biologia molecolare (presso il laboratorio di Parassitologia del Dipartimento di Sanità Pubblica e Malattie Infettive, Sapienza Università di Roma, e il laboratorio di Parassitologia e Malattie Parassitarie, Dipartimento di Biologia Animale, Università degli Studi di Sassari).

5.1 Campionamento degli ospiti

I campioni delle 15 specie di cefalopodi esaminati parassitologicamente durante il presente lavoro sono stati collezionati complessivamente nell'ambito di tre differenti progetti sperimentali condotti dal Dipartimento di Scienze della Vita e dell'Ambiente dell'Università di Cagliari. La distribuzione dei campioni nelle diverse zone geografiche e fasce batimetriche è riassunta nella Tab. 5.1.

In particolare, 13 specie provengono principalmente dalle campagne sperimentali estive di pesca a strascico condotte nei mari circostanti la Sardegna dal 2009 al 2013 nell'ambito del progetto comunitario Mediterranean International Trawl Survey noto con l'acronimo MED.I.T.S., volto a valutare le risorse marine del Mediterraneo (Bertrand et al., 2002). Queste sono: *Ancistrocheirus lesueurii* (1 esemplare), *Ancistroteuthis lichtensteini* (6),

Histioteuthis bonnellii (61), *Histioteuthis reversa* (40), *Octopoteuthis* sp. (1), *Todarodes sagittatus* (47), *Todaropsis eblanae* (7), *Illex coindetii* (39), *Loligo forbesii* (6), *Pteroctopus tetracirrhus* (1), *Eledone cirrhosa* (39), *Sepia orbignyana* (5), *Rossia macrosoma* (1), Secondo la normativa di riferimento, la stratificazione e l'allocazione delle cale nella macroarea corrispondente ai mari sardi, il cui codice è Geographic Sub-Area 11 (GSA11), è stata effettuata seguendo la procedura del campionamento random stratificato. Di conseguenza l'area strascicabile è suddivisa in 7 sottozone, ciascuna con 5 strati batimetrici (Fig. 5.1).

Ulteriori campioni sono stati raccolti nell'ambito del progetto di ricerca Campionamento Biologico (CampBiol), parte del Programma Nazionale per la raccolta di dati alieutici (Regolamento CE 99/2008 e Decisioni della Commissione 949/2008 e 93/2010), che riguarda le catture (sia sbarcato che scarto) effettuate in alcune delle cale identificate con gli stessi criteri sopra citati, durante la pesca commerciale della stessa imbarcazione di riferimento. Entrambi i progetti si appoggiano sulla pesca a strascico in fondali a profondità variabile tra 80 e 600 metri.

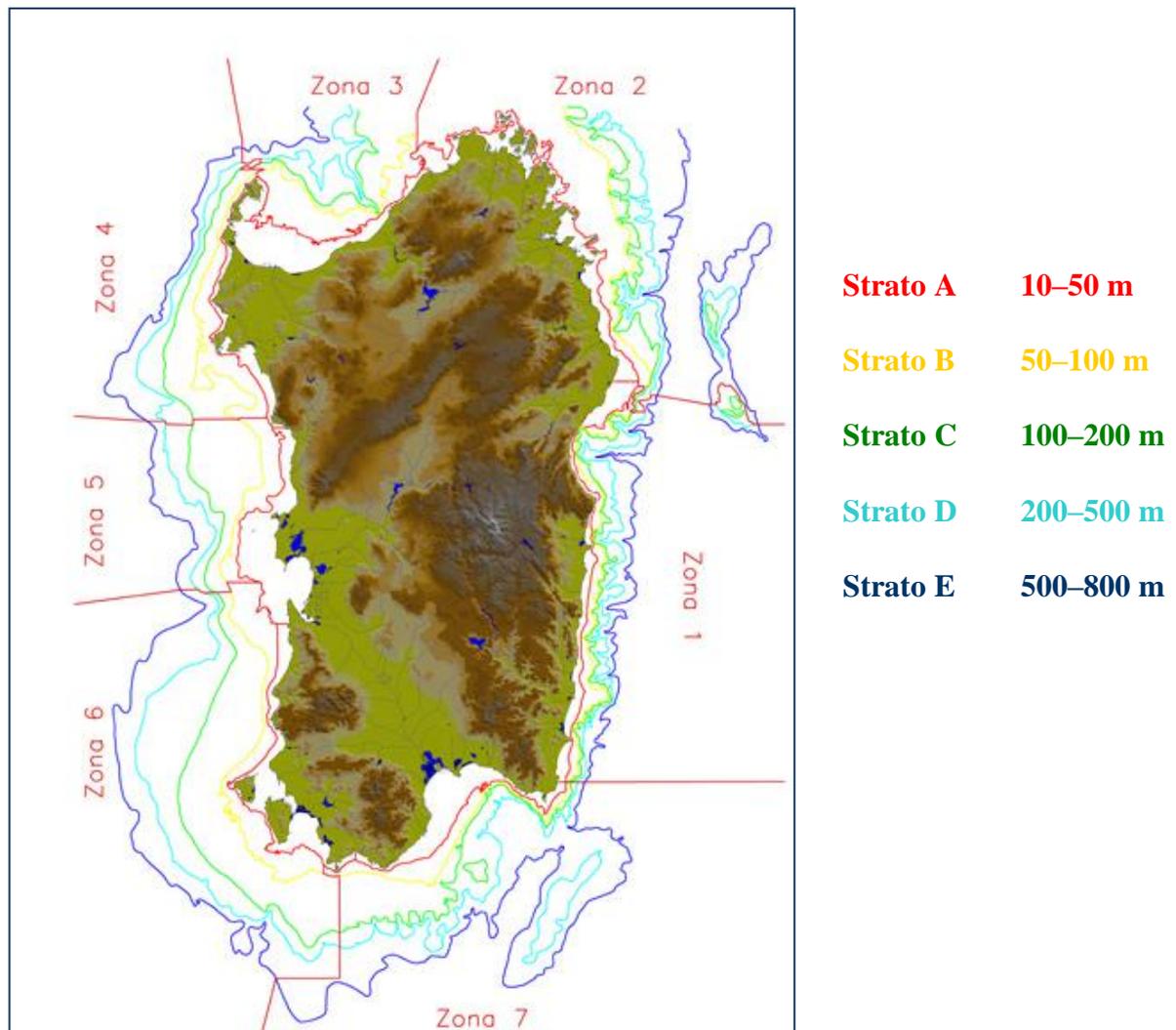


Fig. 5.1 – Distribuzione geografica e batimetrica dell’area d’indagine.

I campioni appartenenti alle specie *Octopus vulgaris* (41 esemplari), e *Octopus macropus* (11), sono stati catturati nei periodi estivo e autunnale compresi tra giugno 2011 e ottobre 2013, durante la pesca del polpo effettuata con l’uso di nasse dalle imbarcazioni Silo e Diego appartenenti alla cooperativa di pesca “Su Pallosu” che operano nel tratto di mare adiacente alla Penisola del Sinis nella Sardegna centro occidentale (Fig. 5.2) nell’ambito della sperimentazione denominata “Metodi innovativi per l’incremento di produzione del polpo comune *O. vulgaris* e per la valorizzazione della biodiversità costiera in un’area CAMP della Sardegna Occidentale” che rientra nell’ambito del più ampio progetto GIRA (Gestione Integrata delle Risorse Alieutiche).

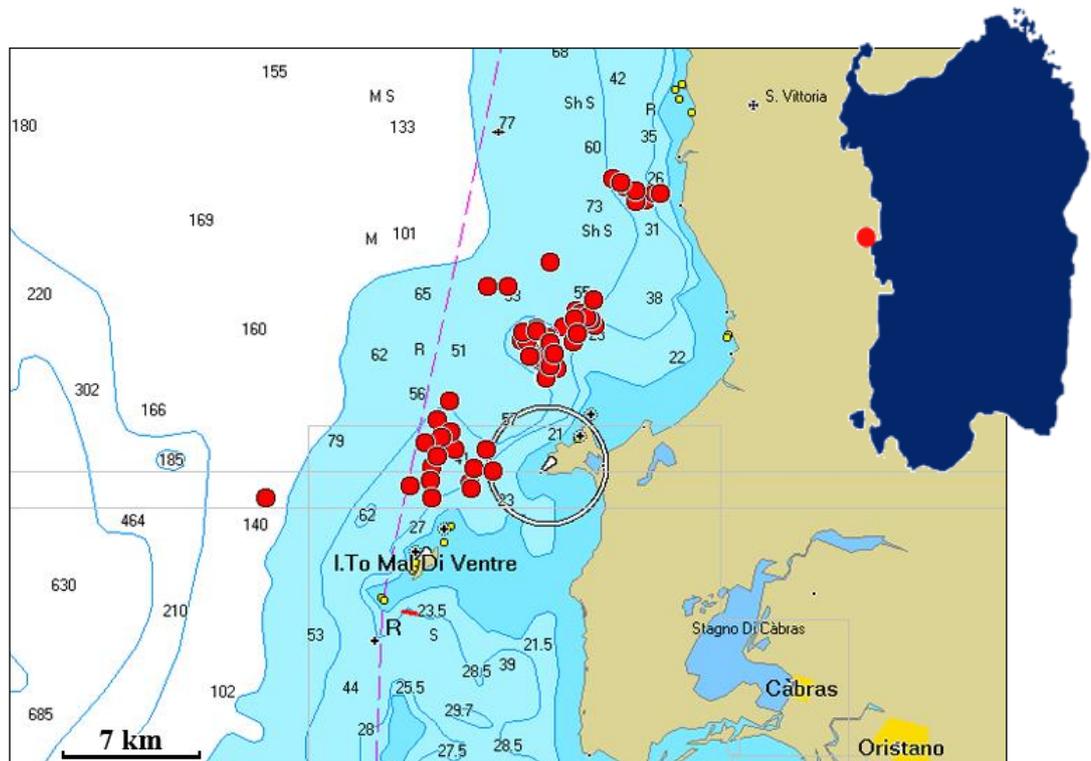


Fig. 5.2 - Localizzazione delle pescate al polpo con le nasse effettuate dagli operatori della marineria di Su Pallosu nell'ambito del progetto CAMP (Cau et al. 2013).

Gli esemplari sono stati trasportati in laboratorio dove sono stati esaminati freschi o dopo un breve periodo di congelamento a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$. Qui, di ciascun individuo sono stati rilevati il peso (PT) e la lunghezza mantello dorsale (LM) secondo la metodica standard indicata da Roper & Voss (1983). Inoltre è stato determinato il sesso e valutato lo stadio di maturità sessuale secondo la scala a X stadi (immaturi, in via di maturazione e maturi) indicata in Tab. 5.2.

Tabella 5.1 – Dati sul campionamento delle specie di cefalopodi in acque circostanti la Sardegna oggetto dello studio parassitologico.

Specie ospite	Zona	Strato	Profondità	Numero	LM (mm)	peso (g)
OCTOPODA						
<i>Octopus vulgaris</i>	5	A	30-45	37	7 - 23,6	121,3 - 6270
	6	A	40-50	2		
<i>Octopus macropus</i>	5	A	30-45	11	7,2 - 11,9	151,4 - 375
<i>Eledone cirrhosa</i>	7	C	100-200	39	4 - 11,3	135 - 452
<i>Pteroctopus tetracirrhus</i>	7	C	100-200	1	13,8	510
SEPIOLIDA						
<i>Rossia macrosoma</i> (1)	7	D	200-500	1	3,7	21,5
SEPIIDA						
<i>Sepia (Rhombosepia) orbignyana</i>	7	D	200-500	5	7,1 - 8,7	42,9 - 70,8
MYOPSIDA						
<i>Loligo forbesii</i>	2, 6, 7	D	200-500	7	18,2 - 25,5	192,3 - 474,5
OEGOPSIDA						
<i>Octopoteuthis</i> sp.	7	E	1600	1	27,4	1336
<i>Ancistrocheirus lesueurii</i>	7	E	550-650	1	21,7	661,6
<i>Ancistroteuthis lichtensteini</i>	6, 7	E	550-650	3	11 - 17,7	38,7 - 116
<i>Histioteuthis bonnellii</i>	6, 7	E	550-650	63	2,1 - 36,1	5,1 - 6315
<i>Histioteuthis reversa</i>	6, 7	E	550-650	40	2,3 - 15,5	10,5 - 940,8
<i>Todarodes sagittatus</i>	2	C	100-200	1	15,5 - 40	97 - 2031
	2,6,7	D	200-500	13		
	7	E	550-650	33		
<i>Illex coindetii</i>	1, 2, 5, 7	D	200-500	25	11 - 22	31,2 - 248
	7	E	550-650	14		
<i>Todaropsis eblanae</i>	6	D	200-500	7	7,5 - 9,2	33,7 - 45,8
Totale				308		

5.2 Ricerca ed estrazione dei parassiti

La ricerca generica dei parassiti è stata effettuata secondo l'adattamento di metodiche quali quelle descritte da Justine et al. (2012) riguardanti la dissezione degli organismi ospiti e il trattamento dei parassiti, e da Berland (1961) e Moravec (1994) per quanto riguarda i Nematoda in particolare.

In questa sezione sono illustrate le diverse fasi secondo le quali si è proceduto nella dissezione dei cefalopodi per la ricerca dei parassiti, che sono in larga parte le medesime sia per i protozoi che per i metazoi.

- nella prima fase, con l'ausilio di una lampada ad ingrandimento (o allo stereomicroscopio, se il campione era di dimensioni ridotte) si sono esaminate la superficie esterna dell'animale, le orbite oculari, la cavità del mantello e la superficie esterna degli organi in essa contenuti;
- nella seconda si è proceduto alla dissezione dell'animale mediante taglio longitudinale del mantello con forbici o bisturi ed esposizione degli organi interni. Questi sono stati estratti dalla cavità del mantello, separati in diverse capsule di Petri e osservati singolarmente allo stereomicroscopio; qui sono stati dissezionati e di quelli cavi sono stati esaminati il lume e la mucosa interna;
- nella terza fase, il mantello è stato disteso su una piastra da transilluminazione in modo da mettere in evidenza anomalie della muscolatura che rivelassero la presenza di lesioni o di parassiti incistati in profondità negli strati più spessi. Nello stesso modo è stata esaminata la superficie basale dell'epidermide del mantello, previa separazione dallo stesso;
- nella quarta fase, mirata all'individuazione di parassiti di dimensioni ridotte o alla distinzione di stadi biologici, porzioni significative degli organi dissezionati (fase

seconda) sono state poste su vetrino e osservate al microscopio ottico. In particolare questa procedura ha riguardato le parti del tratto digerente e le branchie.

I parassiti, o porzioni di tessuto infetto, individuati nelle fasi sopra descritte sono stati estratti delicatamente con aghi, microaghi e/o pipette pasteur e trasferiti in capsule di Petri con soluzione fisiologica (NaCl 0,09%) per un primo risciacquo. In seguito sono stati fissati in etanolo 70% o formalina tamponata.

5.3 Osservazioni al microscopio ottico

Una volta estratti dall'ospite, i parassiti sono stati esaminati a fresco o dopo fissazione. In alcuni casi, in particolare riguardanti larve di nematodi, si è reso necessario procedere alla chiarificazione delle stesse in una soluzione di alcool 70% contenente il 5% glicerina, per rendere maggiormente visibili caratteri di importanza tassonomica.

L'osservazione è stata effettuata con un microscopio ottico Olympus BX41, dotato di oculare micrometrico calibrato. Gli esemplari selezionati per l'analisi morfometrica sono stati misurati, riportando ogni valore in micrometri (μm) tranne dove diversamente espresso.

Le microfotografie sono state scattate con una fotocamera digitale Nikon Coolpix 4500 connessa al microscopio tramite raccordo "passo C" 1X, mentre i disegni sono stati realizzati con l'ausilio di una camera lucida U-DA.

5.4 Identificazione dei parassiti

L'identificazione morfologica dei parassiti è stata ottenuta dalla consultazione della letteratura disponibile, costituita da chiavi dicotomiche, descrizioni tassonomiche, studi epidemiologici, approfondimenti morfologici e anatomici, studi di cicli biologici. Secondo i diversi gruppi di metazoi, i testi principali utili allo scopo sono divisi come segue:

Nematoda: Berland (1961), Grabda (1976, 1991), Moravec (1994), Nagasawa & Moravec (1995, 2002); Trematoda Digenea: Grabda (1991), Overstreet & Hochberg (1975), Pozdnyakov (1996), Pozdnyakov & Gibson (2008); Cestoda: Jensen & Bullard, 2012; Schmidt (1984); Williams (1968). I parassiti protozoi del genere *Aggregata* sono stati identificati sulla base delle descrizioni fornite da Gestal et al. (1999, 2000, 2002a, 2005, 2007a, 2010); Licciardo et al. (2005); Mladineo & Jozić (2005).

I campioni sono stati infine conservati in etanolo 70%. Nell'etichetta di ciascuna provetta di conservazione sono stati riportati: il codice e la data di campionamento, la specie ospite, la specie/taxon del parassita, il numero di parassiti contenuti, il liquido di conservazione.

5.5 Dati statistici

Dopo le procedure di identificazione al microscopio ottico, i parassiti di ciascun taxon sono stati contati al fine di ottenere gli indici parassitologici di: prevalenza (P%), intensità (I), intensità media (IM), abbondanza media (AM) secondo Bush et al., 1997. Sono state inoltre considerate la ricchezza di specie parassite per ciascuna specie ospite (R) e la diversità media di specie di una categoria di parassiti per il totale delle specie indagate.

5.6 Osservazioni istologiche

La procedura eseguita sui tessuti infettati dal protozoo *Aggregata* spp. e dalle larve di anisakidi utilizza come mezzo di inclusione il glicol-metacrilato (GMA, Technovit 7100, Bio-Optica Milano). Questa resina sintetica bicomponente, rispetto alla classica paraffina, permette il taglio di sezioni molto sottili oltre a ridurre la formazione di artefatti migliorando la qualità dei preparati.

Porzioni di tessuto contenenti i parassiti sono state fissate in formalina 5% in una soluzione tampone di sodio fosfato (PBS), pH 7.4 0.01 M a temperatura ambiente. In seguito, sono stati risciacquati in PBS e disidratati in una scala ascendente di alcoli con passaggi doppi di 30 minuti in ciascuna gradazione (70, 95 e 100%).

La fase di inclusione ha previsto tre passaggi fondamentali:

1) pre-infiltrazione: i campioni sono stati immersi in una soluzione 1:1 composta da resina base ed etanolo assoluto, per 2 ore a temperatura ambiente;

2) infiltrazione: i campioni vengono immersi in una soluzione infiltrante composta da 100 ml di resina base e 1 g di induritore 1 (Dibenzilperossido), per 3 ore a temperatura ambiente;

3) inclusione: i campioni, infine, vengono immersi in una soluzione di inclusione mescolando 15 ml di soluzione di infiltrazione e 1 ml di induritore 2 (Derivati dell'acido barbiturico).

Dopo la completa polimerizzazione (2 ore circa a temperatura ambiente), sono state effettuate sezioni di spessore 4-5 μm mediante microtomo (2218 Historange Microtome, LKB Bromma) dotato di lame in vetro preparate con Reichert-Jung Knifemaker. Le sezioni ottenute sono state poste su vetrini portaoggetto in gocce di acqua distillata per determinarne la distensione, e asciugate a 37 °C.

Le sezioni ottenute sono state colorate con ematossilina/eosina secondo la procedura (modificata) proposta da Cerri & Sassi (2003) per i preparati inclusi in glicol-metacrilato:

- 1) colorazione in ematossilina di Harris per (15 min.);
- 2) risciacquo in acqua corrente (5 min.);
- 3) colorazione in eosina alcoolica (0,5% in etanolo 96%)(5 min.);
- 4) disidratazione con passaggi in etanolo 96% (x1) ed etanolo assoluto (x2);
- 5) chiarificazione in Histolemon.

Infine, dopo essere stati lasciati ad asciugare, i vetrini sono stati montati in resina Eukitt.

L'interpretazione degli effetti istopatologici osservabili è stata data sulla base di precedenti studi specifici (es. Estevez et al., 1996, Gestal et al., 2002b; Mladineo & Bočina, 2007, Pascual et al., 1996b) e di descrizioni più generali delle reazioni ai patogeni nei molluschi e nei cefalopodi (De Vico & Carella, 2012; Castellanos-Martinez & Gestal., 2013).

Tab. 5.2 - Scala di valutazione della maturazione sessuale dei cefalopodi utilizzata nell'ambito del progetto Medits (Lipinski, 1979).

Decapodi	Ghiandole Nidamentali (NG) e dell'ovidotto (OG) piccole e traslucide. Le ghiandole nidamentali accessorie (ANG) appaiono come dei puntini rossastri e, sono localizzate nella parte terminale delle NG . Ovario trasparente, viscoso privo di struttura granulare.	1a Immaturo	1 Immaturo
Ottopodi	OG piccole e traslucide. Ovario trasparente, viscoso privo di struttura granulare.		
Decapodi	NG e OG piccole e opache. Ovario semitrasparente con struttura granulare non chiaramente visibile ad occhio nudo. Ovidotti senza anse.	1b Immaturo in Sviluppo	1 Immaturo
Ottopodi	OG piccole e opache. Ovario semitrasparente con struttura granulare non chiaramente visibile ad occhio nudo. Ovidotti senza anse.		
Decapodi	NG e OG ingrandite. NG ricoprono alcuni organi interni. Ovario biancastro con struttura granulare chiaramente visibile, non raggiunge la metà posteriore della cavità del mantello.	2a In Preparazione	2 In via di maturazione
Ottopodi	OG ingrandite. Ovario biancastro con struttura granulare chiaramente visibile, non raggiunge la metà posteriore della cavità del mantello.		
Decapodi	NG grandi ricoprono i visceri. L'ovario occupa l'intera metà posteriore della cavità del mantello, contiene uova reticolate di differenti dimensioni. Ovidotti completamente sviluppati ma vuoti.	2b In via di Maturazione	2 In via di maturazione
Ottopodi	L'ovario occupa l'intera metà posteriore della cavità del mantello, contiene uova reticolate di differenti dimensioni. Ovidotti completamente sviluppati ma vuoti.		
Decapodi	NG come le precedenti. Ovario contenete un'alta percentuale di grandi uova reticolate. Ovidotti colmi di uova lisce mature.	3a Maturi	3 Maturi
Ottopodi	Ovario contenente un'alta percentuale di grandi uova reticolate. Ovidotti colmi di uova lisce mature.		
Decapodi	Ovidotti con uova lisce mature. Uova nell'ovario come sopra.	3b Parzialmente Spenti	3 Maturi
Ottopodi	Ovidotti con uova lisce mature. Uova nell'ovario come sopra.		
Decapodi	NG e OG grandi. Ovario flaccido, in riassorbimento con poche grandi uova e solamente uova immature attaccate al tessuto centrale. Ovidotti flaccidi con nessuna o solamente alcune uova mature.	3c Spenti	3 Maturi
Ottopodi	OG grandi. Ovario flaccido, in riassorbimento con poche grandi uova e solamente uova immature attaccate al tessuto centrale. Ovidotti flaccidi con nessuna o solamente alcune uova mature.		

6. RISULTATI GENERALI

Delle 15 specie di cefalopodi esaminate, 12 ospitavano almeno una specie/taxon parassita appartenente a protozoi del phylum Apicomplexa o a metazoi (Tab. 6.1) Nelle sole specie *Octopus macropus*, *Loligo forbesii* e *Sepia orbignyana* non è stata trovata alcuna forma parassita.

È opportuno sottolineare che alcune delle specie esaminate sono rappresentate da esemplari singoli, o per il fatto che si tratta di ritrovamenti rarissimi o unici nelle acque sarde come *Ancistrocheirus lesueurii* e *Octopoteuthis* sp. (Cuccu et al., 2013a), o perché sono specie che rappresentano in misura ridotta gli sbarcati nelle cale di pesca che sono state selezionate per le analisi parassitologiche, come *Pteroctopus tetracirrhus* e *Rossia macrosoma*. I dati statistici relativi a questi casi non sono considerati singolarmente nelle diverse discussioni ma vengono valutati nelle considerazioni generali in cui alcuni gruppi sono trattati collettivamente.

Sei delle specie esaminate sono risultate positive a infezioni da protozoi, tutte attribuite al genere *Aggregata*, che sono riassunte nella tabella 6.2 ed esaminate in dettaglio nel capitolo 7.

In riferimento ai parassiti metazoi, su un totale di 308 cefalopodi esaminati, 136 (P totale = 44,2%) appartenenti a 11 specie (in quanto in *R. macrosoma* era presente soltanto *Aggregata* sp. 2) sono risultati positivi ad almeno una specie.

Larve del phylum Nematoda sono state individuate in nove delle specie esaminate, mentre tra i platelminti i Digenea erano presenti in sette specie e i Cestoda in sei specie. Questi due phyla di parassiti sono trattati rispettivamente nei capitoli 8 e 9 della presente tesi.

Il numero totale di elminti collezionati è stato di 1036, distribuiti in modo molto vario nelle diverse specie esaminate, come si evince dall'esame delle Tabb. 6.1-6.4.

Ad esempio, negli Octopoda sono stati trovati quasi esclusivamente Digenea e Cestoda, con prevalenze totali limitate: 5,2% in *Eledone cirrhosa*, 4,9% in *Octopus vulgaris*. Negli Oegopsida invece si sono riscontrati tutti i gruppi tassonomici presenti in questo studio, e

spesso con alti indici parassitologici relativamente ai Nematoda. Tra i totani, le specie nelle quali si è registrata la prevalenza totale più alta sono gli Ommastrephidae *Todaropsis eblanae* (P = 85,7%), *Todarodes sagittatus* (P = 76,6%), e *Illex coindetii* (P = 74,4%), seguiti da appartenenti ad altre famiglie quali *Ancistroteuthis lichtensteini* (66,7%), *Histioteuthis reversa* (P = 60%) e *H. bonnellii* (P = 47,6%). Tra queste, le specie ospiti che hanno mostrato la maggiore ricchezza (R) parassitaria sono *T. sagittatus*, *H. bonnellii* e *I. coindetii*, che ospitavano ciascuno sette taxa di metazoi. Se si considera la presenza delle infezioni da *Aggregata* spp., il primato della R spetta a *T. sagittatus* e *H. bonnellii* con otto taxa parassiti. La composizione della fauna parassitaria nelle diverse specie di Oegopsida è illustrata graficamente nella Fig. 6.1. Lo studio della diversità relativa di specie (numero medio di specie di un determinato gruppo parassita presenti nel totale delle specie ospiti esaminate) ha mostrato valori di 0,4 per gli Apicomplexa, 1,4 per i Nematoda, 0,8 sia per i Cestoda che per i Digenea. Ciò significa che in ogni specie di cefalopode tra quelle esaminate, ad esempio si trova mediamente 1,4 specie di nematodi. Per il totale dei parassiti, questo valore è di 2,9.

Dal punto di vista delle singole specie/taxa parassiti, quella che ha fatto registrare la più alta prevalenza è stata *Anisakis physeteris* (Anisakidae), che ha raggiunto il 66,0% in *T. sagittatus*. Invece, le larve di *Lappetascaris* sp. tipo A (Anisakidae) in *H. reversa* hanno avuto la più alta intensità, sia media (10,9) che in un singolo ospite (50). Questo morfotipo larvale è stato reperito in ben sette specie ospiti. Al contrario, vi sono alcuni parassiti che sono stati trovati soltanto in una specie ospite. È il caso, tra i Nematoda, del Cystidicolidae *Spinitectus* sp. in *I. coindetii*, e tra i Cestoda dei plerocercoidi appartenenti al genere *Nybelinia* (Trypanorhyncha) in *T. sagittatus*. Tra i Digenea, il morfotipo larvale *Torticaecum* (Dydimozoidae) è stato rinvenuto solo in *H. bonnellii*, e gli adulti di *Derogenes varicus*, uno dei parassiti più generalisti del mondo marino (Køie, 1979; Overstreet & Hochberg, 1975), soltanto in *E. cirrhosa*.

Tabella 6.1 – Cefalopodi delle acque intorno alla Sardegna e parassiti in essi riscontrati nel presente studio.

Specie ospite (n.)	Specie/taxa parassita	P (%)	n. elminti	Ptot elminti (%)	n. tot elminti
OCTOPODA					
<i>Octopus vulgaris</i> (41)	<i>Aggregata octopiana</i>	86,7	-	4,9	2
	Tetraphyllidea pleroc. 1	4,9	2		
<i>Eledone cirrhosa</i> (39)	<i>Lappetascaris</i> sp. B	2,6	1	5,2	27
	<i>Derogenes varicus</i>	2,6	26		
<i>Pteroctopus tetracirrhus</i> (1)	Tetraphyllidea pleroc. 1	100	6	100	6
SEPIOLIDA					
<i>Rossia macrosoma</i> (1)	<i>Aggregata</i> sp. 2	100	-	100	-
OEGOPSIDA					
<i>Octopoteuthis</i> sp. (1)	<i>Anisakis physeteris</i>	100	1	100	1
<i>Ancistrocheirus lesueurii</i> (1)	<i>Lappetascaris</i> sp. A	100	4	100	4
<i>Ancistroteuthis lichtensteini</i> (6)	<i>Aggregata</i> sp. 1	16,7	-	66,7	27
	<i>Lappetascaris</i> sp. A	50,0	22		
	<i>Lappetascaris</i> sp. B	33,3	4		
	<i>Allomonilicaecum</i>	16,7	1		
<i>Histioteuthis bonnellii</i> (63)	<i>Aggregata</i> sp. inq.	19,2	-	47,6	142
	<i>Lappetascaris</i> sp. A	42,9	120		
	<i>Anisakis pegreffii</i>	1,6	1		
	<i>A. physeteris</i>	12,7	13		
	<i>Neomonilicaecum</i>	0,8	1		
	<i>Torticaecum</i>	0,8	1		
	<i>Scolex pleuronectis</i>	3,2	5		
	Plerocercoidi 2	1,6	1		
<i>Histioteuthis reversa</i> (40)	<i>Aggregata</i> sp. inq.	67,5	-	60,0	244
	<i>Lappetascaris</i> sp. A	52,5	227		
	<i>Lappetascaris</i> sp. B	12,5	6		
	<i>A. pegreffii</i>	7,5	3		
	<i>Neomonilicaecum</i>	5,0	5		
	<i>Scolex pleuronectis</i>	7,5	3		
<i>Todarodes sagittatus</i> (47)	<i>Aggregata sagittata</i>	17,0	-	76,6	322
	<i>Lappetascaris</i> sp. A	19,1	56		
	<i>Lappetascaris</i> sp. B	6,4	6		
	<i>A. pegreffii</i>	17,0	38		
	<i>A. physeteris</i>	66,0	162		
	<i>Allomonilicaecum</i>	4,3	2		
	<i>Scolex pleuronectis</i>	29,8	53		
	<i>Nybelinia</i> sp.	6,4	5		
<i>Illex coindetii</i> (39)	<i>Lappetascaris</i> sp. A	51,3	55	74,4	249
	<i>Lappetascaris</i> sp. B	25,6	77		
	<i>A. pegreffii</i>	51,3	44		
	<i>A. physeteris</i>	10,3	4		
	<i>Spinitectus</i> sp.	2,6	1		
	<i>Neomonilicaecum</i>	17,9	45		
	<i>Scolex pleuronectis</i>	23,1	23		
<i>Todaropsis eblanae</i> (6)	<i>Lappetascaris</i> sp. A	28,6	3	85,7	12
	<i>A. physeteris</i>	42,9	8		
	<i>Neomonilicaecum</i>	14,3	1		
Totale				44,2	1036

Tabella 6.2 – Protozoi (Apicomplexa) parassiti di cefalopodi delle acque intorno alla Sardegna.

Specie parassita	Specie ospite (n°)	Sito d'infezione	P (%)	IM ± ES	Intervallo
APICOMPLEXA					
Eucoccidiorida					
<i>Aggregata octopiana</i> (Schneider, 1875) Frenzel, 1885	<i>Octopus vulgaris</i> (41)	esofago, stomaco, cieco, intestino, branchie, mesenteri	86,7	-	1-3*
<i>Aggregata sagittata</i> Gestal et al., 2000	<i>Todarodes sagittatus</i> (47)	esofago, stomaco, cieco, intestino, branchie	17,0	-	1-3*
<i>Aggregata sp. inq.</i>	<i>Histioteuthis reversa</i> (40)	esofago, stomaco, cieco, intestino, branchie	67,5	-	1-3*
	<i>Histioteuthis bonnellii</i> (63)		19,2	-	
<i>Aggregata sp. 1</i>	<i>Ancistroteuthis lichtensteini</i> (6)	stomaco	16,7	-	1*
<i>Aggregata sp. 2</i>	<i>Rossia macrosoma</i> (1)	stomaco	100	-	1*

Tabella 6.3 – Nematodi parassiti di cefalopodi delle acque intorno alla Sardegna.

Specie parassita	Specie ospite (n°)	Sito d'infezione	P(%)	IM ± ES	Intervallo
NEMATODA					
Anisakidae					
<i>Anisakis pegreffii</i> L3 Campana-Rouget & Biocca, 1955	<i>Illex coindetii</i> (39)	parete stomaco, gonadi	51,3	2,2 ± 0,4	1-7
	<i>H. reversa</i>		7,5	1,0	1
	<i>H. bonnellii</i>		1,6	1,0	1
	<i>T. sagittatus</i>		17,0	4,8 ± 2,0	1-18
<i>Anisakis physeteris</i> L3 (Baylis, 1923)	<i>I. coindetii</i>	gonadi, mesenteri	10,3	1,0 ± 0,0	1
	<i>H. bonnellii</i>		12,7	1,6 ± 0,3	1-3
	<i>Octopoteuthis sp.</i> (1)		100	1,0	1
	<i>T. sagittatus</i>		66,0	5,2 ± 0,9	1-20
<i>A. pegreffii/A. simplex</i> s.s. ibrido	<i>I. coindetii</i>	parete stomaco	2,6	1,0	1
	<i>T. sagittatus</i>		2,1	1,0	1
<i>Lappetascaris sp. L3</i> tipo A (sensu Nagasawa & Moravec, 2002)	<i>Ancistrocheirus lesueurii</i> (1)	mantello, branchie, cavità viscerale, mesenteri, occhi	100	4,0	4
	<i>A. lichtensteini</i>		50,0	7,3 ± 2,7	2-11
	<i>I. coindetii</i>		51,3	2,8 ± 0,5	1-9
	<i>H. reversa</i>		52,5	10,9 ± 3,0	1-50
	<i>H. bonnellii</i>		42,9	4,4 ± 1,1	1-28
	<i>T. sagittatus</i>		19,1	6,2 ± 3,4	1-29
<i>Lappetascaris sp. L3</i> tipo B (sensu Nagasawa & Moravec, 2002)	<i>T. eblanae</i>	28,6	1,5 ± 0,5	1-2	
	<i>H. reversa</i>	12,5	1,2 ± 0,2	1-2	
	<i>I. coindetii</i>	25,6	7,7 ± 1,8	3-22	
	<i>T. sagittatus</i>	6,4	2,0 ± 0,6	1-3	
	<i>E. cirrhosa</i> (39)	2,6	1,0	1	
Cystidicolidae					
<i>Spinitectus sp.</i> Fourment, 1883	<i>I. coindetii</i>	parete stomaco	2,6	1,0	1

Tabella 6.4 – Platelminti (Digenei e Cestodi) parassiti di cefalopodi delle acque intorno alla Sardegna.

Specie/tipo parassita	Specie ospite (n°)	Sito d'infezione	P(%)	IM ± ES	Intervallo
DIGENEA					
Didymozoidae					
<i>Neomonilicaecum</i>	<i>H. bonnellii</i>	stomaco, intestino	0,8	1,0	1
	<i>H. reversa</i>		5,0	2,5 ± 1,5	1-4
	<i>I. coindetii</i>		17,9	6,4 ± 3,4	1-26
	<i>T. eblanae</i>		14,3	1,0	1
<i>Allomonilicaecum</i>	<i>A. lichtensteini</i>	stomaco	16,7	1,0	1
	<i>T. sagittatus</i>		4,3	1,0 ± 0,0	1
<i>Torticaecum</i>	<i>H. bonnellii</i>	stomaco	0,8	1,0	1
Derogenidae					
<i>Derogenes varicus</i>	<i>Eledone cirrhosa</i> (39)	stomaco	2,6	26,0	26
CESTODA					
Tetraphyllidea					
<i>Scolex pleuronectis</i>	<i>H. bonnellii</i>	stomaco, intestino	3,2	2,5 ± 1,5	1-4
	<i>H. reversa</i>		7,5	1,0 ± 0,0	1
	<i>I. coindetii</i>		23,1	2,6 ± 0,7	1-7
	<i>T. sagittatus</i>		29,8	3,8 ± 1,7	1-25
	<i>O. vulgaris</i>		4,9	1,0 ± 0,0	1
	<i>Pteroctopus tetracirrhus</i> (1)		100	6,0	6
Plerocercioide 2	<i>H. bonnellii</i>		1,6	1,0	1
Tripanorhyncha					
<i>Nybelinia</i> sp.	<i>T. sagittatus</i>	parete stomaco	6,4	1,7 ± 0,7	1-3

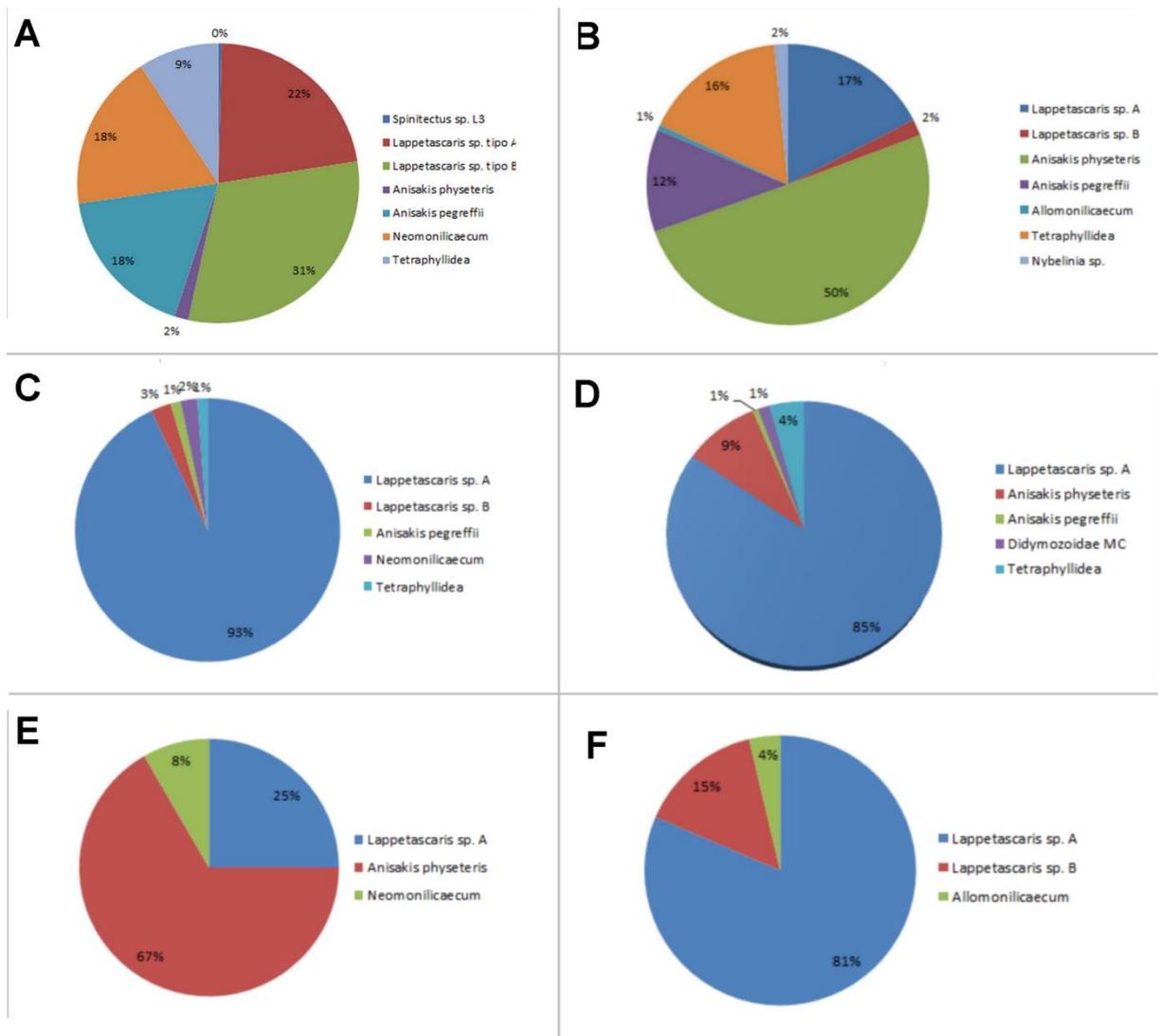


Figura 6.1 – Composizione della parassitofauna elmintica in cefalopodi Oegopsida, nella quale dominano i nematodi Anisakidae. **A** – *Illex coindetii*; **B** – *Todarodes sagittatus*; **C** – *Histioteuthis reversa*; **D** – *Histioteuthis bonnellii*; **E** – *Todaropsis eblanae*; **F** – *Ancistroteuthis lichtensteini*.

7. PROTOZOI DEL GENERE *AGGREGATA* (APICOMPLEXA: EUCCIDIORIDA) PARASSITI DI CEFALOPODI DELLE ACQUE CIRCOSTANTI LA SARDEGNA

7.1 Introduzione

I coccidi del genere *Aggregata* Frenzel, 1885 (Apicomplexa) sono protozoi parassiti intracellulari il cui ciclo biologico si svolge in modo indiretto, e che sono trasmessi attraverso la catena alimentare. Di norma, gli stadi asessuali merogonici infettano crostacei come ospiti intermedi, mentre quelli sessuali che compiono gametogonia e sporogonia hanno luogo in diverse specie di cefalopodi (Hochberg, 1990; Arias, 1998). L'unione di un microgamete e un macrogamete nel tratto digerente dell'ospite definitivo produce uno zigote, che diventa sporonte con numerosi nuclei. In seguito i nuclei individuali e i loro citoplasmi gemmano esternamente e si formano sporoblasti uninucleati. Lo sviluppo degli sporoblasti in sporocisti è caratterizzato da un aumento del numero di nuclei e ulteriore ripartizione di nuclei e citoplasma a formare sporozoiti, e dalla formazione di una parete cistica. Dopo la loro formazione e la maturazione, le sporocisti contenenti sporozoiti infettivi lasciano l'ospite definitivo con le feci. Nell'acqua, esse devono essere ingerite dal crostaceo della specie adatta per proseguire il loro ciclo biologico. Nel tratto digerente di questo, a seguito dell'azione degli acidi gastrici, le sporocisti schiudono e rilasciano gli sporozoiti. Questi migrano attraverso l'epitelio dell'intestino medio fino al connettivo della submucosa, dove si accrescono e diventano meronti, i quali per schizogonia generano merozoiti (Hochberg, 1990; Gestal et al., 2002a).

Infezioni sperimentali come quelle condotte su *Octopus vulgaris* e *Sepia officinalis* da Gestal et al (2002a) sostengono l'ipotesi secondo cui solitamente diverse specie di *Aggregata* mostrano elevata specificità di ospite definitivo e minor specificità per quanto riguarda gli ospiti crostacei. Nei tessuti degli ospiti definitivi si sono spesso osservati effetti patologici: le

oocisti delle specie più note di questo genere di coccidi provocano alterazioni, soprattutto nel tratto digerente ma anche nelle branchie e negli epitelii esterni, che sono state studiate in dettaglio da diversi autori in particolar modo in *Octopus vulgaris* sottoposti a stress da condizioni di allevamento o cattività in genere (Gestal et al., 2002a, 2002b, 2002c, 2007a; Ibanez et al., 2005; Pascual et al., 2006; Mladineo & Jozic, 2005; Mladineo & Bočina, 2007). Complessivamente le specie ad oggi descritte sono 10, come riassunto da Gestal et al. (2010): la prima è *A. octopiana* Schneider, 1875 in *O. vulgaris* seguita da *Aggregata eberthi* Labbè, 1895 in *S. officinalis*, entrambe descritte in Mediterraneo. Dopo quasi un secolo venne descritta la terza specie, *A. kudo* Narasimhamurti, 1979 in *Sepia elliptica* dell'Oceano Indiano. Poynton et al. (1992) nel nord Pacifico e Sardella et al. (2000) in Atlantico meridionale descrissero ciascuno 2 specie: *A. dobelli*, *A. millerorum*, *A. patagonica* e *A. valdesensis*, tutte in specie di Octopoda, così come *A. bathytherma*, l'ultima specie descritta da Gestal et al. (2010) nel polpo abissale *Vulcanoctopus hydrothermalis* (Gonzalez et al., 1998), specie molto interessante dal punto di vista della ricerca biologica (Rocha et al., 2002; Gonzalez et al., 2008). Le uniche specie finora descritte in Cefalopodi pelagici come i totani *Todarodes sagittatus* e *Martialia hyadesi* sono rispettivamente *A. sagittata* (Gestal et al., 2000) e *A. andresi* (Gestal et al., 2005). Tuttavia in molti casi le segnalazioni di questo parassita sono osservazioni sporadiche e prive di descrizioni adeguate (Hochberg, 1990). Seppur raramente, in passato sono state individuate anche infezioni da *Aggregata* a danno di cefalopodi o crostacei anche pelagici, (Sardella & Martorelli, 1997; Sprague & Couch, 1971; Theodorides & Desportes, 1975;). In particolare riguardo a queste ultime, come ad esempio *A. maxima*, *A. leandri*, non si è ancora potuto verificare sperimentalmente se ci sia corrispondenza con specie descritte sulla base degli stadi sporogonici.

Fino ad oggi, le due specie *A. eberthi* e *A. octopiana* sono le uniche descritte in Mediterraneo sulla base dell'osservazione degli stadi sporogonici. Nel presente lavoro sono riportate le

osservazioni effettuate sull'epidemiologia, la morfologia ed alcuni aspetti istopatologici di diverse infezioni da parte di coccidi del genere *Aggregata* in cefalopodi degli ordini Octopoda ed Oegopsida delle acque circostanti la Sardegna.

7.2 Materiali e metodi

La ricerca delle oocisti del genere *Aggregata* è stata effettuata su tutti i 308 campioni di cefalopodi raccolti, elencati nella tabella 2.1.

Gli organi sui quali si è concentrata la ricerca sono stati in particolare quelli viscerali, principalmente il tratto digerente dall'esofago all'intestino, e le branchie.

L'identificazione delle diverse specie di *Aggregata* osservate è stata raggiunta in base alla struttura e alle forme delle fasi sporogoniche: più esattamente, secondo le caratteristiche morfologiche e morfometriche delle oocisti mature e delle sporocisti, e secondo il numero e le dimensioni degli sporozoitii contenuti in ciascuna sporocisti. A tal fine sono stati applicati i medesimi criteri di riferimento usati nei lavori descrittivi più recenti (Gestal et al., 2000, 2005, 2010). I preparati a fresco sono stati esaminati dopo leggera pressione sul vetrino coprioggetto in modo da determinare la rottura delle oocisti e la fuoriuscita delle sporocisti. Gli stadi sporogonici sono stati misurati a fresco, con l'ausilio di un micrometro oculare calibrato, ad ingrandimenti variabili fino all'obiettivo 100x ad immersione. Tutte le misure sono state riportate in micrometri (μm).

Sono state registrate la prevalenza (P%) e l'intensità (I) di ciascuna infezione nei rispettivi ospiti. Per esprimere quest'ultimo parametro di stima è stata messa a punto una scala di tipo semi-quantitativo a 4 gradi, con il grado 0 corrispondente all'assenza di infezione e il grado 3 alle infezioni più intense ed estese. Approcci di questo genere (Mayo-Hernandez et al., 2013) vengono utilizzati in conseguenza del numero spesso elevatissimo delle forme infettive che si

possono presentare distribuite in modo irregolare e diversificato in estese porzioni di tessuto rendendo impossibile l'enumerazione delle stesse.

Pertanto, i livelli di intensità delle infezioni di *Aggregata* spp. espressi in tutto il lavoro sono definiti in base all'estensione dell'infezione a diversi organi o tratti di organo, ed alla prevalente densità osservabile:

- Livello 1: oocisti per lo più isolate e distanti tra loro, presenti in ristrette porzioni del tratto digerente, in particolare dello stomaco e del cieco spirale.
- Livello 2: oocisti per lo più in gruppi isolati, più o meno estesi, che possono interessare anche vaste porzioni del tratto digerente.
- Livello 3: oocisti per lo più costituenti un'unica massa stratiforme, che interessano tutto il tratto digerente fino a ritrovarsi all'esterno di esso e/o in organi diversi come le membrane viscerali e le branchie.

Per l'analisi dei preparati istologici, i campioni di tessuto sono stati selezionati tra quelli che mostravano il più alto grado di intensità di infezione. Da *Octopus vulgaris* sono state esaminate sezioni di stomaco, cieco e branchie; da *Todarodes sagittatus* porzioni di stomaco; da *Histioteuthis reversa* e *H. bonnellii* stomaco e cieco.

Le sezioni istologiche di tratto digerente delle specie ospite contenenti sporocisti mature sono depositate presso il Dipartimento di Scienze della Vita e dell'Ambiente, Università di Cagliari.

7.3 Risultati

7.3.1 *Aggregata octopiana* in *O. vulgaris*

Su un totale di 45 esemplari di polpo comune esaminati, 39 (P = 86,7%) sono risultati positivi all'infezione da parte del protozoo *Aggregata octopiana*.

In questi soggetti, già all'esame macroscopico si notava la presenza di focolai miliari biancastri nei tessuti dell'apparato digerente come esofago, intestino, stomaco e cieco spirale e (Fig. 7.1). Questi ultimi due organi erano colpiti in tutti i casi (occurrence 100%) mentre le branchie erano coinvolte nel 17,9% dei casi (Fig. 7.10).

La quantità delle lesioni distribuite nei diversi organi variava in relazione alla gravità dell'infezione: in 2 soli casi su 39 le lesioni erano distribuite sporadicamente (livello 1)(Fig. 7.1); nella maggior parte dei casi (64,1%) questa era di media intensità (livello 2) e coinvolgeva il solo tratto digerente (Fig. 7.1); infine nel 30,8% di intensità elevata (livello 3) con interessamento massiccio del tratto digerente e degli organi non digerenti (Fig. 7.1).

All'esame microscopico dei preparati a fresco, è stato possibile constatare che ai noduli biancastri corrispondevano diverse fasi sia del ciclo gamogonico, come macro e microgamonti, sia di quello sporogonico di *A. octopiana*, come zigoti, sporonti ed oocisti contenenti sporocisti in vari stadi di sviluppo (Fig. 7.2). Le stesse forme sono state più dettagliatamente osservate nelle sezioni istologiche (Fig. 7.3). Le diverse forme coesistevano nel tratto digerente e anche nelle branchie, mentre nella superficie interna del mantello si sono osservate soltanto oocisti di dimensioni superiori al millimetro (Fig. 7.1D). Segue la descrizione dei diversi stadi di *A. octopiana*:

Fasi gamogoniche: I microgamonti apparivano come cellule con la membrana fortemente ripiegata e nelle quali avvenivano ripartizioni citoplasmatiche, come indicato dalla presenza di diversi nuclei periferici (Fig.7.3), cui seguiva la formazione di microgameti.

I macrogamonti erano riconoscibili per il fatto di avere un grande nucleo e un nucleolo compatto o a forma di anello (Fig. 7.3). Si poteva notare il vacuolo parassitoforo della cellula ospite intorno ad entrambe queste forme.

Fasi sporogoniche: Gli zigoti in fase di sporonti si presentavano con membrana ripiegata e formazione di sporoblasti uninucleati (Fig. 7.2, 7.3), i quali si sviluppano in sporocisti prima immature poi mature (Fig. 7.2) aumentando il numero dei propri nuclei e dividendo il citoplasma, a formare gli sporozoiti (Fig. 7.2).

Le sporocisti, di forma sferica e con superficie liscia o tubercolata (Fig. 7.2) misuravano 11-15 μm e contenevano 8 sporozoiti e un corpo residuo, ma alcune raggiungevano dimensioni maggiori e un numero almeno doppio di sporozoiti all'interno (Fig. 7.2). Alla rottura, le sporocisti rivelavano la propria struttura composta da 2 valve e liberavano gli sporozoiti, misuranti circa 20 μm (Fig. 7.2).

Le oocisti (derivate da zigote e sporonte) contenenti numerose sporocisti avevano forma sferica-ovale e diametro variabile da 300 μm fino ad oltre un mm nel caso di quelle presenti nella mucosa interna al mantello.

Osservazioni istopatologiche

Istologicamente, negli organi bersaglio (spirale del cieco e intestino), le oocisti contenenti i parassiti si presentavano nello spessore della sottomucosa e dello strato muscolare (Figura 7.3), intorno ad esse si osservavano reazioni di isolamento del parassita con la formazione di strati pericistici di origine fibro-connettivale (Fig.7.3). La presenza di oocisti determinava un'alterazione blanda delle strutture interessate dove non si notavano lesioni di tipo erosivo a carico della mucosa, o infiltrati di emociti. Anche nelle branchie i preparati non hanno messo in evidenza gravi fenomeni patologici, eccetto ipertrofia delle cellule parassitate il cui nucleo appariva schiacciato tra il vacuolo parassitoforo e la membrana cellulare (Fig. 7.3).

Commenti

L'elevata prevalenza di *A. octopiana* (86,7%) riscontrata nei polpi esaminati nel presente lavoro è in accordo con quanto osservato da altri autori in Mediterraneo (Mayo-Hernandez et al., 2013) e in Atlantico (Estevez et al., 1996; Gestal et al., 2002a,b; Pascual et al., 1996a; 2006) sebbene leggermente inferiore (96%, 100%, 98% e 100% rispettivamente).

Le forme sporogoniche di *A. octopiana* sono state trovate soprattutto nel tratto digestivo come osservato anche da altri autori sia in infezioni in polpi selvatici che in condizioni di allevamento (Estevez et al., 1996; Licciardo et al., 2005; Mladineo & Jožič, 2005, Mayo-Hernandez et al., 2013), ma spesso anche in “siti inusuali” come le branchie, i connettivi viscerali e la superficie interna del mantello (Gestal et al, 2002b; Pascual et al, 2006). Inoltre è stata fatta un'importante osservazione che finora era stata riportata solamente da Mladineo & Bočina (2007): gli stadi gamogonici del parassita sono stati trovati non soltanto nel tratto digerente ma anche nelle branchie. Da ciò si ha ulteriore conferma di quanto sostenuto da questi autori in merito alla capacità di migrazione extraintestinale che avrebbero i merozoiti di *A. octopiana*.

Confrontando i livelli di intensità con parametri come la lunghezza del mantello, il peso e lo sviluppo delle gonadi, si nota che il grado di infezione 3 è più frequentemente associato alla maturità sessuale (Fig. 7.11)

Tuttavia, le lesioni osservate nei preparati istologici sono meno gravi rispetto a quelle documentate in letteratura (Estevez et al., 1996; Gestal et al., 2002b; Licciardo et al., 2005; Mayo-Hernandez et al., 2013; Mladineo & Bočina, 2007). Generalmente il tipo di lesioni non è grave (Pascual et al., 2006) ma in alcuni casi l'infezione è stata associata a mortalità di *O. vulgaris* allevati sperimentalmente (Mladineo & Jožič, 2005). In ogni caso sembrerebbe che *A. octopiana* abbia un effetto negativo sulla funzione gastrointestinale del polpo, descritto come sindrome di malassorbimento a causa della carenza di enzimi di assorbimento, più che

dell'entità dei danni tissutali verificata in polpi infetti da Gestal et al. (2002c). Dal momento che le manifestazioni dell'infezione più accentuate si verificano di solito in vasche o in gabbie galleggianti, ciò rappresenterebbe un fattore limitante per l'allevamento a scopo commerciale del polpo in sistemi artificiali (Gestal et al., 2007a).

Riguardo alla struttura della superficie delle sporocisti di *A. octopiana*, che si presentava liscia o tubercolata all'esame al microscopio ottico (Fig. 7.2), è stato chiarito da Gestal et al. (2002d,e), mediante osservazioni ultrastrutturali (SEM, TEM, AFT) che sono sempre presenti delle spine, ma esse sono spesso ricoperte da una membrana che ne rende impossibile la visualizzazione, o al massimo le fa apparire come tubercoli. Queste osservazioni hanno determinato la sinonimizzazione della specie fino ad allora valida *Aggregata spinosa* Moroff, 1908 con *A. octopiana*, e suggeriscono l'importanza, negli studi sistematici, di tecniche di supporto alla morfologia tradizionale.

7.3.2 *Aggregata sagittata* in *Todarodes sagittatus*

Otto esemplari di totano viola, su 44 esemplari esaminati, ospitavano la specie *A. sagittata*, con una prevalenza del 18,2%. La presenza delle piccole oocisti delle dimensioni inferiori ai 300µm è stata confermata allo stereomicroscopio, per lo più in distretti dell'apparato digerente (Fig. 7.4). In quasi tutti i casi (Fig.7.12) l'infezione interessava il cieco spirale, nella metà interessava l'intestino, in un caso si estendeva all'intestino e in un altro alle branchie.

L'intensità dell'infezione era minima in un solo caso che interessava il solo cieco spirale, nei restanti casi la quantità di oocisti nei tessuti era elevata o media.

Oltre alle fasi sporogoniche, negli organi del tratto digerente sono stati osservati anche elementi della gamogonia (Fig. 7.4B) mentre nell'unico caso di infezione delle branchie erano presenti soltanto oocisti. Segue la descrizione dei diversi stadi di *A. sagittata*, le cui misure (in µm) sono riassunte nella Tabella 7.1.

Fasi gamogoniche: I microgamonti apparivano come cellule con la membrana fortemente ripiegata e nuclei periferici (Fig. 7.4B).

I macrogamonti, di diametro medio 165 (80-205) erano riconoscibili per il fatto di avere un grande nucleo e un nucleolo compatto o a forma di anello (Fig. 7.4B).

Fasi sporogoniche: Gli zigoti in fase di sporonti, di diametro 194 (130-300) si presentavano con membrana ripiegata e formazione di sporoblasti uninucleati, i quali si sviluppano in sporocisti prima immature poi mature (Fig. 7.4B).

Le oocisti contenenti numerose sporocisti avevano forma sferica o subsferica e dimensioni medie di 170,8 (95-295). Nei preparati a fresco le sporocisti al loro interno assumevano una disposizione uniforme (Fig.7.4C)

Le sporocisti avevano forma sferica o subsferica e superficie liscia (Fig. 7.4D,7.5D) misuravano 16,9 x 15,4 (16,4-17,7 x 14,4-16,2) e contenevano un corpo residuo e 4-8 sporozoiti disposti a spirale, misuranti 14 μm . La rottura delle sporocisti in modo da non danneggiarne il contenuto è stata difficoltosa per via dello spessore della parete, di circa 1,1 μm (Fig.7.5D).

Osservazioni istopatologiche

Nelle sezioni istologiche dello stomaco è stato possibile osservare la formazione di membrane pericistiche di origine connettivale intorno alle oocisti; in alcuni casi le suddette membrane affioravano nel lume dell'organo in seguito alla perdita dell'epitelio (Fig. 7.5B). Ma soprattutto si è riscontrato che in alcuni punti avveniva distacco tra la sottomucosa e lo strato muscolare, con il successivo riempimento dei volumi da parte di parassiti (sostituzione tissutale, Fig. 7.5A).

Commenti

Le caratteristiche osservate e misurate per le sporocisti e le oocisti di questa specie sono compatibili con quelle riportate nella descrizione di *A. sagittata* (Gestal et al., 2000), che quindi in questo lavoro viene riportata per la prima volta in acque del Mar Mediterraneo, dato che la sua presenza era finora conosciuta in totani dell'Atlantico orientale (Gestal et al., 2010). In particolare le dimensioni delle sporocisti, lo spessore della parete e il numero e la disposizione degli sporozoitii sono molto simili (Tab. 7.1). Per quanto riguarda invece le dimensioni inferiori delle oocisti e la loro maggiore variabilità riscontrate nelle presenti osservazioni, potrebbe dipendere da variabilità intrinseche della specie o da un diverso trattamento dei campioni, dato che una maggiore pressione sui vetrini determina un'espansione dell'oocisti.

Inoltre si sono osservati alcuni elementi in più rispetto a quanto riportato da Gestal et al. (2000): in primo luogo, le oocisti mature di *A. sagittata* non sono state osservate nel solo tratto digerente ma in un caso anche nelle branchie, similmente a quanto già osservato in *A. octopiana*. Secondariamente, nei campioni provenienti dai mari sardi sono state individuate per la prima volta le fasi gamogoniche di *A. sagittata*.

Il confronto delle prevalenze (18,2% nel presente lavoro a fronte di 3,3% nell'Atlantico nord-orientale) mostra che la presenza di *A. sagittata* in Mediterraneo non è da considerarsi occasionale. I dati, anzi, suggerirebbero che il ciclo del parassita si svolga più efficacemente nel Mediterraneo. I dati ottenuti consentono per la prima volta di osservare una correlazione positiva tra la prevalenza di *A. sagittata* e la taglia dell'ospite (Fig. 7.12), che potrebbe essere legata anche ad una preferenza di tipo sessuale, dal momento che a) nessun totano di sesso maschile è risultato infetto, mentre lo era il 23,5% delle femmine; b) i totani di taglia maggiore, ovvero delle classi di taglia nelle quali era presente l'infezione, erano tutti femmine. Non essendo specificato il sesso dell'individuo infetto descritto da Gestal et al.

(2000), non c'è un elemento di confronto per eventualmente smentire ciò che sembra emergere da questi dati.

Con questa segnalazione si estende al Mar Mediterraneo occidentale la presenza della terza specie di *Aggregata* descritta finora in acque europee dopo *A. octopiana* e *A. eberthi*. Per la prima volta si sono riportate osservazioni in merito agli effetti istopatologici dell'infezione, che seppure non sono apparsi massivi e diffusi sembrano poter determinare una riduzione della superficie di assorbimento nel tratto digerente. Rimane da chiarire la distribuzione del parassita rispetto all'areale di *T. sagittatus* in Atlantico e Mediterraneo, e soprattutto l'individuazione della/e specie di crostacei decapodi che svolge/svolgono il ruolo di ospite intermedio.

7.3.3 *Aggregata* sp. inq. in *Histioteuthis reversa* e *H. bonnellii*

Nel 67,5% di 40 esemplari di *Histioteuthis reversa* e nel 49,2% di 63 *H. bonnellii*, provenienti da tutte le località di campionamento, sono state osservate sia forme sporogoniche che gamogoniche riconducibili al genere *Aggregata*.

Gli stadi sporogonici (zigoti, sporonti, oocisti immature e mature) e gamogonici (microgamonti e macrogamonti) erano presenti contemporaneamente in stomaco, cieco spirale, intestino, branchie, con una preferenza per i primi due (Fig. 7.12, 7.13)

In entrambe le specie ospiti il parassita presentava le medesime caratteristiche morfologiche che sono di seguito riportate in dettaglio (misure in μm):

Forme sporogoniche

Oocisti (n° elementi misurati = 10): sferiche o subsferiche, dimensioni 193 (90-290) x 183 (90-260), superficie tuberculata (Fig. 7.6).

Sporocisti mature (n° = 11): forma ovoidale, dimensioni 9,3 (9-10,2) x 7,6 (7-9,2); composte da 2 valve aventi superficie liscia e parete di spessore 0,6 (Fig. 7.6, 7.7)

Sporozoit (n° = 5): in numero di 3, con disposizione arricciata intorno all'asse longitudinale della sporocisti, misuranti 21,8 (20-24) (Fig. 7.6, 7.7)

Forme gamogoniche

Microgamonte (n° = 1): in fase iniziale, con nuclei periferici (Fig. 7.7)

Macrogamonte (n° = 10): forma pressochè sferica ma facilmente deformabile dalla compressione dei tessuti, dimensioni 99 (80-150) x 89 (70-100); citoplasma poco denso, nucleo ben visibile con nucleolo nettamente distinto (Fig. 7.7).

Osservazioni istopatologiche

Come visibile nella Fig. 7.8A, l'istologia mette in evidenza come i tessuti dove sono presenti le oocisti ma anche le forme gamogoniche subiscono processi degenerativi, non solo a carico della sottomucosa che appare destrutturata, ma anche a danno dell'epitelio assorbente che viene a mancare. Le reazioni osservate comprendono la formazione di strati pericistici di isolamento del parassita, come osservato più frequentemente intorno alle oocisti (Fig. 7.8.B) e l'attivazione di processi infiammatori con infiltrazione ematocitaria e fagocitosi del parassita. Questa condizione è stata osservata più spesso nei confronti dei gamonti.

Commenti

La classificazione dei coccidi si basa su osservazioni e misurazioni mediante microscopia ottica di caratteri morfologici come oocisti e sporocisti (Dykova & Lom, 1981), e secondo questi criteri sono state descritte le 10 specie fino ad oggi conosciute in cefalopodi di tutti i mari, come riassunto da Gestal et al. (2010) nella tabella che qui è presentata aggiornata.

Pertanto gli aspetti discriminanti considerati nella presente descrizione sono stati: l'aspetto della sporocisti, ovvero la forma, la taglia, il tipo di superficie e lo spessore della parete

esterna; il numero e la taglia degli sporozoiti contenuti nelle sporocisti; la taglia e la forma dell'oocisti.

La specie qui descritta è caratterizzata da dimensioni relativamente ridotte della sporocisti, parete cistica sottile, numero di sporozoiti minimo (3), dimensioni ridotte delle oocisti.

Per forma e dimensioni delle sporocisti, e numero di sporozoiti, questa specie risulta simile ad *Aggregata andresi* (Gestal et al., 2005) parassita dell'Ommastrephidae *Martialia hyadesi* nell'Atlantico sudoccidentale, nei pressi delle isole Falkland. Tuttavia si distingue da essa sia per la taglia degli sporozoiti, che possono raggiungere i 24 micron anziché 20, sia per lo spessore della parete cistica, che è senza dubbio più sottile nella specie qui osservata, in quanto mediamente supera di pochissimo 0,5 micron. Questo dato è molto interessante perché si pone in contrasto con quanto sostenuto da Gestal et al. (2000, 2005), secondo il quale una parete spessa potrebbe essere un adattamento all'elevata pressione idrostatica presente alle elevate profondità abitate da entrambi gli ospiti *Martialia hyadesi* e *Todarodes sagittatus*. Ma poiché anche gli Histioteuthidae hanno un range batimetrico analogo che può superare i 2000 metri (Jereb & Roper, 2005), è probabile che siano altri i sistemi di contrasto di questi parassiti nei confronti dell'elevata pressione idrostatica. D'altronde, anche le sporocisti di *A. octopiana* hanno una parete spessa circa un micron che non può essere messa in relazione con un adattamento alle elevate profondità. Una spiegazione alternativa può essere suggerita dal lavoro di Gestal et al. (2002e) che hanno confrontato mediante analisi a raggi X la composizione delle pareti delle oocisti di *A. octopiana*, più spesse, e di *A. eberthi*, più sottili ma più resistenti alla compressione. Secondo gli autori, la maggiore composizione in Silicio conferisce forza alla struttura della parete. Una conferma potrebbe essere data da un analogo confronto tra le sporocisti di *A. sagittata* e la specie di *Aggregata* indagata.

Anche l'epidemiologia di questo parassita nelle due specie ospiti presentava analogie, ma anche alcune differenze. Gli organi bersaglio erano essenzialmente gli stessi, nello stesso

ordine di percentuale (cieco, intestino, stomaco) ad eccezione dei singoli casi di infezione in branchie in *H. reversa* ed esofago in *H. bonnellii* (Fig. 7.12, 7.13).

La principale differenza registrata riguarda la prevalenza totale, che era sensibilmente maggiore in *H. reversa* rispetto a *H. bonnellii*, per cui la prima specie si può definire ospite elettivo, anche in virtù della presenza più uniforme del parassita in tutte le taglie.

La seconda differenza, meno marcata è nei livelli di intensità, che indicano correlazione tra questa e taglia-maturità in *H. reversa*, e soltanto tra intensità e taglia in *H. bonnellii* (Figg. 7.12, 7.13)

In entrambi gli ospiti le prevalenze dell'infezione non mostrano particolari differenze rispetto a classi di taglia e maturità tali da evidenziare specifici trend, anche se è abbastanza sorprendente riscontrare che la classe degli individui il cui sesso non è ancora visibilmente differenziato (e quindi tendenzialmente i più piccoli) mostra i maggiori livelli di prevalenza rispetto a maschi e femmine sia in *H. reversa* (Fig. 7.11) che in *H. bonnellii* (Fig. 7.12). Tra questi, i livelli maggiori si osservano rispettivamente negli individui maturi (Fig. 7.11) o in via di maturazione (Fig. 7.12).

È da notare come, in questo aspetto, la specie di *Aggregata* oggetto di questa indagine si differenzi da *A. sagittata*, presente soltanto in femmine e quasi sempre mature. Probabilmente l'ospite intermedio di *A. sagittata* è un crostaceo di dimensioni tali da potere essere predato soltanto dai totani che hanno raggiunto una certa taglia; mentre l'ospite intermedio della specie parassita degli Histioteuthidae potrebbe avere piccole dimensioni ed essere costantemente presente nella dieta di *H. reversa* e *H. bonnellii*.

7.3.4 *Aggregata* spp. in altre specie di cefalopodi

Oocisti di specie non identificate di *Aggregata* sono state osservate in due casi durante la ricerca di parassiti nei cefalopodi dei mari sardi. Nel primo, una oocisti immatura ed una

matura (diametro) si trovavano nel cieco spirale di un esemplare di *Ancistroteuthis lichtensteini* su 6 esaminati (P = 16,7%). Le sporocisti contenute in quest'ultima erano in gran parte aperte lungo la sutura tra le due valve. Le poche integre erano subsferiche-subvoidali, misuravano 12-13 x 10,5-12 e avevano parete spessa circa 0,8 micron con superficie liscia; in queste erano contenuti 3 sporozoiti lunghi 18 micron (Fig. 7.8)

Nel secondo caso, nel cieco dell'unico esemplare esaminato di *Rossia macrosoma* è stata riscontrata la presenza di una oocisti lesionata, di dimensioni inferiori ai 200 micron. Essa conteneva poche sporocisti sferiche-subsfere di diametro compreso tra 9,1 e 9,9 e con parete spessa circa 1 micron, nella quale erano alloggiati 3-4 sporozoiti (Fig. 3.8).

7.3.5 Discussione

Nel presente capitolo è stato dato un primo contributo alla conoscenza delle infezioni di coccidi del genere *Aggregata* nei cefalopodi della Sardegna, argomento che finora ha trovato poco spazio nella parassitologia ittica del Mediterraneo occidentale (Pascual et al, 1996a). Oltre ad avere ottenuto conferme morfologiche ed istologiche sulle caratteristiche della specie parassita del polpo comune *A. octopiana*, che è la più studiata in assoluto data l'importanza commerciale dell'ospite elettivo, gli altri risultati ottenuti sono dati caratterizzati dalla maggiore originalità. Tra questi, la nuova segnalazione geografica per il Mediterraneo e l'osservazione di forme gamogoniche di *A. sagittata*: si tratta di informazioni importanti perché questa specie è stata descritta sulla base di un solo caso di infezione registrato in *T. sagittatus* del nord della Spagna (Gestal et al., 2000). Inoltre, si sono effettuate 4 nuove segnalazioni di associazioni ospite/parassita, tra forme sporogoniche di *Aggregata* spp. e *A. lichtensteini*, specie rara del quale nessun dato parassitologico è stato pubblicato in precedenza, *Rossia macrosoma* e le due specie di Histioteuthidae. Si ritiene che la parte più rilevante del presente studio sia stata proprio la descrizione sia morfologica che dell'aspetto

istopatologico di una probabile nuova specie del genere *Aggregata* nelle specie *H. reversa* e *H. bonnellii*. Se in futuro si dovesse confermare questa tesi, col presente contributo il numero di specie descritte salirebbe da 10 ad 11, come già esposto nella Tabella 7.1, e il numero di specie descritte presenti in Mediterraneo, già salito da 2 a 3 con *A. sagittata*, sarebbe di 4. Inoltre considerando le osservazioni singole di stadi sporogonici di *Aggregata* spp. in esemplari di *Ancistroteuthis lichtensteini* e *Rossia macrosoma*. il numero di specie di cefalopodi ospiti di coccidi del genere *Aggregata* in Mediterraneo verrebbe innalzato da due (polpo e seppia comuni) a sette.

Come accennato sopra, il ciclo di questi parassiti è dixeno e coinvolge come ospiti intermedi crostacei Decapodi, soprattutto Reptantia, e come ospiti definitivi cefalopodi predatori bentonici, quasi esclusivamente seppie e polpi. Un aspetto ecologicamente molto importante segnalato in questo lavoro è la presenza di *Aggregata* in famiglie di cefalopodi a vita prevalentemente pelagica come Ommastrephidae, Histioteuthidae e Onychoteuthidae, la quale certifica che questo genere di parassiti, almeno per quanto riguarda il Mediterraneo occidentale, non è esclusivo di cefalopodi bentonici e/o abitanti acque relativamente poco profonde, né quasi peculiare delle famiglie Octopoda e Sepiida. Infatti, seppure esistano diverse descrizioni di fasi merogoniche in crostacei pelagici del Mediterraneo (Théodorides & Desportes, 1975; Sprague & Couch, 1971), non esistevano ancora testimonianze in merito ai corrispondenti ospiti definitivi. In ogni caso ciò non chiarisce se cefalopodi come questi, che compiono migrazioni circadiane tra i fondali della scarpata e le profondità inferiori, contraggano l'infezione cibandosi di crostacei bentonici durante le ore diurne o di specie natanti durante la permanenza notturna lungo la colonna d'acqua. Ulteriori indagini in futuro potranno fare maggiore chiarezza sulla probabile quantità non nota e sottostimata di *Aggregata* spp. che coinvolgono numerose specie di cefalopodi sia demersali che neritico-oceanici in Mediterraneo come negli altri mari.

Tabella 7.1. Confronto tra i dati morfometrici degli stadi sporogonici per le specie di *Aggegata* descritte da ospiti cefalopodi (Gestal et al., 2005; 2010, integrata con dati del presente lavoro). Le specie osservate in *A. lichtensteini* e *R. macrosoma* non sono state inserite per mancanza di adeguata descrizione dovuta al poco materiale disponibile. Tutte le misure sono espresse in μm .

<i>Aggegata</i> sp.	Ospite	Località	Oocisti		taglia	Sporocisti		Sporozoit		Riferimento
			lunghezza	larghezza		n.	parete	n.	lunghezza	
Histioteuthidae										
<i>Aggegata</i> sp. inq.	<i>Histioteuthis reversa</i>, <i>H. bonnellii</i>	O Mediterraneo	193	183	9,3 x 7,6	-	liscia	3	20-24	presente lavoro
Sepiidae										
<i>A. eberthi</i>	<i>Sepia officinalis</i>	NE Atlantico; O Mediterraneo	469	433	8.5	70,000	liscia	3	16	Labbé (1895)
<i>A. kudo</i>	<i>S. elliptica</i>	N Oceano Indiano	260	180	12	-	liscia	6-12	17	Narasimhamurti (1979)
Ommastrephidae										
<i>A. andresi</i>	<i>Martialia hyadesi</i>	SW Atlantico	431	391	9,7 x 8,2	45000	liscia, spessa	3	16-20	Gestal et al., (2005)
<i>A. sagittata</i>	<i>Todarodes sagittatus</i>	NE Atlantico; O Mediterraneo	287	280	17 x 15	600-1000	liscia, spessa	4-8	12	Gestal et al. (2000); presente lavoro
Octopodidae										
<i>A. dobelli</i>	<i>Enteroctopus dofleini</i>	NE Pacifico	736	312	23 x 21	numerous	liscia	9-18	21	Poynton et al. (1992)
<i>A. patagonica</i>	<i>E. megalocyathus</i>	SO Atlantico	519	346	13 x 12	numerous	liscia	8	18	Sardella et al. (2000)
<i>A. octopiana</i>	<i>Octopus vulgaris</i>	NE Atlantico; O Mediterraneo	612	402	11-15	1000- 60000	spinosa	8	20	Schneider (1875); Gestal et al. (1999); presente lavoro
<i>A. millerorum</i>	<i>O. bimaculoides</i>	NE Pacifico	441	226	16 x 14	numerous	liscia	8-10	24	Poynton et al. (1992)
<i>A. valdessensis</i>	<i>O. tehuelchus</i>	SW Atlantico	250	169	10 x 10	numerous	liscia	4-8	17	Sardella et al. (2000)
<i>A. bathytherma</i>	<i>Vulcanoctopus hydrothermalis</i>	NE Pacifico	245	255	28,7x27,9	50-200	liscia, spessa	14-17	49	Gestal et al. (2010)

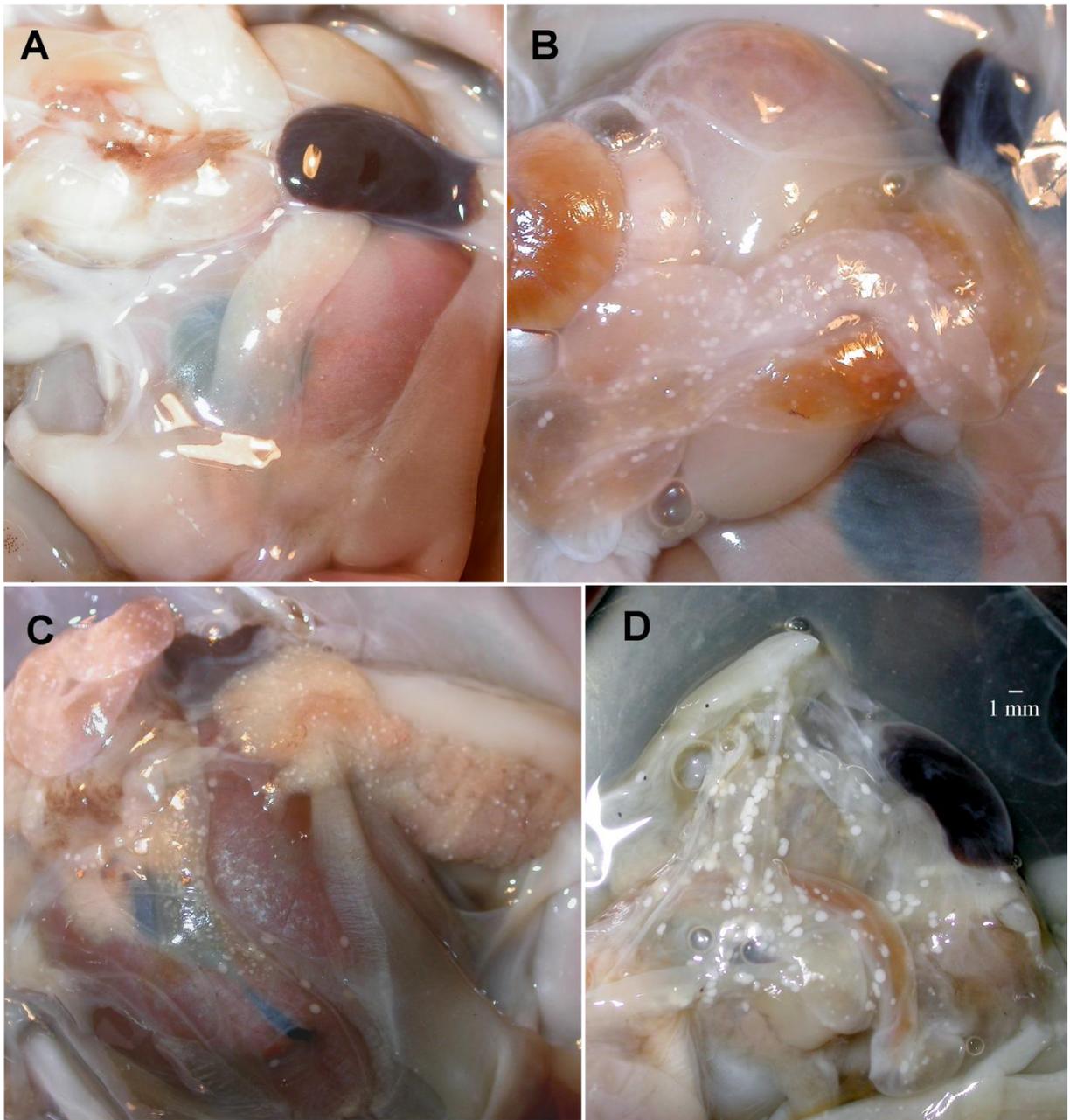


Figura 5.1 – *Aggregata octopiana*: evidenze macroscopiche dell'infezione, a diversi gradi di intensità, in *O. vulgaris*. **A** – infezione di intensità 1; **B** – infezione di intensità 2; **C** – infezione di intensità 3 con coinvolgimento delle branchie; **D** – intensità 3 con oocisti di grandi dimensioni nelle membrane del sacco viscerale.

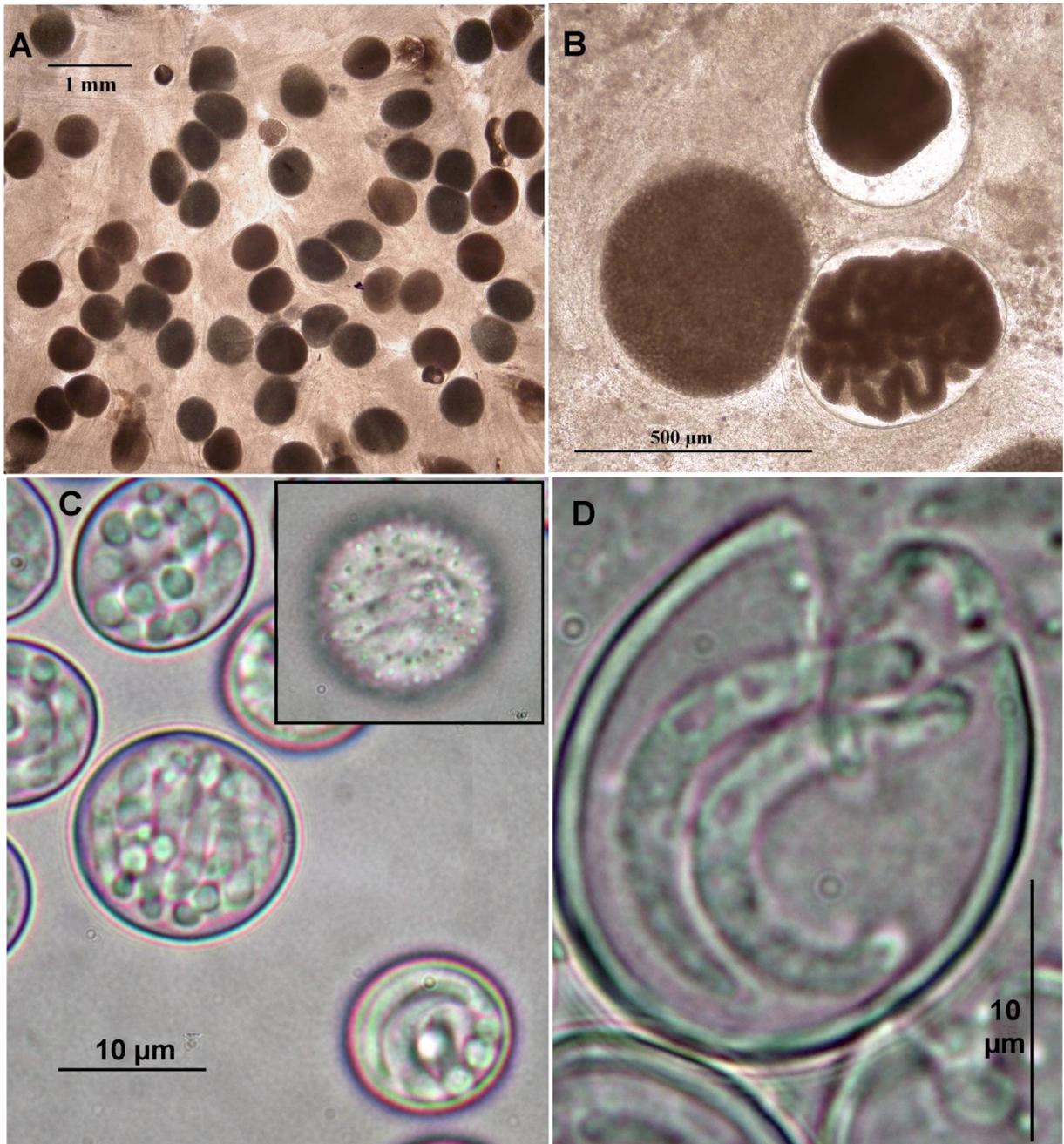


Figura 7.2 - *Aggregata octopiana*: stadi sporogonici al microscopio ottico (obiettivi 2x-100x). **A** – Oocisti nel cieco, in una infezione di livello 3; **B** – Oocisti (sinistra), zigote (in alto) e sporonte; **C** – sporocisti gigante (aal centro) con un numero elevato di sporozoiiti all’interno, e focus sulla superficie delle sporocisti (riquadro); **D** – sporozoiiti all’interno di una sporocisti aperta.

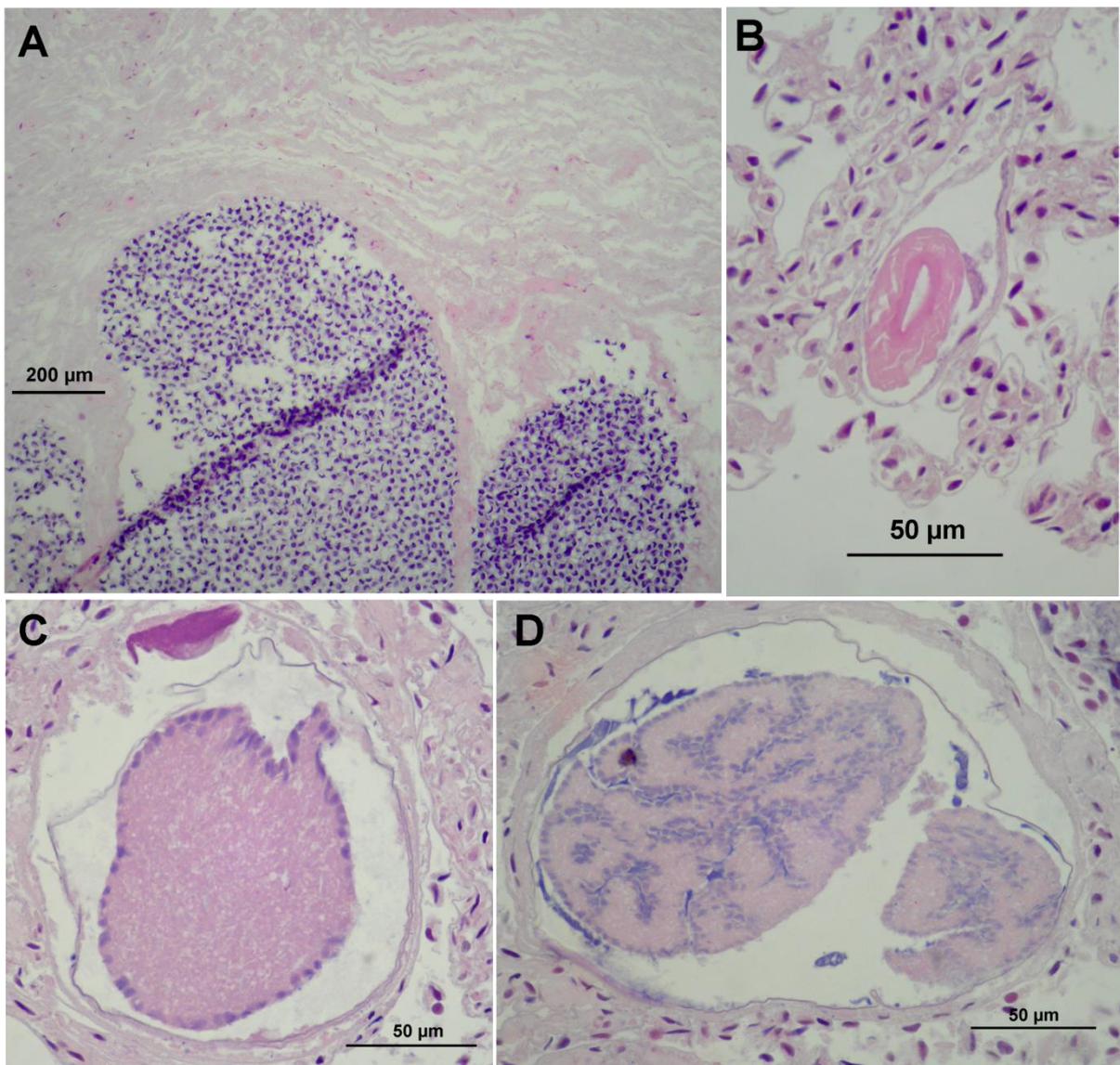


Figura 7.3 - *Aggregata octopiana*: sezioni istologiche di tessuti di *O. vulgaris* infetti. **A** – oocisti intorno alle quali si verificano compressione e distrazione della sottomucosa; **B** – macrogamonte; **C** – fase iniziale di partizione di un microgamonte; **D** – sporonte in fase iniziale, visibili i ripiegamenti della membrana, le partizioni citoplasmatiche e i numerosi nuclei dei futuri sporoblasti.

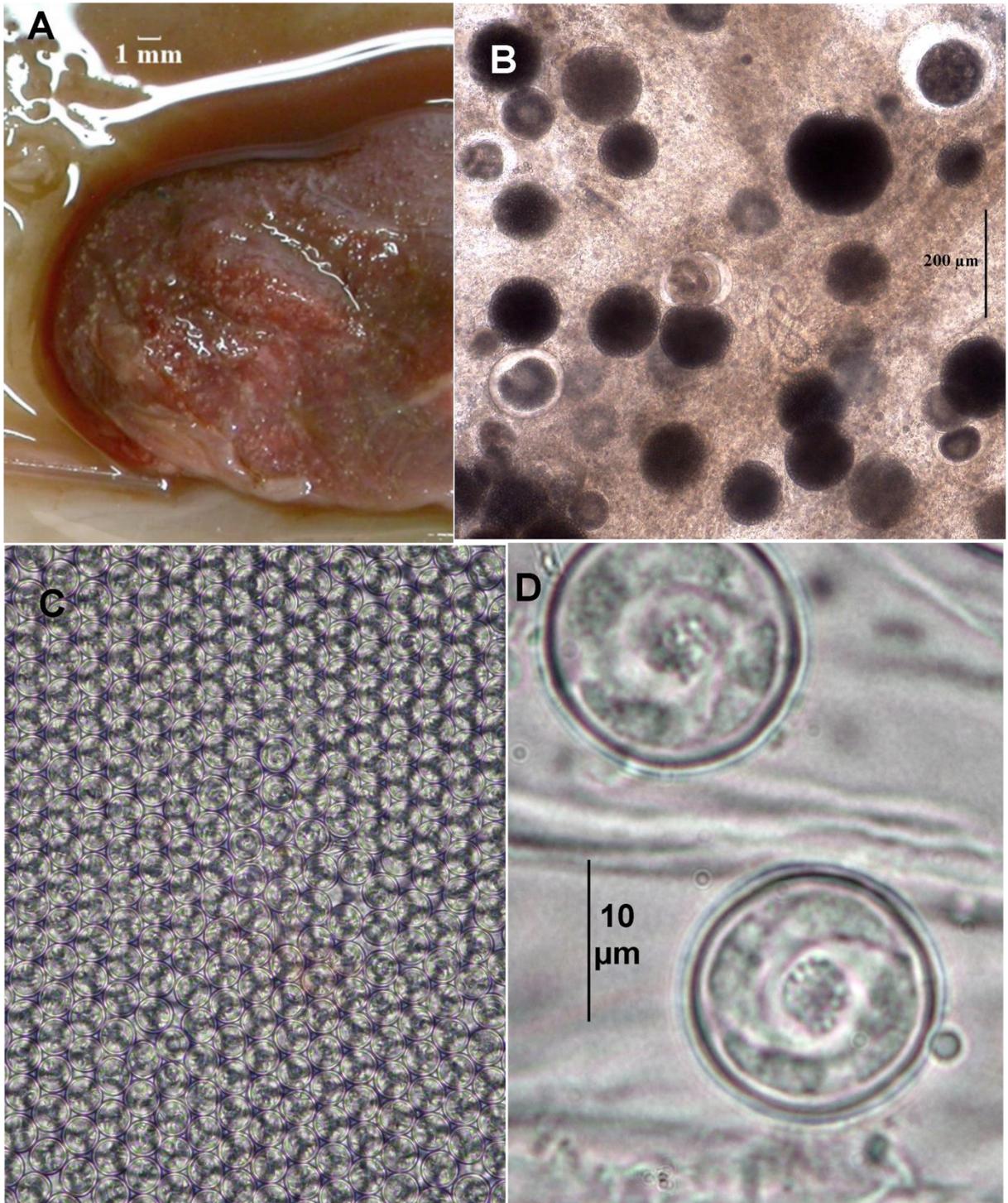


Figura 7.4 - *Aggregata sagittata*: osservazioni macro- e microscopiche in *T. sagittatus*. **A** – piccole oocisti visibili dall'esterno dello stomaco; **B** – oocisti, sporonti e macrogamonti; **C** – disposizione ordinata delle sporocisti in vari strati, in una oocisti sotto leggera pressione; **D** – sporocisti con visibile il corpo residuo e la disposizione degli sporozoi.

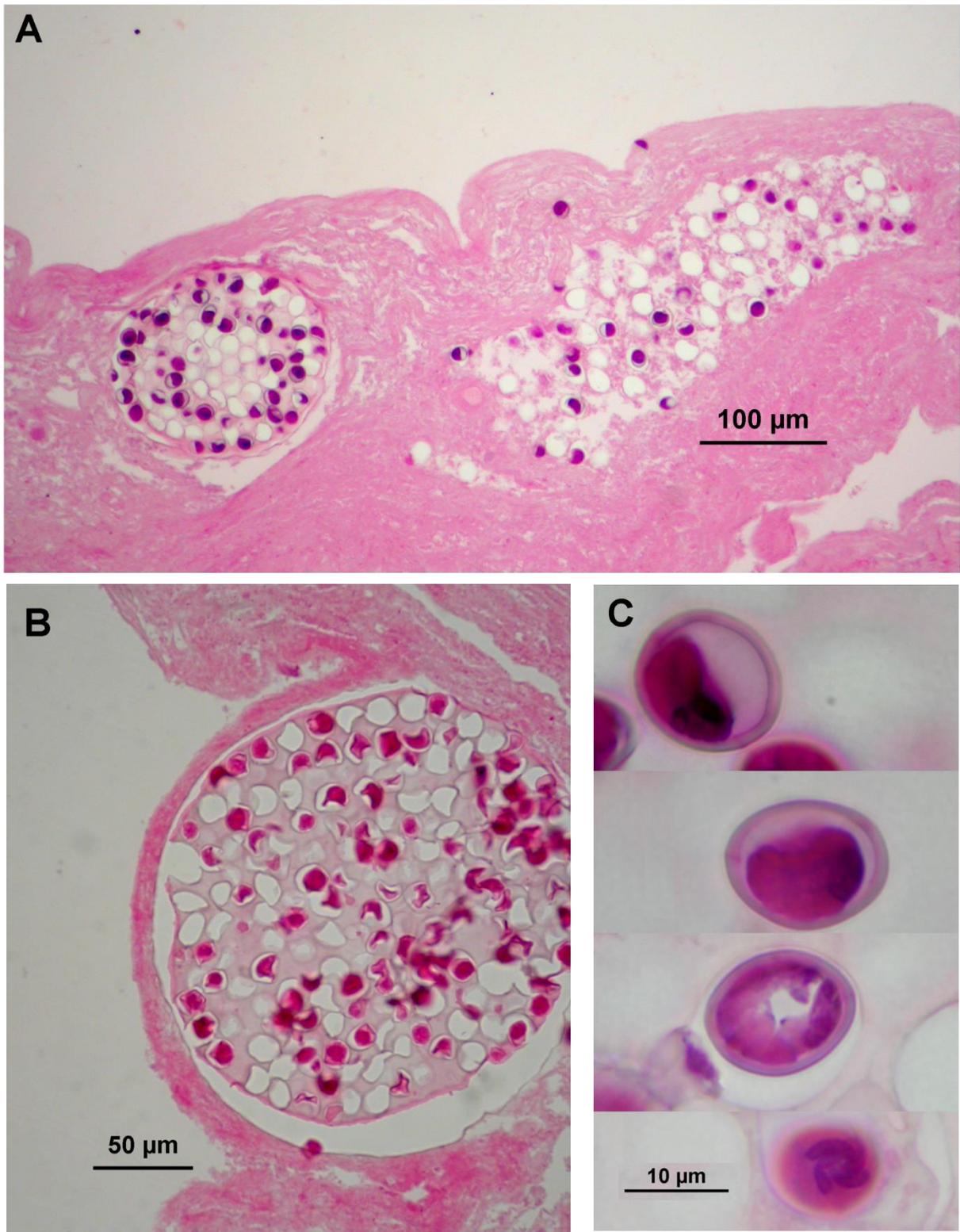


Figura 7.5 - *Aggregata sagittata*: osservazioni morfologiche e istopatologiche in stomaco di *T. sagittatus*. **A** – lesioni del tessuto subepiteliale con sostituzione tissutale da parte di parassiti; **B** – strato pericistico intorno ad una oocisti, che emerge nel lume dello stomaco in un punto di interruzione dell’epitelio; **C** – sporocisti nelle quali è ben visibile l’elevato spessore della parete, e la disposizione degli sporozoiiti rivelata dai 4 nuclei (in basso).

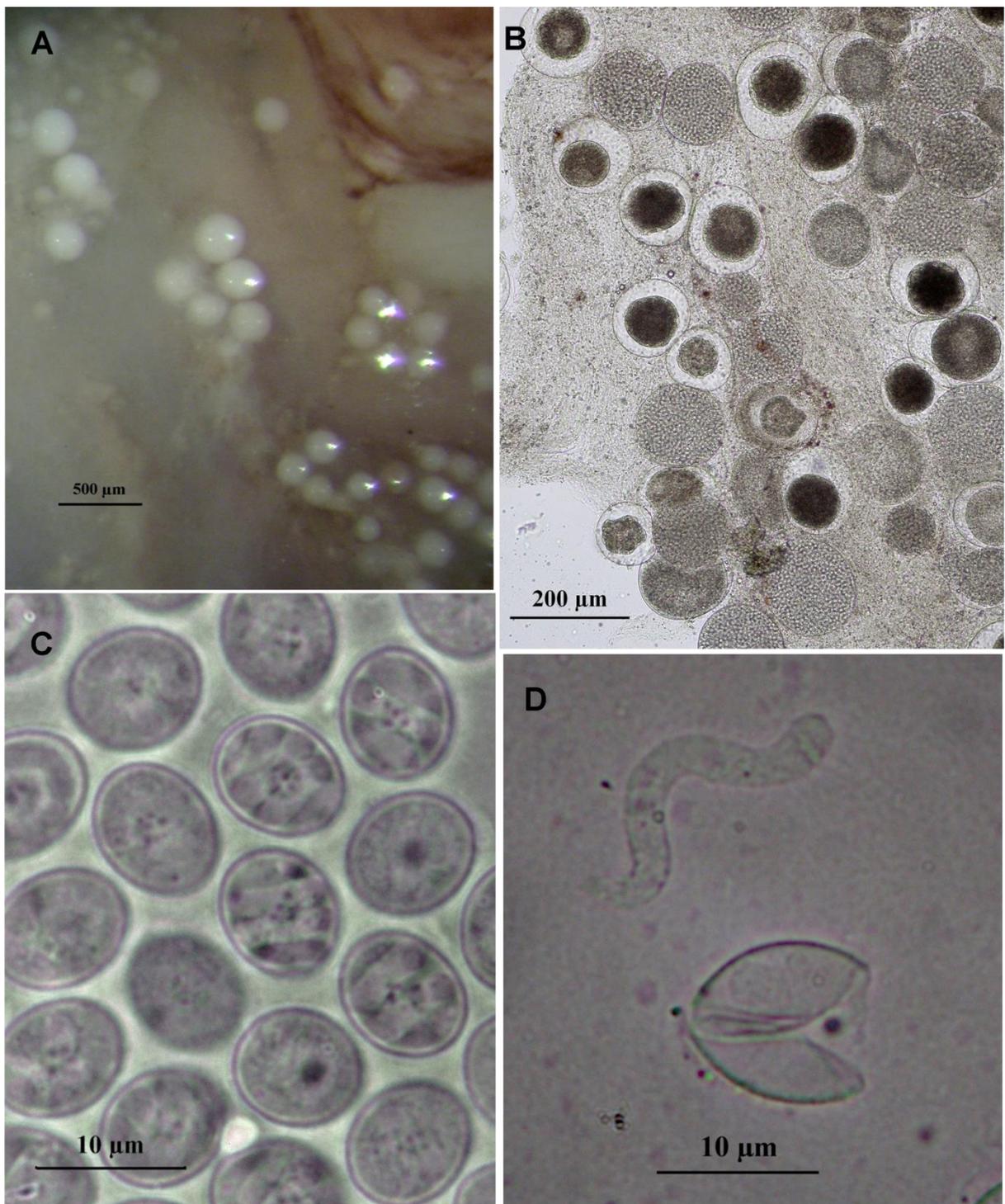


Figura 7.6 – *Aggregata* sp.: osservazioni macro- e microscopiche in *H. reversa*. **A** – basso ingrandimento di oocisti nel lume del cieco spirale; **B** – macrogamonti, oocisti e zigoti nello stesso organo (microscopio ottico); **C**, **D** – sporocisti e sporozoi. Notare le dimensioni ridotte delle prime e grandi di questi ultimi, correlate al loro numero ridotto all'interno di ciascuna.

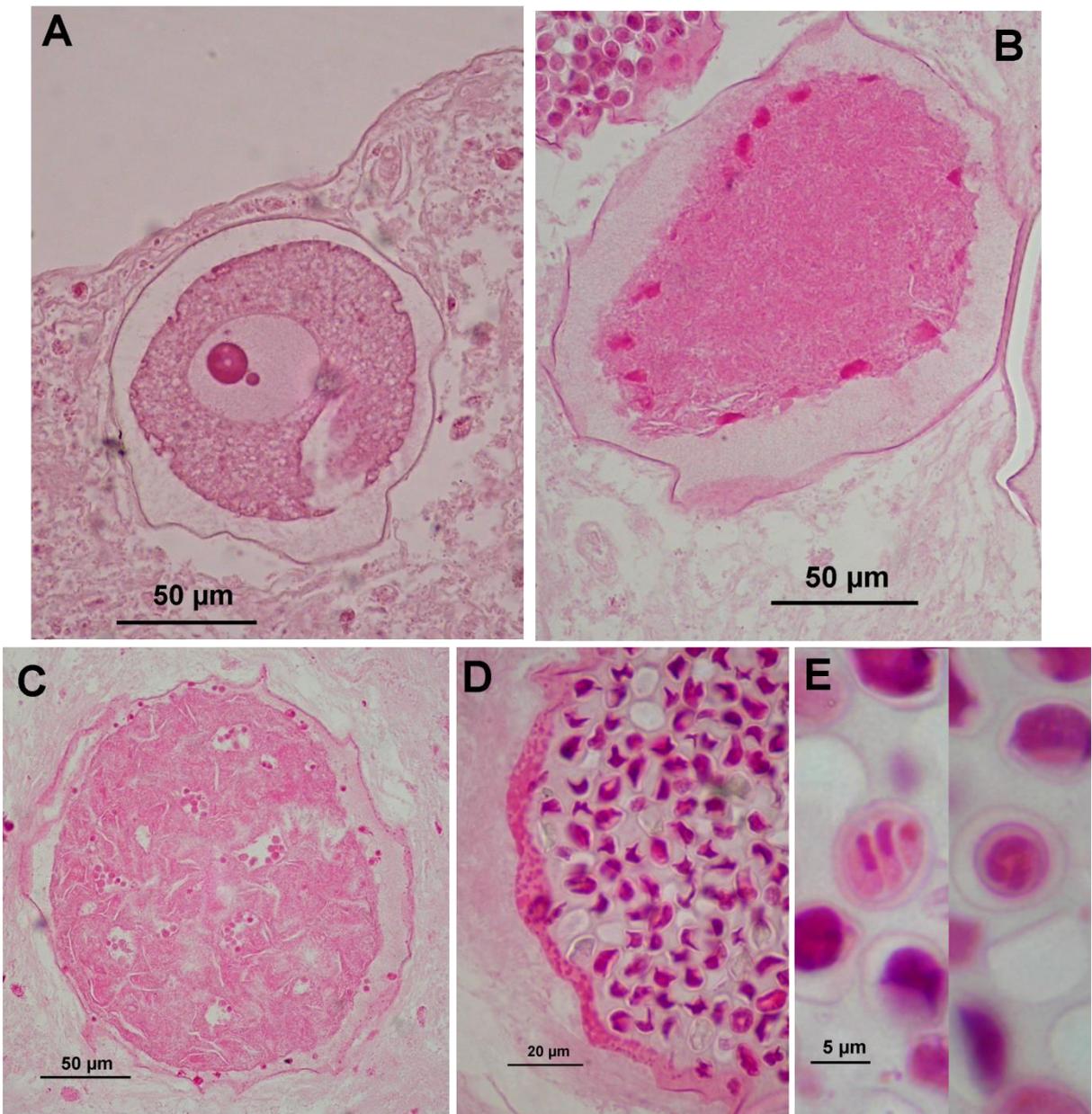


Figura 7.7 – *Aggregata* sp.: osservazioni morfologiche dai preparati istologici di tessuti di *H. reversa* e *H. bonnellii*. **A** – Macrogamonte; **B** – microgamonte in fase iniziale; **C** – sporonte con sporoblasti visibili; **D** – oocisti della quale è visibile la superficie granulosa; **D** – sporocisti (notare la parete sottile) e disposizione dei 3 sporozoiti.

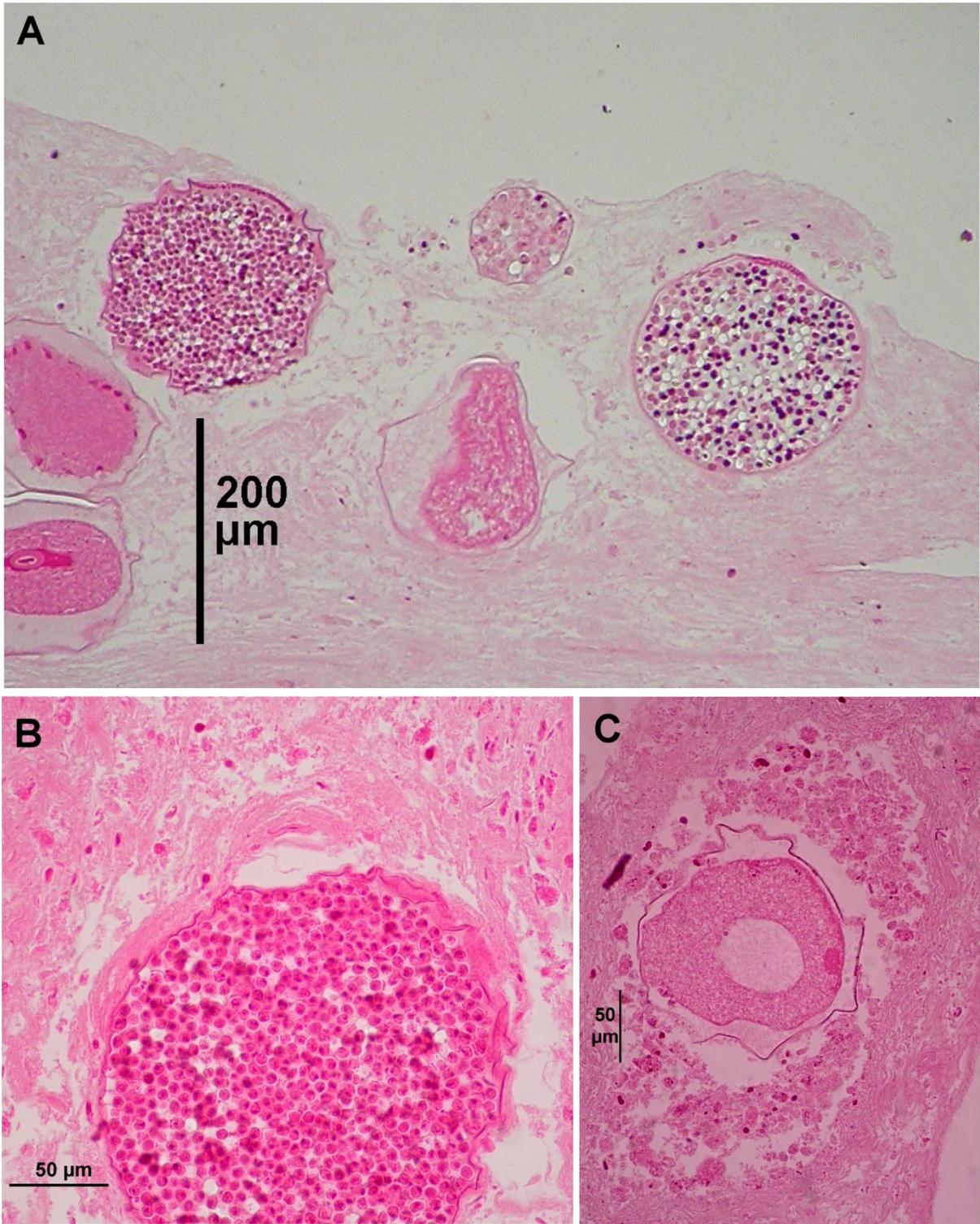


Figura 7.8 - *Aggregatasp.*: osservazioni istopatologiche da tessuti di *H. reversa* e *H. bonnellii*. **A** – discontinuità della mucosa del cieco e destrutturazione della sottomucosa in presenza delle forme parassite; **B** – strato pericistico di origine connettivale intorno ad una oocisti; **C** – infiltrazione di cellule ematiche e fagociti intorno ad un macrogamonte destinato ad essere distrutto.

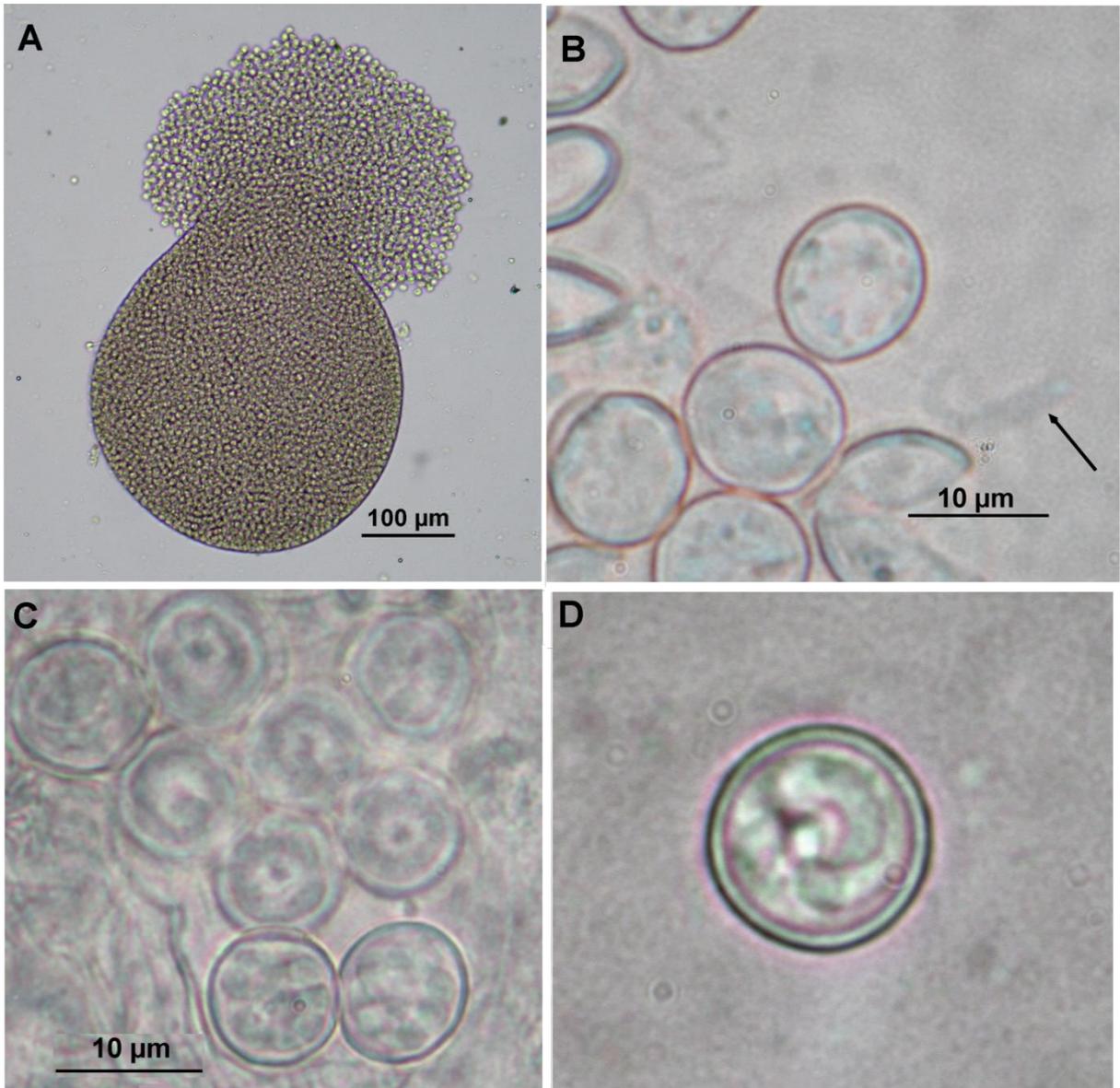


Figura 7.9 – *Aggregata* spp.: forme sporogoniche osservate una tantum in cefalopodi. **A, B** – oocisti immatura e sporocisti mature da stomaco di *A. lichtensteini*; **C, D** – sporocisti estratte da una oocisti nello stomaco di *Rossia macrosoma*.

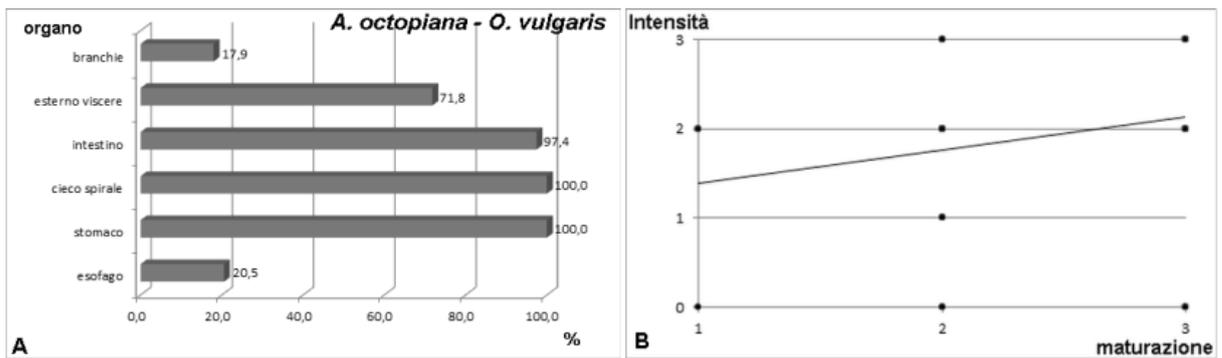


Figura 7.10 - *A. octopiana*. in *O. vulgaris*. **A** – Percentuale di infezione per organo; **B** – correlazione tra grado di intensità dell'infezione e condizioni di maturazione delle gonadi.

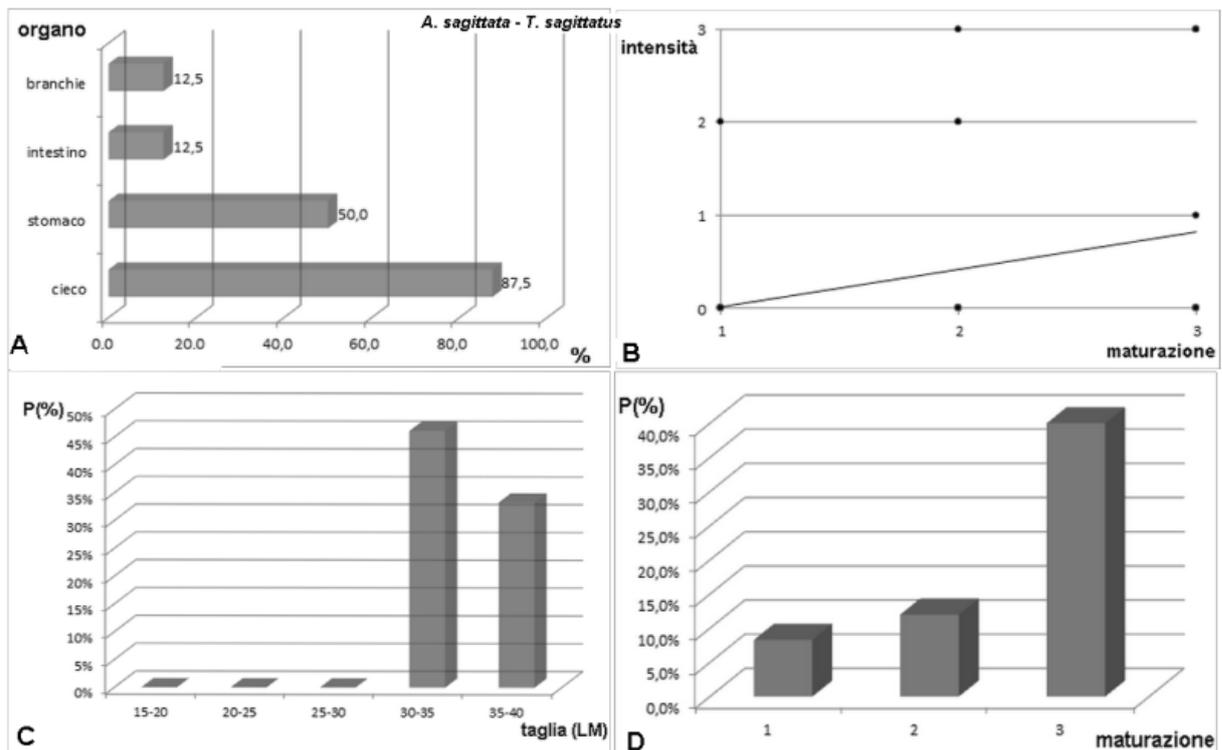


Figura 7.11 – *A. sagittata* in *T. sagittatus*. **A** – Percentuale di infezione per organo; **B** – correlazione tra grado di intensità dell'infezione e condizioni di maturazione delle gonadi. **C** – prevalenza del parassita per classe di taglia dell'ospite; **D** – prevalenza del parassita per grado di maturazione delle gonadi. Come specificato nel testo, i totani infetti sono tutti di sesso femminile.

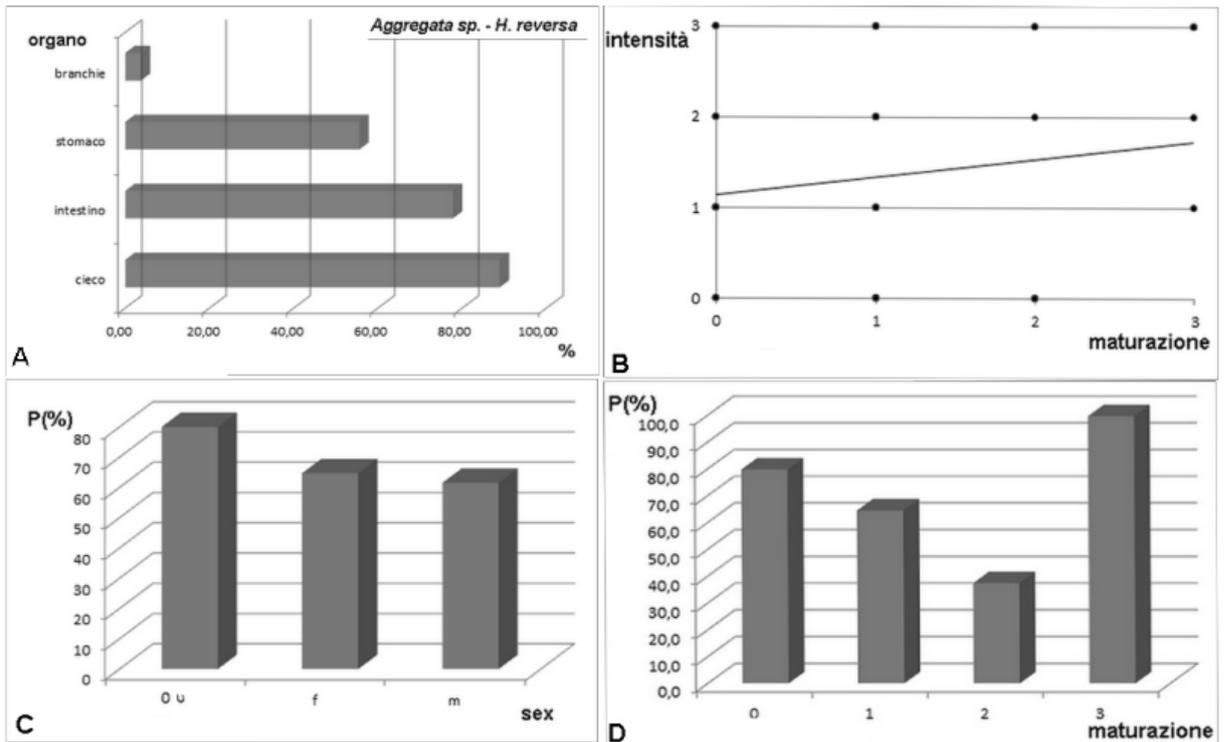


Figura 7.12 – *Aggregata* sp. inq. in *H. reversa*. **A** – Percentuale di infezione per organo; **B** – correlazione tra grado di intensità dell'infezione e condizioni di maturazione delle gonadi. **C** – prevalenza del parassita per sesso dell'ospite (0u = indifferenziato); **D** – prevalenza del parassita per grado di maturazione delle gonadi.

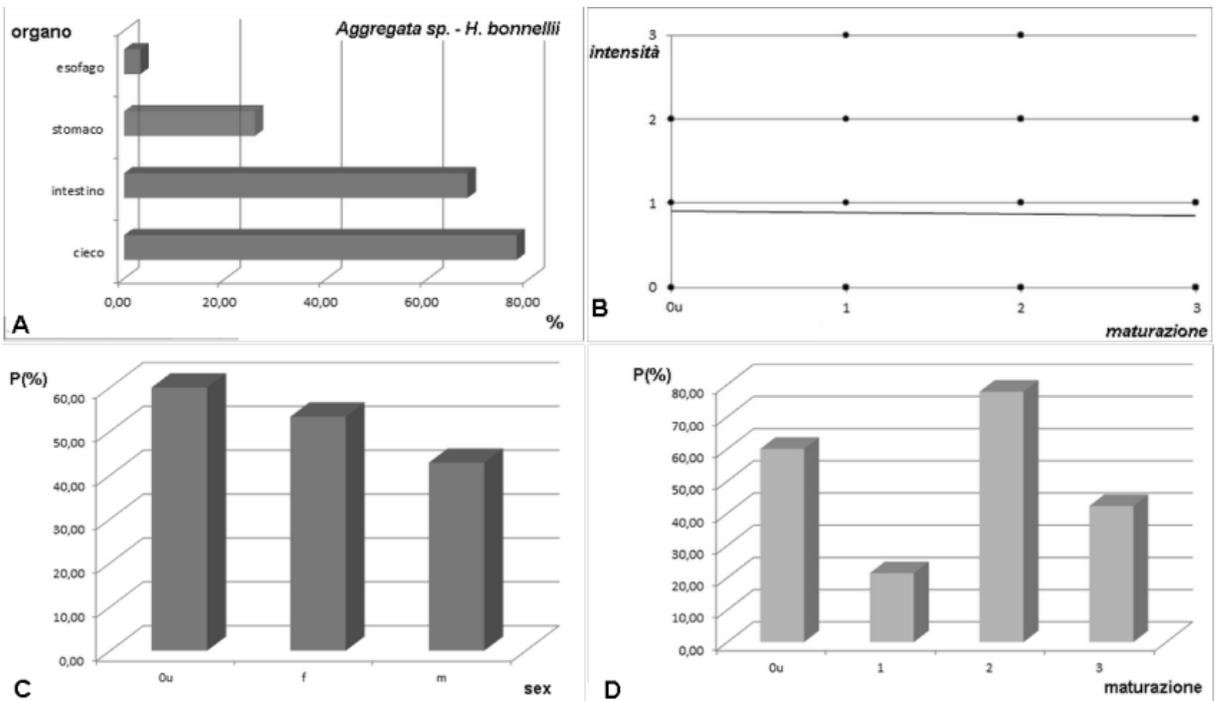


Figura 7.13 - *Aggregata* sp. inq. in *H. bonnellii*. **A** – Percentuale di infezione per organo; **B** – correlazione tra grado di intensità dell'infezione e condizioni di maturazione delle gonadi. **C** – prevalenza del parassita per sesso dell'ospite (0u = indifferenziato); **D** – prevalenza del parassita per grado di maturazione delle gonadi.

8. LARVE DI NEMATODI PARASSITI DEI CEFALOPODI DELLE ACQUE CIRCOSTANTI LA SARDEGNA

8.1 Introduzione

Larve di nematodi, in particolare appartenenti alla famiglia Anisakidae, sono comunemente osservate in pesci e cefalopodi marini, in particolare decapodiformi (Hochberg, 1990). I diversi generi che la compongono formano il gruppo più numeroso e diversificato tra gli Ascaridoidea parassiti di animali marini, i cui cicli eteroxeni coinvolgono sempre più di due specie ospiti (Rohde, 2005): in genere le uova del nematode finiscono libere in acqua attraverso le feci dell'ospite definitivo, all'interno di esse si sviluppano le larve fino al 3° stadio, che schiudono e vengono ingerite da piccoli crostacei. I nematodi quindi passano attraverso ospiti paratenici (di trasporto) come pesci e cefalopodi, fino a raggiungere l'ospite definitivo designato. Gli anisakidi allo stadio adulto infettano rappresentanti di tutti i gruppi tassonomici dei vertebrati marini: la sottofamiglia Anisakinae coinvolge elasmobranchi (parassitati dal genere *Terranova*), rettili (*Parheterotyphlum*, *Sulcascaris*), cetacei (*Anisakis*, *Pseudoterranova*), pinnipedi (*Contracaecum*, *Phocascaris*), uccelli (*Contracaecum*) (Mattiucci et al., 2001; Moravec & Justine, 2006; Sprent, 1977); le sottofamiglie Goeziinae (*Goezia* spp.) e soprattutto Raphidascauridinae (tra le quali i generi *Hysterothylacium*, *Iheringascaris*, *Lappetascaris*, *Paranisakis*, *Raphidascaris*) completano il ciclo quasi esclusivamente in teleostei e di rado in elasmobranchi (Rohde, 2005). Cicli di diverse specie, in particolare del genere *Hysterothylacium*, sono stati interamente o parzialmente osservati in laboratorio (es. Figus, 2001; Grabda, 1976; Køie, 1993).

Nei cefalopodi che fungono da ospiti paratenici, e in particolare negli oegopsidi, insieme a quelli di altri parassiti si trovano più frequentemente gli stadi larvali dei generi *Anisakis*, *Contracaecum*, *Terranova* e *Hysterothylacium* (Hochberg, 1989), come riportato anche in diversi lavori che spesso riguardano i parassiti dei cefalopodi in generale (Abollo et al., 1998,

2001; Gestal et al., 1999; Mladineo and Bočina, 2007; Nigmatullin et al., 2009; Pascual et al., 1996a, 2007).

Tuttavia, nell'ampia letteratura disponibile focalizzata sulle larve di anisakidi è difficile trovare studi descrittivi riguardanti i cefalopodi come loro ospiti, in particolare nel Mediterraneo occidentale e nelle acque circostanti la Sardegna, dove la quasi totalità dei lavori riguarda largamente le infezioni in teleostei (Angelucci et al., 2011; Culurgioni et al., 2006; D'Amico et al., 2006; Farjallah et al., 2008; Figus, 2001; Figus et al., 2004; Petter & Maillard, 1988; Tedde et al., 2012; Valero et al., 2000).

Riguardo i cefalopodi in particolare, le segnalazioni di larve di anisakidi del Mediterraneo, soprattutto nella letteratura più datata sono molto poco accurate e si limitano a brevissime descrizioni di specie non riferibili alla moderna tassonomia, o riferite a generici Ascaroidea (Delle Chiaje, 1829; Dollfus, 1958, in Hochberg, 1990). In tempi più recenti, gli unici report riguardano *Anisakis pegreffii* in *Illex coindetii* del Mar Adriatico (Petrić et al., 2011) e in *T. sagittatus* pescati in Tunisia (Farjallah et al. 2008); *Anisakis simplex* e *Hysterothylacium* sp. in *I. coindetii* e *Eledone cirrhosa* rispettivamente (Gestal et al., 1999), *Anisakis physeteris* in *T. sagittatus* (Mattiucci et al., 2001) in Mar Tirreno.

Riguardo alle acque circostanti la Sardegna, non esistono segnalazioni eccetto quelle di *Anisakis* spp. in *T. sagittatus* e *I. coindetii*, e *Hysterothylacium* sp. in *Octopus vulgaris* provenienti da diversi siti di pesca (Angelucci et al., 2011); e di *A. pegreffii*, *A. physeteris* e *Lappetascaris* sp. in *Histioteuthidae* (Culurgioni et al. 2010; 2012).

Gli anisakidi hanno una serie di caratteri strutturali specifici molto stabili, e come tali indispensabili dal punto di vista tassonomico. Questi sono, ad esempio, l'organizzazione del sistema escretore, la posizione del poro escretore, le strutture annesse al tubo digerente (forma del ventricolo, presenza o assenza di appendici), il numero e la disposizione delle papille caudali. Quest'ultima caratteristica è tra le più importanti ed è, sfortunatamente, rilevabile

soltanto nelle forme adulte. Ciò rende molto difficoltosa, quando possibile, l'identificazione delle larve di anisakidi sulla sola base morfologica. Rispetto alla microscopia ottica tradizionale (utile nello studio della morfologia interna), l'uso del microscopio elettronico a scansione è di grande aiuto nell'analizzare in grande dettaglio la superficie esterna dei campioni. Gli elevati ingrandimenti e il carattere tridimensionale delle immagini che si possono ottenere con questa tecnica permettono di apprezzare al meglio la disposizione spaziale delle strutture esterne delle larve, ed eventualmente di utilizzarle come elementi di riferimento diagnostici nella tassonomia (Weerasooriya et al., 1986).

Lo scopo del presente capitolo è di studiare qualitativamente e quantitativamente la presenza delle larve anisakidi nelle diverse specie di totani (Cephalopoda, Oegopsida) dei mari circostanti la Sardegna, per ottenere maggior chiarezza tassonomica ed epidemiologica sulla fenomenologia di questi parassiti nei cefalopodi.

8.2 Materiali e metodi

Tutti i campioni esaminati, provenienti dalle campagne di pesca Medits e CampBiol, nelle acque sarde, sono stati ottenuti ed esaminati secondo le procedure generali descritte nel capitolo 4 per l'individuazione dei parassiti e secondo le medesime tecniche istologiche.

Nello specifico per i nematodi, le larve estratte dagli ospiti sono state dapprima chiarificate in una soluzione di alcool 70% contenente il 5% glicerina, per rendere maggiormente visibili caratteri di importanza tassonomica quali le strutture presenti nelle estremità cefalica (labbra, denti chitinosi, papille) e caudale (spine, *mucron*), la posizione del poro escretore, la forma del ventricolo e la eventuale presenza di cieco intestinale e appendice ventricolare. Un vantaggio della glicerina, rispetto ad un altro agente chiarificante come il lattofenolo, è quello di ammorbidire la cuticola del campione rendendo più agevole la rotazione della larva tra i vetrini mediante lo spostamento del coprioggetto, per avere una migliore visione delle sue

caratteristiche. Gli esemplari selezionati per l'analisi morfometrica sono stati misurati, riportando ogni valore in micrometri (μm) secondo le caratteristiche elencate nelle Tabb. 8.1-8.3.

Osservazioni al microscopio elettronico a scansione

Per le osservazioni e la microfotografia delle larve L3 di *Lappetascaris* sp. al microscopio elettronico a scansione (SEM), sono state processate le porzioni anteriori e caudali degli esemplari da esaminare, secondo Abollo & Pascual (2002). I campioni, precedentemente conservati in etanolo 70%, provenienti da 5 larve (N=5), sono stati fissati in paraformaldeide 1% e glutaraldeide 1,25% in tampone cacodilato di sodio 0,15 M per 24 h a 22° C. Dopo quattro lavaggi con tampone fosfato (PBS, pH 7,2, 0,85% NaCl), gli esemplari sono stati deidratati attraverso la serie ascendente degli acetoni ed essiccati mediante Critical Point Dryer. I campioni sono stati quindi resi conduttivi con rivestimento di platino (4 nm) mediante evaporatore Emitech K575 ed osservati a 20 KV con microscopio elettronico a scansione Hitachi S4000 ad emissione di campo.

Osservazioni istologiche

Per l'analisi dei preparati istologici in glicol-metacrilato sono state selezionate due tipologie di campioni: porzioni di mantello contenenti il parassita incistato (non incapsulato) nel tessuto muscolare, e intere capsule di incistamento aderenti esternamente agli organi viscerali, contenenti un parassita.

Analisi molecolare

Larve appartenenti ai due morfotipi principali *Anisakis* sp. L3 Type 1 e *Anisakis* sp. L3 Type 2, estratte da *Histioteuthis* spp., sono state processate in un primo tempo nel laboratorio di

Parassitologia del Dipartimento di Sanità Pubblica e Malattie Infettive, Sapienza Università di Roma con la procedura utilizzata da Mattiucci et al. (2009).

Estrazione del DNA: è stato impiegato il kit commerciale Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, Wisconsin), seguendo le istruzioni fornite dalla casa produttrice, e/o il bromuro di cetiltrimetilammonio (Valentini et al., 2006). Il DNA estratto è stato conservato a -20° C.

PCR: un frammento interno del gene della *cox-2* del 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 10 ng di DNA totale, 30 pmol di ciascun primer, 2,5 mM di MgCl₂ (Amersham Pharmacia Biotech. Inc., Piscataway, NJ), PCR buffer 1× (Amersham Pharmacia Biotech. Inc.), DMSO 0,08 mM, dNTPs 0,4 mM (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) e 5 U di Taq Polimerasi (Amersham Pharmacia Biotech. Inc.). Il regime di temperature utilizzato è stato il seguente: denaturazione iniziale a 94° C per 3 min seguiti da 34 cicli di denaturazione a 94° C per 30 sec, annealing a 46° C per 1 min, 72° C per 90 sec, seguiti da una estensione finale a 72° C per 10 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 mediante PEG precipitazione e il sequenziamento è stato eseguito dalla Macrogen Inc. (Seoul, Korea) utilizzando i primers 210 e 211. Le sequenze sono state allineate con il programma ClustalW (Thompson et al., 1994). L'analisi filogenetica è stata effettuata mediante l'analisi di Maximum-Parsimony con il programma PAUP 4.0 (Swofford, 2003), e l'analisi di Neighbor-Joining secondo il modello a

due parametri di Kimura con il programma MEGA 4.0, come descritto da Mattiucci et al. (2009).

Una diversa procedura di identificazione molecolare è stata applicata in un secondo momento (nella Sezione di Parassitologia e Malattie Parassitarie del Dip. Di Biologia Animale dell'università di Sassari) a 20 campioni di larve appartenenti ai morfotipi 1 (sette campioni) e 2 (13 campioni) di *Anisakis* sp. L3, provenienti dalle tre specie di Ommastrephidae ospiti: *Todarodes sagittatus*, *Todaropsis eblanae* e *Illex coindetii*.

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 10×, 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. Cinque 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 40 min a 4 Volt/cm V previa colorazione con Gel Red Nucleic Acid Stain (10.000X, Biotium).

RFLP: Per l'identificazione delle specie di *Anisakis* il prodotto della PCR è stato digerito con l'enzima di restrizione *HinfI* 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 μ l. In relazione all'intensità delle bande sono stati aggiunti 2, 10 o 17 μ l di prodotto della PCR, 1 μ l di enzima (10 u/ μ l), e 2 μ l di buffer 10 \times . La reazione così preparata è stata posta ad incubare a 37°C per 3-4 h. Otto μ l 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 \times , per 100 min a 4 Volt/cm V previa colorazione con Gel Red Nucleic Acid Stain (10.000X, Biotium).

8.3 Risultati

Le larve anisakidi oggetto del presente studio sono state estratte da otto specie di cefalopodi su un totale di 15 esaminate nel periodo compreso tra giugno 2010 e ottobre 2013. Più esattamente, si tratta quasi esclusivamente di specie (sette) appartenenti all'ordine degli Oegopsida (totani), in tutto 203 esemplari: *Todarodes sagittatus* (47 esemplari esaminati), *Illex coindetii* (39), *Todaropsis eblanae* (sei), *Histioteuthis bonnellii* (63), *H. reversa* (40), *Ancistroteuthis lichtensteini* (sei), *Ancistrocheirus lesueurii* (uno), *Octopoteuthis* sp. (uno). Soltanto in un altro caso è stato coinvolto un ottopode, poiché una larva anisakide è stata trovata in *Eledone cirrhosa* (39 esaminate).

All'osservazione macroscopica degli ospiti sono state individuate tre tipologie di larve riconducibili alla famiglia Anisakidae, distinguibili per forma, colore, dimensioni, sito d'infezione preferenziale e disposizione del corpo. Altre due tipologie, una di Anisakidae e una di Cystidicolidae, che verranno brevemente descritte per ultime, sono state individuate soltanto microscopicamente a causa delle loro dimensioni contenute.

8.3.1 Larve al terzo stadio di *Lappetascaris* sp.

Famiglia: Anisakidae Railliet and Henry, 1912

Sottofamiglia: Raphidascaridinae Hartwich, 1954

Genere: *Lappetascaris* Rasheed, 1965

Specie: *Lappetascaris* sp. Type A (*sensu* Nagasawa and Moravec, 2002)

Ospiti: *Ancistrocheirus lesueurii* (Ancistrocheiridae), *Ancistroteuthis lichtensteini* (Onychoteuthidae), *H. bonnellii*, *H. reversa* (Oegopsida: Histioteuthidae), *I. coindetii*, *T. sagittatus*, *T. eblanae* (Ommastrephidae).

Sito di infezione: muscolatura del mantello, cavità del mantello, occhio (raro).

Località geografica: Mar di Sardegna, Canale di Sardegna, Tirreno occidentale.

Le larve della prima tipologia (*Lappetascaris* sp. Tipo A), lunghe circa 2 cm e mezzo, sono state osservate in tutte le specie di Oegopsida esaminate con prevalenza variabile dal 19,1% in *T. sagittatus* al 52,5% in *H. reversa*, e intensità media da 1,5 in *T. eblanae* a 10,9 in *H. reversa*. (Tab. 6.2). Queste larve, talvolta presenti a decine, erano visibili dapprima libere sulla superficie interna del mantello (Fig. 8.1B) o degli organi interni, ma la maggior parte di esse si trovavano incistate (ma non incapsulate) nella muscolatura del mantello (Fig. 8.1A), che risulta essere l'organo bersaglio preferenziale in tutti gli ospiti (Fig. 8.13). In alcuni casi questi parassiti infettavano siti inusuali, come il corpo vitreo dell'occhio (Fig. 8.1C) o i filamenti branchiali. La presenza dei parassiti incistati nel mantello è stata riscontrata in particolare con l'uso della piastra di transilluminazione, che ha messo in evidenza piccole aree di discontinuità cromatica rispetto al mantello sano. Nei casi di intensità elevata, l'aspetto del mantello nel complesso risultava emaciato e flaccido, con lesioni estese e adiacenti (Fig.8.1A). Ognuna di queste "macchie" corrispondeva alla cavità prodotta dal parassita per incamerarsi nel tessuto, la cui notevole degenerazione risultava nella sostituzione ad esso da parte di materiale liquido bianco-giallastro. In esso il nematode si trovava immerso totalmente

o parzialmente, con una o entrambe le estremità fuori dalla superficie del mantello (Fig.8.1B). In alcuni casi le lesioni non erano associate alla presenza del parassita, ovvero alcune larve si muovevano libere sulla superficie interna del mantello. Le larve non in movimento si presentavano distese, sinuose (come in Fig.8.3A), o arrotolate a guisa di molla nella metà posteriore del corpo (Fig. 8.1C).

Osservando i grafici nella Fig. 8.16 emerge che la correlazione tra intensità dell'infezione e lunghezza del mantello dell'ospite è marcatamente positiva nelle specie di *Histioteuthis*, mentre in *I. coindetii* la tendenza è leggera e quasi non si avverte, e in *T. sagittatus* essa appare addirittura negativa.

Osservazioni microscopiche

Analisi morfologica-morfometrica: basata su 15 larve L3 (tutte le misure sono riportate in μm). Corpo allungato e snello, biancastro, lunghezza totale media 20306,8 (min. 14686 – max. 28407) e massima larghezza 374,5 (257,6 – 481); cuticola dall'aspetto ultrastrutturale granuloso e finemente annulata, come evidenziato dalle immagini al SEM (Fig. 8.4E). Porzione cefalica stretta e obliquamente tronca, in modo che la parte ventrale (corrispondente all'abbozzo del labbro ventrale) sporga in avanti maggiormente rispetto alla parte dorsale (Figg. 8.3B, 8.4B). Al microscopio ottico l'abbozzo del labbro ventrale appare coperto anteriormente da un rivestimento cuticolare sostenuto lateralmente da una struttura sclerotizzata dotata di processi posteriori (Fig.8.4B). Ventralmente, tale struttura ha lunghezza di 40,8 (35 – 47,5) e larghezza 70,5 (52,9 – 90). Il SEM evidenzia che la superficie di questa struttura non mostra alcuna annulatura, ma piuttosto si presenta tubercolata e ultrastrutturalmente liscia (Fig. 8.4F). Esofago cilindrico, lungo 1872,1 (1426,7 – 2920), ghiandola esofagea distinguibile come zona dell'esofago a maggior densità (Figg. 8.2B, 8.3B); ventricolo ovale, lungo 239,3 (172 – 373) e largo 118,86 (74 – 155,6). Cieco

intestinale (Fig. 8.2B) protratto fino al livello del poro escretore, lungo 1690,4 (1060 – 2533); appendice ventricolare molto lunga, 13512,8 (8970 – 20042) (Fig. 8.2A). Rapporto medio tra le lunghezze del cieco e dell'appendice: esattamente $1/8$ ($1/10$ – $1/6$); rapporto medio tra la lunghezze dell'appendice e del corpo: esattamente $2/3$ (da circa $1/2$ a circa $3/4$). Intestino dritto, retto cuticularizzato, con tre ghiandole rettali a forma di goccia (Fig. 8.3C). Anello nervoso situato a 363,2 (278,2 – 430) dall'estremità anteriore, poro escretore situato di poco sotto al livello dell'anello nervoso (Figg. 8.2B, 8.4A), a 435,6 (353 – 501) dall'estremità; coda conica (Figg. 8.3C, 8.4C) leggermente allungata, con estremità digitiforme, lunghezza 255,5 (179,2 – 377,3). Estremità portante un minuto aculeo caudale che al SEM appare composto da due segmenti articolati (Fig. 8.4D) e che misura in totale 7,2 (6,5 – 8,1).

Aspetti istopatologici

Quello che si può osservare nelle sezioni di mantello in corrispondenza della lesione dovuta alla presenza della larva di *Lappetascaris* sp. Tipo A è una forte reazione infiammatoria con infiltrazioni cellulari e risposta emocitaria, indicata dalla crescente concentrazione di cellule in prossimità della lesione (Fig. 8.10C, D). Il tessuto che in vivo risulta sostituito da essudato purulento, nel preparato diventa volume libero sostituito dalla resina (Fig. 8.10C) La cavità determinatasi appare nettamente superiore al volume del parassita (Fig. 8.10B), inoltre si nota anche più esternamente una destrutturazione molto marcata del tessuto muscolare e la distruzione dell'epitelio (Fig. 8.10B). Gli strati di fibroblasti non appaiono compatti intorno alla lesione (Fig. 8.10C).

Commenti

I nematodi descritti possiedono la combinazione di caratteristiche morfologiche fondamentali che, secondo la classificazione di Hartwich (1954) all'interno della famiglia Anisakidae, li

rendono ascrivibili alla sottofamiglia Raphidascaridinae (secondo alcuni autori famiglia Raphidascaridiidae). Più esattamente, l'assenza di spine cuticolari, la posizione del poro escretore in prossimità dell'anello nervoso, e la presenza di un'appendice ventricolare rivolta posteriormente e di un cieco intestinale rivolto anteriormente sono tipiche del genere *Hysterothylacium* Ward & Magath, 1917. Questo genere di anisakidi è composto da circa 67 specie variamente distribuite nei mari del mondo, che da adulte sono parassite di teleostei predatori, e il cui ciclo biologico coinvolge crostacei come primi ospiti intermedi, pesci e molluschi come secondi ospiti intermedi o paratenici. Gli stadi larvali, che presentano diverse conformazioni, in molti casi non sono identificabili su sola base morfologica e vengono suddivisi in base a tipologie a seconda di caratteristiche importanti quali la conformazione delle estremità e la lunghezza relativa delle appendici intestinale e ventricolare (Deardorff & Overstreet, 1981; Shamsi et al., 2013).

In acque italiane le specie di *Hysterothylacium* segnalate sono 9 (Ortis & Paggi, 2008), e numerosissimi sono i report riguardanti stadi larvali e adulti in teleostei. Se ne citano solo alcuni, con maggior riferimento a quelli effettuati in acque circostanti la Sardegna: Petter & Maillard (1988), Valero et al. (2000), Figus (2001), Figus et al. (2004), D'Amico et al. (2006), Culurgioni et al. (2006).

Le segnalazioni di larve di nematodi nei cefalopodi, soprattutto nella prima letteratura disponibile, sono molto poco accurate e si limitano a brevissime descrizioni di specie non riferibili alla moderna tassonomia, o riferite a generici Ascaroidea (Delle Chiaje, 1829; Dollfus, 1958; vedere Hochberg, 1990) ma che tuttavia possono essere riaggornate via via che si fa maggior chiarezza tassonomica ed epidemiologica sulla fenomenologia di questi parassiti nei cefalopodi. I report di larve con le caratteristiche generali simili a quelle oggetto del presente studio si possono ritrovare in letteratura riferiti a specie di cefalopodi viventi in

tutti gli oceani; in origine queste larve erano attribuite soprattutto al genere *Thynnascaris*, poi ricondotto a *Hysterothylacium* da Deardorff & Overstreet (1981).

Con particolare riferimento a questi autori, le larve qui descritte hanno alcune caratteristiche che le rendono simili alla forma *Hysterothylacium* type MD, recentemente identificata con la nuova specie *H. deardorffoverstreetorum* nella descrizione di Knoff et al. (2012). Il particolare più simile è rappresentato dalla forma conica della coda, portante una singola spina terminale. Ma altri caratteri fanno discostare le due forme, come il fatto che le larve di *Hysterothylacium* type MD al terzo stadio sono fornite di dente perforatore sul labbro ventrale, assente nelle larve qui descritte; inoltre il rapporto tra le lunghezze del cieco e dell'appendice è molto diverso, essendo della forma MD di 1:12-1:25 (rispetto a 1:6-1:10) soprattutto in virtù del piccolissimo cieco intestinale. Inoltre, pur non osservando dente perforatore nelle L3 di *H. deardorffoverstreetorum*, Knoff et al. (2012) non descrivono la particolare struttura di rivestimento degli abbozzi labiali presente negli esemplari osservati nel presente lavoro e in Culurgioni et al. (2010), distinguendo piuttosto tra labbro dorsale e labbra ventrolaterali con papille. È anche evidente la lunghezza molto inferiore dell'appendice ventricolare in *H. deardorffoverstreetorum*.

In assoluto, le larve L3 descritte in letteratura che per morfologia e morfometria corrispondono maggiormente a quelle oggetto della presente descrizione sono quelle attribuite al genere *Lappetascaris* sp., descritte per la prima volta da Nagasawa & Moravec (1995) in *Todarodes pacificus* (Steenstrup, 1880) del Mar del Giappone; in seguito lo stesso parassita è stato ridescritto dagli stessi autori (Nagasawa & Moravec, 2002) come *Lappetascaris* sp. Tipo A in *Thysanoteuthis rhombus* Troschel, 1857, *Ommastrephes bartramii* (Lesueur, 1821), *Onychoteuthis borealijaponica* Okada, 1927, e *Gonatopus borealis* Sasaki, 1923 dal Pacifico centrale e settentrionale, per distinguerlo dal Tipo B segnalato nello stesso lavoro. Takahara & Sakurai (2010) riportano nuovamente *Lappetascaris* sp. in *T. pacificus* provenienti da 9 aree

di pesca intorno al Giappone. Precedentemente, esisteva soltanto una descrizione di larve dello stesso genere, ma non in cefalopodi bensì nel ciprinide *Paralaubuca cf. typus* (Moravec & Scholz, 1991), ma come asserito da Nagasawa & Moravec (1995) le due forme hanno differenze morfologiche tali da non essere ritenute conspecifiche. Riguardo al Mediterraneo, la prima segnalazione delle stesse larve è stata pubblicata di recente e nelle sole specie *H. bonnellii* e *H. reversa* (Culurgioni et al., 2010) prima che nel presente lavoro. I dettagli morfologici e morfometrici che identificano le nostre larve con *Lappetascaris* sp. sono: in primo luogo la capsula labiale, che Nagasawa & Moravec (1995, 2002) definiscono come “sclerotized supports of lip anlagen”; inoltre la ghiandola esofagea cospicua, la lunghissima appendice ventricolare, il rapporto tra cieco e appendice di 1:8, la morfologia della coda. Infine, il fatto che non esistano report di larve con questa morfologia in teleostei, mentre le larve di specie conosciute di *Hysterothylacium* infestano quasi esclusivamente la cavità viscerale di questi pesci. Secondo il parere di Nagasawa & Moravec (1995), qui condiviso, numerose delle segnalazioni di nematodi non identificati, non descritti o riportati come *Hysterothylacium*, *Thynnascaris*, o *Contracaecum* da numerosi autori (incluso Hochberg, 1990) dovrebbero essere ricondotte a *Lappetascaris* sp..

A sostenere questa ipotesi vi sarebbe, oltre alla morfologia, anche la totale similitudine delle lesioni sul mantello causate dalle larve, già descritte nel paragrafo Risultati, con quelle osservate da Bagrov (1982), citato da Hochberg (1990): “*Contracaecum* [...] from the mantle musculature of *O. bartrami*, *Moroteuthis robusta* and *Todarodes pacificus*. Large white-colored lesions were evident in the mantle at the site of penetration in all 3 hosts. These lesions measured 2 to 10 mm deep by 20 to 25 mm long and were visible to the naked eye”.

La stessa localizzazione è descritta da Naidenova et al. (1985) per larve di *Porrocaecum* in *Sthenoteuthis oualaniensis* (Ommastrephidae), e per *Lappetascaris* sp. in *Todarodes pacificus* (Takahara & Sakurai, 2010).

Ad oggi, il genere *Lappetascaris* comprende la sola specie descritta *L. lutjanii*, Rasheed 1965, parassita di *Lutjanus* sp. (Bloch, 1790) (Lutjanidae) e *Hilsa ilisha* (Hamilton, 1822) (Clupeidae) dalle acque di Karachi (Pakistan), riportata in seguito da diversi altri autori in teleostei marini, di acqua dolce e salmastra in India, Pakistan (Soota & Dey-Sarkar, 1980; De, 1990) e dalle coste Atlantiche del Brasile (Vicente et al., 2002). Nessuna segnalazione esiste riguardo alla sua presenza in teleostei del Mediterraneo, pertanto il ciclo delle larve oggetto del presente studio è tuttora non descritto. Con l'intento di reperire forme di nematodi adulte ad esse riconducibili in pesci predatori di cefalopodi, durante il periodo di studio è stato possibile esaminare sporadicamente il tratto digerente di alcune specie di teleostei e selaci delle acque circostanti la Sardegna. Più esattamente sono stati esaminati: 4 esemplari di *Thunnus thynnus* pescati nelle acque di Portoscuso nel mese di Giugno 2012, risultati negativi; una ventina di esemplari di pesci cartilaginei tra cui *Chimaera monstrosa*, *Dalatias licha*, *Hexanchus griseus*, *Scyliorhinus canicula*, *Dipturus oxyrinchus*, provenienti dalle stesse zone di pesca dei cefalopodi (Cale Medits). Nessun anisakide adulto, né in stadio di larva, è stato individuato nel tratto digerente di questi selaci, sebbene sia ben documentato che nelle zone di pesca di riferimento i cefalopodi costituiscano una parte rilevante della dieta delle specie esaminate (Mulas et al., 2011). È stato anche notato che stomaco di alcuni di essi contenesse non soltanto becchi di cefalopodi, ma anche esemplari ingeriti di recente (i.e. *Illex coindetii*) mostranti l'infezione da L3 di *Lappetascaris* sp.. Questo aspetto non desta meraviglia dal momento che i vermi adulti della sottofamiglia Raphidascaridiinae sono riportati quasi esclusivamente in teleostei (Figus, 2001; Mattiucci et al., 2005; Petter & Maillard, 1988; Vicente et al., 2002; dati non pubblicati).

8.3.2 Larve al terzo stadio del genere *Anisakis*

Le altre due tipologie larvali osservate, anch'esse simili tra loro, sono state inizialmente distinte per alcune caratteristiche visibili macroscopicamente, come ad esempio il colore, il sito di infezione e la modalità di incistamento. Come illustrato di seguito, dopo una prima caratterizzazione morfologica, analisi molecolari hanno permesso di distinguerle fino al livello di specie.

Famiglia: Anisakidae Skrjabin & Karokhin, 1945

Sottofamiglia: Anisakinae Chabaud, 1965

Genere: *Anisakis* Dujardin, 1845

- Specie (morfotipo): *Anisakis* sp. Type 1 (*sensu* Berland, 1961)

Ospiti: *H. bonnellii*, *H. reversa* (Oegopsida: Histioteuthidae), *I. coindetii*, *T. sagittatus*, (Ommastrephidae).

Sito di infezione: esterno delle gonadi, parete gastrica.

Località geografica: Mar di Sardegna, Canale di Sardegna, Tirreno occidentale.

La larva della seconda tipologia (*Anisakis* Tipo 1 *sensu* Berland, 1961 = *A. pegreffii*), bianca/trasparente, lunga circa 2 cm, è stata osservata con maggior prevalenza in *I. coindetii* (51,3%) ma anche in *T. sagittatus* (P = 17,0%) dove ha raggiunto la massima intensità con 18 individui in un solo ospite (Tab. 6.2). Questa larva si presentava avvolta a spirale piatta, incistata ed incapsulata quasi sempre nella parete dello stomaco, organo bersaglio principale, ma anche nelle gonadi (Fig. 8.6C, Fig. 8.14), anche in profondità tanto da non essere individuata nell'immediato. L'intensità dell'infezione di *A. pegreffii* si è dimostrata abbastanza costante in *I. coindetii* di tutte le taglie, mentre in *T. sagittatus* sembra più marcata la correlazione positiva dei due parametri (Fig. 8. 17).

Osservazioni microscopiche

Analisi morfologica-morfometrica: basata su 10 larve L3 (tutte le misure sono riportate in μm). Corpo cilindrico, allungato e slanciato, biancastro, lunghezza totale media 17590,3 (min. 14590 – max. 21265) e massima larghezza 509 (470 – 556); cuticola annulata. Porzione cefalica più stretta rispetto al resto del corpo, con labbra distinte e dente perforante lungo 14,5 (12 – 18,5) su quello ventrale (Fig. 8.7B). Esofago cilindrico, lungo 1753,4 (1105 – 2320); ventricolo rettangolare, lungo 642,3 (544 – 762) e largo 226 (192 – 272) (Fig. 8.7C). Poro escretore terminale, posto sul labbro ventrale poco più esternamente del dente (Fig. 8.7B); ghiandola secernente talvolta visibile, estesa dall'altezza del margine posteriore del ventricolo fino al poro escretore (Fig. 8.7A). Anello nervoso situato a 309,3 (211 – 409) dall'estremità anteriore; intestino dritto, retto cuticolarizzato, con tre ghiandole rettali globulari (Fig. 8.7D). Coda corta, quasi arrotondata, lunghezza (distanza tra ano ed estremità) 72,7 (62 – 90). Sull'estremità è presente un particolare aculeo terminale (*mucron*), lungo 18 (12 – 18,7).

- Specie (morfortipo): *Anisakis* sp. Type 2 (*sensu* Berland, 1961)

Ospiti: *H. bonnellii*, (Histiotteuthidae), *I. coindetii*, *T. sagittatus*, *T. eblanae* (Ommastrephidae), *Octopoteuthis* sp. (Octopoteuthidae).

Sito di infezione: esterno delle gonadi, parete gastrica.

Località geografica: Mar di Sardegna, Canale di Sardegna, Tirreno occidentale.

La larva della terza tipologia (*Anisakis* Tipo 2 *sensu* Berland, 1961 = *A. physeteris*), giallastra e più robusta della precedente, è stata reperita in 5 specie di oegopsidi, delle quali l'ospite preferenziale è *T. sagittatus* (P = 66,0%; IM = 5,2), nel quale si trovava incistata sulla superficie esterna di diversi organi viscerali (Fig. 8.6A-B) con spiccata preferenza per le gonadi (Fig. 8.15), appena sotto l'epitelio di rivestimento, che essendo trasparente rendeva immediatamente visibili questi parassiti nella loro disposizione a spirale (Fig. 8.6A-B). Nelle

altre specie ospiti *I. coindetii* e *T. eblanae* queste larve sono state osservate esclusivamente nelle gonadi, mentre in *H. bonnellii* si trovavano esternamente agli organi dell'apparato digerente (Fig. 8.15).

La taglia degli ospiti *T. sagittatus* e *H. bonnellii* ha correlazione positiva con l'intensità di quest'infezione, come osservabile nei grafici in Fig. 8.18; mentre i pochi parassiti osservati negli altri ospiti non consentono di trarre conclusioni.

Osservazioni microscopiche

Analisi morfologica-morfometrica: basata su 10 larve L3 (tutte le misure sono riportate in μm). Corpo cilindrico, allungato ma poco slanciato, colore bianco-giallastro talvolta rossastro anteriormente (Fig. 8.8A), lunghezza totale media 23115 (min. 20180 – max. 28792) e massima larghezza 713 (575 – 833); cuticola più o meno marcatamente annulata. Porzione cefalica leggermente più stretta rispetto al resto del corpo, con labbra distinte e dente perforante su quello ventrale, lungo 20,2 (16,8 – 25,5) (Fig.). Esofago cilindrico, lungo 1794,6 (1488 – 1973); ventricolo robusto rettangolare (Fig. 8.8B), lungo 484 (380 – 667) e largo 280 (230 – 379). Poro escretore terminale, posto sul labbro ventrale poco più esternamente del dente; ghiandola secernente talvolta visibile, estesa dall'altezza del margine posteriore del ventricolo fino al poro escretore (Fig. 8.8B). Anello nervoso situato a 369,3 (322 – 460) dall'estremità anteriore; intestino dritto, retto cuticularizzato, con tre ghiandole rettali globulari (Fig. 8.8C). Coda conica, con annulatura più evidente che nel resto del corpo, lunghezza 238 (186 – 314), priva di strutture acuminate.

Aspetti istopatologici

L'esame del preparato istologico ha rivelato che l'esemplare microsezionato appartiene al morfotipo larvale *Anisakis* sp. Type 2 (*A. physeteris*), che era incluso in una capsula

connettivale di natura quasi esclusivamente elastica, come indica il fatto che l'ematossilina non ha colorato la struttura (Fig. 8.10A).

Analisi molecolare

Per il primo gruppo di larve di Anisakis Tipo 1 e Tipo 2 estratte dalle specie ospiti *H. bonnellii* e *H. reversa*, l'analisi delle sequenze del gene della *cox-2* ha raggruppato gli individui esaminati in due cluster principali, ed ha permesso di identificare le larve di Tipo 1 come appartenenti alla specie *Anisakis pegreffii* e quelle di Tipo 2 alla specie *Anisakis physeteris*.

Riguardo ai 20 campioni provenienti dalle altre specie ospiti, l'applicazione della metodica PCR-RFLP ha consentito di identificare sette larve di Tipo I (due esemplari estratti da *I. coindetii* e cinque da *T. sagittatus*) come *A. pegreffii* e 13 larve di Tipo II (tre da *I. coindetii* e da *T. eblanae*, sette da *T. sagittatus*) come *A. physeteris*. In particolare, l'amplificazione della regione di rDNA ITS (ITS-1, 5.8S e ITS-2) ha prodotto un frammento di circa 1000 bp (Figura 8.11), la cui digestione mediante l'enzima *HinfI* ha evidenziato tre bande caratteristiche di 370, 300, 250 bp, che identificano la specie *A. pegreffii*, e tre bande di 380, 290, 270 bp identificative di *A. physeteris* (Figura 8.12). Tra i campioni di Tipo 1 esaminati, due (da *I. coindetii* e da *T. sagittatus*) presentavano un pattern di restrizione sovrapponibile a quello identificativo degli individui ibridi tra *A. pegreffii* e *A. simplex* (s.s.) (Fig. 8.12, n. 3, 6), con 4 bande di 620, 370, 300, 250 bp.

Commenti

Le descrizioni effettuate per gli stadi larvali di anisakidi della terza e della quarta tipologia corrispondono rispettivamente ai morfotipi *Anisakis* sp. L3 Type 1 e *Anisakis* sp. L3 Type 2,

secondo la definizione di Berland (1961). Oltre alle differenze prima citate, i principali caratteri discriminanti sono:

- ventricolo più allungato nel Type 1 rispetto al Type 2, che ha una porzione ventricolare quasi quadrangolare;
- presenza, nel Tipo 1, della particolare appendice caudale acuminata chiamata *mucron*.

I risultati ottenuti dalle analisi molecolari svolte nel presente lavoro sono in accordo con i precedenti studi effettuati con l'uso di marcatori allozimici, che negli ultimi anni hanno ampliato le conoscenze tassonomiche sul genere *Anisakis*.

Le analisi molecolari hanno rivelato che il morfotipo *Anisakis* Type 1 (*sensu* Berland, 1961) corrisponde ad *A. pegreffii* Campana-Rouget & Biocca, 1955 (in precedenza denominata *A. simplex A* anche secondo la descrizione di Grabda, 1976), le cui larve vengono rinvenute soprattutto in pesci, ma anche cefalopodi del Mediterraneo: *I. coindetii* ospita *Anisakis pegreffii* in Mare Adriatico (Petric et al., 2011), *A. simplex* nel Tirreno (Gestal et al., 1999); *Anisakis* sp. L3 è segnalato anche in *Sepia officinalis* (Giuffrida et al., 2002) del Golfo di Napoli; *Anisakis* tipo I L3 in *Histioteuthis reversa*, e *H. bonnellii* (Culurgioni et al., 2010).

Questa specie è ampiamente presente nel Mar Mediterraneo, sia nei bacini occidentali che in quelli orientali. Tale abbondanza può essere spiegata dalla presenza, in queste acque, di delfini come *Tursiops truncatus*, *Stenella caeruleoalba* e *Delphinus delphis*, che sono tra i principali ospiti definitivi di *Anisakis pegreffii* (Mattiucci & Nascetti, 2006).

Altre 4 specie di *Anisakis* hanno lo stesso morfotipo larvale (le specie gemelle del complesso *A. simplex*): *A. simplex sensu stricto*, *A. simplex C* (Nascetti et al., 1986), *A. typica* (Diesing, 1860) ed *A. ziphidarum* Paggi, Nascetti, Webb, Mattiucci, Cianchi et Bullini, 1988).

Il morfotipo *Anisakis* Type 2 corrisponde invece ad *A. physeteris*, il cui ospite definitivo è il capodoglio *Physeter catodon* L., mentre le larve sono spesso ritrovate in pesci e cefalopodi dell'Atlantico orientale e del Mar Mediterraneo come *T. sagittatus* (Angelucci et al., 2011);

qui, insieme ad *A. pegreffii* è la specie più diffusa (Farjallah et al., 2008; Mattiucci et al., 2001, 2008). *Anisakis* tipo II L3 è stata segnalata anche in *Histioteuthis bonnellii* (Culurgioni et al., 2010). Lo stesso morfotipo è proprio anche delle specie *A. brevispiculata* (Orecchia et al., 1986; Mattiucci et al., 2001; 2005) e *A. paggiae* Mattiucci, Nascetti, Dailey, Webb, Barros, Cianchi et Bullini, 2005.

Le segnalazioni di larve di *Anisakis* sono numerose in tutti i mari, e solo raramente sono accompagnate dall'esatta identificazione specifica dei morfotipi che spesso viene fatta sulla sola base morfologica. Ad esempio, in Atlantico meridionale (isole Falkland/Malvines) *Anisakis* sp. è registrato in *Loligo gahi* (Brickle, 2001). In acque Coreane, il totano *Todarodes pacificus* ospita larve al terzo stadio di *A. pegreffii*, *A. simplex*, e specie non identificate di Anisakidae (Setyobudi et al., 2013), mentre in Cina *Sepia esculenta* è risultata positiva alla ricerca di *Anisakis simplex* (Ma et al., 1997); in Giappone *Anisakis* L3 di tipo I e II e *Lappetascaris* sp. sono stati identificati in 5 specie di Ommastrephidae da Nagasawa & Moravec (1995, 2002). Altre specie di ospiti, quali *Todarodes pacificus* e *Loligo bleekeri*, sono risultate infette da larve di *A. pegreffii* e *A. simplex* (Ogawa, 1996; Takahara & Sakurai, 2010). In acque neozelandesi, *Anisakis simplex* è stato identificato nella locale specie di totano *Nototodarus sloani* (Smith et al., 1981).

Esami parassitologici su *Ommastrephes bartramii* e *Dosidicus gigas* del Pacifico sudorientale hanno evidenziato la presenza di *Anisakis physeteris*, *Porrocaecum* sp., *Contracecum*, e *Anisakis* L3 dei tipi I e II (Cespedes et al., 2011; Nigmatullin et al., 2009; Pardo-Gandarillas et al., 2009; Shukhgalter & Nigmatullin, 2001).

8.3.3 Larve di nematodi individuate in microscopia

Nelle porzioni di tessuto osservate al microscopio ottico, in particolare nella parete gastrica e talvolta nelle branchie, sono state individuate larve di altre due tipologie. Le prime, anisakidi,

erano molto simile a quelle di *Lappetascaris* sp. descritte in precedenza ma di dimensioni notevolmente inferiori, da 300 µm a 5 mm. Queste larve erano morfologicamente riconducibili a *Lappetascaris* sp. Tipo B (*sensu* Nagasawa & Moravec 2002) (Fig. 8.5A-D). Esse si presentavano isolate, incluse nella mucosa, senza evidenza di particolari macrolesioni (Fig. 8.5A) in ospiti quali *E. cirrhosa* (un solo caso), *H. reversa*, *T. sagittatus* e con indici abbastanza elevati in *I. coindetii* (P = 25,6; IM = 7,7). Infine, sempre in *I. coindetii* e nello stesso organo è stata osservata, in un solo caso, una larva morfologicamente classificabile come *Spinitectus* sp. (Cystidicolidae). La caratteristica principale di questo genere è la serie di anelli di spine che si trovano intorno alla cuticola della porzione anteriore del corpo (Fig. 8.9A-D).

Commenti

Per quanto riguarda le larve classificate come *Lappetascaris* sp. Tipo B, in accordo con osservazioni simili (Hochberg, 1989, 1990; Nagasawa & Moravec 2002) potrebbe trattarsi di uno stadio precedente di quello delle larve di tipo A oppure di un'altra specie, ma non vi sono elementi sperimentali per avere certezze in merito. Larve del genere *Spinitectus* sono state osservate in precedenti lavori riguardanti Ommastrephidae in altri mari, come *Illex argentinus* in Atlantico sud-occidentale e *Dosidicus gigas* nel Pacifico sud-orientale (Nigmatullin & Shukhgalter, 1990; Shukhgalter & Nigmatullin, 2001) mentre una specie non identificata della stessa famiglia, *Cystidicola* sp., è riportata in 8 su 70 *O. vulgaris* nell'Atlantico nord-orientale (Gestal et al., 2007b; Pascual et al., 1996a). L'identificazione delle specie di *Spinitectus* e dei generi simili è molto difficile perché le descrizioni esistenti sono inadeguate anche a causa delle minute dimensioni che rendono difficile l'osservazione di strutture cuticolari, deiridi, spine e papille genitali (Moravec, 2007). Adulti del genere *Spinitectus* e di quello affine *Prospinitectus* in ambiente marino sono parassiti del tratto intestinale di pesci

ossei predatori tra i quali in particolar modo gli Scombridae (Castillo-Sánchez et al., 1997; Crites et al., 1993) incluso *Thunnus thynnus* nell'Atlantico orientale (Mele, comunicazione personale).

8.4 Discussione

Nel presente capitolo ci si è occupati di descrivere la presenza di larve di nematodi in alcune delle specie di cefalopodi dei mari intorno alla Sardegna dal punto di vista, analizzando la morfologia dei parassiti e alcuni aspetti della fenomenologia delle infezioni. Uno dei risultati più evidenti è la presenza di quasi tutte le larve reperite in ospiti dell'ordine Oegopsida. Le specie esaminate appartenenti agli ordini Octopoda, Sepiida, Sepiolida e Myopsida sono interessate solo marginalmente da questo tipo di parassitosi, in accordo con la principale letteratura esistente (Hochberg, 1990; Pascual et al, 1996a).

È possibile mettere in evidenza differenze ed analogie tra le infezioni delle tre specie principali individuate: *Lappetascaris* sp. A, *Anisakis pegreffii* e *A. physeteris*.

Prima di tutto, ciascuna di queste tre specie mostra un diverso comportamento rispetto alla preferenza d'ospite. Nonostante si tratti di stadi larvali generalisti che utilizzano i cefalopodi come ospiti paratenici, soltanto *Lappetascaris* sp. A è presente con prevalenze molto simili in più specie ospiti (Tab. 6.3). Diversamente, *A. pegreffii* fa registrare alti livelli di infestazione soltanto in *I. coindetii* (P = 51,3%) e in minor misura in *T. sagittatus*. *Anisakis physeteris* è invece presente con elevate prevalenza (66,0%) ed intensità soltanto in *T. sagittatus*, e secondariamente nelle altre specie. In ogni caso comunque gli anisakidi di tutte e tre le specie sono generalmente presenti in tutti gli Oegopsida. Ciò suggerisce che i diversi livelli osservati non dipendano da diverse compatibilità tra ospite e parassita, ma piuttosto dalla diversa composizione nella dieta dei diversi cefalopodi e da differenze di habitat. Questo aspetto determina anche le marcate differenze nella parassitofauna di una specie in zone geografiche

differenti. Ad esempio, *T. eblanae* in Atlantico orientale è parassitato da *A. simplex* (Pascual et al., 1996c), e in Mediterraneo occidentale da *A. physeteris* (presente lavoro); *I. coindetii* delle coste toscane del Tirreno presenta unicamente “*A. simplex complex*” (Gestal et al, 1999) come in Atlantico (Pascual et al., 1996a) e nel presente lavoro è infettato sia da *A. pegreffii* e *Lappetascaris* che da *A. physeteris*.

Un altro aspetto nel quale è possibile confrontare le tre specie di Anisakidae è l’andamento delle infezioni rispetto al sesso dell’ospite (Fig. 8.19. *Lappetascaris* sp. A mostra valori di prevalenza leggermente superiori nelle femmine rispetto ai maschi in *I. coindetii* (ma sempre intorno a $P = 50\%$) e negli Histioteuthidae, e in questi ultimi si osservano valori bassi negli individui più giovani di sesso indeterminato. In *T. sagittatus*, risulta addirittura assente nei maschi.

Le prevalenze di *A. pegreffii* rispetto ai sessi mostrano negli Ommastrephidae e in *H. reversa* un andamento quasi identico a quelli di *Lappetascaris*: in *T. sagittatus*, assenza nei maschi e valori di $P\%$ contenuti nelle femmine (e nei giovanili di *H. reversa*); in *I. coindetii* valori intorno al 50% in netrambi i sessi.

Anche la specie *A. physeteris* fa registrare prevalenze maggiori nelle femmine rispetto ai maschi sia in *H. bonnellii* che in *T. sagittatus*, e risulta assente nei maschi di *I. coindetii*.

In accordo con quanto osservato per *I. coindetii* da Pascual et al. (1995a), tale tendenza può essere messa in relazione, più che con il sesso, con la maggiore taglia che generalmente raggiungono le femmine (come riportato nei capitoli introduttivi, e come da campione esaminato), e quindi con la maggiore attività predatoria che espone maggiormente queste ultime alle infezioni parassitarie trasmesse attraverso la catena alimentare.

Questa osservazione trova giustificazione anche nel confronto tra le prevalenze delle infezioni da anisakidi in relazione alla classe di taglia dell’ospite (Fig. 8.20). Per tutte e tre le specie parassite esaminate, nei 4 ospiti per i quali si è ottenuta una quantità sufficiente di dati, si

assiste a andamenti direttamente proporzionali dei due parametri: le prevalenze maggiori si registrano in ospiti di taglia maggiore. Anche in questo caso si ha un andamento molto simile di *Lappetascaris* sp. A e *A. pegreffii* (eccetto che in *H. reversa*).

In questa relazione bisogna considerare il legame tra taglia ed età, quindi il fatto che gli ospiti di maggiori dimensioni, rispetto ai più piccoli e quindi giovani, sono esposti da più tempo al rischio di contrarre parassiti (Pascual et al., 1995a). Inoltre, poiché il ciclo vitale degli Ommastrephidae è breve, i parassiti restano nell'ospite per tutta la sua durata (Hochberg, 1990).

Altre differenze sono osservabili rispetto all'organo bersaglio dei parassiti in esame. Infatti, nel caso di *Lappetascaris* sp. A è il mantello ad essere infettato preferenzialmente (Fig. 8.13), così come osservato in altri casi per le specie riconducibili a questa (Hochberg, 1990; Naidenova et al., 1985; Takahara & Sakurai, 2010).

Anisakis pegreffii mostra invece che il suo organo bersaglio è lo stomaco, nella parete del quale si trova incapsulato nella quasi totalità dei casi (Fig. 8.14). Lo stesso tipo di preferenza è stato osservato da Petric et al (2011) in *I. coindetii* ma con una percentuale inferiore (43,6%); in *I. coindetii* e *T. eblanae* da Pascual et al. (1996c) con alte percentuali relativamente a *A. simplex* B; da Nagasawa & Moravec (2002) per *Anisakis simplex*, mentre in altri casi viene descritto più genericamente come incapsulato nelle viscere (Pascual et al., 1995b).

La stessa localizzazione generica viene data spesso per *A. physeteris* (Nagasawa & Moravec, 2002; Pardo-Gandarillas et al., 2009), ma in questo lavoro il parassita mostra una elevata specificità per le membrane celomiche delle gonadi dell'ospite negli Ommastrephidae (Fig. 8.15), come osservato da Nigmatullin et al. (2009) in *Dosidicus gigas*. In *H. bonnellii* invece, tutti gli individui sono stati trovati all'esterno delle viscere.

Dal confronto delle osservazioni istologiche relative a *Lappetascaris* sp. Tipo A con la poca letteratura disponibile riguardante gli effetti istopatologici di larve anisakidi in cefalopodi, la

differenza principale riguarda l'assenza del rigido incapsulamento della larva con strati di fibroblasti di origine connettivale disposti concentricamente. Ciò invece si verifica nei confronti delle larve di *Anisakis* spp. nelle stesse specie di totani (Pascual et al., 1995b) ed è stato possibile osservare la stessa reazione nel presente lavoro, nel caso di *A. physeteris* in *H. bonnellii*, dove si osserva che la mancanza di cellule nella capsula connettivale (sia fibroblasti sia di risposta infiammatoria) suggerisce che l'isolamento del parassita dai tessuti dell'ospite possa essere efficace per lungo tempo. Pertanto, le larve di *Lappetascaris* per quanto siano avvolte a spirale o meglio "a molla" rimangono libere nelle cavità che hanno prodotto nel tessuto muscolare del mantello. Per lo stesso motivo di frequente si sono osservate delle lesioni all'interno delle quali mancava il parassita, il quale evidentemente è in grado di abbandonare rapidamente il sito di infezione (Fig. 8.1B) ed eventualmente di procurare altre lesioni. Probabilmente, l'alta patogenicità osservata per queste larve è favorita da un loro sistema di difesa (ad esempio la produzione di enzimi litici) rispetto alla reazione dell'ospite, il quale non è in grado di produrre intorno ad esso quelle capsule fibrose che hanno la funzione di isolare l'anisakide evitando la sua ulteriore migrazione e quindi il danneggiamento di altri tessuti. Seppure alcuni strati concentrici di cellule siano visibili, questi sono comunque esterni al fenomeno infiammatorio acuto.

Il presente studio contiene le prime osservazioni delle larve di *Lappetascaris* sp. al SEM, e delle lesioni prodotte da questi parassiti in preparati istologici. Con questo contributo ci si propone di fornire ulteriori elementi, in aggiunta a quelli ottenuti con la descrizione al microscopio ottico, per la caratterizzazione morfologica di un genere di Anisakidae ancora poco conosciuto. Ciò è importante se si considera la frequente presenza di queste larve in numerose e importanti specie di cefalopodi a livello globale, come emerge dalle considerazioni di Nagasawa & Moravec (1995, 2002).

Il dato riguardante la presenza di forme ibride *A. pegreffii*/*A. simplex* s.s. in *T. sagittatus* ed in *I. coindetii* è in accordo con i risultati esistenti in letteratura sulla biologia molecolare degli Anisakidae presenti in pesci del Mar Mediterraneo: relativamente al morfotipo 1, la specie dominante è in ogni caso *A. pegreffii*, ma la presenza di *A. simplex* (specie atlantica) nella parte più occidentale del Mediterraneo dà origine talvolta alla formazione di generazioni ibride (Farjallah et al., 2008; Mattiucci et al., 2008).

Tabella 8.1 – *Lappetascaris* sp. L3. Misure morfometriche, in μm .

Caratteristica	N° 1	N° 2	N° 3	N° 4	N° 5	N° 6	N° 7	N° 8	N° 9	N° 10	N° 11	N° 12	N° 13	N° 14	N° 15	min	max	media
Lunghezza corpo	16879	19444	15688	16048	21161	27707	21923	18233	23571	20286	21071	14686	28407	22476	17022	14686	28407	20306,8
Larghezza corpo (max)	257,6	289	328,1	357,1	354,8	439	481	350	464	290	393	346,3	442	456	368,8	257,6	481	374,4
Lunghezza esofago	1427	1810	1559	1461	1640	2306	1800	1733	2128	1925	2920	1524	2329	2028	1492	1427	2920	1872,1
Lunghezza ventricolo	190	231,6	172	195,7	213,3	258,8	277,8	248	285	229,2	373	181	264,8	271,2	198,6	172	373	239,3
Larghezza ventricolo (max)	106,7	74	96,8	91,3	110	117,6	155,6	118,5	152	150	147	92,2	121,2	151	99	74	155,6	118,9
Lunghezza cieco intestinale	1060	1431	1468	1313	1293	2000	1444	1277	2375	1600	2533	1518	2280	2475	1289	1060	2533	1690,4
Lunghezza appendice ventricolare	8970	11111	11781	11929	11548	19951	14038	12233	15357	11786	15714	11381	20042	15057	11794	8970	20042	13512,8
Rapporto cieco/appendice	0,118	0,129	0,125	0,110	0,112	0,100	0,103	0,104	0,155	0,136	0,161	0,133	0,114	0,164	0,109	0,100	0,164	0,125
Rapporto appendice/corpo	0,531	0,571	0,751	0,743	0,546	0,720	0,640	0,671	0,652	0,581	0,746	0,775	0,706	0,670	0,693	0,531	0,775	0,666
Distanza tra anello nervoso ed estremità anteriore	295	421	430	278,2	413,3	329	333	407,4	375	400	408	325	389	365	279,2	278,2	430	363,2
Distanza tra poro escretore ed estremità anteriore	361	494,7	501	353	490	408	411	466,7	422	441,7	469	484	420	420	392	353	501	435,6
Lunghezza capsula labiale	35	47,2	47,5	41	43	38,3	37,4	39	45,9	37,5	42	38	39,3	41,6	39	35	47,5	40,8
Larghezza capsula labiale (max)	66,7	89,5	67,8	69,8	83,3	52,9	66,7	74	68,1	66,7	90	58,5	62,9	69	71,2	52,9	90	70,5
Lunghezza coda	186,7	323,1	260	215,2	377,3	347,8	237	217,8	179,2	183	280	260	356,5	183,2	226,2	179,2	377,3	255,5
Lunghezza spina caudale	6,7	7	6,5	6,8	7,5	7,9	7,5	7,3	8,1	6,5	7,1	6,5	7,9	8	6,8	6,5	8,1	7,2

Tabella 8.2 – *Anisakis* sp. Tipo 1 (*A. pegreffii*). Misure morfometriche, in μm .

Caratteristica	N° 1	N° 2	N° 3	N° 4	N° 5	N° 6	N° 7	N° 8	N° 9	N° 10	min	max	mean
Lunghezza corpo	21265	19560	18770	16752	17850	19849	16230	14590	14990	16047	14590	21265	17590,3
Larghezza corpo (max)	507	494	510	470	510	521	488	511	556	523	470	556	509,0
Lunghezza esofago	1949	1944	1850	1105	1758	1870	1762	1281	2320	1695	1105	2320	1753,4
Lunghezza ventricolo	695	655	623	591	680	762	618	544	621	634	544	762	642,3
Larghezza ventricolo (max)	270	272	203	192	223	235	212	211	223	219	192	272	226,0
Distanza tra anello nervoso ed estremità anteriore	211	295	302	290	282	318	409	309	378	299	211	409	309,3
Lunghezza mucron	12,5	12,5	17	18	14,8	17,5	22,5	20	27,5	17,5	12,5	27,5	18,0
Lunghezza dente	15	14,5	16	15	13	13,5	12	18,7	13,5	14	12	18,7	14,5
Lunghezza coda	90	65	75	71	72	75	66	62	82	69	62	90	72,7

Tabella 8.3 – *Anisakis* sp. Tipo 2 (*A. physeteris*). Misure morfometriche, in μm .

Caratteristica	N° 1	N° 2	N° 3	N° 4	N° 5	N° 6	N° 7	N° 8	N° 9	N° 10	min	max	mean
Lunghezza corpo	28792	28311	20523	22356	22410	23078	23122	20180	21397	20990	20180	28792	23115,9
Larghezza corpo (max)	833	828	670	750	610	750	575	679	725	710	575	833	713,0
Lunghezza esofago	1875	1932	1912	1590	1633	1720	1862	1961	1973	1488	1488	1973	1794,6
Lunghezza ventricolo	516	667	515	540	380	395	458	510	414	445	380	667	484,0
Larghezza ventricolo (max)	291	379	270	235	255	267	283	342	230	256	230	379	280,8
Distanza tra anello nervoso ed estremità anteriore	324	322	400	430	460	360	372	356	344	325	322	460	369,3
Lunghezza dente	22,2	21	20	17,8	16,8	17,2	17,5	21	22,5	25,5	16,8	25,5	20,2
Lunghezza coda	225	314	198	210	186	254	260	305	216	212	186	314	238,0

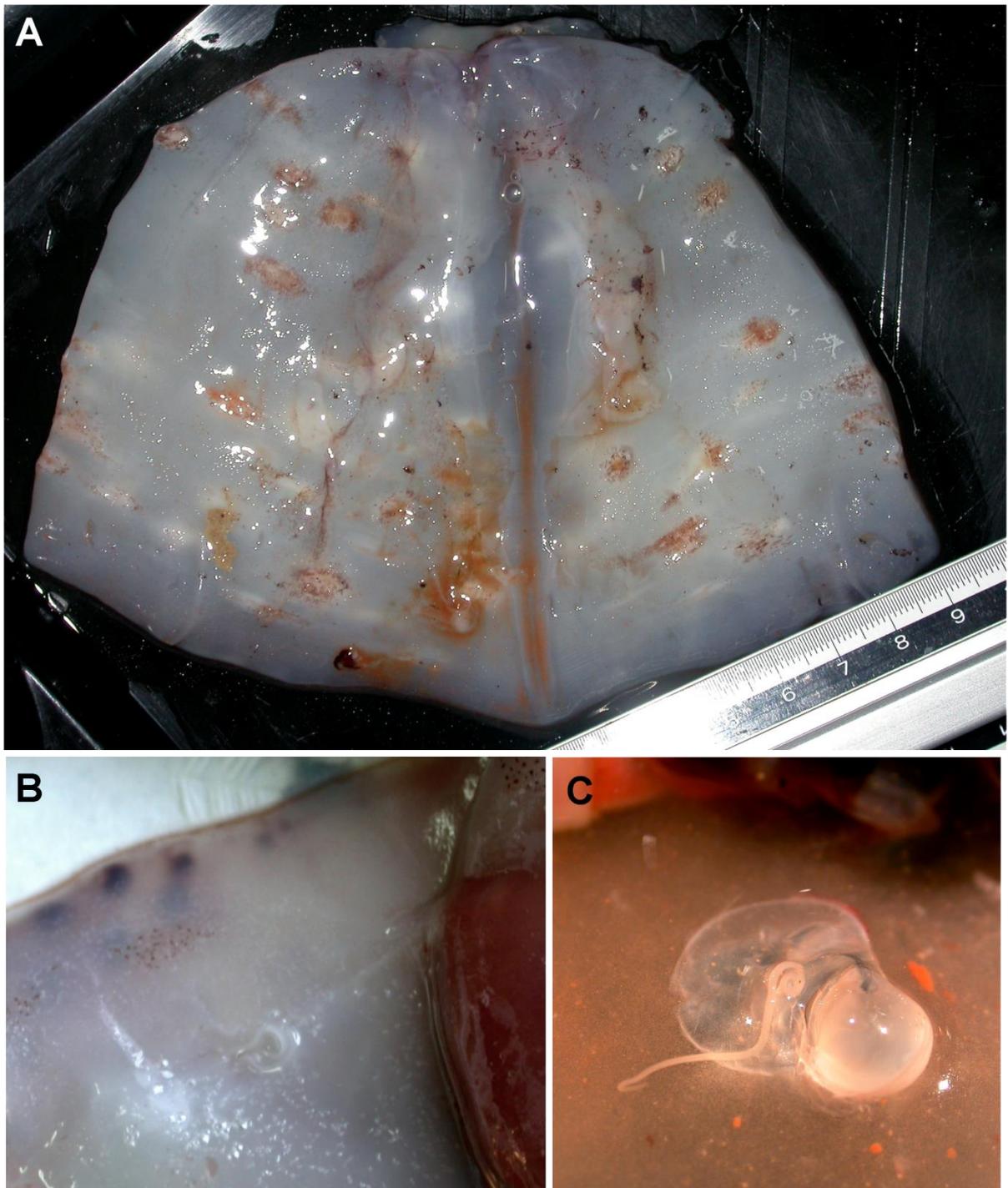


Figura 8.1 – Immagini macroscopiche di larve al terzo stadio di *Lappetascaris* sp. Tipo A. **A** – Mantello di *T. sagittatus* con numerose lesioni biancastre essudative nella muscolatura dovute alla presenza di cavità contenenti larve. Si noti la pigmentazione in corrispondenza di alcune lesioni; **B** – larva nell’atto di fuoriuscire da una lesione di incistamento; **C** – inusuale localizzazione di una larva nel corpo vitreo dell’occhio di *H. bonnellii*.

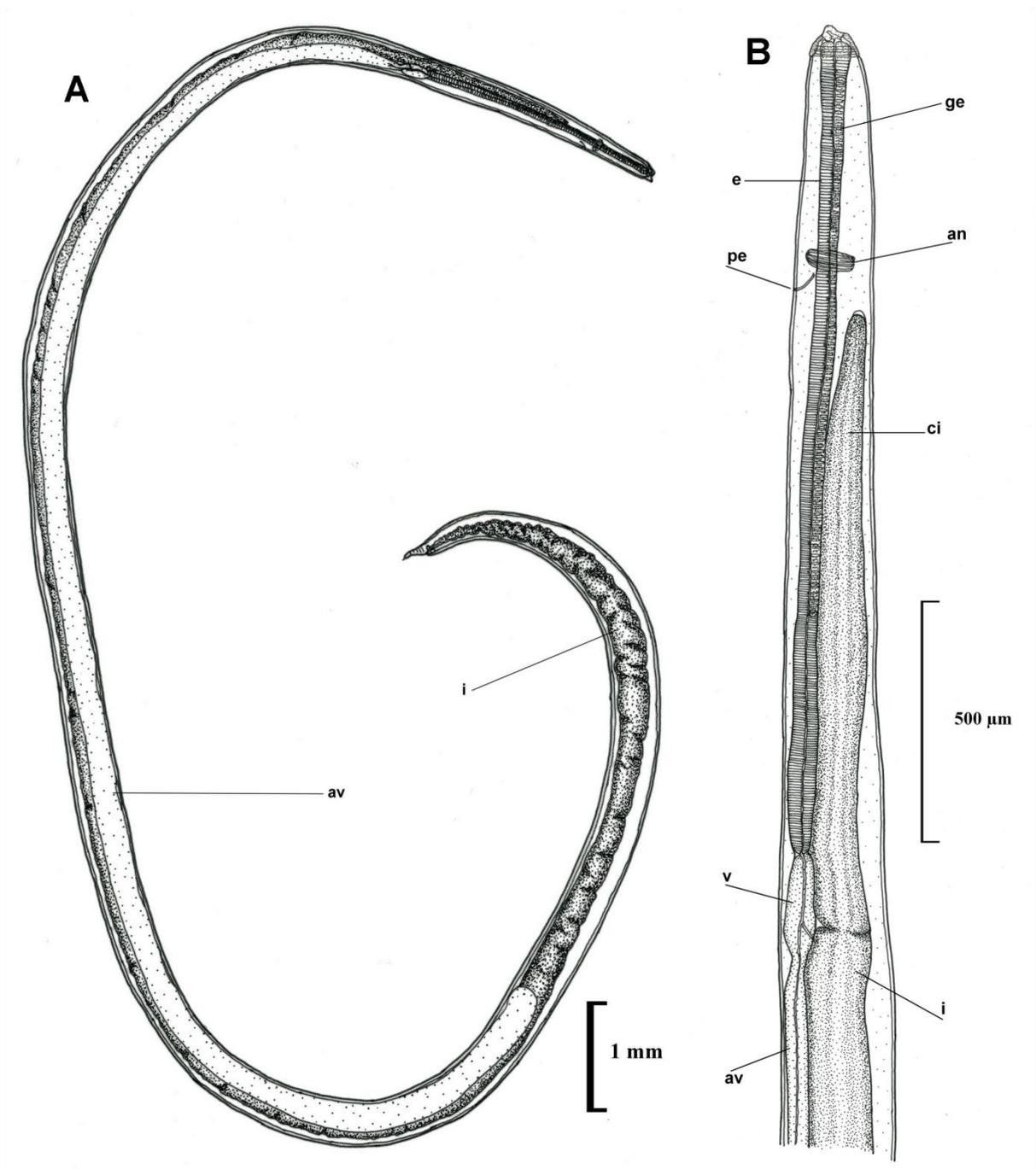


Figura 8.2 – Disegni descrittivi delle larve di *Lappetascaris* sp. Tipo A. **A** – esemplare in toto. Si nota l'estremo sviluppo dell'appendice ventricolare (av) e la conformazione della parte posteriore dell'intestino (i). **B** – porzione anteriore della larva, con in evidenza il cieco intestinale, il ventricolo, l'anello nervoso e il poro escretore.

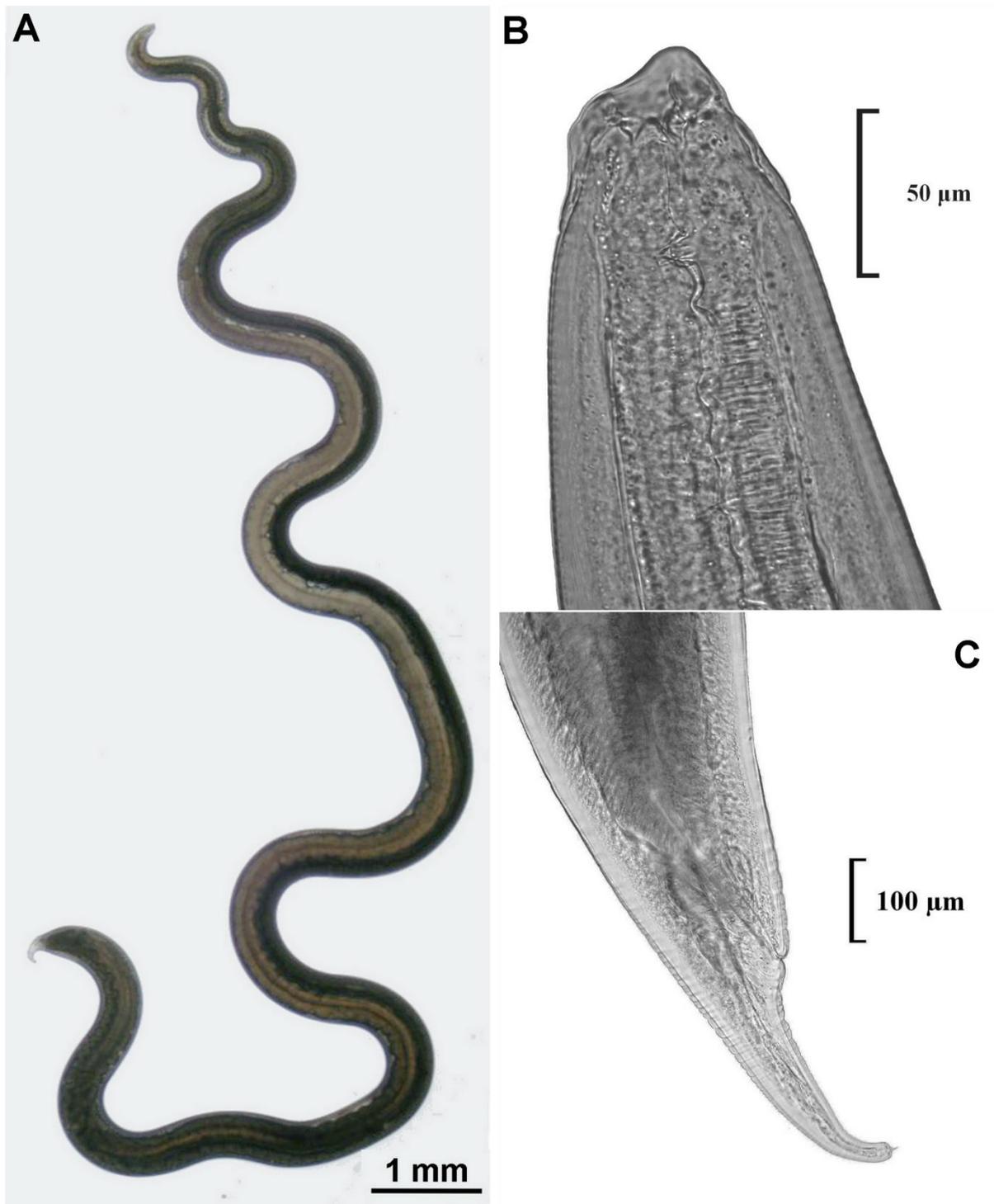


Figura 8.3 - *Lappetascaris* sp. Tipo A, larva L3 al microscopio ottico. **A** – esemplare in toto. **B** – porzione cefalica che evidenzia la struttura chitinoso di rivestimento degli abbozzi delle labbra; **C** – Porzione caudale con minuto aculeo terminale.

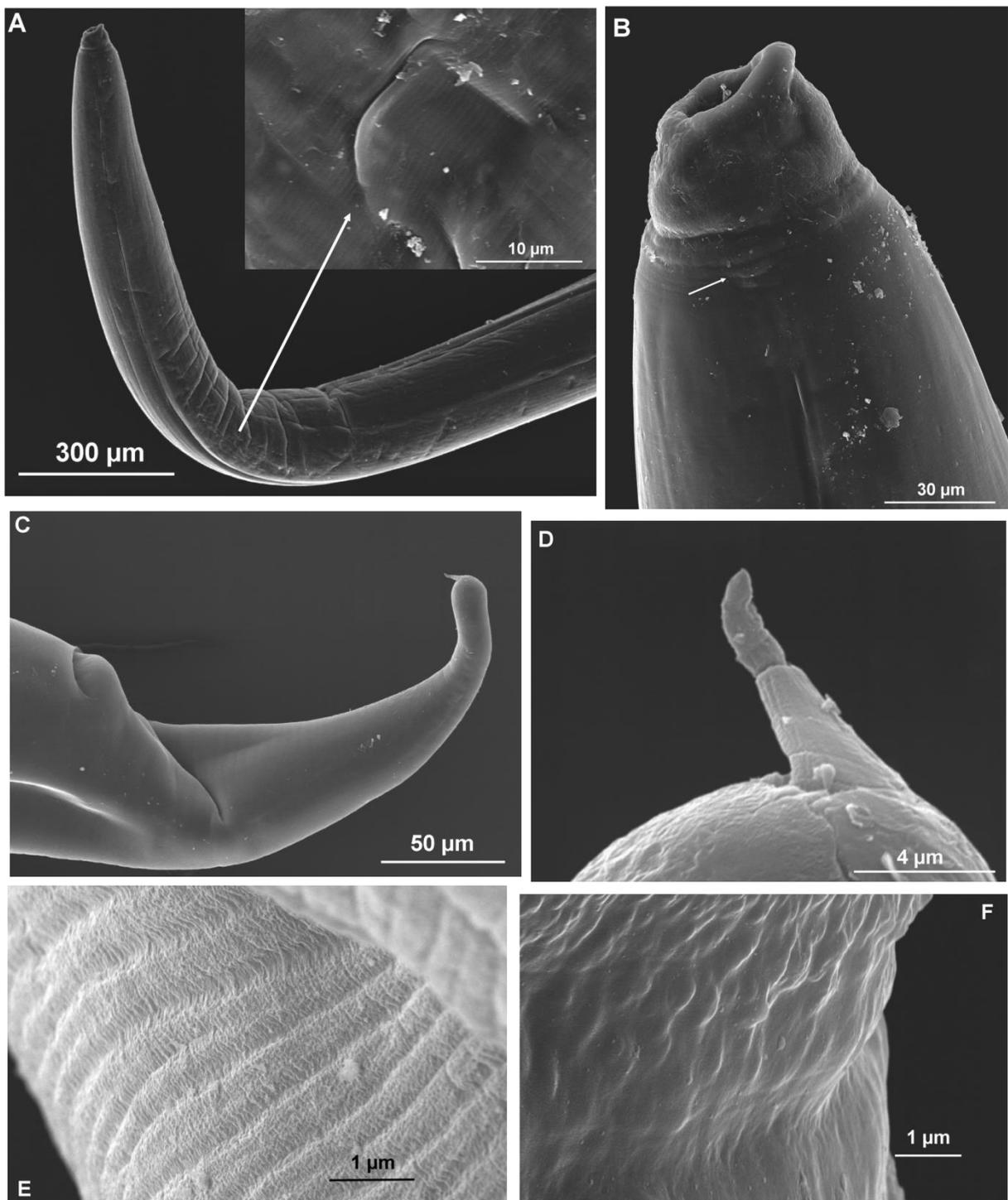


Figura 8.4 - *Lappetascaris* sp., immagini al SEM. **A** – porzione anteriore, con la posizione del poro escretore (nel riquadro); **B** – terminazione cefalica, si nota il cappuccio chitinoso che riveste interamente le labbra. La freccia indica i processi laterali in rilievo; **C** – porzione caudale conico-digitiforme. Si nota la lieve anulatura della cuticola; **D** – aculeo terminale che appare diviso in due articoli di circa 3 e 4 µm; **E** – anulatura della cuticola nella porzione mediana del corpo, a forte ingrandimento; **F** – superficie della cuticola, non anulata ma ruvida, in corrispondenza dell'estremità cefalica.

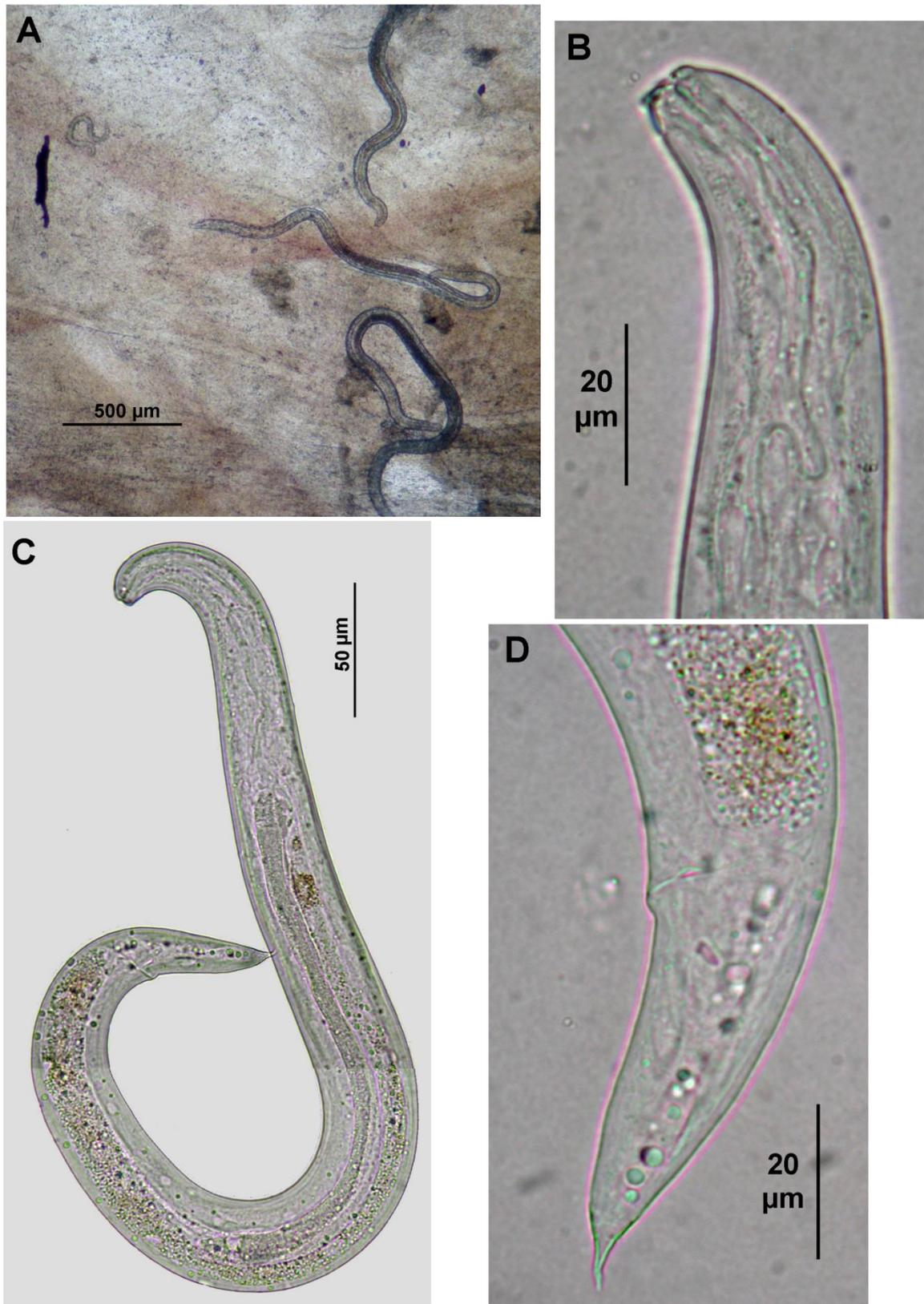


Figura 8.5 – Larve di *Lappetascaris* sp. Tipo B (sensu Nagasawa e Moravec, 2002). **A** – larve di diverse dimensioni nella mucosa gastrica di *I. coindetii*; **B** – esemplare in toto nel quale è visibile la lunga appendice ventricolare; **C** – estremità anteriore, visibile la capsula boccale tipica di *Lappetascaris*; **D** – estremità caudale con aculeo terminale.

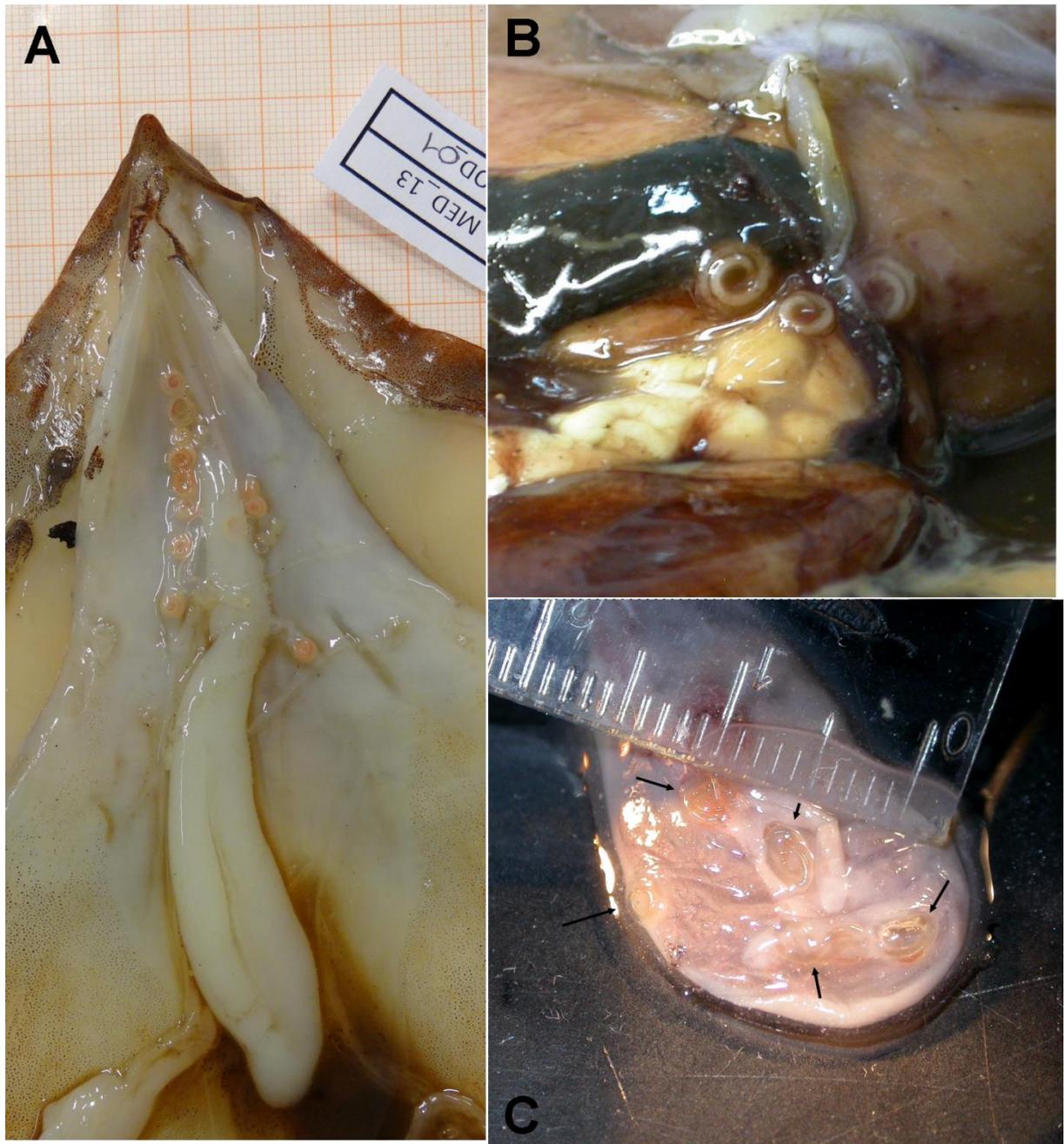


Figura 8.6 – Osservazioni macroscopiche di larve al terzo stadio di *Anisakis*. **A** – *Anisakis* Type 2 (= *A. physeteris*) in gonadi di *T. sagittatus*; **B** – *Anisakis* Type 2 in membrana intorno alla massa viscerale di *H. bonnellii*; **C** - *Anisakis* Type 1 (*A. pegreffii*) in parete gastrica di *I. coindetii*.

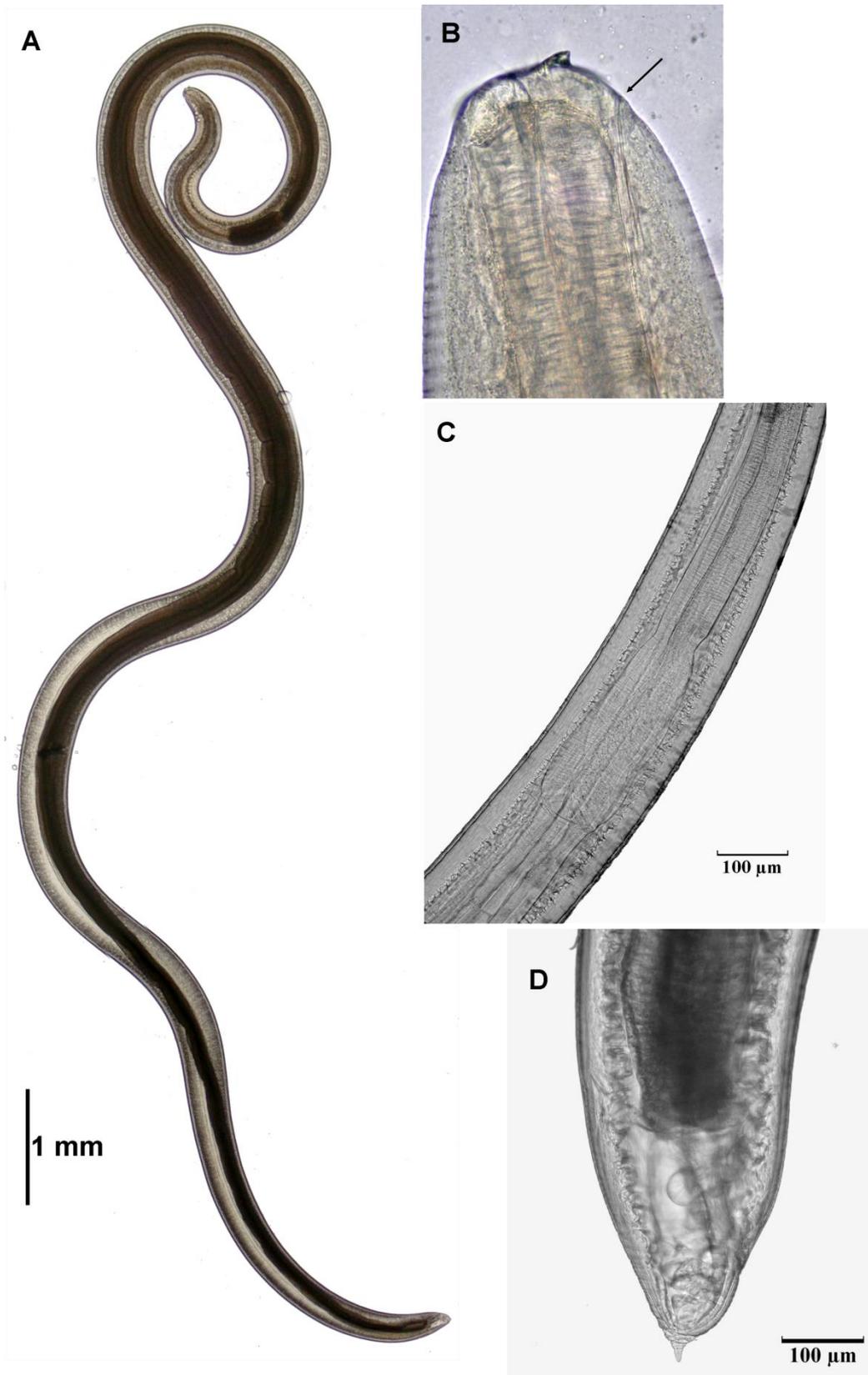


Figura 8.7 – *Anisakis* L3 Type 1, corrispondente alla specie *A. pegreffii*. **A** – esemplare *in toto*; **B** – estremità cefalica con poro escretore (freccia) e dente; **C** – ventricolo allungato; **D** – estremità caudale con mucron.

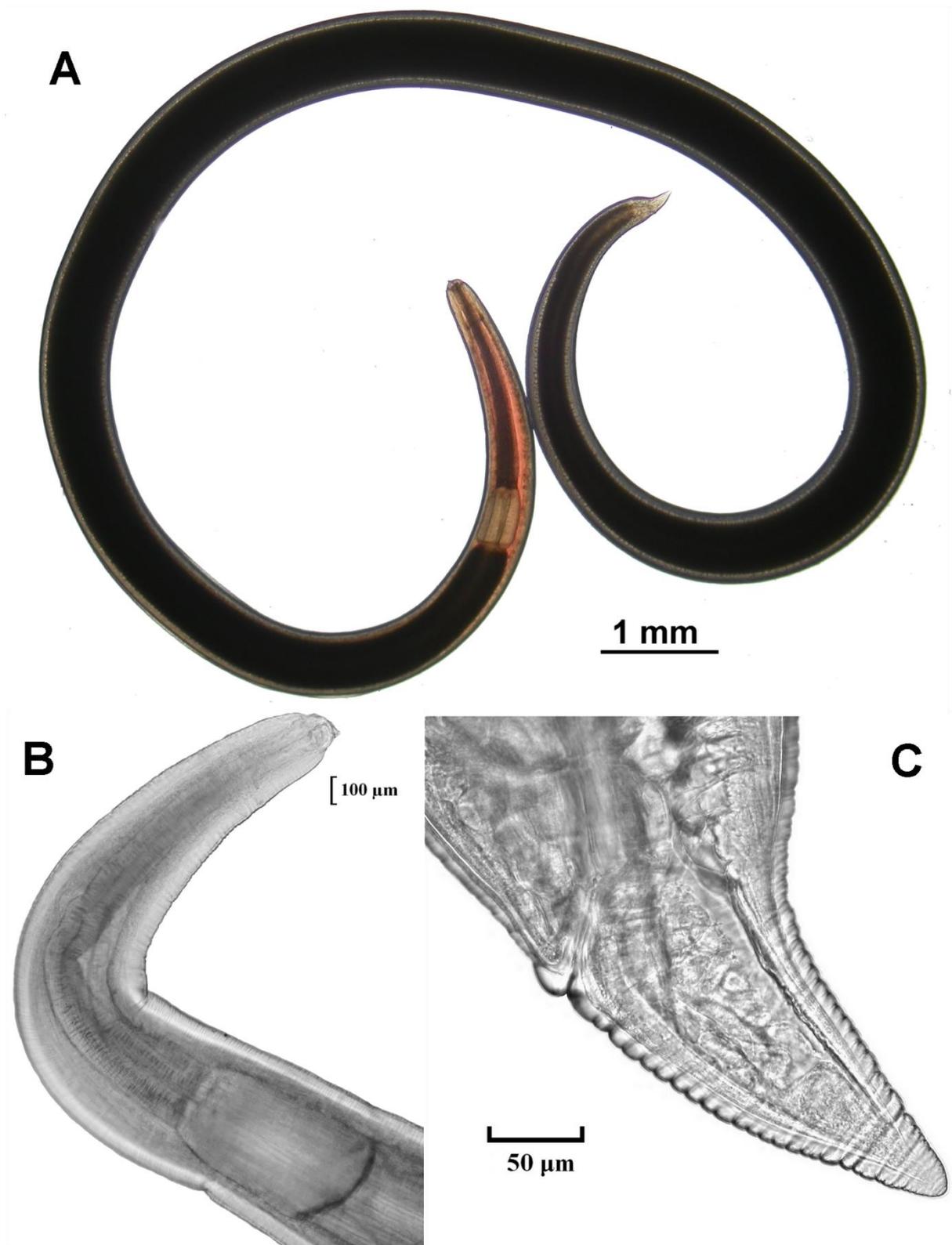


Figura 8.8 - *Anisakis* L3 Type 2, corrispondente alla specie *A. physeteris*. **A** – esemplare intero; **B** – porzione anteriore nella quale si distinguono il dente perforatore e il ventricolo corto; **C** – estremità caudale, si nota la forma conica e l'assenza di mucron.

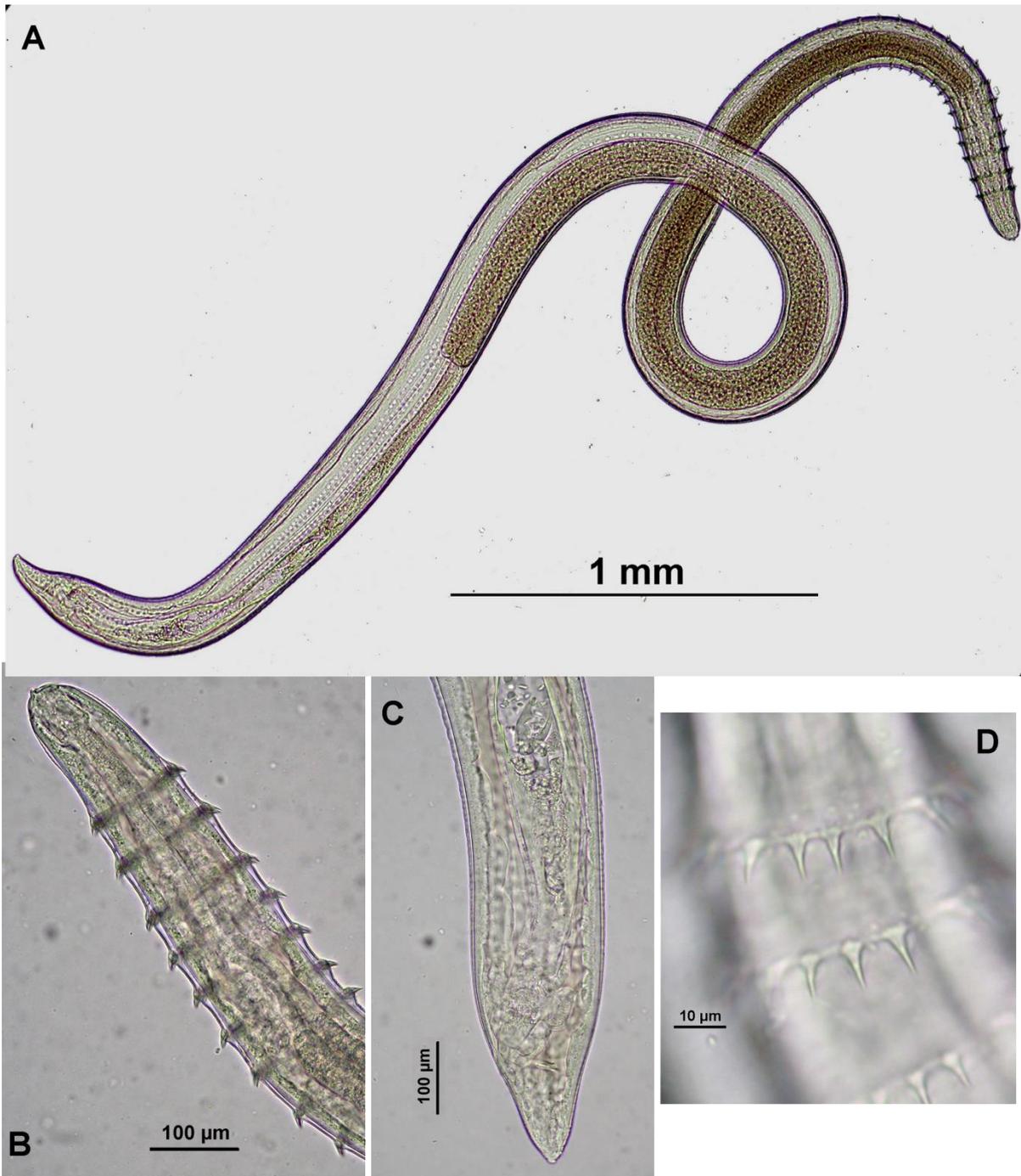


Figura 8.9 – *Spinitectus* sp., larva al terzo stadio: unico esemplare da stomaco di *I. coindetii*. **A** – la larva *in toto* nella quale si notano la lunghezza della parte ghiandolare del tratto digerente e gli abbozzi delle gonadi (follicoli circolari disposti in lunghe serie); **B** – porzione anteriore includente l'esofago; **C** – porzione caudale; **D** – dettaglio sugli aculei che compongono gli anelli cuticolari.

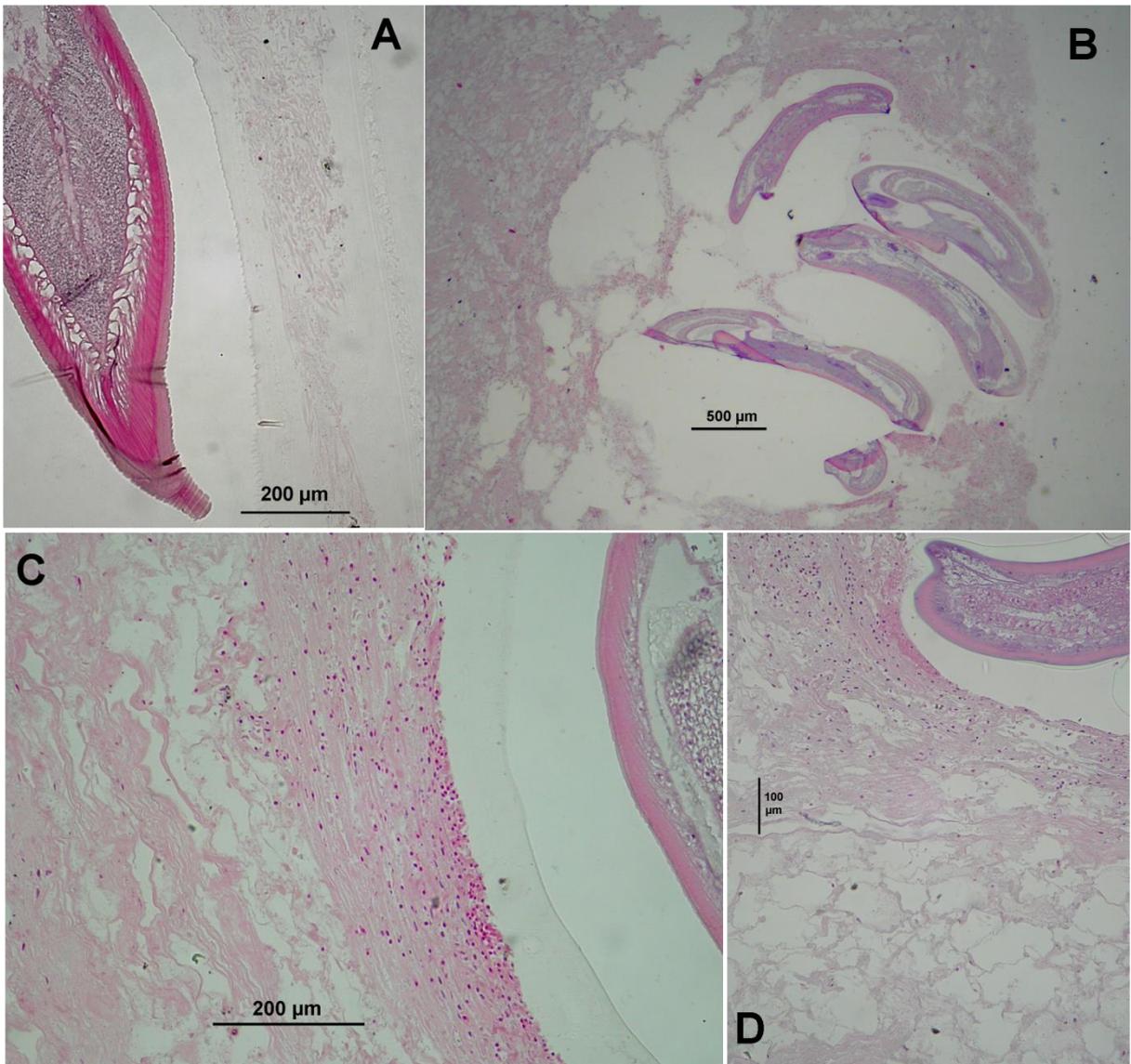


Figura 8.10 – Sezioni istologiche raffiguranti infezioni da anisakidi in cefalopodi. **A** – *A. physeteris* in *H. bonnellii*. Nell'immagine, ad alto contrasto, si nota la scarsa colorazione della capsula fibrosa intorno al verme, che ne indica la natura elastica; **B** – *Lappetascaris* sp. Tipo A in mantello di *H. bonnellii*. Si nota l'estensione della lesione e lo spazio occupato dalla resina che nella lesione *in vivo* contiene l'essudato infiammatorio; **C** – dettaglio sulla concentrazione di emociti crescente in prossimità della lesione e sulla disposizione concentrica di fibre esternamente al fenomeno infiammatorio; **D** – destrutturazione del tessuto muscolare in prossimità della lesione vera e propria.

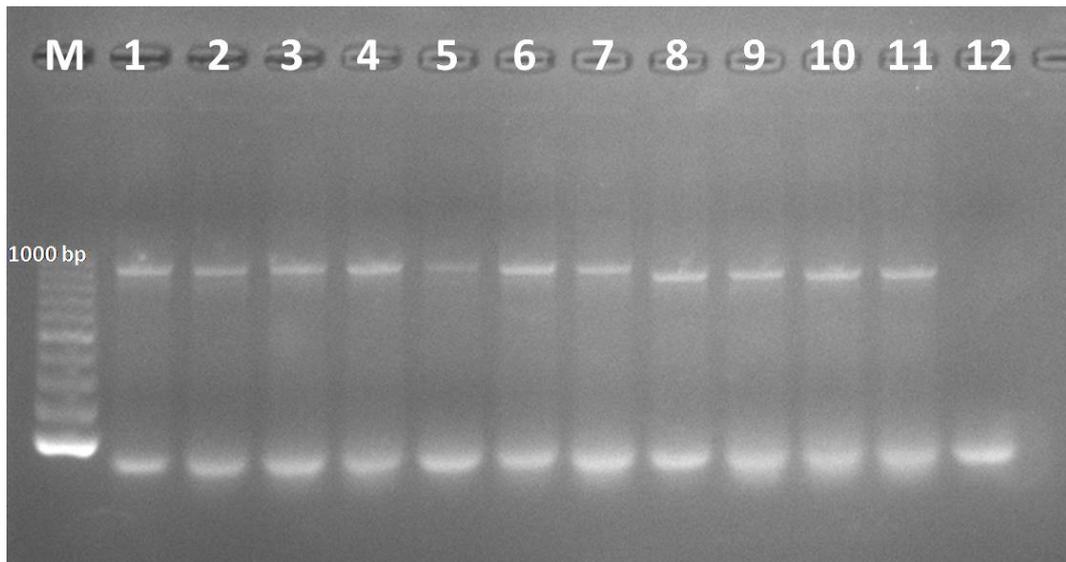


Figura 8.11 - PCR della regione ITS; M: Molecular weight marker; 1: controllo positivo; 12: controllo negativo (Foto M.C. Piras, 2014)

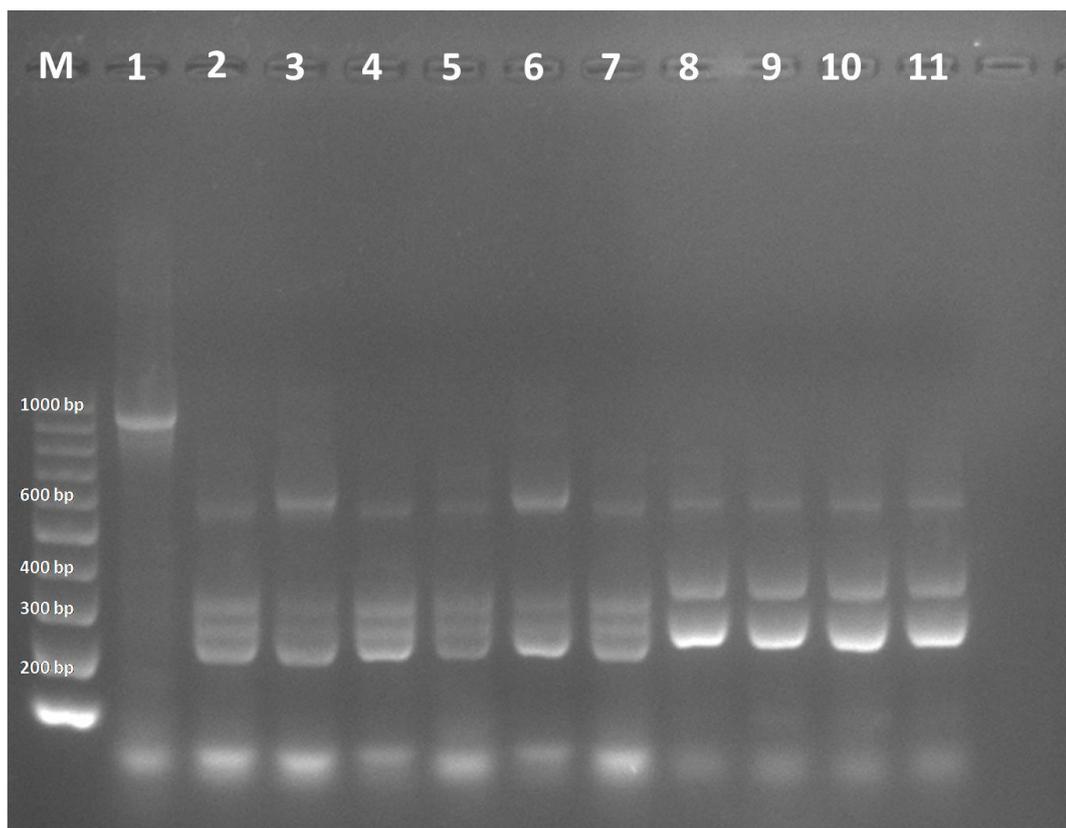


Figura 8.12 - RFLP patterns della regione ITS con l'enzima di restrizione Hinfi. M: Molecular weight marker; 1: Uncut; 2, 4, 5, 7, *A. pegreffii*; 8-11, *A. physeteris*; 3, 6, genotipo ibrido tra *A. pegreffii* e *A. simplex* (s.s.) (Foto M.C. Piras, 2014)

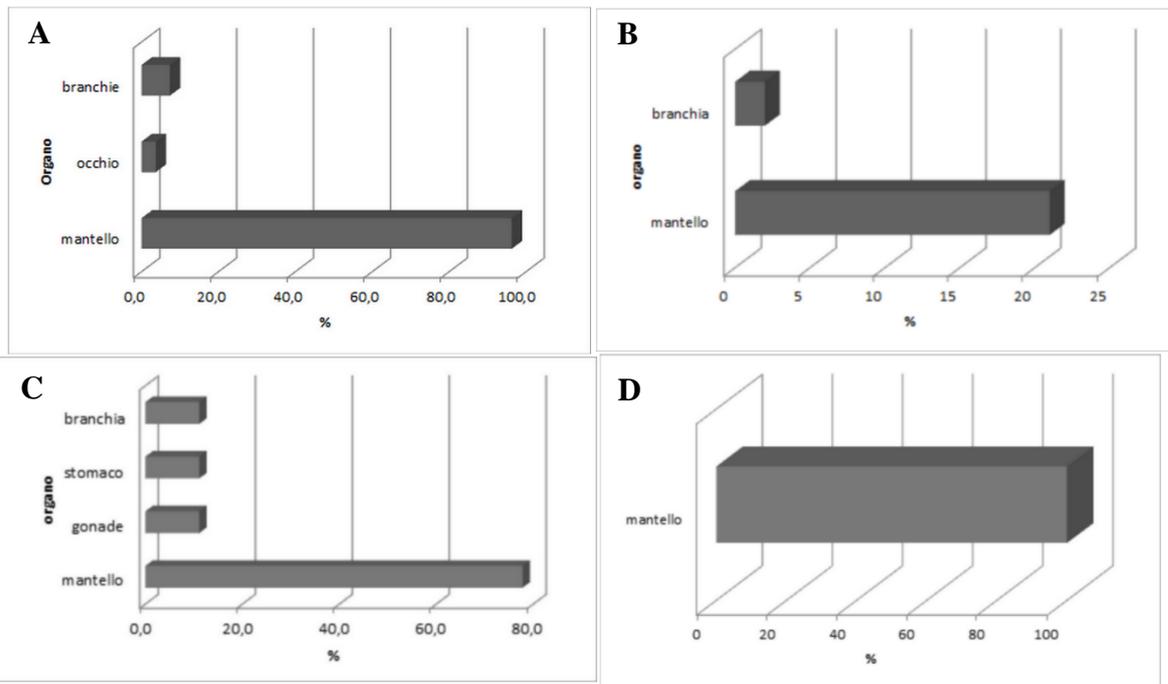


Figura 8.13 – *Lappetascaris* Tipo A. Specificità d'organo, in percentuale. **A** – in *H. bonnellii*; **B** – in *H. reversa*; **C** – in *T. sagittatus*; **D** – in *I. coindetii*.

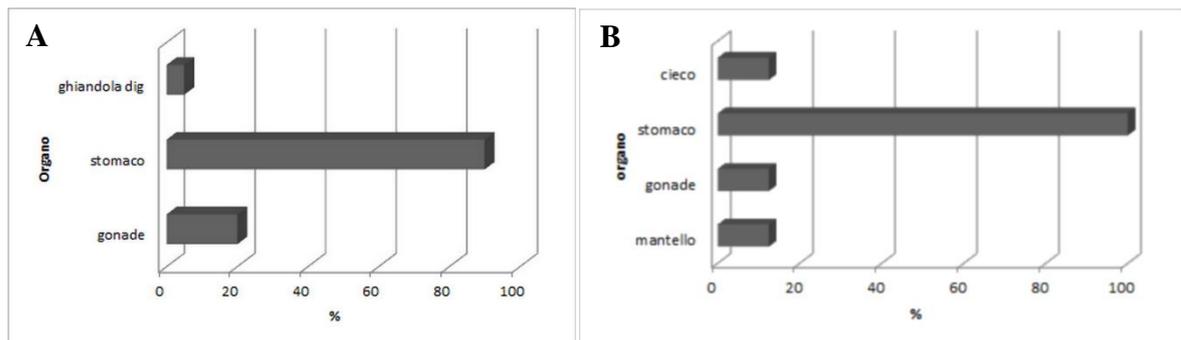


Figura 8.14 – *Anisakis pegreffii*. Specificità d'organo, in percentuale. **A** – in *I. coindetii*; **B** – in *T. sagittatus*.

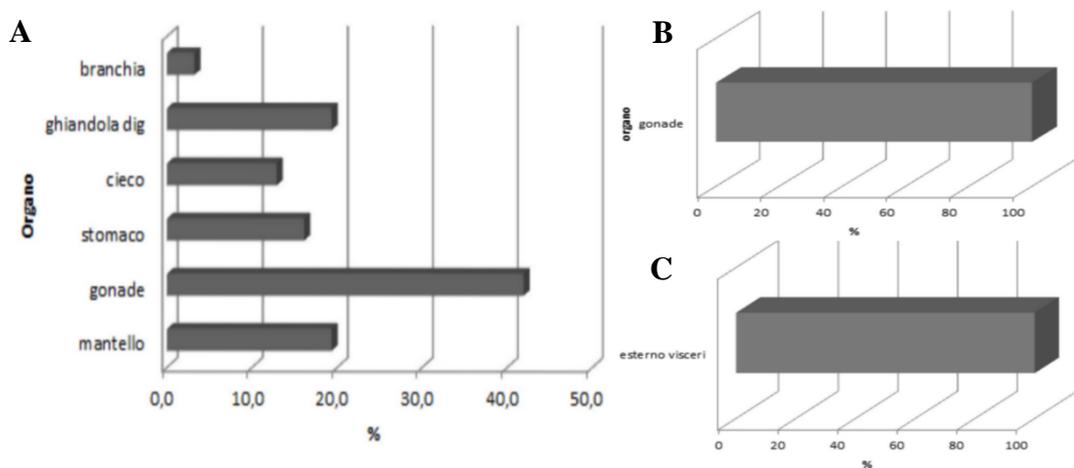


Figura 8.15 - *Anisakis physeteris*. Specificità d'organo, in percentuale. **A** – in *T. sagittatus*; **B** – in *I. coindetii* e *T. eblanae*; **C** – in *H. bonnellii*.

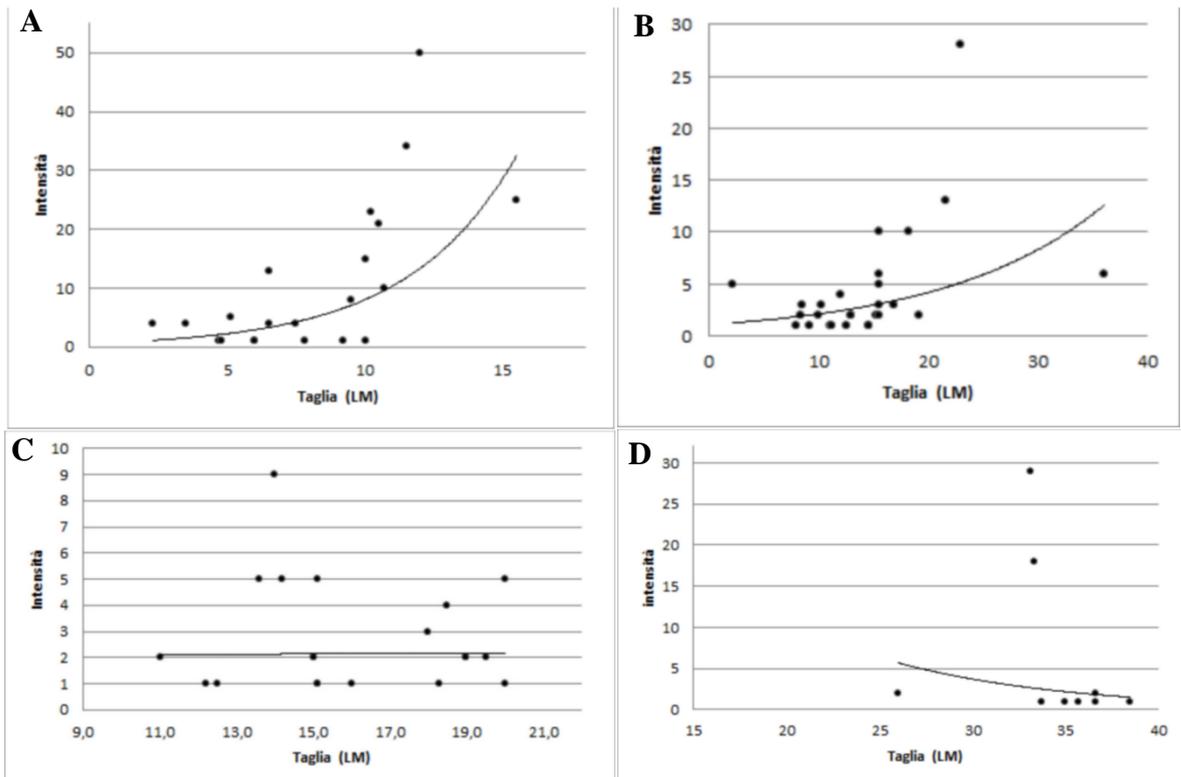


Figura 8.16 – *Lappetascaris* sp. Tipo A. Grafici a dispersione che confrontano l'intensità dell'infezione con la taglia dell'ospite. **A** – in *H. reversa*; **B** – in *H. bonnellii*; **C** – in *I. coindetii*; **D** – in *T. sagittatus*.

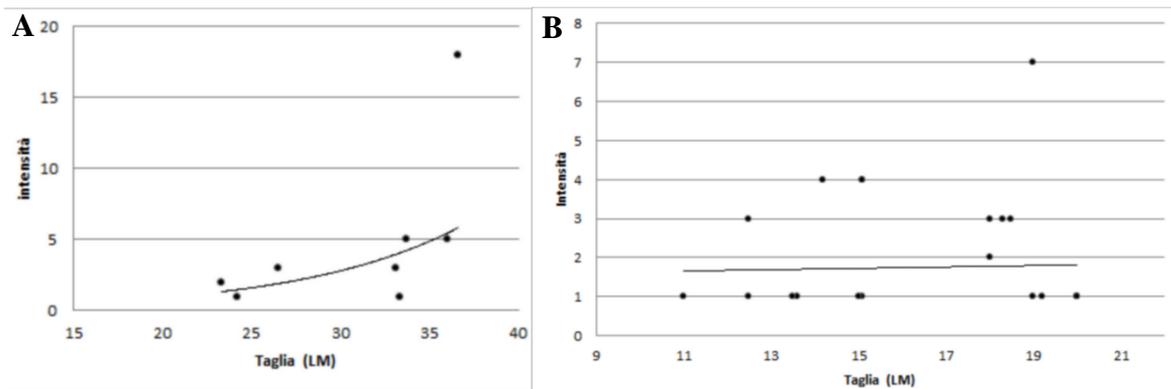


Figura 8.17 – *Anisakis pegreffii*. Grafici a dispersione che confrontano l'intensità dell'infezione con la taglia dell'ospite. **A** – in *T. sagittatus*; **B** – in *I. coindetii*.

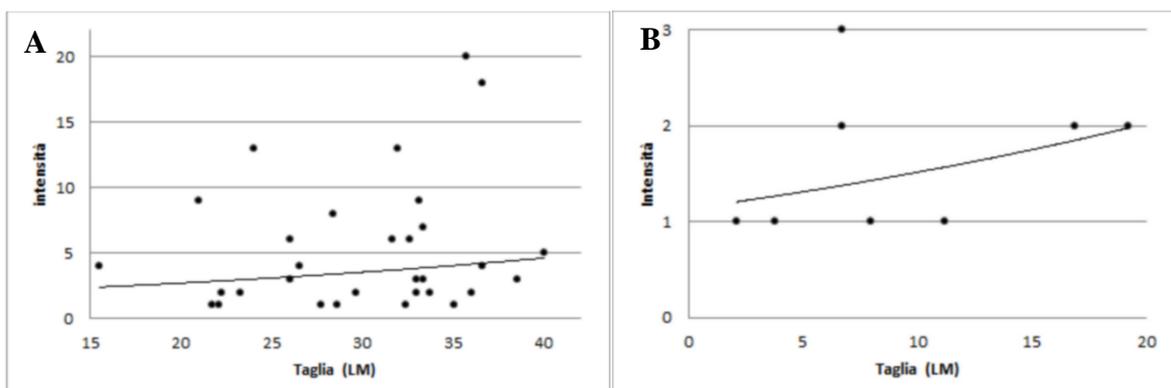


Figura 8.18 - *Anisakis physeteris*. Grafici a dispersione che confrontano l'intensità dell'infezione con la taglia dell'ospite. **A** – in *T. sagittatus*; **B** – in *H. bonnellii*.

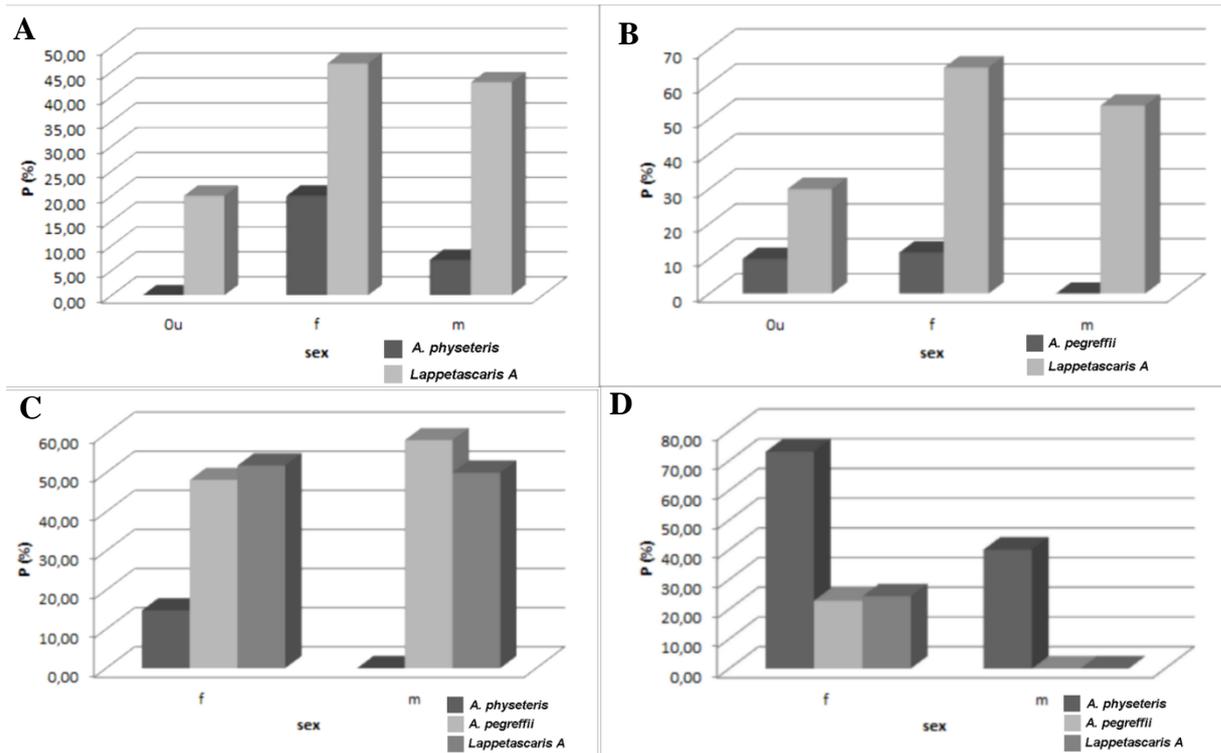


Figura 8.19 – Prevalenza delle infezioni da larve di Anisakidi per sesso dell'ospite. **A** – in *H. bonnellii*; **B** – in *H. reversa*; **C** – in *I. coindetii*; **D** – in *T. sagittatus*.

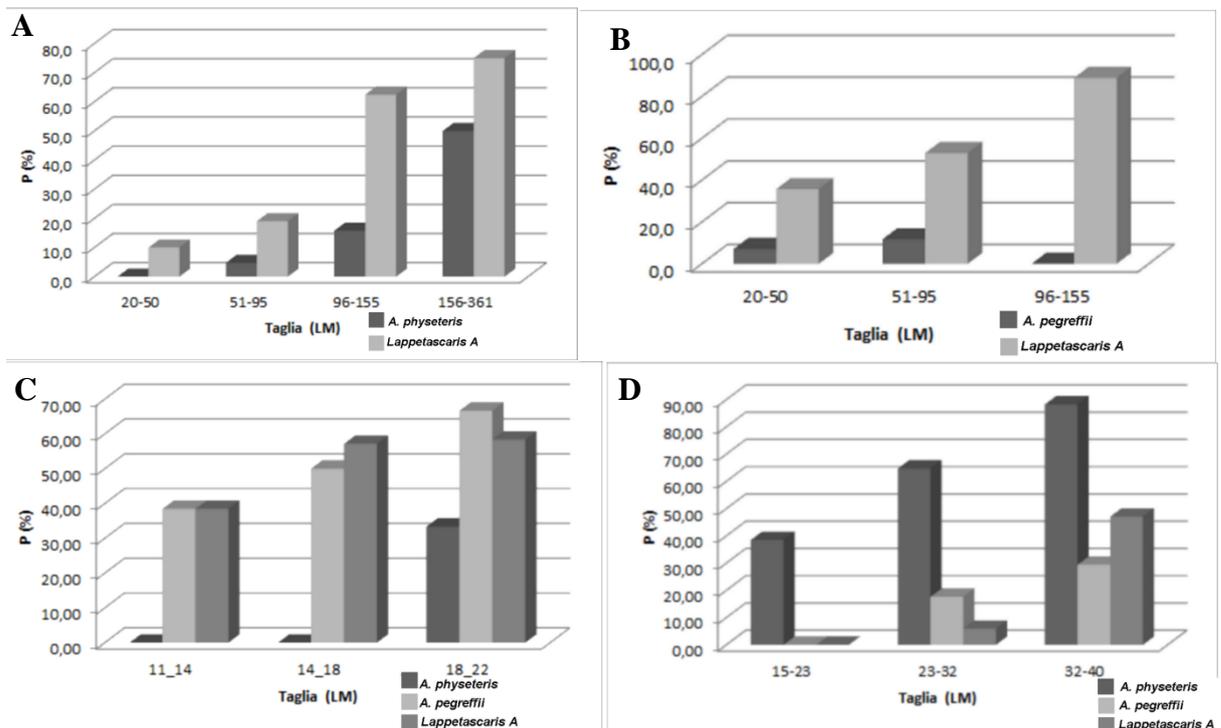


Figura 8.20 – Prevalenza delle infezioni da larve Anisakidi per classe di taglia dell'ospite. **A** – in *H. bonnellii*; **B** – in *H. reversa*; **C** – in *I. coindetii*; **D** – in *T. sagittatus*.

9. STADI LARVALI DI PLATELMINTI PARASSITI DEI CEFALOPODI NELLE ACQUE CIRCOSTANTI LA SARDEGNA

9.1 Introduzione

La centralità dei cefalopodi nelle reti trofiche li rende particolarmente adatti come ospiti intermedi di parassiti appartenenti al phylum Platyhelminthes. Più esattamente svolgono il ruolo di secondo ospite, ponendosi tra il primo ospite, che è una loro preda, e quello definitivo, che solitamente è un pesce osseo o cartilagineo predatore di cefalopodi (Gonzalez et al., 2003). Come si verifica per i nematodi anisakidi, anche per alcuni stadi di cestodi possono essere ospiti di trasporto o paratenici. In nessun caso svolgono il ruolo di primo ospite, mentre soltanto un ridottissimo numero di cestodi o digenei si ritrovano nei molluschi allo stadio adulto (Hochberg, 1983, 1990; Ovestreet & Hochberg, 1975; Reimer, 1971).

Tra i cestodi parassiti dei cefalopodi in acque mediterranee ed europee si possono annoverare stadi larvali appartenenti agli ordini Tetraphyllidea e Trypanorhyncha (Stunkard, 1977). Queste tenie, che allo stadio adulto si ritrovano in elasmobranchi, hanno cicli biologici poco conosciuti, principalmente perché la morfologia larvale e quella adulta presentano marcate differenze in particolare nella struttura dello scolice (Caira & Reyda, 2005; Jensen & Bullard, 2010). Per lo stesso motivo, anche attribuire le stesse forme larvali a taxa specifici, generici o anche familiari è sempre stato problematico, tanto che è spesso usata la pratica comune di utilizzare un nome specifico per un gruppo collettivo che non può essere inserito in livelli precisi (International Commission on Zoological Nomenclature, 1999). È questo il caso di *Scolex pleuronectis* Müller, 1788, nome che identifica le larve di Tetraphyllidea con lo scolice portante una ventosa apicale e 4 acetabula settati o interi, che vengono riportate in numerosissimi pesci e molluschi a livello globale (es. Caira, 1976; Chambers et al., 2000; Hochberg, 1990)

I cestodi dell'ordine Trypanorhyncha, invece, sono più frequentemente identificabili anche negli stadi preadulti poiché sviluppano caratteristiche distintive soprattutto nei tentacoli uncinati che si trovano sul loro scolice (Schmidt, 1986).

Nei cefalopodi del Mar Mediterraneo, Petric et al. (2011) hanno osservato il Tetrphyllidea *Phyllobothrium* sp. in *Illex coindetii* dell'Adriatico; l'altra unica segnalazione di questi plerocercoidi dello stesso ordine è stata fatta nell'ambito del presente studio, in Histioteuthidae (Culurgioni et al., 2012). In acque europee, anche altri Phyllobothridae come *Pelichnibothrium speciosum* e *Dinobothrium* sp. sono riportati in *Illex illecebrosus*, *O. vulgaris*, *Sepia* spp., *L. vulgaris*, *T. sagittatus*, (Dawe et al., 1984; Pascual et al., 1995a, 1996a, 1996b, 1996c). Qui in aggiunta, in *I. coindetii*, e *T. eblanae*, sono stati osservati Trypanorhyncha come *Nibelynia lingualis* e *N. yamagutii*.

Tra i Digenea, solo alcune famiglie infettano i cefalopodi, e quasi esclusivamente allo stadio larvale di metacercaria e pochissimi adulti (Overstreet & Hochberg, 1975). Gli stessi autori propogono un riepilogo dei report di digenei nei cefalopodi, dal quale si segnalano i più datati riconducibili a studi effettuati in Mediterraneo, riguardanti Hemiuridae in *Sepia officinalis* (Vaullegeard, 1896; Dollfus, 1958); *Lepocreadium album* in *Chiroteuthis veranyi* (Dollfus, 1958; Rebecq, 1965); Accacoelidae in *Argonauta argo* (Kolliker, 1849; Moulinié, 1856; Monticelli, 1893; Looss, 1902); Opecoelidae in *Octopus vulgaris* (Delle Chiaje, 1822, 1829, 1841).

Nel complesso, per numero di segnalazioni, la famiglia di digenei più rappresentata nei cefalopodi è senz'altro quella dei Didymozoidae, le cui forme larvali sono riportate ad esempio in *Sthenoteuthis oualaniensis* dell'Oceano Indiano (Naidenova et al., 1985, insieme con *Hirundinella ventricosa*, Hirundinellidae) e in *Illex argentinus* in Atlantico meridionale (Vidal & Haimovici, 1999) e dagli stessi Overstreet & Hochberg (1975). Riguardo al

Mediterraneo, Hochberg (1990) riporta personali osservazioni in *Todaropsis eblanae* e quelle di Dollfus (1971) in *Illex coindetii*.

I cicli biologici di questa particolarissima famiglia di digenei, che si svolgono in 3 o 4 ospiti diversi sono in gran parte sconosciuti (Nikolaeva, 1985). Gli ospiti definitivi sono grandi predatori pelagici come gli scombridi, incluso il tonno rosso e altre specie dell'Atlantico e del Mediterraneo (Culurgioni et al., 2014; Mele et al., 2010b, 2012; Mladineo, 2006b; Rodríguez-Marín et al., 2008), dei quali infestano praticamente tutti gli organi, incluse le branchie. Essi si presentano spesso incistati o incapsulati a coppie, inoltre si osservano spesso forme complesse e frequenti tratti di dimorfismo sessuale (Pozdnyakov & Gibson, 2008; Yamaguti 1958, 1970). Le forme giovanili invece hanno una morfologia uniforme notevolmente differente da quella degli adulti, tanto da meritare studi dedicati e chiavi dicotomiche peculiari che però sono in frequente riarrangiamento, i cui oggetti sono “tipi strutturali” da non confondersi con nomi di genere (Kurochkin & Nikolaeva, 1978; Pozdnyakov, 1990; Pozdnyakov & Gibson, 2008). Nella letteratura sopra citata le forme più osservate sono quelle valide nel momento di esecuzione di ciascuno studio, praticamente in ogni caso sono definite come *Monilicaecum* e/o *Torticaecum* ma più spesso vengono indicate genericamente come forme larvali di didimozoidi (Cespedes et al. 2011).

9.2 Materiali e Metodi

Nel Capitolo 4 sono già descritte le procedure generali con le quali tutti i campioni sono stati ottenuti ed esaminati parassitologicamente. Relativamente al lavoro dedicato ai plattelminti, è da considerarsi la procedura riguardante la microscopia ottica.

Le larve, una volta estratte dagli ospiti mediante gli strumenti più delicati a disposizione, sono state esaminate a fresco per rendere maggiormente visibili caratteri di importanza tassonomica. Nel caso dei cestodi sono particolarmente importanti le strutture presenti nello

scolice (numero e forma delle ventose, eventuale presenza di appendici uncinata); nel caso dei digenei didimozoidi la presenza o assenza della ventosa ventrale, del faringe, dello “stomaco”, di cellule ghiandolari intorno al tratto digerente, la conformazione dei ciechi intestinali.

Alcuni esemplari sono stati colorati con carminio acetico con l'intento di evidenziarne le (poche) caratteristiche morfologiche interne.

9.3 Risultati

Tra i cestodi, la forma più frequentemente osservata è quella delle larve plerocercoidi di Tetrphyllidea riconducibili alla tipologia collettiva *Scolex pleuronectis* (Fig. 9.1A-D) che sono state osservate libere nel lume del tratto digerente (stomaco e intestino) o debolmente incistate nella mucosa di sei specie delle 15 esaminate: due Octopoda (*O. vulgaris* e *P. tetracirrhus*) e quattro Oegopsida (Tab. 6.4). I valori di prevalenza più rilevanti si sono osservati nelle due specie di totani *T. sagittatus* (P = 29,8%) e *I. coindetii* (P = 23,1%), con intensità contenute nei valori medi senza variazioni relative alla taglia dell'ospite (Fig. 9.3, 9.4) ma che hanno raggiunto valori massimi di 25 larve in un totano viola di grosse dimensioni. In un solo caso nello stomaco di *H. bonnellii* è stata individuata una larva di diversa tipologia (Plerocercoidi-2) e di dimensioni ragguardevoli rispetto alle precedenti (Fig. 9.1F), nella quale risultava visibile la sola ventosa terminale in quanto il resto degli apparati dello scolice erano ancora invaginati in una tasca non evertibile.

Alcuni casi di infezione da plerocercoidi Trypanorhyncha del genere *Nybelinia* sp. (Tentaculariidae) (Fig. 9.1E) sono stati osservati esclusivamente in *T. sagittatus* (P = 6,4%, I = 1-3). Queste larve si trovavano incistate nella parete gastrica tra la mucosa e lo strato muscolare, ed è stato possibile individuarle macroscopicamente grazie al fatto che si trovavano all'interno di cisti connettivali di circa 3 mm di lunghezza e 2 mm di larghezza.

Le metacercarie della famiglia Didymozoidae, presenti esclusivamente in 6 specie dell'ordine Oegopsida, sono state estratte dal tratto digerente dove si trovavano debolmente associate alla mucosa, e in rarissimi casi dai filamenti branchiali. La forma più frequentemente incontrata è *Neomonilicaecum* (Fig. 9.2D,E), presente negli Histioteuthidae, in *T. eblanae*, e con gli indici statistici più alti in *I. coindetii* (P = 17,9%; IM = 6,4)(Fig. 9.2A). La forma *Allomonilicaecum* (Fig. 9.2B) è stata rilevata solamente in *T. sagittatus* e *A. lichtensteini*, mentre in *H. bonnellii* è stato osservato un unico esemplare riconducibile alla forma *Torticaecum* (Fig. 9.2C).

L'unico ritrovamento riguardante Digenea diversi dai Didymozoidae riguarda 26 forme immature di *Derogenes varicus* (Fig. 9.2) nello stomaco di un *Eledone cirrhosa* (P = 2,6%).

9.4 Discussione

Nel presente capitolo sono state riportate tutte le forme larvali di plattelminti rinvenute durante la ricerca parassitologica sui cefalopodi delle acque intorno alla Sardegna, con l'intento di applicare, a livello preliminare, una diversificazione morfologica sulla base di diverse chiavi disponibili e di alcune descrizioni presenti in letteratura (es. Grabda, 1991; Kurochkin & Nikolaeva, 1978; Pozdnyakov & Gibson, 2008; Stunkard, 1977; Palm, 1999; Rodriguez-Ibarra et al., 2011; Vidal-Martinez et al., 2012).

Le larve di cestodi che sono state attribuite al complesso *S. pleuronectis* sono caratterizzate nello scolice da una ventosa apicale e da 4 botrie, ciascuna delle quali cioè appare suddivisa da un setto mediano e per questo sembra biloculare. Questa tipologia è anche la stessa delle larve riportate come *Ceratobothrium xanthocephalus* Monticelli, 1892 nella review di Stunkard (1977), il quale invece riporta *S. pleuronectis* con botrie non divise da setti, quindi uniloculari. Tuttavia la denominazione *S. pleuronectis* è qui ritenuta più opportuna, in conseguenza delle considerazioni di Agustì et al. (2005) secondo cui i bottridi appaiono biloculari ma in realtà sono uniloculari e dotati di una ventosa accessoria unita al bottride

superiormente ma separata interamente da una membrana. Secondo gli stessi autori questa caratteristica è descrivibile solo sulla base di osservazioni istologiche e in mancanza di queste si preferisce la denominazione più generalista possibile, che indica la possibilità che il nome *S. pleuronectis* includa diverse specie. Nel presente lavoro non sono mai stati osservati botridi multiloculari e dai bordi irregolari, quindi non si ritiene di attribuire alcun ritrovamento al genere *Phyllobothrium*, uno dei più frequentemente segnalati in cefalopodi (Hochberg, 1990, Pascual et al., 1996a, Petric et al., 2011; Williams, 1968). Tuttavia, è possibile che stadi molto precoci di questo genere presentino botridi uni- o biloculari (Agustì et al., 2005). Confrontando i presenti ritrovamenti con le descrizioni di Chambers et al. (2000), lo stesso tipo di scolice è riportato come “type 8 metacestode”, mentre la morfologia apprezzabile nell'esemplare segnalato come Pleroceroide 2 in *H. bonnellii* è simile al “type 5 metacestode”, caratterizzato da botridi invaginati, non visibili esternamente.

I Tetrphyllidea concludono il loro ciclo diventando adulti nello stomaco o nell'intestino di diversi selaci. Al di là delle dirette segnalazioni parassita-ospite, nessun ciclo biologico è stato esattamente ricostruito, così come la specifica identità tra larve ed adulti (Agustì et al., 2005; Caira & Reyda, 2005). Vi sono però accurate descrizioni della presenza di plerocercoidi e merocercoidi (forme successive) in cetacei, soprattutto delfinidi, che contraggono le larve predando pesci e cefalopodi infetti e fungono quindi da terzo ospite intermedio o ospite paratenico. Questi parassiti si localizzano nelle viscere, nel peritoneo, e nella zona rettale-genitale dei mammiferi in quanto sono le zone che con più alta probabilità vengono colpite dai morsi dei grandi squali predatori, come lo squalo bianco, e di specie che si nutrono delle carcasse (Agustì et al., 2005; Aznar et al., 2007; Gazzonis et al., 2012).

Numerose specie non descritte o non determinate di *Nybelinia* sono state descritte in cefalopodi in diversi oceani e nel Mediterraneo (Dollfus, 1958; Hochberg, 1990; Naidenova et al., 1985). Le specie *Nybelinia bisulcata* e *N. lingualis* sono riportate in *Illex illecebrosus* e

Loligo pealeii in Atlantico da Stunkard (1977) e in *T. eblanae* in Atlantico nord orientale da Pascual et al. (1996c). In altri oceani sono osservati anche *Tentacularia coryphaenae* e *Hepatoxylon trichiuri* (Naidenova et al., 1985; Nigmatullin and Shukhgalter, 1990; Pardo-Gandarillas et al., 2009; Sardella et al., 1990; Shukhgalter & Nigmatullin, 2001).

Gli esemplari reperiti nel presente studio in *T. sagittatus* richiedono esami morfologici più approfonditi a livello dei tentacoli uncinati per poter essere determinati a livello specifico. Pur essendo pochi i casi osservati, gli indici epidemiologici di questa infezione suggeriscono una maggiore incidenza di *Nybelinia* con l'aumento della taglia dell'ospite, e l'assenza del parassita in individui di lunghezza inferiore a 23 cm potrebbe indicare che il suo primo ospite intermedio (o altri ospiti paratenici) entra a far parte della dieta del totano a partire da quella taglia (Fig. 9.4). Il ciclo dei tentacularidi si conclude generalmente nei Selaci (Schmidt, 1986; Stunkard, 1977), come è confermato anche dalle osservazioni personali in seguito agli esami parassitologici svolti su esemplari delle specie *Dalatias licha*, *Hexanchus griseus*, *Scyliorhinus canicula*, *Dipturus oxyrinchus*, provenienti dalle stesse zone di pesca dei cefalopodi (Cale Medits) e dei quali i cefalopodi costituiscono una parte della dieta (Mulas et al., 2011).

I digenei adulti della specie *D. varicus*, una delle più diffuse a livello planetario sono molto generalisti e si trovano in decine di specie ittiche (Hochberg, 1990; Kjøie, 1979). Le specie di cefalopodi coinvolte sono sicuramente di meno (es. *Sepia officinalis*, *Loligo gahi*), ma non si tratta di osservazioni rare (Brickle et al., 2001; Overstreet & Hochberg, 1975). Il fatto che gli esemplari osservati fossero adulti immaturi (privi di uova) è analogo a quanto riportato da Dollfus (1958) che trovò digenei immaturi non identificati in *E. cirrhosa* della Francia meridionale, e potrebbe significare che questo ottopode non è un ospite definitivo particolarmente adatto per i digenei in generale o per *D. varicus*.

Le larve didimozoidi del tipo *Neomonilicaecum* Kurochkin & Nikolaeva 1978 sono riconoscibili per avere ventosa orale e faringe presenti, un organo simile ad uno stomaco (“Drüsenmagen”) tra l’esofago ed i ciechi, e questi ultimi suddivisi in camere contigue.

La tipologia *Allomonilicaecum* Pozdnyakov 1996 si distingue dalla precedente per la forma del corpo più allungata e per la maggiore presenza di cellule ghiandolari nel parenchima.

La larva del tipo *Torticaecum* Yamaguti 1942, rispetto ai tipi *Monilicaecum*, è caratterizzata dall’ assenza di “Drüsenmagen”, esofago privo di cellule ghiandolari, ciechi intestinali non nettamente distinti in camere.

Nella specie *I. coindetii*, la prevalenza delle infezioni da larve di Didymozoidae aumenta al crescere della classe di taglia, ma il numero di questi parassiti individuati è tendenzialmente inferiore negli ospiti di dimensioni maggiori (Fig. 9.3A,C). Ciò potrebbe essere dovuto ad una più efficace risposta immunitaria dei totani più maturi, capace di neutralizzare una proporzione di didimozoidi maggiore rispetto agli ospiti più giovani.

Il fatto che nei tetrafillidei e nei didimozoidi gli stadi larvali non mostrano, se non in rari casi, le caratteristiche morfologiche distintive degli adulti rappresenta un notevole elemento di difficoltà rispetto all’identificazione dei parassiti, che determina sempre più spesso la necessità di ricorrere a strumenti di biologia molecolare e/o di microscopia più raffinata che consenta di approfondire le descrizioni e rendere più chiara la situazione tassonomica (Castellanos-Martínez & Gestal, 2013; Jensen & Bullard, 2010).

Durante il periodo di dottorato, in una linea di ricerca seguita parallelamente a quella oggetto della presente tesi e tuttora attiva (Culurgioni, Mele et al., 2014), si è avuto modo di individuare numerose specie di Didymozoidae adulti in tonni rossi (*Thunnus thynnus*), e di constatare le radicali differenze non solo tra parassiti adulti e larvali, ma anche tra questi ultimi e i tipi morfologici postlarvali che spesso sono presenti nei tonni. A questo proposito, per quanto riguarda le larve di Didymozoidae questo lavoro vuole rappresentare il punto di

inizio della fase morfologico descrittiva di un più ampio progetto, comprendente anche l'aspetto genetico-molecolare, che possa rispondere alla necessità di chiarezza sulla tassonomia e sulla presenza nel Mar Mediterraneo di questa complessa famiglia di digenei che coinvolge in modo particolare i cefalopodi e gli Scombridae.

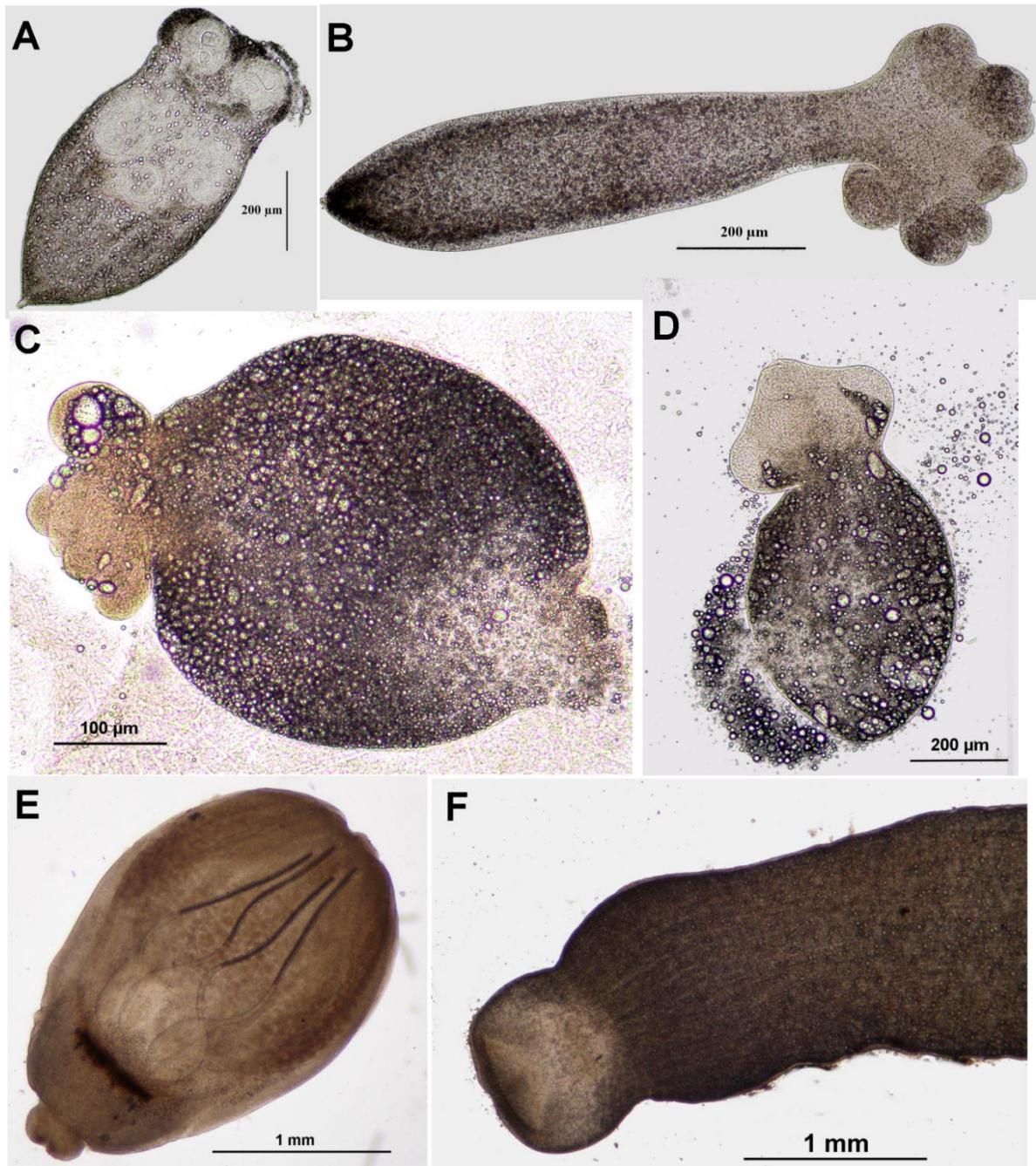


Figura 9.1 – Stadi larvali di cestodi in Cefalopodi. **A, B** – da *H. bonnellii*; **C** – da *O. vulgaris*; **D** – da *I. coindetii*; **E** – *Nybelinia* sp. (Trypanorhyncha) da *T. sagittatus*; **F** – da *H. bonnellii*

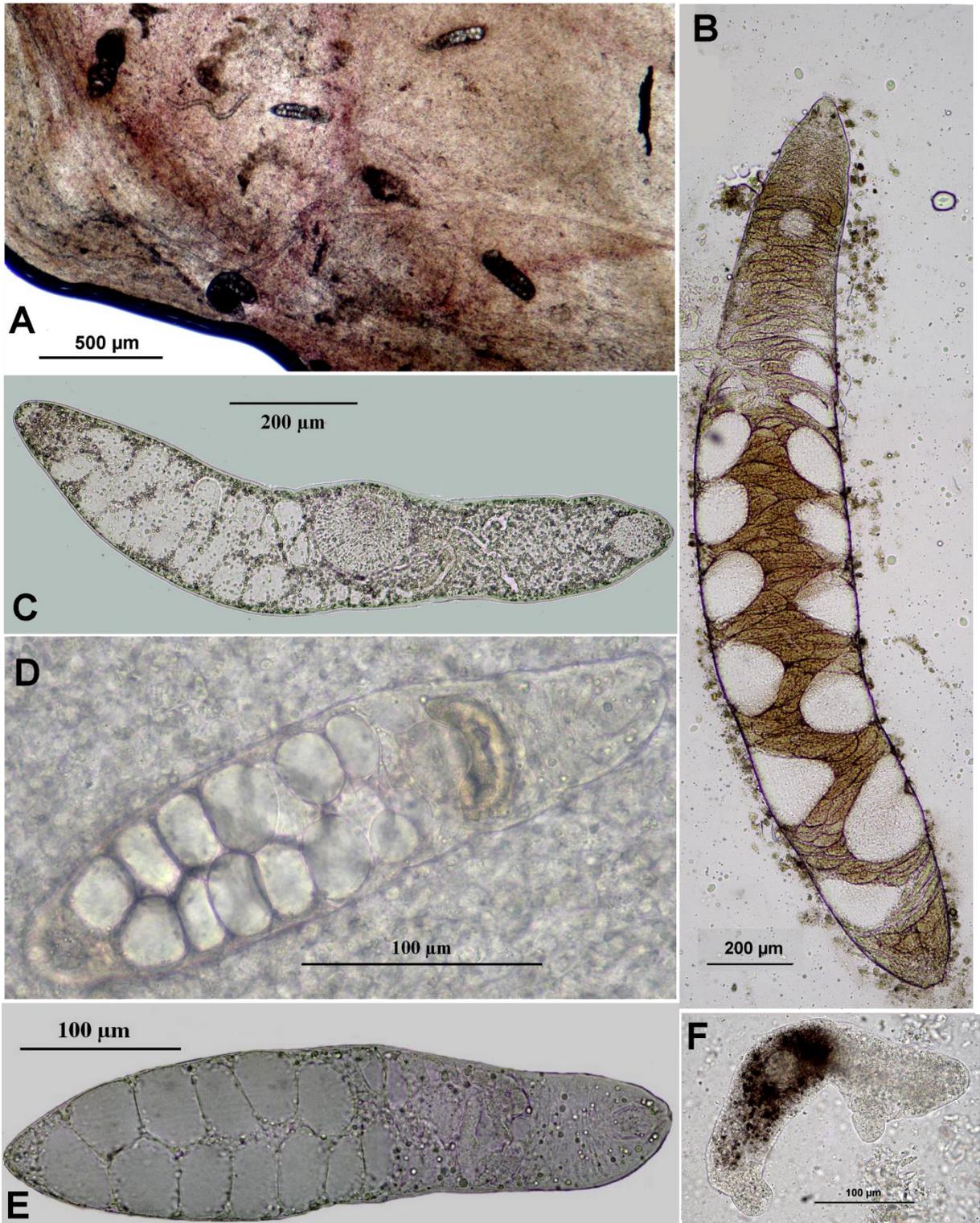


Figura 9.2 – Stadi larvali di Digenea in Cefalopodi. A-E, Didymozoidae. **A** – porzione di stomaco di *I. coindetii* infestato da forme di *Neomonilicaecum*; **B** – *Allomonilicaecum* da *A. lichtensteini* e *T. sagittatus*; **C** – *Torticaecum* da *H. bonnellii*; **D** – *Neomonilicaecum* da *I. coindetii*; **E** – *Neomonilicaecum* da *H. bonnellii*; **F** – *Derogenes varicus* (Derogenidae) immaturo da *E. cirrhosa*

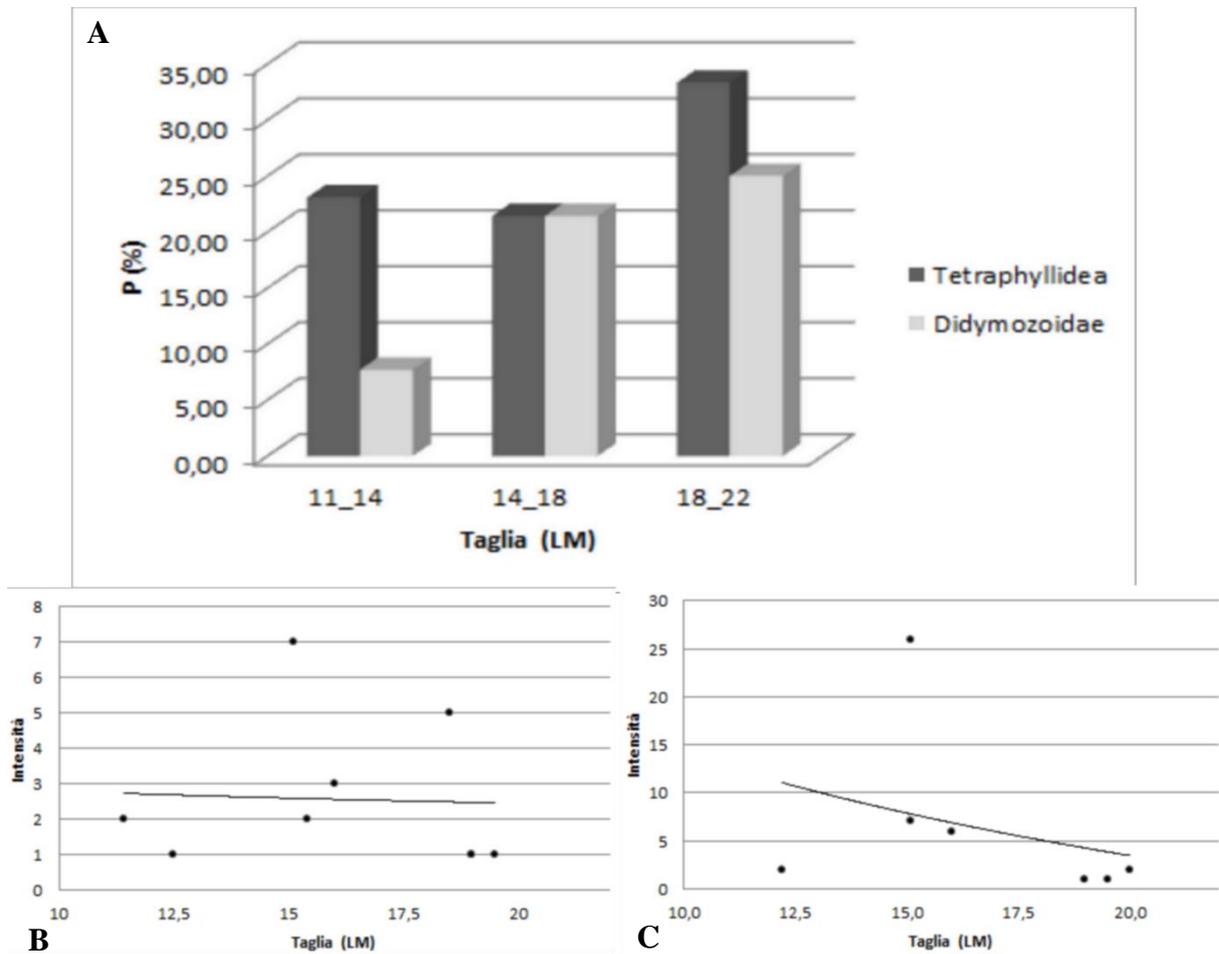


Figura 9.3 – Platyelminti in *Illex coindetii*. **A** – Prevalenza per classi di taglia; **B** – confronto tra la taglia dell'ospite e l'intensità delle infezioni da Tetraphyllidea; **C** – confronto tra la taglia dell'ospite e l'intensità delle infezioni da Didymozoidae.

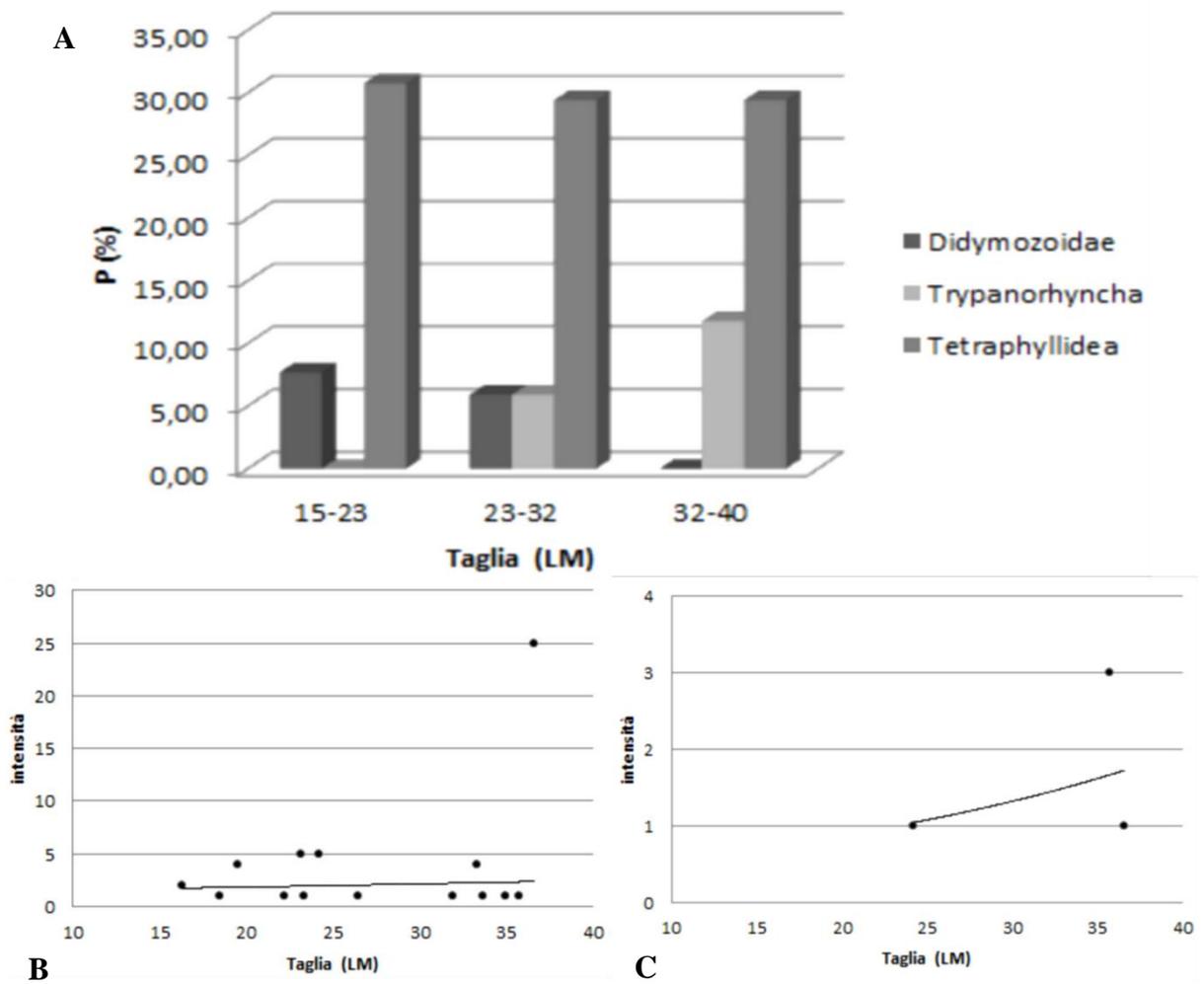


Figura 9.4 – Platyelminti in *Todarodes sagittatus*. **A** – Prevalenza per classi di taglia; **B** – confronto tra la taglia dell'ospite e l'intensità delle infezioni da Tetracystida; **C** – confronto tra la taglia dell'ospite e l'intensità delle infezioni da *Nybelinia* sp..

10. DISCUSSIONE GENERALE E CONCLUSIONI

Nei capitoli precedenti è stata descritta la parassitofauna di 15 specie di cefalopodi delle 43 presenti nelle acque circostanti la Sardegna. Nel campione esaminato è stata riscontrata la presenza di 5 specie di protozoi del genere *Aggregata*; delle larve al terzo stadio di nematodi *Lappetascaris* sp. Tipo A e Tipo B sensu Nagasawa & Moravec, 2002, *Anisakis pegreffii*, *Anisakis physeteris*, la forma ibrida *A. pegreffii/A. simplex*, *Spinitectus* sp.; digenei allo stadio larvale della famiglia Didymozoidae delle tipologie *Neomonilicaecum*, *Allomonilicaecum*, *Torticaecum* e adulti immaturi di *Derogenes varicus*; cestodi Tetrphyllidea riconducibili alla forma pleroceroide denominata *Scolex pleuronectis*, e larve nello stesso stadio di *Nybelinia* sp., dell'ordine Trypanorhyncha.

I dati ottenuti vogliono rappresentare un importante contributo rispetto alla conoscenza delle associazioni ospite-parassita riscontrabili nei Cefalopodi del Mediterraneo, argomento tuttora lacunoso sia dal punto di vista qualitativo che da quello quantitativo (Kinne, 1990). La maggior parte delle informazioni esistenti sono contenute nell'esautiva opera di Hochberg (1990) cui in seguito, relativamente al Mediterraneo occidentale, hanno contribuito Pascual et al (1996a) e Gestal et al (1999). I primi effettuarono una raccolta di dati sui parassiti di cefalopodi delle acque spagnole, incluse quelle del Mediterraneo occidentale. I risultati relativi alle tre specie esaminate in comune con il presente lavoro sono discordanti, dal momento che Pascual et al. (1996a) individuarono esclusivamente crostacei in *T. sagittatus* e *T. eblanae*, e Dicyemida in *Sepia orbignyana*, parassiti che nel presente lavoro non sono stati mai osservati. Piuttosto, i risultati relativi alle acque sarde sono molto più simili a quelli osservati dagli stessi autori negli stessi ospiti in acque spagnole dell'Atlantico, in particolare riguardo alla presenza delle larve di Anisakidae e Tetrphyllidea.

Nell'altro lavoro simile, Gestal et al (1999) svolsero analisi parassitologiche su sette specie di cefalopodi, due sole delle quali in comune con il presente campione, provenienti dalle acque

antistanti le coste toscane (Nord Tirreno). Le sole analogie di questi risultati con i presenti sono la presenza di Anisakinae (riportate come “complesso *Anisakis simplex*”, quindi riconducibili alle larve Type 1 sensu Berland 1961) in *I. coindetii* e di Raphidascaridinae (riportate come *Hysterothylacium* sp.) in *E. cirrhosa*. Nel resto del campione esaminato (costituito quasi esclusivamente da Sepiida e Myopsida), incluse le due specie appena citate, gli autori riportano esclusivamente crostacei parassiti come copepodi e isopodi. Gli stessi autori, confrontando i loro dati con quelli ottenuti da Pascual et al. (1996a), sostennero che in Mediterraneo i cefalopodi svolgono soprattutto il ruolo di ospiti intermedi per crostacei. Poiché nel presente lavoro non sono stati individuati crostacei parassiti, le marcate differenze nei risultati dipendono probabilmente dalla diversa composizione in specie e dalla maturità dei campioni esaminati nei differenti lavori, ma possono anche essere ricondotte alle diverse profondità di campionamento. Per questo, le conclusioni di Gestal et al (1999) si ritengono valide limitatamente alle specie di cefalopodi da essi prese in esame ed al rispettivo grado di maturità, nonché alla profondità di pesca.

Dal confronto della mole di dati in possesso con quelli già esistenti relativamente al Mar Mediterraneo si possono mettere in evidenza alcune nuove segnalazioni di complessi ospite/parassita ed alcuni nuovi record geografici di parassiti durante il periodo di studio:

- Riguardo ai protozoi del genere *Aggregata*, le specie *H. bonnellii*, *H. reversa*, *A. lichtensteini*, *R. macrosoma* sono nuovi ospiti, mentre *A. sagittata* è osservata per la prima volta in Mediterraneo; a questo proposito è molto importante sottolineare l'alta probabilità che quella le cui morfologia ed epidemiologia sono state riportate nei dettagli nelle due specie di *Histioteuthis* esaminate sia una nuova specie di *Aggregata*. Infatti le caratteristiche morfometriche delle oocisti, delle sporocisti e degli sporozoitii descritte differiscono da quelle delle altre specie conosciute (rif.: Gestal et al. 2010; Hochberg, 1990);

- le larve di *Lappetascaris* di entrambi i tipi non erano mai state osservate con questa denominazione in *A. lichtensteini*, *A. lesueurii*, *T. eblanae*, *I. coindetii*, *E. cirrhosa*, *T. sagittatus*, seppure nelle ultime tre specie vi siano dei report riconducibili allo stesso genere, i.e. *Hysterothylacium* sp. o *Contracaecum* sp., segnalati in Atlantico e Mediterraneo (rif.: Gestal et al., 1999a; lista in Hochberg, 1990). In questo mare invece *Lappetascaris* Tipo A era già segnalato in Histioteuthidae (Culurgioni et al., 2010), che si confermano ospiti d'elezione per queste larve;
- La specie *A. pegreffii* è descritta per la prima volta in Histioteuthidae e in *T. sagittatus*, nel quale le larve dello stesso morfotipo 1 erano state identificate come *A. simplex* (Abollo et al., 2003; Hochberg, 1990); *Illex coindetii* si conferma ospite di questa specie (rif. Abollo et al., 2003; Petric et al., 2011);
- Larve ibride *A. pegreffii/A. simplex* non erano mai state rilevate in cefalopodi nel Mediterraneo, mentre lo sono state in *Todarodes pacificus* in acque asiatiche (Setyobudi et al., 2013), pertanto il loro ritrovamento in *I. coindetii* e *T. sagittatus* rappresenta una novità rispetto ai più frequenti report in teleostei presenti in letteratura (Abollo et al., 2003; Farjallah et al., 2008; Mattiucci et al., 2008);
- *A. physeteris* è qui riportato per la prima volta in *I. coindetii* e *T. eblanae*. Questa specie è già segnalata in *T. sagittatus* e *H. bonnellii* del Mediterraneo (Angelucci et al., 2011; Culurgioni et al., 2010; Mattiucci et al., 2001) oltre che in altri Ommastrephidae degli oceani (Céspedes et al., 2011; Nigmatullin et al., 2009);
- la forma larvale di *Spinitectus* sp. è riportata per la prima volta in *I. coindetii* e in cefalopodi del Mediterraneo, mentre è nota in altri Oegopsida e Myopsida di altri mari (Hochberg, 1990; Nigmatullin & Shukhgalter, 1990; Shukhgalter & Nigmatullin, 2001);

- *H. bonnellii* e *H. reversa* rappresentano gli unici nuovi ospiti per plerocercoidi di Tetrphyllidea, che tra l'altro in Mediterraneo sono stati osservati in numerosi ospiti (rif.: Gestal et al., 1999; lista in Hochberg, 1990; Pascual et al., 1996a; Petric et al., 2011);

- le due specie di Histioteuthidae esaminate, insieme con *A. lichtensteini*, sono nuovi ospiti anche per le larve di didimozoidi, che inoltre finora non erano state ancora osservate in *T. sagittatus* del Mediterraneo; anche nei casi di *I. coindetii* e *T. eblanae* la tipologia delle larve è sempre stata definita come *Monilicaecum* e mai come *Neomonilicaecum* (rif.: Hochberg, 1990).

In termini di ricchezza di taxa parassiti (R) per specie ospite i risultati qui ottenuti indicano valori molto superiori nelle acque circostanti la Sardegna rispetto a quelli deducibili per altre zone del Mediterraneo indagate nelle opere sopra citate, in particolar modo riguardo a Ommastrephidae come *T. sagittatus* (R = 8) e *I. coindetii* (R = 7). Quest'ultima specie, anche in Adriatico, risulta ospitare i due soli taxa di elminti *Anisakis pegreffii* e *Phyllobothrium* sp. (Petric et al., 2011). Anche la diversità di specie relativa (numero medio di specie/taxa parassiti per specie ospite) riportata dagli stessi autori per i Nematoda nel Nord Tirreno è nettamente inferiore a quella osservata nel presente lavoro (0,25 contro 1,4); lo stesso vale per quella totale calcolata da Pascual et al. (in Gestal et al., 1999) per il Mediterraneo: 0,5 contro 2,87 specie/taxa parassiti per specie ospite indagata.

Senza dubbio il contributo a questi valori elevati di diversità parassitaria viene dalle osservazioni effettuate sugli Oegopsida, che mostrano marcate differenze soprattutto con quelle effettuate sui generi *Octopus*, *Sepia* e *Loligo*, risultati in accordo con quanto concluso da Gonzalez et al. (2003) secondo cui esistano due diverse "elmintocenosi" (costiera ed oceanica) con diverse composizioni in specie parassite, dipendenti soprattutto da caratteristiche ecologiche della specie cefalopode ospite (vagilità, attività predatoria, batimetria) in combinazione con le caratteristiche ambientali.

Pertanto in virtù della maggior ricchezza parassitaria gli oegopsidi (totani) verranno utilizzati nei successivi passaggi di questo capitolo, nei quali sono analizzati i parassiti come indicatori di alcuni aspetti biologici ed ecologici dei loro ospiti intesi come specie singole o intendendo l'intero gruppo di specie come singolo campione.

Per far ciò è necessario rimarcare il concetto che i parassiti incontrati nel presente studio entrano in contatto con i loro ospiti cefalopodi attraverso il cibo, e quindi la predazione. Questo spiega in primis come, a differenza di altri molluschi come Gastropoda e Bivalvia, i cefalopodi non coprono mai il ruolo di primo ospite intermedio che è solitamente a carico di organismi di livello trofico inferiore, non predatori (Hochberg, 1983, 1990). Seppur con le dovute differenze, quasi tutti i cefalopodi occupano nicchie ecologiche che conferiscono loro una particolare centralità nelle reti trofiche e perciò li rende adatti come ultimi ospiti intermedi immediatamente prima di quelli definitivi, che solitamente sono predatori di cefalopodi: pesci (ossei o cartilaginei) o mammiferi marini (Gonzalez et al., 2003). Le relazioni tra cefalopodi e loro prede e predatori di cui si discute nelle prossime righe sono anche schematizzate nella Fig. 10.5, nella quale si vuole leggere un modello generale di rete trofica in un ecosistema complesso come quello in corrispondenza della piattaforma e della scarpata continentale. Nello schema proposto, lo svolgersi di differenti cicli dei parassiti enfatizza il ruolo chiave che hanno soprattutto gli Oegopsida nel fare da link ecologico tra domini bentonico, nectonico e planctonico.

L'unica categoria di parassiti presente in questa tesi che utilizza i cefalopodi come ospiti definitivi è quella dei coccidi *Aggregata* spp.. Come descritto nel capitolo 7, le fasi merogoniche di questi protozoi si trovano in crostacei bentonici ma anche pelagici che compongono la dieta delle rispettive specie di cefalopodi (Arias, 1998; Gestal et al., 2002a; Hochberg, 1990; Sprague & Couch, 1971; Théodorides & Desportes, 1975).

Nelle diverse associazioni *Aggregata*/cefalopode analizzate si può notare un'analogia, ovvero una leggera correlazione positiva tra LM (e stadio di maturità) dell'ospite e il grado di intensità dell'infezione (Figg. 7.10-13). Ma esaminando altri parametri si evidenziano delle differenze importanti, in particolare nelle associazioni tra *A. sagittata*/*T. sagittatus* e *Aggregata* sp. inq./Histioteuthidae. Infatti la prevalenza (P%) di *A. sagittata* è registrata unicamente nei totani di LM maggiore, che erano esclusivamente femmine e quasi tutte sessualmente mature (Fig. 7.11). Ciò suggerisce che l'ospite intermedio di questo parassita è un crostaceo che entra a far parte della dieta di *T. sagittatus* in fase di maturazione sessuale avanzata, quando le dimensioni del mantello sono di circa 30 cm, e che le femmine predano più attivamente dei maschi questi crostacei probabilmente per una maggior richiesta energetica dovuta alla produzione di uova. Questa conclusione in perfetto accordo con il cambiamento nell'alimentazione dei totani osservato da Quetglas et al. (1999), con i giovani che si nutrono soprattutto di pesci e gli adulti che catturano sempre maggiormente crostacei. Gli stessi autori riportano anche lo spostamento degli adulti in acque più profonde, fatto che suggerisce che l'ospite intermedio di *A. sagittata* sia un decapode più abbondante in questi fondali.

Per quanto riguarda la probabile nuova specie di *Aggregata* osservata in *H. reversa* e *H. bonnellii* si è osservato un andamento quasi opposto nei confronti della maturazione dell'ospite (Fig. 7.12,13): infatti questa infezione presentava maggiori prevalenze negli ospiti giovanili di sesso ancora indifferenziato e minori prevalenze in maschi e femmine. Ciò da un lato può significare che ci sia una certa mortalità degli individui infetti all'inizio della maturazione, e quindi una maggior proporzione di individui adulti sani. Ma suggerisce anche che con la crescita la varietà delle prede si sposti sempre più a favore di pesci e cefalopodi (Voss et al., 1998; Quetglas et al., 2010) con minore incidenza dell'infezione. Infatti l'ospite intermedio di *Aggregata* sp. inq. dovrebbe essere un piccolo crostaceo e questi cefalopodi

consumano (oltre a piccoli teleostei) decapodi, eufasiacei e copepodi fin dagli stadi giovanili. Una ripresa osservata nella prevalenza di *Aggregata* degli stadi di maturità avanzata può dipendere dalla maggiore attività predatoria del mollusco prossimo alla riproduzione e/o da una minore risposta immunitaria, possibile in individui di età avanzata.

Anche nelle infezioni da elminti in generale si osservano prevalenze leggermente superiori negli ospiti di sesso femminile e con l'aumentare della taglia (LM) (Figg. 8.16-20) come anche osservato da Pascual et al. (1996a).

L'anisakide *Lappetascaris* Tipo A è il taxon dominante negli Histioteuthidae e in *A. lesueurii*, e insieme con il Tipo B anche in *I. coindetii*, inoltre negli altri oegopsidi si colloca come secondo dopo le rispettive specie dominanti (Fig. 6.1). Coerentemente con i cicli degli anisakidi della stessa sottofamiglia Raphidascaridinae, questi vermi raggiungono l'ospite cefalopode attraverso la predazione di crostacei che fungono da primi ospiti intermedi. A conferma di quanto detto sopra, anche dall'interpretazione dei dati su *Lappetascaris* si evince che *T. sagittatus* inizia a nutrirsi cospicuamente di crostacei, e quindi a contrarre i parassiti da essi trasmessi, quando raggiunge taglie LM superiori a 25-30 cm (Figg. 8.16, 8.19). Gli Histioteuthidae invece si nutrono di crostacei per un arco vitale più ampio cosicché, per via dell'accumulo di larve di *Lappetascaris* nei tessuti in un lungo tempo, l'intensità dell'infezione è sempre crescente con la taglia del mollusco. In *I. coindetii* non si nota lo stesso effetto di accumulo, quasi come se l'alta diversità relativa in specie elmintiche e le abbondanze abbastanza equilibrate (Fig. 6.1) determinassero una sorta di controllo reciproco delle popolazioni parassite sulle intensità delle infezioni. Infatti si nota anche in Fig. 8.17 che l'andamento di *A. pegreffii* in *I. coindetii* è molto simile a quello di *Lappetascaris* e che i due parassiti coinvolgono lo stesso ampio range di LM. Questo suggerisce una dieta abbastanza composta durante gli stadi maturi in *I. coindetii*, in quanto le larve di *Anisakis* spp. vengono contratte soprattutto nella predazione di teleostei demersali come *Micromesistius poutassou*

che sono tra i più importanti ospiti paratenici per questi nematodi, e nella predazione di altri cefalopodi (Pascual et al., 1996a) (Fig. 10.5). Lo stesso si osserva solo per LM maggiori di 23 cm in *T. sagittatus*, quando questa specie è negli stadi maturativi 2 e 3. Riguardo ad *A. physeteris* invece avviene l'opposto (Fig. 8.17,18), in quanto questo parassita, che è dominante in *T. sagittatus* (e in *T. eblanae*, dato non raffigurato) di tutte le età esaminate, è stato trovato solo in quattro *I. coindetii* tutti di taglia maggiore, in coinfezione con *Lappetascaris* e/o *A. pegreffii*.

In sintesi i dati sugli anisakidi suggeriscono una sovrapposizione di diete, e quindi un certo livello di competizione negli oegopsidi presenti nelle zone soggette a campionamento, soprattutto tra *I. coindetii* e *T. sagittatus* nel periodo di maturazione di entrambe. In fondali più alti la sovrapposizione di diete coinvolge anche altre famiglie di totani. Questa considerazione è suggerita sia dalla presenza di *Anisakis* spp. in Histioteuthidae, sia dall'osservazione dei valori di prevalenza ed abbondanza degli anisakidi nelle due fasce batimetriche di campionamento prese in considerazione (Fig. 10.3). Infatti si nota come *Lappetascaris* A sia il taxon dominante nei fondali a profondità più alta che sono stati indagati, mentre nella stessa immagine si può notare come la tendenza delle due specie di *Anisakis* sia opposta a quella dell'altro anisakide. In particolare *A. pegreffii* mostra valori molto bassi in totani pescati in fondali di fascia E.

Riguardo ai plateminti, la corrispondenza tra valori di prevalenza e intensità rispetto all'accrescimento dell'ospite cefalopode non è così evidente come per i nematodi (Figg. 9.3,4). Considerando ad esempio le infezioni da *Scolex pleuronectis* (larve Tetracystidae) in *I. coindetii* e *T. sagittatus*, ad esempio si nota come le P% siano leggermente crescenti nella prima specie e costanti nella seconda; anche l'intensità si mostra priva di tendenza rispetto alla taglia con un numero pressochè costante di larve negli ospiti, come osservato anche in uno studio di Gaevskaya & Nigmatullin (1981, in russo) riportato da Hochberg (1990).

Riguardo alle larve di didimozoidi si assiste invece ad un calo dell'intensità nelle maggiori taglie di *I. coindetii*, e un calo di prevalenza in *T. sagittatus*. Questo perchè il ciclo di questi digenei, largamente sconosciuto (Fig. 10.5), sembra coinvolgere piccoli molluschi ed altri invertebrati pelagici come primi e secondi ospiti intermedi (Felizardo et al., 2011; Gómez del Prado-Rosas et al., 2007; Nikolaeva, 1985, Hochberg, 1990). Di conseguenza il cefalopode, che con la crescita aggiunge alla dieta prede di maggior taglia, ingerisce un numero minore di questi parassiti; inoltre le larve sopravvivono per poco tempo nel tratto digerente del mollusco, degenerando dopo pochi mesi (Hochberg, 1990).

Considerando il livello trofico successivo, che vede gli oegopsidi come prede anche in quale misura le diverse specie di oegopsidi sono importanti nel trasferimento delle larve anisakidi ai rispettivi ospiti definitivi (Fig. 10.5): così emerge che gli alti livelli di infezione di *Lappetascaris* negli Histioteuthidae riflettono con alta probabilità la loro maggior presenza rispetto ad altri cefalopodi nella dieta del teleosteo/i non identificato/i che ne rappresenta l'ospite definitivo, verosimilmente una predatore bentonico o demersale. Similmente, *I. coindetii* è il più efficace ospite paratenico disponibile per *A. pegreffii* nel passaggio alle diverse specie di delfinidi ove raggiungere lo stadio adulto, mentre *T. sagittatus* e *T. eblanae* sono il miglior ospite per *A. physeteris* nel suo trasferimento ai capodogli. In questo ha senza dubbio un ruolo importante anche *H. bonnellii*, come dimostrato anche da studi sui contenuti stomacali (Clarke, 1996; Roberts, 2003; Santos et al., 2001; Xavier et al., 2007)

I Didymozoidae adulti si trovano in teleostei predatori come pesci spada e scombridi (Nikolaeva, 1975; Peristeraki et al., 2005; Rodriguez-Marin et al., 2008) che attaccano preferenzialmente ommastrephidae di taglia massima 20 cm LM, assicurando alle larve di questi parassiti un trasferimento ottimale (Hochberg, 1990). Le larve di didimozoidi sono state riscontrate in pochi casi e con bassi indici in quasi tutti gli oegopsidi esaminati, eccetto in *I. coindetii* in cui sono particolarmente rappresentate.

Riguardo agli elasmobranchi, che sono gli ospiti definitivi dei cestodi, in certi casi la trasmissione del plerocercioide tetrafillideo è diretta dal cefalopode al pesce predatore (Smale, 1996), così come per i Trypanorhyncha (Caira & Pickering, 2013; Jensen & Bullard, 2010). In certi Tetraphyllidea che possono essere incluse nella forma *Scolex pleuronectis* invece, come *Clistobothrium* e *Phyllobotrium* sp., un ulteriore ospite (intermedio o paratenico) è rappresentato da un mammifero odontocete (Agustì et al., 2005; Aznar et al., 2007; Jensen & Bullard, 2010), nelle cui viscere può avvenire o meno il passaggio della larva a merocercioide prima del definitivo passaggio ad uno squalo predatore di vertice o all'occorrenza necrofago (Bianucci et al., 2000; Storai et al., 2001).

Le Figg. 10.1 e 10.2 si riferiscono ai dati di prevalenza ed abbondanza dei parassiti dei cefalopodi rispetto alle diverse zone di pesca indagate. Non vi sono differenze di rilievo a dispetto di quanto suggerirebbe una prima osservazione. Infatti con particolare riferimento alle abbondanze relative per gruppi tassonomici, il dato che si discosta maggiormente dagli altri è quello delle zone 1 e 2, corrispondente al Tirreno occidentale (Sardegna orientale), dove soprattutto si nota il valore più basso per *Lappetascaris* sp. A. Questo dipende dal fatto che i campioni provenienti da questo settore sono stati ottenuti quasi esclusivamente in fondali di fascia D, e quelli dei settori 6 e 7 prevalentemente dalla fascia E, e infatti il confronto tra la Fig. 10.2 e la Fig. 10.4 mostra delle analogie tra i grafici. I dati relativi alla zona 5 (Mar di Sardegna centrale) appaiono così netti per via della superficie contenuta del settore e del relativo numero ristretto di campioni. Poiché comunque in tutti i settori presi in esame vi sono prove della presenza degli elementi che permettono lo svolgimento dei cicli vitali di parassiti che coinvolgono i cefalopodi, dalle proporzioni relative dei valori osservati si può dedurre che la composizione della parassitofauna nei cefalopodi intorno alla Sardegna non dipenda dalla zona geografica ma dalla fascia batimetrica alla quale si trovano (Gonzalez et al., 2003). Quindi un utilizzo potenziale dei parassiti come marche biologiche, in questo

grado di approfondimento, e in una scala geografica così ridotta, potrebbe contribuire nello studio delle migrazioni a gradiente batimetrico effettuate dalle popolazioni durante l'accrescimento e la maturazione sessuale, piuttosto che negli sudi finalizzati alla discriminazione di stock. Infatti anche se differenze geografiche nella parassitofauna esistono, e sono state usate per fornire indirette informazioni sulle migrazioni orizzontali, per ottenere chiari risultati è necessario arrivare a informazioni molto dettagliate su specificità d'ospite e distribuzione geografica del parassita (Semmens et al., 2007). A tal fine potrebbe essere determinante lo studio genetico sui polimorfismi delle popolazioni di parassiti nelle diverse aree di riferimento (Pascual & Hochberg, 1996).

Molte delle nuove informazioni ottenute sui parassiti esaminati, incluse le ultime discusse, sono state raggiunte mediante accurate analisi morfologiche e morfometriche finalizzate alla loro determinazione fino al livello più basso possibile. Tuttavia, il fatto che la quasi totalità degli elminti presenti nei cefalopodi è allo stadio larvale rappresenta un elemento di difficoltà rispetto all'identificazione dei parassiti, a causa dell'esiguità dei loro caratteri distintivi rispetto alle corrispondenti forme adulte. Per questo motivo, alla microscopia ottica si sono talvolta abbinate tecniche diagnostiche più raffinate. Ad esempio sono state applicate metodiche di istologia nel caso di tre specie di *Aggregata* e per gli anisakidi *Lappetascaris* sp. Tipo A e *A. physeteris*. Queste hanno anche permesso di evidenziare alcuni aspetti istopatologici delle suddette infezioni, e in particolare nel caso dei nematodi di apprezzare le differenti reazioni difensive degli ospiti a questi parassiti. In più, l'uso delle immagini al microscopio elettronico a scansione ha permesso di fornire elementi morfologici nuovi per la descrizione delle larve di *Lappetascaris*, molto utili dal momento che la collocazione tassonomica di questo nematode è ancora incerta, così come la sua distribuzione geografica ed il suo ciclo biologico. Le citate incertezze tassonomiche determinano sempre più spesso la necessità di ricorrere a strumenti di biologia molecolare (Castellanos-Martínez & Gestal,

2013). A questo proposito, per ottenere il riconoscimento specifico dei tipi larvali di *Anisakis*, si è fatto ricorso a tecniche di biologia molecolare che hanno confermato la presenza in Mediterraneo occidentale di due specie dominanti, ma anche la possibilità che una, *A. pegreffii*, ibridizzi con la specie affine *A. simplex* che è dominante nell'Oceano Atlantico e presente in modo costante nel settore più occidentale del Mediterraneo (Farjallah et al., 2008; Mattiucci et al., 2001).

La presenza di *Anisakis* ibridi offre uno spunto sull'uso degli anisakidi come marche biologiche, e suggerisce la necessità di una conoscenza sulla struttura genetica delle popolazioni di parassiti per ottenere risultati più efficaci soprattutto nella discriminazione degli stock soggetti a sfruttamento. A questo scopo le caratteristiche genetiche potrebbero essere più utili dello studio dei diversi livelli di infestazione, come nel caso di *Anisakis simplex* e del cestode *Phyllobothrium* sp., (Pascual & Hochberg, 1996c). Inoltre laddove la morfologia delle forme larvali è incerta, l'identità genetica dei parassiti dà maggiori informazioni sui cicli biologici e le reti trofiche nelle biocenosi marine (Brickle et al., 2001). Ciò è valido in modo particolare per i Didymozoidae, dei quali si vedrà crescere in modo determinante l'uso come indicatori bioecologici quando grazie alla biologia molecolare si troveranno corrispondenze tra morfotipi larvali come quelli osservati nel presente lavoro, e le numerose forme adulte che si ritrovano nei tonni.

Ancora riguardo al genere *Anisakis* dalla letteratura disponibile e dalle informazioni ottenute emerge che gli Ommastrephidae *T. eblanae*, *I. coindetii* e *T. sagittatus* sono, tra i cefalopodi esaminati, tra i principali ospiti paratenici di questi agenti zoonotici legati al consumo umano di prodotti ittici crudi o poco cotti, come anche riconosciuto dall'OIE (Organizzazione mondiale della sanità animale) (Pozio, 2013). La localizzazione delle larve negli ospiti, come osservato da altri autori (Abollo et al., 2001; Setyobudi et al., 2013) era nella quasi totalità dei casi in parti del corpo che di solito non sono appetibili o comunque non consumate senza

cottura, come le viscere o le gonadi. Ciò rappresenta un fattore che di per sé riduce il rischio di trasmissione di questi parassiti all'uomo. Comunque, in accordo con Roper et al. (2010), una migliore comprensione della diffusione dei parassiti anisakidi nei cefalopodi può essere di aiuto non solo nella conoscenza della biologia e delle abitudini alimentari dell'ospite, ma anche, come informazioni utili nella programmazione della sicurezza alimentare legata al consumo di prodotti marini crudi.

In questo senso il lavoro svolto ha riguardato diversi aspetti che si pongono tra le informazioni di base, soprattutto concentrandosi sulle descrizioni morfologiche e dei parassiti osservati e sulla fenomenologia delle loro infezioni nei cefalopodi. Tutte le informazioni raccolte rappresentano nuovi dati per quanto riguarda i mari circostanti la Sardegna (Zona GSA 11), eccetto la presenza di anisakidi in Histioteuthidae e *A. physeteris* in *T. sagittatus* (Angelucci et al., 2011; Culurgioni et al., 2010). Il carattere estensivo della ricerca svolta ha permesso di ottenere una gamma di risultati che, lungi dall'essere definitivi, offrono alcuni canali di grande interesse che costituiscono ulteriori spunti per la ricerca da sviluppare nell'immediato futuro. Tra questi, per quanto riguarda la sistematica dei parassiti, è in corso l'ulteriore approfondimento mediante tecniche di biologia molecolare sulla collocazione degli anisakidi che per morfologia sono stati attribuiti al genere *Lappetascaris*; dello stesso tipo è l'indagine che riguarda l'identità tra le larve e gli adulti dei didimozoidi, che potrebbero rivelarsi tra le più potenti marche biologiche per risorse importanti e delicate come i cefalopodi e gli sgombridi. È sicuramente vicino anche il completamento della descrizione della nuova specie di *Aggregata* osservata negli Histioteuthidae, insieme con l'approfondimento della biologia di questo genere di protozoi.

Inoltre risultati come quelli discussi e messi a confronto con altri lavori hanno messo in evidenza che alcuni parassiti, soprattutto *Aggregata* spp. e gli Anisakidae, sono potenzialmente utili come indicatori bioecologici anche allo stato attuale della loro

conoscenza, in quanto i valori epidemiologici ad essi legati si sono rivelati sensibili ad aspetti dell'ospite come dominio occupato, variazioni nelle abitudini alimentari, crescita, maturazione sessuale, spostamenti batimetrici. Da queste osservazioni emerge l'opportunità di ampliare e arricchire di dettagli le conoscenze sulla presenza e la trasmissione dei parassiti e delle malattie parassitarie nei cefalopodi. Le loro applicazioni infatti rappresentano uno strumento utile da inserire nel complesso delle discipline che vengono applicate nello studio della biologia e dell'ecologia di questi molluschi e di altri organismi ad essi legati nella rete trofica, con il fine ultimo della salvaguardia e alla corretta gestione delle risorse marine sottoposte a sfruttamento.

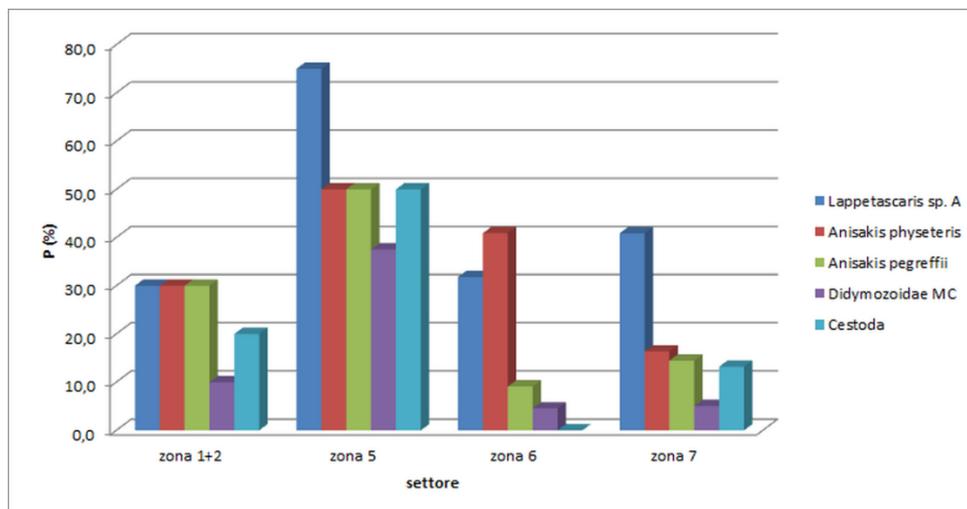
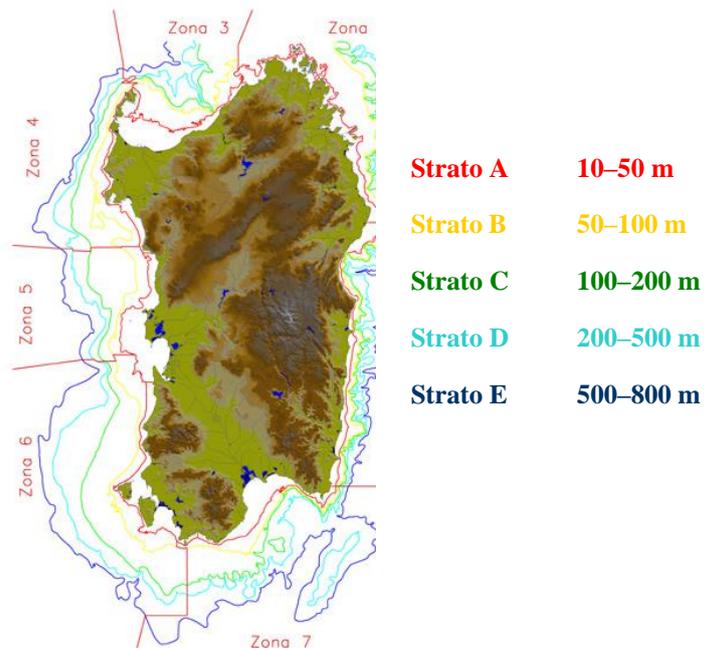


Figura 10.1 - Confronto tra le prevalenze delle infezioni nelle zone geografiche di pesca circostanti la Sardegna.

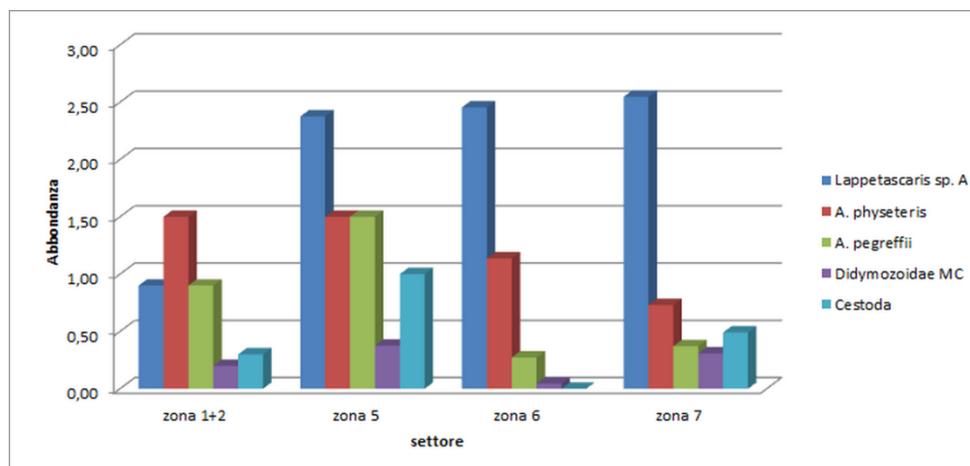


Figura 10.2 - Confronto tra le abbondanze delle infezioni nelle zone geografiche di pesca circostanti la Sardegna.

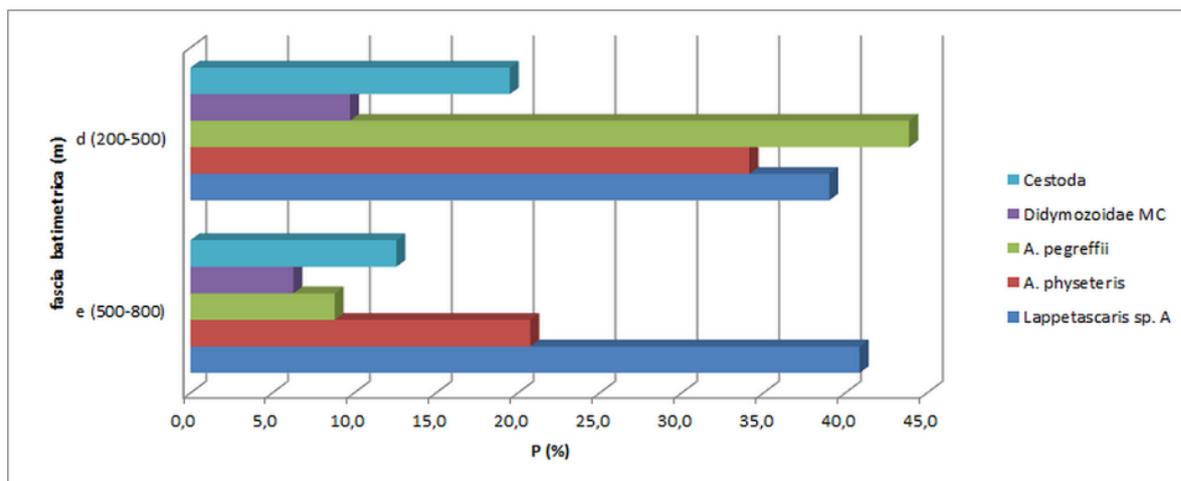


Figura 10.3 – Confronto tra le prevalenze delle infezioni nelle fasce batimetriche D ed E. Si nota come tutti i valori calino nei fondali di profondità maggiore, eccetto la P di *Lappetascaris* sp.

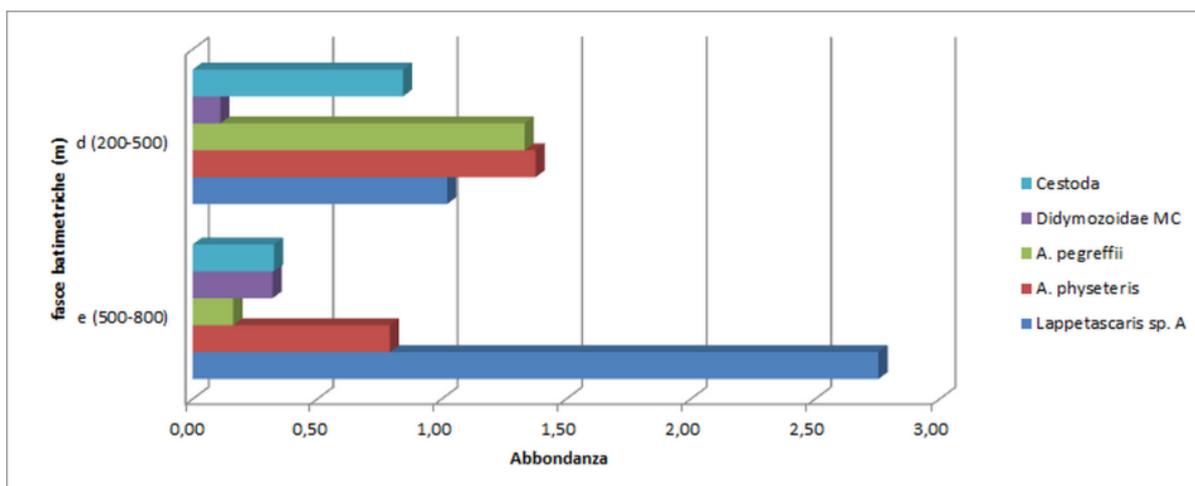


Figura 10.4 - Confronto tra le abbondanze delle infezioni nelle fasce batimetriche D ed E. Si nota come tutti i valori calino nei fondali di profondità maggiore, eccetto la A di *Lappetascaris* sp. e quella delle metacercarie *Didymozoidae*.

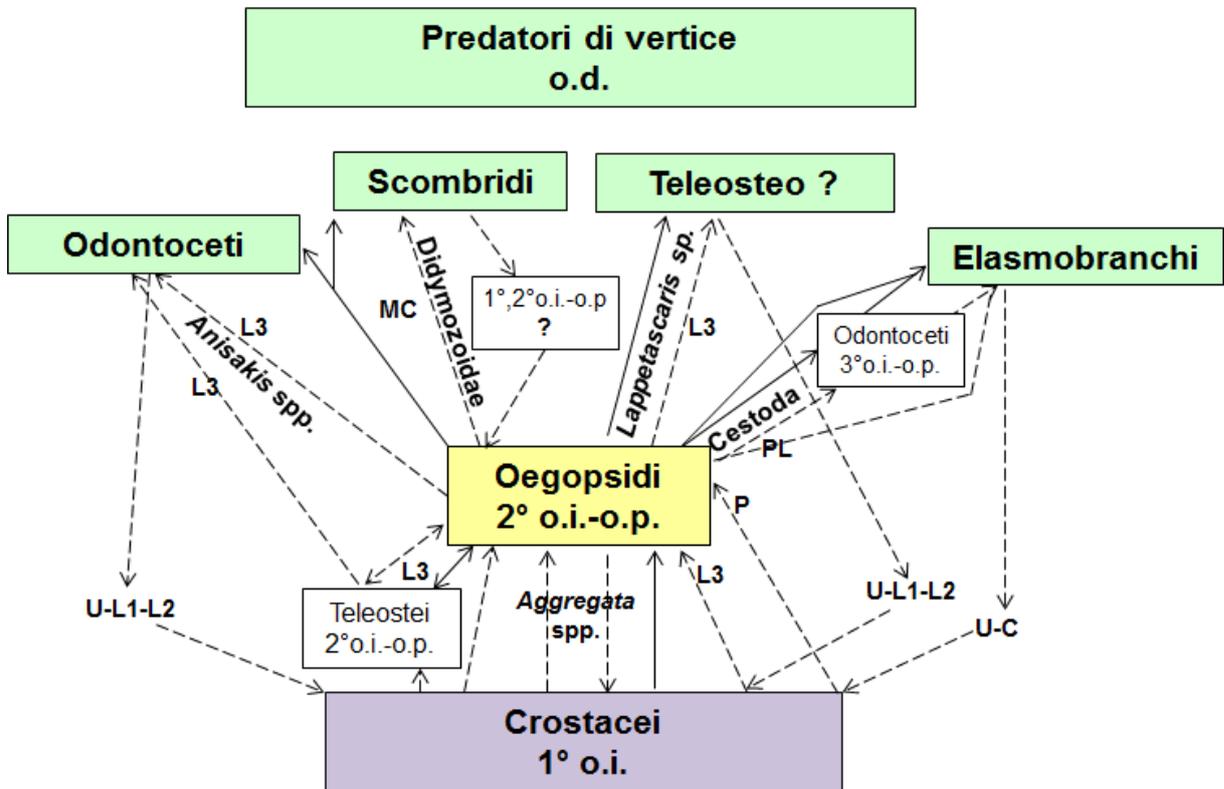


Figura 10.5 – Rappresentazione schematica delle relazioni biotiche tra i cefalopodi Oegopsida e gli organismi della rete trofica ad essi correlati, secondo un modello generale suggerito dalle analisi parassitologiche. Le linee tratteggiate ricostruiscono i cicli dei principali gruppi di parassiti, mentre le linee continue indicano il rapporto preda →predatore.

Legenda: U = uovo; L1, L2, L3 = larve al primo, secondo e terzo stadio; C = cisticerco; P = procercoide; PL = plerocercoide; o.i. = ospite intermedio; o.p. = ospite paratenico; o.d. = ospite definitivo; ? = ospite non identificato per mancanza di informazioni sul ciclo del parassita.

BIBLIOGRAFIA

- Abollo, E., Gestal, C., Lopez, A., González, A.F., Guerra, A., Pascual, S.** 1998. Squid as trophic bridges for parasite flow within marine ecosystems: the case of *Anisakis simplex* (Nematoda: Anisakidae), or when the wrong way can be right. *South African Journal of Marine Sciences*, **20**: 223–232.
- Abollo, E., Gestal C., Pascual, S.** 2001. *Anisakis* infestation in marine fish and cephalopods from Galician waters: an updated perspective. *Parasitology Research*, **87**: 492–499.
- Abollo, E., Pascual, S.** 2002. SEM study of *Anisakis brevispiculata* Dollfus, 1966 and *Pseudoterranova ceticola* (Deardoff and Overstreet, 1981)(Nematoda: Anisakidae), parasites of the pygmy sperm whale *Kogia breviceps*. *Scientia Marina*, **66**: 249–255.
- 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. *Infections, Genetics and Evolution* **3**: 175–181.
- Agustì, C., Aznar, F.J., Raga, A.** 2005. Tetrphyllidean plerocercoids from western Mediterranean cetaceans and other marine mammals around the world: a comprehensive morphological analysis. *Journal of Parasitology*, **91**: 83–92.
- 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. *Journal of Food Protection*, **74**: 1769–1775.
- Arias, C., Gestal, C., Rodriguez, H., Soto, M., Estevez, J.** 1998. *Palaemon elegans*, an intermediate host in the life-cycle of *Aggregata octopiana*. *Diseases of Aquatic Organisms*, **32**: 75–78.
- Aznar, F.J., Agustì, C., Littlewood, D.T.J., Raga, J.A., Olson, P.D.** 2007. Insight into the role of cetaceans in the life cycle of the tetrphyllideans (Platyhelminthes: Cestoda). *International Journal for Parasitology*, **37**: 243–255.
- Belcari, P.** 1999a. *Sepia orbygnyana*. In: Relini, B., Bertrand, J., Zamboni, A. (Eds.), Syntesis of the knowledge on bottom fishery resources in central Mediterranean (Italy and Corsica). *Biologia Marina Mediterranea*, **6**: 687–690.
- Belcari, P.** 1999b. *Illex coindetii*. In: Relini, B., Bertrand, J., Zamboni, A. (Eds.), Syntesis of the knowledge on bottom fishery resources in central Mediterranean (Italy and Corsica). *Biologia Marina Mediterranea*, **6**: 715–720.
- Belcari, P., Cuccu, D., Gonzalez, M., Srairi, A., Vidoris, P.** 2002. Distribution and abundance of *Octopus vulgaris* Cuvier, 1797 (Cephalopoda: Octopoda) in the Mediterranean Sea. *Scientia Marina*, **66**: 157–166.

- Bello, G.** 1991. Role of Cephalopods in the diet of the swordfish, *Xiphias gladius*, from the Eastern Mediterranean Sea. *Bulletin of Marine Sciences*, **49**: 312–324.
- Bello, G.** 1996. Teuthophagous predators as collectors of oceanic cephalopods: the case of the Adriatic Sea. *Bollettino Malacologico*, **32**: 71–78.
- Bello, G.** 2003. The biogeography of Mediterranean cephalopods. *Biogeographia*, **26**: 209–226.
- Bello, G.** 2004. Aggiornamento della “Checklist delle specie della fauna italiana: Cephalopoda”. *Bollettino Malacologia*, **40**: 45–47.
- Bello, G.** 2008. Cephalopoda. *Biologia Marina Mediterranea*, **15**: 318–322.
- Bello, G., Pipitone, C.** 2002. Predation of cephalopods by the giant red shrimp *Aristaeomorpha foliacea*. *Journal of Marine Biologists Association of the UK*, **82**: 213–218.
- Berland, B.** 1961. Nematodes from some Norwegian marine fishes. *Sarsia*, **2**: 1–50.
- Bertrand, J.A., de Sola, L.G., Papaconstantinou, C., Relini, G., Souplet, A.** 2002. The general specifications of the MEDITS surveys. *Scientia Marina*, Vol **66**: 9–17.
- Bianucci, G., Bisconti, M., Landini, W., Storai, T., Zuffa, M., Giuliani, S., Mojetta, A.** 2000. Trophic interaction between white shark, *Carcharodon carcharias*, and cetaceans: A comparison between Pliocene and Recent data from central Mediterranean Sea. *Proceedings of the IV European Elasmobranch Association Meeting*, Italy, 33-48.
- Boyle P.R.** 1990. Cephalopod biology in the fishery context. *Fisheries Research*, **8**: 303–332.
- Boyle, P.R., Grisley, M.S., Robertson G.** 1986. Crustacea in the diet of *Eledone cirrhosa* (Mollusca: Cephalopoda) determined by serological methods. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, **66**: 867–879.
- Boyle, P.R., v. Boletzky, S.** 1996. Cephalopod Populations: Definition and Dynamics. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B*, **351**: 985–1002.
- Bower, S.M., Margolis, L.** 1991. Potential use of helminth parasites in stock identification of flying squid, *Ommastrephes bartrami*, in North Pacific waters. *Canadian Journal of Zoology*, **69**: 1124–1126.
- Brickle, P., Olson, P.D., Littlewood, D.T.J., Bishop, A., Arkhipkin, A.I.** 2001. Parasites of *Loligo gahi* from waters off the Falkland Islands, with a phylogenetically based identification of their cestode larvae. *Canadian Journal Of Zoology*, **79**: 2289–2296.
- Bush, A.O., Lafferty, K.D., Lotz, M., Shostak, A.W.** 1997. Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis et al. revisited. *Journal of Parasitology*, **83**: 575–583.

- Caddy, J.F., Rodhouse, P.G.** 1998. Cephalopod and groundfish landings: evidence for ecological change in global fisheries? *Reviews in Fish Biology and Fisheries* **8**: 431–444.
- Caira, J.N., Reyda, F.B.**, 2005. Eucestoda (true tapeworms). In: Rohde, K. (Ed), *Marine parasitology*. CABI Publishing, Wallingford, UK, pp. 92–104.
- Caira, J.N. Pickering, M.** 2013. Cestodes from deep-water squaliform sharks in the Azores. *Deep-Sea Research II* **98**: 170–177.
- Cake, E.W.** 1976. A key to larval cestodes of shallow-water, benthic mollusks of the northern Gulf of Mexico. *Bulletin of the Helminthological Society of Washington*, 43: 160–171.
- Capponi, F.** 1972. *P. Ovidii Nasonis Halieuticon: Commentario*. Vol. 2. Brill.
- Capua, D.** 2004. I Cefalopodi delle coste e dell'arcipelago Toscano. Sistematica, anatomia, fisiologia e sfruttamento delle specie presenti nel Mediterraneo. Evolver, Roma, pp. 366.
- Capua, D.** 2009. Classis Cephalopoda Cuvier, 1797 Dai ranghi principali all'identificazione delle specie del Mediterraneo. Strumenti. *Atti del terzo Convegno Malacologico Pontino – Sabaudia, settembre 2009*.
- Castellanos-Martínez, S., Gestal, C.** 2013. Pathogens and immune response of cephalopods. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **447**: 14–22.
- Castillo-Sánchez E., García-Prieto, L., G. Pérez-Ponce de León, G.** 1997. Helminthofauna de *Euthynnus lineatus* (Perciformes: Scombridae) en Jalisco, México. *Revista de Biología Tropical*, **45**: 1251–1253.
- Catalano, S.R., Whittington, I.D., Donnellan, S.C., Gillanders B.M.**, 2013. Parasites as biological tags to assess host population structure: Guidelines, recent genetic advances and comments on a holistic approach. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijppaw.2013.11.001>.
- Cau, A., Cuccu, D.** 2013. Metodi innovativi per l'incremento di produzione del polpo comune *Octopus vulgaris* e per la valorizzazione della biodiversità costiera in un'area CAMP della Sardegna Occidentale. *Relazione Tecnica - ottobre 2013*, pp. 103.
- Cerri, P.S., Sasso-Cerri, E.** 2003. Staining methods applied to glycol methacrylate embedded tissue sections. *Micron*, **34**: 365–372.
- Chambers, C.B., Cribb, T.H., Jones. M.K.** 2000. Tetraphyllidean metacestodes of teleosts of the Great Barrier Reef, and the use of in vitro cultivation to identify them. *Folia Parasitologica*, **47**: 285–292
- Céspedes, R.E., Iannacone, J., Salas, A.** 2011. Helminthos parásitos de *Dosidicus Gigas* “Pota” eviscerada en Arequipa, Perú. *Ecología Aplicada*, **10**: 1–11.

- Clarke, M.R.** 1996. Cephalopods as Prey. III. Cetaceans. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B*, **351**: 1053–1065.
- Cribb, T.H.** 2005. Digenea (endoparasitic flukes). In: Rohde, K. (Ed), *Marine parasitology*. CABI Publishing, Wallingford, UK, pp. 76–86.
- Crites, J.L., Overstreet, R.M., Maung, M.** 1993. *Ctenascarophis lesteri* n.sp. and *Prospinitectus exiguus* n.sp. (Nematoda: Cystidicolidae) from the skipjack tuna, *Katsuwonus pelamis*. *The Journal of Parasitology*, **79**: 847-859
- Croxall, J.P., Prince, P.A.** 1996. **Cephalopods as Prey. I. Seabirds.** *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B*, **351**: 1023–1043.
- Cuccu, D., Addis, P., Damele, F., Manfrin Piccinetti, G.** 2003a. Primo censimento della teutofauna dei mari circostanti la Sardegna. *Biologia Marina Mediterranea*, **10**: 795–798.
- Cuccu, D., Damele, F., Follesa, M.C., Murenu, M., Cau, A.** 2003b. Aspetti biologici di *E. cirrhosa* (Cephalopoda Octopoda) nei mari circostanti la Sardegna. *Biologia Marina Mediterranea*, **10**: 119-126.
- Cuccu, D., Jereb, P., Addis, P., Pendugiu, A.A., Sabatini, A. Cau, A.** 2005. Eccezionali catture di *Todarodes sagittatus* (Cephalopoda: Ommastrephidae) nei mari sardi. *Biologia Marina Mediterranea*, **12**: 500–503.
- Cuccu, D., Cabiddu, S., Dymarkowska, M., Mereu, M., Porcu, C., Cau A.** 2006. Prima segnalazione di *Opisthoteuthis calypso* (Octopoda, Cirrata, Opisthoteuthidae) nei mari sardi. *Biologia Marina Mediterranea*, **13**: 851–853.
- Cuccu, D., Mereu, Cannas, R., Follesa, M.C., Cau, A., Jereb, P.** 2007a. Egg clutch, sperm reservoirs and fecundity of *Neorossia caroli* (Cephalopoda: Sepiolidae) from the southern Sardinian sea (western Mediterranean). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, **87**: 971–976.
- Cuccu, D., Mereu, M., Loi, B., Sanna, I., Cau, A.** 2007b. The squid family Histioteuthidae in the Sardinian waters. *Biologia Marina Mediterranea*, **14**: 262–263.
- Cuccu, D., Jereb, P., Ragonese, S., Giovannini, N., Colella, S., Cau, A.,** 2009a. On the abundance and spatial distribution of *Illex coindetii* (Cephalopoda: Ommastrephidae) and *Eledone moschata* (Cephalopoda: Octopodidae) in the Sardinian Seas (central-western Mediterranean) - A preliminary and qualitative investigation with special attention to some environmental constraints. *Bolettino di Malacologia*, **45**: 102–109.
- Cuccu, D., Mereu, M., Cannas, R., Follesa, M.C., Cau, A., Jereb, P.** 2009b. Morphology, biology and molecular characterizations of *Opisthoteuthis calypso* (Cephalopoda: Octopoda) from the

Sardinian Channel (central western Mediterranean). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, **89**: 1709–1715.

Cuccu, D., Mereu, M., Cannas, R., Sanna, I., Cau, A., Jereb, P. 2009c. Variability in *Sepietta oweniana* (Cephalopoda: Sepiolidae) hectocotyli. *Italian Journal of Zoology*, **76**: 189–193.

Cuccu, D., Mereu, M., Masala, P., Cau, A., Jereb P. 2009d. *Chroteuthis veranii* and *Ommastrephes bartramii* (Cephalopoda: Teuthidae) in the Sardinian waters. *Biologia Marina Mediterranea*, **16**: 334–335.

Cuccu, D., Mereu, M., Cannas, R., Marcias, S., Cau, A., Jereb, P. 2010a. An unusual finding of *Sepietta oweniana* (Cephalopoda: Sepiolidae) egg clutch. *Scientia Marina*, **74**: 555–560.

Cuccu, D., Mereu, M., Masala, P., Cau, A., Jereb P. 2010b. First record of *Stoloteuthis leucoptera* (Cephalopoda: Sepiolidae) in the Sardinian waters. *Biologia Marina Mediterranea*, **17**: 334–335.

Cuccu, D., Mereu, M., Follesa, M.C., Deiana, A.M., Cau, A. 2011a. *Bathypolypus sponsalis* (Cephalopoda: Octopoda) from the central western Mediterranean Sea. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, **91**: 549–553.

Cuccu, D., Mereu, M., Masala, P., Cau, A., Jereb, P. 2011b. Male reproductive system in *Neorossia caroli* (Joubin 1902) (Cephalopoda: Sepiolidae) from Sardinian waters (western Mediterranean Sea) with particular reference to sexual products. *Invertebrate Reproduction & Development*, **55**: 16–21.

Cuccu D., Cannas R., Mereu M., Follesa M.C., Jereb P., Cau A. 2013a. On the first record of the genus *Octopoteuthis* (Cephalopoda: Octopoteuthidae) in the Sardinian Channel (central western Mediterranean Sea). *Molluscan Research*, **33**: 135–142.

Cuccu D., Mereu M., Cau Al., Pesci P., Cau A. 2013b. Reproductive development versus estimated age and size in a wild Mediterranean population of *Octopus vulgaris* (Cephalopoda: Octopodidae), *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, **93**: 843–849.

Cuccu D., Mereu M., Porcu C., Follesa M.C., Cau Al., Cau A. 2013c. Development of sexual organs and fecundity in *Octopus vulgaris* Cuvier, 1797 from the Sardinian waters (Mediterranean Sea). *Mediterranean Marine Science*, **14**: 270-277.

Cuccu, D., Mereu, M., Agus, B., Cau, A., Culurgioni, J., Sabatini, A., Jereb, P. 2014. Male reproductive system and spermatophores production and storage in *Histioteuthis bonnellii* (Cephalopoda: Histioteuthidae): a look into deep-sea squids reproductive strategy. *Deep-Sea Research Part I*. (submitted).

Culurgioni, J., D'Amico, V., Coluccia, E., Mulas, A., Figus, V. 2006. Metazoan parasite fauna of conger eel *Conger conger* L. from Sardinian waters (Italy). *Ittiopatologia*, **3**: 253–261.

- Culurgioni, J., Cuccu, D., Mereu, M., Figus, V.** 2010. Larval anisakid nematodes of *Histioteuthis reversa* (Verril, 1880) and *H. bonnellii* (Férussac, 1835) (Cephalopoda: Teuthoidea) from Sardinian Channel (western Mediterranean). *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, **30**: 217–226.
- Culurgioni, J., Cuccu, D., Mereu, M., Agus, B., Mattiucci, S., Paoletti, M., Figus, V., Cau, A.** 2012. Parasitofauna of *Histioteuthis bonnellii* (Férussac, 1835) and *H. reversa* (Verril, 1880) (Cephalopoda: Teuthoidea) from Sardinian waters (western Mediterranean). In: *Mappe Parassitologiche 18, SoIPa XXVII Abstracts*, p. 179.
- Culurgioni, J., S. Mele, S., Merella, P., Addis, P., Figus, V., Cau, A., Karakulak, F.S., Garippa, G.** 2014. Metazoan gill parasites of the Atlantic bluefin tuna *Thunnus thynnus* (Linnaeus) (Osteichthyes: Scombridae) from the Mediterranean and their possible use as biological tags. *Folia Parasitologica*, **61**: 148–156. doi: 10.14411/fp.2014.011
- D'Amico, V., Canestri Trotti, G., Culurgioni, J., Figus V.** 2006. Helminth parasite community of *Diplodus annularis* L. (Osteichthyes, Sparidae) from Gulf of Cagliari (Sardinia, South Western Mediterranean). *Bulletin of European Association of Fish Pathologists*, **26**: 222–228.
- D'Amelio, S., Mathiopoulos, K., Santos, C.P., Pugachev, O.N., Webb, S.C., Picanço, M., Paggi, L.** 2000. Genetic markers in ribosomal DNA for the identification of members of the genus *Anisakis* (Nematoda: Ascaridoidea) defined by polymerase chain reactionbased restriction fragment length polymorphism. *International Journal for Parasitology*, **30**: 223–226.
- Dawe, E.G., Mercer, M.C., Threlfall, W.** 1984. On the stock identity of short-finned squid (*Illex illecebrosus*) in the Northwest Atlantic. *Scientific Council Studies*, **7**: 77–86.
- De, N.C.** 1990. Some new data on the morphology of the nematode *Lappetascaris lutjani* Rasheed, 1965 (Nematoda: Anisakidae). *Folia Parasitologica*, **37**: 295–299.
- De Pierrepont, J.F., Dubois, B., Desormonts, S., Santos, M.B. & Robin, J.P.** 2005. Stomach contents of English Channel cetaceans stranded on the coast of Normandy. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* **85**: 1539–1546.
- De Vico, G., Carella, F.** 2012. Morphological features of the inflammatory response in molluscs. *Research in Veterinary Science*, **93**: 1109–1115.
- Deardorff, T.L., Overstreet, R.M.** 1980. Review of *Hysterothylacium* and *Iheringascaris* (both previously = *Thynnascaris*) (Nematoda: Anisakidae). Proceedings of the Biological Society of Washington **93**: 1035–1079.
- Dobell, C.C.** 1909. Some Observations on the Infusoria Parasitic in Cephalopoda. *Quarterly Journal of Microscopical Science*, **53**: 183–199.

- Dogiel, V.A., Bychovsky, B.E.** 1939. Parasites of the fishes of the Caspian Sea. *Trudy Kompleksnoi Izucheniya Kaspiikogo Morya*, **7**: 1–150.
- Dollfus, R.P.** 1958. Copépodes, Isopodes et Helminthes parasites de Céphalopodes de la Méditerranée et de l'Atlantique Européen. *Faune Marine des Pyrénées Orientales*, **1**: 61–72.
- Dyková, I. Lom, J.** 1981. Fish coccidia. Critical notes on life cycles, classification and pathogenicity. *Journal of Fish Diseases*, **4**: 487–505.
- Estevez, J., Pascual, S., Gestal, C., Soto, M., Rodriguez, H., Arias, C.** 1996. *Aggregata octopiana* (Apicomplexa: Aggregatidae) from *Octopus vulgaris* off NW Spain. *Diseases Of Aquatic Organisms*, **27**: 227–231.
- Fang, W., Xu, S., Zhang, S., Wang, Y., Chen, X., Luo, D.** 2010. Multiple primer PCR for the identification of anisakid nematodes from Taiwan Strait. *Experimental Parasitology*, **124**: 197–201.
- FAO**, 2013. FAO yearbook 2011. Fishery and Aquaculture Statistics. Capture Production. Statistics and Information Branch of the Fisheries and Aquaculture Department, Roma. 609 pp.
- Farjallah, S., Ben Slimane, B., Busi, M., Paggi, L., Amor, N., Blel, H., Said, K., D'Amelio, S.** 2008. Occurrence and molecular identification of *Anisakis* spp. from the North African coasts of Mediterranean Sea. *Parasitology Research*, **102**: 371–379.
- Felizardo, N.N., Justo, M.C., Knoff, M., Fonseca, M.C., Pinto, R.M., Gomes, D.C.** 2011. Juvenile didymozoids of the types, *Torticaecum* and *Neotorticaecum* (Didymozoidae: Digenea), from new marine fish hosts (Pisces: Teleostei) in the neotropical region of Brazil. *Journal of Helminthology*, **85**: 270–275.
- Figus, V.** 2001. Aspetti del ciclo biologico di *Hysterothylacium* sp. (Nematoda: Anisakidae) in *Uranoscopus scaber* L.. *Biologia Marina Mediterranea*, **8**: 822–825.
- Figus, V., Culurgioni, J., Cortis, M., D'Amico, V., Canestri Trotti, G.** 2004. Trematodi Digenei di *Mullus surmuletus* (L., 1758) del Golfo di Cagliari, Sardegna meridionale. *Ittiopatologia* **1**: 41–48.
- Furuya, H., Tsuneki, K.**, 2003. Biology of dicyemid mesozoans. *Zoological Sciences* **20**: 519–532.
- Furuya, H.**, 2010. A new dicyemid from *Benthoctopus sibiricus* (Mollusca: Cephalopoda: Octopoda). *Journal of Parasitology* **96**: 1123–1127.
- Galil, B.S.** 2007. Seeing Red: Alien species along the Mediterranean coast of Israel. *Aquatic Invasions*, **2**: 281–312.
- Gazzonis, A.L., Manfredi, M.T., Garippa, G.** 2012. Parassiti dei cetacei in Italia - In: Cetacei dei mari italiani : diffusione, spiaggiamenti e problematiche sanitarie (Mappe parassitologiche, 16) [a cura di] M.T. Manfredi, A.L. Gazzonis, P. Merella, G. Garippa, V. Musella. - [s.l.] : Giuseppe Cringoli. - ISBN 978-88-89132-58-6. - pp. 49-57

- Gestal, C., Abollo, E., Arias, G., Pascual, S.**, 1997. *Dicyema typus* Van Beneden, 1876 (Dicyema: Dicyemidae), un mesozoo parásito del “riñón” de *Octopus vulgaris* Curier, 1797 (Mollusca: Cephalopoda) del noroeste de España. *Revista Iberica de Parasitologia* **57**: 85–87.
- Gestal, C., Belcari, P., Abollo, E., Pascual, S.** 1999. Parasites of cephalopods in the northern Thyrrenian Sea (western Mediterranean): new host records and host specificity. *Scientia Marina*, **63**: 39–43.
- Gestal, C., Guerra, A., Abollo, E., Pascual, S.** 2000. *Aggregata sagittata* n. sp. (Apicomplexa: Aggregatidae), a coccidian parasite from the European flying squid *Todarodes sagittatus* (Mollusca: Cephalopoda). *Systematic Parasitology*, **47**: 203–206.
- Gestal, C., Guerra, A., Pascual, S., Azevedo, C.** 2002a. On the life cycle of *Aggregata eberthi* and observations on *Aggregata octopiana* (Apicomplexa, Aggregatidae) from Galicia (NE Atlantic). *Eur J Protistol*, **37**: 427–435.
- Gestal, C., Abollo, E., Pascual, S.** 2002b. Observations on associated histopathology with *Aggregata octopiana* infection (Protista: Apicomplexa) in *Octopus vulgaris*. *Diseases of Aquatic Organisms*, **50**: 45–49.
- Gestal, C., Pàez de la Cadena, M., Pascual, S.** 2002c. Malabsorption syndrome observed in the common octopus *Octopus vulgaris* infected with *Aggregata octopiana* (Protista: Apicomplexa). *Diseases of Aquatic Organisms*, **51**: 61–65.
- Gestal, C., Serra, C., Guerra, A., Pascual, S.** 2002d. Scratching the sporocyst surface: characterisation of European *Aggregata* species by atomic force microscopy. *Parasitology Research*, **88**: 242–246.
- Gestal, C., Pascual, S.** 2002e. Comparative x-ray microanalysis of the sporocyst wall of *Aggregata octopiana* and *Aggregata eberthi* (Protista: Apicomplexa). *European Journal of Protistology*, **38**: 209–211.
- Gestal, C., Nigmatullin, C.M., Hochberg, F.G., Guerra, A., Pascual, S.** 2005. *Aggregata andresi* n. sp. (Apicomplexa: Aggregatidae) from the ommastrephid squid *Martialia hyadesi* in the SW Atlantic Ocean and some general remarks on *Aggregata* spp. in cephalopod hosts. *Systematic Parasitology*, **60**: 65–73.
- Gestal, C., Guerra, A., Pascual, S.** 2007a. *Aggregata octopiana* (Protista: Apicomplexa): a dangerous pathogen during commercial *Octopus vulgaris* ongrowing. *ICES Journal of Marine Science*, **64**: 1743–1748.
- Gestal, C., Abollo E., Arias, C., Pascual, S.** 2007b. Larval nematodes (Spiruroidea: Cystidicolidae) in *Octopus vulgaris* (Mollusca: Cephalopoda: Octopodidae) from the northeastern Atlantic Ocean. *The Journal of Parasitology*, **85**: 508–511.

- Gestal, C., Pascual, S., Hochberg, F.G.** 2010. *Aggregata bathytherma* sp. nov. (Apicomplexa: Aggregatidae), a new coccidian parasite associated with a deep-sea hydrothermal vent octopus. *Diseases of Aquatic Organisms*, **91**: 237–42.
- Gibson, D.I.** 2002. Class Trematoda Rudolphi, 1808. In: Gibson, D.I., Jones, A., Bray, R.A. (Eds.), *Keys to the Trematoda Vol. 1* CAB International and the Natural History Museum, London. pp. 1–3.
- Giuffrida, A., Ziino, G., Pennisi, L.** 2002. Larva *Anisakis* in *Sepia officinalis* del Mediterraneo – First report of *Anisakis* larva in one specimen of *Sepia officinalis* of Mediterranean sea. *Industrie Alimentari*, **41**: 1086–1088.
- Gómez del Prado-Rosas, M.C., Álvarez-Cadena, J.N., Segura-Puertas, L., Lamothe-Argumedo, R.** 2007. Didymozoid *Monilicaecum* type trematodes in chaetognaths from the Mexican Caribbean Sea. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, **78**: 483–487.
- González, A.F., Pascual, S., Gestal, C., Abollo E., Guerra, A.** 1998. *Vulcanoctopus hydrothermalis* gen. et sp. nov. (Mollusca, Cephalopoda): an octopus from a deep-sea hydrothermal vent site. *Cahiers de Biologie Marine*, **39**: 169–184.
- González, R.A., Kroeck, M.A.** 2000. Enteric helminths of the shortfin squid *Illex argentinus* in San Matías Gulf (Argentina) as stock discriminants. *Acta Parasitologica*, **45**: 89–93.
- González, A.F., Pascual, S., Gestal, C., Abollo E., Guerra, A.** 2003. What makes a cephalopod a suitable host for parasite? The case of Galician waters. *Fisheries Research*, **60**: 177–183.
- González, A.F., Guerra, A., Pascual, S., Segonzac, M.** 2008. Female description of the hydrothermal vent cephalopod *Vulcanoctopus hydrothermalis*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, **88**: 375–379.
- Grabda, J.** 1976. Studies on the life cycle and the morphogenesis of *Anisakis simplex* (rudolphi, 1809) (Nematoda: Anisakidae) cultured in vitro. *Acta Ichthyologica et Piscatoria*, **6**: 119–141.
- Grabda, J.** 1991. *Marine parasitology. An outline.* PWN, Polis Scientific Publishers, Warsaw. 306 pp.
- Guerra, A.** 1991. Cephalopod resources in the world: a present day view. *Proceedings of the 2° World Conference “Squid ’91 Madrid”*: 1–13.
- Guerra, A., Perez-Gandaras, G.** 1983. Las pesquerías mundiales des Cephalòpodos: situacion actual y perspectivas. *Informes técnicos del Instituto de Investigaciones Pesqueras*, 102-104, 141pp.
- Guerra, A., Allcock, L., Pereira, J.** 2010. Cephalopod life history, ecology and fisheries: An introduction. *Fisheries Research* **106**: 117–124.
- Haimovici, M., Brunetti, N.E., Rodhouse, P.G., Csirke, J., Leta, R.H.** 1998. Chapter 3. *Illex argentinus*. In: Rodhouse, P.G., Dawe, E.G., O’Dor, R.K. (Eds.), *Squid recruitment dynamics – The*

genus *Illex* as a model, the commercial *Illex* species and Influences on Variability. *FAO Fisheries Technical Paper*, **376**: 27–58.

Hanlon, R.T., Forsythe, J.W. 1990. Diseases Caused By Microorganisms (Subchapter). In: Kinne, O. (Ed.), *Diseases of Marine Animals. Vol. III: Cephalopoda to Urochordata*. Biologische Anstalt Helgoland, Hamburg, pp. 31–46.

Hanlon R.T., Messenger J.B. 1996. *Cephalopod behaviour*. Cambridge University Press, U.K, 232 p.

Hartwich, G. 1974. Keys to the genera of the Ascaridoidea. In: Anderson, Chabaud, Willmott (Eds). *Keys to the nematode parasites of vertebrates 2*. England, Commonwealth Agricultural Bureaux. Farnham Royal Bucks, 27p.

Hastie, L.C., Pierce, G.J., Wang, J., Bruno, I., Moreno, A., Piatkowski, U., Robin, J.P. 2009. Cephalopods in the North-Eastern Atlantic: Species, Biogeography, Ecology, Exploitation and Conservation. *Oceanography and Marine Biology: An Annual Review*, **47**: 111–190.

Healy C.J., Janine N. Caira J.N., Jensen K., Webster B.L., Littlewood, D.T.J. 2009. Proposal for a new tapeworm order, Rhinebothriidea. *International Journal for Parasitology*, **39**: 497–511.

Herrington, W.C., Bearnse, H.M., Firth, F.E. 1939. Observations on the life history, occurrence and distribution of the redfish parasite *Sphyrion lumpi*. *United States Bureau of Fisheries Special Report*, **5**: 1–18.

Hochberg, F.G. 1983. The parasites of cephalopods: a review. *Memoirs of the National Museum Victoria*, **44**: 109–145.

Hochberg, F.G. 1989. Les Parasites. In: Grassé, P.P. & Mangold, K. (Eds). *Traité de Zoologie. Anatomie, systématique, biologie. Tome V, Fascicule 4. Cephalopodes*. Masson, Paris, pp. 589-608.

Hochberg, F.G. 1990. Diseases of Mollusca: Cephalopoda. In: Kinne, O. (Ed.), *Diseases of Marine Animals. Vol. III: Cephalopoda to Urochordata*. Biologische Anstalt Helgoland, Hamburg, pp. 47–227.

Ibáñez, C.M., Pardo-Gandarillas, M.C., George-Nascimento, M. 2005. Uso del microhábitat por el protozoo parásito *Aggregata patagonica* Sardella, Ré & Timi, 2000 (Apicomplexa: Aggregatidae) en su hospedador definitivo, el pulpo *Enteroctopus megalocyathus* (Gould, 1852) (Cephalopoda: Octopodidae) en el sur de Chile. *Revista Chilena de Historia Natural*, **78**: 441–450.

Jensen, K., Bullard, S.A. 2010. Characterization of a diversity of tetraphyllidean and rhinebothriidean cestode larval types, with comments on host associations and life-cycles. *International Journal for Parasitology*, **40**: 889–910.

Jereb, P., Roper, C.F.E. (Eds.) 2005. *Cephalopods of the world. An annotated and illustrated catalogue of cephalopod species known to date. Volume 1. Chambered nautilus and sepioids*

(*Nautilidae, Sepiidae, Sepiolidae, Sepiadariidae, Idiosepiidae and Spirulidae*). FAO Species Catalogue for Fishery Purposes. No. 4, Vol. 1. Rome, FAO. 262 pp. 9 colour plates.

Jereb, P., Roper, C.F.E. (Eds.) 2010. *Cephalopods of the world. An annotated and illustrated catalogue of cephalopod species known to date. Volume 2. Myopsid and Oegopsid Squids*. FAO Species Catalogue for Fishery Purposes. No. 4, Vol. 2. Rome, FAO. 605pp. 10 colour plates.

Jereb, P., Vecchione, M. & Roper, C.F.E. 2010. Family Loliginidae. In: Jereb, P., Roper, C.F.E. (Eds.), *Cephalopods of the world. An annotated and illustrated catalogue of species known to date. Volume 2. Myopsid and Oegopsid Squids*. FAO Species Catalogue for Fishery Purposes. No. 4, Vol. 2. Rome, FAO. pp. 38–117.

Jereb, P., Battaglia, P., Bello, G., Cannas, R., Duysak, Ö., Garibaldi, F., Hoving, H.J.T., Lefkaditou, E., Lipinski, M.R., Maiorano, P., Marcias, S., Mereu, M., Peristeraki, P., Ragonese, S., Romeo, T., Salman, A., Santos, B., Villari, A., Cuccu D. 2012. The genus *Octopoteuthis* and the Mediterranean Sea: a look in the deep. *Cephalopod International Advisory Council - CIAC Symposium – Florianopolis (Brasile) 27 ottobre- 02 novembre 2012*.

Johansen, K., Huston, M.J. 1962. Effects of some drugs on the circulatory system of the intact, non-anesthetized cephalopod, *Octopus dofleini*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, **5**: 177–178.

Jones, G.M., O'Dor, R.K. 1983. Ultrastructural observations on a thraustochytrid fungus parasitic in the gills of squid (*Illex illecebrosus* Legueur). *Journal of Parasitology*, **69**: 903–911.

Justine, J.-L., Briand, M.J., Bray, R.A. 2012. A quick and simple method, usable in the field, for collecting parasites in suitable condition for both morphological and molecular studies. *Parasitology Research*, **111**: 341–351

Juorio, A.V., Barlow, J.J. 1974. Catecholamine levels in the vertical lobes of *Octopus vulgaris* and other cephalopods and the effect of experimental degeneration. *Comparative and General Pharmacology*, **5**: 281–284.

Kaspiris, P., Tsiambaos, P. 1984. Some uncommon cephalopods from western Kourinthiakos Gulf (Mollusca-Dibranchiata). *Institut za Oceanografiju I Ribarstvo – Split. Bilješke*, **62**: 1–4.

Kinne, O. (Ed.) 1990. Diseases of Marine Animals. Vol. III: Cephalopoda to Urochordata. Biologische Anstalt Helgoland, Hamburg, pp. 696.

Knoff, M., Felizardo, N.N., Iñiguez A.M., Maldonado, A., Torres, E.J.L., Magalhães Pinto R., Corrêa Gomes, D. 2012. Genetic and morphological characterisation of a new species of the genus *Hysterothylacium* (Nematoda) from *Paralichthys isosceles* Jordan, 1890 (Pisces: Teleostei) of the Neotropical Region, state of Rio de Janeiro, Brazil. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, **107**: 186–193.

- Kotsoubas, D., Boyle, P.** 1999. *Histioteuthis bonnellii* (Férussac 1835)(Cephalopoda) in the Eastern Mediterranean: new record and biological considerations. *Journal of Mollusca Studies*, **65**: 380–383.
- Køie, M.** 1979. On the morphology and life-history of *Derogenes varicus* (Müller, 1784) Looss, 1901 (Trematoda, Hemiuridae). *Zeitschrift für Parasitenkunde*, **59**: 67–78.
- Køie, M.** 1993. Aspects of the life cycle and morphology of *Hysterothylacium aduncum* (Rudolphi, 1802) (Nematoda, Ascaridoidea, Anisakidae). *Canadian Journal of Zoology*, **71**: 1289–1296.
- Kurochkin, Y.V., Nikolaeva, V.M.** 1978. The basis of didymozoid metacercaria systematics. In Theses of reports of the All-Union Congress of Parasitocenologists, p. 82–84.
- Licciardo, G., Garziano, A., Nocera, G., Gaglio, G., Marino, F., De Vico, G.** 2005. Contributo alla conoscenza dell'azione patogena di *Aggregata octopiana* (Apicomplexa: Aggregatidae) in *Octopus vulgaris* nel sud del Mar Tirreno. *Ittiopatologia*, **2**: 193–19.
- Ma, H.W., Jiang, T.J., Quan, F.S., Chen, X.G., Wang, H.D., Zhang, Y.S., Cui, M.S., Zhi, W.Y., Jiang, D.C.** 1997. The infection status of anisakid larvae in marine fish and cephalopods from the Bohai Sea, China and their taxonomical consideration. *The Korean Journal of Parasitology*, **35**: 19–24.
- MacKenzie, K., Abaunza, P.**, 2005. Parasites as biological tags. In: Cadrin, S.X., Friedland, K.D., Waldman, J.R. (Eds.). *Stock Identification Methods. Applications in Fisheries Science*. Elsevier Academic Press, San Diego, 211-26.
- Maggenti, A.** 1981. *General Nematology*. Springer-Verlag New York, 372 pp.
- Mangold-Wirtz, K.** 1963. Biologie des Céphalopodes benthiques et nectoniques de la mer Catalane. *Vie Millieu, Supplement*, 285 pp.
- Mangold, K.** (Ed.) 1989. Céphalopodes. Tome 5, Fascicule 4. In: Grassé, P.P. (Ed.). *Traité de Zoologie. Anatomie, Systématique, Biologie*. Masson, Paris, 804 pp.
- 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). *International Journal of Parasitology*, **31**: 9–14.
- Mattiucci, S., Nascetti, G., Dailey, M., Webb, S.C., Barros, N.B., Cianchi, R., Bullini, L.** 2005. Evidence for a new species of *Anisakis* Dujardin, 1845: morphological description and genetic relationships between congeners (Nematoda: Anisakidae). *Systematic Parasitology*, **61**: 157–171.
- 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.** 2008a. Advances and trends in the molecular systematics of anisakid nematodes, with implications for their evolutionary ecology and host-parasite co-evolutionary processes. *Advances in Parasitology*, **66**: 47–148.
- Mattiucci, S., Farina, V., Campbell N., MacKenzie, K., Ramos, P., Pinto, A.L., Abaunza, P., Nascetti, G.** 2008b. *Anisakis* spp. larvae (Nematoda: Anisakidae) from Atlantic horse mackerel: Their genetic identification and use as biological tags for host stock characterization. *Fisheries Research*, **89**: 146–151.
- 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. *Systematic Parasitology*, **74**: 199–217.
- Mayo-Hernández, E. Barcala, E., Berriatua, E., García-Ayala, A., Muñoz, P.** 2013. *Aggregata* (Protozoa: Apicomplexa) infection in the common octopus *Octopus vulgaris* from the West Mediterranean Sea: The infection rates and possible effect of faunistic, environmental and ecological factors. *Journal of Sea Research*, **83**: 195–201
- McClellan, G.** 2005. Nematoda (roundworms). In: Rohde, K. (Ed), Marine parasitology. CABI Publishing, Wallingford, UK, pp. 104–115.
- McLean, N., Hochberg, F.G., Shinn G.L.** 1987. Giant protistan parasites on the gills of cephalopods (Mollusca). *Diseases of Aquatic Organisms*, **3**: 119–125.
- Mele, S., Culurgioni, J., Merella, P., Cau, A., D'Amico, V., Figus, V., Garippa, G., Addis P.** 2010a. The usefulness of the metazoan gill parasites of Atlantic bluefin tuna *Thunnus thynnus* (L.) as biological tags. *XIX Congresso del Gruppo per l'Ecologia di Base "G. Gadio", Il ruolo delle aree protette per la tutela della biodiversità. Olbia, 21-23 maggio 2010. Abstract book*: 74.
- Mele, S., Merella, P., Macías, D., Gómez, M.J., Garippa, G., Alemany, F.** 2010b. Metazoan gill parasites of wild albacore *Thunnus alalunga* (Bonaterre, 1788) from the Balearic Sea (western Mediterranean) and their use as biological tags. *Fisheries Research*, **102**: 305–310.
- Mele, S., Macías, D., Gómez, M.J., Garippa, G., Alemany, F., Merella, P.** 2012. Metazoan parasites on the gills of the skipjack tuna *Katsuwonus pelamis* (Osteichthyes: Scombridae) from the Alboran Sea (western Mediterranean Sea). *Diseases of Aquatic Organisms*, **97**: 219–225.
- Mereu, M., Masala, P., Maccioni, A., Stacca, D., Cau, Al., Cuccu D.** 2010. Tagging *Octopus vulgaris* (Octopoda: Octopodidae) in an area of central Sardinian waters. *Biologia Marina Mediterranea*, **17**: 306–307.
- Mereu, M., Agus, B., Cau, Al., Cuccu, D.** 2012. On a female of *Tremoctopus* sp. (Octopoda: Tremoctopodidae) caught in the Sardinian Sea. *Biologia Marina Mediterranea*, **19**: 214–215.

- Mereu, M., Agus, B., Cau, A., Marongiu, M.F., Jereb, P., Cuccu, D.** 2013. Finding of two loliginidae egg masses in the Sardinian waters. *Biologia Marina Mediterranea*, **20**: 194–195.
- Mladineo, I., Jozic, M.** 2005. *Aggregata* infection in the common octopus, *Octopus vulgaris* (Linnaeus, 1758), Cephalopoda: Octopodidae, reared in a flow-through system. *Acta Adriatica*, **46**: 193–199.
- Mladineo, I.** 2006a. *Hepatoxylon trichiuri* (Cestoda: Trypanorhyncha plerocercoids in cage-reared northern bluefin tuna, *Thunnus thynnus* (Osteichthyes: Scombridae). *Acta Adriatica*, **47**: 79–83.
- Mladineo, I.** 2006b. Histopathology of five species of *Didymocystis* spp. (Digenea: Didymozoidae) in cage-reared Atlantic bluefin tuna (*Thunnus thynnus thynnus*). *Vet. Res. Commun.* **30**: 475–484.
- Mladineo, I., Bočina, I.** 2007. Extraintestinal gamogony of *Aggregata octopiana* in the reared common octopus (*Octopus vulgaris*) (Cephalopoda: Octopodidae). *Journal of Invertebrate Pathology*, **96**: 261–264.
- Moravec, F.** 1994. Parasitic Nematodes of Freshwater Fishes of Europe. Academia and Kluwer Academic Publishers, Prague and Dordrecht, Boston, London, 473 pp.
- Moravec, F.** 2007. Some aspects of the taxonomy and biology of adult spirurine nematodes parasitic in fishes: a review. *Folia Parasitologica* **54**: 239–257.
- Moravec, F., Justine, J.L.** 2006. Three nematode species from elasmobranchs off New Caledonia. *Systematic Parasitology*, **64**: 131–145.
- Moravec, F., Scholz, T.** 1991. Observations on some nematodes parasitic in freshwater fishes in Laos. *Folia Parasitologica*, **38**: 163–178.
- Mulas, A., Bellodi, A., Cau, A., Gastoni, A., Locci, I., Follesa, M.C.** 2011. Trophic interactions among Chondrichthyans in the central-western Mediterranean Sea. *Biologia Marina Mediterranea*, **18**: 81–84.
- 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. *Faculty Publications from the Harold W. Manter Laboratory of Parasitology*. Paper 708.
- Nagasawa, K., Nakata, J.** 1984. Parasite fauna of oceanic squids from the northern North Pacific (Preliminary report). (Appendix: Bibliography of parasites of squids of Japan). (In Japanese). *Cont. Fisheries Research Japan Sea Block*, **2**: 83–89.
- Nagasawa, K., Mori, J., Okamura, H.** 1998. Parasites as biological tags of stocks of neon flying squid (*Ommastrephes bartramii*) in the North Pacific Ocean. *In*: Okutani, T. (1998). *Contributed papers to International Symposium on Large Pelagic Squids, July 18-19, 1996, for JAMARC's 25th anniversary of its foundation*. pp. 49–64.

- Nagasawa, K., Moravec, F.** 1995. Larval anisakid nematodes of Japanese common squid (*Todarodes pacificus*) from the Sea of Japan. *Journal of Parasitology*, **81**: 69–75.
- Nagasawa, K., Moravec, F.** 2002. Larval anisakid nematodes from four species of squid (Cephalopoda: Teuthoidea) from the central and western Pacific Ocean. *Journal of Natural History*, **36**: 883–891.
- Naidenova, N. N., Nigmatullin, C. M., Gaevskaya, A. V.** 1985. The Helminth Fauna and Host-Parasite Relations of Squids *Sthenoteuthis oualaniensis* (Lesson) (Cephalopoda, Ommastrephidae) in the Indian Ocean and the Red Sea. In: Hargis, W.J. Jr. (Ed.), Parasitology and Pathology of Marine Organisms of the World Ocean, U.S. Department of Commerce, National Marine Fisheries Service. pp. 113–116.
- Nigmatullin, C.M., Shukhalter, O.A.** 1990. Helminthofauna y aspectos ecologicos de las relaciones parasitarias del calamar (*Illex argentinus*) en el Atlantico sudoccidental. *Frente Maritimo*, **7**: 57-68.
- Nigmatullin, C.M, Shchetinnikov, A.S Shukhgalter, O.A.** 2009. On feeding and helminth fauna of neon flying squid *Ommastrephes bartramii* (Lesueur, 1821) (Cephalophoda: Ommastrephidae) in the southeastern Pacific. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, **44**: 227–235.
- Nikolaeva, V.M.** 1985. Trematodes-Didymozoidae Fauna, Distribution and Biology. In: Hargis, W.J. Jr. (Ed.), Parasitology and Pathology of Marine Organisms of the World Ocean, U.S. Department of Commerce, National Marine Fisheries Service. pp. 67-72.
- Ogawa, K.** 1996. Marine parasitology with special reference to Japanese fisheries and mariculture. *Veterinary Parasitology*, **64**: 95–105.
- Ortis M., Paggi, L.** 2008. Nematoda Secernentea. *Biologia Marina Mediterranea*, **15**: 210–213.
- Overstreet, R.M., Hochberg, F.G.** 1975. Digenetic trematodes in cephalopods. *Journal of Marine Biologists Association of United Kingdom*, **55**: 893–910.
- Palm, H.W.** 1999. *Nybelinia* Poche, 1926, *Heteronybelinia* gen. nov. and *Mixonybelinia* gen. nov. (Cestoda, Trypanorhyncha) in the collections of the Natural History Museum, London. *Bulletin of Natural History Museum of London (Zool.)*, **65**: 133–153.
- Pardo-Gandarillas M.C., Lohrmann, K.B., Valdivia, A.L., Ibáñez, C.M.** 2009. First record of parasites of *Dosidicus gigas* (d' Orbigny, 1835) (Cephalopoda: Ommastrephidae) from the Humboldt Current system off Chile. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, **44**: 397–408.
- Pascual, S., Guerra, A.** 2001. Vexing question on fisheries research: the study of cephalopods and their parasites. *Iberus*, **19**: 87–95.
- Pascual, S., Resero, M., Arias, C., Guerra, A.** 1995a. Helminth fauna of the short finned squid *Illex coindetti* (Cephalopoda: Ommastrephidae) off NW Spain. *Diseases of Aquatic Organisms*, **23**: 71–75.

- Pascual, S., Gonzalez, A., Arias C., Guerra, A.** 1995b. Histopathology of larval *Anisakis simplex* B (Nematoda, Anisakidae), parasites of short-finned squid in the S.E. North Atlantic. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, **15**: 160–161.
- Pascual, S., Hochberg, F.G.** 1996. Marine Parasites as Biological Tags of Cephalopod Hosts. *Parasitology Today*, **12**: 324–327.
- Pascual, S., Gestal, C., Estevez, J.M., Rodriguez, H., Soto, M., Abollo, E., Arias, C.** 1996a. Parasites in commercially-exploited cephalopods (Mollusca, Cephalopoda) in Spain: an updated perspective. *Acquaculture*, **142**: 1–10.
- Pascual, S., Arias, C., Guerra, A.** 1996b. First record of the trypanorhynchidean parasite *Nybelinia lingualis* Cuvier, 1817 in the squid *Todaropsis eblanae* (Cephalopoda: Ommastrephidae). *Scientia Marina*, **60**: 553–555.
- Pascual, S., Gonzalez, A., Arias C., Guerra, A.** 1996c. Biotic relationships of *Illex coindetii* and *Todaropsis eblanae* (Cephalopoda, Ommastrephidae) in the Northeast Atlantic: vidence from parasites. *Sarsia*, **81**: 265–274.
- Pascual, S., Gonzalez, A.F., Guerra, A.** 2006. Unusual sites of *Aggregata octopiana* infection in octopus cultured in floating cages. *Aquaculture*, **254**: 21–23.
- Pascual, S., Gonzalez A.F., Guerra, A.** 2007. Parasites and cephalopod fisheries uncertainty: towards a waterfall understanding. *Review of Fish Biology and Fisheries*, **17**: 139–144.
- Peristeraki, P., Tserpes, G., Lefkaditou, L.** 2005. What cephalopod remains from *Xiphias gladius* stomachs can imply about predator-prey interactions in the Mediterranean Sea? *Journal of Fish Biology*, **67**: 549–554.
- Petrić, M., Mladineo, I., Krstulović Šifner, S.** 2011. Insight into the short-finned squid *Illex coindetii* (Cephalopoda: Ommastrephidae) feeding ecology: is there a link between helminth parasites and food composition? *Journal of Parasitology*, **97**: 55–62.
- Petter, A.J., Maillard, C.** 1988. Larves d'Ascarides parasites de poissons en Mediterranee occidentale. *Bulletin du Museum National d'Histoire Naturelle. Paris*, **4**: 347–369.
- Piatkowski, U., Hernandez-Garcia, V., Clarke, M.R.** 1998. On the biology of the European flying squid *Todarodes sagittatus* (Lamarck, 1798) (Cephalopoda, Ommastrephidae) in the central eastern Atlantic. *South African Journal of Marine Science*, **20**: 375–383.
- Piatkowski, U., Pierce, G. J., Morais da Cunha, M.** 2001. Impact of cephalopods in the food chain and their interaction with the environment and fisheries: an overview. *Fisheries Research*, **52**: 5–10.
- Pierce, G. J., Guerra, A.** 1994. Stock assessment methods used for cephalopod fisheries. *Fisheries Research*, **21**: 255–285.

- Pierce, G. J., Santos, M.B.** 1996. Trophic interactions of squid *Loligo forbesii* in Scottish waters. In: Greenstreet, S.P.R., Tasker, M.L. (Eds.), Aquatic predators and their prey. *Fishing News Books*, pp. 58–64.
- Pierce, G. J., Allcock, L., Bruno, I., Bustamante, P., González, A., Guerra, A., Jereb, P., Lefkaditou, E., Malham, S., Moreno, A., Pereira, J., Piatkowski, U., Rasero, M., Sanchez, P., Santos, M.B., Santurtún, M., Seixas, S., Sobrino, I., Villanueva, R.** 2010. Cephalopod biology and fisheries in Europe. ICES Cooperative Research Report No. 303. 175 pp.
- Polglase, J.L.** 1980. A preliminary report on the thraustochytrid(s) and labyrinthulid(s) associated with a pathological condition in the lesser octopus *Eledone cirrhosa*. *Botanica Marina*, **23**: 699–706.
- Polglase, J.L., Dix, N.J., Bullock, A.M.** 1984. Infection of skin wounds in the lesser octopus, *Eledone cirrhosa*, by *Cladosporium sphaerospermum*. *Transitions of the British Mycological Society*, **82**: 577–580.
- Pollerspöck, J.** 2012. Bibliography database of living/fossil sharks, rays and chimaeras (Chondrichthyes: Elasmobranchii, Holocephali) – Host-Parasites List, www.shark-references.com, WWW electronic publication, Version 08/2012, ISSN: 2195-6499.
- 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. *Journal of Parasitology*, **91**: 1430–1434.
- Poynton, S.L., Reimschuessel, R., Stoskopf, M.K.** 1992. *Aggregata dobelli* n. sp. and *Aggregata millerorum* n. sp. (Apicomplexa: Aggregatidae) from two species of octopus (Mollusca: Octopodidae) from the eastern North Pacific Ocean. *Journal of Protozoology*, **39**: 248–256.
- Pozdnyakov, S.E.** 1990. Revision of the genus *Didymocystis* and validation of the genus *Didymosulcus* gen. n. (Trematoda: Didymozoidae). *Zool. Zhurnal.*, **69**: 5–11.
- Pozdnyakov, S.E., Gibson, D.I.** 2008. Family Didymozoidae Monticelli, 1888. In: Bray R.A., Gibson D.I., Jones A. (Eds.), Keys to the Trematoda, Vol 3. CAB International and Natural History Museum, Wallingford, UK.
- Pozio, E.** 2013. Integrating animal health surveillance and food safety: the example of *Anisakis*. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*, **32**: 487–496
- Pörtner, H.O., O'Dor, R.K., Macmillan, D.L.** 1994. Physiology of Cephalopod Molluscs Lifestyle and Performance Adaptations. *Gordon and Breach Publishers*, 214 pp.
- Quetglas, A., Alemany, F., Carbonell, A., Merella, P., Sanchez, P.** 1998. Some aspects of the biology of *Todarodes sagittatus* (Cephalopoda: Ommastrephidae) from the Balearic Sea (Western Mediterranean). *Scientia Marina*, **62**: 73–82.

- Quetglas, A., Carbonell, A., Merella, P., Sanchez, P.** 1999. Diet of the European flying squid *Todarodes sagittatus* (Cephalopoda: Ommastrephidae) in the Balearic Sea (Western Mediterranean). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, **79**: 479–486.
- Quetglas, A., Oridines, F., González, M., Franco, I.** 2009. Life history of the bathyal octopus *Pteroctopus tetracirrhus* (Mollusca, Cephalopoda) in the Mediterranean Sea. *Deep-Sea Research I*, **56**: 1379–1390.
- Quetglas, A., de Mesa, A., Oridines, F., Grau, A.** 2010. Life history of the deep-sea cephalopod family Histiotteuthidae in the western Mediterranean. *Deep-Sea Research I*, **57**: 999–1008.
- Ragonese, S., Jereb, P.** 1990. Sulla teutofauna di interesse commerciale del canale di Sicilia. *Oebalia*, **16**: 745–748.
- Rasheed, S.** 1965. On a Remarkable New Nematode, *Lappetascaris lutjani* gen. et sp. nov. (Anisakidae: Ascaridoidea) from Marine Fishes of Karachi and an Account of *Thynnascaris iniquies* (Linton, 1901) n. comb. and *Goezia intermedia* n. sp.. *Journal of Helminthology*, **34**: 313–342.
- Rathjen, W.F. & G.L. Voss.** 1987. The cephalopod fisheries: a review. In: Boyle, P.R. (Ed.), *Cephalopod Life Cycles, Vol. II Comparative Reviews*, Academic Press, London, pp. 253–275.
- Reimer, L.W.** 1971. The position of cephalopods in life cycles of helminths of marine fishes. In *Abstracts of the Proceedings of the III International Congress on Parasitology, Munich, Germany, 25–31 August 1974*. pp. 1727–1728.
- Roberts, S.M.** 2003. Examination of the stomach contents from a Mediterranean sperm whale found south of Crete, Greece. *Journal of Marine Biological Association of the United Kingdom*, **83**: 667–670.
- Rocha, F., Guerra, A., González, A.F.** 2001. A review of reproductive strategies in cephalopods. *Biological reviews*, **76**: 291–304.
- Rocha, F., González, A.F., Segonzac, M., Guerra, A.** 2002. Behavioural observations of the cephalopod *Vulcanoctopus hydrothermalis*. *Cahiers de Biologie Marine*, **43**: 299–302.
- Rodríguez-Ibarra, E., Monks, S., Pulido-Flores, G.** 2011. Metacercarias del tipo *Paramonilicaecum* Digenea: Didymozoidae), parásitos accidentales de elasmobranchios (Elasmobranchii) del golfo de México e identificación de metacercarias (Didymozoidae) de la Colección Nacional de Helminths. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, **82**: 705–708.
- Rodríguez-Marín, E., Barreiro, S., Montero, F.E., Carbonell, E.** 2008. Looking for skin and gill parasites as biological tags for Atlantic bluefin tuna (*Thunnus thynnus*). *Aquatic Living Resources*, **21**: 365–371.
- Rohde K.** 2005. *Marine parasitology*. CABI Publishing, Wallingford, UK, 1–590.

- Roper, C.F.E., Sweeney, M. J., Nauen, E.** 1984. FAO Species Catalogue. Vol. 3 : Cephalopods of the World. An Annotated and Illustrated Catalogue of Species of Interest to Fisheries. *FAO Fisheries Synopsis*, **125**: 277 pp.
- Roper, C.F.E., Jereb, P.** 2010a. Family Histioteuthidae. In Jereb, P., Roper, C.F.E. (Eds.), Cephalopods of the world. An annotated and illustrated catalogue of species known to date. Volume 2. Myopsid and Oegopsid Squids. FAO Species Catalogue for Fishery Purposes. No. 4, Vol. 2. Rome, FAO. pp. 223–236.
- Roper, C.F.E., Jereb, P.** 2010b. Family Onychoteuthidae. In Jereb, P., Roper, C.F.E. (Eds.), Cephalopods of the world. An annotated and illustrated catalogue of species known to date. Volume 2. Myopsid and Oegopsid Squids. FAO Species Catalogue for Fishery Purposes. No. 4, Vol. 2. Rome, FAO. pp. 348–369.
- Roper, C.F.E., Jereb, P.** 2010c. Family Octopoteuthidae. In Jereb, P., Roper, C.F.E. (Eds.), Cephalopods of the world. An annotated and illustrated catalogue of species known to date. Volume 2. Myopsid and Oegopsid Squids. FAO Species Catalogue for Fishery Purposes. No. 4, Vol. 2. Rome, FAO. pp. 262–268.
- Roper, C.F.E., Jereb, P.** 2010d. Family Ancistrocheiridae. In Jereb, P., Roper, C.F.E. (Eds.), Cephalopods of the world. An annotated and illustrated catalogue of species known to date. Volume 2. Myopsid and Oegopsid Squids. FAO Species Catalogue for Fishery Purposes. No. 4, Vol. 2. Rome, FAO. pp. 118–120.
- Roper, C.F.E., Nigmatullin C., Jereb P.** 2010. Family Ommastrephidae. In Jereb, P., Roper, C.F.E. (Eds.), Cephalopods of the world. An annotated and illustrated catalogue of species known to date. Volume 2. Myopsid and Oegopsid Squids. FAO Species Catalogue for Fishery Purposes. No. 4, Vol. 2. Rome, FAO. pp. 269–347.
- Roper, C.F.E., Voss, G.L.** 1983. Guidelines for taxonomic descriptions of Cephalopod species. *Memoirs of the National Museum Victoria*, **44**, 49–63.
- Salman, A., Katağan, T., Benli, H.A.** 2002. Cephalopod fauna of the Eastern Mediterranean. *Turkish Journal of Zoology*, **26**: 47–52.
- Santos, M.B., Pierce, G.J., Boyle, P.R., Reid, R.J., Ross, H.M., Patterson, I.A.P., Kinze, C.C., Tougaard, S., Lick, R., Piatkowski, U., Hernandez-Garcia, V.** 1999. Stomach contents of sperm whale *Physeter macrocephalus* stranded in the North Sea 1990-1996. *Marine Ecology Progress Series*, **183**: 281–294.
- Santos, M.B., Clarke, M.R., Pierce, G.J.** 2001. Assessing the importance of cephalopods in the diets of marine mammals and other top predators: problems and solutions. *Fisheries Research*, **52**: 121–139.

- Sardella, N.H., Roldán, M.I., Tanzola, D.** 1990. Helminths parasites of the squid (*Illex argentinus*) (de Castellanos, 1960) in the subpopulation bonaerense-norpatagónica. *Frente Marítimo*, **7**: 53–56.
- Sardella, N.H., Martorelli, S.R.** 1997. Occurrence of merogony of *Aggregata* Frenzel 1885 (Apicomplexa) in *Pleoticus muelleri* and *Artemesia longinaris* (Crustacea: Natantia) from Patagonian waters (Argentina). *Journal of Invertebrate Pathology* **70**: 198–202.
- Sardella, N.H., Re, M.E. & Timi, J.T.** (2000) Two new *Aggregata* species (Apicomplexa: Aggregatidae) infecting *Octopus tehuelchus* and *Enteroctopus megalocyathus* (Mollusca: Octopodidae) in Patagonia, Argentina. *Journal of Parasitology*, **86**, 1107–1113.
- Sartor, P., Belcari, P., Carbonell, A., Gonzalez, M., Quetglas, A., Sanchez, P.** 1998. The importance of cephalopods to trawl fisheries in the western Mediterranean Sea. In: Payne, A.I.L., Lipinski, M.R., Roeleveld, M.A.C. (eds). Cephalopod Biodiversity, Ecology and Evolution. South African Journal of Marine Science, **20**: 67–72.
- Schmidt, G.D.** 1986. Handbook of tapeworm identification. CRC Press, Boca Raton, Fla.
- Scholz, T., Euzet, L., Moravec, F.** 1998. Taxonomic status of *Pelichnibothrium speciosum* Monticelli, 1889 (Cestoda: Tetraphyllidae), a mysterious parasite of *Alepisaurus ferox* Lowe (Teleostei: Alepisauridae) and *Prionace glauca* (L.) (Euselachii: Carcharinidae). *Systematic Parasitology*, **41**: 1–8.
- Semmens, J.M., Pecl, G.T., Gillanders, B.M., Waluda, C.M., Shea, E.K., Jouffre, D., Ichii, T., Zumholz, K., Katugin, O.N., Leporati, S.C., Shaw, P.W.** 2007. Approaches to resolving cephalopod movement and migration patterns. *Review Fish Biology and Fisheries*, **17**: 401–423.
- Setyobudi, E., Jeon, C.H., Choi, K., Lee, S.I., Lee, C.I., Kim, J.H.** 2013. Molecular identification of anisakid nematodes third stage larvae isolated from common squid (*Todarodes pacificus*) in Korea. *Ocean Science Journal*, **48**: 197–205.
- Shamsi, S., Gasser, R., Beveridge, I.** 2013. Description and genetic characterisation of *Hysterothylacium* (Nematoda: Raphidascarididae) larvae parasitic in Australian marine fishes. *Parasitology International*, **62**: 320–328.
- Shukhgalter, O.A., Nigmatullin, C.M.** 2001. Parasitic helminths of jumbo squid *Dosidicus gigas* (Cephalopoda: Ommastrephidae) in open waters of the central east Pacific. *Fisheries Research*, **54**: 95–110.
- Smale, M.J.** 1996. Cephalopods as prey. IV. Fishes. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B*, **351**: 1067–1081.
- Smith, P.J., Roberts, P.E., Hurst, R.J.** 1981. Evidence for two species of arrow squid in the New Zealand fishery. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, **15**: 247–253.

- Soota, T.D., Dey-Sarkar, S.R.** 1980. On three species of the nematode genus *Cucullanus* Mueller 1777, and a note on *Lappetascaris lutjani* Rasheed, 1965 from Indian marine fishes. *Records of the Zoological Survey of India*, **76**: 1–6.
- Speare, P.** 1995. Parasites as biological tags for sailfish *Istiophorus platypterus* from east coast Australian waters. *Marine Ecology Progress Series*, **118**: 43–50.
- Sprague, V., Couch, J.** 1971. An annotated list of protozoan parasites, hyperparasites, and commensals of decapod Crustacea. *Journal of Protozoology*, **18**: 526–537.
- Sprent, J.F.A.** 1977. Ascaridoid nematodes of amphibians and reptiles: *Sulcascaris*. *Journal of Helminthology*, **51**: 379–387.
- Storai, T., Zuffa, M., Gioia, R.** 2001. Evidenze di predazione su odontoceti da parte di *Isurus oxyrinchus* (Rafinesque, 1810) nel Tirreno meridionale e Mar Ionio (Mediterraneo). *Atti Società Toscana Scienze Naturali*, **108**: 71-75.
- Stunkard, H.W.** 1977. Studies on tetraphyllidean and tetrarhynchidean metacestodes from squid taken on the New England coast. *Biology Bulletin*, **153**: 387–412.
- Sweeney, M.J. Roper, C.F.E.** 1998. Classification, type localities, and type repositories of recent Cephalopoda. In: Voss, N.A., Vecchione, M.V., Toll, R.B., Sweeney, M.J. (Eds.) Systematics and Biogeography of Cephalopods, Vol. II. *Smithsonian Contributions to Zoology*, **586**: 561–599.
- Swofford DL.** 2003. PAUP*. Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods). v. 4. Sinauer Associates, Sunderland, MA, USA.
- Takahara, H., Sakurai, Y.** 2010. Infection of the Japanese common squid, *Todarodes pacificus* (Cephalopoda: Ommastrephidae) by larval anisakid nematodes. *Fisheries Research*, **106**: 156–159.
- Tedde, T., Piras M.C., Merella P., Mele P., Lorenzoni G., Rosa M.N., Salza S., Assaretti A., Santoru F., Marongiu E., Virgilio S.** 2012. Caratterizzazione biomolecolare di nematodi anisakidi in specie ittiche marine pescate nel Nord Sardegna. *Italian Journal of Food Safety*, **1**: 107–108.
- Theodorides, J., Desportes, I.** 1975. Sporozoaires d'invertebres pelagiques de Villefranche-sur Mer (etude descriptive et faunistique). *Protistologica*, **11**: 205–220.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Geanmougin, F., Higgins, D.G.** 1997. The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, **25**: 4876–82.
- Torchio, M.** 1967. Reperti di *Histioteuthis bonelliana* (Férussac) e di *Ornmastrephes bartrami* (Lesueur) in acque neritiche del Golfo di Taranto. (*Cephalopoda, Dibranchiata*). *Museo Civico di Storia Naturale di Milano – Acquario*, 30–36.

- Unger, M.A., Vadas, G.G., Harvey, E., Vecchione, M.** 2006. Accumulation of persistent organic pollutants and tributyltin in nine species of Atlantic deep-sea cephalopods. *Proceedings of the 11th International Deep-Sea Biology Symposium, National Oceanography Centre, Southampton, UK 9-14 July 2006.*
- Valentini, A., Mattiucci, S., Bondanelli, P., Webb, S.C., Mignucci-Giannone, A., Colom-Llavina, M.M., Nascetti, G.** 2006. Genetic relationships among anisakis species (Nematoda: Anisakidae) inferred from mitochondrial cox2 sequences, and comparison with allozyme data. *Journal of Parasitology*, **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. *Journal of Helminthology*, **74**: 361–364.
- van Dijk, D., Nierich, A.P., Eefting, F.D., Buskens, E., Nathoe, H.M., Jansen, E.W.L., Borst, C., Knape, J.T.A., Bredée, J.J., Robles de Medina, E.O., Grobbee, D.E., Diephuis, J.C., de Jaegere, Peter P.Th.** 2000. The *Octopus* study: rationale and design of two randomized trials on medical effectiveness, safety, and cost-effectiveness of bypass surgery on the beating heart. *Controlled Clinical Trials*, **21**: 595–609.
- Verne, J.** 1870. Vingt mille lieues sous les mers. Hetzel, Paris.
- Vicente, J.J., Mincarone, M.M., Pinto, R.M.** 2002. First Report of *Lappetascaris lutjani* Rasheed, 1965 (Nematoda, Ascaridoidea, Anisakidae) Parasitizing *Trachipterus arawatae* (Pisces, Lampridiformes) on the Atlantic Coast of Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **97**: 93–94.
- Vidal, E.A.G., Haimovici, M.** 1999. Digestive tract parasites in rhynchoteuthion squid paralarvae, particularly in *Illex argentinus* (Cephalopoda: Ommastrephidae). *Fisheries Bulletin*, **97**: 402–405.
- Vidal-Martínez, V.M., Aguirre-Macedo, M.L., McLaughlin, J.P., Hechinger, R.F., Jaramillo, A.G., Shaw, J.C., James, A.K., Kuris, A.M. Lafferty, K.D.** 2012. Digenean metacercariae of fishes from the lagoon flats of Palmyra Atoll, Eastern Indo-Pacific. *Journal of Helminthology*, **86**: 493–509.
- Voight, J.R.** 2005. Hydrothermal vent octopuses of *Vulcanoctopus hydrothermalis*, feed on bathypelagic amphipods of *Halice hesmonectes*. *Journal of the Marine Biological Association of the UK*, **85**: 985–988.
- Voliani, A., Cuccu, D., Fiorentino, F., Giordan, D., Mannini, A.** 2009. An updated review of the occurrence of *Bathypolypus sponsalis* (Cephalopoda: Octopodidae) in the Italian seas and notes on its distribution in the Mediterranean. *Bollettino di Malacologia*, **45**: 81–86.
- Von Boletsky S., Fuentès M., Offner N.** 2001. First record of spawning and embryonic development in *Octopus macropus* (Mollusca: Cephalopoda). *Journal of the Marine Biological Association of the UK*, **81**: 703–704.

- Voss, N.A., Vecchione, M., Toll, R.B., Sweeney, M.J.** 1998. Systematics and Biogeography of Cephalopods (Vol. II). Smithsonian Contributions to Zoology.
- Voss, N.A., Nesis, K.N. and Rodhouse, P.G.** 1998. The cephalopod family Histiotiuthidae (Oegopsida): systematic, biology and biogeography. In “Systematics and Biogeography of Cephalopods (Vol. II)” (N.A. Voss, M. Vecchione, R.B. Toll, M.J. Sweeney, Eds.), Smithsonian Contributions to Zoology, pp 293-372.
- Warnke, K., Söller, R., Blohm, D., Saint-Paul, U.** 2004. A new look at geographic and phylogenetic relationships within the species group surrounding *Octopus vulgaris* (Mollusca, Cephalopoda): indications of very wide distribution from mitochondrial DNA sequences. *J. Zoological Systematics and Evolutionary Research*, **42**: 306–312.
- Weerasooriya, M.V., Fujino, T., Ishii, Y., Kagei, N.** 1986. The value of external morphology in the identification of larval anisakid nematodes: a scanning electron microscope study. *Zeitschrift für Parasitenkunde*, **72**: 765–778.
- Williams, H.H.** 1968. The taxonomy, ecology and host-specificity of some Phyllobothriidae (Cestoda: Tetraphyllidea), a critical revision of *Phyllobothrium* Beneden, 1849 and comments on some allied genera. *Philosophical transactions of the Royal Society of London*, **786**: 231–307.
- Williams, H.H., MacKenzie K., McCarthy A.M.** 1992. Parasites as biological indicators of the population biology, migrations, diet, and phylogenetics of fish. *Review of Fish Biology and Fisheries*, **2**: 144–76.
- Williams, H., Jones, A.** 1994. Parasitic worms of fish. Taylor & Francis, London. 593 pp.
- Xavier, J., Clarke, M.R., Magalhães, M.C., Stowasser, G., Blanco, C., Cherel, Y.** 2007. Current status of using beaks to identify cephalopods. *III International Workshop and training course on Cephalopod beaks, Faial island, Azores*, pp. 41–48.
- Yamaguti, S.** 1958. Systema Helminthum. Vol. I, The Digenic Trematodes of Vertebrates. Interscience Publishers Inc., New York, USA.
- Yamaguti, S.** 1970. Digenetic trematodes of Hawaiian fishes. Interscience Publishers, New York, 436 pp.
- Young, R.E., Vecchione, M., Mangold K.M. (1922-2003)** 2012. Cephalopoda Cuvier 1797. Octopods, squids, nautilus, etc.. Version 10 November 2012 (under construction). <http://tolweb.org/Cephalopoda/19386/2012.11.10> in The Tree of Life Web Project, <http://tolweb.org/>. Ultima visita 11/04/2014.

Ringraziamenti

I miei ringraziamenti vanno innanzitutto alla mia tutor, la Prof.ssa Anna Maria Deiana, per la pazienza e la fiducia dimostratami.

Ringrazio inoltre per l'importanza fondamentale che hanno avuto in questo lavoro i Dottori Danila Cuccu, Blondine Agus, Paola Pesci, Marco Mereu, Antonello Mulas, Andrea Bellodi e il Prof. Angelo Cau, per il loro supporto tecnico e scientifico; le Dott.sse Cristina Porcu e Martina Marongiu per il tempo che mi hanno dedicato in istologia; il Dott. Gabriele Conti per il grande aiuto con il SEM; i Dottori Andrea Sabatini, Piero Addis, Riccardo De Murtas, per la loro grande disponibilità ed il loro costante apporto motivazionale; la Prof.ssa Simonetta Mattiucci della Sapienza Università di Roma.

Grazie ai colleghi di disciplina della Sezione di Parassitologia e Malattie Parassitarie dell'Università di Sassari: Dott.ssa Maria Cristina Piras per l'aiuto in biologia molecolare, Dottori Paolo Merella, Salvatore Mele, Prof. Giovanni Garippa, per il supporto scientifico.

Ringrazio particolarmente la Prof.ssa Vincenza Figus, in assoluto la persona che più mi ha dato e che mi ha sostenuto in tutto il mio percorso di studio e di lavoro nel mondo della Parassitologia.

Grazie e buona fortuna ai compagni con i quali ho condiviso tutto o parte del mio dottorato: i colleghi del XXVI ciclo, Dott.ssa Susanna Campisi, Dottori Francesco Fois, Francesco Palmas, Marco Secci, Riccardo Melis, e i colleghi del XXVII ciclo.

Grazie a Massimo Leonardi per il suo indelebile contributo grafico.

Infine ringrazio tantissimo gli affetti, gli amici e i familiari che con la loro curiosità ed il loro interesse per il mio lavoro hanno tenuto viva la mia voglia di portarlo avanti. Se avete fatto finta vi capisco e vi ringrazio ancor di più.

Annesso – pubblicazioni e contributi a congressi durante il periodo di Dottorato.

Dal 2011 al 2014 ho partecipato alla stesura di pubblicazioni scientifiche in riviste nazionali ed internazionali, i cui titoli ed abstract sono riportati nella figura a fine sezione. Si tratta di lavori che, complessivamente, trattano la morfologia e l'epidemiologia di parassiti che infettano pesci e molluschi delle acque marine e salmastre della Sardegna. Di alcuni parassiti è stato valutato il potenziale uso come indicatori bioecologici e in altri casi l'aspetto zoonotico legato al consumo di pesci e molluschi crudi o poco cotti.

Qui di seguito, il titolo dell'articolo più recente, in fase di seconda revisione:

- Culurgioni J., Figus V., Cabiddu S., De Murtas R., Cau A., Sabatini A. (2014). Larval helminth parasites of fishes and shellfishes from Santa Gilla lagoon (Sardinia, western Mediterranean), and their use as bioecological indicators. *Estuaries and Coasts* (sotto seconda revisione).

I seguenti titoli riguardano posters e comunicazioni scientifiche presentati a congressi ai quali ho partecipato come autore o coautore nel 2011 e nel 2012. Diversi lavori hanno avuto come argomenti i medesimi sopra citati:

- Culurgioni J, Mattiucci S, Paoletti M & Figus V (2011). First report of *Anisakis pegreffii* larvae (Nematoda, Anisakidae) in wild European sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L.) from Mediterranean waters (Southern Sardinia). Atti XVII Conv. Naz. SIPI, 58.

- Culurgioni J, Cannella S, Sabatini A, Sanna N, Torcivia A & Figus V (2011). Metazoan parasites of wild gilthead seabream *Sparus aurata* L. from three Sardinian lagoons (South-western Mediterranean). Atti XVII Conv. Naz. SIPI, 43.

- Mele S., Culurgioni J., Merella P., Macías D., Rossi G., Montero F.E. (2011). Didymozoid trematodes of the gill of the Atlantic bluefin tuna *Thunnus thynnus* (Osteichthyes: Scombridae). VIII International Symposium on Fish Parasites. Viña del Mar (Chile), 26-30/09/2011. Abstract Book, 153-154.

- Culurgioni J, Sabatini A, Cannella S, De Murtas R, Figus V. (2012) Zoonotic helminth parasites in commercial fish from three coastal lagoons of Southern Sardinia. Atti del XVIII Convegno Nazionale della Società Italiana di Patologia Ittica SIPI, 9-11 maggio 2012, Udine, p. 46.

- Mele S., Pennino M.G., Culurgioni J., Macías D., Addis P., Garcia E., Gómez-Vives M.J., Masala S., Garippa G., Montero F.E., Merella P. (2012). Gills of scombrid fish as habitat: can the gill design drive the site specificity of didymozoids (Trematoda: Didymozoidae)? XVII Iberian Symposium on Marine Biology Studies. 11-14 settembre 2012, Donostia (Spain). Revista de Investigación Marina, AZTI-Tecnalia, 19: 139-140.

- Rossi G., Culurgioni J., Macías D., Rodríguez-Marín E., Addis P., Garippa G., Merella P., Montero F.E., Mele S. (2012). Temporal changes of metazoan parasite infections on the gills of wild *Thunnus*

thynnus (Osteichthyes: Scombridae) from the western Mediterranean Sea and the north eastern Atlantic Ocean. In: *Mappe Parassitologiche* 18, SOIPA XXVII ABSTRACTS, p. 192.

- Culurgioni J., Cabiddu S., Sabatini A., De Murtas R., Figus V., Cau A. (2012). Larval helminth parasites of fish and shellfish from St. Gilla lagoon (south Sardinia, western Mediterranean), and their possible use as biologic and ecologic indicators. In: Abstracts book, VI Congresso LaguNet, Cagliari, 29-31 Ottobre 2012, p. 46.

- Culurgioni J., Cannella S., Sabatini A., Figus V. (2012). Parasites of the grass goby *Zosterisessor ophiocephalus* (Pallas, 1814) from Porto Pino lagoon (Sardinia, Western Mediterranean). In: *Mappe Parassitologiche* 18, SOIPA XXVII ABSTRACTS, p. 178.

- Culurgioni J., Sanna G., Virgilio S., Piras G., Tedde T., Salza S., Rosa M.N., Tola S., Piras M.C., Garippa G., Merella P. (2012). *Cryptosporidium* sp. and *Giardia* sp. in edible bivalves: results of a one-year monitoring on three sites in Sardinia. In: *Mappe Parassitologiche* 18, SOIPA XXVII ABSTRACTS, p. 180.

Due posters hanno avuto per argomento aspetti della ricerca svolta per il Dottorato:

- Culurgioni J., Mereu M., Cuccu D., Agus B., Figus V., Cau A. (2012). Occurrence of *Aggregata* spp. (Apicomplexa, Aggregatidae) in cephalopods from Sardinian waters (Western Mediterranean), with observations of new species from *Histioteuthis bonnellii*, *H. reversa* and *Ancistroteuthis lichtensteini*. Atti del XVIII Convegno Nazionale della Società Italiana di Patologia Ittica SIPI, 9-11 maggio 2012, Udine, p. 43.

- Culurgioni J., Cuccu D., Mereu M., Agus B., Mattiucci S., Paoletti M., Figus V., Cau A. (2012). Parasitofauna of *Histioteuthis bonnellii* (Férussac, 1835) and *H. reversa* (Verril, 1880) (Cephalopoda: Teuthoidea) from Sardinian waters (western Mediterranean). In: *Mappe Parassitologiche* 18, SOIPA XXVII ABSTRACTS, p. 179.

Infine, tre contributi hanno riguardato segnalazioni e distribuzione di artropodi parassiti terrestri in Sardegna:

- Fois F., Culurgioni J., Mereu Piras P., Zinzula L., Deiana A.M. (2012). First signalling of *Ornithodoros maritimus* (Ixodida: Argasidae) in the coastal mainland of southern Sardinia, and its potential role as vector of pathogenic arboviruses. In: *Mappe Parassitologiche* 18, SOIPA XXVII ABSTRACTS, p. 106.

- Fois F., Mereu Piras P., Cappai S., Cillo D., Culurgioni J., Deiana A.M., Mandas L., Rolesu S. (2012). Contribution to the knowledge of Diptera Hippoboscidae in Sardinia. In: *Mappe Parassitologiche* 18, SOIPA XXVII ABSTRACTS, p. 108.

- Fois F., Mereu Piras P., Culurgioni J., Usai F., Seu V., Palmas C., Deiana A.M. (2012). New data on the presence of *Argas reflexus* (Ixodida: Argasidae) in Sardinia. In: *Mappe Parassitologiche* 18 SOIPA XXVII ABSTRACTS, p. 109.

Investigation into *Cryptosporidium* and *Giardia* in bivalve mollusks farmed in Sardinia region and destined for human consumption

Tiziana Tedde,¹ Gabriella Piras,¹
Sara Salza,¹ Rosa Maria Nives,¹
Giovanna Sanna,¹ Sebastiana Tola,¹
Jacopo Culurgioni,² Cristina Piras,²
Paolo Merella,² Giovanni Garippa,²
Sebastiano Virgilio¹

¹Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna, Sassari; ²Dipartimento di Biologia Animale, Sezione di Parassitologia e Malattie parassitarie, Università di Sassari, Italy

Abstract

Cryptosporidium and *Giardia* are protozoan parasites transmitted by fecal-oral ingestion of (oo)cysts, and are responsible for enteritis in several animal species and humans worldwide. These (oo)cysts can survive for over a year in aquatic environments and can accumulate in bivalve mollusks, which filter large volumes of water. The aim of this study is to evaluate the natural occurrence of *Cryptosporidium* and *Giardia* contamination in different specimens of edible bivalves mollusks from farming sites of the western and north-eastern coasts of Sardinia. From April 2011 to February 2012, 1095 specimens of *Mytilus galloprovincialis* and 240 of *Crassostrea gigas* were sampled from Olbia and Oristano gulf and San Teodoro pond. Hepatopancreas and gills, including the labial palp, were examined for oocysts and cysts after pooling and homogenisation using different techniques: i) staining for light and fluorescence microscopy; ii) direct immunofluorescence (IF) Merifluor[®] test *Cryptosporidium*/*Giardia* (Meridian Bioscience Inc., Cincinnati, OH, USA); and iii) molecular procedures. However, in the context under study, all mollusks examined with the three main diagnostic techniques were negative for both parasites pointing out the hypothetically low zoonotic risk related to *Cryptosporidium* and *Giardia* in bivalves, especially *Mytilus galloprovincialis* and *Crassostrea gigas*.

Helminth parasites of fish and shellfish from the Santa Gilla Lagoon in southern Sardinia, Italy

J. Culurgioni¹, A. Sabatini¹, R. De Murtas², S. Mattiucci³
and V. Figus^{1*}

¹Department of Life and Environmental Sciences, University of Cagliari, Via T. Fiorelli, 1 - 09126, Cagliari, Italy; ²Consorzio Ittico Santa Gilla, Loc. Sa Illetta, SS195, km 2,300, Cagliari, Italy; ³Department of Public Health and Infectious Diseases, Section of Parasitology, 'Sapienza' Università di Roma, P.le Aldo Moro, 5 - 00185, Roma, Italy

(Received 20 November 2012; Accepted 17 May 2013)

Abstract

An extensive survey of helminth parasites in fish and shellfish species from Santa Gilla, a brackish water lagoon in southern Sardinia (western Mediterranean), resulted in the identification of 69 helminth parasite taxa and/or species from 13 fish species ($n = 515$) and seven bivalve species ($n = 2322$) examined between September 2001 and July 2011. The list summarizes information on the helminth parasites harboured by fish and molluscs contained in the available literature. Digenea species (37), both adults and larvae, dominated the parasite fauna, whereas Cestoda were the least represented class (three species). Monogenea, Nematoda and Acanthocephala were present with 17, 6 and 6 species, respectively, which were mainly adults. The most widespread parasite species was the generalist *Contracaecum rudolphii* A (Nematoda). Other species, such as the Haplosporidae and Ascocotyle (*Phagocota*) spp. 1 and 2 (Digenea), showed a high family specificity in Mugilidae. Importantly, the study recorded the occurrence of potential zoonotic agents, such as *Heterophyes heterophyes*, *Ascocotyle (Phagocota)* spp. and *C. rudolphii* A, the latter two reaching the highest indices of infection in the highly marketed fish grey mullet and sea bass, respectively. The highest parasite richness was detected in *Dicentrarchus labrax*, which harboured 17 helminth species, whereas the lowest value was observed in *Atherina boyeri*, infected by only three species. The list includes the first geographical record in Italian coastal waters of *Robinia aurata* and *Sitotodona saukinensis*, and 30 reports of new host-parasite complexes, including the larval stages of *Ascocotyle (Ascocotyle)* sp. and *Southwellina hispida* in *D. labrax*.

DAO 106:163-172 (2013) - doi:10.3354/dao02650

Postmonorchis sp. nq. (Digenea: Monorchidae) metacercariae infecting natural beds of wedge clam *Donax trunculus* in Italy

F. Carella^{1*}, J. Culurgioni², S. Aceto¹, G. Fichi³, T. Pretto⁴, D. Luise¹, A. Gustinelli⁵, G. De Vico¹

¹Department of Biology, University of Naples Federico II, 80134 Napoli, Italy
²Department of Life and Environmental Sciences, University of Cagliari, 09126 Cagliari, Italy
³Laboratory of Ichthyopathology, Experimental Zooprofilattico Institute of Lazio and Tuscany, 56123 Pisa, Italy
⁴Experimental Zooprofilattico Institute of Venice, 35020 Legnaro, Padua, Italy
⁵Department of Veterinary Public Health and Animal Pathology, University of Bologna, 40054 Ozzano dell'Emilia, Italy

*Email: francesca.carella@unina.it

ABSTRACT: The wedge clam *Donax trunculus* Linnaeus, 1758 is one of the most common bivalve molluscs inhabiting the sandy shores of the Mediterranean Sea and is considered an important commercial resource. In this study, we report the first molecular, morphological and histopathological descriptions of metacercariae from a trematode belonging to the genus *Postmonorchis* (Digenea: Monorchidae) that infects *D. trunculus* in natural beds of the Italian Tyrrhenian coast (Campania, Lazio and Tuscany). Morphological analysis of the parasite revealed a combination of features that exist in the 3 previously identified species of *Postmonorchis*, viz. *P. donacis*, *P. variabilis* and *P. orthostriis*, with the addition of new, distinctive morphological characteristics. The pathogen exhibited a predilection for the gill; however, it was also present in the labial palp and mantle in addition to the gut, kidney epithelium and foot. The inflammatory response was characterised by either a focal or diffuse haemocyte infiltration followed by the formation of multiple, large multi-layered capsules associated with tissue destruction. The prevalence of the pathogen ranged from 75 to 100%, while the infection intensity fluctuated among the study areas. Further studies regarding the life cycle of this parasite and the identification of other larval and adult stages and their respective hosts may confirm the identification of a new species of *Postmonorchis* that infects wedge clams in Mediterranean waters. The study of the parasite is completed by molecular analysis of the ITS1 and ITS2 rDNA sequences.

KEY WORDS: Donacidae · Bivalvia · Metacercariae · Monorchidae · *Postmonorchis* · Trematoda · Parasite · Mediterranean · ITS

FOLIA PARASITOLOGICA 61 [2]: 148–156, 2014
ISSN 0015-5883 (print), ISSN 1803-6465 (online)
doi: 10.14411/fp.2014.011

© Institute of Parasitology, Biology Centre ASCR
http://folia.paru.cas.cz/

Metazoan gill parasites of the Atlantic bluefin tuna *Thunnus thynnus* (Linnaeus) (Osteichthyes: Scombridae) from the Mediterranean and their possible use as biological tags

Jacopo Culurgioni¹, Salvatore Mele², Paolo Merella³, Piero Addis¹, Vincenza Figus¹, Angelo Cau¹, Firdes Saadet Karakulak¹ and Giovanni Garippa²

¹Department of Life and Environmental Sciences, University of Cagliari, Italy;

²Parasitology and Parasitic Diseases, Department of Veterinary Medicine, University of Sassari, Italy;

³Faculty of Fisheries, Istanbul University, Laleli-Istanbul, Turkey

*These authors contributed equally to this work

Abstract: The gills of 63 specimens of the Atlantic bluefin tuna *Thunnus thynnus* (Linnaeus) (Osteichthyes: Scombridae) from three localities of the Mediterranean (Sardinia, Tyrrhenian and Levantine Seas) were examined for metazoan parasites. The parasite fauna of *T. thynnus* from the Sea of Sardinia included 11 species: five didymozoid trematodes, three capsalid and one hexostomid monogeneans, and one caligid and one pseudocycnid copepods. Four didymozoids were found in fish from the Levantine Sea and only one didymozoid was recorded in fish from the Tyrrhenian Sea. Dividing the hosts into four size-groups (small, medium-sized, large and extra large), the pairwise comparison of prevalence and mean abundance of the new and literary data) showed differences according to host size. The differences in the composition of the parasitic faunas and in the prevalence of parasites, observed between the small tunas from the Tyrrhenian Sea and the medium-sized tunas from the Adriatic Sea, Levantine Sea and the North-East (NE) Atlantic Ocean, indicated that these groups form discrete units. The parasite fauna of the large tunas from the Sea of Sardinia is the richest among the bluefin tuna populations of the Mediterranean and the NE Atlantic, due to the presence of species not found elsewhere in bluefin tunas, such as *Caligus coryphaenae* Steenstrup et Lütken, 1861, *Capsala magorum* (Jälski, 1936) and *C. paucispinosa* (Mamaev, 1968). This fact and the prevalence of some parasites of this group (lower than those of medium-sized fish from the NE Atlantic and higher than the small and medium-sized tunas from the Mediterranean) suggest that the large-sized tuna group in the western Mediterranean is formed by Mediterranean resident tunas (poorly infected), and by tunas migrating from the Atlantic Ocean (heavily infected).

Keywords: Copepoda, Didymozoidae, Monogenea, marine fish, bioindicators, fish parasites, Sea of Sardinia, Levantine Sea