

**Studio epidemiologico della Perkinsosi nella vongola
filippina (*Ruditapes philippinarum*) allevata
nella Laguna di Marano (Nord Adriatico)**

*Epidemiology of Perkinsosis in manila clam
(*Ruditapes philippinarum*) farmed in
the Marano Lagoon (North Adriatic Sea)*

**Giuseppe Ceschia^{1*}, Lucia Sgro¹, Gioia Capelli², Aurelio Zentilin³,
Rosario Ramirez Tafur¹, Marco Sello¹**

¹Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Laboratorio Patologia Molluschi - Basaldella di
Campofornido (UD); ²Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie - Legnaro (PD); ³Acquacoltura
Lagunare Marinetta Scarl - Marano Lagunare (UD)

RIASSUNTO - Data la notevole presenza di *Perkinsus* sp. nelle vongole della Laguna di Marano (Nord Adriatico), riscontrata attraverso l'analisi di diversi campioni in questi ultimi anni, questa ricerca si è proposta di studiare la Perkinsosi durante un ciclo di allevamento e di valutare l'influenza dei parametri ambientali sullo sviluppo della patologia. Allo scopo, sono stati effettuati campionamenti mensili in due zone di allevamento (ingrasso): Zona A, Porto Lignano e Zona B, Isola di Marinetta. Su ogni campione, costituito da 50 soggetti, sono stati condotti esami istologici ed esami colturali quantitativi in Ray Fluid Thioglicollate Medium. *Perkinsus* sp. è stato rinvenuto in quasi tutti i soggetti esaminati: 76-100%. Nella zona A il numero di spore per soggetto varia tra 0 e 1.320.000; quello di spore/g tra 0 e 1.702.127. Il valore medio spore/g si colloca tra 13.805 (marzo 2004) e 219.647 (ottobre 2003). Nella zona B il numero di spore per soggetto varia tra 0 e 3.000.000; quello di spore/g tra 0 e 3.273.137. Il valore medio spore/g è compreso tra 43.794 (giugno 2003) e 783.390 (agosto 2004). Le vongole allevate nella zona B mostrano una media di spore significativamente più elevata di quelle della zona A. La diversa salinità riscontrata tra le due zone e la diversa composizione del substrato possono aver influenzato la variazione del grado di infestazione di *Perkinsus* sp.

SUMMARY - Manila clam, farmed in the Marano Lagoon, is infested by the aetiological agent responsible for this infection, Perkinsus sp., as revealed by survey performed in the last years on several clam samples. The purpose of this research project was to observe the progression of the disease during farming cycle and to estimate the influence of the environment on the disease status. Monthly, two areas in the lagoon were sampled: Area A, Lignano harbour and Area B, Marinetta Island. Samples, each one of 50 subjects, were analysed by histology and by incubation of tissues in Ray's Fluid Thioglycollate Medium (RFTM). Perkinsus sp. was found in nearly all the examined subjects: 76-100%. In area A, the number of hypnospores/individual ranged between 0 and 1320000, while the number of hypnospores/g between 0 and 1702127. The mean value of hypnospores/g ranged between 13805 (March 2004) and 219647 (October 2003). In area B, the number of hypnospores/individual ranged between 0 and 3000000, while the number of hypnospores/g between 0 e 3273137. The mean value of hypnospores/g ranged between 43794 (June 2003) and 783390 (August 2004). The mean value of hypnospores found in clams farmed in the area B was significantly higher than that found in clams from the area A. The different salinity characterizing the two areas and the different bottom composition may be the cause of the difference found in the Perkinsus sp. infection level.

Key words: Manila clam, *Ruditapes philippinarum*, *Perkinsus* spp., *Perkinsus olseni*, *Perkinsus mediterraneus*, Pathology.

* Corresponding author: c/o Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Laboratorio Patologia Molluschi, Via della Roggia 102 - 33030 Basaldella di Campofornido (UD). Tel.: 0432-561196; Fax: 0432-561532; E-mail: gceschia@izsvenezie.it.

INTRODUZIONE

Il genere *Perkinsus* include diverse specie di parassiti protisti che infettano numerosi molluschi marini. La sua presenza è segnalata in oltre 50 specie popolanti le acque sia temperate sia tropicali dell'Oceano Pacifico e dell'Oceano Atlantico. Maggiori segnalazioni si hanno nelle specie più commercializzate: *Crassostrea virginica* (USA), *Haliotis* spp. (Australia) e *Ruditapes* spp. (Corea, Europa). In Europa è riscontrato soprattutto nelle vongole (*R. decussatus* e *R. philippinarum*) negli Stati che maggiormente allevano queste specie o che gestiscono, ai fini commerciali, zone naturali (Portogallo, Spagna, Francia, Italia).

Inizialmente, la specie rinvenuta in Europa era stata identificata come *P. atlanticus* (Azevedo, 1989). Recentemente, da studi genetici di diversi isolati riferibili al genere *Perkinsus*, si ritiene che *P. atlanticus* e *P. olseni* (segnalato in *Haliotis* spp. australiane) siano la stessa specie (Murrell *et al.*, 2002); pertanto per "diritto di prima segnalazione" gli organismi riferibili al genere *Perkinsus* segnalati in Europa, salvo ritrovamento di nuove specie, dovrebbero essere attribuiti alla specie *P. olseni*. D'altra parte nel 2004 organismi riferibili al genere *Perkinsus* sono stati segnalati in ostrica piatta (*Ostrea edulis*) nelle Isole Baleari spagnole (Casas *et al.*, 2004) ed attribuiti a *P. mediterraneus* n. sp.

La malattia causata da questi organismi è conosciuta come Perkinsosi ed è molto studiata, poiché le viene attribuita, talvolta, responsabilità diretta in casi di mortalità in Europa, ad esempio nell'allevamento di *R. decussatus* e *R. philippinarum* in Portogallo (Ruano & Cachola, 1986) e Spagna (Figueras *et al.*, 1992).

Per l'Europa, la prima segnalazione di *Perkinsus* si è avuta nel 1978 in *R. decussatus* della Laguna di Venezia (Da Ros & Canzonier, 1985; 1986). Poiché l'introduzione della vongola filippina (*R. philippinarum*) in Italia (Laguna di Venezia) si è avuta nel 1983, appare evidente l'esistenza di *Perkinsus* prima di tale introduzione, anche se la pratica di allevamento può averne rinforzato la presenza. Da Ros & Canzonier (1985; 1986) segnalano *Perkinsus* in *O. edulis* in banchi naturali della Laguna di Venezia. Secondo questi Autori, già durante l'inverno 1978 il parassita era stato riscontrato in ostriche piatte, importate dalla Grecia ed immesse nel Nord Adriatico. Nella Laguna di Marano (Nord Adriatico), in cui l'allevamento di *R. philippinarum* ha avuto inizio nel 1986, è stata segnalata tale parassitosi nel 1991 (Ceschia *et al.*, 1991). In tale area, la Cooperativa ALMAR Scarl possiede schiuditoio, preingrasso ed ingrasso (100 ettari), nonché un'area naturale gestita (con reimmersione di prodotto reperito commercialmente in Italia e/o estero) per la raccolta da parte della Cooperativa Pescatori S. Vito.

Dato l'elevata presenza di *Perkinsus* nelle vongole della Laguna di Marano, evidenziata dall'analisi di diversi campioni in questi ultimi anni, ci si è proposti di studiare la Perkinsosi durante un ciclo di allevamento e di valutare l'influenza dei parametri temperatura e salinità ed eventuali altri fattori ambientali sullo sviluppo della patologia.

MATERIALE E METODI

La Cooperativa ALMAR utilizza per l'ingrasso della vongola filippina due zone: una di 60 ettari nelle vicinanze del Porto di Lignano (zona A) e la seconda di 40 ettari in un'area limitata verso il mare dal cordone litorale dell'isola di Marinetta (zona B).

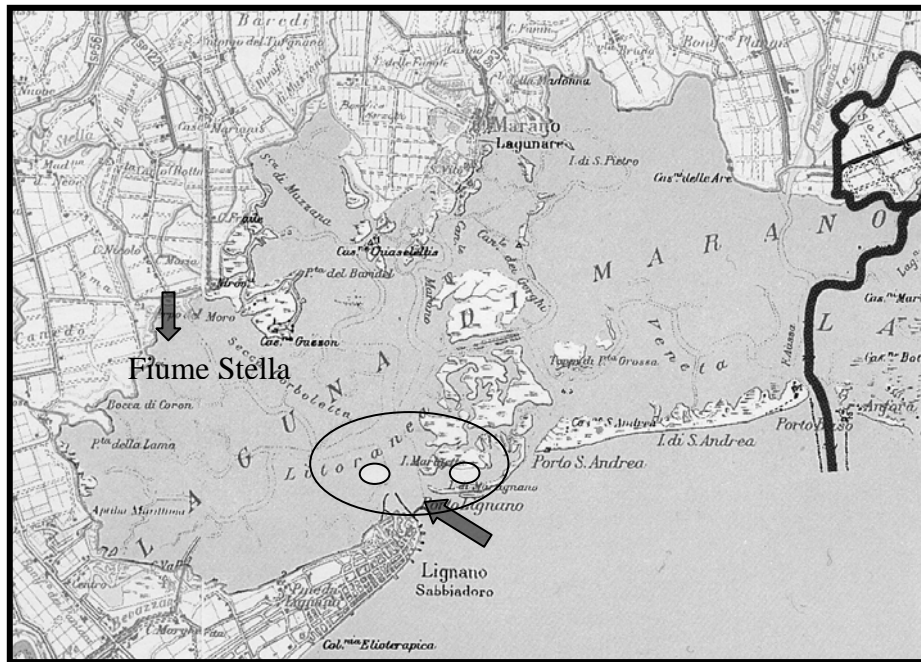


Figura 1 - Laguna di Marano (UD). Zona A e zona B: aree di allevamento (ingrasso) della vongola filippina (da Cooperativa ALMAR).

Figure 1 - Lagoon of Marano (UD - Italy). Zone A and zone B: rearing areas of manila clam (Coop. ALMAR).

Le vongole, superata la taglia di 10 mm, vengono seminate direttamente sul fondale, con una densità di 200 individui/m², fino al raggiungimento della taglia commerciale (> 25 mm). L'ingrasso viene fatto su di un substrato di matrice sabbioso-fangosa. Per ciascuna fase di allevamento (preparazione terreno di semina, semina, protezione mediante stesura di reti in materiale plastico, pulizia e raccolta) vengono utilizzati sistemi meccanizzati. Il seme prodotto nello schiuditoio della ALMAR o acquisito sul mercato nazionale e/o estero, viene reimmerso per l'ingrasso due volte l'anno: in primavera ed in estate.

La ricerca è stata condotta dal 4 dicembre 2002 al 25 marzo 2003 (fase di preingrasso) e dal 7 maggio 2003 al 19 ottobre 2004 (fase di ingrasso). La scelta delle zone di ricerca e del periodo è stata suggerita dalla normale routine d'allevamento della Cooperativa. Durante la primavera (7 maggio 2003), leggermente in ritardo dato il prolungarsi di temperature particolarmente rigide, sono state effettuate semine nelle due zone. Il materiale di semina era di origine locale (schiuditoio della Cooperativa).

Mensilmente venivano effettuati campionamenti nelle due aree di ingrasso:

- Zona A - Porto Lignano: substrato con componente sabbiosa del 20% (resto fangoso), area fortemente influenzata dalla vivificazione marina attraverso la bocca di Porto Lignano e dall'immissione di acqua dolce dai fiumi sfocianti a Nord della Laguna di Marano;
- Zona B - Isola di Marinetta: substrato con componente sabbiosa del 10%, area meno esposta ai flussi idrici, essendo protetta dal cordone litorale, e caratterizzata da bassi fondali emergenti durante i periodi di bassa marea.

Contemporaneamente al prelievo dei campioni sono stati raccolti dati ed informazioni riguardanti caratteristiche fisiche e meteorologiche: temperatura, salinità, condizioni meteo e stato di marea.

Ogni campione era costituito da 50-55 soggetti. Appena raccolti venivano portati al Laboratorio Patologia Molluschi dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie di Basaldella di Campofornido (UD) per essere sottoposti ai seguenti accertamenti:

- misurazione di lunghezza e peso di ogni soggetto/campione;
- esami istologici normalmente condotti su 25-30 soggetti/campione
- esami colturali quantitativi in Ray Fluid Thioglicollate Medium (RFTM) sul mollusco in toto, 25 soggetti/campione.

L'esame istologico è stato effettuato secondo le normali procedure istologiche (fissazione in fissativo di Carson, processazione, inclusione in paraffina, taglio, colorazione Ematossilina-Eosina, lettura al microscopio ottico). Questa analisi fornisce informazioni riguardanti la reazione dei tessuti, la distribuzione dei trofozoiti di *Perkinsus* e la presenza di altre forme parassitarie. Non fornisce però dati quantitativi e non è abbastanza sensibile per evidenziare gli stati iniziali dell'infezione.

L'esame colturale quantitativo è stato condotto mediante coltura della polpa del mollusco in RFTM. Con questa tecnica tutti i parassiti nei diversi stadi di maturazione aumentano di volume e diventano più facilmente visibili ed identificabili e non si ha perdita di parassiti eventualmente presenti nei tessuti. L'intero corpo del mollusco, dopo essere stato prelevato dalla conchiglia, viene asciugato su carta assorbente per rimuovere il liquido intervalvare e pesato. Successivamente il mollusco viene sminuzzato e posto ad incubare in 20 ml di Tioglicolato per 4-5 giorni al buio a temperatura ambiente. Si procede in seguito alla centrifugazione a 2500 rpm per 10 minuti e all'eliminazione del surnatante. Per la lisi, il tessuto è sospeso in 20 ml di una soluzione 2M di NaOH ed incubato a bagnomaria a 60°C per 1-3 ore. Dopo centrifugazione a 2500 rpm per 10 minuti, rimosso il surnatante, si effettuano 5 lavaggi in 10 ml di acqua distillata, con successive centrifugazioni, a cui fa seguito l'eliminazione del surnatante. Quindi 100 µl di sedimento diluito in 1 ml di acqua distillata, sono posti su filtro Millipore con porosità 0,22 µm, prima di procedere alla colorazione (1 ml di soluzione di Lugol al 20%) ed alla conta dei parassiti presenti mediante microscopio ottico. Se il numero dei parassiti risulta elevato, si procede alla diluizione fino al raggiungimento di una lettura ottimale. Al termine del conteggio si moltiplica il numero delle spore trovate per 10 (fattore di diluizione standard) e per l'eventuale altra diluizione apportata (n° spore totale) e si divide per il peso della polpa dell'animale (g) in modo da esprimere il n° spore/g.

La differenza di positività per l'infezione da *Perkinsus* nei due anni di indagine è stata valutata tramite il test esatto di Fisher. Il numero di spore/g è stato trasformato in logaritmo naturale ($[\ln(x+1)]$) al fine di tendere alla normalità della distribuzione e poter utilizzare strumenti statistici parametrici. Le eventuali correlazioni fra il numero di spore/g e le variabili temperatura, salinità, lunghezza e peso del mitilo sono state valutate tramite il coefficiente di correlazione r di Pearson. Il software utilizzato è stato SPSS per Windows, versione 12.01.

RISULTATI

Temperatura dell'acqua

Nella Zona A la temperatura è risultata compresa tra 3,0°C e 29,5°C; nella Zona B tra 4,0°C e 30,5°C. L'ampia oscillazione è dovuta ad un ambiente poco profondo. Durante il 2003 si è avuto un periodo caldo molto lungo e privo di precipitazioni (giugno-settembre) (Tabella 1).

Salinità

Nella Zona A i valori sono risultati compresi tra 14,8‰ e 33,3‰; nella zona B tra 21,3‰ e 35,0‰. Mediamente valori maggiori sono stati riscontrati nella Zona B. Come riportato precedentemente questa zona è più protetta, con ricambio idrico più lento e meno condizionato dai corsi d'acqua che sfociano in laguna (Tabella 1).

Data	Ora	ZONA A		ZONA B		Condizioni meteo	Marea
		T °C	Salinità ‰	T °C	Salinità ‰		
07/05/03	9,30	20,5	18,0	21,0	28,9	sereno	crescente
06/06/03	7,35	24,0	24,6	25,0	29,6	sereno	crescente
04/07/03	9,45	26,0	26,5	25,0	32,8	poco nuvoloso	crescente
07/08/03	14,45	29,5	33,3	30,5	35,0	quasi sereno	crescente
02/09/03	15,30	24,0	25,9	24,0	32,5	sereno	crescente
15/10/03	16,00	16,5	27,5	17,0	32,9	nuvoloso\bora	calante
07/11/03	15,00	12,0	21,3	12,0	29,1	nuvoloso\bora	calante
09/12/03	14,00	11,0	16,0	11,5	22,5	sereno	calante
07/01/04	16,00	3,0	15,4	4,0	24,2	nuvoloso\calma	calante
04/02/04	16,00	7,0	24,4	7,5	24,4	poco nuvoloso\nebbia	crescente
16/03/04	11,00	12,0	14,8	12,0	21,3	sereno	calante
21/04/04	9,00	15,0	19,3	15,0	27,2	sereno	crescente
18/05/04	7,00	19,5	19,1	18,5	25,5	sereno	crescente
23/06/04	8,00	21,0	15,6	22,0	29,1	sereno	crescente
20/07/04	17,00	27,5	24,4	30,0	29,5	sereno	calante
23/08/04	8,45	23,0	24,2	24,0	32,5	sereno/tramontana	crescente
19/09/04	17,30	20,5	19,5	23,0	30,8	sereno	calante
19/10/04	15,20	16,0	26,1	16,0	28,8	molto nuvoloso	calante

Tabella 1 - Caratteristiche fisiche e meteo delle zone di sperimentazione.
 Table 1 - Physical and meteorological characteristics of experimental area.

Biometrie

Alla fine della sperimentazione le vongole della zona A sono risultate avere un peso medio di 7,7 g e una lunghezza media di 32,2 mm, quelle della zona B, 8,4 g e 31,5 mm. Durante il primo anno, i soggetti immessi in primavera hanno presentato una variazione sia in peso sia in lunghezza tra le due zone (A-B); a fine ricerca i valori sono risultati molto simili (Tabelle 2 e 3; Grafici 1 e 2).

Stato sanitarioEsame colturale quantitativo

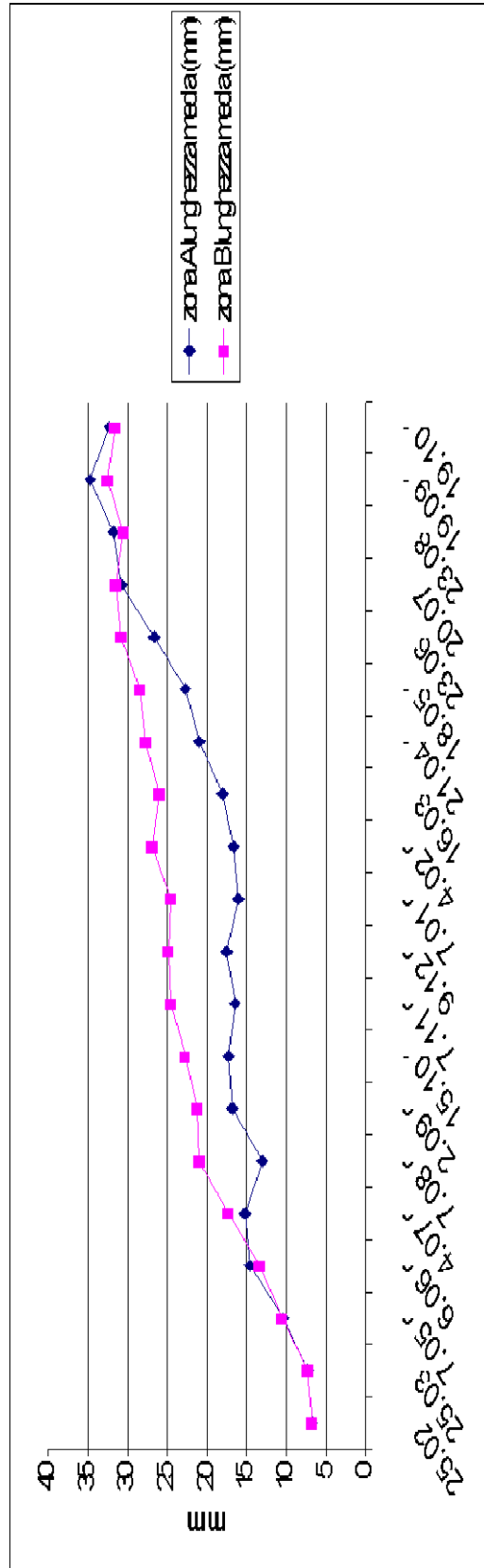
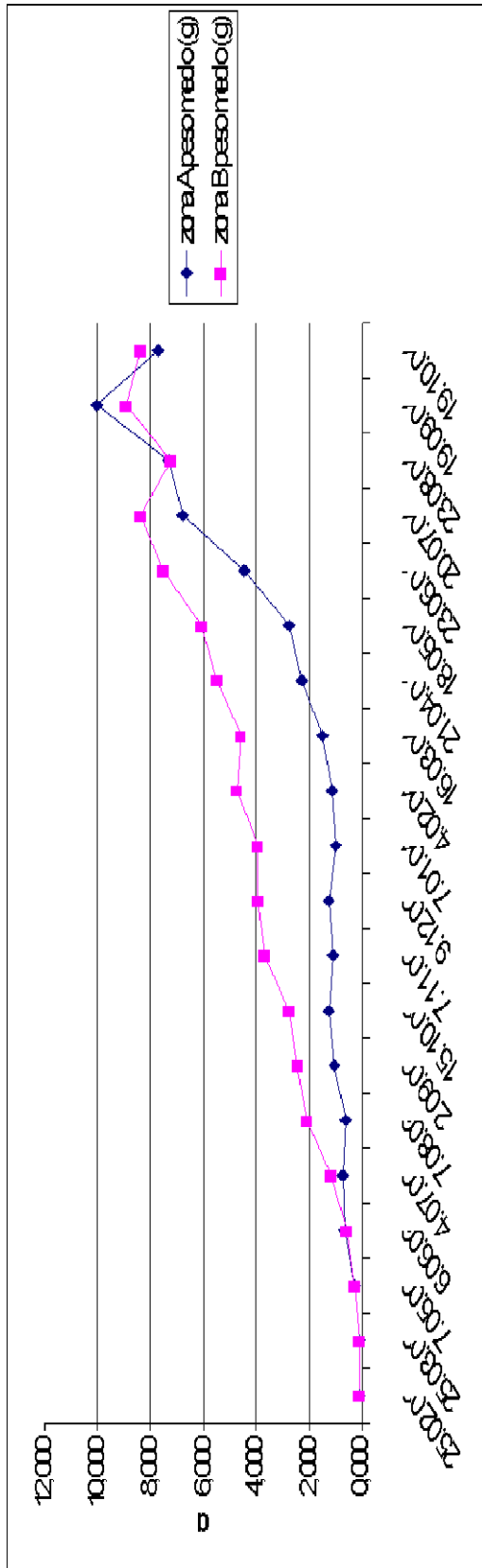
Perkinsus sp. è stato trovato in molti soggetti esaminati: 76-96%. Il numero di spore per soggetto è variato tra 0 e 127.000; quello delle spore/g tra 0 e 1.336.842. Il valore medio delle spore/g si è collocato tra 7.006 (febbraio 2003) e 123.755 (dicembre 2002).

Data	Peso totale (g)				Lunghezza totale (mm)			
	Min	Max	Media	D.S.	Min	Max	Media	D.S.
25.02.03	0,063	0,102	0,080	0,010374	5,2	8,0	6,7	0,576715
25.03.03	0,050	0,128	0,087	0,018039	6,1	9,1	7,3	0,687992
07.05.03	0,069	0,852	0,269	0,186875	6,9	16,9	10,3	2,538536
06.06.03	0,363	1,131	0,645	0,214749	12,0	17,5	14,5	1,719671
04.07.03	0,329	1,469	0,713	0,299493	11,2	23,0	15,1	2,708277
07.08.03	0,192	1,217	0,601	0,258199	0,9	17,5	13,0	4,027336
02.09.03	0,548	2,044	1,041	0,362508	14,0	20,5	16,7	1,766796
15.10.03	0,544	2,830	1,250	0,555259	13,3	23,2	17,2	2,538129
07.11.03	0,526	2,416	1,107	0,535887	13,0	21,5	16,4	2,534745
09.12.03	0,676	1,905	1,259	0,380838	14,0	21,0	17,5	1,865226
07.01.04	0,418	1,891	0,994	0,407943	12,0	20,7	16,0	2,302157
04.02.04	0,305	3,042	1,122	0,610232	10,8	25,0	16,6	3,225249
16.03.04	0,332	3,587	1,490	0,828492	11,0	25,0	18,0	3,746296
21.04.04	0,657	6,499	2,261	1,169679	14,4	29,5	21,0	3,230542
18.05.04	1,363	4,419	2,773	0,860380	18,0	26,6	22,7	2,307907
23.06.04	3,073	6,001	4,457	0,941333	22,7	30,0	26,6	2,065446
20.07.04	3,493	11,696	6,785	2,172489	24,5	36,0	30,8	3,086136
23.08.04	5,400	10,827	7,305	1,507214	29,2	35,4	31,7	1,821172
19.09.04	7,014	18,025	10,053	2,840287	31,2	40,8	34,7	2,589080
19.10.04	4,527	11,697	7,718	1,655501	26,3	35,6	32,2	2,090255

Tabella 2 - Caratteristiche peso medio e lunghezza media delle vongole nella Zona A.
 Table 2 - Mean weight and length of manila clam (zone A).

Data	Peso totale (g)				Lunghezza totale (mm)			
	Min	Max	Media	D.S.	Min	Max	Media	D.S.
25.02.03	0,063	0,102	0,080	0,010374	5,2	8,0	6,7	0,576715
25.03.03	0,050	0,128	0,087	0,018039	6,1	9,1	7,3	0,687992
07.05.04	0,082	0,580	0,271	0,136191	7,0	14,0	10,5	2,182712
06.06.03	0,248	1,320	0,555	0,279085	10,3	18,4	13,3	2,306426
04.07.03	0,419	2,114	1,174	0,425191	12,5	24,0	17,3	2,917904
07.08.03	0,954	3,900	2,098	0,646654	16,7	27,0	20,9	2,222971
02.09.03	1,527	3,476	2,439	0,617749	18,5	24,5	21,2	1,807365
15.10.03	1,621	5,122	2,749	0,802605	19,0	28,5	22,7	2,178164
07.11.03	1,726	5,392	3,675	1,018407	19,0	30,4	24,5	2,688754
09.12.03	2,107	6,061	3,935	1,180776	19,0	30,0	24,8	2,854383
07.01.04	1,787	6,868	3,952	1,330368	18,7	30,4	24,5	3,097757
04.02.04	2,606	8,105	4,745	1,405334	21,8	31,0	26,8	2,612949
16.03.04	1,869	7,493	4,582	1,453167	20,0	31,3	26,0	2,735282
21.04.04	3,322	9,375	5,492	1,565486	23,3	34,0	27,7	2,823750
18.05.04	3,914	8,874	6,065	1,553855	24,0	32,6	28,4	2,606613
23.06.04	4,471	11,727	7,524	1,844045	24,8	37,0	30,8	2,910624
20.07.04	4,871	11,864	8,385	1,806065	26,8	36,5	31,4	2,270154
23.08.04	4,650	12,106	7,348	1,896967	25,5	35,1	30,5	2,319001
19.09.04	6,927	12,485	8,940	1,380920	30,0	35,7	32,5	1,805519
19.10.04	5,227	12,199	8,400	1,695898	26,0	36,9	31,5	2,415802

Tabella 3 - Caratteristiche peso medio e lunghezza media delle vongole nella Zona B.
 Table 3 - Mean weight and length of manila clam (zone B).



Grafici 1-2 - Peso medio e lunghezza media delle vongole nelle zone A e B.
 Graphics 1-2 - Mean weight and length of manila clam (zones A and B).

Data	Peso polpa (g)				N° spore totali				N° spore/g					
	Min	Max	Media	D.S.	Min	Max	Media	D.S.	Media	Max	Media	D.S.	Media- na	
PREINGRASSO														
04.12.02	0,039	0,136	0,065	0,021099	0	30000	6158	9136,9	820	0	638297	123755	196682,6	976
09.01.03	0,012	0,110	0,061	0,025141	0	127000	6922	25328,3	170	0	1336842	80947	268204,5	4117
25.02.03	0,002	0,013	0,007	0,003234	0	540	40	105,2	20	0	90000	7006	17537,5	3330
25.03.03	0,006	0,028	0,014	0,004518	0	6700	284	1336,7	10	0	446666	19102	89083,1	1176
INGRASSO														
07.05.03	0,003	0,190	0,049	0,044160	0	37000	2930	8384,0	80	0	1275862	64534	253717,5	3478
06.06.03	0,057	0,235	0,118	0,051692	0	46000	3902	10528,2	30	0	308641	31934	80799,6	350
04.07.03	0,027	0,433	0,100	0,081917	0	51000	4891	11396,3	160	0	301369	38457	76109,3	1875
07.08.03	0,017	0,221	0,097	0,056020	0	142000	17816	31281,5	6000	0	1302752	183959	303453,7	65217
02.09.03	0,120	0,494	0,209	0,076755	90	104000	22173	27007,2	17000	545	622754	114803	150148,1	78703
15.10.03	0,102	0,629	0,234	0,112084	70	259000	46854	74125,6	14000	548	1702127	219647	416322,6	62330
07.11.03	0,085	0,512	0,238	0,125442	100	115000	17511	27634,4	8000	552	373376	71532	91698,7	28753
09.12.03	0,105	0,328	0,206	0,061130	50	61000	16889	18980,3	11000	221	281081	79235	86107,0	64024
07.01.04	0,072	0,405	0,201	0,089238	0	121000	16136	29527,5	285	0	725490	79992	161694,2	1914
04.02.04	0,043	0,628	0,208	0,122651	0	32000	4338	8179,8	500	0	244274	34247	60195,1	1937
16.03.04	0,072	0,812	0,365	0,200797	40	50000	5411	10465,7	1660	105	98591	13805	23159,3	5725
21.04.04	0,151	1,522	0,588	0,288615	70	61000	13959	14806,2	11000	118	110707	22534	23617,3	19710
18.05.04	0,249	1,113	0,589	0,227088	70	148000	22474	34421,2	10000	130	183850	35623	45962,9	22106
23.06.04	0,483	1,256	0,837	0,216340	40	510000	46256	103713,6	10000	77	478873	54441	104958,3	11655
20.07.04	0,419	2,187	1,174	0,446734	200	174000	27168	41792,4	11000	191	243356	28406	50269,9	11088
23.08.04	0,857	2,150	1,329	0,306022	50	137000	32470	36187,6	21000	23	83922	27271	29254,5	10971
19.09.04	0,942	2,188	1,340	0,333607	300	1320000	113321	272694,0	36000	302	735376	78484	169871,3	29190
19.10.04	0,688	1,800	1,219	0,245490	1000	161000	30560	39667,4	6000	586	147166	25099	33891,5	8720

Tabella 4- Peso polpa, n° spore totali e n° spore/g nelle vongole della Zona A
 Table 4- Body weight, total spore and spores/g in manila clams reared (zone A)

Data	Peso polpa (g)			N° spore totali					N° spore/g					
	Min	Max	Media	D.S.	Min	Max	Media	D.S.	Media	Min	Max	Media	D.S.	Media
PREINGRASSO														
04.12.02	0,039	0,136	0,065	0,021099	0	30000	6158	9136,9	820	0	638297	123755	196682,6	976
09.01.03	0,012	0,110	0,061	0,025141	0	127000	6922	25328,3	170	0	1336842	80947	268204,5	4117
25.02.03	0,002	0,013	0,007	0,003234	0	540	40	105,2	20	0	90000	7006	17537,5	3330
25.03.03	0,006	0,028	0,014	0,004518	0	6700	284	1336,7	10	0	446666	19102	89083,1	1176
INGRASSO														
07.05.03	0,014	0,107	0,054	0,027675	20	54000	4856	12828,0	130	266	2133333	127788	434032,8	2727
06.06.03	0,024	0,229	0,088	0,054521	0	54000	2642	10722,2	40	0	964285	43794	192275,7	1020
04.07.03	0,039	0,295	0,133	0,061583	0	97000	13537	23150,4	1110	0	836206	114769	206505,8	10620
07.08.03	0,160	0,605	0,363	0,109213	40	376000	63709	102278,7	5000	121	1089855	176168	291173,9	15723
02.09.03	0,183	0,571	0,395	0,124441	680	1450000	251067	307310,9	156000	1497	3273137	647611	692113,6	493670
15.10.03	0,226	0,896	0,520	0,146801	510	730000	214040	233247,4	130000	1847	1533613	405858	455538,7	307304
07.11.03	0,315	1,164	0,692	0,216374	5000	780000	211520	226702,5	64000	10703	1287128	319135	369706,7	84544
09.12.03	0,311	0,893	0,561	0,183298	1000	828000	279600	260400,5	303000	2053	1566666	525368	496537,3	529147
07.01.04	0,349	1,437	0,761	0,262071	1000	1035000	323200	241057,0	346000	1730	1470170	434879	368258,7	359550
04.02.04	0,474	1,270	0,868	0,236302	620	686000	251776	275106,3	158000	633	1223628	287842	333757,6	193390
16.03.04	0,437	1,750	1,029	0,343685	3000	800000	301400	235092,4	312000	1244	713429	266029	216673,6	300752
21.04.04	0,682	1,832	1,108	0,314415	3000	556000	166680	155126,2	117000	2722	538035	156209	146986,3	122816
18.05.04	0,499	1,668	0,981	0,303388	1000	1131000	204560	258655,5	151000	899	767299	206683	213002,0	172661
23.06.04	0,692	2,176	1,279	0,389407	600	700000	144464	147444,5	118000	366	453661	124575	113637,1	105054
20.07.04	0,697	1,538	1,107	0,215361	350	720000	198028	208970,8	131000	261	482686	169728	167387,7	111111
23.08.04	0,483	1,631	0,949	0,254659	2000	3000000	805560	703538,1	790000	2607	2522756	783390	626157,4	794573
19.09.04	0,730	1,555	0,990	0,173150	1000	2350000	519280	614694,9	225000	993	2445369	510310	658996,8	97077
19.10.04	0,630	1,672	1,053	0,246753	4000	1660000	307680	475325,8	115000	3996	1830209	282540	442299,6	147625

Tabella 5 - Peso polpa, n° spore totali e n° spore/g nelle vongole della Zona B.
 Table 5 - Body weight, total spore and spores/g in manila clams reared (zone B).

Zona A - *Perkinsus* sp. è stato rinvenuto in quasi tutti i soggetti esaminati: 76-100%. Il numero di spore per soggetto è variato tra 0 e 1.320.000; quello delle spore/g tra 0 e 1.702.127. Il valore medio spore/g è collocato tra 13.805 (marzo 2004) e 219.647 (ottobre 2003) (Tabella 4; Grafico 3).

Zona B - *Perkinsus* sp. è stato rinvenuto in quasi tutti i soggetti esaminati: 76-100%. Il numero di spore per soggetto è variato tra 0 e 3.000.000; quello delle spore/g tra 0 e 3.273.137. Il valore medio di spore/g si è collocato tra 43.794 (giugno 2003) e 783.390 (agosto 2004) (Tabella 5; Grafico 3).

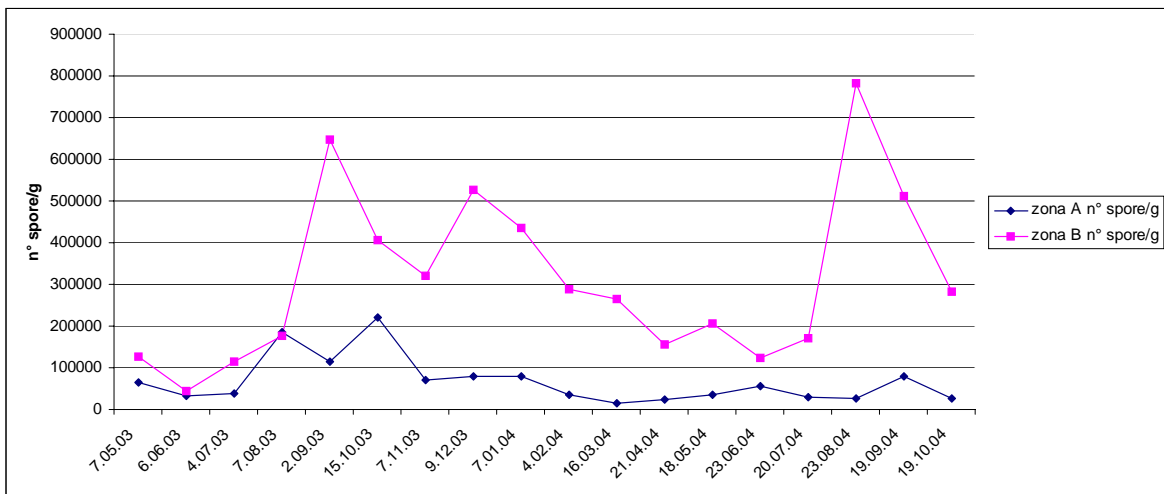


Grafico 3 - N° spore/g presenti nelle vongole delle zone A-B.
Graphic 3 - Spores/g in manila clam (zones A and B).

Esame istologico

L'esame istologico non è stato condotto su un numero omogeneo di soggetti per campione. Complessivamente, sono risultati positivi nella Zona A il 39,1% dei soggetti esaminati, nella Zona B il 57,82% (Tabella 6).

Come per l'esame colturale quantitativo, anche per l'esame istologico i soggetti allevati nella Zona B risultavano maggiormente infestati da *Perkinsus* sp. rispetto a quelli della Zona A (Tabella 7).

Analisi statistica

Le medie di spore/g rilevate in generale nei due anni di indagine non sono risultate statisticamente significative.

Le vongole allevate su terreno fangoso hanno mostrato una media di spore significativamente più elevata di quelle coltivate su terreno sabbioso.

In generale i mesi tardo primaverili-estivi (maggio, giugno e luglio) hanno mostrato una media di spore/g significativamente inferiore rispetto ai mesi più freddi (da settembre a gennaio).

Data	Zona A %	Zona B %
04.12.02	preingrasso primavera	56,0
09.01.03		48,0
25.02.03		4,0
25.03.03		4,0
07.05.03	36,0	28,0
06.06.03	36,0	24,0
04.07.03	40,0	24,0
07.08.03	36,0	52,0
15.10.03	0,0	56,0
07.11.03	75,0	72,0
09.12.03	28,5	68,0
07.01.04	-	52,0
04.02.04	50,0	73,3
16.03.04	50,0	92,0
21.04.04	62,5	88,0
18.05.04	42,8	56,0
23.06.04	58,3	64,0
20.07.04	33,3	84,0
23.08.04	60,0	90,6
19.09.04	40,0	80,0
19.10.04	37,5	64,0

Tabella 6 - Esame istologico: % soggetti positivi per *Perkinsus* sp.
 Table 6 - Histological investigation: *Perkinsus* sp. positive samples (%).

Data	Zona A %	Zona B %
04.12.02	preingrasso primavera	92,0
09.01.03		96,0
25.02.03		88,0
25.03.03		76,0
07.05.03	84,0	100,0
06.06.03	76,0	76,0
04.07.03	96,0	96,0
07.08.03	96,0	100,0
02.09.03	100,0	100,0
15.10.03	100,0	100,0
07.11.03	100,0	100,0
09.12.03	100,0	100,0
07.01.04	95,8	100,0
04.02.04	96,0	100,0
16.03.04	100,0	100,0
21.04.04	100,0	100,0
18.05.04	100,0	100,0
23.06.04	100,0	100,0
20.07.04	100,0	100,0
23.08.04	100,0	100,0
19.09.04	100,0	100,0
19.10.04	100,0	100,0

Tabella 7 - Esame colturale quantitativo: % soggetti positivi per *Perkinsus* sp.
 Table 7 - Cultural investigation: *Perkinsus* sp. positive samples (%).

Correlazioni

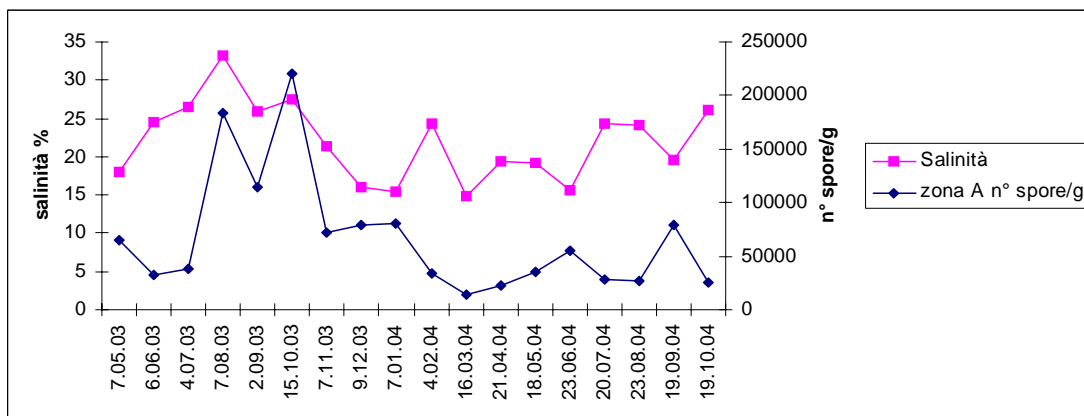
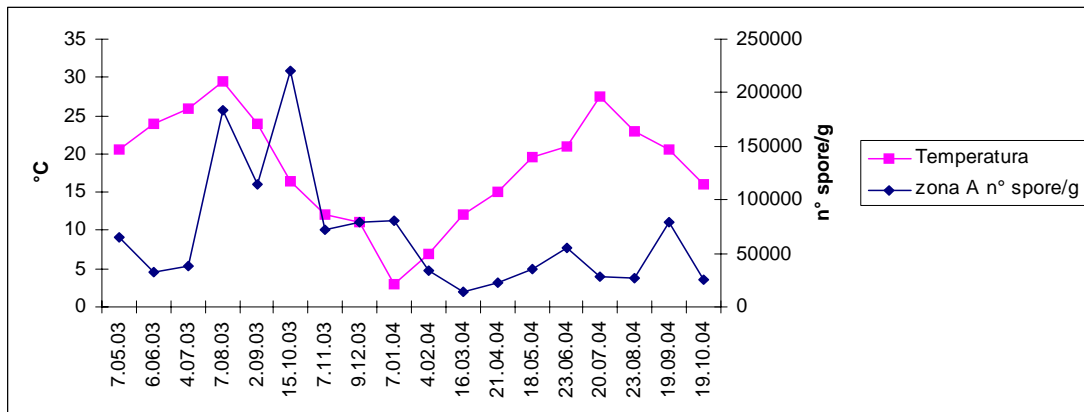
Nella tabella seguente (Tabella 8) vengono riportati i coefficienti di correlazione fra il numero di spore e le variabili peso polpa, peso totale e lunghezza della vongola e fra il numero di spore, temperatura e salinità dell'acqua al momento del prelievo. Benché alcune correlazioni siano significative, i valori dei coefficienti sono bassi, indicando una mancanza di relazione lineare fra il numero di spore conteggiate e le variabili esaminate.

variabili	Zona A	Zona B
Peso polpa	.059	.212**
Peso totale (g)	.075	.282**
Lunghezza (mm)	.093*	.356**
Temperatura	.035	-.209**
Salinità	.074	-.097*

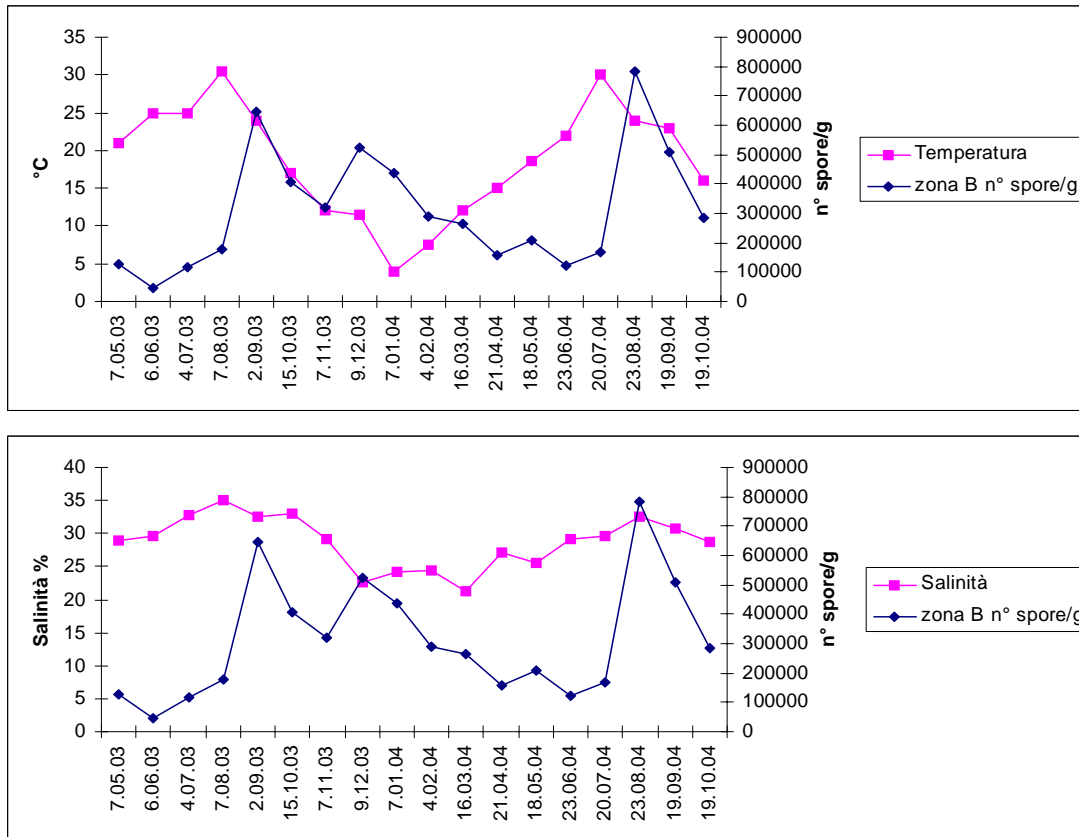
* La correlazione è significativa al livello 0,05.

** La correlazione è significativa al livello 0,01.

Tabella 8 – Coefficienti di correlazione tra il numero di spore e le diverse variabili.
Table 8 – Correlation coefficients between spores numbers and parameters.



Grafici 4-5 - Temperatura, salinità e numero di spore/g in vongole relative alla zona A.
Graphics 4-5 - Temperature, salinity and spores/g (zone A).



Grafici 6-7 - Temperatura, salinità e numero di spore/g in vongole relative alla zona B.
 Graphics 6-7 - Temperature, salinity and spores/g (zone B).

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

La ricerca condotta fotografa quanto avvenuto nei due anni in esame in normali zone di allevamento di vongola filippina della Laguna di Marano. Zona di allevamento, stagionalità di introduzione, seme preingrassato, densità di popolazione, ecc., sono quelle abituali e compatibili con l'habitat.

Le condizioni ambientali e trofiche, molto simili nelle due zone, permettono di raggiungere la taglia minima commerciale (25 mm) in circa 12 mesi dall'introduzione del seme, in circa 18 mesi, una taglia maggiore, commercialmente più remunerativa (<30 mm).

La temperatura e la salinità osservate rispecchiano, in parte, quelle rilevate annualmente nella zona; la variazione più significativa si è avuta nei valori della temperatura osservati nei mesi di giugno-luglio 2003, superiori alla norma.

La Perkinsosi nelle zone oggetto di ricerca è presente nell'arco di tutto l'anno. I soggetti sono infetti già dalla fase di preingrasso.

Mediamente la sua presenza tende a ridursi durante il periodo invernale-primaverile, per poi crescere a partire dall'estate e raggiungere un picco durante fine estate-inizio autunno. Durante

il primo anno di allevamento, i mesi con il grado maggiore di infezione sono stati settembre (Zona B) e ottobre (Zona A); nel secondo anno i mesi di agosto (Zona B) e settembre (Zona A).

I soggetti allevati nella Zona B presentavano un grado di infezione statisticamente significativo più elevato rispetto a quelli della Zona A.

Normalmente il grado di infezione aumenta con l'età: il numero medio di spore/g nei soggetti del secondo anno è maggiore rispetto ai soggetti del primo anno. Dalla ricerca questo non si evince.

Molti fattori possono condizionare la presenza e l'intensità della Perkinsosi. Molte considerazioni concernenti l'epidemiologia hanno focalizzato delle responsabilità, per quanto riguarda fattori esterni, nella temperatura e nella salinità.

In Europa, il maggior numero di informazioni si ha dall'allevamento e dalle prove in vitro effettuate da ricercatori portoghesi e spagnoli su *R. decussatus* e *R. philippinarum*.

Presenza ed intensità diminuiscono con il decrescere della temperatura e della salinità, mentre aumentano con l'accrescimento di questi parametri, entro determinati limiti, legati alla specie allevata e alle esigenze del parassita.

Negli allevamenti spagnoli di *R. decussatus* si hanno segnalazioni di mortalità durante tutto l'anno, maggiormente dalla primavera all'autunno, con due picchi: primavera-fine estate ed inizio autunno, quando la temperatura dell'acqua è compresa tra 15-28°C (La Payne & Nickens, 2002; Villalba *et al.*, 2005). Valori simili per la temperatura sono riportati da più Autori, che hanno basato i loro studi su dati raccolti durante fenomeni di mortalità o sullo studio *in vitro* del ciclo biologico del parassita (in particolare fase di sporulazione). Una ricerca condotta da Cigarria *et al.* (1997) per valori di temperatura compresi tra 15-25°C, sottolinea che la mortalità coincide con il verificarsi delle temperature più elevate. Ordas & Figueras (1998) riportano che a temperature comprese tra 5-37°C è presente *Perkinsus*, con valori ottimali tra 16-26°C. Casas *et al.* (2002) riportano valori compresi tra 15-32°C, con intervallo ottimale tra 19-28°C. Da prove in vitro effettuate in Francia da Auzoux-Bordenave *et al.* (1995), risulta che i valori ottimali siano compresi tra 24-28°C.

La temperatura osservata durante la sperimentazione era caratterizzata da un'ampia oscillazione, dovuta all'ambiente poco profondo. Nei mesi (agosto-ottobre) in cui *Perkinsus* era maggiormente infettante (numero spore/g), il valore della temperatura si collocava tra 16 e 24°C. Questi valori bene si inseriscono tra quelli riportati in letteratura (15-28°C) come ottimali per la presenza del parassita. I valori riscontrati durante l'arco di un anno (3-30,5°C) sono compatibili con la sopravvivenza della specie allevata (3-32°C in banchi naturali) (Gosling, 2003) e le esigenze del parassita.

A differenza di quanto riportato da alcuni Autori (mortalità nelle vongole con temperature superiori a 25°C), nella ricerca condotta nella Laguna di Marano non sono stati evidenziati episodi di mortalità.

Poiché non sono state rilevate variazioni significative di temperatura tra le due zone, non si ritiene che la temperatura sia la causa del diverso grado di infestazione da *Perkinsus* riscontrato.

Per quanto riguarda la salinità, i vari Autori riportano valori compresi tra 15-40 ‰ (Ordas & Figueras, 1998) e 25-35‰ (Auzoux-Bordenave *et al.*, 1995; Casas *et al.*, 2002). Casas *et al.* (1999) riportano il valore 5‰ come limite al di sotto del quale si possono verificare casi di mortalità nelle vongole. Gosling (2003) riporta come valori ottimali per la specie *R. philippinarum* 13-35‰.

I valori di salinità riscontrati durante la sperimentazione variano a seconda delle zone: mediamente si possono raggiungere valori minori nella zona A (14,8-33,3‰) rispetto alla zona B (21,3-35,0‰), in quanto influenzata dall'apporto di acqua dolce dai fiumi che sfociano a nord della laguna di Marano.

La zona B, inoltre, è più protetta, in quanto collocata a ridosso dell'isola della Marinetta all'interno della laguna. Questo fa sì che il substrato su cui vengono allevate le vongole abbia una composizione diversa: in particolare varia la presenza di sabbia, inferiore mediamente del 10-20% rispetto alla zona A.

La diversa salinità riscontrata tra le due zone e la diversa composizione del substrato possono pertanto aver influenzato la variazione del grado di infestazione di *Perkinsus*.

BIBLIOGRAFIA

Auzoux-Bordenave S., Vigarito A.M., Ruano F., Domart-Coulon I. & Doumenc D. (1995). In vitro sporulation of the clam pathogen *Perkinsus atlanticus* (Apicomplexa, Perkinsea) under various environmental conditions. *J. Shellfish Res.*, 14, 2: 469-475.

Azevedo C. (1989). Fine structure of *Perkinsus atlanticus* n. sp. (Apicomplexa, Perkinsea) parasite of the clam *Ruditapes decussatus* from Portugal. *J. Parasitol.*, 75: 627-635.

Casas S.M., Grau A., Reece K.S., Apakupakul K., Azevedo C. & Villalba A. (2004). *Perkinsus mediterraneus* n. sp., a protistan parasite of the European flat oyster *Ostrea edulis* from the Balearic Islands, Mediterranean Sea. *Dis. Aquat. Org.*, 58: 231-244.

Casas S.M., Villalba A., Lopez C. & Carballal M.J. (1999). In vitro study of temperature and salinity effects on viability and longevity of free stages of the life cycle of *Perkinsus atlanticus*, a parasite of the carpet shell *Ruditapes decussatus*. *9th International Congress EAFP, 19-24 settembre 1999*: P014.

Casas S.M., Villalba A. & Reece K.S. (2002). Study of *Perkinsus* in the carpet shell clam *Tapes decussatus* in Galicia (NW Spain). I. Identification of the aetiological agent and in vitro modulation of zoosporulation by temperature and salinity. *Dis. Aquat. Org.*, 50: 51-61.

Ceschia G., Zentilin A. & Giorgetti G. (1991). Presenza di *Perkinsus* in vongole veraci (*Ruditapes philippinarum*) allevate nel Nord-Est Italia. *Boll. Soc. It. Patol. Ittica*, 5: 101-108.

Cigarría J., Rodríguez C. & Fernández J.M. (1997). Impact of *Perkinsus* sp. on Manila clam *Ruditapes philippinarum* beds. *Dis. Aquat. Org.*, 29: 117-120.

Da Ros L. & Canzonier W.J. (1985). *Perkinsus*, a protistan threat to bivalve culture in the Mediterranean basin. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, 5, 2: 23-27.

Da Ros L. & Canzonier W.J. (1986). *Perkinsus*, a protistan threat to bivalve culture in the Mediterranean basin. In: *Pathology in marine aquaculture, European Society, Special Publication No. 9*: 137.

Figueras A., Robledo J.A.F. & Novoa B. (1992). Occurrence of Haplosporidian and *Perkinsus*-like infections in carpet-shell clams, *Ruditapes decussatus* (Linnaeus, 1758), of the Ria de Vigo (Galicia, NW Spain). *J. Shellfish Res.*, 11, 2: 377-382.

Gosling E. (2003). Bivalve molluscs: biology, ecology and culture. *Fishing news Books*.

La Peyne J.F. & Nickens A.D. (2002). Viability and growth of *Perkinsus marinus* and *Perkinsus atlanticus* at three temperatures. *Annual Meeting National Shellfisheries Association, 14-18 aprile 2002, Mystic, Connecticut*: 374.

Murrell A., Kleeman S.N., Barker S.C. & Lester R.J (2002). Synonymy of *Perkinsus olseni* Lester & Davis, 1981 and *Perkinsus atlanticus* Azevedo, 1989 and an update on the phylogenetic position of the genus *Perkinsus*. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, 22, 4: 258-265.

Ordas M.C. & Figueras A. (1998). In vitro culture of *Perkinsus atlanticus*, a parasite of the carpet shell clam *Ruditapes decussatus*. *Dis. Aquat. Org.*, 33: 129-136.

Ruano F. & Cachola R. (1986). Outbreak of a severe epizootic of *Perkinsus marinus* (Levin, 1978) at Ria de Faro clam's culture beds. In *Proc. 2nd Int. Colloq. Pathol. Mar. Aquac. (PAMAQ II)*, 7-11 sept. 1986, Oporto (Portugal): 41-42.

Villalba A., Casas S.M., Lopez C. & Carballal M.J. (2005). Study of *Perkinsus* in the carpet shell clam *Tapes decussatus* in Galicia (NW Spain). II. Temporal pattern of disease dynamics and association with clam mortality. *Dis. Aquat. Org.*, 65: 257-267.