



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI SANITA' PUBBLICA, PATOLOGIA  
COMPARATA ED IGIENE VETERINARIA

AGRIPOLIS – Viale dell'Università, 16 – 35020 Legnaro (PD)  
CF 80006480281 – P.IVA 00742430283

- RELAZIONE FINALE -

SPIAGGIAMENTO DI 7 ESEMPLARI DI CAPODOGLIO (*PHYSETER  
MACROCEPHALUS*) SUL LITORALE COMPRESO TRA CAGNANO  
VARANO E ISCHITELLA (FG) TRA IL 10 ED IL 15 DICEMBRE 2009

**Dr. Sandro Mazzariol, DVM, PhD**  
**Dipartimento di Sanità Pubblica, Patologia Comparata e Igiene Veterinaria**  
**Università degli Studi di Padova.**

## **1. Cronologia degli eventi**

### ***1.1 10 Dicembre 2009***

Alle ore 17 del 10 Dicembre 2009, su segnalazione della Capitaneria di Porto di Vieste, il veterinario dell'ASL competente della Provincia di Foggia, Dipartimento di Prevenzione, dr. Rodolfo Reale, procede ad un primo sopralluogo sul sito dello spiaggiamento. I soggetti erano stati segnalati alle Autorità marittime competenti dal sig. Coccia, referente locale di AGCI Pesca, il quale provvedeva poi a segnalare l'evento anche alla sede centrale del proprio ente di appartenenza.

Contemporaneamente la stessa Capitaneria dava segnalazione di cetacei vivi e lontani dalla costa di cetacei di specie non identificata al Centro Studi Cetacei (CSC - dr. Alessandro Bortolotto). La Capitaneria riporta allo stesso dr. Bortolotto l'impossibilità di inviare una vedetta per il monitoraggio data l'ora e le cattive condizioni meteo-marine.

All'atto del controllo il veterinario ASL, alle ore 18.30 in assenza di adeguata illuminazione, segnalava la presenza di 9 esemplari di capodoglio in acque basse, con una distanza da decine a centinaia di metri dalla linea di costa di Isola Varano.

Nel frattempo, il dr. Reale, si informava presso la Facoltà di Medicina Veterinaria dell'Università di Bari, su chi potesse intervenire per gestire l'evento. Il Prof. Antonio Di Bello, forniva il nominativo del sottoscritto in qualità di esperto e coordinatore scientifico dell'Unità per la Necropsia di grandi cetacei spiaggiati (di seguito Unità) e ha provveduto ad allertare il sottoscritto verso le ore 17.30.

Venivano inoltre allertati il Prof. Nicola Zizzo, professore associato del settore di Patologia Generale ed Anatomia Patologica della Facoltà di Medicina Veterinaria di Bari, che solitamente interviene su carcasse di cetacei spiaggiati lungo le coste pugliesi ed il Dr. Petrella Antonio dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Foggia, in qualità di dirigente dell'U.O. Diagnostica e referente locale Ce.R.M.A.S. (Centro di referenza nazionale per le malattie della fauna selvatica).

Subito dopo le 18, il sottoscritto veniva inoltre allertato dalla sede di Roma di AGCI Pesca (dr.ssa Serena Maso) che forniva il numero del sig. Coccia come riferimento locale dello spiaggiamento, e da Fondazione Cetacea (dr. Marco Affronte) a sua volta allertati da un centro di recupero per le tartarughe marine di Manfredonia. Ho quindi provveduto a informarmi sulla situazione telefonando alla Capitaneria di Porto di Vieste verso le 18.30, la quale confermava l'evento e mi comunicava di aver già allertato anche il Centro Studi Cetacei.

Il Prof. Bruno Cozzi, opportunamente avvisato al momento della prima segnalazione, è entrato in contatto con il dr. Bortolotto e da quel momento siamo rimasti in comunicazione, coordinando l'intervento e il monitoraggio della situazione. Il sig. Coccia ha provveduto a fornire aggiornamenti puntuali fino alle 23 circa e quindi dalle 6 del mattino dell'11 dicembre.

Da allora la Capitaneria di Porto, l'Unità, il CSC e l'ASL hanno mantenuto i contatti per coordinare l'intervento.

### ***1.2 11 Dicembre 2009***

Alle ore 5 dell'11 dicembre è giunta una nuova segnalazione alla Guardia di Finanza che dal momento ha presidiato i cetacei. Al primo sopralluogo del mattino, il dr. Reale constatava la presenza di 7 animali a pochi metri dalla battigia, trasportati dalla mareggiata in atto. Degli altri due animali non si hanno notizie certe e non sono mai stati avvistati nei giorni seguenti. Successivamente gli animali sono stati identificati da 1 a 7 partendo dal più meridionale e vicino al porto canale di Foce Varano in agro di Ischitella verso la foce di Capoiale in agro di Cagnano Varano, con gli esemplari da 1 a 5 nel territorio del primo comune e i soggetti 6 e 7 in quello del

secondo. Tale numerazione ci è sembrata rispettare l'ordine di spiaggiamento e/o decesso. Infatti i numeri da 1 a 4 sono stari ritrovati morti o in fase agonica (il soggetto 2 appare essere deceduto dopo dei soggetti 1, 3 e 4 in considerazione del ritardo degli eventi putrefattivi, constatati successivamente), mentre i soggetti da 5 a 7 sono stati trovati ancora vitali ma nell'impossibilità di riprendere il largo. Come si vede in figura 4.1, i sette animali erano distribuiti lungo 3,8 km di litorale sabbioso.

Nella sera dell'11 dicembre il soggetto numero 7 è morto. Le aree intorno alle carcasse sono state delimitate, cercando di mettere forze dell'ordine per presidiare i vivi, per lo meno di giorno.

L'Unità riusciva ad approntare il materiale per l'esecuzione degli esami post-mortem sugli animali deceduti e quindi partiva dalla sede (Legnaro – PD) verso le ore 11 con 10 persone. Durante il viaggio sono stati mantenuti i contatti con il CSC, in particolare con il dr. Bortolotto (CSC) ed il dr. Vincenzo Olivieri (CSC e ASL Pescara), che hanno assicurato la loro presenza dalla tarda mattinata fino a sera, con aggiornamenti costanti sulla situazione e fornendo supporto organizzativo nella gestione dell'evento. I referenti del CSC hanno inoltre provveduto ad informare le amministrazioni sulle procedure da adottare sia per quanto riguarda le carcasse, secondo la vigente legislazione, sia per quanto riguarda gli esemplari vivi, al fine di scoraggiare ogni possibile tentativo di operazioni e manovre non corrette sugli animali. A tal fine è stato organizzato un incontro serale presso la sede della Guardia di Finanza. Hanno infine iniziato i contatti con la Prefettura locale e il MATTM.

Prima della partenza, il sottoscritto ed il Prof. Cozzi hanno provveduto ad entrare in contatto con il Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio e del Mare (MATTM - dr. Oliviero Montanaro e dr.ssa Marina Pulcini) ed a allertare vari ricercatori con cui esistono forme di collaborazione e coordinazione da tempo (Prof. Giovanni Di Guardo – Facoltà di Medicina Veterinaria di Teramo; dr.sse Cristina Fossi e Letizia Marsili Facoltà di Scienze Ambientali di Siena; dr.ssa Michela Podestà del Museo di Storia Naturale di Milano; dr. Gianni Pavan del CIBRA di Pavia; dr. Giuseppe Notarbartolo di Sciara, Tethys). Numerose altre persone hanno provveduto a contattarci offrendo il proprio supporto ed aiuto per le operazioni di necropsia. Tra questi si ricorda il Prof. Antonio Fernandez della Facoltà di Medicina Veterinaria di Las Palmas de Gran Canaria (ES), noto esperto internazionale in merito alle patologie e agli spiaggiamenti connessi con i sonar, che ha provveduto a inviare due ricercatrici per effettuare le analisi su possibili embolismi gassosi reperiti durante le indagini; i colleghi dell'IZS di Foggia, in particolare i dottori Antonio Petrella, Pasquale Troiano e Alfredo Ferrara e il tecnico di laboratorio Giuseppe Leonzio per il supporto sia durante le necropsie sia per tutte le indagini collaterali successive (virologia, microbiologia, tossicologia e prove biologiche); i colleghi delle Facoltà di Medicina Veterinaria di Bologna (dr.ssa Annalisa Zaccaroni) e Napoli (Prof. Paolo De Girolamo). Un elenco completo delle persone intervenute viene fornito in seguito.

I due rappresentanti del CSC giungevano sul sito verso mezzogiorno con il fine di monitorare le condizioni degli animali e fornire indicazioni utili alle Amministrazioni per la gestione dell'evento.

I sindaci e le amministrazioni comunali si sono attivati su richiesta telefonica e hanno iniziato a coordinare il primo personale di vigilanza. Intanto il pubblico veniva allertato dalle informazioni mediatiche e il litorale cominciava ad affollarsi di curiosi.

Durante la giornata, i referenti ministeriali indicavano il sottoscritto come referente tecnico-scientifico dell'evento per conto del MATTM, con il compito specifico di coordinare le operazioni di necropsia e campionamento sugli animali spiaggiati al fine ultimo di individuare le possibili cause del decesso e di collaborare con i veterinari ASL locali e IZS competente per gestire la

situazione di emergenza igienico-sanitaria, in qualità di medico-veterinario.

Il personale dell'Unità è giunto sul posto verso le 17 e dopo un veloce sopralluogo sugli animali presenti sulla spiaggia di Capoiale, ha partecipato, verso le 18, all'incontro sopra citato con gli Enti locali e l'Assessore all'Ambiente della Provincia di Foggia Stefano Pecorella, presso il comune di Cagnano Varano.

In questa sede il sottoscritto ha dichiarato la necessità di procedere con la maggior celerità possibile agli esami post-mortem per non perdere informazioni utili sul maggior numero di soggetti, dato la mole ed il numero di esemplari. Ha inoltre suggerito che, sulla base della propria esperienza e di protocolli internazionali esistenti per questi casi, era opportuno procedere all'esecuzione della necropsia sulla spiaggia, in considerazione dei seguenti criteri:

- difficoltà di intervento di mezzi adeguati a sollevare e trasportare questi animali,
- possibilità di sezionamento in tempi rapidi con animali poco putrefatti e riduzione del peso dei tronconi,
- possibilità di interrimento in spiaggia previo accertamento di assenza di rischio idrogeologico per falde di acqua potabile usate dall'uomo o animali,
- trasporto più facile per parti di carcassa meno pesanti, sia per la musealizzazione sia per l'eventuale smaltimento.

A tal proposito si è ricordato che le carcasse di cetacei, in termini igienico-sanitari, fanno riferimenti al regolamento CE 1774/2002. Al termine della riunione si è deciso di trasportare gli animali in una cava nel territorio del Comune di Cagnano Varano, dopo aver provveduto ad opere di impermeabilizzazione del terreno e di escavo per il sotterramento delle carcasse.

In tale sede, i colleghi dell'ASL, garanti del benessere animale, hanno espresso la volontà di richiedere parere di eutanasia. Il dr. Bortolotto, al termine dell'incontro, è dovuto partire, assicurandomi il supporto da parte di altri volontari del CSC il giorno seguente che avrebbero potuto coadiuvare le operazioni di campionamento sotto il coordinamento dell'Unità (dr. Marco Tocchetti e dr. Mario Tringali).

### ***1.3 12 Dicembre 2009***

Il giorno seguente, è stata inviata una prima relazione da parte del Servizio Veterinario dell'ASL di Foggia – area C ai Sindaci, al Prefetto, al Questore, all'assessorato all'Ambiente della Provincia di Foggia, alla Capitaneria di Porto di Vieste, al Parco Nazionale del Gargano e al Direttore del Dipartimento di Prevenzione dell'ASL FG per informare degli avvenimenti e richiedere intervento urgente secondo le competenze.

Dopo un primo sopralluogo, in questa data si è tenuta una riunione congiunta dove veniva stilato un documento di protocollo operativo in cui si individuava, come fine prioritario, la necessità di eseguire le necropsie e preservare gli scheletri, nel rispetto della salute umana e dell'ambiente, dato l'elevato valore scientifico ed educativo dell'evento, oltre data la sua straordinarietà.

Per motivi igienico-sanitari, oltre che meteo-climatici, non è stato possibile effettuare alcun campionamento o rilievo biometrico sugli animali ancora in acqua.

Sono finalmente iniziate le operazioni di trasporto delle carcasse. Data l'impossibilità di portarle nel sito prestabilito, si è proceduto a posizionarle sulla spiaggia, come indicato dal sottoscritto. Le operazioni sono terminate verso le 16 e sono quindi iniziati i primi rilievi biometrici, fotografici ed i prelievi per le indagini genetiche, seguiti e coordinati dalla dr.ssa Michela Podestà e dal dr. Gianni Pavan.

Vista l'impossibilità di salvataggio dei cetacei ancora vivi, per il perdurare delle avverse condizioni meteo-marine e la mancanza di mezzi ed attrezzature idonee per il traino e la reimmissione in mare dei capodogli, lo stesso Servizio Veterinario ha chiesto al Direttore Generale della Sanità Animale del Ministero della Salute indicazioni e chiarimenti circa la possibilità di eutanasia di due animali rimasti vivi.

Il sottoscritto, in merito a questa questione, si informava da colleghi clinici sulle modalità di soppressione di animali di queste dimensioni, nel rispetto della sicurezza degli operatori e del successo dell'intervento eutanasi. Tali informazioni e la richiesta di un parere ufficiale sono stati quindi inoltrati al dr. Aldo Cosentino e al dr. Oliviero Montanaro (MATTM) via e-mail e, per conoscenza, alla Prefettura di Foggia via fax.

Fortunatamente gli animali (in ordine, 6 e 5) venivano a morte tra la sera del 12 e la mattina del 13 dicembre.

Alle ore 18 è stato effettuato un primo incontro con tutto il personale coinvolto negli accertamenti necroscopici per spiegare il protocollo operativo, affidare compiti e responsabilità di coordinamento e concordare sulle procedure ed accertamenti collaterali da effettuare. Un riscontro dei rilievi necroscopici, dei campionamenti e del personale coinvolto saranno elencati di seguito.

Le operazioni di necropsia iniziavano sul soggetto morto più recentemente (il 7) alle ore 19 e sono continuate in pessime condizioni meteorologiche e di temperatura fino alle ore 02 del mattino del 13 dicembre, grazie all'attrezzatura in dotazione. Tale attrezzatura è stata lasciata sul sito in custodia alle forze di polizia presenti per continuare il mattino seguente. Il presidio era purtroppo assicurato solo fino alle 05.30 del mattino seguente, con la necessità quindi di continuare un controllo da parte del sottoscritto fino alle riprese delle attività, verso le ore 8.

#### ***1.4 13 Dicembre 2009***

Al mattino sono state recuperate anche le ultime due carcasse di animali, ancora vivi il giorno precedente e deceduti la sera/notte del 12 dicembre (n. 6 e 7).

Le indagini sull'animale 6 sono continuate il mattino di domenica 13, a partire dalle ore 9, con una costante presenza dei sindaci e dei rappresentanti istituzionali, delle forze dell'ordine e della protezione civile, oltre che ad un'abbondante folla di curiosi che ha creato notevoli problemi al traffico locale. Gli accessi alle spiagge (circa 20), sono stati interdetti solamente al pomeriggio con ordinanza dei due sindaci.

Durante il pomeriggio, inoltre, si è provveduto a effettuare incisioni sull'addome degli esemplari da 1 a 4, per evitare che il meteorismo da gas di putrefazione potesse determinare un'esplosione. Sono stati effettuati in questo momento prelievi per le indagini tossicologiche da parte delle Università di Siena e di Catania (dr.ssa Chiara Copat e Stefano Floridia). Quest'ultima si è presa in carico anche campioni per le analisi genetiche, effettuate anche dall'Università di Firenze (Dr.ssa Stefania Gaspari).

#### ***1.5 14 Dicembre 2009***

Al mattino di lunedì 14 si è proceduto ad effettuare la necropsia dell'ultimo soggetto valutabile, il numero 5, e ad effettuare i prelievi di contenuto gastrico e denti per la determinazione dell'età nei 4 soggetti spiaggiati ed in avanzato stato di decomposizione.

I sindaci, impegnati in un tavolo tecnico in Prefettura di Foggia mirato a comprendere le modalità di

spostamento e smaltimento delle carcasse dalla spiaggia con il fine di recuperare lo scheletro, non hanno potuto provvedere a dare indicazioni per un adeguato supporto logistico, al fine di movimentare la strumentazione da un soggetto spiaggiato ad un altro, e per poter spostare il personale. La difficoltà dalle operazioni è stata aggravata inoltre dalle condizioni meteorologiche con pioggia abbondante nelle prime ore.

Le operazioni di necropsia e campionamento, eseguite in collaborazione con tutte le forze veterinarie presenti sul posto (Facoltà di Medicina Veterinaria - Padova, Teramo, Bari, Bologna e Napoli -, IZS di Foggia e veterinari ASL) coordinate dal sottoscritto, si sono concluse alla sera del 14 dicembre, verso le ore 19, dopo un confronto con il dr. Rodolfo Reale, responsabile dell'ASL di Foggia per il territorio in oggetto.

#### ***1.6 15 Dicembre 2009***

Durante il rientro in sede, il dr. Reale mi ha tenuto informato dell'evoluzione sulle decisioni relative alla movimentazione e stoccaggio delle carcasse, in seguito agli incontri e alle visite effettuate dal Comitato tecnico-scientifico per la gestione delle carcasse, nominato dalla Prefettura di Foggia. Nel tardo pomeriggio si è trovato un sito idoneo nel territorio del Comune di Cagnano Varano, da attrezzare per l'evenienza. La richiesta di distruzione per infossamento è stata ufficialmente inoltrata dall'ASL per ragioni igienico-sanitarie.

Le carcasse saranno sezionate in due parti da personale esperto sotto la supervisione del Prof. Nicola Zizzo e sotto controllo del personale ASL, per favorire le manovre di spostamento.

## 2. Dati storici e letteratura sugli spiaggiamenti di capodogli.

Gli spiaggiamenti di massa di capodogli nel Mar Mediterraneo sono eventi molto rari e distanziati da diverse decadi gli uni dagli altri. Per quanto riguarda le coste italiane si segnalano almeno **altri 7 eventi, di cui due nel Mar Adriatico** e gli altri lungo le coste siciliane, e riassunti in tabella 2.1.

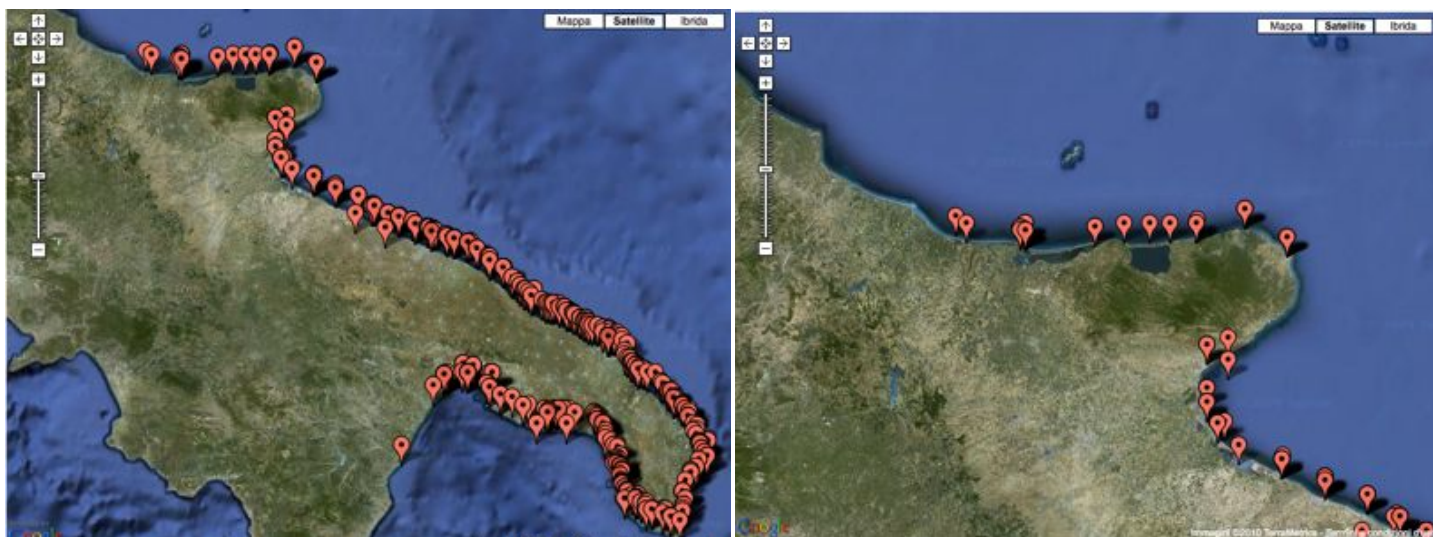
Luogo spiaggiamento	Prov	Data	n. animali coinvolti
Mazzara del Vallo	TP	1734	16
Cittanova d'Istria	Croazia	15/08/1853	6
Pozzallo	RG	1873	5
Marsala	TP	25/11/1892	7
Castellamare del Golfo	TP	1902	7
Milazzo	ME	1934	3
Falconara	AN	20/08/1938	7 (maschi)

Tab. 2.1



Fig. 2.1





**Fig. 2.2**

Per dare un quadro completo, nell'immagine 2.1, si riporta una cartina degli spiaggiamenti di capodogli, singoli e di massa, estratta dalla Banca Spiaggiamenti dell'Università di Pavia ([www-3.unipv.it/cibra/spiaggiamenti.html](http://www-3.unipv.it/cibra/spiaggiamenti.html)), che raccoglie i dati degli spiaggiamenti lungo le coste italiane (con la stella sono indicati gli spiaggiamenti di massa riportati in tabella). Dalla stessa banca riportiamo inoltre una cartina che riporta l'entità degli spiaggiamenti lungo le coste pugliesi (fig. 2.2). Come si può evincere da tali cartine, le coste pugliesi sono state interessate da spiaggiamenti singoli di capodogli solamente due volte prima dell'evento garganico (in cartina è già stato segnato), su coste prossime al Mar Ionio. Considerando la distribuzione degli spiaggiamenti in genere, questi sembrano essere più frequenti lungo le coste del salento, rispetto al versante settentrionale della penisola. Comunicazioni non ufficiali indicano però un numero maggiore di cetacei morti lungo questo litorale.

In letteratura e sui media è possibile recuperare numerosi resoconti di spiaggiamenti di massa di questa specie, con numeri estremamente superiori a quelli registrati nell'evento in oggetto. Le aree geografiche maggiormente interessate sono le coste statunitensi, in particolare la costa occidentale e le coste che si affacciano sul Golfo del Messico; le coste del Mare del Nord, in particolare lungo le coste dell'Europa continentale; in Australia ed in particolare in Tasmania.

### *2.1 Letteratura sugli spiaggiamenti di capodogli*

La maggior parte dei capodogli che si spiaggiano in massa sembrano essere sani, a parte qualche eccezione (Janeaux et al, 1998). Spiaggiamenti di massa coinvolgono solo maschi, solo femmine ed i loro cuccioli o una combinazione tra le due. I numeri possono essere grandi, in particolare quando si spiaggiano le femmine. E' stata calcolata una media di 32 animali nel caso di spiaggiamenti di femmine o misti e di 13 in caso di maschi. Tali eventi possono essere interessante tratti di costa di centinaia o migliaia di chilometri e possono essere disseminati in vari mesi.

Analizzando correlazioni spaziali e temporali si nota una maggior incidenza su coste battute da onde alte e con una pendenza minima, facendo pensare che la topografia possa avere un ruolo. In alcune indagini si suggerisce una componente correlata a variazioni geomagnetiche che potrebbero alterare il senso dell'orientamento di questi animali. In questo caso, anche un'alterazione nell'attività solare, appare essere correlata agli spiaggiamenti. Ancora, esistono correlazioni con eventi meteorologici anomali ed intensi. Ovviamente, esiste anche un'associazione con attività antropiche (inquinamento chimico o acustico).



C'è una correlazione tra gli spiaggiamenti di capodogli ed aspetti atmosferici come il vento che, può portare ad una variazione delle prede nella colonna d'acqua con un avvicinamento alla superficie, a causa del raffreddamento dell'acqua di superficie (Evans et al., 2005). Anche i cicli lunari sembrano variare la localizzazione delle prede favorendo una migrazione verticale (Wright 2005). I cicli solari invece sembrano interferire alterando il campo magnetico terrestre (Vanselow and Ricklefs 2005).

Durante questi spiaggiamenti di massa si devono sottolineare vari comportamenti anomali. In alcuni casi i cetacei sono stati visti nuotare attivamente verso la riva. In altri casi sono stati avvistati altri individui nuotare appena al largo durante lo spiaggiamento, alcuni dei quali si sono spiaggiati più tardi. Gli spiaggiamenti possono essere separati da pochi, decine o centinaia di metri. Se riportato in acque più alte, un animale spiaggiato generalmente si arena nuovamente.

Per quanto gli spiaggiamenti di massa dei capodogli e di altre specie odontoceti (globicefali, pseudorche, etc.) sembrano regolati da eventi o fattori esterni come le condizioni atmosferiche, le condizioni marine, la topografia del fondale, i campi magnetici, il rumore o l'inquinamento chimico che possono aver il ruolo di confondere le balene o di alterare il loro sistema nervoso o di sonar, molti autori sostengono che negli spiaggiamenti di massa ha un ruolo notevole la componente sociale. Le balene arrivano sulla spiaggia tutte insieme per una coesione sociale e non perché sono state portate tutte insieme in maniera indipendente.

**Relativamente agli spiaggiamenti di massa, esiste un consenso generale relativamente agli spiaggiamenti di massa sul fatto che esistano una serie di co-fattori che influiscono sul sistema di navigazione interno di questi animali che non fornisce più un'immagine precisa, "un sistema nervoso alterato che può determinare panico e risposta incontrollata" di fronte ad un'alterata informazione, probabilmente intensificata da fattori esterni come cattive condizioni meteorologiche, il non adattamento a fondali bassi e la coesione sociale. Il mancato adattamento ad acque basse può essere visto come conseguenza dell'adattamento evolutivo di questa specie ad acque profonde per le loro dimensioni corporee e per le strategie alimentari (Whitehead, 2003; pag. 200)**

### 3. Dati geografici, batimetrici, meteorologici e geomagnetici.

Gli animali si sono spiaggiati lungo un tratto di litorale sabbioso di circa 3,8 km, tra Cagnano Varano (2 animali) e Ischitella (5 animali) - FG. Al momento del sopralluogo (12 dicembre) tutti gli animali erano parzialmente ricoperti di acqua e i vivi, per respirare, dovevano alzare la testa. Intorno al corpo dell'animale si era venuta a formare una fossa che, con le onde, rendeva difficile l'avvicinamento. Tutti i soggetti erano disposti con il corpo parallelamente alla linea di costa. Una volta accertato il decesso le carcasse sono state trasportate a riva.

In tabella n. 3.1, riportiamo i dati relativi ai singoli animali, secondo il codice numerico riportato nel paragrafo precedente. Viene inoltre riportata una mappa satellitare dove vengono riportati tali dati, oltre ai dati biometrici descritti nel paragrafo seguente. In fig. n. 4.2 si mostra un estratto di mappa satellitare con l'esatta ubicazione delle carcasse, l'orientamento ed i dati biometrici.

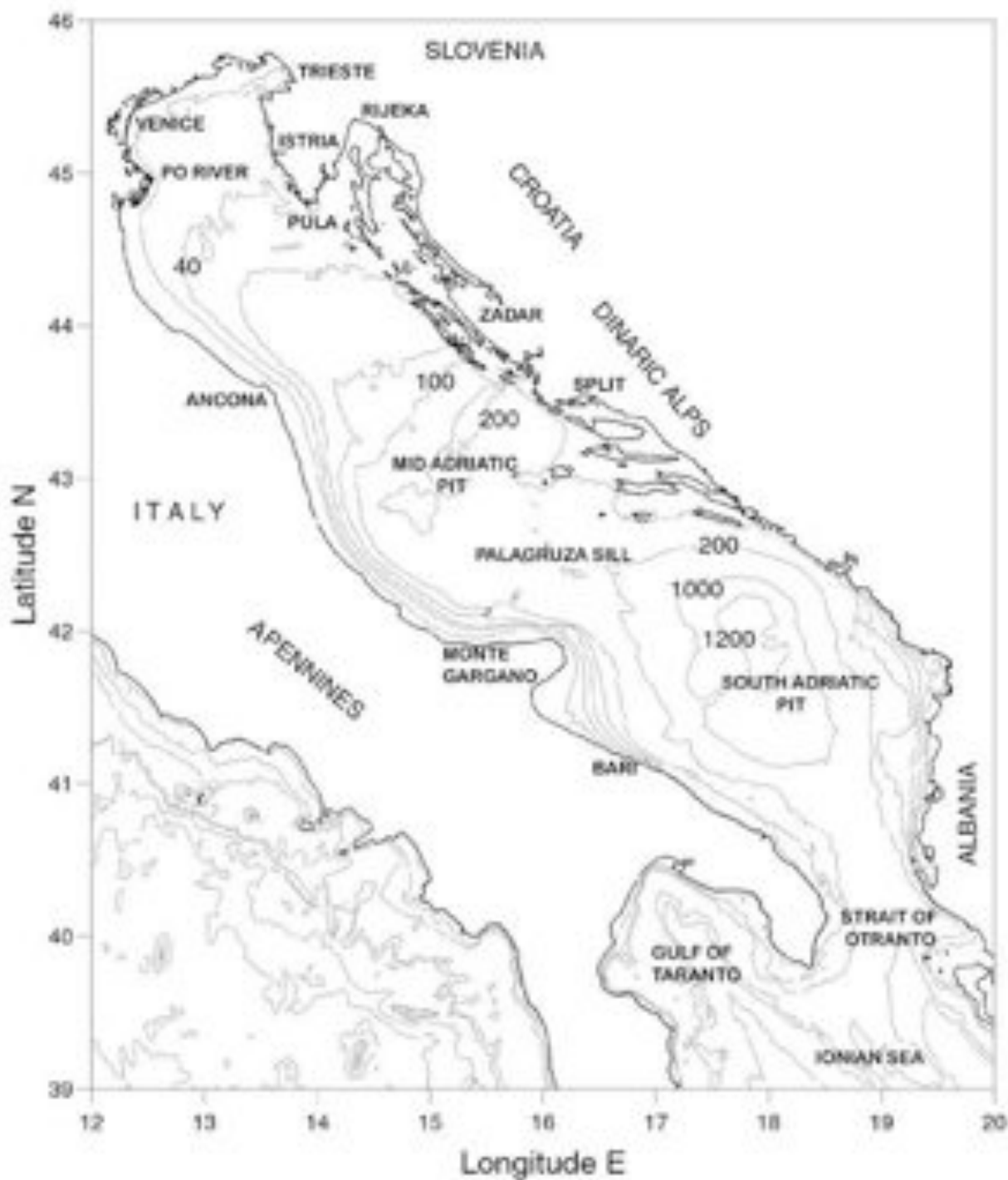
Animale n.	Coordinate piane (WGS 84)	Orientamento testa e decubito
1	15°46'23.18"E 41°55'05.08"N	Nord su fianco sx
2	15°46'08.11"E 41°55'03.71"N	Nord su fianco dx
3	15°45'34.69"E 41°55'01.44"N	Nord su fianco dx
4	15°44'32.43"E 41°54'57.44"N	Nord su fianco dx
5	15°44'10.51"E 41°54'54.31"N	Sud su fianco sx
6	15°43'43.73"E 41°54'54.48"N	Sud su fianco sx
7	15°43'39.99"E 41°54'54.08"N	Nord su fianco dx

*Tab. 3.1*

L'evento si è verificato nel settore del Mar Adriatico Meridionale dove la letteratura e gli spiaggiamenti suggeriscono una presenza sporadica del capodoglio. Per questo motivo, e per le motivazioni riportate nei paragrafi successivi, si sono richiesti i dati relativi alla batimetria, alle correnti e alle condizioni meteo-marine del Mar Ionio. In attesa di tali dati più precisi alleghiamo delle cartine dei rilievi batimetrici (Fig. 3.1-2-3).

Come si può vedere, esiste una sola fossa che scende al di sotto dei 1000 metri, tra le coste pugliesi e l'Albania. Questa fossa che ha una superficie comunque limitata, è circondata da fondali più bassi, tra i 200 ed i 600 m, anche nella zona in cui inizia l'Adriatico, all'altezza di S. Maria di Leuca. **In questa zona si trova l'unico punto con la profondità favorevole per la vita del capodoglio, anche se in letteratura non è mai stata confermata una presenza costante di questa specie** (Notarbartolo et al., 1993). **Anche l'andamento degli spiaggiamenti mostrato in figura 2 sembra dare sostegno a questa tesi.** E' invece confermata e descritta la costante presenza di capodogli nello Ionio e, in misura maggiore, nella parte meridionale, in quella zona oceanica definita "Fossa Ellenica", che si estende dalle isole Ionie a Creta.

Se tale ipotesi fosse vera, i capodogli spiaggiatisi sul Gargano avrebbero percorso, tenendo conto del percorso più breve in linea retta, almeno 140 km dal canyon di Bari, 360 km da St. Maria di Leuca e 650 km da Zacinto, dove inizia la Fossa Ellenica. Le distanze sono stimate usando Google Maps ma danno l'idea dell'ordine di grandezza. Da tener conto che, comunque, la navigazione di



questi animali sfrutta anche le correnti che, in questo periodo, hanno un percorso diverso, lambendo le coste orientali dell'Adriatico (fig.3.3).

**Fig. 3.1**

DART06 Alliance CTDs 2-13 March

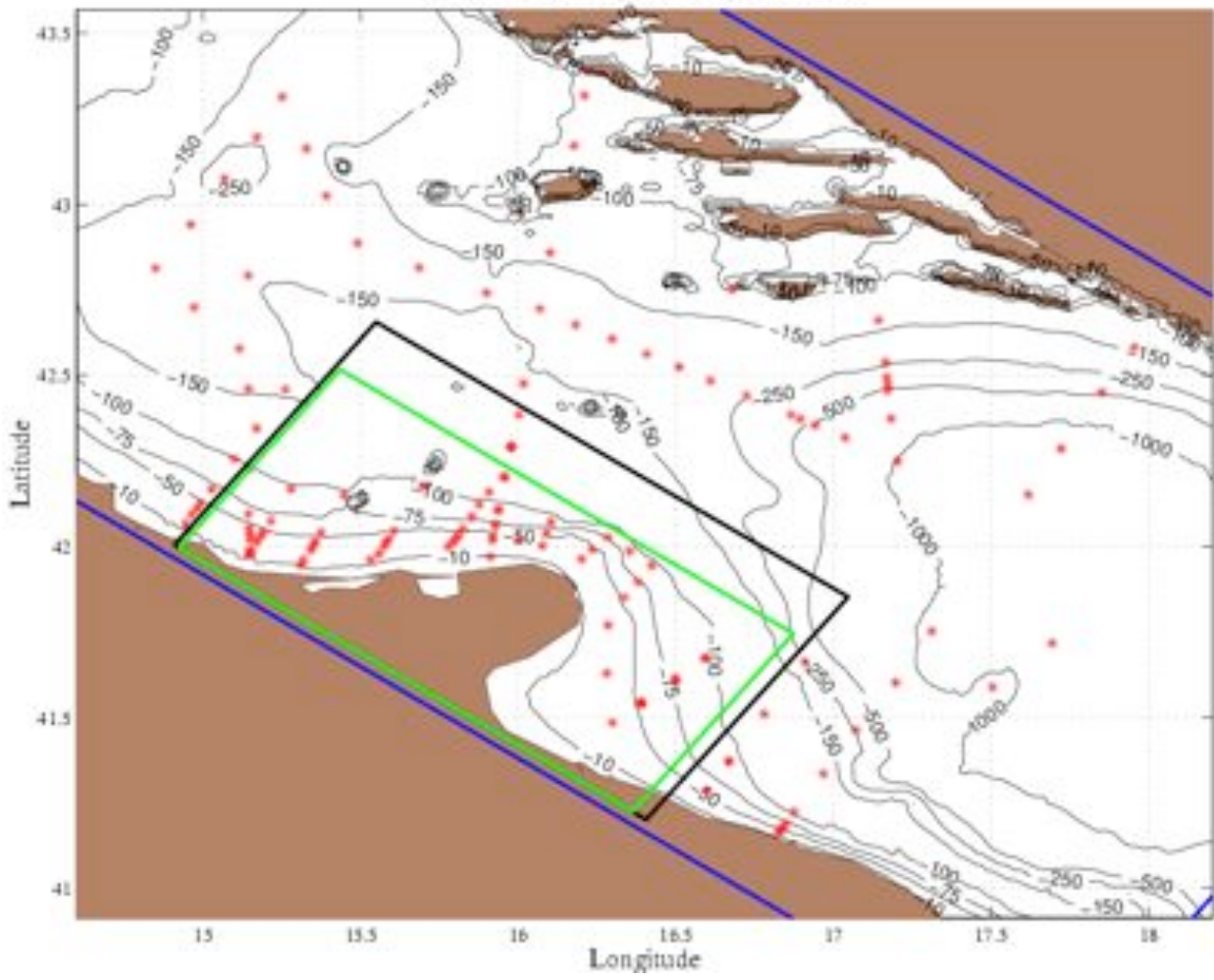
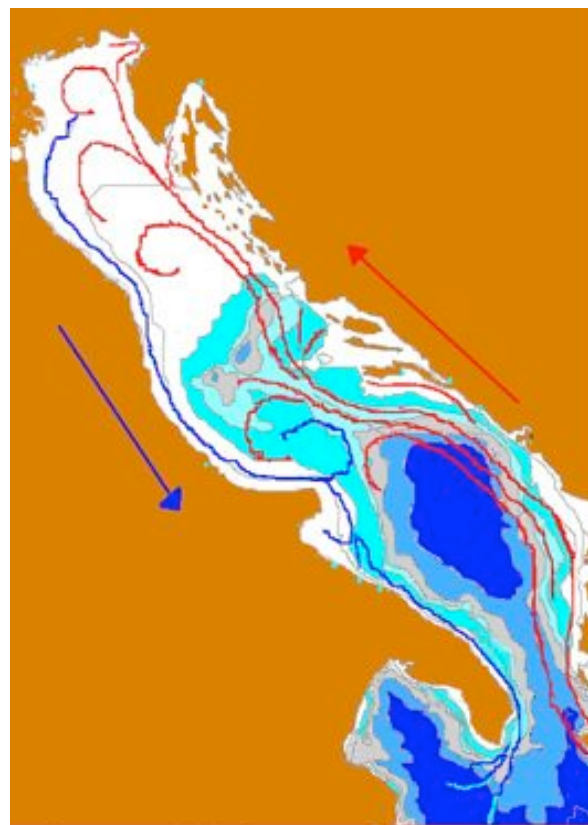


Fig. 3.2-3



Surface currents during winter season

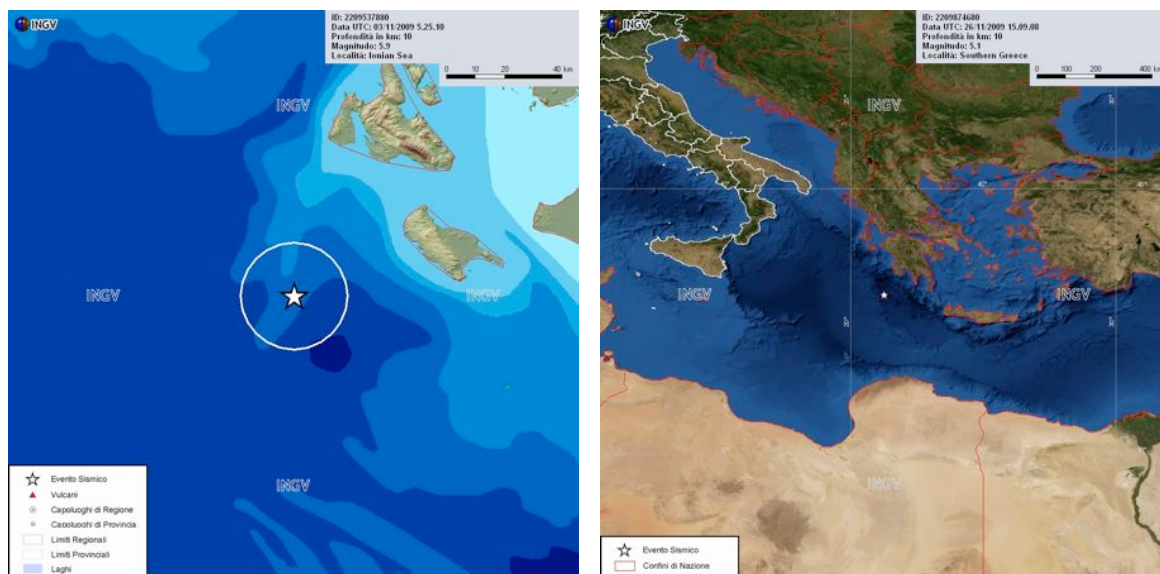
I dati meteo-marini nei giorni antecedenti allo spiaggiamento sembrano essere ininfluenti a parte nel determinismo del luogo dello spiaggiamento considerate la forza e la direzione delle onde, oltre alla scarsa visibilità intorno al Gargano tra il 9 ed il 10 dicembre. Si segnalano comunque anomalie della temperatura superficiale nello Ionio nel mese di dicembre con acque più calde in media di 3-4 °C, oltre che, in generale, durante l'estate in tutto l'Adriatico e lo Ionio. Infine tra il 29 ed il 30 novembre si sono registrati venti e correnti forti direzionati tutti verso Nord all'imboccatura dell'Adriatico.

Durante i 20 giorni antecedenti allo spiaggiamento non si sono evidenziati aumenti dell'attività solare, alterazioni del campo geomagnetico e la luna non presentava condizioni particolari del ciclo (quarto di luna discendente il 9 dicembre).

L'attività sismica nel bacino Adriatico appare essere tutta di lieve entità, al di sotto dei 3-4 gradi della scala Richter, nei giorni prima dell'evento, come si evince dalla figura 3.5. In questa cartina il punto rosso a raggera e i coni gialli rappresentano zone in cui è stato possibile definire la presenza di attività di prospezione geologica nel Mar Adriatico.

Di maggior rilievo, nel Mar Ionio si devono segnalare due eventi: un terremoto il 3 di novembre (fig. 3.4a) ed uno il 26 dello stesso mese (fig. 3.4b), entrambi con una potenza superiore al grado 5 della scala Richter e localizzati di fronte alle isole greche del Mar Ionio, proprio in corrispondenza della Fossa Ellenica.

Si segnala che nel periodo considerato erano previste sia esercitazioni militari di tiro, sia attività di prospezione geologica previste dai ministeri competenti. Tra queste si riporta l'ordinanza 58/09 della Capitaneria di Porto di Gallipoli relativa alla presenza della Mn "Pelagia", nave da ricerca olandese nell'ambito del progetto "Mocchia", dal 25 Novembre al 13 Dicembre 2009.



**Fig. 3.4a-b**

## 4. Biologia ed ecologia

Riportiamo di seguito le note biologiche sulla specie, funzionali a comprendere l'evento che ha interessato i 7 soggetti spiaggiati sul Gargano.

### 4.1 Distribuzione nel Mediterraneo

E' possibile estrapolare la distribuzione e la presenza di capodogli nel Mar Mediterraneo dalle cartine sottostanti, in fig. 4.1, che danno un'immagine sulla base degli avvistamenti e delle localizzazioni acustiche, di quali siano le aree in cui si registra la maggior presenza di questa specie (Gannier A. et al., 2002).

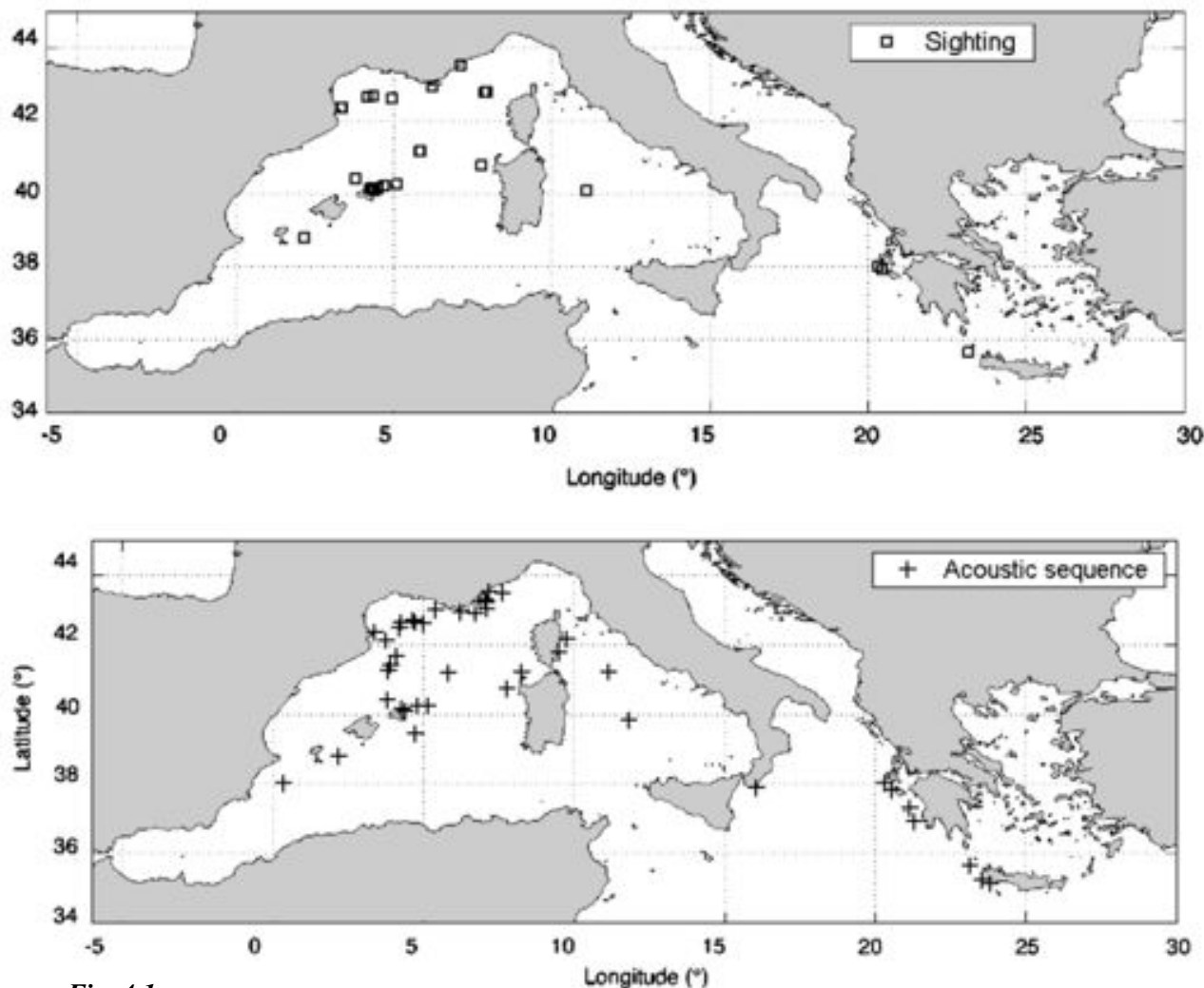


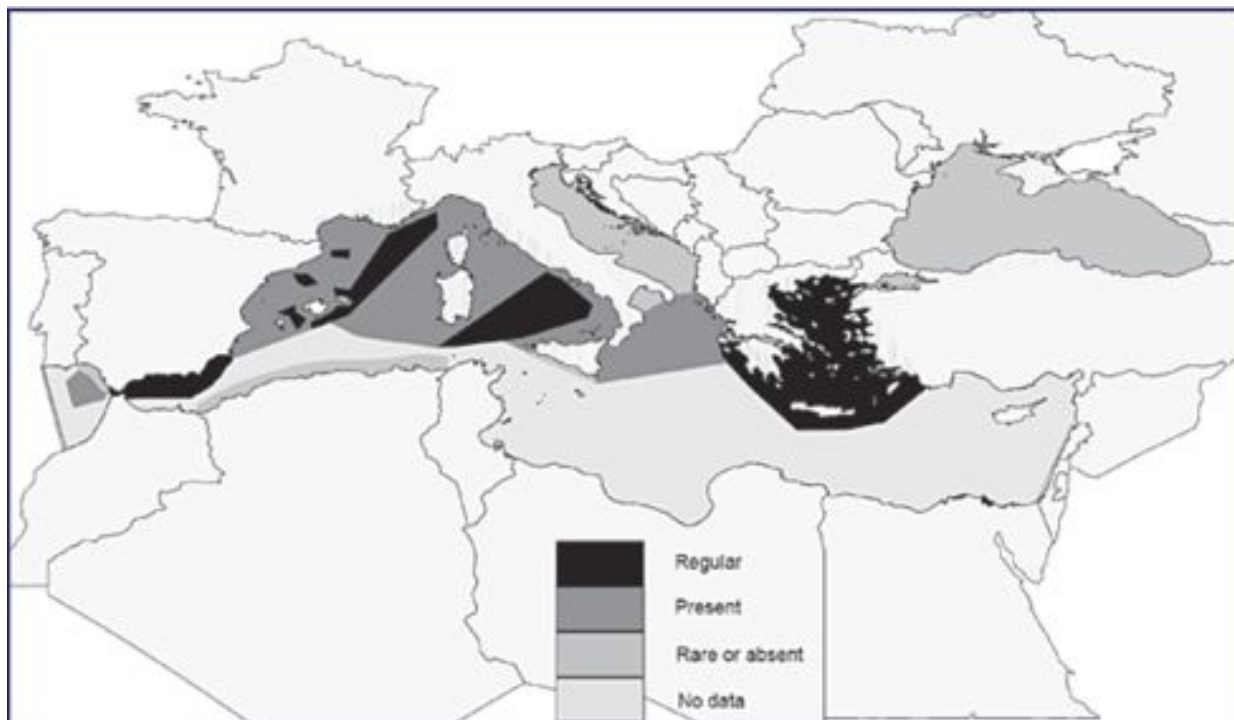
Fig. 4.1

In figura 4.3 riportiamo la cartina di presenza del capodoglio del documento della IUCN sulla presenza dei cetacei del Mediterraneo del 2006, dove si segnala in Albania come specie presente, mentre in Croazia come specie visitatrice (Reeves R e Notarbartolo Di Sciara G., 2006).

### 4.2 Life history



Fig. 4.3



I maschi lasciano i gruppi familiari costituiti da femmine e sub-adulti ad un'età compresa tra i 3 ed i 15 anni, per formare dei gruppi di aggregazione senza una precisa struttura sociale di individui con un'età omogenea, definiti *bachelors schools* o *groups*, in età adolescenziale (10-20 anni). Il numero degli appartenenti a questi gruppi tende a ridursi con l'età fino a quando, intorno ai quarant'anni, i capodogli maschi maturi (18 mt di lunghezza e 45 ton di peso) tendono a stare da soli, alle latitudini più alte e quindi in acque più fredde vicino ai circoli polari.

La loro maturità sessuale avviene gradualmente durante l'adolescenza, anche se non partecipano attivamente all'accoppiamento, e solo tra i 25 ed i 30 anni migrano verso le acque più calde dove possono trovare le femmine. Non si sa molto di queste migrazioni in senso longitudinale o latitudinale, se non che possono essere lunghe chilometri (Whitehead, 2003; pag. 12).

Quando lasciano il gruppo materno si aggregano nei cosiddetti *bachelor pods* o *schools*. Sono gruppi di maschi immaturi sessualmente e non strutturati. Il numero di componenti di questi gruppi tende a decrescere con le dimensioni. Generalmente gli animali hanno dimensioni comprese tra 12-14 m. Questi gruppi possono essere aggregazioni (circa 20 maschi rimangono aggregati in un raggio di circa 20 km per periodi variabili di giorni o mesi) con la formazione di qualche *cluster* (avvicinamento occasionale di due o più individui).

I *bachelor pods* tendono comunque ad essere meno aggregati spazialmente rispetto alle femmine. Inoltre non sembrano esistere delle relazioni stabili o delle unità sociali. In genere tali forme di aggregazione sembrano avere una funzione di protezione nei confronti dei predatori e delle difficoltà dato che, il nuotare vicini ed in contatto, pur se distanti, li rende meno vulnerabili. (Whitehead, 2003; pag. 267)

#### 4.3 Alimentazione e predazione

Studiando il contenuto stomacale, risulta chiaro che si nutrono di varie specie di cefalopodi che variano a seconda della zona geografica. Possono ingerire anche pesci, preferenzialmente condroitti, ma anche teleostei. Generalmente sono pesci di taglia medio-grande che vivono sul





Fig. 4.2

fondo o comunque in profondità. Durante le attività di ricerca del cibo, i capodogli, in particolare i maschi, tendono a mangiare incidentalmente una vasta varietà di altri animali, inclusi tunicati, spugne, stelle marine, granchi, aragoste, krill, uccelli di mare, foche, ma possono inghiottire anche oggetti inanimati come legno, noci di cocco, gusci di molluschi, pietre, sabbia, oggetti di alluminio, plastica e reti da pesca. Addirittura è stata abbastanza ben documentata l'ingestione di parti di cadavere umano.

Il successo nell'attività di alimentazione (parametro che tiene conto del contenuto stomacale e della defecazione al momento dell'immersione, considerati segni di successo recente, o dello strato del blubber, ritenuto indicatore di un successo costante) varia moltissimo a seconda della regione, o addirittura, a distanza di qualche centinaio o migliaio di chilometri. Ci sono scarse evidenze di un trend giornaliero, stagionale o geografico. In generale i maschi hanno un successo generalmente inferiore rispetto alle femmine (pag. 44).

Pur essendoci una certa variabilità, questi animali trascorrono circa il 75% del loro tempo nel cercare cibo ed il 25% a socializzare, generalmente il pomeriggio (Whitehead, 2003; pag 156). Inoltre, è stato evidenziato che consumano quotidianamente una quantità di prede pari al 3-3,5% del loro peso da vivi (Lockyer, 1981).

#### *4.4 Spostamenti e velocità*

In relazione agli spostamenti, i capodogli si muovono con velocità differenti a seconda del numero di immersioni effettuate e dei giorni in cui sono in movimento. Le ricerche effettuate mostrano una velocità media tra i 2 e gli 8 km/h con punte massime di 39 km/h per brevi periodi. Su uno spostamento di breve durata (0,5-2 h) generalmente mantengono una velocità media di 2-5 km/h tenendo conto anche di alcune immersioni. Valutando gli spostamenti effettuati in relazione al tempo di osservazione, si rileva che gruppi di femmine e maschi immaturi percorrono 4 km in un ora, 20 km in 6 ore, 70-90 km in un giorno e 110 km in 2 giorni. Gli animali che hanno un minor successo alimentare possono percorrere distanze pari a 1,5-2 volte rispetto a quelle indicate nello stesso intervallo di tempo. Queste misure fatte con un tracking diretto non permettono di seguire gli animali per periodi più lunghi. Ricerche effettuate nell'Oceano Pacifico usando la foto-identificazione, per quanto più imprecisa, suggeriscono che in 5 giorni gli animali possono effettuare trasferimenti di 100 km circa e di 300 km in un mese.

A differenza delle femmine, i maschi sembrano avere velocità medie simili (4-5 km/h o 90 km al giorno), con distanze percorse simili sui lunghi periodi. Differentemente dalle femmine, i maschi sembrano percorrere distanze maggiori nei loro spostamenti, nell'ordine di qualche migliaio di chilometri, in opportuni spostamenti stagionali legati alla presenza di cibo e di femmine. In questo caso, gli spostamenti e la loro ampiezza sembrano dipendere dalla latitudine (pagg. 87-104). Lavori effettuati sul Mar Mediterraneo occidentale, utilizzando la foto-identificazione, suggeriscono spostamenti di 500 km in 7 giorni (Drouot-Dulau V e Gannier G, 2007).

**Utilizzando le velocità riportate in letteratura e le distanze probabilmente percorse indicate nel paragrafo precedente, considerando inoltre la provenienza ionica, come suggerito dai risultati del confronto tra le foto identificative, i tempi necessari per percorrere le distanze tra il sito di spiaggiamento e il canyon di Bari, l'inizio dell'Adriatico e la Fossa Ellenica, sono rispettivamente 2 giorni, 5 giorni e 9 giorni circa.**

## 5. Dati biometrici e foto-ID

### 5.1 Dati biometrici e parametri biologici

In tabella 2 riportiamo i dati biometrici e biologici dei 7 esemplari oggetto delle indagini. La figura 9 riporta quindi i medesimi dati su mappa satellitare del sito di spiaggiamento, per meglio rendere l'idea delle proporzioni dell'evento. La lunghezza è stata misurata sulla spiaggia con una cordella metrica e corrisponde alla lunghezza lineare dall'estremità craniale al centro della coda. La stima del peso è stata fatta utilizzando una formula universalmente riconosciuta che sfrutta la lunghezza totale dell'animale. Il peso reale delle carcasse è stato valutato durante le fasi di spostamento per lo smaltimento e la sua correzione, che tiene conto dei fluidi e tessuti persi durante lo spostamento e la necropsia, è stata fatta moltiplicando il peso reale per 1,14. La stima e la correzione sono stati fatti basandosi sulle formule ricavate in letteratura (Lockyer, 1991). La maturità gonadica sugli individui 5, 6 e 7 è stata valutata al microscopio ottico (Dr. Sandro Mazzariol e Prof. Giovanni Di Guardo), osservando la presenza di spermatozoi maturi nel lume dei tubuli seminiferi. L'età è stata stimata leggendo in triplo (Prof. Bruno Cozzi, dr. Michela Podestà e dr.ssa Maristella Giuriso) la deposizione degli strati di dentina dai denti estratti da ciascun capodoglio e facendo corrispondere ogni strato di dentina a 2 anni secondo Berzin (Berzin A. A., 1972) o a 1 anno, secondo Lockyer. Nel soggetto 1, il più anziano, la lettura è apparsa di particolare difficoltà e quindi la stima è più incerta. In generale, sono in corso ulteriori valutazioni per poter avere una stima più certa, confrontabile con i dati di letteratura.

Animale n.	Lunghezza standard	Peso stimato	Peso reale	Peso corretto	Sesso e maturità gonadica	Strati dentina (età Lockyer-Berzin)
1	11,8 m	18,9 t	13 t	14,8 t	M	<28 (<28-14)
2	12,2 m	20,7 t	14 t	16 t	M	20 (20-10)
3	11,3 m	16,7 t	12,5 t	14,8 t	M	20 (20-10)
4	11,4 m	17,1 t	12 t	13,7 t	M	20 (20-10)
5	10,5 m	13,7 t	14 t	16 t	M - no	15 (15-8)
6	12,1 m	20,4 t	15,5 t	17,7 t	M - no	20 (20-10)
7	11,2 m	16,3 t	13,8 t	15,7 t	M - no	20 (20-10)

Tab. 2

**I parametri biologici permettono di supporre che gli individui appartenessero ad una *bachelor school*. Confrontando i pesi stimati e corretti, si nota una diminuzione del peso atteso, con una diminuzione compresa tra le 0,6 e le 4,7 tonnellate, a parte il soggetto n. 5 (il più giovane) che presentava un incremento ponderale pari a 2,3 tonnellate.**

### 2) Foto-identificazione

Le attività di molti ricercatori sui cetacei hanno permesso di avere dei cataloghi fotografici di animali identificati mediante fotografie di parti del corpo significative (soprattutto, nel capodoglio) la pagina inferiore della pinna caudale). Uno degli archivi più grandi nel Mediterraneo afferisce al *Pelagos Research Institute* (dr. Alexandros Frantzis), coordinatore del *Greek Sperm Whales Project* e in contatto con i database Mediterranei del Mar Mediterraneo occidentale. Le foto, effettuate dal dr. Gianni Pavan del CIBRA (da 6.1 a 6.7, rispettivamente da capodoglio n.1 a n. 7) hanno



permesso di identificare 3 soggetti su 7, uno visto nel Mar Ionio (n. 5) e due dal Mar Ligure (n.2 e 6). Gli altri 4 non sono stati riconosciuti o avvistati in precedenza. Di seguito alcune foto usate per il riconoscimento ed il *matching* con le foto presenti nei cataloghi mediterranei. A queste indagini si assoceranno i risultati degli esami genetici in corso presso le Università di Firenze (dr.ssa Stefania Gaspari) e Catania (dr. Stefano Florida).

**Fig. 6.1 - capodoglio n. 1**



**Fig. 6.2 - capodoglio n. 2**



**Fig. 6.3 - capodoglio n. 3**





*Fig. 6.4 - capodoglio n. 4*



*Fig. 6.5 - capodoglio n. 5*



*Fig. 6.6 - capodoglio n. 6*



**Fig. 6.7 - capodoglio n. 7**



### 3) *Genetica*

Le analisi genetiche a livello mitocondriale sui sette capodogli (*Physeter macrocephalus*) spiaggiati lungo il litorale pugliese sono state effettuate dalla dr.ssa Stefania Gaspari dell'Università di Firenze. Il DNA mitocondriale è, nella maggior parte dei casi, presente in singole copie in ogni cellula eucariota, si trasmette per via materna, ed è caratterizzato da un elevato tasso di evoluzione, dovuto principalmente alla mancanza di meccanismi che correggono gli errori compiuti in fase di replicazione del DNA, ed è praticamente esente da fenomeni di ricombinazione. La regione di controllo del DNA mitocondriale è una sequenza particolarmente variabile poiché non codifica per proteine. È caratterizzata da tassi di mutazione più elevati di altri geni mitocondriali e permette analisi di divergenza genetica dettagliate a livello di popolazione.

Per poter realizzare un'analisi di confronto oltre ai sette individui spiaggiati sono stati aggiunti tre individui mediterranei (2 provenienti dall'Asinara e 1 dalla Toscana), e due individui provenienti dal mare di Cortez, Messico; per un totale di 12 esemplari di capodoglio. Il DNA è stato estratto da tessuto cutaneo. Il sesso è stato definito geneticamente attraverso il gene SRY, e conferma la valutazione fatta sul campo: tutti gli individui sono di sesso maschile. Per poter amplificare l'intera Regione di Controllo (RC), partendo dall'intero genoma mitocondriale di *Physeter catodon*, sono stati disegnati dal nostro laboratorio dei primers per la reazione a catena della polimerasi (PCR) di *Physeter catodon*. Il prodotto di amplificazione e prodotto PCR ha una lunghezza di 1160bp. Da questo prodotto è stata caratterizzata la sequenza della RC di lunghezza pari a 954 bp.

Dall'analisi dei 12 individui, sono stati trovati due diversi aplotipi. Aplotipo 1 rappresenta gli individui mediterranei; i sette capodogli spiaggiati in Puglia e due esemplari campionati in Sardegna (Asinara) e uno in Toscana, i 10 capodogli sono identici dal punto di vista del DNA mitocondriale, non vi è perciò nessuna variabilità. L'aplotipo 2 rappresenta i capodogli campionati nel mare di Cortez. I due aplotipi differiscono per due transizioni G>A rispettivamente ai siti 288 e 947.

**Le indagini genetiche confermano quindi l'appartenenza alla popolazione Mediterranea dei 7 animali.**

## 6. Contenuti stomacali

Durante l'intervento è stato possibile esaminare lo stomaco di 6 animali (tutti tranne il n. 2) e valutarne il contenuto. Sono stati separati i contenuti di origine organica (becchi di calamari), dai parassiti e dal contenuto di natura inorganica. Ognuno di questi è stato analizzato e valutato separatamente ed in particolare dal Museo di Storia Naturale di Milano (dr.ssa Michela Podestà e dr. Fulvio Garibaldi) per riconoscere le specie trovate ed il loro grado di digestione; dalle Università di Padova, la Sapienza di Roma e la Tuscia di Viterbo (dr. Federica Marcer e Simonetta Mattiucci, Prof. Giuseppe Nascetti) per valutare gli Anisakidi e la loro genetica; i contenuti inorganici sono stati catalogati e pesati presso l'Università di Padova e quindi conservati presso il Museo di Milano, inviando il raschiato ottenuto all'Università di Siena per analisi tossicologiche.

La tabella 3 riassume e quantifica quanto è stato trovato negli stomaci di 6 individui su 7, in quanto nel numero 2, per questioni logistiche, non è stato possibile aprire le concamerazioni gastriche, e nei soggetti 1 e 3 non è stato possibile raccogliere tutto il contenuto.

Da un punto di vista qualitativo, la frazione organica è rappresentata esclusivamente da cefalopodi, prevalentemente del genere *Histioteuthis* spp. In tutti i capodogli esaminati sono stati rinvenuti solo i becchi dei cefalopodi, mentre mancano completamente i cristallini; è da evidenziare l'assenza totale di parti molli delle prede. È possibile inoltre rilevare una differenza nel grado di digestione delle mandibole, che in alcuni dei capodogli risultano molto digerite, in particolare nell'esemplare n. 3. La presenza di questi becchi ed il loro grado di digestione, inoltre, fa pensare che non ci siano stati episodi di vomito (descritti in caso di stress nel corso dello spiaggiamento) e che i capodogli non si siano alimentati negli ultimi giorni antecedenti il decesso, possibilmente intorno ai 7 giorni, considerando i tempi di transito gastrico e completa digestione riportati nei pochi lavori in letteratura.

Nelle camere gastriche (I e II), sono stati reperiti oggetti di origine antropica, generalmente in plastica (sacchetti, scatole e contenitori, visibili nelle foto 6.1-4) in quantità variabile da pochi grammi (soggetti 4 e 5) ad 1 kg circa (1, 3, 6 e 7); reti, ami e fili da pesca (soggetti 1 e 6), una matassa di corda di materiale sintetico intrecciato del diametro di 0,5 cm e del peso di 4 kg (soggetto 3). Per quanto da segnalare come reperto importante, si segnala che nei soggetti in cui è stato ascrivito il decesso ai corpi estranei, si sono reperiti oltre 80 kg di reti, con evidente ostruzione dell'ostio tra la I e la II concamerazione gastrica (Jackobsen *et al.*, 2010). Inoltre si segnala che il reperimento di corpi estranei nelle concamerazioni gastriche è un rilievo relativamente comune e si riscontra in una percentuale variabile negli spiaggiamenti di massa tra l'11 ed il 20% (Evans *et al.*, 2004)

I soggetti 4 e 5 sono quelli che presentano la minor quantità di materiale (organico e non) negli stomaci. Di seguito si mostrano alcune immagini di tali reperti.

Accanto ai reperti alimentari e ai corpi estranei, si sono reperiti anche elementi parassitari, sia adulti sia pre-adulti (stadio L4), nei soggetti 5, 6 e 7, del genere *Anisakis* spp., associati a quadri di gastrite catarrale acuta lieve con minime erosioni/ulcerazioni. Su tali esemplari è in corso l'indagine genetica. In generale, il carico parassitario sembra essere correlato con la quantità di cibo.





*Fig 6.1 - cont. stomacali capodoglio n. 1*

Animale n.	Cont. alimentare	Corpi estranei	Peso tot.	n. Anisakis (adulti+L4)
1	208,9 g	1475,4 g	1684,3 g	-
3	237,6 g	4934,6 g	5172,2 g	-
4	10,6 g	20,7 g	31,3 g	0
5	29 g	9,5 g	38,5 g	41
6	496,2 g	1199 g	1695,2 g	244
7	265,4 g	731,6 g	997 g	145

Tab. 3

Si sottolinea che il tempo probabile di digiuno indicato dal grado di digestione dei becchi di calamaro corrisponde ai tempi di viaggio supposto dall'ingresso in Adriatico al luogo dello spiaggiamento.

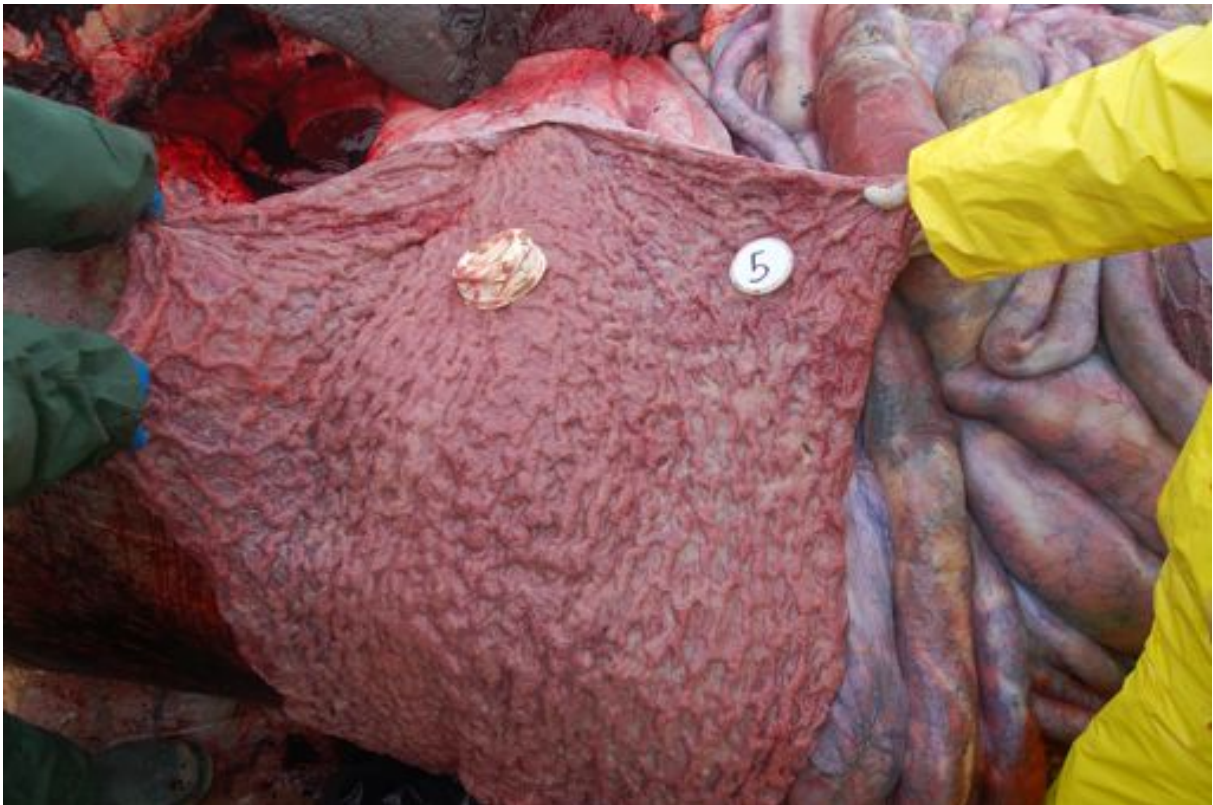


6.2: contenuti stomacali capodoglio n. 3



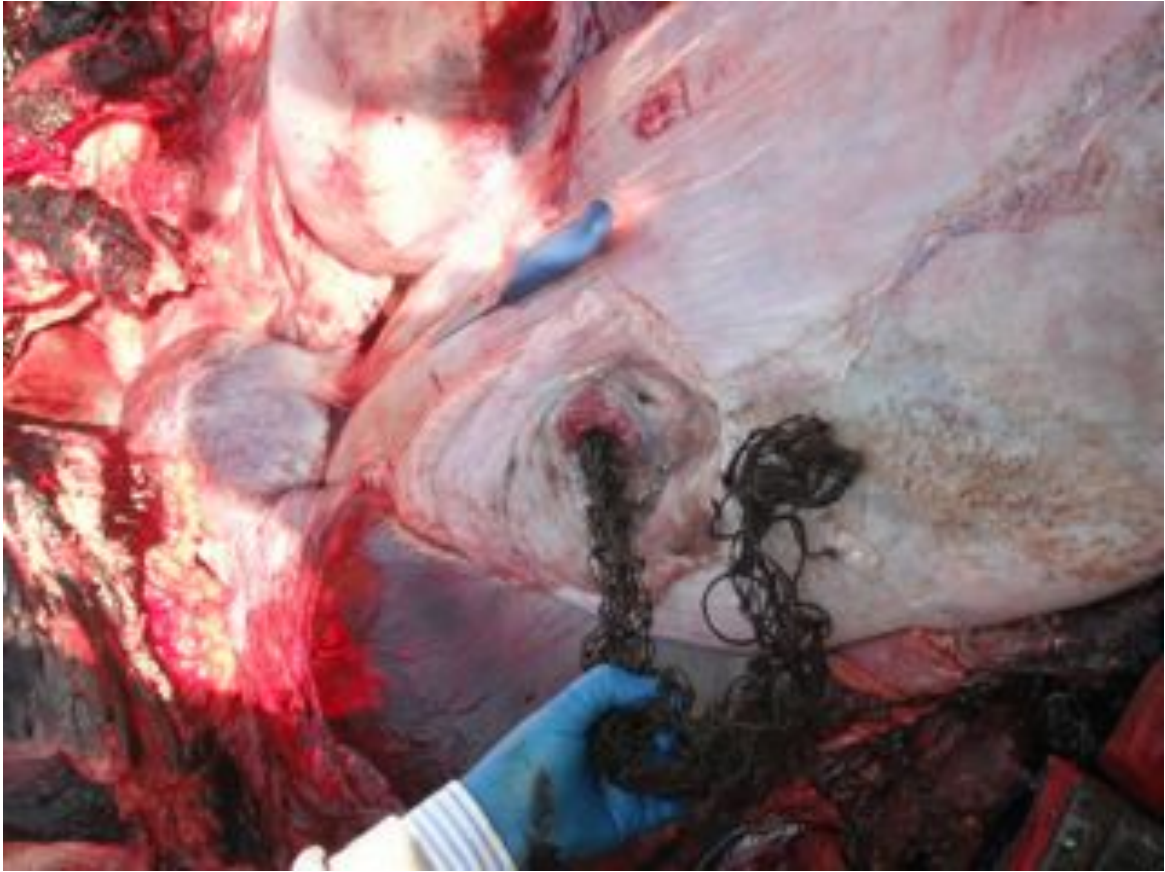


*Fig. 6.3: contenuti stomacali n. 4*



*Fig. 6.4: contenuti stomacali n. 5*





*Fig. 6.5: contenuti stomacali n. 6*





*Fig. 6.6: contenuti stomacali n. 6*



## 7. Isotopi stabili di carbonio ed azoto ( $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ )

L'analisi degli isotopi stabili di carbonio ed azoto ( $\delta^{13}\text{C}$  e  $\delta^{15}\text{N}$ ) costituisce uno strumento dalle molteplici potenzialità nell'ambito delle ricerche ecologiche (Michener e Schell, 1994). L'abbondanza naturale degli isotopi stabili nei tessuti dei consumatori riflette la composizione isotopica della dieta assimilata, fornendo precise indicazioni sui percorsi della materia organica all'interno delle reti trofiche. Questa tecnica è stata già usata nell'ambito degli studi dell'ecologia trofica dei mammiferi marini, consentendo l'acquisizione di informazioni sulla dieta ed anche sui movimenti di diverse specie (e.g. Gendron *et al.* 2001, Hooker *et al.* 2001).

Nel corso di questa indagine sono stati analizzati per la composizione isotopica campioni di blubber, cute, muscolo e fegato provenienti dai capodogli spiaggiati in Puglia. I campioni sono stati trattati con una soluzione 1:1 di cloroformio:metanolo per tre volte e risciacquati abbondantemente con acqua distillata (Sotiropoulos *et al.*, 2004). Successivamente essi sono stati ridotti in polvere mediante l'utilizzo di pestello e mortaio. Una quantità pari a circa 1 mg è stata pesata in capsule di stagno dal diametro di 4 mm mediante l'utilizzo di una bilancia analitica (precisione 0.00001 g). Ogni campione è poi stato analizzato per la determinazione dei rapporti isotopici di C e N mediante uno spettrometro di massa per isotopi stabili (IRMS: *Isotope Ratio Mass Spectrometer*, Thermo-Electron Delta Plus XP), accoppiato ad un analizzatore elementare (Thermo-Electron EA 1112). I risultati sono stati espressi in  $\delta$  secondo la seguente equazione:  $^x\delta = \delta^xE = (R_{\text{campione}}/R_{\text{standard}} - 1) \times 10^3$  dove:  $\delta$  = deviazione del rapporto isotopico di un campione, relativa a quella di un campione di riferimento; X = massa dell'isotopo più pesante ( $^{15}$  per N,  $^{13}$  per C); E = elemento in questione; R = rapporto tra l'isotopo pesante e quello leggero ( $^{15}\text{N}/^{13}\text{N}$  e  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ). La riproducibilità delle analisi è stata di 0.2‰ per entrambi i rapporti isotopici.

Dai risultati ottenuti si evince che il  $\delta^{13}\text{C}$  rientra nei *range* riscontrati in letteratura per esemplari appartenenti alla stessa specie e campionati in varie aree geografiche (e.g. Das *et al.*, 2003; Whitehead e Rendell, 2004), mentre il  $\delta^{15}\text{N}$  presenta valori piuttosto bassi rispecchiando probabilmente l'ologotrofia del Mar Mediterraneo (Tabella 7.1).

Tab. 7.1. Composizione isotopica ( $\delta^{13}\text{C}$ ,  $\delta^{15}\text{N}$ ; ‰) dei tessuti analizzati nei vari esemplari.

Esemplare	Blubber		Cute		Fegato		Muscolo	
	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{15}\text{N}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{15}\text{N}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{15}\text{N}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{15}\text{N}$
1	-19.98	10.25	-19.18	9.94	-	-	-	-
2	-18.94	11.04	-19.03	9.78	-	-	-	-
3	-20.26	11.19	-17.58	10.02	-	-	-	-
4	-18.25	11.27	-18.68	9.78	-18.62	9.22	-16.22	9.27
6	-20.56	11.26	-17.91	9.75	-19.07	9.71	-17.17	9.63
7	-18.97	11.06	-17.74	10.10	-18.25	9.06	-16.66	9.63

Ciascun tessuto ha presentato una bassa variabilità isotopica tra gli individui come già riportato in letteratura per altre aree geografiche, suggerendo l'appartenenza degli esemplari spiaggiati allo stesso gruppo. Ciò conferma come i dati isotopici possano essere utilizzati per differenziare i gruppi di organismi che sono tipici della struttura sociale di questa specie (Whitehead e Rendell, 2004). Infatti in genere all'interno dello stesso gruppo vengono riscontrate composizioni isotopiche simili che suggeriscono elevata similarità nelle risorse alimentari utilizzate (Ruiz-Cooley *et al.*, 2004; Marcoux *et al.*, 2007).

Sono state osservate differenze tra i tessuti analizzati (Figura 1). I valori di  $\delta^{13}\text{C}$  e  $\delta^{15}\text{N}$  più elevati sono stati riscontrati rispettivamente nel muscolo e nel blubber. Le differenze in  $\delta^{13}\text{C}$  possono

essere ricondotte al diverso contenuto lipidico dei tessuti analizzati, infatti sebbene essi siano stati sottoposti al trattamento con cloroformio e metanolo, alcuni residui, più ricchi in  $^{12}\text{C}$ , potrebbero avere determinato un impoverimento nei tessuti in cui la componente grassa è più abbondante. La presenza di variazioni a carico anche del  $\delta^{15}\text{N}$  suggerisce però possibili variazioni nella dieta a breve-medio e lungo termine. Infatti alcuni tessuti analizzati (cute, fegato) presentano tempi di *turnover* minori di altri (muscolo), fornendo indicazioni sulla dieta assunta nell'ultimo periodo. Per esempio, i tempi di *turnover* della cute dei capodogli sono ritenuti comparabili a quelli di altri odontoceti e stimabili intorno a 70-75 giorni (Ruiz-Cooley et al., 2004), sebbene non si possano escludere tempi anche maggiori laddove la cute risulti particolarmente spessa. Di conseguenza, i dati isotopici permettono di differenziare tra la dieta assimilata negli ultimi 2-3 mesi (più impoverita in  $^{13}\text{C}$ ) e quella relativa a periodi anteriori in cui gli organismi si sono alimentati di altre prede, probabilmente perché presenti in altre aree.

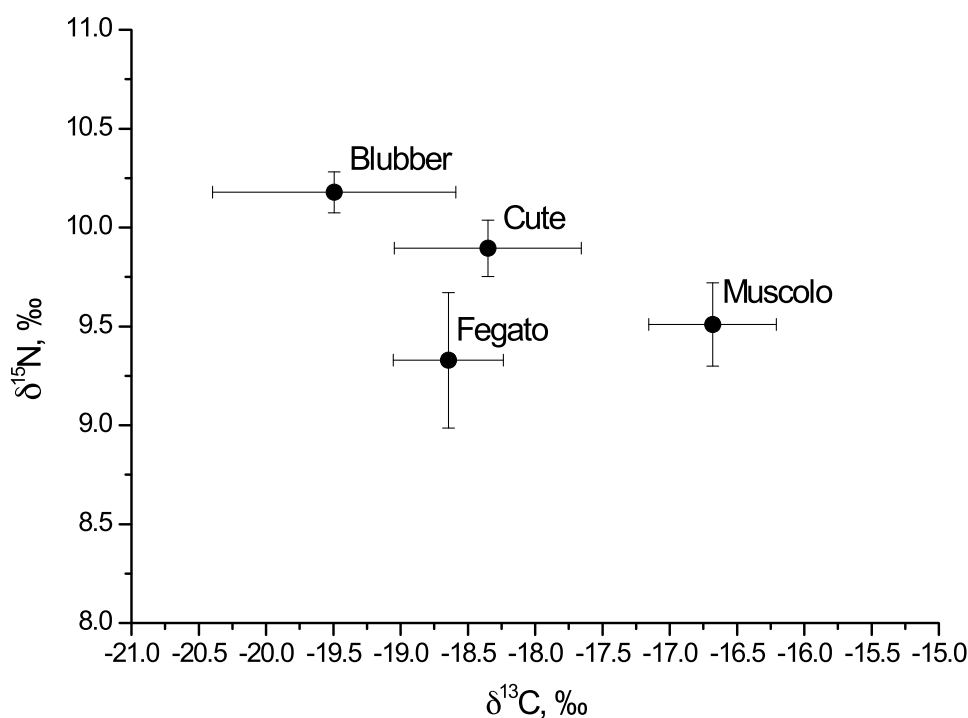


Fig. 7.1. Composizione isotopica media ( $\pm$ d.s.) dei vari tessuti negli esemplari analizzati.

In letteratura è stato riportato che l'astinenza dal cibo comporta in genere un incremento nella composizione isotopica in azoto (Hobson *et al.*, 1993; Gaye-Siessegger *et al.*, 2004), indice del riciclo delle sostanze accumulate. Nella presente indagine i dati disponibili non consentono di valutare se i capodogli spiaggiati siano andati incontro ad un periodo di digiuno, in quanto i tessuti analizzati danno indicazioni su una scala temporale piuttosto ampia e mancano confronti con altri organismi presenti nell'area che non sono andati incontro allo spiaggiamento.



## 8. Dati necroscopici ed indagini post-mortem

Le indagini post-mortem e le conseguenti indagini collaterali sui tessuti campionati durante le necroscopie sono state effettuate sugli individui 5, 6 e 7 in quanto gli altri soggetti si presentavano in avanzato stato di decomposizione e quindi era impossibile effettuare un campionamento per approfondire gli aspetti patologici immediati. Gli aspetti patologici sono stati effettuati dalle Università di Padova, Teramo, dell'IZS di Foggia, dall'Università di Bari e di Las Palmas de Gran Canaria. Inoltre, sono stati inviati campioni per le indagini relative alle biotossine algali al Centro Ricerche Marine (dr. Poletti) e all'IZS delle Venezie per l'indagine micologica.

In seguito riportiamo i report necroscopici dei tre individui che riassumono i dati patologici e microbiologici relativi a ciascuno degli individui analizzati. Agli animali è stato dato un codice di conservazione della carcassa (da 1 - vivo o appena morto - a 5 - resti o carcassa mummificata) e di nutrizione (da 1 - cachettico - a 5 - obeso).

### 8.1 Capodoglio n. 5

<b>Dati di segnalamento</b>		
Data necroscopia	14/12/09	
Codice conservazione	2/3	
Stato di nutrizione	3	
Lunghezza totale	10,5 m	
Spessore blubber (dorsale/medio e ventrale)	D: 9 cm; M: 9 cm; V: 11 cm	
Peso pesato/corretto	14 t	16 t
Sesso	M	
<b>Esame macroscopico</b>		
Cute, blubber e tessuti sottocutanei	Presenza di crostacei Pennellidae, associate a lesioni granulomatose	
Linfonodi pre-scapolari	•Linfadenopatia reattiva diffusa grave cronica con presenza di alcune cavitazioni cistiche nella corticale di piccole dimensioni •Positività del citoplasma di macrofagi nei seni linfonodali alla colorazione di Danscher, anche perifericamente ai follicoli linfatici.	

Cavità toracica	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Petecchie e soffiusioni pleuriche con aree di edema emorragico. Modesta effusioni siero-ematica pleurica.</li> <li>• Grave e diffuso pneumomediastino con petecchie emorragiche.</li> </ul>
Polmoni e pleure	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Emorragie polmonari sub-pleuriche occasionalmente associate a cavitazioni.</li> <li>• Edema diffuso grave ed aree di enfisema sul polmone destro associato a petecchie emorragiche.</li> </ul>
Linfonodi polmonari	Linfadenopatia reattiva sub-acuto/cronica diffusa grave con presenza abbondante di cavitazioni contenenti gas nella corticale.
Cuore e pericardio	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Presenza abbondante di bolle sia nei vasi coronarici sia nel sangue intra-cardiaco.</li> <li>• Presenza di coagulo bianco nell'atrio destro e di coagulo contenente bolle nel ventricolo destro.</li> <li>• Spessore della parete ventricolare libera dx: 4,5 cm, sx; 12 cm.</li> </ul>
Cavità addominale e mesentere	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Peritonite siero-fibrinosa viscerale e parietale sub-acuta diffusa grave</li> <li>• Marcata iperemia e congestione vascolare, occasionali petecchie e soffiusioni emorragiche.</li> <li>• Erosioni/ulcerazioni disseminate nel tessuto mesenterico, generalmente con decorso para-vascolare, con minime aderenze tra le pliche mesenteriche.</li> <li>• Presenza di cisti parassitarie presenti nella radice intestinale del mesentere</li> </ul>
Fegato e pancreas	Congestione/emorragia epatica diffusa grave
Milza	n.d.r.
Concamerazioni gastriche	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Presenza di nematodi, scarsi becchi di calamari e una sola scatola di plastica.</li> <li>• Gastrite catarrale acuta diffusa moderata con erosioni sulla sommità delle pliche mucosali nella II concamerazione gastrica.</li> <li>• Occasionalmente ulcere a carico della mucosa della III concamerazione gastrica che appare colma di liquido giallo-verdastro (bile)</li> </ul>
Intestino	Enterite catarrale moderata diffusa nel tratto prossimale.
Linfonodi meseraici	ndr

Rene	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Congestione grave, in particolare alla giunzione cortico-midollare, con edema.</li> <li>• Emorragie multifocali puntiformi.</li> </ul>
Testicoli	ndr
Altro	Congestione ed edema multiviscerale
<b>Esame microscopico</b>	
Linfonodi pre-scapolari	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Grave deplezione linfocitaria centro-follicolari, associata minima carenza linfocitaria a livello dei centri germinativi.</li> </ul>
Polmoni e pleure	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ampie aree emorragiche associate a presenza di elementi batterici riferibili a clostridi.</li> <li>• <u>Esame IHC per Morbillivirus negativo.</u></li> </ul>
Linfonodi polmonari	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Grave deplezione linfocitaria centro-follicolari, associata minima carenza linfocitaria a livello dei centri germinativi.</li> <li>• Presenza di ampie cavitazioni otticamente vuote nella corticale</li> <li>• Istiocitosi dei seni</li> <li>• <u>Esame IHC per Morbillivirus negativo.</u></li> </ul>
Cuore e pericardio	Microemorragie miocardiche
Fegato e pancreas	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Grave quadro congestizio-emorragico.</li> <li>• Alla colorazione di Danscher diffusa positività delle cellule del Kupffer.</li> </ul>
Milza	n.d.r.
Intestino	Enterite cronica lieve con disepitelizzazione e denudazione dei villi intestinali, associati a pigmento giallo-verde, riferibile a pigmento biliare.
Rene	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ampie aree congeste con emorragie, frequentemente intra-tubulari</li> <li>• Alla colorazione di Danscher, diffusa positività citoplasmatica delle cellule dei tubuli contorti e, occasionalmente, nell'epitelio e nel lume tubulare nella midollare.</li> </ul>
Testicoli	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Presenza di attività di spermiogenesi/spermatogenesi in corso.</li> <li>• Presenza di pigmento bruno-giallastro nelle cellule di Leydig</li> </ul>
<b>Esame virologico</b>	

Morbillivirus	negativo (PCR)
Herpesvirus	negativo (PCR)
Adenovirus	negativo (PCR)
Coronavirus	negativo (PCR)
Altri	negativo (microscopia elettronica)
<b>Esame batteriologico</b>	
Polmone	polimicrobismo aspecifico
Linfonodi pre-scapolari	polimicrobismo aspecifico
Linfonodi polmonari	polimicrobismo aspecifico
Fegato e pancreas	polimicrobismo aspecifico
Rene	polimicrobismo aspecifico
Intestino	polimicrobismo aspecifico
Altro	Ricerca <i>Brucella</i> spp. negativa
<b>Esame parassitologico</b>	
<i>Toxoplasma gondii</i>	negativo (PCR - polmone, fegato)
Parassiti esterni	Presenti di rare lesioni cutanee, localizzate prevalentemente lateralmente sul corpo dell'animale, dalle quali sono state isolate solo porzioni di cefalotorace degenerate di crostacei Pennellidae; per lo stato di conservazione dei parassiti, non è stato possibile arrivare ad una identificazione morfologica di specie.
Polmone	ndr
Rene	ndr
Fegato	ndr
Mesentere	isolate in prossimità delle anse intestinali, 12 larve merocercoidi di cestodi Tetraphyllidea appartenenti alla specie <i>Monorygma grimaldii</i> .
Stomaco	45 <i>Anisakis</i> spp. (adulti e L4)

Intestino	Assenza di parassiti macroscopicamente evidenti all'apertura delle diverse porzioni intestinali esaminate (tratto iniziale, intermedio e terminale). Il contenuto intestinale, analizzato per filtrazione mediante l'utilizzo di setacci, ha dato esito negativo.	
Coprologico	Presenza di rare uova di nematodi Anisakidae.	
Micologico	negativo (fegato e polmone)	
<b>Esame sierologico</b>		
Brucella	negativa	
<b>Altre indagini</b>		
Radioattività	negativa	
Emboli lipidici polmonari	assenti (fissazione <i>en bloc</i> con OsO <sub>4</sub> di tessuto polmonare)	
Emboli gassosi vascolari (media di 6 campioni)	16,30 +/- 1,36 % O <sub>2</sub> 78,35 +/- 0,73 % N <sub>2</sub> 2,38 +/- 1,33 % CO <sub>2</sub> 2,94 +/- 0,77 % H <sub>2</sub> 0,03 +/- 0,08% CH <sub>4</sub>	
Biotossine idro e liposolubili	negativa (fegato)	

## 8.2 Capodoglio n. 6

<b>Dati di segnalamento</b>		
Data necropsopia	13/12/09	
Codice conservazione	2	
Stato di nutrizione	3	
Lunghezza totale	12,14 m	
Spessore blubber (dorsale/medio e ventrale)	D: 8,5 cm; M: 9 cm; V: 12 cm	
Peso pesato/corretto	15,5 t	17,7 t

Sesso	M
<b>Esame macroscopico</b>	
Cute, blubber e tessuti sottocutanei	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Parassitosi esterna lieve associata a occasionale dermatite granulomatosa associata a frammenti di elementi parassitari.</li> <li>• Ferite lacero-contuse ed erosioni a carico della mandibola dovute allo spiaggiamento con stasi ematica a carico della rima mandibolare.</li> <li>• Assenza di emorragie ed edema nelle regioni retro-mandibolari, mandibolari, peri-oculari e peri-auricolari.</li> <li>• Assenza di emorragie nel grasso acustico intra-mandibolare.</li> </ul>
Linfonodi pre-scapolari	Linfadenopatia reattiva sub-acuta/cronica con abbondante pigmentazione nerastra multifocale in sede corticale.
Cavità toracica	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Minima effusione toracica sieroso limpido lievemente rosato (trasudato)</li> <li>• Pneumomediastino moderato con emorragie ed edema.</li> </ul>
Polmoni e pleure	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Edema polmonare moderato diffuso con soffiusioni e petecchie pleuriche.</li> <li>• Aree di edema gelatinoso ed emorragia a carico della pleura parietale.</li> </ul>
Linfonodi polmonari	Linfo-adenopatia cronica diffusa grave con presenza di bolle associate ad emorragie.
Cuore e pericardio	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Emboli gassosi nei vasi coronarici.</li> <li>• Coaguli multipli aderenti all'endocardio atriale destro.</li> <li>• Spessore della parete ventricolare libera dx: 4 cm, sx; 5,2 cm.</li> </ul>
Cavità addominale e mesentere	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Peritonite siero-fibrinosa viscerale e parietale sub-acuta diffusa lieve</li> <li>• Marcata iperemia e congestione vascolare, occasionali petecchie e soffiusioni emorragiche.</li> <li>• Erosioni/ulcerazioni disseminate nel tessuto mesenterico con minime aderenze tra le pliche mesenteriche.</li> <li>• Presenza di cisti parassitarie presenti nella radice intestinale del mesentere</li> </ul>
Fegato e pancreas	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Congestione epatica diffusa grave.</li> <li>• Periepatite fibrinosa diffusa moderata.</li> <li>• Pancreas autolitico</li> </ul>
Milza	n.d.r.

Concamerazioni gastriche	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Presenza di nematodi, becchi di calamari e corpi estranei</li> <li>• Gastrite catarrale acuta diffusa lieve della II concamerazione gastrica con erosioni minime sulla sommità delle pliche della mucosa.</li> <li>• Presenza di abbondante fluido sieroso marrone nella I e II concamerazione.</li> <li>• Gastrite ulcerativa da lieve a moderata del compartimento pilorico con contenuto catarrale giallo-verdastro abbondante (bile)</li> </ul>
Intestino	Enterite catarrale moderata diffusa nel tratto prossimale.
Linfonodi meseraici	Linfadenopatia reattiva cronica diffusa lieve.
Rene	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Congestione grave, in particolare alla giunzione cortico-midollare, con edema.</li> <li>• Emorragie multifocali puntiformi.</li> </ul>
Testicoli	ndr
Altro	Congestione ed edema multiviscerale
<b>Esame microscopico</b>	
Cute, blubber e tessuti sottocutanei	Dermatite purulenta multifocale grave nelle sezioni ottenute dalle lesioni cutanee
Linfonodi pre-scapolari	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Deplezione linfocitaria centro-follicolare</li> <li>• Linfadenite eosinofila da lieve a moderata</li> <li>• Microemorragie con eritrofagocitosi</li> <li>• Istiocitosi marcata dei seni</li> <li>• Presenza di abbondanti depositi di un pigmento simil-antracotico, di colorito bruno-nerastro, osservabile generalmente in vicinanza della parete di vasi sanguigni.</li> <li>• Positività del citoplasma di macrofagi nei seni linfonodali alla colorazione di Danscher</li> </ul>
Polmoni e pleure	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Bronchite cronica multifocale da lieve a moderata.</li> <li>• Aree emorragiche multifocali associate alla presenza di corpi batterici (possibilmente clostridi) nel lume dei vasi sanguigni</li> <li>• <u>IHC per Morbillivirus negativa</u></li> </ul>
Linfonodi polmonari	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Deplezione linfocitaria centro-follicolare con occasionale carioressi linfocitaria, associata a microemorragie e istiocitosi dei seni.</li> <li>• <u>IHC per Morbillivirus negativa</u></li> </ul>



Cuore e pericardio	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Presenza di materiale simil-fibrinoso prevalentemente adeso al rivestimento endocardico nelle sezioni di atrio.</li> <li>• Microemorragie miocardiche.</li> <li>• Presenza di cavitazioni otticamente vuoti, sia singole sia disposte a treno, nei vasi dell'epicardio</li> </ul>
Cavità addominale e mesentere	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mesentere: emorragie perivasali di modica estensione.</li> <li>• Peritonite mesenterica perivascolare cronica lieve. Microtrombosi evidente in alcuni vasi venosi di piccolo calibro e diverse strutture capillari</li> </ul>
Fegato e pancreas	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Presenza di estesi fenomeni autolitici, con contestuale riscontro di multipli e densi aggregati di corpi batterici sia nel lume dei vasi sanguigni, sia nel parenchima</li> <li>• All'interno di più strutture vasali, inoltre, sono apprezzabili accumuli di un pigmento di colorito giallo-verdastro.</li> <li>• Stasi biliare e fenomeni congestizio emorragici a carico del tessuto epatico.</li> <li>• Alla colorazione di Danscher diffusa positività citoplasmatica delle cellule del Kupffer.</li> </ul>
Concamerazioni gastriche	Elementi batterici riferibili a clostridi sia nel tessuto in esame, sia all'interno dei vasi sanguigni
Intestino	Enterite cronica lieve con disepitelizzazione e denudazione dei villi intestinali, associati a pigmento giallo-verde, riferibile a pigmento biliare.
Rene	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ampie aree congeste con emorragie, frequentemente intratubulari</li> <li>• Alla colorazione di Danscher, diffusa positività citoplasmatica delle cellule dei tubuli contorti e, occasionalmente, nell'epitelio e nel lume tubulare nella midollare.</li> </ul>
Testicoli	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Presenza di attività di spermiogenesi/spermatogenesi in corso.</li> <li>• Presenza di pigmento bruno-giallastro nelle cellule di Leydig</li> </ul>
SNC	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Lipofuscinosi neuronale occasionale</li> <li>• Rari sferoidi ed edema con presenza di elementi riferibili a clostridi (post-mortem).</li> <li>• Occasionali aggregati di granuli citoplasmatici positivi alla colorazione di Danscher.</li> </ul>
<b>Esame virologico</b>	
Morbillivirus	negativo (PCR)

Herpesvirus	negativo (PCR)
Adenovirus	negativo (PCR)
Coronavirus	negativo (PCR)
Altri	negativo (microscopia elettronica)
<b>Esame batteriologico</b>	
Polmone	<i>Aeromonas hydrophila</i> e <i>Vibrio parahaemolyticus</i>
Linfonodi pre-scapolari	<i>Aeromonas hydrophila</i>
Linfonodi polmonari	<i>Aeromonas hydrophila</i> e <i>Corynebacterium aquaticum</i>
Fegato e pancreas	assenza di crescita
Rene	assenza di crescita
Intestino	<i>Vibrio vulnificus</i> e <i>Vibrio holisae</i>
Altro	Ricerca <i>Brucella</i> spp. negativa
<b>Esame parassitologico</b>	
<i>Toxoplasma gondii</i>	negativo (PCR - polmone, fegato e SNC)
Parassiti esterni	Evidenti rare lesioni cutanee, dalle quali sono stati isolati 21 esemplari di crostacei del genere <i>Pennella</i> . Alcuni parassiti integri, mentre nella maggior parte dei casi erano presenti lesioni, contenenti solo la porzione cefalica del parassita. I crostacei integri erano localizzati per lo più nella porzione anteriore del corpo, mentre la maggior parte delle lesioni da Pennellidae erano distribuite nelle zone ventrali e centrali del corpo e sulla testa. Occasionali cisti parassitarie nello spessore del <i>blubber</i> ( <i>Phyllobothrium delphini</i> )
Polmone	ndr
Rene	ndr
Fegato	ndr
Mesentere	isolate in prossimità delle anse intestinali, 5 larve merocercoidi di cestodi Tetrphyllidea appartenenti alla specie <i>Monorygma grimaldii</i> .

Stomaco	241 <i>Anisakis</i> spp. (adulti e L4)
Intestino	Assenza di parassiti macroscopicamente evidenti all'apertura delle diverse porzioni intestinali esaminate (tratto iniziale, intermedio e terminale). Il contenuto intestinale, analizzato per filtrazione mediante l'utilizzo di setacci, ha dato esito negativo.
Coprologico	Presenza di numerose uova di nematodi Anisakidae.
Micologico	negativo (fegato e polmone)
<b>Esame sierologico</b>	
Brucella	negativa
<b>Altre indagini</b>	
Radioattività	negativa
Emboli lipidici polmonari	assenti (fissazione <i>en bloc</i> con OsO <sub>4</sub> di tessuto polmonare)
Emboli gassosi vascolari (media di 5 campioni)	13,63 +/- 7,62 O <sub>2</sub> 84,96 +/- 6,56 % N <sub>2</sub> 1,41 +/- 1,07 % CO <sub>2</sub>
Biotossine idro e liposolubili	negativa (fegato e SNC)

### 8.3 Capodoglio n. 7

<b>Dati di segnalamento</b>		
Data necropsopia	12-13/12/09	
Codice conservazione	2	
Stato di nutrizione	3	
Lunghezza totale	11,8 m	
Spessore blubber (dorsale/medio e ventrale)	D: 7,3 cm; M 8,8 cm ; V:9,8 cm	
Peso pesato/corretto	13,8 t	15,7 t
Sesso	M	

<b>Esame macroscopico</b>	
Cute, blubber e tessuti sottocutanei	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Parassitosi esterna lieve associata a occasionale dermatite granulomatosa associata a frammenti di elementi parassitari.</li> <li>• Ferite lacero-contuse ed erosioni a carico della mandibola dovute allo spiaggiamento con stasi ematica a carico della rima mandibolare.</li> <li>• Assenza di emorragie ed edema nelle regioni retro-mandibolari, mandibolari, peri-oculari e peri-auricolari.</li> <li>• Assenza di emorragie nel grasso acustico intra-mandibolare.</li> </ul>
Linfonodi pre-scapolari	Linfadenopatia reattiva sub-acuta/cronica con abbondante pigmentazione arancio/marrone multifocale in sede corticale.
Cavità toracica	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Moderata effusione toracica sieroso limpido lievemente rosato (trasudato)</li> <li>• Pneumomediastino minimo con emorragie ed edema.</li> </ul>
Polmoni e pleure	Edema polmonare grave diffuso con iperemia pleurica ed enfisema.
Linfonodi polmonari	Linfadenopatia cronica diffusa grave con presenza di bolle associate ad emorragie.
Cuore e pericardio	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Presenza di moderata quantità di bolle nei vasi coronarici.</li> <li>• Spessore della parete ventricolare libera dx: 3,2 cm, sx; 3,7 cm.</li> </ul>
Cavità addominale e mesentere	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Peritonite siero-fibrinosa viscerale e parietale sub-acuta diffusa lieve</li> <li>• Marcata iperemia e congestione vascolare, occasionali petecchie e soffiusioni emorragiche.</li> <li>• Presenza di cisti parassitarie presenti nella radice intestinale del mesentere</li> </ul>
Fegato e pancreas	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Congestione epatica diffusa grave.</li> <li>• Aspetti di epatosi evidente nelle aree non congeste.</li> <li>• Periepatite fibrinosa diffusa moderata.</li> </ul>
Milza	n.d.r.

Concamerazioni gastriche	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Presenza di nematodi, becchi di calamari e corpi estranei</li> <li>• Gastrite catarrale acuta diffusa lieve della II concamerazione gastrica con erosioni minime sulla sommità delle pliche della mucosa.</li> <li>• Presenza di abbondante fluido sieroso marrone nella I e II concamerazione.</li> <li>• Gastrite ulcerativa da lieve a moderata del compartimento pilorico con contenuto catarrale giallo-verdastro abbondante (bile)</li> </ul>
Intestino	Enterite catarrale moderata diffusa nel tratto prossimale.
Linfonodi meseraici	ndr
Rene	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Congestione grave, in particolare alla giunzione cortico-midollare, con edema.</li> </ul>
Testicoli	ndr
Altro	Congestione ed edema multiviscerale
<b>Esame microscopico</b>	
Cute, blubber e tessuti sottocutanei	Dermatite piogranulomatosa multifocale grave
Linfonodi pre-scapolari	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Deplezione linfocitaria nei centri germinativi, con focali reperti di carioressi linfocitaria.</li> <li>• Istiocitosi moderata dei seni con presenza di plasmacellule, con scarsi granulociti neutrofili ed eosinofili.</li> <li>• In sede corticale, generalmente perivascolare, presenti elementi macrofagici, singoli o in gruppo, con citoplasma aumentato e repleto di pigmento marrone-nerastro.</li> <li>• Positività del citoplasma di macrofagi nei seni linfonodali alla colorazione di Danscher</li> </ul>
Polmoni e pleure	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Broncopolmonite fibrinosa acuta diffusa grave con minima componente interstiziale.</li> <li>• <u>IHC per Morbillivirus negativa</u></li> </ul>
Linfonodi polmonari	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Deplezione linfocitaria nei centri germinativi, con focali reperti di carioressi linfocitaria.</li> <li>• Istiocitosi moderata dei seni con presenza di plasmacellule, con scarsi granulociti neutrofili ed eosinofili.</li> <li>• <u>IHC per Morbillivirus negativa</u></li> </ul>

Cuore e pericardio	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Microemorragie miocardiche</li> <li>•Fibrosi interstiziale minima lieve con segni di degenerazione delle fibre miocardiche</li> </ul>
Cavità addominale e mesentere	Peritonite fibrinosa cronica multifocale lieve.
Fegato e pancreas	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Aspetti congestizio-emorragici, generalmente in zona 3, associati a quadri atrofici (compressione) delle filiere epatocitarie.</li> <li>•Fibrosi interstiziale portale lieve</li> <li>•Aspetti degenerativi a carico degli epatociti in zona 1 e 2 (rigonfiamento torbido e degenerazione vacuolare) con quadri di lipidosi macro-vacuolare evidente soprattutto in zona 1. Presenza di globuli ialini eosinofili da ipossia intracitoplasmatici.</li> <li>•Stasi biliare intra-epatocitaria.</li> <li>•Alla colorazione di Danscher, granuli citoplasmatici positivi di epatici (prevalentemente centro-lobulare e midzonale), e diffusa positività citoplasmatica delle cellule del Kupffer.</li> </ul>
Intestino	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Enterite cronica diffusa lieve con componente eosinofila, con minime atrofia e fusione dei villi intestinali.</li> <li>•Sfaldamento della mucosa enterica con completa denudazione dei villi intestinali</li> <li>•Evidenza di aggregati di pigmento biliare nel lume frammisto alle cellule epiteliali sfaldate.</li> </ul>
Rene	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Congestione diffusa grave</li> <li>•Emorragie intra-tubulari in prossimità della giunzione cortico-midollare.</li> <li>• Alla colorazione di Danscher, diffusa positività citoplasmatica delle cellule dei tubuli contorti e, occasionalmente, nell'epitelio e nel lume tubulare nella midollare.</li> </ul>
Testicoli	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Presenza di attività di spermiogenesi/spermatogenesi</li> <li>•Occasionale microemorragie nel lume di alcuni tubuli</li> </ul>
<b>Esame virologico</b>	
Morbillivirus	negativo (PCR)
Herpesvirus	negativo (PCR)
Adenovirus	negativo (PCR)



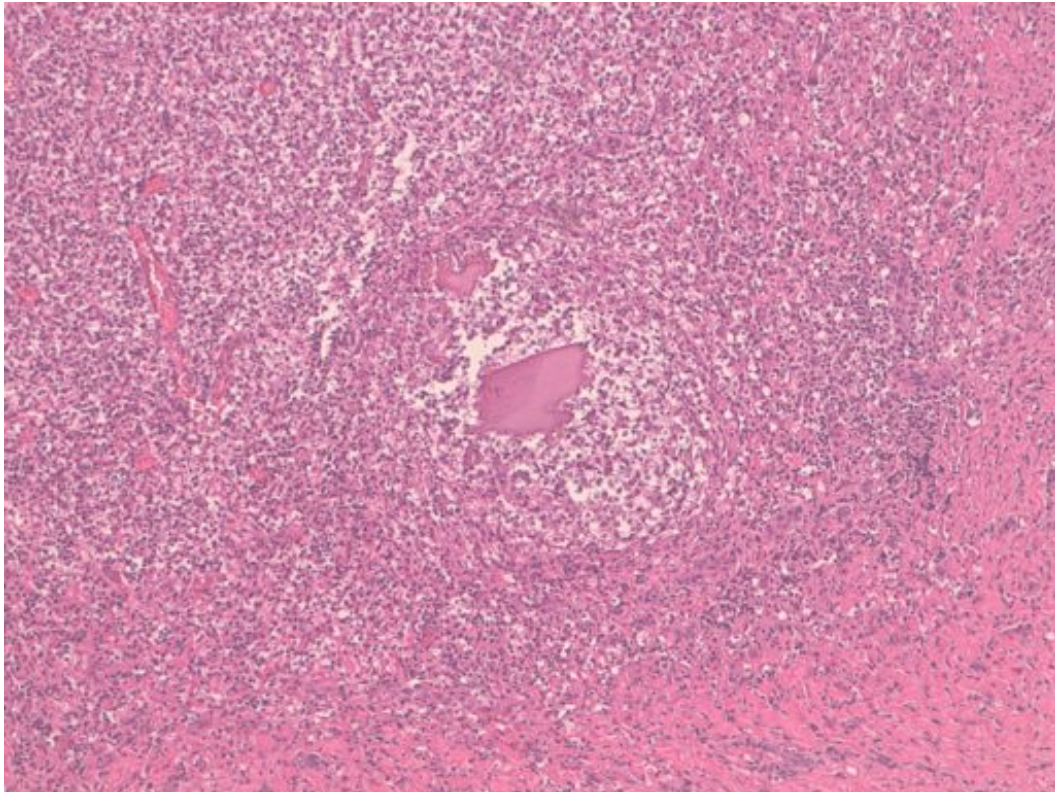
Coronavirus	negativo (PCR)
Altri	negativa (microscopia elettronica)
<b>Esame batteriologico</b>	
Polmone	<i>Aeromonas hydrophila</i> e <i>Vibrio holisae</i>
Linfonodi pre-scapolari	assenza di crescita
Linfonodi polmonari	assenza di crescita
Fegato e pancreas	assenza di crescita
Rene	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> e <i>Enterobacter</i> spp.
Intestino	<i>Citrobacter</i> spp.
Altro	Ricerca <i>Brucella</i> spp. negativa Nessuna crescita dal coagulo intra-cardiaco
<b>Esame parassitologico</b>	
<i>Toxoplasma gondii</i>	negativo (PCR - polmone, fegato)
Parassiti esterni	Evidenti rare lesioni cutanee, dalle quali sono state isolate solo porzioni di cefalotorace degenerati di crostacei Pennellidae.
Polmone	ndr
Rene	ndr
Fegato	ndr
Mesentere	isolate in prossimità delle anse intestinali, 3 larve merocercoidi di cestodi Tetraphyllidea appartenenti alla specie <i>Monorygma grimaldii</i> .
Stomaco	145 <i>Anisakis</i> spp. (adulti e L4)
Intestino	Assenza di parassiti macroscopicamente evidenti all'apertura delle diverse porzioni intestinali esaminate (tratto iniziale, intermedio e terminale). Il contenuto intestinale, analizzato per filtrazione mediante l'utilizzo di setacci, ha dato esito negativo.
Coprologico	Presenza di numerose uova di nematodi Anisakidae.
Micologico	negativo (fegato e polmone)

<b>Esame sierologico</b>	
Brucella	negativa
<b>Altre indagini</b>	
Radioattività	negativa
Emboli lipidici polmonari	assenti (fissazione <i>en bloc</i> con OsO <sub>4</sub> di tessuto polmonare)
Emboli gassosi vascolari (media di 7 campioni)	17,52 +/- 1,22 % O <sub>2</sub> 81,86 +/- 0,93 % N <sub>2</sub> 0,62 +/- 0,23% CO <sub>2</sub>
Biotossine idro e liposolubili	negativa (fegato)

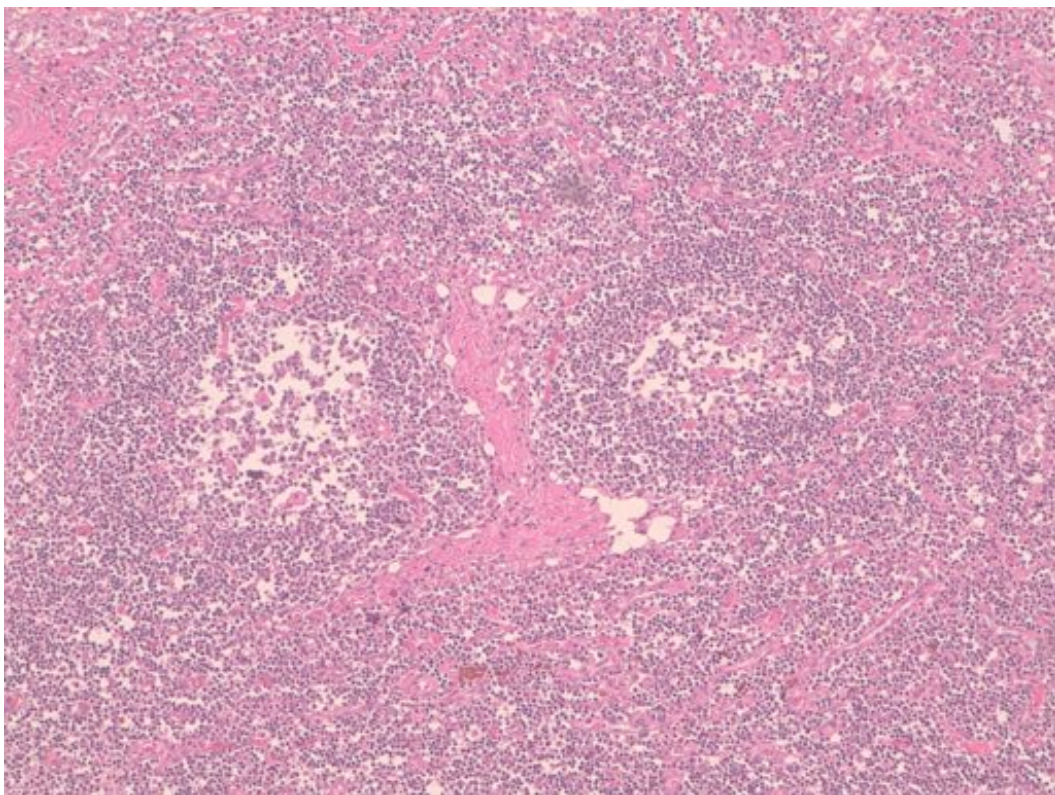


**Fig. 8.1a**

*Fig. 8.1b: dermatite piogranulomatosa n. 7 con materiale esogeno, EE, 10x*



*Fig. 8.2: deplezione centri follicolari dei linfonodi, EE, 10x*





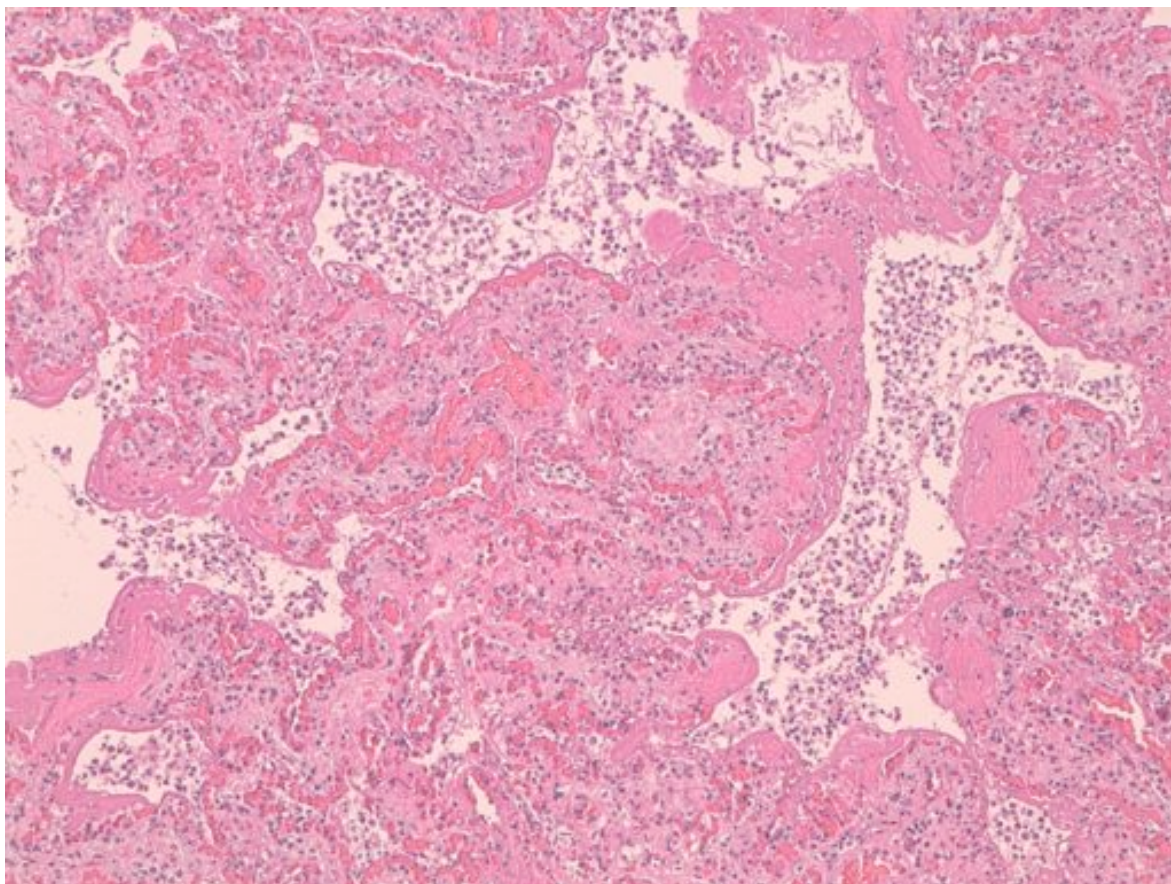
*Fig. 8.3a: peritonite fibrinosa*



*Fig. 8.3b: lesioni ulcerative mesenteriche*



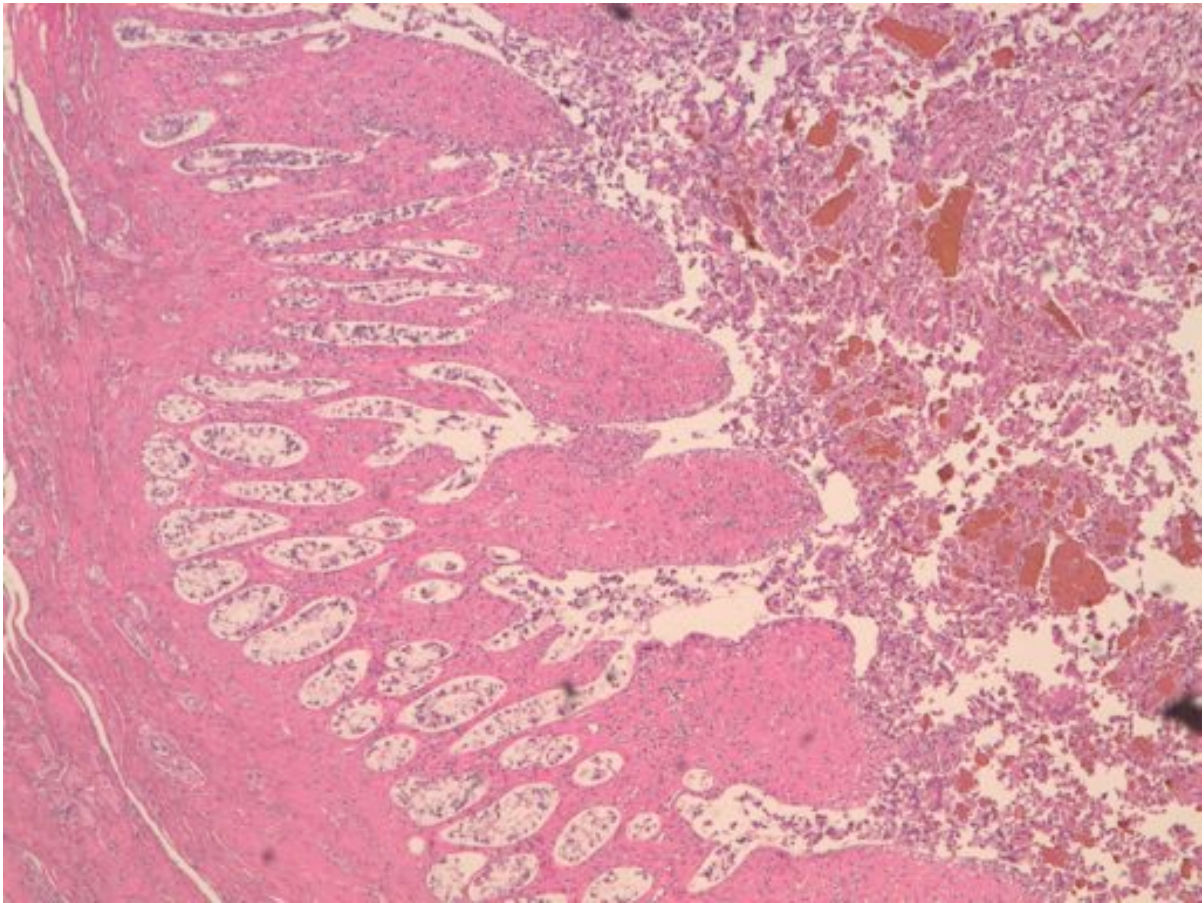
*Fig. 8.4: broncopolmonite fibrinosa acuta diffusa grave n. 7, EE, 10x*



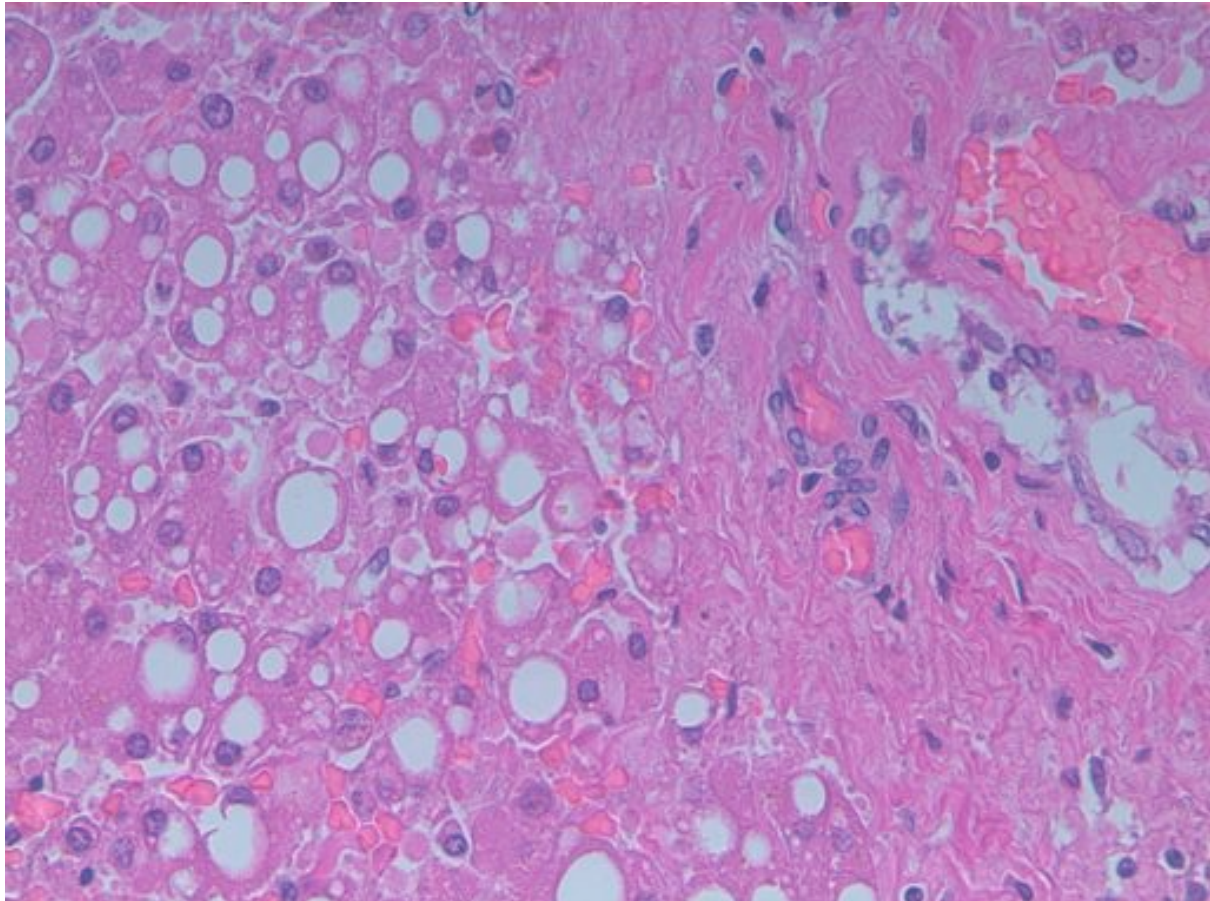
*Fig. 8.5: pneumomediastino*



*Fig 8.6: enterite con sfaldamento e pigmento biliare, EE, 5x*

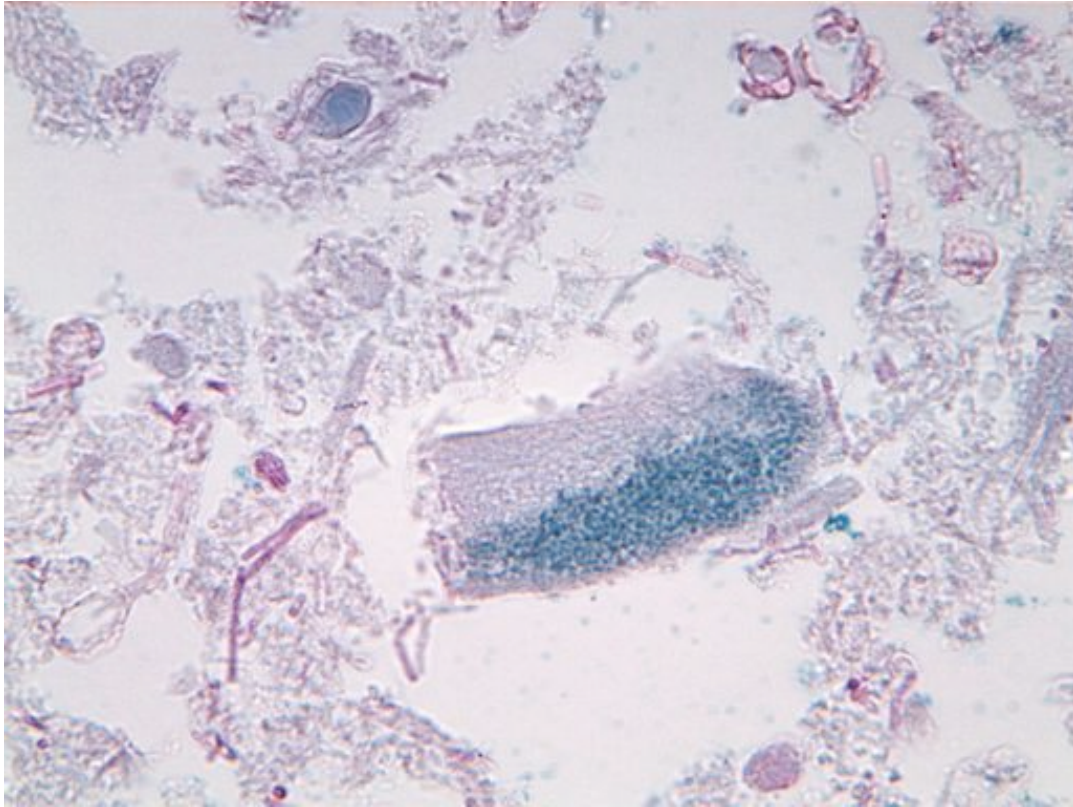


*Fig. 8.7: lipidosi epatica, EE, 40x*

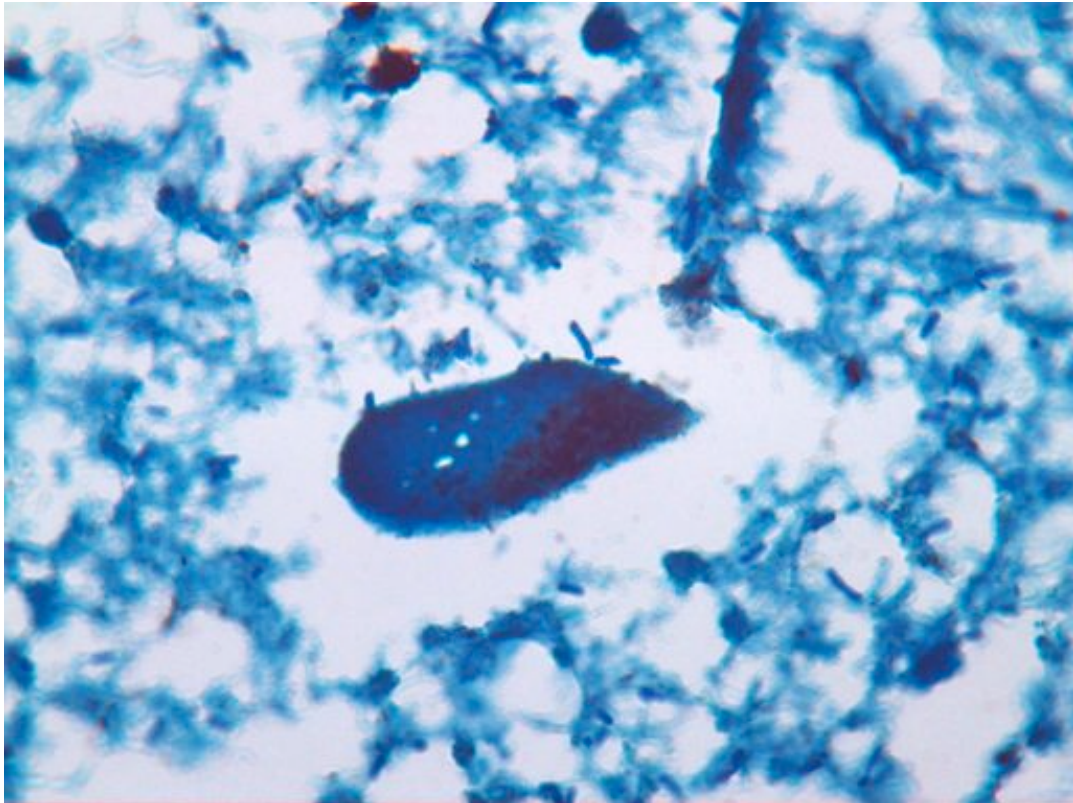




*Fig. 8.8: lipofuscinosi neuronale, Schmorl, 40x*

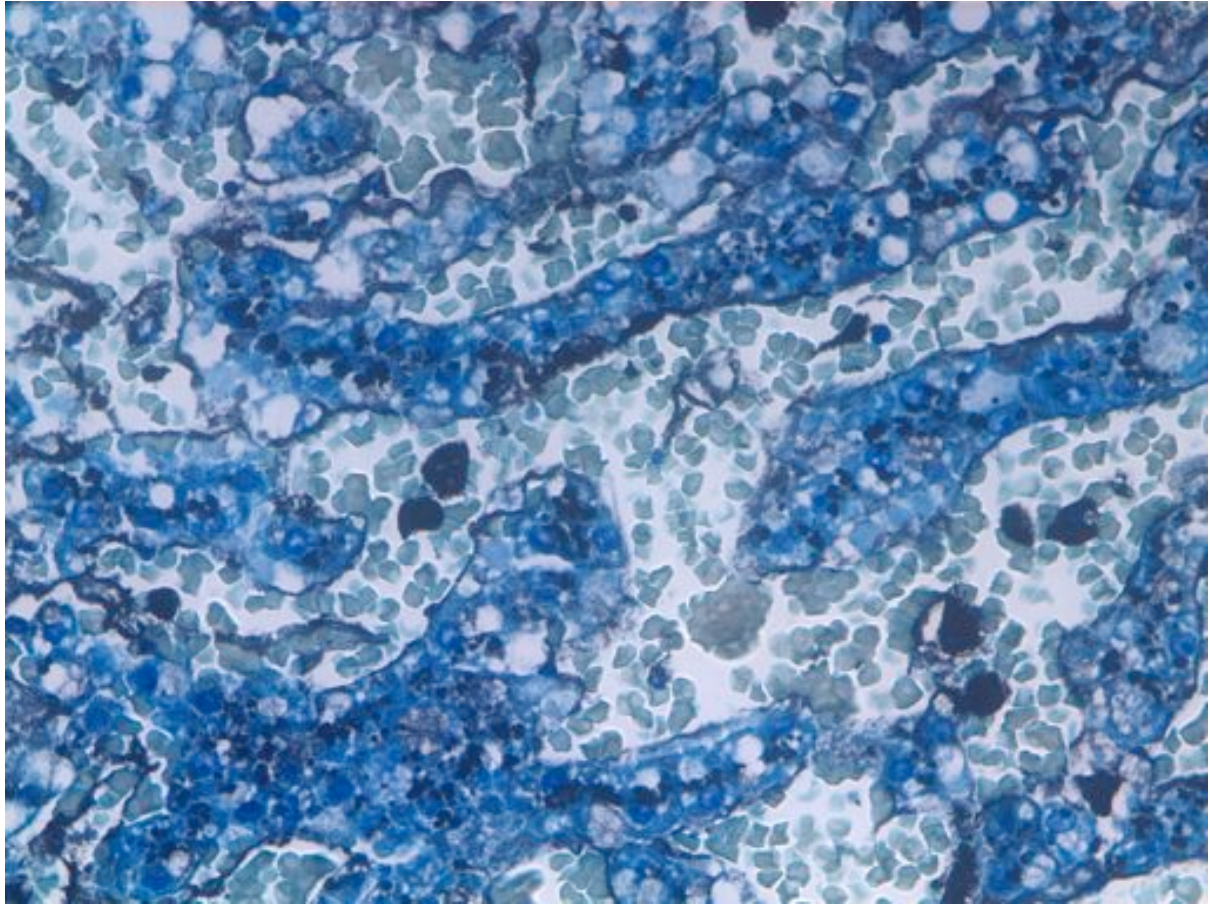


*Fig. 8.9: deposito citoplasmatico di mercurio, Danscher, 100x*

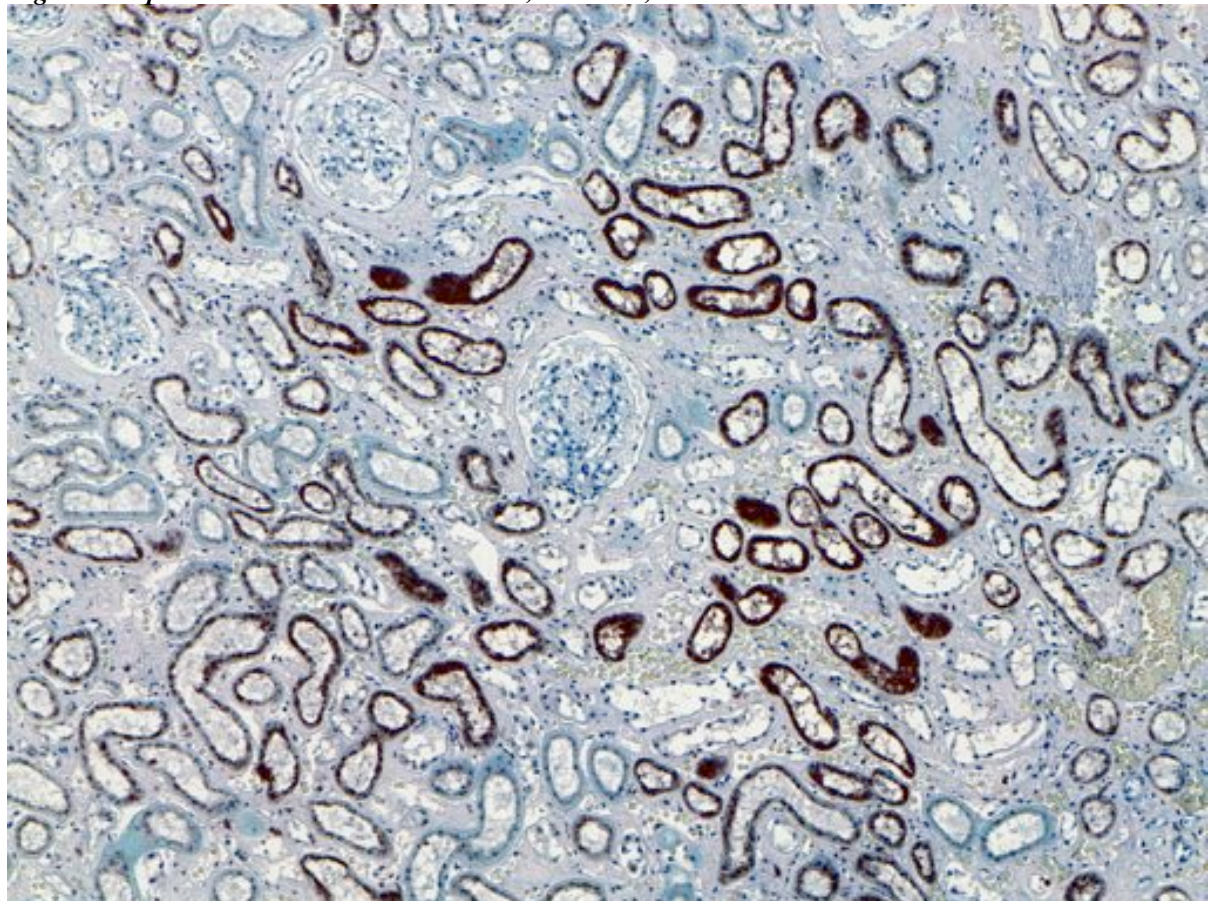




*Fig. 8.10: depositi epatici di mercurio e nelle cellule del Kupffer, Danscher, 10x*



*Fig. 8.11: depositi di mercurio nei tubuli renali, Danscher, 10x*

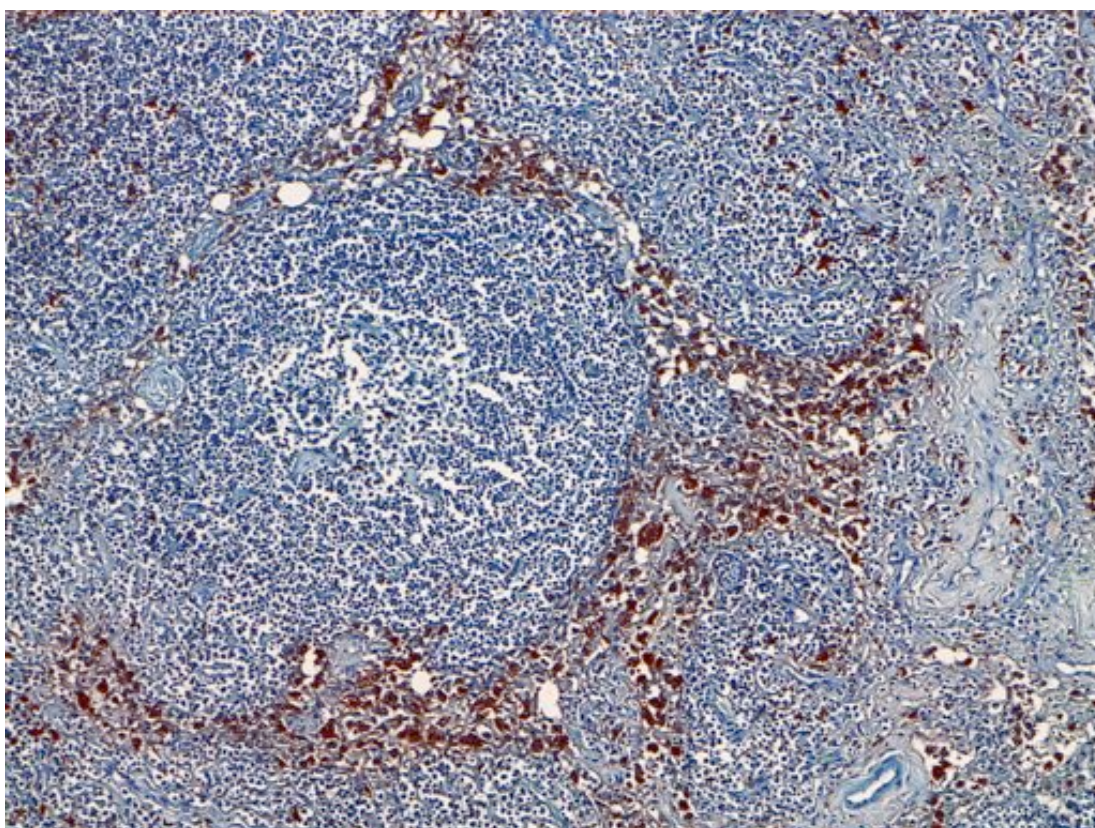




*Fig. 8.12: depositi di mercurio nei macrofagi prescapolari in sede perivascolare, Danscher, 5x*



*Fig. 8.13: mercurio nei macrofagi nei seni corticali e deplezione dei centri germinativi, Danscher, 10x*



#### 8.4 Rilievi patologici ed indagini collaterali

Gli esami anatomo-patologici effettuati sui tre soggetti spiaggiati vivi (5, 6 e 7) non mettono in risalto alcuna lesione significativa o indicativa di uno stato patologico potenzialmente responsabile dello spiaggiamento. Le lesioni patologiche più importanti, presenti in tutti e tre i soggetti, sono:

- Dermatite parassitaria da *Pennella* con complicazioni piogranulomatose o purulente, da patogeni opportunisti. (Fig. 8.1)
- Linfadenopatia reattiva pre-scapolare con deplezione centro-follicolare, edema, occasionali emorragie e istiocitosi dei seni (Fig. 8.2).
- Congestione multiviscerale
- Peritonite sierio-fibrinosa cronica con minime aderenze, emorragie ed erosioni (5 e 6) Fig. 8.3)
- Bronco-polmonite fibrinosa acuta diffusa (7) e occasionale (5) (Fig.8.4); bronchite cronica diffusa lieve (6).
- Linfadenopatia reattiva polmonare diffusa da moderata a grave con deplezione centrofollicolare e occasionali emorragie.
- Pneumomediastino, emorragie polmonari e pleuriche, pneumomatosi cistica dei linfonodi mediastinici (Fig. 8.5)
- Gastrite catarrale parassitaria con erosioni/ulcere (II concamerazione), e ulcere gastriche nella III concamerazione.
- Enterite cronica diffusa lieve con abbondante pigmento biliare (Fig. 8.6).
- Congestione epatica grave con minima atrofia centro-lobulare e lipidosi peri-portale (evidente soprattutto nel 7). Stasi biliare e abbondante positività (Fig. 8.7).
- Emorragie intra-tubulari renali.
- Lipofuscinosi dei neuroni osservati nel midollo allungato del n. 6 (Fig. 8.8)
- Depositi citoplasmatici positivi alla colorazione istochimica di Danscher per il mercurio negli epatociti e nelle cellule del Kupffer, nelle cellule epiteliali dei tubuli renali prossimali e distali, nei macrofagi dei seni linfonodali, sia corticali sia midollari, nei neuroni del midollo allungato del soggetto 6 (associati a lipofuscinosi).

Di particolare rilievo sono i quadri linfonodali con una deplezione dei centri germinativi follicolari che suggeriscono una condizione di immunodepressione. Anche i quadri infiammatori polmonari in alcuni casi e la dermatite parassitaria associata ad infezioni secondarie di tipo purulento o piogranulomatoso sembrano andare in questa direzione. Queste ultime sembrano essere state determinate da batteri alofili opportunisti, come *Aeromonas hydrophila*, presenti nell'acqua respirata durante lo spiaggiamento. Si segnala che tale reperto appare associato alla positività citoplasmatica dei macrofagi nei seni linfonodali, soprattutto degli organi pre-scapolari, in particolare in sede peri-follicolare e sinusale.

La colorazione istochimica di Danscher, nota anche come autometallografia, viene utilizzata per mettere in rilievo la presenza alcuni metalli nei tessuti inclusi in paraffina (oro, argento, zinco e mercurio). Il particolare protocollo usato colora i depositi di solfuro e seleniuro di mercurio (Danscher and Moller-Madsen, 1985) e deve sempre essere correlata con tecniche di rilevamento a raggi X (proton o electron induced X-ray emission analysis) che attualmente è in corso. In letteratura, viene descritta la possibilità del mercurio inorganico di accumularsi nei lisosomi come solfuro di mercurio, senza dare danni per lunghi periodi: autopsie effettuate su esseri umani adulti hanno dimostrato, usando la tecnica di Danscher, che oltre un terzo dei soggetti presentava accumuli neuronali di mercurio senza disordini neurologici in vita o alterazioni evidenti al microscopio, suggerendo che l'assunzione da parte dei motoneuroni. Anche studi di laboratorio mostrano come il mercurio inorganico, evidenziato dalla tecnica autometallografica, non crea



problemi seri alla funzionalità dei motoneuroni. Tale situazione invece è differente per il mercurio organico (metilmercurio o MeHg) che invece determina danni diffusi sia a livello centrale sia periferico (Pamphlett R. et al., 2004). Le indagini di microanalisi a raggi-X hanno messo in evidenza una composizione dei cristalli fatta di Hg, Se (in rapporto 1:0,87) e S, suggerendo la presenza di forme di mineralizzazione epatica del mercurio

Le alterazioni epatiche, evidenti soprattutto nel 7, oltre ai reperti da stasi e compressione (rilievi congestizio/emorragici, reperti degenerativi ipossici, atrofia delle filiere in zona 3, stasi biliare), mettono in evidenza inoltre un quadro di lipidosi in sede peri-portale, che compare generalmente durante stati cachettici (confermando il lungo periodo senza alimentazione) e/o tossici. Si segnala la positività alla colorazione di Danscher sia epatica (prevalentemente delle cellule del Kupffer) sia renale (Fig. 7.9). La distribuzione di tali pigmenti ricalca quanto reperito in letteratura con il fegato che funge da organo di accumulo e detossificazione ed i reni come organo escretore. Woshner et al. (2002) riportano che condizioni degenerative degli epatociti possono aumentare la circolazione del mercurio (generalmente coniugato al selenio) che viene quindi fagocitato dalle cellule del Kupffer, come è possibile vedere in questo caso.

Di particolare importanza è il reperimento di lipofuscinosi nei neuroni del midollo allungato del soggetto n. 6: la lipofuscinosi è generalmente un reperto correlato all'età, ma può essere inoltre determinato da fattori che promuovono lo stress ossidativo, aumentano l'invecchiamento cellulare o riducono la funzionalità di autofagia, aumentano la quantità di ferro e le reazioni redox (Terman e Brunk, 2004). Oltre alla lipofuscinosi, si nota la presenza di aggregati di granuli citoplasmatici positivi alla colorazione specifica di Danscher, in particolare nelle cellule delle corna dorsali (neuroni e glia).

I reperti gastro-enterici sono compatibili con uno stato di mancata alimentazione prolungata, associata al permanere per un lungo periodo di tempo sulla spiaggia. Anche la peritonite potrebbe essere ascrivibile a questa condizione. Le condizioni agoniche hanno determinato infine i rilievi emorragici e congestizi polmonari, pleurici, renali e mesenterici, oltre che la formazione di pneumomediastino e pneumatosi cistica dei linfonodi polmonari.

### *8.5 Emboli gassosi e lipidici*

I risultati ottenuti dalle indagini sugli emboli gassosi possono essere definiti, secondo l'esperienza del gruppo dell'Università di Las Palmas, coordinato dal Prof. A. Fernandez, come un "embolismo gassoso" associato a pneumoedistino, pneumotorace e pneumopericardio, causati da un lungo periodo di decubito sulla spiaggia in vita (Fernandez et al., 2009; Bernaldo et al., 2009). Le caratteristiche di questo embolismo sono correlate alla massa di questi animali che passano molto tempo sulla spiaggia schiacciati dal loro stesso peso: la posizione di decubito laterale, infatti, senza un'adeguata capacità di movimento della cassa toracica, porta progressivamente ad una respirazione forzata, con ampi movimenti di inspirazione ed espirazione e di sovra-distensione dei polmoni che sono compressi e congesti. Questo porta alla creazione di enfisema alveolare, in seguito alla rottura delle pareti degli spazi aerei, e quindi ad enfisema interstiziale e sub-pleurico, con determinazione di pneumomediastino, pneumotorace e pneumopericardio, nei casi gravi come questi. Questo processo porta ad un ingresso di gas nell'atrio e nel ventricolo sinistro attraverso le vene polmonari. Questo, combinato ad una ridotta efficienza ventilatoria polmonare, porta ad una progressiva generale ipossia e ad un'ipertensione polmonare con conseguente insufficienza cardio-respiratoria. Il caso n. 5 è un buon esempio per comprendere quanto detto prima, con un'abbondante quantità di

gas nel ventricolo sinistro. Inoltre da segnalare che questo caso presentava anche gas di putrefazione (idrogeno e metano), indicando una sovrapposizione dei processi con una maggior evidenza di tale condizione.

In relazione agli emboli lipidici, nonostante gli animali siano stati per un lungo periodo sulla battigia, non si riscontrava alcuna positività polmonare. Questo supporta quanto rilevato in letteratura e in studi precedenti dello stesso gruppo spagnolo, che gli emboli non sono reperto comune nei cetacei spiaggiati. **In conclusione, l'assenza di emboli lipidici e gassosi nei tessuti, permettono di escludere la presenza della cosiddetta "gas and fat embolic pathology", trovata in spiaggiamenti di massa di zifidi, in associazione a particolari frequenze di sonar militari** (Fernandez et al., 2005).

#### 8.6 Esami microbiologici, virologici e sierologici

**Gli esami effettuati sono risultati negativi ai principali agenti patogeni conosciuti nei cetacei, in particolare quelli ad azione neurotrofa** (Morbillivirus, Herpesvirus, *Brucella* sp e *Toxoplasma gondii*). L'esame istologico ed immunoistochimico conferma tale rilievo e, insieme alla microscopia elettronica, sembra inoltre escludere un possibile coinvolgimento di un agente virale sconosciuto.

I batteri riscontrati all'esame microbiologico sono tutti agenti opportunisti e nessuno può essere considerato come agente causale dello spiaggiamento: i batteri hanno probabilmente colonizzato gli apparati interni (respiratorio e intestinale) durante lo spiaggiamento.

#### 8.7 Biotossine algali

Per questa determinazione gli estratti dei fegati di due capodogli (6 e 7) sono stati inoculati per via intraperitoneale a topi albini del peso di 20g ca. Tutti i soggetti sono giunti a morte a 14-20 ore dalla inoculazione. Porzioni di fegato e gli estratti residui sono stati inviati al Centro di Referenza Nazionale per le Biotossine Marine di Cesenatico (Dr. Poletti) per effettuare esami più approfonditi. Dal rapporto d'analisi dal quale si esclude la presenza, in valori significativi, delle seguenti biotossine: azaspiracidi totali, pectenotossine totali, yessotossine totali, acido okadaico e derivati totali, paralytic shellfish poison. In un secondo momento è stato inviato anche una porzione di tessuto nervoso del n. 6, per valutare nel SNC la presenza di tossine liposolubili. Anche in questo caso, l'esito è stato negativo.

## 9. Esami tossicologici e prove biologiche

Gli esami tossicologici e le prove biologiche effettuate per poter comprendere quale sia l'effetto delle sostanze presenti nei tessuti dei capodogli, sono stati eseguiti da tre gruppi differenti: l'IZS della Puglia e della Basilicata, l'Università di Siena e l'Università di Catania. Riportiamo di seguito i risultati di ognuno di questi gruppi.

### 8.1 Risultati dell'IZS della Puglia e della Basilicata: metalli pesanti e prove biologiche

La ricerca di metalli pesanti (piombo, cadmio, mercurio, arsenico, rame, manganese, zinco, cromo) dal fegato e dal rene dei due soggetti ha evidenziato una elevata quantità di mercurio totale nel fegato (rispettivamente 89424 ng /g e 118431 ng /g) e quantità non significative dei restanti metalli. Le indagini effettuate per la speciazione del mercurio, riportano una percentuale variabile tra il 3 ed il 4% di mercurio organico, quantità da non ritenere tossiche.

A seguito di tale riscontro altri topi di laboratorio sono stati reinoculati per via intraperitoneale con estratto di fegato e sono venuti a morte dopo 14 -16 ore. Parallelamente altri topini sono alimentati con fegato di capodoglio impiegando dosi diversificate (g 2 e g 4 pro capite), per 24 ore. Trascorso tale termine gli animali da laboratorio hanno mostrato letargia, pelo arruffato, riluttanza al movimento, ottundimento del sensorio. Quindi sono stati sacrificati ed i rispettivi organi (fegato, reni, encefalo) sono stati campionati per la ricerca di mercurio. Rispetto ai soggetti controllo, in cui sono state evidenziate concentrazioni medie oscillanti tra 1 e 5 ppb, gli organi degli animali oggetto del presente test in vivo hanno mostrato sensibili incrementi come si evince dalla tabella 8.1. Il quantitativo di mercurio dei soggetti inoculati per via endoperitoneale e deceduti dopo 14-16 ore è sovrapponibile a quello dei gruppi controllo.

L'importante quantità di mercurio (rispetto ai controlli) evidenziata nel cervello degli animali alimentati con fegato tal quale denota una sua efficace capacità di attraversamento della barriera emato-encefalica, a prescindere dalla forma chimica che ad oggi non ci è nota.

Campione	Prova	Tessuto	Concentrazione (ppm - µg/g)
1	topi inoculati IP con estratti di fegato di capodoglio n. 6 e 7	Encefalo	≤ 0,010
		Organi	≤ 0,010
2	topi alimentati con 2 gdi fegato di capodoglio n 7	Encefalo	0,126
		Reni	1,046
		Fegato	0,328
3	topi alimentati con 4 gdi fegato di capodoglio n 7	Encefalo	0,171
		Reni	1,53
		Fegato	0,442
4	topi alimentati con 2 gdi fegato di capodoglio n 6	Encefalo	0,200
		Reni	1,57
		Fegato	0,510
5	topi alimentati con 4 gdi fegato di capodoglio n 6	Encefalo	0,153
		Reni	1,47
		Fegato	0,664

Tab. 9.1

### 9.2 Risultati dell'Università di Siena: prove biologiche

**Colture cellulari:** sono state realizzate colture cellulari primarie a partire da prelievo cutaneo di 2 esemplari di capodoglio sui 3 esemplari campionati, in quanto è stato impossibile allestire delle colture cellulari del PM5 e, solo in parte, per il PM7 a causa delle grandi infezioni sviluppatasi. Sono stati inviati all'IZS di Siena dei campioni di coltura cellulare per identificare gli agenti infettanti nell'epidermide messa in mezzo di coltura dell'esemplare PM5 e PM7. I risultati hanno evidenziato la presenza di *Brevundimonas vesicularis*, ad oggi mai ritrovato nelle nostre colture di fibroblasti di cetaceo (vedi allegato).

Le colture cellulari primarie di fibroblasti di 2 esemplari di capodoglio (esemplare n. 6 e n. 7), sono state trattate ciascuna con l'estratto di fegato del rispettivo esemplare. Tale esperimento aveva lo scopo di valutare l'eventuale presenza e la tossicità di biotossine algali liposolubili presenti nel fegato dei capodogli al fine di stabilire l'eventuale ruolo di queste tossine sulla morte degli animali. Tale trattamento *in vitro* ha permesso di avere un dato di tossicità direttamente sulla stessa specie e non su altre tassonomicamente molto distanti, anche se con le limitazioni classiche di qualunque test *in vitro*. L'estrazione delle biotossine liposolubili è stata effettuata su materiale epatico congelato a -20°C, seguendo la metodica indicata in Gazzetta Ufficiale N. 165 del 16 Luglio 2002 (MINISTERO DELLA SALUTE, DECRETO 16 maggio 2002 - Tenori massimi e metodiche di analisi delle biotossine algali nei molluschi bivalvi vivi, echinodermi, tunicati e gasteropodi marini). Il piano sperimentale ha previsto il trattamento di 4 flask da 200 ml a confluenza, 2 con colture cellulari dell'esemplare n. 6 e 2 con colture cellulari dell'esemplare n. 7, tutte alla terza generazione. 1 flask per animale è stata trattata con estratto del rispettivo fegato e 1 flask per animale è stata trattata con il veicolante (bianco chimico) utilizzato per le tossine liposolubili, cioè il Tween 60. Dopo 6 ore dal trattamento tutte le cellule erano morte sia nella flask con l'estratto epatico che in quella con il veicolante, evidenziando ancora una volta come queste sostanze (tween) siano tossiche a livello culturale. Da mettere in evidenza un elevato numero di infezioni che si sono sviluppate nelle Fiasche con l'estratto epatico, di origine batterica. Non è stato effettuato un test specifico per valutare il tipo di infezione.

Successivamente le colture cellulari sono state trattate con un omogenato in soluzione fisiologica di fegato di 2 esemplari di capodoglio (n. 6 - PM6 - e n. 7 - PM7) e, come bianco sperimentale, di un esemplare di maiale, 2 colture cellulari di fibroblasti degli esemplari n. 6 e n. 7. 4 provette da 15 ml a confluenza (terza generazione), 2 dell'esemplare n. 6 e 2 dell'esemplare n. 7, sono state così trattate: una n. 6 con omogenato di maiale (1g/L), una PM6 con omogenato di fegato n. 6, una PM7 con omogenato di maiale (1g/L), una PM7 con omogenato di fegato n.7. Dopo 12 ore di trattamento tutte le cellule delle 4 provette mostravano un evidente stress ma non la morte. Immediato lo sviluppo di infezioni di origine batterica. Dopo 24h è stato effettuato un test con il tripan blu per valutare la vitalità cellulare: le cellule con l'omogenato di maiale erano morte per più del 70%, le altre con l'omogenato di capodoglio erano vive per il 90%.

**Test di tossicità con gambusie:** in data 27 gennaio 2010 sono stati trattati con un omogenato in soluzione fisiologica di fegato di 2 esemplari di capodoglio (n. 6 e n. 7) e, come bianco sperimentale, di un esemplare di maiale, 80 esemplari di *Gambusia affinis*, suddivisi in 4 gruppi sperimentali. Il primo gruppo (20 pesci) mantenuto in acqua pura come Gruppo Controllo, un secondo gruppo (20 pesci) mantenuto in acqua con omogenato di fegato di maiale (1g/L) come Controllo Sperimentale, un terzo gruppo (20 pesci) mantenuto in acqua con omogenato di fegato di PM6 (1g/L) ed un quarto gruppo (20 pesci) mantenuto in acqua con omogenato di PM7 (1g/L). Tutte le vasche sono state adeguatamente ossigenate durante

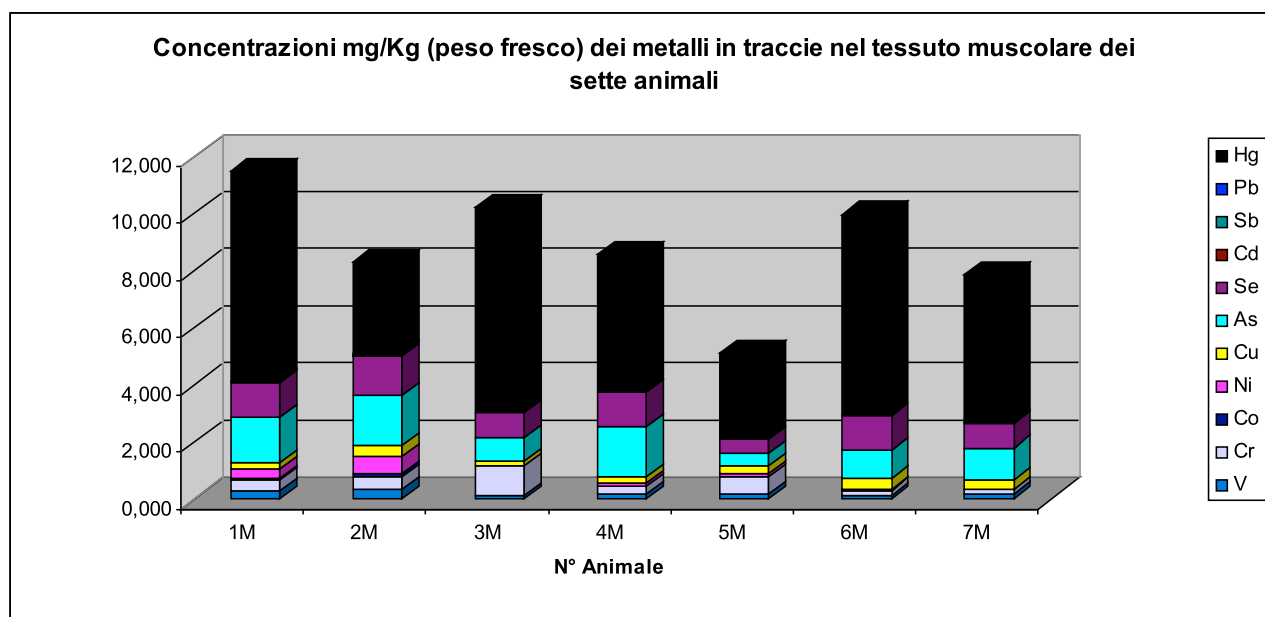
tutto il tempo sperimentale. Dopo 24 ore di trattamento i pesci delle 4 vasche erano tutti vivi, anche se quelli delle vasche PM6 e PM7 mostravano un comportamento anomalo rispetto agli altri, già evidenziato in seguito a trattamento di esemplari della stessa specie con idrocarburi policiclici aromatici. L'esperimento è stato mantenuto fino a 48 h e quindi si è proceduto al sacrificio degli animali per le indagini dei *biomarkers*. In particolare, sono stati indagati dei *markers* di genotossicità: Erythrocytic Nuclear Abnormalities (ENA) e Comet Assay, di neurotossicità: Acetilcolinesterasi (AChE), e per valutare la presenza di tossine liposolubili: Etossiresorufina-O-Detilasi (EROD). Le prove hanno dimostrato una inibizione parziale della AChE sottolineando la presenza di un potenziale agente neurotossico.

### 9.3 Università di Catania: metalli pesanti

I campioni di muscolo sono stati mineralizzati in un sistema a microonde Ethos Touch Control Microwave system (Milestone) con HNO<sub>3</sub> e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e letti allo spettrometro di massa ICP-MS Elan DRC-e (Perkin Elmer). I risultati sono riportati in tabella 9.2 e i dati sono espressi in mg/kg (peso fresco). Viene inoltre riportato il grafico 9.1 che rappresenta e sintetizza i risultati.

Tab. 9.2

Animale n	V	Cr	Co	Ni	Cu	As	Se	Cd	Sb	Pb	Hg	T-Hg/Se
1	0,281	0,375	0,071	0,316	0,217	1,631	1,213	0,008	0,000	0,044	7,350	6,1
2	0,352	0,461	0,097	0,611	0,341	1,781	1,392	0,006	0,002	0,065	3,216	2,3
3	0,150	1,008	0,007	0,033	0,129	0,845	0,870	0,004	0,000	0,002	7,152	8,2
4	0,170	0,277	0,018	0,091	0,211	1,776	1,192	0,006	0,000	0,010	4,851	4,1
5	0,165	0,611	0,024	0,074	0,296	0,467	0,467	0,006	0,004	0,016	2,977	6,4
6	0,107	0,214	0,004	0,026	0,364	0,983	1,230	0,003	0,000	0,018	7,027	5,7
7	0,183	0,158	0,009	0,005	0,335	1,111	0,860	0,004	0,000	0,022	5,156	6



Graf 9.1



#### 9.4 Interpretazione dei risultati

Le indagini tossicologiche sottolineano il ruolo causale di alcune sostanze esogene che hanno dimostrato, nelle prove biologiche, di avere un'influenza sulle funzioni del sistema nervoso, per quanto lieve. Questo può aver determinato un'alterazione sia nelle funzioni sensoriali e/o in quelle motorie.

Per quanto riguarda l'individuazione della/e sostanza/e responsabile/i di tale condizione, le indagini in atto hanno permesso di evidenziare dei livelli elevati di mercurio nel fegato dei due soggetti. Sono ben noti gli effetti depletivi del mercurio a carico degli organi del sistema reticolo-endoteliale e i conseguenti deficit immunologici, oltre agli effetti neurotossici che possono provocare alterazioni dell'orientamento e del comportamento, svolti dalla forma organica del mercurio. I valori di mercurio reperiti rientrano negli intervalli di riferimento per i cetacei del Mar Mediterraneo, per quanto questa specie sia meno studiata delle altre e non sia certa la presenza di sistemi di detossificazione simili agli altri odontoceti, essendo filogeneticamente distante da questi (Capelli et al., 2008, Nigro e Leonzio, 1996). ***I dati relativi alla speciazione del mercurio e alla quantificazione epatica del selenio sono in corso di conferma ma da una prima indagine si suppone che il mercurio non abbia un ruolo rilevante nel determinismo di una potenziale neurotossicità.*** La colorazione di Danscher effettuata su vari tessuti sembra comunque suggerire una circolazione di tale sostanza ed una localizzazione certa in sede neuronale, comune ad entrambe le specie di mercurio (inorganica e organica). Tale osservazione pare trovare supporto anche nelle prove di somministrazione *per os* di fegato di capodoglio su topo.

La misura dell'inibizione dell'attività dell'acetilcolinesterasi, un enzima presente nel tessuto nervoso di tutti i gruppi animali, che catalizza l'idrolisi del neurotrasmettitore acetilcolina. E' noto che alcuni pesticidi come gli organofosforati ed i carbammati, utilizzati su larga scala, hanno un'azione inibitoria nei confronti dell'acetilcolinesterasi. Gli organofosforati sono stati utilizzati in diversi campi come pesticidi, lubrificanti, additivi nei carburanti ed anche come agenti chimici impiegati in diversi conflitti, mentre i carbammati sono usati principalmente come insetticidi. Da tener conto che lo stesso mercurio presenta un'azione inibente dell'acetilcolinesterasi.

## 9. Discussione e conclusioni

Lo spiaggiamenti di massa di 7 capodogli lungo il litorale pugliese il 10 dicembre del 2009 rappresenta un evento abbastanza inusuale nel Mar Mediterraneo e per le coste italiane, per quanto sia già occorso in passato (descritto 7 volte negli ultimi). Le due aree maggiormente interessate sono la Sicilia, in particolare le coste sud-occidentali (5 eventi distanziati da intervalli di tempo variabili da 4 a 140 anni) ed il **Mar Adriatico**, in cui si sono registrati **3 eventi simili** (compreso quello in oggetto) a distanza di **71 e 75 anni**.

I 7 animali erano giovani maschi con un'età intorno ai 10 anni che, potenzialmente, avevano appena lasciato i gruppi materni e quindi probabilmente inesperti. Senza dubbio, il gruppo si configura nell'entità sociale di una "*bachelor school*", probabilmente aggregatosi di recente, come suggeriscono i *matching* fotografici con i database mediterranei dato che almeno due dei soggetti provenivano dal Mar Ligure, supponendo una migrazione stagionale tra i due bacini attraverso lo stretto di Messina o (meno probabile), il Canale di Sicilia. Tale osservazione viene supportata dai dati sugli isotopi stabili che indica un cambio di dieta 2-3 mesi prima dello spiaggiamento. Questi rilievi, insieme alle osservazioni sui contenuti gastrici e ai dati reperiti in letteratura, indicano inoltre che questi animali si trovavano molto probabilmente nel Mar Ionio nel periodo antecedente allo spiaggiamento, ad una distanza di almeno 350 km dal punto dello spiaggiamento. E' inoltre plausibile supporre che il gruppo, nuotando alla massima velocità conosciuta ininterrottamente, abbia impiegato almeno 7 giorni per arrivare davanti alle coste garganiche, tempi che coincidono con la mancata alimentazione dimostrata dall'analisi dei contenuti gastrici. Questi tempi, non tengono conto di soste, rallentamenti o deviazioni, come quelle imposte dalle correnti marine che normalmente, in questo periodo lambiscono le coste orientali dell'Adriatico. Anche le distanze sono state calcolate dal Gargano a S.ta Maria di Leuca, ovvero al limite tra Ionio e Adriatico: è possibile che questi animali vivessero in acque più meridionali, a circa 500-600 km dal luogo dello spiaggiamento. In letteratura, si descrive il capodoglio come una specie evolutasi per vivere in mari profondi oltre i 600 metri. Quando questi animali si trovano in mari poco profondi forse non riescono più ad utilizzare in maniera adeguata il proprio sistema di orientamento.

**I rilievi patologici sono stati effettuati, per forza di cose, su soli 3 soggetti e quindi danno un quadro incompleto della situazione.** In particolare, risulta difficile comprendere se esistesse una condizione patologica marcata ed evidente negli altri quattro soggetti morti in mare e se quindi il gruppo abbia seguito uno o più di questi soggetti per aggregazione sociale. In ogni caso, i reperti sono sufficienti per indicare l'assenza di cause biologiche od organiche come responsabili della morte dei 7 soggetti. Si deve solamente sottolineare la presenza di un quadro di immunocompromissione, evidente nel sistema linfatico, che ha potenzialmente esposto gli animali a quadri infiammatori secondari, come broncopolmoniti e dermatiti. **I medesimi reperti escludono che la causa del decesso sia da attribuire alla "gas and fat embolic syndrome", condizione patologica riportata in letteratura come associata all'esposizione ai sonar militari.** Di contro, **i rilievi tossicologici e le prove biologiche indicano un'alterazione delle funzioni nervose ad eziologia esogena che, per quanto minime possono aver alterato il senso di orientamento e della percezione.**

In conclusione, lo spiaggiamento di questi 7 capodogli si può attribuire ad una condizione multifattoriale, come spesso viene suggerito nei lavori scientifici che riportano eventi come questo,

citati in bibliografia (Evans et al., 2005; Whitehead, 2000; Jauniaux et al, 1998). In figura 9, si riassume quanto scritto di seguito, cercando di indicare i rapporti di causalità ed influenza.

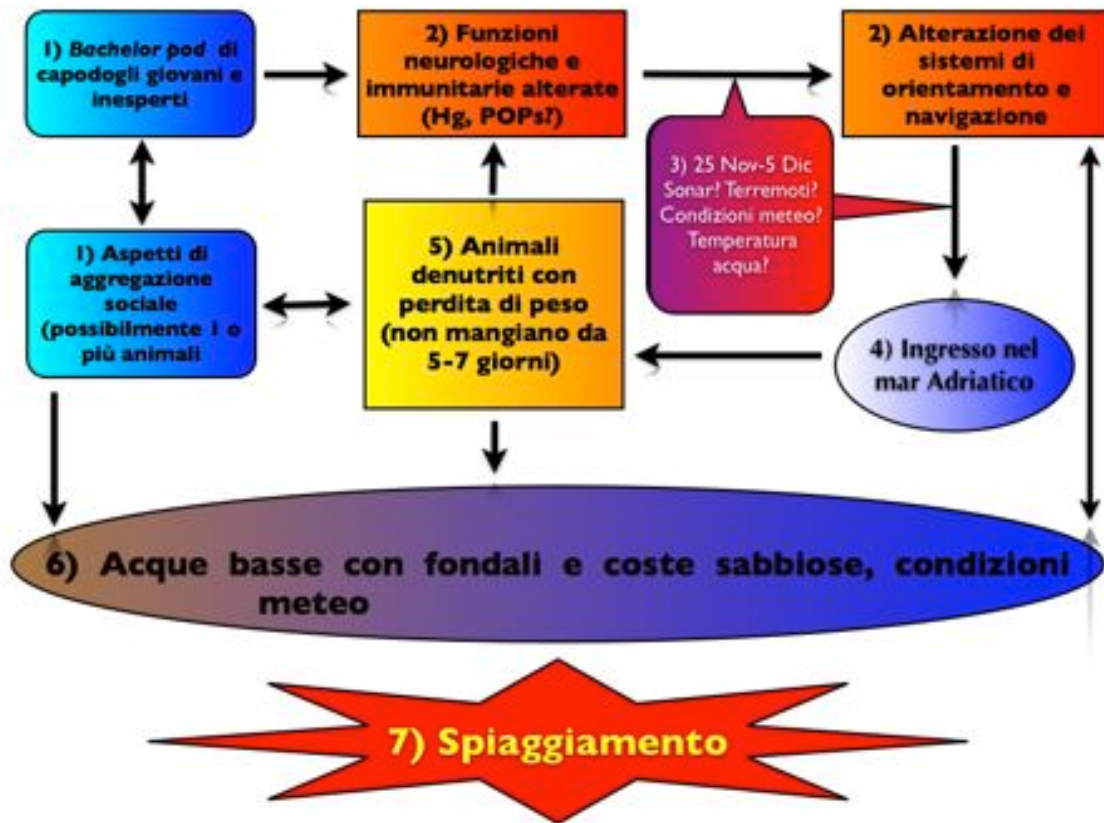
**I soggetti si trovavano probabilmente nel Mar Ionio**, presumibilmente a basse latitudini. **La positività alla colorazione specifica per il mercurio del citoplasma neuronale associato alla presenza di lipofuscina, così come descritto in medicina umana, e il reperimento del medesimo reperto in sede linfonodale, renale ed epatico, suggerisce una circolazione della sostanza nell'organismo dei capodogli.** Si ricorda inoltre che lo stesso mercurio ha un'azione di depressione del sistema immunitario. In considerazione dei risultati delle prove biologiche, non si escludono (inibizione dell'acetilcolinesterasi) non si escludono altre sostanze come fattori predisponenti lo spiaggiamento.

Gli animali sono entrati nel Mar Adriatico e qui la **complicità di fattori ecologici** (profondità), **biologici** (inesperienza del gruppo), **sociali** (aggregazione), insieme ai rilievi **patologici e tossicologici** (alterazione del sensorio e immunocompromissione di origine chimica), ha determinato l'impossibilità ad orientarsi e a trovare una via d'uscita da questo vicolo cieco. In questo quadro resta da valutare il ruolo delle condizioni meteo-climatiche. **Durante il viaggio, durato almeno una settimana, gli animali non si sono alimentati**, con una potenziale movimentazione delle riserve lipidiche e, potenzialmente, delle eventuali sostanze inquinanti lipofile presenti nei tessuti adiposi. Questa situazione ha ovviamente aggravato le condizioni generali di salute dei soggetti.

Resta da identificare il motivo per cui questi esemplari si siano addentrati (o fuggiti) nel Mar Adriatico. Escluse eventuali correlazioni con i cicli solari, alterazioni del campo geomagnetico e fasi lunari (come riportato in letteratura), **rimangono da indagare alcuni fattori naturali ed antropici, verificatisi almeno da 7 a 20 giorni prima dell'evento nel Mar Ionio.** In particolare si devono considerare eventuali alterazioni della **temperatura dell'acqua**, con uno spostamento delle prede nella colonna d'acqua. Altri fattori naturali da tenere in considerazione sono i **terremoti**, come evento causale di una fuga e non come scatenante una condizione embolica. L'unico che appare compatibile con i fattori elencati prima sembra essere quello verificatosi il 26 Novembre 2009 (magnitudo 5,1 scala Richter) nella Fossa Ellenica ovvero dove vivono e vengono usualmente avvistati i capodogli, tra cui 2 di quelli spiaggiati. Infine, i **sonar**, come quelli correlati alle attività di prospezione presenti anche in Adriatico (cartina riportata qui sotto e ricavata dal sito del Ministero dello Sviluppo Economico), **non possono essere considerati come agenti causali lo spiaggiamento per il loro impatto diretto**, almeno nei tre soggetti esaminati, in quanto è stata evidenziata l'assenza della "*gas and fat embolic syndrome*", ma possono eventualmente essere tenuti in considerazione come potenziale fattore di disturbo e/o di alterazione del comportamento di questi animali. In letteratura, su prove eseguite nel Golfo del Messico, si riscontrano alterazioni evidenti del comportamento alimentare, anche se non sembrano modificare profili di immersione e direzione (Jochens et al., 2008, Miller et al, 2009). Gli studi eseguiti rimangono comunque limitati dato lo spettro di emissione acustica degli airguns usati (Madsen et al., 2006)

Questo lavoro rappresenta, da un punto di vista scientifico e professionale, il risultato di un lavoro di coordinazione tra numerosi gruppi ed enti di ricerca e di figure professionali. Rappresenta inoltre un esempio di lavoro concertato da poter utilizzare anche in altri casi, ottimizzando i mezzi e le competenze a disposizione, per quanto sia un modello migliorabile.

Le indagini che mancano per giungere ad un esito più completo, in particolare le indagini tossicologiche, hanno tempi lunghi in relazione a difficoltà tecniche e a carenza di risorse economiche. Le indagini tossicologiche sono tuttora in corso e quando queste verranno completate, i risultati saranno tempestivamente comunicati.



Questa terza relazione finale è il riassunto degli sforzi congiunti di vari enti ed istituzioni. Qui sotto riporto i ricercatori che hanno fornito il loro contributo. Altri sono ancora al lavoro per poter fornire ulteriori indicazioni.

- **Dr. Sandro Mazzariol** (ricercatore presso il Dipartimento di Sanità Pubblica, Patologia Comparata e Igiene Veterinaria - Università di Padova)
- **Prof. Massimo Castagnaro** (professore ordinario presso il Dipartimento di Sanità Pubblica, Patologia Comparata e Igiene Veterinaria - Università di Padova; preside della Facoltà di Medicina Veterinaria)
- **Prof. Bruno Cozzi** (professore ordinario presso il Dipartimento di Scienze Sperimentali Veterinarie - Università di Padova; coordinatore della Banca dei Tessuti dei Mammiferi Marini del Mediterraneo)
- **Prof. Giovanni Di Guardo** (professore associato presso il Dipartimento di Scienze Biomediche Comparate - Università di Teramo)
- **Dr. Giuseppe Marrucchella** (ricercatore presso il Dipartimento di Scienze Biomediche Comparate - Università di Teramo)
- **Dr. Antonio Petrella** (dirigente veterinario Unità Operativa Diagnostica dell'IZS della Puglia e della Basilicata)
- **Dr. Pasquale Troiano** (dirigente veterinario Unità Operativa Diagnostica dell'IZS della Puglia e della Basilicata)
- **Dr. Dorianò Chiocco** (direttore dell'IZS della Puglia e della Basilicata)
- **Prof. Nicola Zizzo** (professore associato presso il Dipartimento di Sanità Pubblica e Benessere degli Animali - Università di Bari)
- **Prof.ssa Maria Cristina Fossi** (professore associato presso il Dipartimento di Scienze Ambientali - Università di Siena)
- **dr.ssa Letizia Marsili** (ricercatore presso il Dipartimento di Scienze Ambientali - Università di Siena)
- **dr.ssa Federica Marcer** (ricercatore presso il Dipartimento di Scienze Sperimentali Veterinarie - Università di Padova)
- **dr.ssa Simonetta Mattiucci** (ricercatore presso il Dipartimento di Scienze di Sanità Pubblica - Università la Sapienza di Roma)
- **Prof. Giuseppe Nascetti** (professore ordinario presso il Dipartimento di Ecologia e Sviluppo Economico Sostenibile, Università della Tuscia, Viterbo)
- **dr.ssa Michela Podestà** (curatore presso il Museo Civico di Storia Naturale di Milano)
- **dr. Gianni Pavan** (ricercatore del CIBR - Dipartimento di Biologia Animale, Università di Pavia).

Sono stati inoltre acquisiti i pareri ed i rapporti di prova del dr. Antonio Fernandez dell'Università de Las Palmas de Gran Canaria, per quanto riguarda i dati relativi agli emboli lipidici e gassosi, e del dr. Roberto Poletti, del Centro di Ricerche Marine di Cesenatico, per quanto riguarda le indagini sulle biotossine algali, dr. Alexandros Fratzis del Pelagos Research Institute e del dr. Maurizio Wurtz, dell'Università di Genova, per quanto riguarda la foto-identificazione dei soggetti. Infine ci si è avvalsi del parere del dr. Giuseppe Notarbartolo di Sciara.



## ALLEGATO I - Bibliografia

Bernaldo de Quirós, Y.; González, O.; Muñoz, C.; Arbelo, M.; Méndez, M.; Fernández, A, 2009. Iatrogenic deadly pulmonary trauma and pneumodiastinum in a young sea lion. *Journal of Wildlife Diseases* (Accepted, 2009).

Berzin A.A., 1972. *The sperm whales*, Ed. A.V. Yablokov, Izdatel 'stvo "Pishchevaya Promyshlennost", Moskva, 1971, tradotto dal russo da Israel Program for Scientific Translations Jerusalem 1972.

Drouot-Dulau V., Gannier A., 2007. *Movements of sperm whale in the western Mediterranean Sea: preliminary photo-identification results* *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* (2007), **87:1**:195-200 Cambridge University Press

Capelli R., Das K., De Pellegrini R., Drava G., Lepoint G., Miglio C., Minganti V., Poggi R., 2008. *Distribution of trace elements in organs of six species of cetaceans from the Ligurian Sea (Mediterranean), and the relationship with stable carbon and nitrogen ratios*, *Science of the Total Environment*, 390: 569-578.

Danscher G., Moller-Madsen B., 1985. *Silver amplification of mercury sulfide and selenide: a histochemical method for light and electron microscopic localization of mercury in tissue*. *J Histochem Cytochem.*, 33:219-28.

Das K, Lepoint G, Leroy Y, Bouquegneau JM (2003) Marine mammals from the southern North Sea: feeding ecology data from  $\delta^{13}\text{C}$  and  $\delta^{15}\text{N}$  measurements. *Mar Ecol Prog Ser* 263: 287-298.

Evans K and Hindell MA., 2004. The diet of sperm whales (*Physeter macrocephalus*) in southern Australian waters. *Journal of Marine Science*, 61: 1313-29

Evans, K., Thresher, R., Warneke, R.M., Bradshaw, C.J.A., Pook, M., Thiele, D., Hindell M.A. 2005. Periodic variability in cetacean strandings: links to large-scale climate events. *Biology Letters* 1, 147–150 doi:10.1098/rsbl.2005.0313.

Fernández A, Edwards JF, Rodríguez F, Espinosa de Los Monteros A, Herráez P, Castro P, Jaber JR, Martín V and Arbelo M. "Gas and fat embolic syndrome" involving a mass stranding of beaked whales (Family Ziphiidae) exposed to anthropogenic sonar signals. *Veterinary Pathology*, 42:446-457 (2005)

Fernández A, Bernaldo de Quirós Y y González O, 2009. *Análisis e interpretación de embolismo gaseoso en cetáceos varados*. *Revista Canaria de las Ciencias Veterinarias*. Volumen 5, páginas 10-14. (Spanish).

Gannier A., Drouot V., Goold JC., 2002. *Distribution and relative abundance of sperm whales in the Mediterranean Sea*. *Mar Ecol Prog Ser*, 243:281-293.

- Gendron D, Aguñiña S, Carriquiry JD (2001)  $\delta^{15}\text{N}$  and  $\delta^{13}\text{C}$  in skin biopsy samples: a note on their applicability for examining the relative trophic level in three rorqual species. *J Cetacean Res Manag* 3: 41-44.
- Gaye-Siessegger J, Focken U, Muetzel S, Abel HJ, Becker K (2004) Feeding level and individual metabolic rate affect  $\delta^{13}\text{C}$  and  $\delta^{15}\text{N}$  values in carp: implications for food web studies. *Oecologia* 138: 175-183.
- Hobson KA, Alisauskas R T, Clark RG (1993) Stable nitrogen isotope enrichment in avian tissues due to fasting and nutritional stress: implications for isotopic analyses of diet. *The Condor* 95: 388-394.
- Hooker SK, Iverson SJ, Ostrom P, Smith SC (2001) Diet of northern bottlenose whales inferred from fatty-acid and stable-isotope analyses of biopsy samples. *Can J Zool* 79: 1442–1454.
- Lockyer, C. 1981. *Estimates of growth and energy budget for the sperm whale, *Physeter catodon**. FAO Fish. Ser. 5:489-504.
- Jacobsen JK, Massey L, Gulland F., 2010. Fatal ingestion of floating net debris by two sperm whales (*Physeter macrocephalus*). *Mar Pollut Bull.*, Epub ahead of print.
- Jauniaux T., Bronsens L., Jacquinet E., Lambrigts D., Addink M., Smeenk C., Coignoul F., 1998. *Postmortem investigations on winter stranded sperm whales from the coasts of Belgium and the Netherlands*. *J. Wild. Dis.*, 34: 99-109.
- Jochens, A., D. Biggs, K. Benoit-Bird, D. Engelhaupt, J. Gordon, C. Hu, N. Jaquet, M. Johnson, R. Leben, B. Mate, P. Miller, J. Ortega-Ortiz, A. Thode, P. Tyack, and B. Würsig., 2008. Sperm whale seismic study in the Gulf of Mexico: Synthesis report. U.S. Dept. of the Interior, Minerals Management Service, Gulf of Mexico OCS Region, New Orleans, LA. OCS Study MMS 2008-006. 341 pp.
- Madsen PT, Johnson M, Miller PJ, Aguilar Soto N, Lynch J, Tyack P., 2006 Quantitative measures of air-gun pulses recorded on sperm whales (*Physeter macrocephalus*) using acoustic tags during controlled exposure experiments. *J Acoust Soc Am.*; 120:2366-79.
- Marcoux M, Whitehead H, Rendell L (2007) Sperm whale feeding variation by location, year, social group and clan: evidence from stable isotopes. *Mar Ecol Prog Ser* 333: 309-314.
- Michener RH, Schell DM (1994) Stable isotope ratios as tracers in marine aquatic food webs, p. 138–157. In K. Lajtha and R. Michener [eds.], *Stable isotopes in ecology and environmental science*. Blackwell Scientific.
- P.J.O. Miller PJO., Johnson MP., Madsen PT., Biassoni N., Quero M, Tyack PL, 2009. Using at-sea experiments to study the effects of airguns on the foraging behavior of sperm whales in the Gulf of Mexico. *Deep-Sea Research I*, 56: 1168–1181

- Nigro M e Leonzio C., 1996. *Intracellular storage of mercury and selenium in different marine vertebrate*. Mar Ecol Prog Ser., 135:137-143.
- Notarbartolo Di Sciara G., Venturino MC., Zanardelli M., Bearzi G., Borsani FJ., Cavalloni B., 1993. *Cetacean in the central Mediterranean Sea: distribution and sighting frequencies*. Boll. Zool 60:131-138.
- Pamphlett R., Elde R., Danscher G., 2004. *Does selenium deficiency unmask mercury toxicity in motor neurons?* Neurotoxicology and Teratology, 27: 241-244
- Pierce GJ, Santos MB, Smeenk C, Saveliev A., Zuur AF., 2007. *Historical trends in the incidence of strandings of sperm whales (Physeter macrocephalus) on the North Sea coasts: an association with positive temperature anomalies*. Fisheries Research 87:219-228.
- Reeves R e Notarbartolo Di Sciara G., 2006. *The status and distribution of cetaceans in the Black Sea and Mediterranean Sea*. IUCN Workshop Report, Monaco, 5-7 marzo 2006.
- Ruiz-Cooley RI, Gendron D, Aguiñiga S, Mesnick S, Carriquiry JD (2004) Trophic relationships between sperm whales and jumbo squid using stable isotopes of C and N. Mar Ecol Prog Ser 277: 275-283.
- Sotiropoulos MA, Tonn WM, Wassenaar LI (2004) Effects of lipid extraction on stable carbon and nitrogen isotope analyses of fish tissues: potential consequences for food web studies. Ecol Freshw Fish13: 155-160.
- Vanselow, K. H., K. Ricklefs. 2005. Are solar activity and sperm whale *Physeter macrocephalus* strandings around the North Sea related? *Journal of Sea Research* 53: 319- 327
- Whitehead H., 2003. *Sperm whales: Social evolution in the Ocean*. The University of Chicago Press.
- Whitehead H, Rendell L (2004) Movements, habitat use and feeding success of cultural clans of South Pacific sperm whales. J Anim Ecol73: 190-196.
- Woshner VM, O'Hara TM, Eurell JA., Wallig MA, Bratton GR., Suydam RS., Beasley VR., 2002. *Distribution of Inorganic Mercury, in the Liver and Kidney of Beluga and Bowhead Whales through Autometallographic Development of Light Microscopic Tissue Sections*. Toxicologic Pathology, 30: 209-215.
- Wright, A. 2005. Lunar cycles and sperm whales (*Physeter Macrocephalus*) strandings on the North Atlantic coastlines of the British isles and eastern Canada. *Marine Mammal Science* 21:145-149.
- Terman A., Brunk U.T., 2004. *Lipofuscin*. The International Journal of Biochemistry and Cell Biology. **36**: 1400-1404.

Thiemann GW, Budge SM, Iverson SJ (2004) Determining blubber fatty acid composition: a comparison of in situ direct and traditional methods. *Mar Mamm Sci* 20: 284-295.

ALLEGATO II - Campioni ed esami svolti

<b>Individui 5,6,7</b>										
<b>Organo</b>	<b>Virol./sierol.</b>	<b>Microb.</b>	<b>Tossic./biotox</b>	<b>Parass.</b>	<b>Istopat.</b>	<b>Genetica</b>	<b>Età</b>	<b>Alimentazione</b>	<b>Analisi emboli</b>	<b>Isotopi stabili</b>
Cute			x	x	x	x				
Blubber		x	x	x	x			x		X
Muscolo			x	x	x					X
Denti							x			
Ln. prescap.		x			x					
Polmone	x	x		x	x				x	
L n polmonari		x			x					
Cuore					x					
C o a g cardiaco	x	x								
Fegato	x	x	x	x	x					
Milza (n.5)					x					
Pancreas (n.6)					x					
Rene	x	x	x		x					
Stomaco					x					
C o n t e n u t i stomacali			x	x				x		
Intestino	x	x			x					
SNC (n. 6)				x	x					
Parassiti				x	x					
Gonadi					x		x			
Altri organi/liq e tessuti		x			x					
Sangue									x	
Mesentere				x	x				x	
<b>Animali 1,2,3,4</b>										
Cute			x							
Blubber			x	x						x
Muscolo			x							x
Denti							x			
C o n t stomaco				x				x		



- **Virologia/sierologia:** Facoltà di Medicina Veterinaria delle Università di Teramo (UniTE) e Bari (UniBA).
- **Microbiologia:** IZS FG, UniBA e UniTE.
- **Tossicologia e biotossine:** Dip. Scienze Ambientali Università di Siena (UniSI), IZS FG - Centro di Ricerche Marine - Cesenatico, Università di Catania (UniCT).
- **Parassitologia:** Facoltà di Medicina Veterinaria dell'Università di Padova (UniPD), Università la Sapienza (UniROMA) e della Tuscia (UniTU).
- **Istopatologia:** UniPD, UniTE, IZS FG.
- **Genetica:** Università di Firenze (UniFI), Università di Palermo (UniPA)
- **Età:** UniPD
- **Alimentazione:** Museo di Storia Naturale di Milano (MuMI), UniPA.
- **Analisi emboli:** Facoltà di Medicina Veterinaria dell'Università di Las Palmas de Gran Canaria (ULPGC) e UNIPD
- **Foto-ID:** Pelagos Research Institute, Tethys Research Institute e Università di Genova (UniGE)



ALLEGATO III - Persone ed enti che hanno partecipato agli esami necroscopici e alle indagini collaterali

<b>Nome</b>	<b>Cognome</b>	<b>Istituzione</b>	<b>Competenza</b>
Sandro	Mazzariol	UniPD	Ricercatore
Bruno	Cozzi	UniPD	Professore ordinario
Massimo	Castagnaro	UniPD	Professore ordinario
Emanuele	Zanetti	UniPD	Tecnico
Maristella	Giurisato	UniPD	Tecnico
Federica	Marcer	UniPD	Ricercatore
Mattia	Panin	UniPD	Dottorando
Alessandro	Biscaro	UniPD	Laureato freq
Claudia	Zanardello	UniPD	Laureato freq
Valentina	Innocente	UniPD	Laureato freq
Stefania	Visin	UniPD	St u d e n t e ( D r . S . Mazzariol)
Maria Giovanna	Zambon	UniPD	St u d e n t e ( D r . S . Mazzariol)
Rodolfo	Reale	ASL FG	Veterinario
Giovanni	Di Guardo	UniTE	Prof. Ass.
Giuseppe	Marrucchella	UniTE	Ricercatore
Guido	Pietrolungo	UniTE	Studente (Prof. G. Di Guardo)
Giulia	Buffatello	UnitTE	Studente (Prof. G. Di Guardo)
Massimiliano	Pennelli	UniTE	Studente (Prof. G. Di Guardo)
Alfredo	Ferrara	IZS Puglia e Basilicata – FGDir. Vet.	
Antonio	Petrella	IZS Puglia e Basilicata – FGDir. Vet.	
Pasquale	Troiano	IZS Puglia e Basilicata – FGDir. Vet.	
Giuseppe	Leonzio	IZS Puglia e Basilicata – FGTechnico	
Cristina	Fossi	UniSI	Professore associato
Letizia	Marsili	UniSI	Ricercatore
Lucia	Mazzi	UniSI	Studente (Prof. C. Fossi)
Martina	Bartolini	UniSI	Studente (Prof. C. Fossi)
Daniela	Florio	UniBO	Ricercatore
Luca	Parisi	UniBO	St u d e n t e ( D r . A . Zaccaroni)
Giulia	Tugnoli	UniBO	St u d e n t e ( D r . A . Zaccaroni)
Chiara	Varoli	UniBO	St u d e n t e ( D r . A . Zaccaroni)
Antonio J	Fernandez	Uni Las Palmas	Professore ordinario
Simona	Sacchini	Uni Las Palmas	Dottorando
Yara	B e r n a l d o D e Quiros	Uni Las Palmas	Dottorando

Nicola	Zizzo	UniBA	Prof. Ass.
Giuseppe	Passantino	UniBA	Ricercatore
Marco	Tocchetti	CSC	Volontario
Gianni	Pavan	UniPV – CIBRA	Ricercatore
Michela	Podestà	Museo di Storia Nat. MI	Curatore
Simonetta	Mattiucci	UniSAP	Ricercatore
Giuseppe	Nascetti	UniTUSCIA	Professore ordinario
Alfonso	Sturchio	ASL FG	Veterinario
Giovanni	Muscarella	ASL FG	Veterinario
Nazario	Iannacone	Libero professionista	Veterinario
Claudia	Gatta	UniNA	Studente (Prof. De Girolamo)
Mario	Tringali	CSC	Volontario
Giancarlo	Rapazzo	UniCT	Professore associato
Stefano	Floridia	UniCT - CSC	tesista
Salvatrice	Vizzini	UniPa	ricercatore
Salvatore	Sciacca	UniCT	professore ordinario
Chiara	Copat	UniCT - CSC	dottorando
Stefania	Gaspari	UniFI	ricercatore
Alexandros	Frantzis	Pelagos Research Institute	ricercatore
Maurizio	Wurtz	UniGE	ricercatore
Giuseppe	Notarbartolo	Di	
	Sciara	Thetys Research Institute	ricercatore