



UNIVERSITÀ  
DI CAMERINO

**VALUTAZIONE DELLO STATO DI BENESSERE  
DELLA TROTA IRIDEA  
SULLA BASE DI INDICATORI EMATOCHIMICI  
NELLE ULTIME TRE FASI DEL CICLO PRODUTTIVO**  
*(raceways, vasca di pre-macellazione, vasca di stordimento)*

***29 marzo 2021***

**Gruppo di lavoro:**

*Prof.ssa Alessandra Roncarati*

*Dr.ssa Elisa Fiordelmondo*

## **OBIETTIVO DELLO STUDIO**

Al fine di verificare l'efficacia del sistema di stordimento adottato (elettroshock) e l'effettivo rispetto del benessere animale nelle ultime fasi di allevamento, è stata condotta un'analisi su campioni di sangue indagando i parametri ematici correlati allo stato di benessere e salute del pesce allevato.

## **INQUADRAMENTO DELLA RICERCA E PRESUPPOSTI SCIENTIFICI**

Dati anatomici, farmacologici e comportamentali riportati nella letteratura odierna suggeriscono che ***anche i pesci possano avere l'innata capacità di provare esperienze negative*** come uno stato di dolore, paura o stress, analogamente a quanto accade negli organismi vertebrati. Ciò implica che i pesci hanno la capacità di soffrire, e in un'ottica di rispetto del benessere animale è necessario tener conto di questo aspetto.

***Lo stress può essere considerato come una modificazione dei processi fisiologici volta a fronteggiare stimoli ambientali avversi.*** Nei pesci i cambiamenti che si verificano in risposta allo stress, sia esso acuto o cronico, sono simili a quelli descritti per i Mammiferi.

Uno stress acuto è caratterizzato da uno stimolo di elevata intensità ma di breve durata, uno stress cronico invece è causato da stimoli di lieve intensità ma ripetuti e duraturi nel tempo.

***La risposta neuroendocrina allo stress nei pesci è sovrapponibile a quella che avviene nei Mammiferi, ovvero mediata dall'asse ipotalamo-ipofisi-rene (HPI).*** La percezione di un fattore di stress da parte di un organismo acquatico avvia un rilascio rapido nel circolo sanguigno di catecolamine, secrete dal tessuto cromaffine (midollare) del rene anteriore. Questo evento è accompagnato dalla secrezione dell'ormone di rilascio della corticotropina (CRH) da parte dell'ipotalamo, che gioca un ruolo chiave nel coordinamento della risposta fisiologica allo stress. A sua volta, infatti, il CRH induce il rilascio dell'ormone adrenocorticotropo (ACTH) da parte della ghiandola pituitaria che, a sua volta, induce la sintesi e secrezione di cortisolo da parte del tessuto interrenale (corticale). Il cortisolo si lega quindi ai recettori mineral-corticoidi e gluco-corticoidi nei tessuti bersaglio, promuovendo le risposte fisiologiche allo stress.

Quando gli stimoli stressanti persistono per un lungo periodo, l'attivazione prolungata della risposta allo stress (che in questo caso diventa cronico) può portare a cambiamenti morfologici e comportamentali con perdita di appetito, riduzione del tasso di crescita, atrofia muscolare e immunodepressione.

**Tra i principali fattori stressanti che inducono una riduzione di benessere nei pesci allevati occorre ricordare che:**

***-una corretta gestione dei bacini di allevamento risulta fondamentale*** poiché riduce l'esposizione dei soggetti allevati a una qualità inadeguata delle acque. Durante tutte le fasi di allevamento l'Azienda Erede Rossi Trote provvede ad effettuare analisi fisico-chimiche delle acque almeno ogni 6 mesi determinandone tutti i parametri necessari per una corretta gestione dell'allevamento;

***-elevate densità di allevamento favoriscono l'instaurarsi e il diffondersi di malattie infettive,*** l'inquinamento delle acque, il cannibalismo e l'instaurarsi di lesioni cutanee. Presso l'Azienda Erede Rossi Trote la densità di allevamento è sempre commisurata ai fabbisogni fisiologici e comportamentali della trota in tutte le fasi di allevamento. In particolare in nessun momento del ciclo produttivo nelle vasche di allevamento la densità massima supera i 25 kg/m<sup>3</sup>;

***-la qualità delle materie prime impiegate nella formulazione dei mangimi,*** così come la composizione centesimale, è essenziale per garantire la salute e il benessere dei pesci allevati,

al fine di soddisfare tutti i fabbisogni nutrizionali specifici della specie. L'Azienda Erede Rossi Trote ha posto particolare attenzione alla qualità dei mangimi impiegati mettendo a punto diete facilmente assimilabili dalle trote e formulate con materie prime di propria produzione al fine di garantire un'elevata qualità del mangime somministrato alle trote in tutte le fasi di allevamento;

**-la privazione alimentare (digiuno) è causa di malessere**, ma risulta essere una pratica fondamentale prima delle manipolazioni, del trasporto e della macellazione;

**-le operazioni di cattura dei pesci** (calibratura, ecc.) devono essere condotte evitando inutili sofferenze e utilizzando sempre la stessa metodica al fine di abituare gli animali a quella specifica manipolazione;

**-le disinfezioni, preventive e curative, possono provocare stress se condotte in maniera non appropriata**. Per quanto riguarda le operazioni di pulizia, disinfestazione e disinfezione, l'Azienda Erede Rossi Trote ha adottato un piano di interventi basati sull'impiego di prodotti autorizzati e rispettosi della normativa vigente e che sono programmati su un arco temporale pluriennale;

**-il rispetto della temperatura e della qualità delle acque, così come un adeguato ricambio idrico sulle lunghe distanze, sono fattori da controllare** nel rispetto del benessere animale durante lo spostamento e il trasporto degli animali;

**-prima di essere macellati, i pesci devono adattarsi al nuovo ambiente rappresentato dalla vasca di pre-macellazione**. Inoltre, il metodo di macellazione adottato deve essere rapido ed efficiente nello stordire ed uccidere il pesce nel più breve tempo possibile, evitando inutile stress e sofferenza. Presso l'Azienda Erede Rossi Trote, le trote sostano dalle 4 alle 6 ore nella vasca di pre-macellazione per dar loro modo di ambientarsi; all'interno della vasca di pre-macellazione, gli animali non vengono alimentati per rispettare la fase di digiuno necessaria prima della macellazione. Dalla vasca di pre-macellazione il pesce viene aspirato mediante pompaggio di acqua e pesce e condotto nella vasca di stordimento, evento che avviene tramite elettroshock, e successivamente macellato.

## **METODOLOGIA IMPIEGATA**

Al fine di indagare lo stato di benessere del pesce negli ultimi tre ambienti in cui l'animale si trova a vivere all'interno dell'allevamento (vasca di allevamento o raceway, vasca di pre-macellazione, vasca di uccisione), sono stati individuati tre punti di cattura degli animali: vasca di allevamento, vasca di stoccaggio prima della macellazione (vasca di pre-macellazione) e vasca post-stordimento (o vasca di uccisione).

Presso l'Azienda Erede Rossi Trote lo stordimento delle trote avviene all'interno dell'apposita vasca, di dimensioni 2x2x1 m e del volume di 4 m<sup>3</sup>, all'interno della quale viene generato un campo elettrico sinusoidale continuo di 24 V, applicato per un tempo diverso in relazione alla biomassa presente in quell'istante all'interno della vasca di uccisione. Nello specifico: 30 sec per 150 kg di pesce, 60 sec per 300 kg, 90 sec per 450 kg, 120 sec per 600 kg.

Fig. 1 – Raffigurazione delle tre tipologie di ambienti da cui sono state prelevate le trote iridee per il monitoraggio del benessere animale



La vasca di pre-macellazione ospita le trote che verranno macellate in giornata; esse vengono qui spostate al mattino, per procedere alla loro uccisione dopo almeno 3 ore di sosta per consentire agli animali di adattarsi al nuovo ambiente. Prima della macellazione, le trote rispettano un periodo di digiuno di 12 ore.

In ognuno dei tre punti esaminati è stato prelevato un campione di trote scelte in maniera casuale. I gruppi di animali sono stati così distinti:

**Gruppo R**, costituito dalle trote prelevate dalla vasca terminale di allevamento (raceways), ospitante le trote che hanno raggiunto la taglia commerciale;

**Gruppo S**, costituito dalle trote provenienti dalla vasca di pre-macellazione, ospitante i pesci che sono pronti per la macellazione;

**Gruppo P**, costituito dai pesci provenienti dalla vasca di stordimento, ovvero prelevati dalla catena di macellazione dopo la fase di stordimento e prima dell'uccisione.

#### Attività di prelievi ematici

Tutti i prelievi sono stati eseguiti direttamente in impianto al mattino, al fine di evitare possibili variazioni circadiane (Benneman et al., 1977). Per ogni ambiente individuato i pesci sono stati catturati in maniera casuale e mediante l'utilizzo di un retino. Al fine di sottoporre gli animali ad una manipolazione che risultasse ad essi familiare, tale metodica adottata è la stessa comunemente impiegata dagli addetti ai lavori del suddetto allevamento.

Subito dopo la loro cattura dalla corrispettiva vasca (vasca di allevamento per il Gruppo R, vasca di pre-macellazione per il Gruppo S, e vasca di stordimento per il gruppo P), i soggetti sono stati introdotti in apposite bacinelle contenenti acqua prelevata dalla stessa vasca di provenienza degli animali in cui era stato precedentemente aggiunto dell'anestetico alla concentrazione di 0.04 mg/l. L'anestetico impiegato è un estratto naturale a base di olio di chiodi di garofano, fornito direttamente dall'Azienda e in essa comunemente impiegato.

Nell'arco di pochi minuti è stato osservato l'effetto dell'anestetico, e solo a questo punto i pesci sono stati prelevati dalla bacinella e adagiati su un tavolino portatile rivestito di carta assorbente per essere sottoposti al prelievo di sangue, che è stato completato in meno di due minuti, mediante puntura endocardiaca. Per ogni pesce è stata utilizzata una siringa di plastica monouso da 5 ml munita di un ago nero da 22G monouso; per ogni animale sono stati prelevati circa 1-2 cc di sangue.

Dopo aver tolto l'ago dalla siringa, i campioni sono stati immessi in provette di plastica prive di sostanze anticoagulanti.

Durante l'esecuzione della procedura, i campioni di sangue di volta in volta ottenuti sono stati subito immessi all'interno di un frigo portatile munito di ghiaccio, per essere trasportati a fine esecuzione presso il laboratorio del Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie dell'Università di Camerino. Presso tale laboratorio, i campioni sono stati sottoposti a centrifugazione (centrifuga SI-TRON TINCA 3003M) a 3000 RPM per 20 minuti. Il supernatante ottenuto, rappresentante il siero, è stato prelevato dalla provetta utilizzando una pipetta in plastica per essere quindi inserito in una eppendorf numerata e sigillata. Tutte le eppendorf sono state conservate in frigorifero fino all'esecuzione delle analisi, che sono state condotte mediante apparecchiatura spettrofotometrica (BT3500VET, Microtech 648 Electrophoresis). Di seguito sono riportati i metodi di analisi impiegati per i diversi parametri analizzati: per il glucosio, Metodo GOD-PAP Trinder; per il colesterolo totale, Metodo CHOD-POD Trinder; per i trigliceridi totali, Metodo GPO colorimetrico; per le proteine totali, Metodo colorimetrico al Biuret; per GOT e GGT, Metodo per il dosaggio dell'aspartato-aminotransferasi; per le globuline totali, Metodo REL; per le albumine, metodo VBC.

**Di seguito sono riportati i parametri ematochimici oggetto di studio:**

### ***Glucosio***

Il contenuto di glucosio nel plasma rappresenta la prima fonte di energia per l'organismo. In caso di stress, l'animale vive un'esperienza che induce uno stato di agitazione e di conseguenza si muove di più, per cui i livelli di glucosio nel plasma si riducono per un importante aumento del suo consumo da parte dell'organismo. Nei pesci teleostei, infatti, l'iperglicemia è un conosciuto indicatore della risposta allo stress (Melotti et al., 1992).

### ***Proteine totali***

Una situazione di stress o uno stato patologico in corso comportano un dispendio di proteine per aumento della richiesta energetica da parte dell'organismo, con conseguente diminuzione del valore ematico riferito alle proteine totali. Tale parametro perciò, analogamente al glucosio, è ritenuto indicatore di benessere quando il suo valore si mantiene sui valori consoni per la specie animale considerata.

### ***Albumina***

L'albumina è un antiossidante plasmatico con la funzione di trasportare ormoni, vitamine, farmaci, e ioni. La sua concentrazione nel sangue dipende dalla funzionalità del fegato, organo

deputato alla sua produzione e secrezione. Si ipotizza che nei pesci, così come nei Mammiferi, il valore ematico riferito all'albumina diminuisce in caso di danni o patologie epatiche, infiammazione e shock.

### ***Globuline totali***

Le globuline sono prodotte in parte dal fegato e in parte dal sistema immunitario. All'interno del circolo sanguigno contribuiscono al trasporto di nutrienti e alla difesa dell'organismo dalle infezioni. Un valore di globulinemia entro range ottimali rispecchia uno stato di benessere dei due sistemi deputati alla produzione delle globuline.

### ***Trigliceridi totali***

I trigliceridi rappresentano i grassi (lipidi) presenti nel sangue; derivano prevalentemente dall'alimentazione, e solamente una minima quota è prodotta dal fegato. Il loro livello ematico è perciò strettamente correlato alla qualità del mangime e nello specifico alla qualità della quota dei grassi in esso contenuta. I trigliceridi rappresentano la principale riserva energetica dell'organismo; dal circolo sanguigno si depositano a livello del tessuto connettivo sottocutaneo con funzione di isolamento termico e negli organi viscerali con funzione di protezione.

### ***Colesterolo totale***

Le molecole di cortisolo, prodotte dal fegato, vengono riversate nel circolo sanguigno legate a particelle di trasporto, denominate lipoproteine. Il colesterolo svolge diverse funzioni biologiche: è un componente essenziale delle membrane cellulari, di cui regola la fluidità e la permeabilità, partecipa alla formazione degli acidi biliari ed è il precursore degli ormoni steroidei.

Lo stress, andando ad influenzare l'attività dell'ipotalamo, può indurre un aumento della produzione di cortisolo e adrenalina, ormoni che a loro volta sollecitano la produzione di colesterolo in quanto agiscono come stimolo per aumentare la liberazione di sostanze energetiche. In particolare lo stress cronico può determinare un forte aumento del cortisolo ematico, accompagnato da riduzione della massa muscolare e concomitante aumento dell'appetito.

### ***Enzimi epatici (GOT, GGT)***

In risposta ad una situazione stressogena, l'attività epatica è accentuata per preparare l'organismo ad una immediata reazione o risposta di fuga nei confronti della fonte che genera lo stato di stress, minaccia o paura. I valori riferiti agli enzimi epatici, che sono indici della funzionalità epatica, risulteranno perciò aumentati.

### ***Cortisolo***

Nei pesci è il principale ormone dello stress, con spiccata azione immunodepressiva. Elevati livelli di cortisolo ematico, associati ad una condizione di stress cronico, inibiscono la corretta funzionalità immunitaria e rende il pesce maggiormente suscettibile a contrarre malattie (Segner et. al., 2018). Nella trota iridea il cortisolo è anche un affidabile indice di stress acuto: è stato infatti dimostrato che 30 minuti dopo uno stress di 3 minuti, i livelli plasmatici di cortisolo aumentano di circa 4 volte, in seguito al rilascio in circolo di cortisolo da parte delle cellule surrenali, evento primario di risposta allo stress (Ellis et al., 2004; Mommsen et al.,

1999). La risposta del cortisolo allo stress è infatti intensa, fornendo differenze chiare e facili da rilevare tra animali stressati e non stressati (Mommsen et al., 1999).

### **Attività di prelievo del muco cutaneo**

Nel mese di gennaio è stato effettuato il prelievo di muco cutaneo da 10 soggetti di ogni gruppo. I campioni sono stati utilizzati per determinare il livello di cortisolo al fine di prendere a riferimento un indicatore poco invasivo, per la modalità di prelievo che comporta, e altamente affidabile. Infatti, grazie alla sua natura lipofila, il cortisolo diffonde nel muco cutaneo in proporzione all'ammontare di cortisolo rilasciato nel torrente circolatorio.

## **RISULTATI**

Andando ad analizzare i **parametri ematici di base** (glucosio, proteine totali, colesterolo totale, trigliceridi totali) e confrontando tra loro i valori medi ottenuti nei tre differenti gruppi, si può dedurre che essi **sono tra loro omogenei, non essendo presente una variazione significativa tra i valori riscontrati riferiti ai parametri indagati**. Ciò suggerisce che le condizioni di vita degli animali nei tre differenti gruppi considerati (vasca di allevamento, vasca di pre-macellazione e vasca di stordimento) sono sovrapponibili, e che l'animale nell'ultima fase della vita, che va dall'ultima vasca di allevamento allo stordimento prima della macellazione, non subisce eventi stressogeni tali da indurre un'alterazione dei parametri ematici. Infatti, la risposta allo stress stimola importanti variazioni a livello ematico, in primis un incremento della glicemia (Yildiz et al. 2009), che si verifica in breve tempo in seguito all'esposizione di diversi agenti stressanti, ma anche delle proteine totali e del cortisolo totale. Tali parametri sono invece sempre risultati all'interno del range fisiologico di riferimento della specie indagata (Dezzutto et al. 2016).

**Tutti i valori riscontrati sono pienamente concordi ai range di normalità dei principali parametri ematochimici nella trota iridea** (Dezzutto et al. 2016).

Per quanto riguarda il **glucosio ematico**, nel presente studio i valori riscontrati sono sempre stati inferiori a 100 mg/dl. In altri lavori presenti in letteratura (Melotti et al., 1992) un livello pari a 100 mg/dl è stato considerato parametro base e di controllo riferito a pesci in una condizione di benessere, mentre una condizione di stress aveva portato ad un aumento significativo della glicemia ben oltre tale valore e fino a 300 mg/dl.

### **Cortisolo**

Il cortisolo è considerato il principale ormone dello stress e indicatore principe nel rilevare una situazione di mancato rispetto del benessere animale (Sadoul and Geffroy, 2019).

Analizzando i valori ematici riferiti al cortisolo ottenuti nel presente studio, è stato riscontrato che essi sono rimasti compresi tra 10 e 15 ng/ml in tutti gli animali considerati.

Da tale riscontro si deduce che non si riscontrano variazioni significative di tale ormone nei tre gruppi indagati.

Studi bibliografici hanno evidenziato come nella trota iridea il livello di cortisolo basale risulta essere di  $17.2 \pm 4.2$  ng/ml. Uno stress acuto causa un netto incremento del livello di cortisolo ematico, fino ad un valore di  $108.0 \pm 30.7$  ng/ml in seguito da uno stress acuto della durata di 3 minuti (Gesto et al., 2015). Livelli anche superiori sono stati registrati in condizioni di ridotto benessere animale legato a scarsa qualità delle acque (Satoshi et al., 2011).

Tabella 1 - Risultati (media  $\pm$  dev.st.)

	<b>GRUPPO R</b>	<b>GRUPPO P</b>	<b>GRUPPO S</b>
<b>Glucosio (mg/dl)</b>	53.414 $\pm$ 9.1	73.021 $\pm$ 14.1	59.649 $\pm$ 12.5
<b>GOT (UI/l)</b>	429.770 $\pm$ 103	285.713 $\pm$ 114	358.289 $\pm$ 132
<b>GGT (UI/l)</b>	3.4623 $\pm$ 0.7	4.533 $\pm$ 1.1	3.280 $\pm$ 1.2
<b>Colesterolo (mg/dl)</b>	249.130 $\pm$ 13.5	265.160 $\pm$ 19	226.840 $\pm$ 21
<b>Trigliceridi (mg/dl)</b>	479.220 $\pm$ 103	382.420 $\pm$ 124	335.390 $\pm$ 132
<b>Albumine (g/dl)</b>	1.592 $\pm$ 0.2	1.729 $\pm$ 0.4	1.461 $\pm$ 0.5
<b>Proteine totali (g/dl)</b>	4.185 $\pm$ 0.4	4.316 $\pm$ 0.6	3.518 $\pm$ 0.6
<b>Globuline (g/dl)</b>	2.548 $\pm$ 0.4	2.671 $\pm$ 0.6	2.196 $\pm$ 0.5
<b>Cortisolo</b>	12.25 $\pm$ 1.5	13.58 $\pm$ 1.9	13.96 $\pm$ 2.0

### **Muco cutaneo**

I risultati ottenuti seguono l'andamento del cortisolo ematico relativo allo stesso gruppo di soggetti e non sono state osservate differenze degne di nota. Per questi risultati si è in attesa di un confronto con il gruppo di ricerca del Dipartimento Farm Animals and Veterinary and Public Health dell'Università di Vienna dove, dallo scorso 15 marzo, si trova la dott. Fiordelmondo per svolgere il suo stage di dottorato all'estero.

### **CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE**

Il quadro osservato presso l'Azienda Erede Rossi Trote, caratterizzato dal mantenimento dei livelli di cortisolo sempre all'interno dei livelli standard, mette in luce uno stato di benessere degli animali in tutti e tre gli ambienti di ricerca, deducibile anche dall'osservazione delle riprese svolte con telecamera immersa in acqua, dalle quali si evidenzia un comportamento degli animali consono alla specie di riferimento (Rainbow trout) in una condizione di benessere.

Considerando nello specifico il solo gruppo P (vasca di stordimento), è inoltre possibile affermare che gli animali hanno vissuto gli ultimi momenti della loro vita nel pieno rispetto del benessere animale, in quanto durante il campionamento in nessun soggetto è stata riscontrata la presenza di lesioni cutanee superficiali o abrasioni o lacerazioni, né alterazioni del muco cutaneo, che è sempre risultato omogeneo, uniforme e ben distribuito.

L'assenza di lesioni simili sulla superficie corporea delle trote appartenenti al gruppo S (vasca di pre-macellazione) evidenzia come il trasporto degli animali dalla vasca di allevamento alla vasca di pre-macellazione avviene nel pieno rispetto del benessere animale.

## BIBLIOGRAFIA CONSULTATA

- Benemann J.R., Weissman J.C., Koopman B.L., Oswald W.L.; 1977. Nature volume 268, 19–23.
- Braithwaite V. A., Ebbesson L. O. E.; 2014. Rev Sci Tech. 2014 Apr;33(1):245-53.
- Campbell T. W.; 1988. Fish Cytology and Hematology . Tropical Fish Medicine 0195-5616/88, Vol. 18, No. 2, March 1988 349-364.
- Campbell T.; Murru F.; 1999. Veterinaria, Anno 13, n. 6, Dicembre 1999, 79-85.
- Dezzutto D., Barbero R., Fogliani C., and Scanzio T.; 2016. Determinazione dei range di normalità dei principali parametri ematochimici in trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*). Ittiopatologia, 2016, 13: 89-96.
- Marino Prearo, Nicoletta Vitale, Stefania Bergagna, Maria Silvia Gennero
- Ellis, T.; James, J. D.; Stewart, C.; Scott, A. P.; 2004. Journal of Fish Biology (2004) 65, 1233–1252.
- Fazio F.; 2018 Fish hematology analysis as an important tool of aquaculture: A review. Aquaculture, Volume 500, 1 February 2019, Pages 237-242.
- Gesto, Manuel; Hernández, Juan; López-Patiño, Marcos A.; Soengas, José L.; Míguez, Jesús M. (2015). Is gill cortisol concentration a good acute stress indicator in fish? A study in rainbow trout and zebrafish. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology, 188, 65–69.
- Hoseini, Seyyed Morteza; Mirghaed, Ali Taheri; Ghelichpour, Melika; Paghe, Esmaeil; Iri, Yousef; Kor, Abdolvahhab (2019). Effects of dietary tryptophan supplementation and stocking density on growth performance and stress responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture, 519 (2020) 734908.
- Lone G.N., Shammi Q.J., Mir S.A., Sheikh I.A. and Chalkoo S.R.; 2012. Rainbow Trout Hematology Coinciding with Metabolic Requirement. Walailak J Sci & Tech 2012; 9(4): 309-316.
- Melotti P., Roncarati A., Garella E., Carnevali O., Mosconi G. and Polzonetti-Magni A.; 1992. Effects of handling and capture stress on plasma glucose, cortisol and androgen levels in brown trout, *Salmo trutta morpha fario*. J. Appl. Ichthyol. 8 (1992) 234-239.
- Mommsen, T. P.; Vijayan, M.M.; Moon, T.W.; 1999. Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. Fish Biology and Fisheries 9: 211–268, 1999.
- Oliveira R., Galhardo L.; 2009. Psychological Stress and Welfare in Fish. ARBS Annu Rev Biomed Sci 2009;11:1-20.
- Řehulka J.; Minařík B; Adamec V.; Řehulková E.; 2005. Investigations of physiological and pathological levels of total plasma protein in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, (Walbaum). Aquaculture Research, 2005, 36, 22–32.
- Sadoul, Bastien; Geffroy, Benjamin (2019). Measuring cortisol, the major stress hormone in fishes. J Fish Biol. 2019;94:540–555.
- Salati, F.; Roncarati, A.; Angelucci, G.; Fenza, A.; Meluzzi, A.; 2016. Stress and Humoral Innate Immune Response of Gilthead Seabream (*Sparus aurata*) Cultured in Sea Cages. Journal of Aquatic Animal Health, 28(3), 166–172.
- Satoshi Awata; Tetsuya Tsuruta; Takashi Yada; Kei'ichiro Iguchi (2011). Effects of suspended sediment on cortisol levels in wild and cultured strains of ayu *Plecoglossus altivelis*. Aquaculture 314 (2011) 115–121.
- Segner, H.; Sundh, H.; Buchmann, K.; Douxfils, J.; Sundell, K. S.; Mathieu. C.; Ruane, N.; Jutfelt, F.; Toften, H.; Vaughan, L.; 2018. Health of farmed fish: its relation to fish welfare and its utility as welfare indicator. Fish Physiol Biochem (2012), 38:85–105.
- Yildiz, Hijran Yavuzcan, Guzey, Iknur Meric and Ergonul, Mehmet Borga(2009). Changes of Non-Specific Immune Parameters in Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss*, After Exposure to Antimicrobial Agents Used in Aquaculture', Journal of Applied Aquaculture, 21:3, 139 — 150.