



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
DEPARTAMENTO DE AQUICULTURA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA

**Patógenos em ostras na Ilha de Santa Catarina-SC e no Estuário do Rio Pacoti-CE, com ênfase no protozoário *Perkinsus*.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Aquicultura da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito à obtenção do título de Doutor em Aquicultura

Orientadora: Dra. Aimê Rachel Magenta Magalhães  
Co-orientadora: Dra. Tereza Cristina Vasconcelos Gesteira

**RACHEL COSTA SABRY**

Florianópolis  
2010

Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária da  
Universidade Federal de Santa Catarina

Sabry, Rachel Costa,

Patógenos em ostras na Ilha de Santa Catarina-SC e no  
Estuário do Rio Pacoti-CE, com ênfase no protozoário *Perkinsus*. /  
Rachel Costa Rachel Costa - 2010.

124 f: 17 figs. 5 Tabs.

Orientadora: Dra. Aimê Rachel Magenta Magalhães.

Tese (Doutorado) Universidade Federal de Santa Catarina,  
Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em  
Aquicultura.

1. *Perkinsus*; 2. *Crassostrea*; 3. histopatologia; 4. ostras

**Patógenos em ostras na Ilha de Santa Catarina-SC e no Estuário do Rio Pacoti-CE, com ênfase no protozoário *Perkinsus***

Por

RACHEL COSTA SABRY

Esta tese foi julgada adequada para a obtenção do título de

**DOUTOR EM AQUICULTURA**

e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Aquicultura.

Banca Examinadora:

---

Dra. Aimê Rachel Magenta Magalhães – *Orientadora*

---

Dra. Guisla Boehs

---

Dra. Patricia Mirella da Silva Scardua

---

Dra. Margherita Anna Antônia Maria Barracco

---

Dr. Luis Alejandro Vinatea Arana



**Aos meus pais Maria do Brasão e Charif Sabry com amor e carinho**



## AGRADECIMENTOS

Quero nesse espaço agradecer a todas as pessoas que direta ou indiretamente participaram para a realização da minha tese de doutoramento, contribuindo para que durante esse tempo eu tivesse forças para vencer todos os obstáculos encontrados no decorrer do trabalho.

Inicialmente quero agradecer à minha orientadora Dra. Aimê Rachel M. Magalhães, a quem eu admiro pela sua competência, por ter aceitado me orientar em uma área de pesquisa relativamente nova no Brasil e depois pelos ensinamentos a mim dedicados. Professora Aimê acreditou desde o início na idéia do projeto e me incentivou a desenvolver esta pesquisa. À professora Aimê meus mais sinceros agradecimentos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES pela concessão da bolsa de estudo. Agradeço em especial ao Dr. Luiz Drude de Lacerda coordenador do Projeto pertencente ao Programa Amazônia Azul – CAPES do qual fui bolsista.

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq e ao Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento - MAPA, pelo apoio financeiro para execução de parte das atividades do presente projeto.

Ao Instituto de Ciências do Mar-LABOMAR/UFC, pelo apoio de infraestrutura concedida para viabilização de algumas etapas do presente projeto.

À Dra. Patrícia Mirella da Silva pela sua incondicional contribuição a qual viabilizou a concretização desse trabalho de tese em todas as suas etapas. A esta professora, quero agradecer por todos os ensinamentos na área de patologia de bivalves. Quero agradecer pelos estímulos, pelo companheirismo, amizade e por ter me dado o privilégio de aprender novas técnicas de diagnósticos e crescer profissionalmente.

À Dra. Tereza Cristina V. Gesteira, pelo aprendizado ao longo desses 14 anos de convivência. Com esta professora dei os primeiros passos na minha vida acadêmica e aprendi a valorizar a ética e o profissionalismo. Não posso deixar de agradecer a sua amizade, humanidade, companheirismo e acima de tudo o papel de mãe científica. Através de sua incomparável experiência profissional, professora Cristina me mostrou os melhores caminhos para minha formação profissional.

Quero agradecer ao Dr. Antonio Villalba Garcia, do Centro de Investigación Mariñas – CIMA/Espanha, por ter despertado em mim a idéia de fazer uma pesquisa mais aprofundada na área de patologia de moluscos bivalves e também pelo apoio na cessão de materiais importantes para a tese.

Dra. Margherita Barracco e a Dra. Luciane M. Perazzolo pelo apoio concedido durante a execução de minha tese. Esse apoio tornou viável a execução de parte das análises, imprescindíveis, no presente projeto de doutorado.

Dra. Guisla Boehs a qual tenho no mais profundo conceito de professora e pesquisadora, meus sinceros agradecimentos pela força, e incentivo. Professora Guisla desde a época em que fiz o mestrado vem me apoiando profissionalmente e tem contribuído para minha formação. Também quero agradecer pela sua amizade e companheirismo, sempre.

Quero agradecer em especial ao Dr. Jaime Fernando Ferreira, que através do Laboratório de Moluscos Marinhos-LMM/UFSC, fez a concessão das ostras de cultivo utilizadas neste trabalho e sempre esteve disponível para contribuir com o projeto. Professor Jaime contribuiu diretamente, através de seus preciosos ensinamentos, para que eu admirasse mais ainda a área de aquicultura.

Agradeço ao Dr. Rodrigo Maggioni, por ter disponibilizado a infraestrutura do Laboratório de PCR/Labomar, para execução do trabalho e pelo apoio e incentivo.

Quero agradecer aos companheiros do Centro de Diagnóstico de Enfermidades de Camarões Marinhos - CEDECAM e do Grupo de Estudos de Moluscos Bivalves – GEMB/Labomar: Graça Coelho, João Mafalda, Cândida, Pedro Carlos, Diego Apolinário, Germano Praxedes, Lidiane Romão e Rayza Araújo que contribuíram direta ou indiretamente para esse trabalho e também pela convivência durante todo esse período. Agradeço em especial a Engenheira de Pesca Liana Pinho Ferreira pela valiosa ajuda em todas as etapas da tese.

À equipe do Núcleo de Estudos em Patologia em Aquicultura – NEPAQ/UFSC, pelo apoio durante o processamento das análises e pelo convívio durante esses anos de curso. Quero agradecer em especial a Marthiellen, Vitor Pontinha que me ajudaram em todas as etapas do trabalho e também a Ana Lúcia Schaefer pelo apoio no laboratório de histologia.



A todos os que fazem o Laboratório de Imunologia Aplicada a Aquicultura – LIAQ/UFSC, em especial a Cris, Liege e Mirian que sempre me ajudaram nas atividades do dia a dia do laboratório. Em especial quero agradecer a Rafael Rosa pela importante participação no presente projeto.

Às amigas do laboratório de microbiologia do LABOMAR/UFSC (Cris, Gleyre e Renata) e em especial a Dra. Oscarina Viana e a Engenheira de Pesca Edirsana que contribuíram de forma significativa para o bom desenvolvimento da pesquisa, pela amizade e pela ajuda nos momentos difíceis.

Agradeço ao meu grande amigo, Francisco de Assis (FRAN - IBAMA/LABOMAR) pela valiosa contribuição no meu projeto de doutorado, com toda sua competência e experiência profissional. Com certeza, aprendi muito com seus conselhos e dicas preciosas.

Ao meu amigo de todas as horas, Pedro Alexandre (PA) com quem dividi momentos importantes durante o período de doutorado. PA obrigada pela sua amizade e companheirismo.

Ao meu amigo Carlito (CCA/UFSC) que com sua competência profissional ajudou de forma significante no decorrer do presente projeto.

Aos amigos: Keka, Adélia, Karlia Dalla, Esaú Carvalho, Ricardo Albuquerque, Régis Vasconcelos, Célia, Hanne, Breno Costa, Marcos Scardua e em especial quero agradecer a Igor Silva Nogueira e a minha grande amiga Tathiana Zimmermann de Farias pela valiosa contribuição no presente trabalho e pela força em todos os momentos. Agradeço também a minha amiga Maria do Carmo Gominho Rosa que sempre me deu força e me acolheu nas horas mais difíceis do curso.

Ao meu amor Maximiano Dantas pela ajuda, carinho, amizade, companheirismo e por ter compartilhado de todos os momentos durante a realização desse trabalho. Agradeço a Max por ter me incentivado desde o início a lutar pelos meus sonhos e de ter contribuído de forma significativa na minha formação profissional.

Aos meus irmãos e sobrinhos pela força e porque de forma indireta têm sido o motivo de minha luta ao longo desses anos. Em especial quero ressaltar aqui meu sobrinho Bruno Sabry que nas horas decisivas, durante esse doutorado, foi minha fonte de inspiração.



## RESUMO

A perkinsiose, enfermidade causada pelo protozoário *Perkinsus* sp., é responsável por mortalidades de moluscos marinhos em todo o mundo. O presente estudo objetivou verificar a presença de patógenos com ênfase em *Perkinsus* em ostras de Santa Catarina/SC e do Ceará/CE, Brasil. Em SC, as ostras *Crassostrea rhizophorae* (costão) e *Crassostrea gigas* (cultivo) foram coletadas no Sambaqui e Ribeirão da Ilha, em março/2008 e abril/2009 (N= 1200). No CE, as ostras *C. rhizophorae* foram coletadas em 3 pontos do Estuário do Rio Pacoti, em agosto/2008 e dezembro/2009 (N= 900). As técnicas utilizadas foram análise macroscópica, histologia, cultivo em meio líquido de tioglicolato, reação em cadeia da polimerase (PCR), clonagem e sequenciamento de uma região identificada de *Perkinsus*. Os resultados nas ostras estudadas mostraram: hipertrofia gamética, a presença de bactérias do tipo rickettsia; protozoários: *Perkinsus*, *Nematopsis*, *Trichodina*, *Sphenophrya*, *Ancistrocoma* e *Steinhausia*. As hipertrofias e bactérias foram detectadas nas ostras de SC e *Perkinsus* somente nas ostras do CE. Os metazoários observados foram poliquetas *Polydora*, *Urastoma*, *Tylocephalum*, copépode possivelmente do gênero *Pseudomyicola* e, nas ostras do Ceará, larvas de digenéticos. Os patógenos não foram associados a danos significativos nos tecidos das ostras, em SC e CE. As ostras do CE foram diagnosticadas com *Perkinsus* sp. (5,8% em 2008 e 5,1% em 2009). A PCR com iniciadores específicos seguida do sequenciamento confirmou se tratar do gênero *Perkinsus*, porém ainda não foi possível confirmar a espécie.

1. *Perkinsus* sp.; 2. *Crassostrea*; 3. histopatologia; 4. Ostras.

## ABSTRACT

### **Pathogens in oysters from Santa Catarina Island, Santa Catarina State, and from Pacoti River Estuary, Ceará State, with emphasis on the *Perkinsus* protozoa.**

Perkinsiosis, disease caused by the protozoan *Perkinsus* sp., is responsible for mortalities of marine mollusks worldwide. This study aimed to evaluate the presence of pathogens with emphasis on *Perkinsus* sp. in oysters from the States of Santa Catarina/SC and Ceará/CE, Brazil. In SC, the oysters *Crassostrea rhizophorae* (from the coast) and *Crassostrea gigas* (from culture) were collected at Sambaqui and Ribeirão da Ilha, on March 2008 and April 2009 (N = 1200). In CE, oysters *C. rhizophorae* were collected at three sites of the Pacoti River Estuary on August 2008 and December 2009 (N = 900). The techniques used were macroscopic analysis, histology, culture in thioglycolate medium, polymerase chain reaction, cloning and sequencing of an identified region of *Perkinsus*. The results in oysters studied showed gametic hypertrophy, rickettsia-like bacteria and protozoans of genera *Perkinsus*, *Nematopsis*, *Trichodina*, *Sphenophrya*, *Ancistrocoma* and *Steinhausia*. The hypertrophy caused by viruses and bacteria were detected in oysters from SC and *Perkinsus* only detected in oyster from CE. The metazoans observed were polychaetes *Polydora*, *Urastoma*, *Tylocephalum*, copepods of genus *Pseudomyicola* and, in oysters from CE, digenetic larvae. The pathogens were not associated to significant damage in oysters tissues, in SC and CE. The oysters from CE were diagnosed with *Perkinsus* sp. (5.8% in 2008 and 5.1% in 2009). PCR with specific primers followed by sequencing confirmed the occurrence of the genus *Perkinsus*, but it was not possible to confirm the species.

Key words: 1. *Perkinsus* sp.; 2. *Crassostrea*; 3. Histopathology; 4. oysters

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO I

- Figura 1.** Ciclo de vida de *Perkinsus olseni* parasitando o bivalve *Ruditapes philippinarum*..... 31

### CAPÍTULO II

- Figura 1.** Alterações patológicas e patógenos detectados em tecidos de *Crassostrea gigas* e *C. rhizophorae* do Sambaqui e Ribeirão da Ilha (Ilha de Santa Catarina, Brasil) em março-abril de 2008 e 2009 ..... 46
- Figura 2.** Patógenos observados em tecidos de *Crassostrea gigas* e *C. rhizophorae* do Sambaqui e Ribeirão da Ilha (Ilha de Santa Catarina, Brasil) em março-abril de 2008 e 2009 ..... 47

### CAPÍTULO III

- Figura 1.** Locais de amostragem de ostras (S) no estuário do Rio Pacoti (Fortaleza) e na Ilha de Santa Catarina (Ribeirão da Ilha e Sambaqui) ..... 66
- Figura. 2.** Preparação das brânquias de *Crassostrea rhizophorae* incubadas em RFTM e coradas com lugol. .... 71
- Figura 3.** Trofozoíto fagocitado mostrando uma típica aparência anelada, um grande vacúolo (V) e um núcleo excêntrico com nucléolo proeminente..... 73
- Figura 4.** Esquizonte de *Perkinsus* sp. (seta) contendo pequenas células-filhas no interior do tecido conjuntivo entre dois túbulos da glândula digestiva ..... 73
- Figura 5 a 8.** Esporulação *in vitro* de *Perkinsus* sp. em água do mar filtrada esterilizada..... 73
- Figura 9 e 10.** Diagnóstico molecular de *Perkinsus* sp. infectando a ostra-de-mangue *Crassostrea rhizophorae*..... 75

**Figura 11.** Análise de máxima parcimônia das sequências da região ITS do rDNA de diferentes espécies de *Perkinsus*.....76

#### **CAPÍTULO IV**

**Figura 1.** Mapa ressaltando o Rio Pacoti, Ceará onde se localiza os três pontos de amostragem de ostras na região estuarina. ....91

**Figura 2.** Patógenos detectados em tecidos de *Crassostrea rhizophorae* no Estuário do Rio Pacoti, Ceará, em agosto de 2008 e dezembro de 2009. ....99

**Figura 3.** Patógenos detectados em tecidos de *Crassostrea rhizophorae* no Estuário do Rio Pacoti, Ceará em agosto de 2008 e dezembro de 2009. ....100

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO II

<b>Tabela I.</b> Prevalência (%) de patógenos e alterações patológicas nas ostras <i>Crassostrea gigas</i> (G) e <i>C. rhizophorae</i> (R) em dois pontos da Ilha de Santa Catarina, Sambaqui (SAM) e Ribeirão da Ilha (RIB), em março-abril de 2008 e 2009 .....	43
---	----

### CAPÍTULO III

<b>Tabela 1.</b> Sequências do Genbank incluídas na análise da região do espaçador interno transcrito (Internal Transcribed Spacer - ITS) de <i>Perkinsus</i> sp.....	71
---	----

<b>Tabela 2.</b> Prevalência (%) da infecção por <i>Perkinsus</i> sp. em <i>Crassostrea rhizophorae</i> do estuário do Rio Pacoti (Fortaleza), baseada em ensaios com Meio Fluido de Tioglicolato de Ray (RFTM) e histologia.....	72
---	----

### CAPÍTULO IV

<b>Tabela 1.</b> Prevalência (%) de patógenos detectados na ostra-de-mangue <i>Crassostrea rhizophorae</i> em 3 pontos (pontos: 1, 2 e 3) do Estuário do Rio Pacoti, Ceará, em agosto de 2008 e dezembro de 2009.....	96
---	----

<b>Tabela 2.</b> Prevalência (%) da infecção por <i>Perkinsus</i> sp. em ostra-de-mangue <i>Crassostrea rhizophorae</i> do Estuário do Rio Pacoti, em 2009.....	97
---	----

## LISTA DE ABREVIATURAS

AM	análise macroscópica
BLASTN	programa que encontra as regiões de similaridade entre as sequências nucleotídicas ( <i>Basic Local Alignment Search Tool</i> )
bp	pares de base ( <i>base pairs</i> )
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CH	cortes histológicos
CIMA	Centro de Investigações Marinas
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
DNA	ácido desoxirribonucléico ( <i>deoxyribonucleic acid</i> )
DNAzol®	reagente para extração de DNA
EDTA	ácido etileno diamino tretra-acético
FSSW	água do mar filtrada e esterilizada ( <i>filtered sterilized Seawater</i> )
FUNCEME	Fundação Cearense de Meteorologia e Recursos Hídricos
GenBank	banco de dados de sequências gênicas
HE	hematoxilina e eosina
<i>Hinf</i> I	enzima de restrição
ITS	espaçador interno transcrito ( <i>interno transcribed spacer</i> )
MegaBace	sequenciador de DNA
MgCl <sub>2</sub>	cloreto de magnésio
NCBI	Centro Nacional para Informações <i>Bioteconológicas</i> ( <i>National Center for Biotechnology Information</i> )
OIE	Organização Mundial para Saúde Animal ( <i>Office International des Epizooties</i> )
PCR	reação em cadeia da polimerase ( <i>polymerase chain reaction</i> )
Perk	abreviatura para gênero <i>Perkinsus</i>
PerkITS	espaçador interno transcrito do gênero <i>Perkinsus</i>
PNSAA	Programa Nacional de Sanidade de Animais Aquáticos
RFLP	Polimorfismo de fragmentos de restrição ( <i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i> )
RFTM	meio líquido de tioglicolato de Ray ( <i>Ray's fluid thioglycollate medium</i> )
RIB	Ribeirão da Ilha
rRNA	ácido ribonucléico ribossômico ( <i>ribosomal ribonucleic acid</i> )



<i>RsaI</i>	enzima de restrição
SAM	Sambaqui
TA	título aglutinante
TAE	tampão Tris-Ácido acético - EDTA
Tris	Tris-hidroxi-metil-amino-metano
VGH	Hipertrofia Gametocítica Viral ( <i>Viral gametocytic hypertrophy</i> ).

## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO I – Introdução Geral</b> .....	21
1. Histórico e Identificação do problema .....	21
1.1. Vírus.....	22
1.2. Bactérias.....	22
1.3. Fungos.....	23
1.4. Protozoários .....	24
1.5. Metazoários.....	26
1.6. Enfermidades de declaração obrigatória à OIE.....	27
1.7. Conhecimento sobre a Perkinsiose.....	28
1.7.1. Aspectos da sitomatologia em animais infectados por <i>Perkinsus</i> .....	29
1.7.2. Transmissão e ciclo de vida de <i>Perkinsus</i> spp. ....	30
2. Justificativa .....	31
3. Objetivos .....	33
3.1. Objetivo geral.....	33
3.2. Objetivos específicos .....	33
 <b>CAPÍTULO II. Estudo patológico de ostras <i>Crassostrea gigas</i> de cultivo e <i>C. rhizophorae</i> de estoque natural da Ilha de Santa Catarina, SC, Brasil.</b> .....	34
Resumo .....	36
1. Introdução .....	37
2. Materiais e Métodos.....	39
2.1. Amostragens das ostras .....	39
2.2. Incubação de tecidos em meio líquido de tioglicolato .....	40
2.3 Preparações histológicas.....	40
3 Resultados.....	40
3.1. Biometria.....	40
3.2. Análises macroscópicas .....	41
3.3. Incubação de tecidos em meio líquido de tioglicolato .....	41
3.4. Análises histopatológicas.....	41
3.4.1. Hipertrofia dos gametas.....	42
3.4.2. Bactérias do tipo rickettsia .....	42
3.4.3. Protozoários.....	42
3.4.4. Metazoários.....	45
4. Discussão .....	48
5. Agradecimentos .....	53
6. Referências.....	54

<b>CAPÍTULO III. Primeiro registro de <i>Perkinsus</i> sp. infectando a ostra de mangue <i>Crassostrea rhizophorae</i> da costa brasileira. ....</b>	<b>60</b>
Resumo.....	62
Introdução .....	63
Materiais e Métodos .....	65
<i>Amostragem</i> .....	65
<i>Análise histológica</i> .....	66
<i>Detecção de <u>Perkinsus</u> por ensaios de RFTM</i> .....	67
<i>Zoosporulação in vitro</i> .....	67
<i>Extração de DNA e ensaios de PCR</i> .....	67
<i>Ensaio de PCR-RFLP</i> .....	68
<i>Clonagem molecular, sequenciamento de DNA e análises filogenéticas</i> .....	69
Resultados .....	70
<i>Diagnóstico de <u>Perkinsus</u> por ensaios RFTM</i> .....	70
<i>Análise histológica</i> .....	72
<i>Zoosporulação do parasita</i> .....	72
<i>Detecção de <u>Perkinsus</u> por PCR</i> .....	74
<i>Ensaio de PCR-RFLP</i> .....	74
<i>Análise filogenética da região ITS do rDNA</i> .....	75
Discussão.....	77
Agradecimentos .....	80
Referências .....	81

<b>CAPÍTULO IV. Estudo patológico da ostra de mangue <i>Crassostrea rhizophorae</i> no Estuário do Rio Pacoti, CE, Brasil. ....</b>	<b>86</b>
Resumo.....	88
1. Introdução .....	89
2. Materiais e Métodos .....	90
2.1. <i>Amostragens das ostras</i> .....	90
2.2. <i>Incubação de tecidos em meio líquido de tioglicolato</i> .....	92
2.3. <i>Preparações histológicas</i> .....	92
2.4. <i>Diagnóstico de <u>Perkinsus</u> por Reação em Cadeia da Polimerase-PCR</i> .....	93
3. Resultados .....	93
3.1. <i>Biometria</i> .....	93
3.2. <i>Análises macroscópicas</i> .....	94
3.3. <i>Incubação de tecidos em meio líquido de tioglicolato</i> .....	94
3.4. <i>Análises histopatológicas</i> .....	95
3.4.1. <i>Protozoários</i> .....	95
3.4.2. <i>Metazoários</i> .....	98

3.5. Diagnóstico de <i>Perkinsus</i> por PCR.....	98
4. Discussão .....	101
5. Agradecimentos .....	107
6. Referências.....	107
<b>CAPÍTULO V</b> .....	114
Considerações finais .....	114
Sugestões .....	115
Referências Bibliográficas da Introdução geral .....	116

## Capítulo I. Introdução Geral

### 1. Histórico e identificação do problema

No Brasil, a prática de cultivo de moluscos é recente quando comparada a outros países. Somente na década de 70 é que as pesquisas na área de cultivo de moluscos se iniciaram em diversas partes do país. Atualmente, no Brasil os moluscos mais cultivados são o mexilhão *Perna perna* (Bivalvia: Mytilidae), a ostra japonesa *Crassostrea gigas* e a vieira *Nodipecten nodosus* (Bivalvia: Pectinidae), sendo o Estado de Santa Catarina responsável por 95% da produção nacional, com uma produção total de 12.462 toneladas comercializadas em 2009 (dos SANTOS et al., 2010).

A ostra japonesa *C. gigas* foi introduzida no Brasil em 1974 através do Instituto de Pesquisas da Marinha em Cabo Frio – RJ e posteriormente (1987) no Estado de Santa Catarina, sendo atualmente considerada um recurso de grande importância socioeconômica para o Estado. Já a ostra nativa *Crassostrea rhizophorae* é cultivada em pequena escala em algumas regiões brasileiras, incluindo o nordeste. Por ser uma ostra que habita regiões estuarinas, incluindo os manguezais, apresenta um grande potencial para expansão da produção.

É importante ressaltar, que apesar da aquicultura apresentar grande importância socioeconômica em muitos países, incluindo o Brasil, essa atividade ao longo dos anos é também responsável pelo transporte de espécies entre e dentro dos países, aumentando o risco de introdução de enfermidades e conseqüentemente, a redução das populações de moluscos cultivadas bem como trazendo riscos de contaminação das espécies silvestres (MAGALHÃES e FERREIRA, 2006).

Desde o final dos anos 70 o cultivo de moluscos no mundo é afetado por várias epizootias, sendo a transferência de moluscos vivos a principal causa para o surgimento das enfermidades (BERTHE, 2001). O mesmo fato foi notificado pela Organização Mundial para Saúde Animal quando relatou que as enfermidades são responsáveis por severos impactos no desenvolvimento socioeconômico em muitos países, por causa do transporte de moluscos contaminados para áreas livres de patógenos (OIE, 2006).

Apesar do grande risco que os patógenos representam para as populações de moluscos dos estoques naturais e cultivados, o estudo de enfermidades em moluscos marinhos no Brasil é escasso e recente quando comparado a outras partes do mundo, onde as pesquisas na área

de patologia de moluscos explorados comercialmente vêm de longa data (BOWER; MCGLADDERY; PRICE, 1994). Portanto, é necessário o desenvolvimento de programas de monitoramento de doenças para um melhor conhecimento dos patógenos que afetam as populações de moluscos bivalves, visando à tomada de medidas de controle sanitário adequadas para evitar surtos de enfermidades.

A seguir são descritos alguns patógenos de moluscos registrados no mundo e no Brasil.

### **1.1. Vírus**

Vírus pertencentes a diferentes famílias têm causado doenças e até mortalidades em diferentes bivalves em todo o mundo. Os mais importantes são os pertencentes às famílias Iridoviridae, Herpesviridae, Papovaviridae, Togaviridae, Retroviridae, Birnaviridae, Reoviridae e Picornaviridae (RENAULT e NOVOA, 2004). Ainda, os vírus das famílias Papillomaviridae e Polyomaviridae afetam os moluscos bivalves causando a enfermidade conhecida como Hipertrofia Gametocítica Viral (VGH, *Viral gametocytic hypertrophy*) (BOWER et al. 1994). O primeiro relato de VGH foi realizado por Farley (1976) em ostras *Crassostrea virginica* coletadas em 1973 nos Estados Unidos e sabe-se que atualmente esta enfermidade afeta ostras *Crassostrea gigas* e *C. rhizophorae* (BOWER et al. 1994). Além das ostras, a VGH foi detectada em vários moluscos bivalves de vários países (CHOI et al. 2004; WINSTEAD et al. 2004; GARCIA et al. 2006; MEYERS et al. 2009), e seu principal efeito é a hipertrofia dos gametas do hospedeiro (BOWER et al. 1994). No Brasil, a hipertrofia gametocítica viral foi detectada com prevalência média de até 4% em *C. gigas* de Santa Catarina (PONTINHA, 2009).

### **1.2. Bactérias**

As bactérias do tipo rickettsia e clamídias são parasitas intracelulares obrigatórios que infectam as células epiteliais das brânquias e glândula digestiva de uma ampla variedade de moluscos bivalves, geralmente em baixa intensidade e não estão associadas com doenças (BOWER; MCGLADDERY; PRICE, 1994). No entanto, quando em elevadas intensidades de infecção foram associadas a episódios de mortalidade em moluscos do Estado de Rhode Island (EUA) e da Galícia (Espanha) (GULKA; CHANG; MARTI, 1983; VILLALBA et al., 1999).

Na década de 90 um fenômeno conhecido em outros países como Mortalidade em Massa de Verão (MMV) da ostra *Crassostrea gigas* ocorreu pela primeira vez na Ilha de Santa Catarina, SC e causou mortalidades de 89,5%. A MMV foi associada às altas temperaturas da água do mar, assim como ao estresse pós-desova e talvez à presença de bactérias pertencentes ao gênero *Nocardia* (SILVEIRA Jr., 1997; POLI, 2004). No entanto, a maior parte dos estudos realizados a este respeito não permitiu relacionar a MMV a nenhum patógeno específico, sendo principalmente a reprodução um dos fatores chave para o desencadeamento da suscetibilidade à MMV (SAMAIN et al., 2007).

Recentemente, bactérias do tipo rickettsia foram observadas nas ostras japonesas *C. gigas* de cultivos comerciais em Florianópolis (PONTINHA, 2009) e posteriormente em *Crassostrea rhizophorae* de costão e *C. gigas* de cultivo em Florianópolis (da SILVA et al., 2010), porém sem causar enfermidade. Estas bactérias foram registradas também em outros moluscos bivalves, como no berbigão *Anomalocardia brasiliiana* (Bivalvia: Veneridae) do Estuário do Rio Pacoti, no Estado do Ceará (FERREIRA et al., 2008a); e, recentemente, no mexilhão *Mytella guyanensis* (Bivalvia: Mytilidae) do Estuário do Rio Cachoeira, Ilhéus, BA (BOEHS et al., 2010). Em nenhum destes casos houve danos graves ao hospedeiro.

### 1.3. Fungos

Uma das espécies de fungo que afeta os bivalves marinhos refere-se à espécie *Ostracoblabe implexa*. Na França, a enfermidade causada por esse fungo é conhecida por doença da concha, do pé ou da charneira e foi relatada na ostra plana *Ostrea edulis* no oeste da Europa (LAUCKNER, 1983), sendo inclusive responsável por mortalidades massivas desta espécie na França, Holanda e Inglaterra (FIGUERAS e VILLALBA, 1988). A doença da concha foi documentada para várias espécies de moluscos e recentemente foi também descrita em *C. gigas* cultivada no Mar Negro (PIRKOVA e DEMENKO, 2008).

No Brasil, a enfermidade do pé foi observada pela primeira vez no ano 2000 em *C. gigas* cultivada na Ilha de Santa Catarina (Silveira Jr. et al., 2000). Posteriormente, um fungo com características semelhantes às pertencentes ao gênero *Ostracoblabe* foi registrado formando nódulos de conchiolina na região de inserção do músculo adutor e dificultando o fechamento das valvas de *C. rhizophorae* e *C. gigas*, ambas provenientes de cultivos comerciais na Praia da Ponta do Sambaqui, na Ilha de Santa Catarina (SABRY e MAGALHÃES, 2005). A presença

desse fungo nas ostras tem ocorrido com baixa prevalência e até o presente estudo a espécie que infecta as ostras da região sul país ainda não foi identificada.

#### 1.4. Protozoários

Os protozoários estão entre os mais importantes patógenos de moluscos (LAUCKNER, 1983; vide edição *Aquatic Living Resources*, 2004), principalmente os considerados de declaração obrigatória pela Organização Mundial para Saúde Animal – OIE, os quais têm causado grandes prejuízos econômicos em diversos países. Até o presente momento não há relato desse tipo de ocorrência no Brasil.

*Nematopsis* sp. (Apicomplexa: Eugregarinida) infecta os bivalves marinhos, utilizando-os como hospedeiros intermediários (AZEVEDO e CACHOLA, 1992; CARBALLAL et al., 2001). Na maioria dos casos de infecção por *Nematopsis* não são observados danos significativos no hospedeiro (BOWER; MCGLADDERY; PRICE, 1994; WINSTEAD; VOLETY; TOLLEY, 2004). No entanto, na década de 90 estes patógenos foram associados a mortalidades do bivalve *Cerastoderma edule* (Bivalvia: Cardiidae) em Portugal (AZEVEDO e CACHOLA, 1992).

No Brasil, *Nematopsis* sp. foi registrado em vários moluscos bivalves de diferentes regiões. Em ostras, *Nematopsis* sp. foi detectado em *Crassostrea rhizophorae* dos estoques naturais de alguns estuários sendo eles: Jacuruna, BA (NASCIMENTO et al., 1986); Rio Jaguaribe, CE (SABRY; GESTEIRA; BOEHS, 2007); Rio Cachoeira, BA (BOEHS; LENZ; VILLALBA, 2008); Rio Pacoti, CE (ROMÃO et al., 2010) e recentemente em *C. rhizophorae* de costões localizados nas Baías Norte e Sul da Ilha de Santa Catarina (da SILVA et al., 2010). Em ambientes de cultivos, *Nematopsis* sp. foi identificado em ostras *C. rhizophorae* e em *C. gigas* nessa última região (SABRY e MAGALHÃES, 2005).

Em mexilhões, *Nematopsis mytella* foi detectado no marisco-do-mange *Mytella guyanensis* de ambiente natural no Amazonas (AZEVEDO e MATOS, 1999). *Nematopsis* sp. também foi observado infectando *Perna perna* proveniente de cultivo no Rio de Janeiro, RJ (LIMA; ABREU; MESQUITA, 2001); em *Mytella falcata* do Estuário do Rio Jaguaribe, CE (SABRY et al., 2006); *M. guyanensis* do Estuário do Rio Cachoeira, BA (PINTO e BOEHS, 2008) e também em *P. perna* cultivada em Serraria, SC (da SILVA et al., 2010).



Vale ressaltar, que também existem registros de *Nematopsis* sp. em *Anomalocardia brasiliana* (Bivalvia: Veneridae) de SC (MAGALHÃES; MATOS; AZEVEDO, 2002); *Tagelus plebeius* (Bivalvia: Psammobiidae) (SANTOS, BOEHS; CEUTA, 2007) e recentemente em *A. brasiliana* da região estuarina do Rio Cachoeira, BA (BOEHS et al., 2010). Apesar de na maioria das vezes *Nematopsis* ter sido detectado em elevadas prevalências, a intensidade de infecção nos tecidos dos bivalves é geralmente baixa. Ainda, em nenhum dos estudos, realizados no Brasil, os autores fizeram menção a mortalidades associadas a presença desse patógeno. No entanto, nos palpos labiais de alguns exemplares de *Mytella guyanensis* da BA, altamente infectados com *Nematopsis* foi observada a destruição do tecido conjuntivo (CEUTA, 2010).

Outros protozoários também foram observados em moluscos da costa brasileira, entre eles: *Trichodina* sp. (Ciliophora: Trichodinidae), *Ancistrocoma* sp. (Ciliophora: Ancistrocomidae), *Sphenophrya* sp. (Ciliophora: Sphenophryidae) e *Steinhausia* sp. (Microspora).

*Trichodina* quando em elevada intensidade de infecção causa lesões nas brânquias dos moluscos e pode interferir no funcionamento normal desse órgão (LAUCKNER, 1983; FIGUERAS e VILLALBA, 1988). *Trichodina* sp. foi detectado em ostras *Crassostrea gigas* de cultivo em SC (SABRY e MAGALHÃES, 2005; PONTINHA, 2009; da SILVA et al., 2010) e em *Crassostrea rhizophorae* de estoque natural da Baía de Camamu, BA (BOEHS, LENZ; VILLALBA, 2008). Em venerídeos, *Trichodina* sp. foi observado em *A. brasiliana* de estoques naturais (BOEHS e MAGALHÃES, 2004; da SILVA et al., 2010). Em todos os casos de parasitismo por tricodinídeos, a intensidade de infecção foi considerada baixa e não causou danos aos hospedeiros.

Os ciliados dos gêneros *Sphenophrya* e *Ancistrocoma* podem ocorrer em vários bivalves marinhos, incluindo várias espécies de ostras, sem causar mortalidade (LAUCKNER, 1983; BOWER; MCGLADDERY; PRICE, 1994; WINSTEAD; VOLETY; TOLLEY, 2004). No entanto, em ostras, a hipertrofia das células e do seu núcleo, pode formar tumores denominados xenomas (BOWER; MCGLADDERY; PRICE, 1994). *Sphenophrya* sp. foi registrado em *Crassostrea rhizophorae* da Baía de Todos os Santos, BA (NASCIMENTO et al., 1986) e posteriormente em *C. gigas* cultivada em Santa Catarina (PONTINHA, 2009) sem causar nenhum efeito sobre o hospedeiro. Em *C. rhizophorae* da Baía de Camamu, BA, este ciliado causou a formação de xenomas no epitélio das brânquias. Contudo, não resultou em mortalidade dos animais (BOEHS; LENZ; VILLALBA,

2009). *Ancistrocoma* sp. foi detectado em *Crassostrea rhizophorae* (NASCIMENTO et al., 1986) e recentemente em *Crassostrea gigas* cultivada em SC (PONTINHA, 2009).

Protozoários do gênero *Steinhausia* infectam o citoplasma dos ovócitos dos moluscos promovendo uma resposta de defesa do hospedeiro evidenciada por uma forte infiltração de hemócitos (BOWER; MCGLADDERY; PRICE, 1994; GREEN et al., 2008). No Brasil, este patógeno já foi observado em *Mytella guyanensis* do Estuário do Rio Amazonas (MATOS; MATOS; AZEVEDO, 2005) e em *C. gigas* (PONTINHA, 2009), *Anomalocardia brasiliana* (da SILVA et al., 2010) e no mexilhão *Brachidontes solisianus* de SC (PONTINHA et al., 2010). Todos os relatos desse patógeno até o momento não citam danos ao processo de gametogênese nos moluscos infectados.

## 1.5. Metazoários

Entre os metazoários, o trematódeo digenético do gênero *Bucephalus* (Digenea: Bucephalidae) utiliza os moluscos como hospedeiro intermediário e os peixes como hospedeiro intermediário e definitivo (CHENG, 1978). Nos mitilídeos, a enfermidade causada por *Bucephalus* é conhecida como bucefalose ou “doença laranja”, pois confere coloração laranja ao manto e aos tecidos infestados (UMIJI; LUNETTA; LEONEL, 1976). Este parasita quando se instala na gônada do molusco pode causar danos significativos, levando a castração do hospedeiro (LAUCKNER, 1983; MAGALHÃES, 1998).

O parasitismo por *Bucephalus* sp. já foi observado em mexilhões, berbigões e raramente em ostras de diferentes regiões do país. O trematódeo *Bucephalus* sp. foi detectado no mexilhão *Perna perna* cultivado no Rio de Janeiro, RJ (LIMA; ABREU; MESQUITA, 2001), em SC (SILVA; MAGALHÃES; BARRACCO, 2002; da COSTA, 2007; LEITE, 2007; COCHÔA e MAGALHÃES, 2008; FERREIRA et al., 2008b); na Baía de Santos e na Praia do Guarau, SP (GALVÃO et al., 2006), em *M. guyanensis* no Estuário do Rio Cachoeira, BA (BOEHS et al., 2010) e Baía de Camamu, BA (CEUTA, 2010). É importante ressaltar que a espécie de bucefalídeo que infesta os mexilhões em Santa Catarina foi recentemente identificada como sendo *Bucephalus margaritae* (MARCHIORI; MAGALHÃES; PEREIRA Jr., 2010). Em berbigões *A. brasiliana*, trematódeos bucefalídeos foram registrados nos estuários do Rio Jaguaribe e Rio Pacoti, CE (ARAÚJO e ROCHA-BARREIRA, 2004; FERREIRA et al., 2008a) e no Estuário do Rio Cachoeira, BA (BOEHS et al., 2010) e em ostras nativas

*Crassostrea rhizophorae* do Estuário do Rio Jacuruna, BA (NASCIMENTO et al., 1986) e Baía de Camamu, BA (BOEHS; LENZ; VILLALBA, 2008) e também do estuário do Rio Pacoti (ROMÃO et al., 2010).

Metazoários do gênero *Tylocephalum* (Cestoda: Lecanicephalidea) parasitam bivalves marinhos, incluindo ostras em várias partes do mundo, principalmente as pertencentes ao gênero *Crassostrea* e as ostras perlíferas (LAUCKNER, 1983). A infestação por esse metazoário é acompanhada por infiltração de hemócitos e encapsulamento do parasita (SINDERMAN, 1970; LAUCKNER, 1983). Larvas de *Tylocephalum* foram registradas em *Crassostrea gigas* e *C. rhizophorae* cultivadas em Santa Catarina (SABRY e MAGALHÃES, 2005); *C. rhizophorae* dos estuários dos Rios Jaguaribe (SABRY; GESTEIRA; BOEHS, 2007) e Pacoti, CE (ROMÃO et al., 2010); em mexilhões *Mytella guyanensis* da Baía de Camamu (CEUTA, 2010) e *Perna perna* cultivada em Serraria, SC (da SILVA et al., 2010). *Tylocephalum* também foi registrado em *Anomalocardia brasiliana* de SC (BOEHS e MAGALHÃES, 2004) e do Estuário do Rio Cachoeira, BA (BOEHS et al., 2010).

É importante ressaltar que nenhum dos patógenos acima citados é de declaração obrigatória à Organização Mundial para Saúde Animal (OIE) e que no Brasil até o presente momento não foram associados a mortalidades nos moluscos estudados.

## **1.6. Enfermidades de declaração obrigatória à OIE**

A Organização Mundial para Saúde Animal – OIE em seu código que trata da saúde para animais aquáticos, lista como patógenos de declaração obrigatória de moluscos os seguintes protozoários: Filo Haplosporidia: *Bonamia ostreae* e *B. exitiosa*; Filo Paramyxia: *Marteilia refringens*; Filo Perkinsozoa: *Perkinsus marinus* e *P. olseni*; além da bactéria *Xenohalotus californiensis* e do vírus de tipo Herpes que infecta abalones.

Entre os protozoários, os pertencentes ao gênero *Perkinsus* ocorrem em diversos moluscos, entre eles gastrópodes (abalones) e principalmente bivalves, levando muitas vezes a mortalidades massivas gerando grandes perdas econômicas (VILLALBA et al., 2004; CHOI e PARK, 2010). Um dos exemplos principais é o *Perkinsus marinus*, que afeta a ostra americana *Crassostrea virginica* desde 1940 (KAROLUS et al., 2000).

No Brasil até o presente momento o único trabalho que foi realizado utilizando técnicas confirmatórias para detecção de *Perkinsus* em ostras foi feito por Nascimento et al. (1986). Os autores não encontraram *Perkinsus* em ostras *Crassostrea rhizophorae* da região da Baía de Todos os Santos, Bahia. Desta forma, os esforços para realização do presente estudo foram voltados para a investigação da ocorrência de *Perkinsus* levando-se em consideração os riscos que este protozoário representa para as populações de moluscos de ambientes naturais e cultivados.

## 1.7. Conhecimento sobre a Perkinsiose

A Perkinsiose, doença causada por representantes do protozoário do gênero *Perkinsus* foi identificada pela primeira vez em populações de ostras *Crassostrea virginica* na Louisiana, costa atlântica dos Estados Unidos em 1940. Primeiramente se pensava que era um fungo e foi denominado de *Dermocystidium marinum*, por isso essa doença é também conhecida como Dermo (MACKIN; OWEN; COLLIER, 1950) e posteriormente o protozoário foi descrito como *Perkinsus marinus* por Levine em 1987.

Atualmente existem sete espécies descritas pertencentes ao gênero *Perkinsus*, sendo elas: *P. marinus*, que infecta a ostra americana *C. virginica*; *P. olseni* (= *P. atlanticus*) que infecta várias espécies de moluscos; *P. qugwadi* que infecta a vieira *Patinopecten yessoensis*; *P. chesapeakei* (= *andrewsi*) que infecta o berbigão *Mya arenaria* e outros bivalves; *P. mediterraneus* que infecta a ostra plana *Ostrea edulis* (VILLALBA et al., 2004); *P. honshuensis* que infecta o berbigão *Ruditapes philippinarum* no Japão (DUNGAN e REECE, 2006) e *Perkinsus beihaiensis*, que infecta as ostras *Crassostrea hongkongensis* e *Crassostrea ariakensis* do sul da China (MOSS et al., 2008). Entre essas espécies de *Perkinsus*, somente *P. marinus* e *P. olseni* são de declaração obrigatória pela Organização Mundial para Saúde Animal (OIE).

O protozoário *Perkinsus marinus* é encontrado na Baía de Delaware, Baía de Chesapeake e Golfo do México (OIE, 2009). Em ostras, *P. marinus* tem como hospedeiros: *C. virginica*, *C. ariakensis* e *Crassostrea gigas* (BOWER; MCGLADDERY; PRICE, 1994; BERTHE, 2001; VILLALBA et al., 2004; OIE, 2009). Este protozoário foi responsável por significativas mortalidades em populações de ostras cultivadas em Massachusetts, EUA, durante os meses de verão (SMOLOWITZ e FORD, 1998). Dittman et al. (2001), relataram que

este patógeno foi responsável por grandes mortalidades e que possivelmente pode também causar efeitos subletais, afetando o crescimento e a reprodução do hospedeiro. *Perkinsus marinus* foi também registrada no bivalve *Mercenaria mercenaria* na Flórida, com prevalência de 47 a 50% (MCCOY, 2005). Bushek et al. (2002) observaram que *Crassostrea rhizophorae* do Caribe é suscetível a *Perkinsus marinus*. Posteriormente, *P. marinus* foi detectada infectando a ostra *Crassostrea virginica* no Golfo do México (GULLIAN-KLANIAN et al., 2008).

*Perkinsus olseni* ocorre na Austrália, Nova Zelândia, Coreia, Japão, Kuwait, Portugal, Espanha, França, Itália e Uruguai (BOWER; MCGLADDERY; PRICE, 1994) e possui um grande espectro de moluscos hospedeiros (VILLALBA et al., 2004; OIE, 2009).

O primeiro registro de *P. olseni* foi no abalone *Haliotis rubra* (LESTER e DAVIS, 1981). Posteriormente, foram detectadas mortalidades em *Haliotis laevigata*, também na Austrália (ROBLEDO; COSS; VASTA, 2000), no venerídeo *Ruditapes decussatus* em Portugal (AZEVEDO, 1989) e em *Ruditapes philippinarum* na Coreia do Sul (OIE, 2006). A partir daí, *P. olseni* foi detectada em diversas espécies de moluscos bivalves, entre elas: *Pitar rostrata* do Uruguai (CREMONTE; BALSEIRO; FIGUERAS, 2005); no bivalve *R. philippinarum* da Itália (ABOLLO et al., 2006); no berbigão *Protothaca jedoensis* da Coreia do Sul (PARK et al., 2006); *Austrovenus stutchburyi* da Nova Zelândia (DUNGAN et al., 2007) e em *Tridacna crocea* do Vietnã (SHEPPARD e PHILLIPS, 2008). Mais recentemente, *P. olseni* foi registrada infectando *R. decussatus* em águas do Mediterrâneo espanhol (ELANDALOUSSI et al., 2009).

O fato de *P. olseni* ter sido identificada em *P. rostrata* do Uruguai contribuiu para incentivar a realização desse estudo sobre a ocorrência de *Perkinsus* sp. nos bivalves da costa brasileira, tendo em vista que esta espécie de molusco também ocorre no Brasil tendo sua distribuição geográfica do Rio de Janeiro até o Rio Grande do Sul (RIOS, 1994).

### **1.7.1. Aspectos da sintomatologia em animais infectados por *Perkinsus*.**

Alguns dos sinais da infecção por *Perkinsus marinus* na ostra *Crassostrea virginica* são aparência pálida da glândula digestiva, retração do manto, além do retardo no desenvolvimento das gônadas,

abertura da concha (*gaping*) e redução do índice de condição (BERTHE, 2001; BOWER; MCGLADDERY; PRICE, 1994).

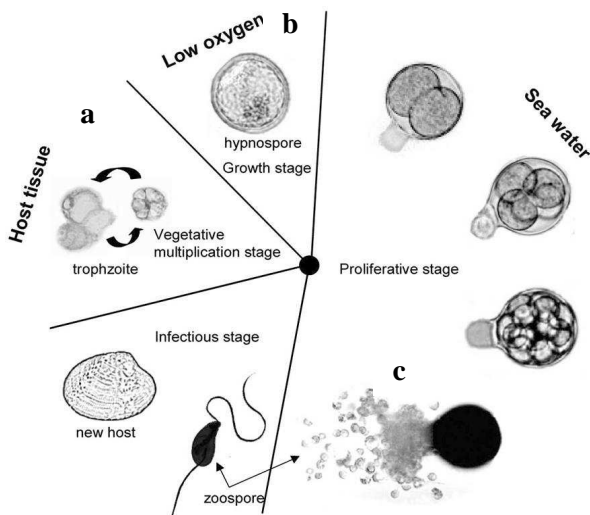
Já com respeito a *Perkinsus olseni*, infecção avançada pode causar a formação de pústulas nas brânquias de *Ruditapes decussatus* e *R. philippinarum* (AZEVEDO, 1989) as quais nos abalones *Haliotis rubra* e *H. laevigata* podem chegar a mais de 8 mm de diâmetro, ocorrendo no pé e manto, reduzindo seu valor de mercado (BOWER; MCGLADDERY; PRICE, 1994). *Perkinsus olseni* causa nestes últimos a destruição do tecido conjuntivo e das células epiteliais dos túbulos digestivos.

Através das análises histopatológicas, os trofozoítos de *Perkinsus* podem ser observados no tecido conjuntivo de vários órgãos (BOWER; MCGLADDERY; PRICE, 1994). Os trofozoítos apresentam morfologia típica circular com um vacúolo excêntrico ocupando uma grande área do citoplasma e um núcleo excêntrico com um nucléolo proeminente (VILLALBA et al., 2004).

### 1.7.2. Transmissão e ciclo de vida de *Perkinsus* spp.

O ciclo de vida do gênero *Perkinsus* inclui três formas do parasito: trofozoítos, hipnósporos e zoósporos. Os trofozoítos são células esféricas contendo um grande vacúolo que ocupa mais da metade do volume da célula e ocorrem intracelularmente no tecido conjuntivo e epitélios do hospedeiro. Os trofozoítos quando maduros passam por sucessivas divisões binárias (palintomia) envolvendo ciclos de cariocinese e citocinese resultando na formação de 2, 4 a 32 células dentro do envoltório celular original, com aspecto de roseta (VILLALBA et al., 2004) (Fig. 1A). Sua proliferação está associada, em alguns casos, às altas temperaturas de verão (maiores que 20°C) (BOWER; MCGLADDERY; PRICE, 1994). Quando os trofozoítos são incubados em meio líquido de tioglicolato, aumentam de tamanho, desenvolvem uma parede espessa e inicia-se uma nova fase conhecida por hipnósporo (RAY, 1952) (Fig. 1B). Quando os hipnósporos produzidos são transferidos para a água do mar, inicia-se a esporulação onde ocorrem sucessivas cariocineses e citocineses formando-se inúmeros zoósporos dentro da célula original (PERKINS, 1996) (Figura 1C). Os zoósporos elipsoidais biflagelados deixam o zoosporângio através de um tubo de descarga o qual aparece sobre cada hipnósporo antes de qualquer divisão celular ter ocorrido (AZEVEDO, 1989). De acordo com Perkins (1996), os hipnósporos são precursores dos zoosporângios e, portanto, têm sido referidos como pré-zoosporângios.

O mecanismo de transmissão do patógeno é direto, de hospedeiro para hospedeiro e todos os estágios de vida são infectivos (VILLALBA et al., 2004; OIE, 2009).



**Figura 1.** Ciclo de vida de *Perkinsus olseni* parasitando o bivalve *Ruditapes philippinarum*. **Fig. 1a.** Trofozoítos no tecido do hospedeiro. **Fig. 1b.** Hipnósporo após incubação em meio de tioglicolato. **Fig. 1c.** Zoósporo após transferência para água do mar filtrada (modificado de CHOI et al., 2010).

## 2. Justificativa

Nas últimas décadas, a aquicultura tem sido uma alternativa viável para suprir, em parte, a carência de alimentos. No entanto, ao longo de seu desenvolvimento, as atividades aquícolas, de um modo geral são afetadas por um grande número de epizootias, as quais têm trazido graves prejuízos econômicos em diversas partes do mundo (OIE, 2009).

Entre as práticas aquícolas, o cultivo de moluscos vem se intensificando e as enfermidades estão entre os fatores que podem causar mortalidades nas populações naturais e/ou cultivadas. Nos últimos anos, pesquisas relacionadas à patologia de bivalves da costa brasileira vêm sendo feitas principalmente devido ao crescimento dos cultivos e sua importância econômica (BOEHS e MAGALHÃES, 2004;

SABRY e MAGALHÃES, 2005; SABRY et al., 2007; SABRY et al., 2009; BOEHS et al., 2009 e 2010; da SILVA et al., 2009; SUÁREZ-MORALES et al., 2010).

No Brasil, a ostreicultura apesar de ser uma atividade relativamente nova apresenta aumento a cada ano. Contudo, as pesquisas sobre patologia de moluscos ainda são incipientes. Portanto, há a necessidade de investir em pesquisas nessa área, para conhecer os potenciais patógenos presentes na região que possam resultar em mortalidades em ambientes natural e de cultivo. Além disto, a falta de informações sobre patógenos nos moluscos pode inviabilizar a sua exportação e assim prejudicar o desenvolvimento da malacocultura brasileira. O monitoramento frequente da saúde dos moluscos, tanto em estoques naturais como em cultivos é primordial para a detecção de patógenos e também para a adoção de estratégias de controle das enfermidades.

Pelo fato de *Perkinsus* ser um gênero com dois representantes listados pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) um estudo focalizado neste protozoário torna-se fundamental. Também contribui o fato deste patógeno ter sido registrado no Golfo do México e no Uruguai.

O projeto proposto irá contribuir para o conhecimento de parasitoses ainda desconhecidas que podem afetar as populações de ostras do litoral brasileiro. Além disso, o diagnóstico de patógenos de declaração obrigatória em moluscos é importante para o setor produtivo, tendo em vista que a OIE classifica os moluscos livres de patógenos de declaração obrigatória, aptos para exportação para outras zonas de produção.

Pelo fato de não ter havido um monitoramento de ocorrência de *Perkinsus* nos moluscos da costa do Brasil, a realização de diagnósticos segundo padrões internacionais irá trazer real conhecimento sobre essa enfermidade em ostras do litoral brasileiro e irá auxiliar em tomada de medidas preventivas. Vale salientar que esse estudo permitirá a detecção de outros patógenos que venham a ocorrer nos animais estudados.



### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo geral**

Contribuir para o conhecimento das enfermidades que acometem as ostras *Crassostrea rhizophorae* e *C. gigas* da Ilha de Santa Catarina, SC e de *C. rhizophorae* do Estuário do Rio Pacoti, CE, com ênfase em *Perkinsus*.

#### **3.2. Objetivos específicos**

**3.2.1.** Investigar as patologias na ostra *Crassostrea gigas* de cultivo e de *C. rhizophorae* de estoque natural da Ilha de Santa Catarina – SC;

**3.2.2.** Investigar as patologias na ostra *Crassostrea rhizophorae* do Estuário do Rio Pacoti – CE;

**3.2.3.** Padronizar a técnica de RFTM para detecção do protozoário do gênero *Perkinsus* em ostras de Santa Catarina e Ceará.

**CAPÍTULO II – Estudo patológico de ostras *Crassostrea gigas* de cultivo e *C. rhizophorae* de estoque natural da Ilha de Santa Catarina, SC, Brasil.**

**O artigo será enviado para publicação no periódico Aquaculture, tendo sido redigido segundo as normas da referida revista científica.**

**Estudo patológico de ostras *Crassostrea gigas* de cultivo e *C. rhizophorae* de estoque natural da Ilha de Santa Catarina, SC, Brasil.**

Rachel Costa Sabry<sup>a\*</sup>, Patrícia Mirella da Silva<sup>b</sup>, Tereza Cristina Vasconcelos Gesteira<sup>a</sup>, Vitor de Almeida Pontinha<sup>c</sup>, Aimê Rachel Magenta Magalhães<sup>c</sup>.

<sup>a</sup>Instituto de Ciências do Mar, Universidade Federal do Ceará, Av. da Abolição, 3507, Meireles, CEP: 60165-081, Fortaleza, CE, Brasil. [rachelsabry@yahoo.com.br](mailto:rachelsabry@yahoo.com.br); [gesteira@ufc.br](mailto:gesteira@ufc.br)

<sup>b</sup>Universidade Federal da Paraíba, Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Departamento de Biologia Molecular, Cidade Universitária – Campus I. CEP, 58059-900, João Pessoa, PB, Brasil. [mirella\\_dasilva@hotmail.com](mailto:mirella_dasilva@hotmail.com)

<sup>c</sup>Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Aquicultura, Núcleo de Estudos em Patologia Aquícola, Rodovia Admar Gonzaga, 1346, Itacorubi, CEP 88040-900, Florianópolis, SC, Brasil. [rachel@cca.ufsc.br](mailto:rachel@cca.ufsc.br)

(\*) Autor para correspondência:

Rachel Costa Sabry. Universidade Federal do Ceará, Instituto de Ciências do Mar, Av. da Abolição, 3207, Meireles, CEP: 60165-081, Fortaleza, CE, Brasil. [rachelsabry@yahoo.com.br](mailto:rachelsabry@yahoo.com.br).  
Telefone: (55) (85) 3366 7009

## RESUMO

O presente trabalho faz um relato dos patógenos encontrados na ostra japonesa *Crassostrea gigas* cultivada e ostra-de-mangue *Crassostrea rhizophorae* de populações naturais de dois locais, Sambaqui (27°29'18" S, 48°32'1" W) e Ribeirão da Ilha (27°42'51" S, 48°34'6" W) da Ilha de Santa Catarina, Brasil. As ostras foram coletadas em março de 2008 e abril de 2009, sendo 150 por local, ano e condição (costão e cultivo). Para o estudo patológico, as técnicas utilizadas foram: exame macroscópico, histologia e o cultivo de tecidos em meio líquido tioglicolato específico para *Perkinsus*. Os resultados mostraram: a presença de poliqueta *Polydora* sp., com prevalências altas (até 100%) em *C. gigas*; hipertrofia gamética em *C. rhizophorae* do Ribeirão da Ilha e *C. gigas* do Sambaqui e Ribeirão da Ilha com prevalências baixas (3,3%); bactérias do tipo rickettsia, com maior prevalência em *C. gigas* (30%) do que em *C. rhizophorae* causando alteração no epitélio do estômago. Não foi detectada a presença de *Perkinsus* em nenhuma amostra de ostra analisada de nenhuma localidade. Ciliados do gênero *Trichodina* foram observados entre as lamelas branquiais, túbulos digestivos e aderidas às brânquias das ostras do Ribeirão da Ilha, com maior prevalência em *C. rhizophorae* (50%) e sem causar lesão. Protozoários do tipo *Sphenophrya* foram encontrados nas brânquias de *C. gigas* e *C. rhizophorae*, sendo a maior prevalência em *C. gigas* do Sambaqui (70%) não causando alterações nas brânquias. Protozoários do gênero *Ancistrocoma* foram detectados nos túbulos digestivos de *C. gigas* (36,7%) e em *C. rhizophorae* (40%) do Sambaqui, em baixa intensidade e sem causar danos aparentes. Microsporídeos do tipo *Steinhausia* foram observados no citoplasma dos ovócitos de *C. rhizophorae* e *C. gigas* com prevalências de até 33,3%. A intensidade de infecção nos animais foi baixa, com apenas uma ostra apresentando mais de 50 ovócitos infectados. Os esporocistos do patógeno causaram alteração na estrutura normal do citoplasma dos ovócitos. Protozoários do gênero *Nematopsis* foram observados no tecido conjuntivo das brânquias e manto com prevalências elevadas (até 100%) em *C. rhizophorae* do Sambaqui, sem resposta de defesa do hospedeiro. Os metazoários observados foram: turbelários do tipo *Urastoma*, metacéstóide do gênero *Tylocephalum* e copépode possivelmente do gênero *Pseudomiycola*, todos em baixa prevalência. Nenhuma das ocorrências patológicas encontradas parece causar danos significativos nas ostras, uma vez que foram encontrados em baixa intensidade. No entanto, pela grande importância socioeconômica que os moluscos representam para o Estado de Santa Catarina é preciso manter o monitoramento do estado de saúde destas populações.

Palavras chave: ostras, ostricultura, patógenos, histopatologia.

## 1. Introdução

O Estado de Santa Catarina é o maior produtor brasileiro de moluscos, contribuindo com 95% da produção nacional, sendo representado pelo cultivo do mexilhão *Perna perna* (Bivalvia: Mytilidae), a ostra japonesa *Crassostrea gigas* (Bivalvia: Ostreidae) e a vieira *Nodipecten nodosus* (Bivalvia: Pectinidae), que já está sendo cultivada comercialmente no Estado. No entanto, estudos sobre as doenças nesses bivalves ainda são escassos quando comparados a outras partes do mundo, onde as patologias de moluscos explorados comercialmente são bem conhecidas (Bower et al. 1994). Só nos últimos anos, as pesquisas sobre o estado de saúde de bivalves marinhos da costa brasileira vêm sendo intensificadas (da Silva et al. 2002; Boehs e Magalhães, 2004; Sabry e Magalhães, 2005; Sabry et al. 2007; Boehs et al. 2009, Suárez-Morales et al. 2010) devido principalmente à expansão dos cultivos.

A mortalidade em massa de verão da ostra japonesa (*C. gigas*) cultivada em Santa Catarina foi registrada pela primeira vez em dezembro de 1987. No verão de 89/90 a mortalidade de verão alcançou 89,5% (Silveira Jr., 1997). O fenômeno foi associado ao estresse causado pelo período reprodutivo, elevadas temperaturas da água e talvez a presença de bactérias do gênero *Nocardia* (Silveira Jr., 1997). As bactérias, assim como os vírus, quando em elevadas intensidades podem causar mortalidades em moluscos (Gulka et al. 1983; Villalba et al. 1999; Paillard et al. 2004; Renault e Novoa, 2004), mas não o fazem em baixas intensidades (Carballal et al. 2001; Cremonte et al. 2005).

Os Protozoários são importantes patógenos podendo causar mortalidade em várias espécies de moluscos em todo o mundo.

Com relação aos protozoários, *Nematopsis* spp. (Apicomplexa: Porosporidae) utilizam bivalves marinhos como hospedeiros intermediários (Azevedo e Cachola, 1992; Carballal et al. 2001) mas há controvérsias quanto a sua patogenicidade (Lauckner, 1983). *Nematopsis* sp. foi descrito em ostras *C. gigas* e *C. rhizophorae* cultivadas na Praia da Ponta do Sambaqui, Ilha de Santa Catarina (Brasil) (Sabry e Magalhães, 2005). *Trichodina* (Ciliophora: Trichodinidae) pode causar a destruição dos filamentos branquiais e comprometer o ganho de peso dos animais (Figueras e Villalba, 1988; Bower et al. 1994). *Trichodina* sp. foi observada em *C. rhizophorae* (Sabry e Magalhães, 2005) e em *Anomalocardia brasiliana* (Bivalvia: Veneridae) da Iha de Santa Catarina (Boehs e Magalhães, 2004), mas sem causar danos sérios aos hospedeiros. Recentemente, para ostras

dessa região foram registrados os protozoários dos gêneros *Sphenophrya*, *Ancistrocoma* (Ciliophora) e *Steinhausia* (Microspora) (Pontinha, 2009; da Silva et al. 2010). *Sphenophrya* pode causar hipertrofia celular no hospedeiro e formar tumores denominados xenomas (Winstead et al. 2004; Boehs et al. 2009). Porém, não há registros de mortalidade associada à infecção por este patógeno (Lauckner, 1983; Bower et al. 1994; Winstead et al. 2004). Infecção por *Ancistrocoma* também não tem sido associada a patologias (Bower et al. 1994). No caso de parasitismo por *Steinhausia* (microsporídio que infecta o citoplasma dos ovócitos), é observada reação imunológica ou inflamatória pelo hospedeiro, caracterizada pela intensa infiltração de hemócitos (Green et al. 2008). *Steinhausia* já foi detectado em populações de *Cerastoderma edule* (Bivalvia: Cardiidae) da costa da Galícia, Espanha sem causar danos patológicos significativos nos animais infectados (Carballal et al. 2001).

Metazoários do gênero *Tylocephalum* (Cestoda: Tetragonocephalidae) foram observados em baixas prevalências e intensidades de infestação em *Crassostrea gigas* (Sabry e Magalhães, 2005) e em *Anomalocardia brasiliana* da Ilha de Santa Catarina (Boehs e Magalhães, 2004). O turbelário *Urastoma cyprinae* foi registrado em mexilhões *Mytilus galloprovincialis* do Mar Negro (Murina e Solonchenko, 1991) e da Espanha (Robledo et al. 1994) e em *Mytilus edulis* de Portugal (dos Santos e Coimbra, 1995) causando severas alterações nas brânquias; Poliquetas do gênero *Polydora* (Polychaeta: Spionidae) são comumente encontrados na ostra japonesa *C. gigas* (Ibbotson, 2002; Sabry e Magalhães, 2005; Pontinha, 2009; da Silva et al. 2010) cultivada e em outros bivalves como o mexilhão *Perna perna* (da Costa, 2007) e *Anomalocardia brasiliana* (Boehs e Magalhães, 2004) da Ilha de Santa Catarina. Entre os copépodes, *Pseudomyicola spinosus* (Copepoda: Myicolidae) é comumente encontrada em bivalves marinhos (Ho e Kim, 1991; Cáceres-Martínez et al. 2005) e quando em baixa prevalência e intensidade não causa patologias (Bower et al. 1994). No Brasil, análises histopatológicas no mexilhão *P. perna* cultivado em Santa Catarina, revelaram que a presença de cópepodes do gênero *Monstrilla* causou alterações na estrutura da borda do manto com intensa infiltração hemocitária (Suárez-Morales et al. 2010).

Nenhum dos patógenos acima relacionados é de declaração obrigatória à Organização Mundial para a Saúde Animal (OIE). Atualmente, segundo esta organização, os patógenos considerados de declaração obrigatória para moluscos são: protozoários Haplosporidia: *Bonamia ostreae* e *B. exitiosa*; Paramyxia: *Marteilia refringens*; Perkinsozoa:

*Perkinsus marinus* e *P. olseni*; a bactéria *Xenohaliotis californiensis* e o vírus de tipo Herpes que afeta abalones.

Considerando a importância socioeconômica dos bivalves para o Estado de Santa Catarina, o presente trabalho faz um relato dos patógenos encontrados na ostra *Crassostrea gigas* cultivada e na ostra-do-mange *C. rhizophorae* de costões próximos aos cultivos, na Ilha de Santa Catarina, SC.

## 2. Materiais e métodos

### 2.1. Amostragem das ostras

Exemplares da ostra-do-mange *Crassostrea rhizophorae* ( $N_{\text{total}} = 600$ ) e da ostra japonesa *C. gigas* ( $N_{\text{total}} = 600$ ) foram coletados em dois locais da Ilha de Santa Catarina: no Sambaqui (Baía Norte, 27°29'18"S – 48°32'12"W) e no Ribeirão da Ilha (Baía Sul, 27°42'51"S – 48°34'6"W). As coletas foram realizadas nos meses de março de 2008 e abril de 2009. Em cada mês foram coletadas 150 ostras de cada espécie e local.

As ostras *C. rhizophorae* foram retiradas do costão rochoso, localizado na zona intermareal, a 70 e 200 metros de distância dos cultivos de ostras *C. gigas* no Sambaqui e Ribeirão da Ilha, respectivamente. Os exemplares de *C. gigas* foram coletados de lanternas de cultivo penduradas em *long-lines* no Sambaqui, pertencentes ao Laboratório de Cultivo de Moluscos da Universidade Federal de Santa Catarina e no Ribeirão da Ilha, pertencentes a uma ostreicultora. As ostras tinham tamanho comercial, correspondendo a um tempo de cultivo de 9-12 meses.

As ostras foram medidas (altura da concha segundo Galtsoff 1964), e abertas para observação macroscópica da concha e órgãos internos (manto, brânquias, gônada e glândula digestiva), para verificar a ocorrência de alterações patológicas.

Todos os animais coletados em cada ponto ( $N = 150$ ) foram submetidos individualmente à técnica do cultivo em meio líquido de tioglicolato de Ray (*Ray's fluid thioglycollate medium*, RFTM, item 2.2) e 30 foram aleatoriamente selecionados para análise histopatológica (item 2.3).

A temperatura e a salinidade da água do mar foram medidas em cada local e data de coleta utilizando-se termômetro e refratômetro, respectivamente. A temperatura da água no Sambaqui foi de 24°C em 2008 e 2009 e no Ribeirão da Ilha de 22 e 26°C para os anos de 2008 e

2009, respectivamente. A salinidade foi de 32‰ (2008) e 35 ‰ (2009) no Sambaqui e de 26‰ (2008) e 34 ‰ (2009) no Ribeirão da Ilha (Tabela 1).

### 2.2. Incubação de tecidos em meio líquido de tioglicolato de Ray (RFTM)

Duas demibrânquias e o reto de cada animal foram incubados em meio líquido de tioglicolato por 7 dias no escuro e a temperatura ambiente ( $\pm 28^{\circ}\text{C}$ ). Após o período de incubação, os tecidos foram coletados, macerados sobre uma lâmina e corados com solução de lugol, segundo o método descrito por Ray (1954). O preparado foi observado ao microscópio óptico para verificar a presença de hipnósporos de *Perkinsus*, os quais são esféricos e as paredes se coram de azul ou negro azulado.

### 2.3. Preparações histológicas

De cada ostra (N= 30 por local, espécie e ano), uma secção transversal do animal foi retirada amostrando-se vários órgãos, entre eles: brânquias, gônada e glândula digestiva. Os tecidos foram fixados em Solução de Davidson (Shaw e Battle, 1957) por 24 h, desidratados em uma série gradativa de álcool até 100%, diafanizados em xilol e impregnados em parafina histológica a  $60^{\circ}\text{C}$ . Cortes de 5  $\mu\text{m}$  foram realizados e posteriormente corados com hematoxilina de Harris e eosina (Howard et al. 2004). Os cortes obtidos foram analisados em microscópio óptico.

A prevalência dos patógenos foi calculada como sendo o número de animais parasitados sobre o número total de ostras coletadas em cada ponto de coleta (Bush et al. 1997).

## 3. Resultados

### 3.1. Biometria

A biometria das ostras *Crassostrea rhizophorae* (costão) e *Crassostrea gigas* (cultivo) do Sambaqui e Ribeirão teve como objetivo verificar o tamanho dos animais que seriam submetidos às análises patológicas, sem, contudo, fazer comparações sobre o crescimento dos animais nos dois locais amostrados; e não teve o objetivo de relacionar o tamanho dos animais com a presença e/ou ausência de parasitismo. As alturas médias (mm) das ostras em 2008 e 2009 encontram-se na tabela 1.



### 3.2. Análises macroscópicas

As observações macroscópicas não evidenciaram a presença de abscessos ou pústulas em nenhum dos órgãos analisados nas duas espécies estudadas. A alteração macroscópica predominante foi o parasitismo pelo poliqueta do gênero *Polydora* nas valvas das ostras. A infestação por *Polydora* foi caracterizada pela presença de tubos horizontais e verticais. Eventualmente os tubos perfuraram o tecido atingindo a glândula digestiva. Também foram observadas bolhas de lodo cobertas por camadas de conchiolina ocupando uma parte representativa da região interna das valvas dos animais.

As maiores prevalências de *Polydora* em ostras nativas *Crassostrea rhizophorae* foram observadas nas coletas em 2008, no Sambaqui (81,3%) e Ribeirão da Ilha (67,3%) (Tabela 1). Com relação a *Crassostrea gigas*, as prevalências alcançadas foram máximas (100%) nos dois locais de estudo e nos dois anos de amostragem (Tabela 1).

### 3.3. Incubação de tecidos em meio líquido de tioglicolato de Ray (RFTM)

Para as duas espécies de ostras investigadas quanto à presença de *Perkinsus* pelo método de RFTM, todos os indivíduos resultaram negativos, ou seja, não houve presença desse protozoário.

A técnica do cultivo dos tecidos em meio líquido de tioglicolato (RFTM) se mostrou eficaz para a detecção do protozoário *Nematopsis*. Ainda que *Nematopsis* não tenha se corado pelo lugol, este se apresentou bastante refringente e era facilmente observado entre as células das brânquias das ostras em objetiva de 20x. A prevalência de *Nematopsis* por RFTM em *C. rhizophorae* do Sambaqui foi alta e variou de 90 a 96% (Tabela 1).

### 3.4. Análises histopatológicas

As análises histológicas evidenciaram: hipertrofia dos gametas masculinos, bactérias do tipo rickettsia e protozoários dos gêneros *Trichodina*, *Sphenophrya*, *Ancistrocoma*, *Steinhausia* e *Nematopsis*. Entre os metazoários foram observados o turbelário do gênero *Urastoma*, o cestóide *Tylocephalum* e um copépode possivelmente do gênero *Pseudomiycola* (Tabela 1). Todavia nenhuma das alterações histopatológicas encontradas no presente estudo representou risco à saúde das ostras.

### 3.4.1. Hipertrófia dos gametas

Nos folículos gonádicos masculinos de ostras de ambas as espécies foram evidenciadas células hipertrofiadas com diâmetro variando entre 15 a 36  $\mu\text{m}$ . Estas células apresentavam um conteúdo acidófilo e uma região periférica basófila (Fig. 1A). Somente três ostras apresentaram tal patologia: uma *Crassostrea rhizophorae* do Ribeirão da Ilha, coletada em 2009; uma *Crassostrea gigas* do Ribeirão da Ilha, coletada em 2008 e outra do Sambaqui em 2009, resultando em prevalência baixa (3,3%) (Tabela 1).

### 3.4.2. Bactérias do tipo rickettsia

Bactérias do tipo rickettsia foram visualizadas em *C. rhizophorae* e *C. gigas* do Sambaqui e do Ribeirão da Ilha em 2008 e 2009. As bactérias formavam colônias intracitoplasmáticas com caráter basófilo e com tamanho variando de 7 a 30  $\mu\text{m}$  nas células epiteliais dos túbulos digestivos (Fig. 1B). Na maior parte das ostras investigadas a intensidade de infecção foi baixa (1 a 5). Em apenas uma ostra *Crassostrea rhizophorae* também foram observadas cinco colônias destas bactérias no epitélio do estômago, causando alteração no citoplasma da célula epitelial (Fig. 1C). A maior prevalência de bactérias foi de 30% em *C. gigas* do Ribeirão da Ilha no ano de 2009 (Tabela 1).

### 3.4.3. Protozoários

Ciliados do gênero *Trichodina* foram observados aderidos às lamelas branquiais e livres no lúmen dos túbulos digestivos de *Crassostrea rhizophorae* e *C. gigas*, provenientes do Ribeirão da Ilha (Fig. 1D e 1E). Nas brânquias foram observados até 4 ciliados/corte histológico e nos túbulos digestivos mais de 5 por ostra. *Trichodina* em vista lateral apresentou a típica forma de meia lua, possuindo um núcleo basófilo evidente (Fig. 1D). Nas brânquias, esses ciliados apresentaram tamanhos variando de 12 a 47  $\mu\text{m}$  e nos túbulos digestivos de 10 a 20  $\mu\text{m}$ . Nas extremidades do patógeno foram observadas estruturas (ganchos) utilizadas para fixação no hospedeiro (Fig. 1E). A maior prevalência em *C. gigas* foi de 13,3% em 2008. Em *C. rhizophorae*, estes ciliados foram observados somente em 2009 no Ribeirão da Ilha, com prevalência alta (50%) (Tabela 1).

**Tabela 1.** Prevalência (%) de patógenos e alterações patológicas nas ostras *Crassostrea gigas* (G) e *C. rhizophorae* (R) em dois pontos da Ilha de Santa Catarina, Sambaqui (SAM) e Ribeirão da Ilha (RIB), em março-abril de 2008 e 2009. Análises macroscópicas (AM, N=150), incubação de tecidos em meio líquido de tioglicolato de Ray (RFTM, N= 150) e cortes histológicos (CH, N= 30). Altura média das ostras (mm) e Desvio Padrão (DP).

Patógenos e alterações patológicas	2008				2009			
	SAM		RIB		SAM		RIB	
	G	R	G	R	G	R	G	R
	Altura (mm) ± DP							
	96,7±14,3	55,3±10,3	84,2±15,8	49,6±6,4	98,1±10	59,6±5,1	104,9±12	58,2±5,4
	T. 24 °C; Sal. 32 ‰		T. 22 °C; Sal. 26 ‰		T. 24 °C; Sal. 35 ‰		T. 26 °C; Sal. 34 ‰	
Hipertrofia do gameta	-	-	3,3	-	3,3	-	-	3,3
Bactérias do tipo <i>Rickettsia</i>	16,7	10,0	6,7	13,3	10,0	13,3	30,0	10,0
<b>Protozoários</b>								
<i>Trichodina</i> sp.	-	-	13,3	-	-	-	3,3	50,0
<i>Sphenophrya</i> sp.	46,7	6,7	20,0	26,7	70,0	33,3	13,3	46,7
<i>Ancistrocoma</i> sp.	36,6	6,7	36,7	10,0	-	40,0	6,7	23,3
<i>Steinhausia</i> sp.	26,7	16,7	-	23,3	16,7	33,3	3,3	30,0
<i>Nematopsis</i> sp. (CH)	-	96,6	-	23,3	-	100	-	50,0
<i>Nematopsis</i> sp.(RFTM)	4,7	90,0	1,3	35,3	-	96,0	-	88,0
<b>Metazoários</b>								
<i>Polydora</i> sp. (AM)	100	81,3	100	67,3	100	18,7	100	22,7
<i>Urastoma</i> sp.	-	6,7	6,7	-	-	3,3	-	6,7
<i>Tylocephalum</i> sp.	3,3	-	-	-	3,3	-	-	-
Copépode	-	-	-	3,3	-	-	-	-

Outro ciliado, *Sphenophrya* sp., foi visualizado na base dos filamentos branquiais (Fig. 1F). O ciliado tinha forma ovalada e/ou redonda, contendo macronúcleo basófilo, um citoplasma com caráter eosinófilo e tamanho variando de 9 a 17  $\mu\text{m}$ . A maior prevalência de *Sphenophrya* foi observada em *Crassostrea gigas* do Sambaqui, em 2009 (70%) e a menor (6,7%), em *Crassostrea rhizophorae* também do Sambaqui, em 2008 (Tabela 1). De um modo geral, a intensidade foi baixa com exceção de apenas 3 animais (*C. rhizophorae* do Sambaqui) que apresentaram cada um mais de 250 ciliados no total da brânquia analisada no corte histológico. Não foi detectada alteração nas brânquias nem reação do hospedeiro.

Ciliados do gênero *Ancistrocoma* foram observados no lúmen dos túbulos digestivos. Os ciliados apresentavam forma ovalada, núcleo basofílico e citoplasma eosinófilo (Fig. 2A) com tamanho variando de 12 a 26  $\mu\text{m}$ . As maiores prevalências foram observadas nas ostras *C. rhizophorae* do Sambaqui, em 2009 (40%) e *C. gigas* do Sambaqui (36,7%) e Ribeirão da Ilha (36,7%), em 2008. A intensidade por este ciliado foi baixa, com um máximo de 4 ciliados/corte histológico.

O microsporídeo *Steinhausia* foi detectado no citoplasma dos ovócitos das ostras (Fig. 2B). Os vacúolos contendo as células do patógeno algumas vezes ocupavam uma porção representativa do citoplasma. As maiores prevalências desse protozoário foram observadas em 2009, em *C. rhizophorae* do Sambaqui (33,3%) e Ribeirão da Ilha (30%). A intensidade de infecção na maioria dos animais variou de 1 a 35 ovócitos infectados/corte histológico. Porém, em uma ostra *C. gigas* do Sambaqui foram observados mais de 50 ovócitos contendo os esporos do patógeno, sem resposta de defesa.

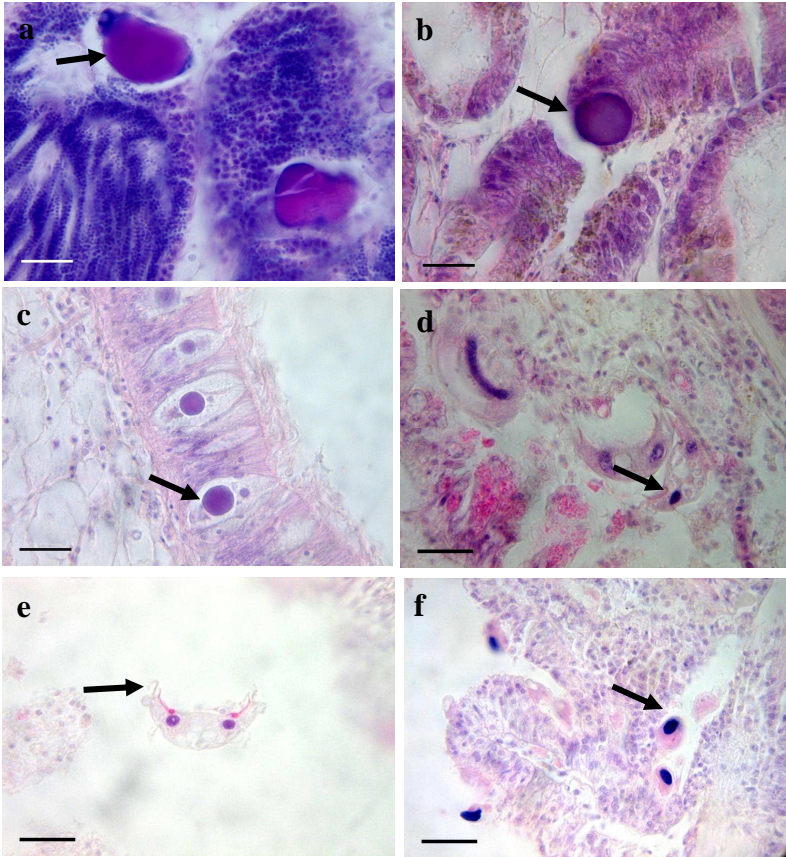
Um protozoário do gênero *Nematopsis* foi observado infectando o tecido conjuntivo de vários órgãos, como as brânquias e o manto (Fig. 2C). Os oocistos de *Nematopsis* densamente basófilos tinham tamanhos variando de 8 a 14  $\mu\text{m}$ , parede hialina e foram encontrados de 1 a 4/fagócito. As prevalências encontradas após observação dos cortes histológicos foram altas em *C. rhizophorae* do Sambaqui (96,6% em 2008 e 100% em 2009). Já em *C. gigas*, este patógeno não foi detectado em nenhum dos locais estudados. Apesar das elevadas prevalências de *Nematopsis* sp. em *C. rhizophorae*, não foi observada resposta do hospedeiro. A intensidade de infecção foi baixa, com poucos oocistos/corte histológico.

#### 3.4.4. Metazoários

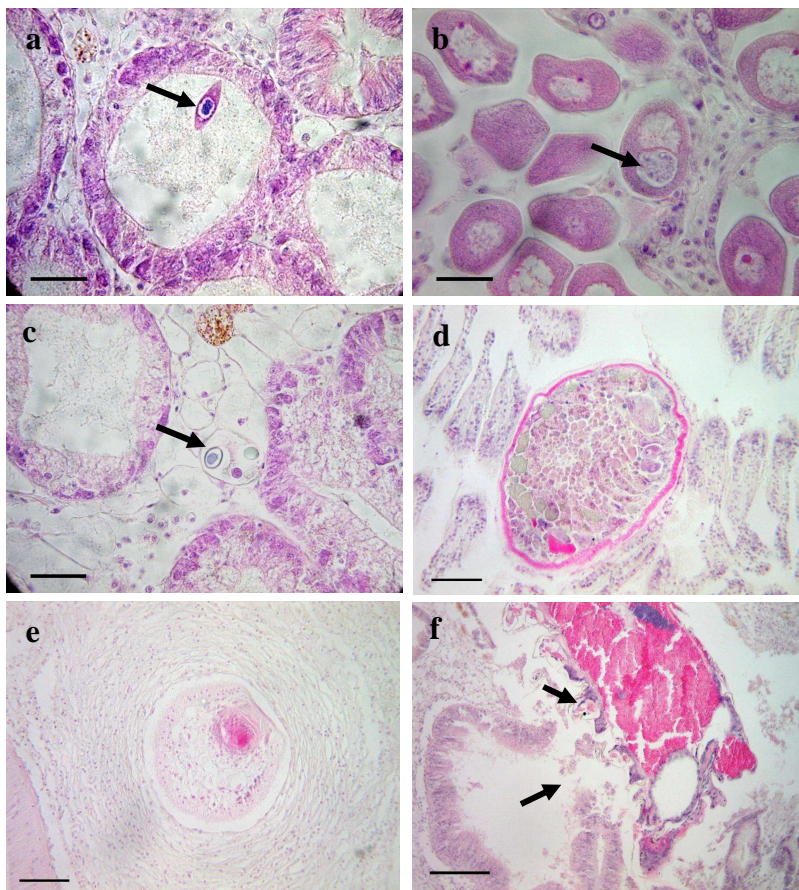
Turbelários do gênero *Urastoma* foram encontrados próximos às brânquias da ostra *Crassostrea rhizophorae* do Ribeirão da Ilha e também em *C. rhizophorae* do Sambaqui e Ribeirão da Ilha. Estes apresentavam tamanhos variando de 162,5 a 245  $\mu\text{m}$  (Fig. 2D). A maior prevalência observada foi de 6,7% (Tabela 1). A intensidade de infestação foi baixa, tendo sido registrado no máximo dois turbelários por ostra e sem causar dano aparente nas brânquias.

Larvas de cestóides do gênero *Tylocephalum* foram registradas somente em ostras japonesas e no Sambaqui com prevalência de 3,3% (1/30) nas coletas de março-abril de 2008 e 2009. As larvas encontravam-se encapsuladas por várias camadas de células achatadas. Além da reação de encapsulamento, não se observou outra alteração nos tecidos do hospedeiro (Fig. 2E).

Um copépode possivelmente do gênero *Pseudomiycola* foi detectado no lúmen de um túbulo digestivo secundário de ostra de mangue *C. rhizophorae* do Ribeirão da Ilha (Fig. 2F). Esse parasita media 900  $\mu\text{m}$  e causou a ruptura da parede deste túbulo.



**Figura 1.** Alterações patológicas e patógenos detectados em tecidos de *Crassostrea gigas* e *C. rhizophorae* do Sambaqui e Ribeirão da Ilha (Ilha de Santa Catarina, Brasil) em março-abril de 2008 e 2009. **Fig. 1a.** Células hipertrofiadas na parede do folículo masculino (seta). **Fig. 1b.** Colônia de bactéria do tipo rickettsia (seta) no citoplasma de célula epitelial do túbulo digestivo. **Fig. 1c.** Colônias de bactérias do tipo rickettsia no citoplasma de célula epitelial do estômago. **Fig. 1d.** *Trichodina* sp. (seta) nos filamentos branquiais, mostrando núcleo evidente. **Fig. 1e.** Detalhe das estruturas de fixação (seta) de *Trichodina*. **Fig. 1f.** Ciliado *Sphenophrya* sp. (seta) em contato com as brânquias. Barras = 20 $\mu$ m.



**Figura 2.** Patógenos observados em tecidos de *Crassostrea gigas* e *C. rhizophorae* do Sambaqui e Ribeirão da Ilha (Ilha de Santa Catarina, Brasil) em março-abril de 2008 e 2009. **Fig. 2a.** *Ancistrocoma* sp. (seta) no lúmen de um túbulo digestivo. **Fig. 2b.** Vacúolo parasitário com esporos de *Steinhausia* sp. (seta) no citoplasma de um ovócito. **Fig. 2c.** Oocistos de *Nematopsis* sp. na glândula digestiva. **Fig. 2d.** *Urastoma* sp. entre os filamentos branquiais. **Fig. 2e.** *Tylocephalum* sp. no tecido conjuntivo ao redor dos túbulos digestivos. **Fig. 2f.** Copépode (seta) causando ruptura da parede de um túbulo digestivo. Veja detalhes dos apêndices (seta). Barras = Figs. a; b; c = 20  $\mu$ m; Figs. d; e; f = 50  $\mu$ m.

#### 4. Discussão

O presente estudo registrou diversos patógenos com diferentes prevalências e intensidades nas duas espécies de ostras estudadas. Todavia, nenhum destes representou risco às populações de ostras estudadas.

O poliqueta do gênero *Polydora* esteve presente com elevadas prevalências (até 100%) em *Crassostrea gigas* dos dois locais estudados. No entanto, os produtores não relataram mortalidades nos períodos das coletas, mostrando que apesar de sua alta prevalência os possíveis danos não levam a morte da ostra. Para os mesmos locais já foram documentadas prevalências similares (Ibbotson, 2002; Sabry e Magalhães, 2005) deste poliqueta. Infestações por *Polydora* sp. são comuns em bivalves de diversas parte do mundo e parece que o maior prejuízo é para o produtor, pois os tubos horizontais e verticais com coloração escura e as bolhas de lodo na concha influenciam negativamente o valor de mercado dos moluscos. No presente estudo, as ostras *Crassostrea rhizophorae* coletadas em 2009 apresentaram prevalências de *Polydora* inferiores às encontradas em ostras japonesas *Crassostrea gigas* no mesmo período. Este fato poderia sugerir que a ostra *C. rhizophorae* fosse mais resistente ao ataque de poliquetos. No entanto, para o ano de 2008 nos dois locais (Sambaqui e Ribeirão da Ilha), as prevalências de *Polydora* em *C. rhizophorae* foram altas merecendo, portanto, um monitoramento constante para melhor compreensão sobre a suscetibilidade de *C. rhizophorae* ao ataque dos poliquetas.

Os resultados obtidos pela técnica do cultivo de tecidos em meio de tioglicolato para o diagnóstico de *Perkinsus* mostraram que as ostras de bancos naturais assim como as ostras japonesas cultivadas não são afetadas por este patógeno. Estudos nas populações de moluscos da Ilha de Santa Catarina, utilizando esta técnica específica para o diagnóstico do protozoário do gênero *Perkinsus* são recentes. As primeiras pesquisas com RFTM foram realizadas em 2008 por da Silva et al. (2010), para *C. rhizophorae* e *Anomalocardia brasiliiana*, que também obtiveram resultados negativos. No Brasil, apenas um trabalho com *C. rhizophorae* da Bahia faz referência ao uso dessa técnica e também não detectou *Perkinsus* sp. nas ostras analisadas (Nascimento et al. 1986). No bivalve unha-de-velho (*Tagelus plebeius*) da Praia do Pontal da Daniela, SC, também não foi detectada a presença de *Perkinsus* sp. quando esta técnica foi utilizada (da Silva et al. 2009).



As hipertrofias dos gametas masculinos observadas nas ostras *Crassostrea rhizophorae* (Ribeirão da Ilha) e em *Crassostrea gigas* (Ribeirão da Ilha e Sambaqui) possivelmente foram causadas por um vírus. A presença de núcleo hipertrofiado com grânulos intensamente basofílicos na periferia das células, sugere a presença de vírus das famílias Papillomaviridae e Polyomaviridae, que causam a enfermidade conhecida por Hipertrofia Gametocítica Viral (VGH, *Viral gametocytic hypertrophy*) (Bower et al. 1994). Essa doença foi registrada em moluscos bivalves, incluindo as ostras *C. gigas* e *C. rhizophorae* (Bower et al. 1994). O primeiro relato dessa doença foi feito por Farley (1976). A partir de então, essa enfermidade foi documentada em vários moluscos bivalves (Choi et al. 2004; Winstead et al. 2004; Garcia et al. 2006; Meyers et al. 2009). A prevalência da hipertrofia gametocítica detectada nas ostras do presente estudo foi baixa e não foram observadas infiltrações de hemócitos ou lesões nos tecidos, além da alteração do gameta infectado. Em *C. gigas* da Coreia do Sul, as prevalências de VGH variaram de 3,3 a 7,1%, a intensidade de infecção foi baixa e não foram detectadas respostas de defesa do hospedeiro (Choi et al. 2004). Já em *C. gigas* na França, as prevalências de VGH foram baixas (3,3 a 13,3%) e intensidade de infecção também. Os autores observaram lesões na gônada de alguns animais, porém com ausência de reação hemocitária e sem efeitos letais sobre as ostras (Garcia et al. 2006).

No presente estudo, colônias de bactérias do tipo rickettsia foram observadas nos epitélios dos túbulos digestivos e, em apenas uma ostra *C. rhizophorae*, foi detectada no epitélio do estômago. Apesar das prevalências encontradas terem sido de até 30%, não houve dano considerável nos animais. Em berbigões *Cerastoderma edule* da Espanha, a infecção por colônias bacterianas do tipo rickettsia foi de baixa intensidade e não foi observada resposta do hospedeiro frente à infecção (Carballal et al. 2001), ao contrário do que foi relatado em ostras *C. gigas* da costa Atlântica da França, quando uma infecção intensa causou lesões e mudança na estrutura normal das brânquias (Renault e Cochenec, 1994). Bactérias do tipo rickettsia causaram infecções intensas e danos severos nas células epiteliais da brânquia, glândula digestiva e manto da ostra *Crassostrea ariakensis* da Província de Guangdong, China (Sun e Wu, 2004). No entanto, os danos que as bactérias do tipo rickettsia causam nas células dos hospedeiros parecem diferir entre os moluscos (Villalba et al. 1999; Wu e Pan, 2000; Cremonte et al. 2005; da Silva et al. 2005; Grenn et al. 2008; Boehs et al. 2010).

Ciliados são organismos que habitam a cavidade paleal dos bivalves sem causar danos ao hospedeiro (McGladdery e Bower, 2001).

No presente estudo, a prevalência do ciliado *Trichodina* na ostra *Crassostrea rhizophorae* foi alta (50%), porém menor que a observada na vieira *Aequipecten tehuelchus* (100%) da Patagônia, Argentina por Cremonte et al. (2005). A maior prevalência de *Trichodina* observada apenas nas ostras de estoques naturais do Ribeirão da Ilha, possivelmente pode estar relacionada com a elevada concentração de matéria orgânica e consequentemente condições de qualidade de água inadequadas (Akşit et al. 2008). A ocorrência de *Trichodina* parece ser maior em hospedeiros de áreas poluídas, sendo, portanto, um patógeno bioindicador de poluição (Lauckner, 1983). Ainda, o fato de *Trichodina* ter sido observada em maior quantidade livre nos túbulos digestivos das ostras investigadas, poderia indicar uma elevada quantidade desse protozoário no ambiente, no dia da coleta. Ciliados do gênero *Trichodina* ocorrem mundialmente em vários moluscos bivalves (Boussaïd et al. 1999; Carballal et al. 2001; Boehs e Magalhães, 2004; Cremonte et al. 2005). No entanto, a patogenicidade de *Trichodina* é controversa (Bower et al. 1994). Elevadas infecções por *Trichodina* sp. foram associadas a erosões nas brânquias de *Crassostrea angulata* da França e responsabilizadas pelo mau funcionamento desse órgão (Lauckner, 1983). Na vieira *Aequipecten tehuelchus* de estoque natural do nordeste da Patagônia, Argentina (Cremonte et al. 2005) e no berbigão *Cerastoderma edule* da costa da Galícia, Espanha (Carballal et al. 2001), *Trichodina* também não causou danos ou respostas dos hospedeiros. Já em *Crassostrea gigas* muito infectada por *Trichodina* foi detectada resposta inflamatória e alterações no epitélio das brânquias (Boussaïd et al. 1999).

Ciliados do gênero *Sphenophrya* foram encontrados nas brânquias de *C. gigas* e *Crassostrea rhizophorae* nos dois locais estudados. Algumas vezes as prevalências detectadas foram elevadas, chegando a alcançar até 70% em *C. gigas* do Sambaqui, mas a intensidade foi geralmente baixa e nenhuma resposta inflamatória foi observada nas ostras afetadas. Ciliados desse gênero são observados em uma grande variedade de espécies de bivalves podendo causar hipertrofia da célula e seu núcleo (xenoma) (Bower et al. 1994). Em *Crassostrea rhizophorae* da Baía de Todos os Santos, Salvador, BA, *Sphenophrya* foi observado sem causar nenhum dano (Nascimento et al. 1986). Entretanto, para a mesma espécie de ostra coletada na Baía de Camamu, BA, foi observada a formação de xenomas (Boehs et al. 2009) e os autores concluíram que este efeito patológico esteve associado à presença do ciliado. No mexilhão *Dreissena polymorpha* (Bivalvia: Mytilidae) altamente infectado por *Sphenophrya dreissenae* foi

observada hiperplasia, hipertrofia celular e vacuolização do epitélio (Laruelle et al. 1999).

*Ancistrocoma* sp. é outro ciliado que foi observado nas ostras do presente estudo, em baixa intensidade e não causou danos ou respostas de defesa do hospedeiro. Nascimento et al. (1986) também relataram ausência de danos em *Crassostrea rhizophorae* da Bahia afetada por *Ancistrocoma* sp.

*Steinhausia* sp. foi observada em ovócitos de *Crassostrea gigas* e *C. rhizophorae* nos dois locais. A presença dos esporocistos com esporos do patógeno causou dano na estrutura normal do citoplasma dos ovócitos, porém não foram observadas células de defesa próximas aos ovócitos infectados. Em *Mytilus galloprovincialis* (Bivalvia: Mytilidae) infectados com *Steinhausia* também não foi observada infiltração de hemócitos (Robledo et al. 1994). Ao contrário, o berbigão *Cerastoderma edule* infectado por microsporídeos do tipo *Steinhausia* mostrou uma leve resposta hemocítica sem, contudo, causar danos patológicos significativos ao hospedeiro (Carballal et al. 2001). Ostras *Saccostrea glomerata* da Austrália, infectadas com esse microsporídeo, apresentaram completa reabsorção dos ovócitos com infecção do epitélio germinal e elevada infiltração de hemócitos (Green et al. 2008). As prevalências de *Steinhausia* observadas neste trabalho foram consideradas elevadas (até 33,3%) quando comparadas as de 6,6% detectadas em *Mytella guyanensis* do Rio Amazonas (Matos; Matos; Azevedo, 2005), 9% para *C. gigas* (Pontinha, 2009) e a de 7,5% em *Anomalocardia brasiliiana* de Santa Catarina (da Silva et al., 2010). No entanto, a maior prevalência encontrada no presente estudo foi similar a registrada em *Brachidontes solisianus* de Santa Catarina, (37,5%) (Pontinha et al., 2010).

Gregarinas do gênero *Nematopsis* sp. foram detectadas em 100% das ostras *C. rhizophorae* provenientes do Sambaqui. No entanto, não foi observada resposta de defesa das ostras. O protozoário *Nematopsis* sp. utiliza bivalves como hospedeiro intermediário e completa seu ciclo de vida em artrópodes marinhos (Lauckner, 1983; McGladdery et al. 2006). A maior prevalência de *Nematopsis* nas ostras do costão poderia estar relacionada à maior proximidade dos crustáceos aos costões e talvez a pouca quantidade destes nas lanternas de cultivo. Boehs et al. (2010) detectaram maiores prevalências de *Nematopsis* no mexilhão *M. guyanensis* coletada em áreas de manguezal quando comparadas as encontradas em *A. brasiliiana* e relataram que a abundância de crustáceos no estuário poderia ter contribuído para as diferenças nas prevalências encontradas. *Nematopsis* em elevadas prevalências em

vieiras *Aequipecten tehuelchus* na Argentina (100%) não induziu reações de defesa do hospedeiro (Cremonte et al. 2005). Já em *Crassostrea rhizophorae* do Rio Jaguaribe, CE foram observadas reações de defesa evidenciada pela infiltração de hemócitos (Sabry et al. 2007). Elevadas intensidades de infecção por *Nematopsis* sp. também causaram alterações na morfologia das brânquias e manto do bivalve *Mytella guyanensis* da região Estuarina do Rio Cachoeira, BA (Pinto e Boehs, 2008). Já no berbigão *Anomalocardia brasiliana* desse mesmo estuário não foram observadas lesões nos tecidos ou infiltrações de hemócitos nos animais infectados (Boehs et al. 2010). *Nematopsis* sp. foi associado a completa destruição das células das brânquias e mortalidade no berbigão *Cerastoderma edule* da região sul de Portugal (Azevedo e Cachola, 1992). Nestes berbigões da Espanha, a presença de *Nematopsis* sp. causou lesões moderadas nos filamentos branquiais e induziu uma leve resposta hemocítica sem, contudo, causar mortalidade (Carballal et al. 2001).

Vale ressaltar que no presente estudo a técnica de RFTM mostrou-se útil para o diagnóstico de *Nematopsis* sp. As análises das brânquias revelaram elevadas prevalências deste protozoário mostrando ser uma técnica sensível, auxiliando a histologia.

Metazoários do gênero *Urastoma* (Turbellaria) foram detectados livres entre os filamentos branquiais das ostras *Crassostrea gigas* e em *C. rhizophorae* do presente estudo e não causaram danos aparentes nas brânquias. A prevalência, assim como os níveis de infestação por este organismo foi baixa. Na costa atlântica do Canadá as infestações por *Urastoma cyprinae* em ostras *Crassostrea virginica* foram bastante elevadas: até 1.000 parasitas por indivíduos com prevalências de até 100%. No entanto, não se observou danos histopatológicos nas brânquias (McGladdery et al. 2006).

Nas ostras *C. gigas* do Sambaqui infectadas por uma larva de cestóide *Tylocephalum*, foi observada uma resposta do hospedeiro, evidenciada por uma camada de células de natureza fibrosa, além da infiltração de hemócitos formando o encapsulamento do parasita. A resposta do hospedeiro contra o parasita pode variar entre as espécies afetadas (Lauckner, 1983). De acordo com Figueras e Villalba (1988), a resposta de *C. gigas* quando infestada por *Tylocephalum* parece ser menos intensa que em outros bivalves. Em bivalves do gênero *Pinctada*, a formação da cápsula não é tão acentuada e por isso acredita-se que as ostras pertencentes a esse gênero sejam hospedeiras intermediárias normais desse parasita uma vez que a resposta de defesa do hospedeiro é menos intensa (Lauckner, 1983). Em ostras *C. rhizophorae* do Estado da

Bahia, larvas de *Tylocephalum* foram responsáveis por danos de natureza mecânica evidenciados pela ruptura dos tecidos, durante a penetração dos cestóides (Nascimento et al. 1986).

O copépode encontrado em *Crassostrea rhizophorae* do Ribeirão possivelmente pertencia ao gênero *Pseudomyicola*. Este copépode causou danos no tecido epitelial do estômago da ostra *C. rhizophorae* provavelmente pelo seu grande tamanho e pela presença dos apêndices do animal. No pectinídeo *Argopecten ventricosus* do México, Cáceres-Martínez et al. (2005) também observaram erosões no epitélio do estômago e da brânquia, leve infiltração de hemócitos e alteração da membrana basal do epitélio causadas pelos apêndices do copépode *Pseudomyicola spinosus*. A prevalência de copépodes em *A. ventricosus* (100%) e *Mytilus galloprovincialis* (93,3%) do México (Cáceres-Martínez et al. 2005; Cáceres-Martínez et al. 1997) foi bastante elevada comparada com a prevalência de 3,3% observada no presente trabalho.

Nenhum dos patógenos encontrados no presente estudo parece causar danos significativos nas ostras, levando-se em consideração a baixa intensidade de infecção e/ou infestação em que foram observados e, na grande maioria dos animais, ausência de efeitos patológicos. Apesar dos patógenos encontrados não estarem na lista de declaração obrigatória a OIE, é necessário um monitoramento constante das populações de moluscos para que se possa avaliar com mais precisão os efeitos desses patógenos nos seus hospedeiros, principalmente em situação de estresse que poderia funcionar como fator para desencadear infecções não aparentes. Além disso, os moluscos bivalves têm grande importância socioeconômica para o Estado de Santa Catarina, merecendo atenção especial com relação à questão da saúde desses animais.

## 5. Agradecimentos

Os autores são gratos ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro, através do Edital 64/2008 do MCT/CNPq/MAPA/DAS e pela Bolsa de Pós-Doutoramento para Patrícia Mirella da Silva e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela Bolsa de Doutorado do Programa Amazônia Azul para Rachel C. Sabry. Ao Dr. Jaime F. Ferreira e à produtora de ostras Rita C. Rodrigues pelo apoio e fornecimento de ostras.

## 6. Referências

Akşit, D., Falakali-Mutaf., Göçmen B., Gürelli, G., 2008. A preliminary observations on *Trichodina* sp. (Ciliophora: Peritricha) on the Gills of Limpets (*Patella* spp.) in Antalya (Turkey). North-Western J. Zool. 4, 295–299.

Azevedo, C., Cachola, R., 1992. Fine structure of the apicomplexa oocyst of *Nematopsis* sp. of two marine bivalve molluscs. Dis. Aquat. Org. 14, 69–73.

Boehs, G., Magalhães, A.R.M., 2004. Simbiontes associados com *Anomalocardia brasiliiana* (Gmelin) (Mollusca, Bivalvia, Veneridae) na Ilha de Santa Catarina e região continental adjacente, Santa Catarina, Brasil. Rev. Bras. Zool. 21, 865–869.

Boehs, G., Lenz, T. M., Villalba, A., 2009. Xenomas in *Crassostrea rhizophorae* (Ostreidae) from Camamu Bay, Bahia, Brazil. Braz. J. Biol. 69, 457–458.

Boehs, G., Villalba, A., Ceuta, L.O., Luz, J.R., 2010. Parasites of three commercially exploited bivalve mollusc species of the estuarine region of the Cachoeira River (Ilhéus, Bahia, Brazil). J. Invertebr. Pathol. 103, 43–47.

Bossaïd, B., Grippari, J.L., Renault, T., Tige, G., Dorange, G., 1999. *Trichodina* sp. infestation of *Crassostrea gigas* oyster gills in Brittany, France. J. Invert. Pathol. 73, 339–342.

Bower, S.M., McGladdery, S.E., Price, I.M., 1994. Synopsis of infectious diseases and parasites of commercially exploited shellfish. Annu. Rev. Fish Dis. 4, 1–199.

Bush, A.O., Lafferty, A.D., Lotz, J.M., Shostak, A.W., 1997. Parasitology meets ecology on its own terms: Margoli et al. revisited. J. Parasitol. 83, 575–583.

Cáceres-Martínez, J., Vázquez-Yeomans, R., 1997. Presence and histopathological effects of the copepod *Pseudomyicola spinosus* in

*Mytilus galloprovincialis* and *Mytilus californianus*. J. Invert. Pathol. 70, 150–155.

Cáceres-Martínez, C., Chávez-Villalba, J., Garduño-Méndez, L., 2005. First record of *Pseudomyicola spinosus* in *Argopecten ventricosus* in Baja California, Mexico. J. Invert. Pathol. 89, 95–100.

Carballal, M.J., Iglesias, D., Santamarina, J., Ferro-Soto, B., Villalba, A., 2001. Parasites and pathologic conditions of the cockle *Cerastoderma edule* populations of the coast of Galicia (NW Spain). J. Invert. Pathol. 78, 87–97.

Choi, D.L., Lee, N.S., Choi, H.J., Park, M.A., McGladdery S.E., Park, M.S., 2004. Viral gametocytic hypertrophy caused by a papova-like virus infection in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* in Korea. Dis. Aquat. Org. 59, 205–209.

Cremonte, F, Figueras, A., Burreson, E.M. 2005. A histopathological survey of some commercially exploited bivalve molluscs in northern Patagonia, Argentina. Aquaculture 24, 23–33.

da Costa, R.L., 2007. Prevalência de enfermidades e histopatologia de *Perna perna* (Mollusca) em Florianópolis/SC, Brasil. Dissertação de Mestrado, UFSC, Florianópolis.

da Silva, P.M., Magalhães, A.R.M., Barracco, M.A., 2002. Effects of *Bucephalus* sp. (Trematoda: Bucephalidae) on *Perna perna* mussels from a culture station in Ratonés Grande Island, Brazil. J. Invertebr. Pathol. 79, 154–162.

da Silva, P.M.; Fuentes, J; Villalba, A. 2005. Growth, mortality and disease susceptibility of oyster *Ostrea edulis* families obtained from brood stocks of different geographical origins, through on-growing in the Ría de Arousa (Galicia, NW Spain). Mar. Biol. 147, 965–977.

da Silva, P.M., Cremonte, F., Sabry, R.C., Rosa, R.D., Cantelli, L., Barracco, M.A., 2009. Presence and histopathological effects of the *Parvatrema* sp. (Digenea, Gymnophallidae) in the stout razor clam *Tagelus plebeius* (Bivalvia, Psammobiidae). J. Invert. Pathol. 102, 14–20.

da Silva, P.M., Leal, A.L.L., Magalhães, A.R.M., Barracco, M.A., 2010. Pathological survey on the commercial edible bivalve species from Santa Catarina (South Brazil). In: Aquaculture 2010. San Diego, Califórnia. p. 244.

dos Santos, T.A.M., Coimbra J., 1995. Growth and production of raft-cultured *Mytilus edulis* L., in Ria de Aveiro: gonad symbiotic infestation. Aquaculture 132, 195–211.

Farley, C.A., 1976. Ultrastructural observations on epizootic neoplasia and lytic virus infection in bivalve mollusks. Prog. Exp. Tumor. Res. 20, 283–294.

Figueras, A.J., Villalba, A., 1988. Patología de moluscos, In: Monteros, J.E., Labarta, U. (Eds.), Patología en acuicultura. Mundi-Prensa Libros, Madrid. 4, pp. 327–389.

Galtsoff, P.S., 1964. The American oyster *Crassostrea virginica*. Fishery Bulletin. 64, 480p.

Garcia, C., Robert, M., Arzul, I., Chollet, B., Joly, Jean-Pierre., Miossec, L., Comtet T., Berthe, F., 2006. Viral gametocytic hypertrophy of *Crassostrea gigas* in France: from occasional records to disease emergence. Dis. Aquat. Org. 70, 193–199.

Green, T.J., Jones, B.J., Adlard, R.D., Barnes, A.C., 2008. Parasites, pathological conditions and mortality in QX-resistant and wild-caught Sydney rock oysters, *Saccostrea glomerata*. Aquaculture 280, 35–38.

Gulka, G., Chang, P.W., Marti, K.A., 1983. Procaryotic infection associated with mass mortality of the sea scallop *Placopecten magellanicus*. J. Fish Dis. 6, 355–364.

Howard, D.W., Lewis, E.J., Keller, B.J., Smith, C.S., 2004. Histological Techniques for Marine Bivalve Mollusks and Crustaceans. NOAA Technical Memorandum. 218pp.

Ho, J.S., Kim, I.H. 1991. Copepod parasites of commercial bivalves in Korea. II. Copepods from cultured bivalves. Bull. Korean Fish. Soc. 24, 369–396.



- Ibbotson, D. P., 2002. Poliquetas espionídeos em ostras *Crassostrea gigas* e no plâncton da Praia da Ponta do Sambaqui, Florianópolis/SC–Brasil. Dissertação de Mestrado, UFSC, Florianópolis.
- Laruelle, F., Fokin, D.P., Molloy, S.I., Ovcharenko, M.A., 1999. Histological analysis of mantle-cavity ciliates in *Dreissena polymorpha*: their location, symbiotic relationship, and distinguishing morphological characteristics. J. Shellfish Res. 18, 251–257.
- Lauckner, G. 1983. Diseases of Mollusca: Bivalvia diseases of marine animals, in: Kinne, O. (Ed.), Introduction Bivalvia to Scaphopoda. Biologische Anstalt Helgoland, Hamburg, pp. 477– 977.
- Meyers, T.R., Burton, T., Evans, W., Starkey, N., 2009. Detection of viruses and virus-like particles in four species of wild and farmed bivalve mollusks in Alaska, USA, from 1987 to 2009. Dis. Aquat. Org. 88, 1–12.
- McGladdery, S.E., Bower, S.M., 2001. Synopsis of infectious diseases and parasites of commercially exploited shellfish: Intracellular ciliates of mussels. available from: <[http://www-sci.pac.dfo-mpo.gc.ca/shelldis/pages/icmu\\_e.htm](http://www-sci.pac.dfo-mpo.gc.ca/shelldis/pages/icmu_e.htm)>. Accessed: Abril 2010.
- McGladdery, S.E., Bower, S.M., Getchell, R.G., 2006. Diseases and parasites of scallops. In: shumway, S.E., Parsons, G.J. (Editors), Scallops: Biology, Ecology and Aquaculture. pp. 595 – 650.
- Murina, G.V., Solonchenko, A.I. 1991. Commensals of *Mytilus galloprovincialis* in the Black Sea: *Urastoma cyprinae* turbellaria and *Polydora ciliata* Polychaeta. Hydrobiologia 227, 385–387.
- Nascimento, I.A., Smith, D.H., Kern II, F., Pereira, S.A., 1986. Pathological findings in *Crassostrea rhizophorae* from Todos os Santos Bay, Bahia, Brazil. J. Invertebr. Pathol. 47, 340–349.
- OIE (Office International des Èpizooties/ World Animal Health Organization). 2009. Manual of diagnostic test for aquatic animals, OIE, Paris.

Paillard, C., 2004. A short-review of brown ring disease, a vibriosis affecting clams, *Ruditapes philipinarum* and *Ruditapes decussates*. Aquat. Living Resour. 17, 397–409.

Pinto, T.R., Boehs, G., 2008. *Nematopsis* sp. (Apicomplexa: Eugregarinida) em *Mytella guyanensis* (Lamarck, 1819) (Bivalvia: Mytilidae) da região estuarina do Rio Cachoeira, Ilhéus, Bahia, Brasil. Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci. 45, 95–100.

Pontinha, V. A., 2009. Diagnóstico da saúde da ostra *Crassostrea gigas* (Thumberg, 1793) cultivada em Florianópolis/SC. Dissertação de Mestrado, UFSC, Florianópolis, 53p.

Ray, S.M., 1954. *Biological studies of Dermocystidium marinum, a fungus parasite of oysters*. Rice Institute pamphlet (Monogr Biol Spec Ser Iss), Rice Institute, Washington, DC.

Renault, T., Cochenec, N. 1994. *Rickettsia*-like organisms in the cytoplasm of gill epithelial cells of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. J. Invertebr. Pathol. 61, 160–162.

Renault, T., Novoa, B., 2004. Viruses infecting bivalve molluscs. Aquat. Living Resour. 17, 467–475.

Robledo, J.A.F., Cáceres-Martinez, J., Sluys, R., Figueras, A., 1994. The parasitic turbellarian *Urastoma cyprinae* (Platyhelminthes: Urastomidae) from blue mussel *Mytilus galloprovincialis* in Spain: occurrence and pathology. Dis. Aquat. Org. 18, 203–210.

Sabry, R.C., Magalhães, A.R.M., 2005. Parasitas em ostras de cultivo (*Crassostrea rhizophorae* e *Crassostrea gigas*) da Ponta do Sambaqui, Florianópolis, SC. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 57, 194–203.

Sabry, R.C., Gesteira, T.C.V., Boehs, G., 2007. First record of parasitism in the mangrove oyster *Crassostrea rhizophorae* (Bivalvia: Ostreidae) at Jaguaribe River estuary – Ceará, Brazil. Braz. J. Biol. 67, 755–758

Shaw, B.L., Battle, H.I., 1957. The gross and microscopic anatomy of the digestive tract of the oyster *Crassostrea virginica* (Gmelin), Can. J. Zool. 35, 325–347.

Silveira JR., N., 1997. Predadores, incrustantes e enfermidades. In: *Manual de cultivo de ostras*. Laboratório de Cultivo de Moluscos Marinhos. Florianópolis, Universidade Federal de Santa Catarina, p. 39–55.

Suárez–Morales, Scardua, M.P., da Silva, P.M., 2010. Occurrence and histopathological effects of *Monstrilla* sp. (Copepoda: Monstrilloida) and other parasites in the brown mussel *Perna perna* from Brazil. *J. Mar. Bio. Assoc. U.K.* 90, 953–958.

Sun, J., Wu, X., 2004. Histology, ultrastructure, and morphogenesis of a rickettsia-like organism causing disease in the oyster, *Crassostrea ariakensis* Gould. *J. Invert. Pathol.* 86, 77–86.

Villalba, A., Carballal, M.J., López, C., Cabada, A., Corral, L., Azevedo, C., 1999. Branchial *Rickettsia*-like infection associated with clam *Venerupis rhomboides* mortality. *Dis. Aquat. Org.* 36, 53–60.

Winstead, J.T., Volety, A.K., Tolley, S.G., 2004. Parasitic and symbiotic fauna in oyster (*Crassostrea virginica*) collected from the Caloosahatchee River and Estuary in Florida. *J. Shellfish Res.* 23, 831–840.

Wu, X.Z; Pan. J.P. 2000. An intracellular prokaryotic microorganism associated with lesions in the oyster, *Crassostrea ariakensis* Gould. *J. Fish. Dis.* 23, 409–414.

**CAPÍTULO III – Primeiro registro de *Perkinsus* sp. infectando a ostra de mangue *Crassostrea rhizophorae* da costa brasileira.**

**Revista: *Diseases of Aquatic Organisms***  
**Publicado em 22 de dezembro de 2009**  
**DOI: 10.3354/dao02136**

**Primeiro registro de *Perkinsus* sp. infectando a ostra de mangue *Crassostrea rhizophorae* da costa brasileira.**

Rachel Costa Sabry<sup>1</sup>, Rafael Diego Rosa<sup>2</sup>, Aimê Rachel Magenta Magalhães<sup>3</sup>, Margherita Anna Barracco<sup>2</sup>, Tereza Cristina Vasconcelos Gesteira<sup>1</sup>, Patrícia Mirella da Silva<sup>3,4\*</sup>.

<sup>1</sup>Instituto de Ciências do Mar, Universidade Federal do Ceará, Cx. P. 52756, Fortaleza, CE, Brasil.

<sup>2</sup>Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética, Universidade Federal de Santa Catarina, Cx. P. 476, Florianópolis, SC, Brasil.

<sup>3</sup>Departamento de Aquicultura, Universidade Federal de Santa Catarina, Cx. P. 476, Florianópolis, SC, Brasil.

<sup>4</sup>Presente endereço: Núcleo de Engenharia de Pesca, Departamento de Engenharia Agrônômica, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Sergipe, Rua Mal. Rondon s/n, Cidade Universitária Professor José Aloísio de Campos, Jardim Rosa Elze, CEP: 49100-000, São Cristóvão, SE, Brasil.

\* E-mail: mirella\_dasilva@hotmail.com

## RESUMO

Protozoários parasitas do gênero *Perkinsus* são considerados patógenos importantes responsáveis por mortalidades em massa de várias espécies de moluscos em todo o mundo. No presente estudo descreve-se, pela primeira vez, um parasita do gênero *Perkinsus* infectando a ostra-de-mangue *Crassostrea rhizophorae* na costa brasileira. A prevalência deste parasita no Estuário do Rio Pacoti (Ceará, nordeste do Brasil) foi baixa e ausente em ostras do sul do Brasil. Tecidos da brânquia e do reto da ostra incubados em Meio Líquido de Tioglicolato de Ray (*Ray's Fluid Thioglycollate Medium* – RFTM) revelaram a presença de hipnósporos esféricos (5 a 55 µm de diâmetro). A análise histológica revelou a ocorrência de trofozoítos em forma de anel típicos e esquizontes (3 a 6 µm de diâmetro) infectando o tecido conjuntivo de vários órgãos e epitélio digestivo. Ensaio específicos de PCR para o gênero *Perkinsus*, seguidos pela clonagem e sequenciamento da região do espaçador interno transcrito (*Internal Transcribed Spacer* – ITS) do complexo de genes do ácido ribonucléico ribossômico (rRNA) confirmaram que se trata de *Perkinsus* e detectou uma estreita relação filogenética entre a espécie brasileira *Perkinsus* sp. com *P. beihaiensis*, que infecta ostras chinesas.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Crassostrea rhizophorae*, ostra-de-mangue; *Perkinsus* sp.; PCR-RFLP; rRNA; RFTM; esporulação.

## INTRODUÇÃO

O estado de Santa Catarina, no sul do Brasil, é o maior produtor de moluscos bivalves do país (95%) (11.300 ton. em 2007). Esta atividade é de grande importância socioeconômica para a região. O mexilhão *Perna perna* e a ostra-do-pacífico, *Crassostrea gigas*, são as principais espécies cultivadas, sendo a vieira, *Nodipecten nodosus*, e a ostra-de-mangue, *Crassostrea rhizophorae*, cultivadas em menor escala. O Nordeste do Brasil tem um extenso sistema de estuários e manguezais no qual habitam diversas populações de ostras (*Crassostrea brasiliiana* e *C. rhizophorae*). Estas ostras são amplamente consumidas pelas populações locais. Assim, várias tentativas têm sido feitas para desenvolver a aquicultura de ostras nativas nessa região, porém com resultados modestos até o presente.

Em 2003, o governo brasileiro deu início ao *Programa Nacional de Sanidade de Animais Aquáticos* (PNSAA) para ajudar a impedir a introdução de doenças de animais exóticos e erradicar aquelas já presentes no país. Guiado por esta iniciativa, em 2007, iniciou-se um projeto de pesquisa para diagnosticar parasitas e doenças afetando espécies de bivalves cultivados e comestíveis de duas regiões brasileiras. O projeto foi concebido para pesquisar parasitas dentre populações silvestres e cultivadas de ostras *C. gigas* da Ilha de Santa Catarina e do estuário do Rio Pacoti (Fortaleza, Estado do Ceará, Nordeste do Brasil). Os resultados fornecem dados sobre a distribuição de patógenos e suscetibilidades dos hospedeiros aos patógenos, os quais qualificarão ainda mais os programas de monitoramento, ajudarão a evitar transferências de doenças a partir de populações infectadas e esforços para manter áreas não afetadas livres de parasitas.

O primeiro parasita do gênero *Perkinsus* descrito foi *P. marinus* (Mackin et al. 1950), que foi identificado como sendo responsável por surtos de mortalidade entre estoques de ostra *Crassostrea virginica* da Louisiana, E.U.A. Essa espécie foi inicialmente descrita como *Dermocystidium marinum*, parcialmente baseado nas características de hipnósporos hipertróficos e zoosporângio, que aumentam em tecidos de ostras infectadas quando incubadas em Meio de Líquido de Tioglicolato de Ray (RFTM) (Ray, 1952). Desde então uma diversidade de espécies de *Perkinsus* spp. tem sido registrada infectando muitas espécies comercialmente importantes de moluscos cultivadas no mundo inteiro.

*Perkinsus olsenii* foi primeiro descrita como um patógeno do abalone australiano *Haliotis ruber* (Lester & Davis 1981). Azevedo (1989) descreveu a espécie *Perkinsus atlanticus* infectando o bivalve

*Ruditapes decussatus* em Portugal. *Perkinsus atlanticus* que é atualmente sinônima de *Perkinsus olseni*, ocorrendo em uma vasta área geográfica e faixas de hospedeiros. Este foi posteriormente registrado em outras espécies de bivalves tais como *Pitar rostrata* no Uruguai (Cremonte et al. 2005a) e *Ruditapes philippinarum*, *Venerupis pullastra* e *Paphia aurea*, nas costas do Oceano Atlântico e mar Mediterrâneo da Espanha (Navas et al. 1992, Sagristá et al. 1995, Ordás et al. 2001). No entanto, muitos dos estudos acima foram baseados em características morfológicas, sem caracterizações moleculares. Casas et al. (2002a) descreveram a primeira utilização de métodos de biologia molecular para caracterizar *P. olseni* infectando *R. decussatus* da Espanha. Desde então, ferramentas moleculares têm sido utilizadas para descrever e confirmar *P. olseni* infectando diversas espécies de bivalves como *R. decussatus* da costa espanhola e do mar Mediterrâneo (Elandaloussi et al. 2009); *R. philippinarum* da Itália (Abollo et al. 2006), Coreia do Sul (Park et al. 2005) e China (Zhang et al. 2005); *Protothaca jedoensis* da Coreia do Sul (Park et al. 2006); *Austrovenus stutchburyi* da Nova Zelândia (Dungan et al. 2007); e *Tridacna crocea* do Vietnã (Sheppard & Phillips, 2008). Desde recente revisão sobre perkinsiose realizada por Villalba et al. (2004), na qual seis espécies de *Perkinsus* (*P. marinus*, *P. olseni*, *P. qugwadi*, *P. chesapeaki*, *P. andrewsi* e *P. mediterraneus*) foram consideradas válidas, os dados sobre genética molecular de espécies aumentaram. Como resultado, melhores caracterizações moleculares mostram que *P. chesapeaki* e *P. andrewsi* são sinônimos (Burreson et al. 2005) e mais duas novas espécies de *Perkinsus* foram descritas: *P. honshuensis* infectando bivalves em Manila no Japão (Dungan & Reece 2006) e *P. beihaiensis* infectando *Crassostrea hongkongensis*, *Crassostrea ariakensis* e outros bivalves, nas províncias de Fujian a Guangxi, no sul da China (Moss et al. 2008). Entre os moluscos hospedeiros brasileiros, *Crassostrea rhizophorae* é registrada como suscetível à *Perkinsus marinus* após infecções experimentais (Bushek et al. 2002). Com base nos resultados do ensaio RFTM, Littlewood (2000) relatou infecções naturais por *P. marinus* entre ostras-de-mangue *C. rhizophorae* da Jamaica, embora análises moleculares não tenham sido utilizadas para confirmar a identidade do parasita. Portanto, um programa de vigilância para perkinsiose foi iniciado ao longo da distribuição geográfica desta espécie de ostra em águas brasileiras. O presente estudo fornece características detalhadas sobre o primeiro registro da infecção de *Perkinsus* sp. em ostras *Crassostrea rhizophorae* brasileiras. As infecções foram detectadas por ensaios de RFTM; os parasitas foram confirmados *in situ* e



caracterizados pela histologia e o patógeno foi parcialmente caracterizado por métodos de genética molecular.

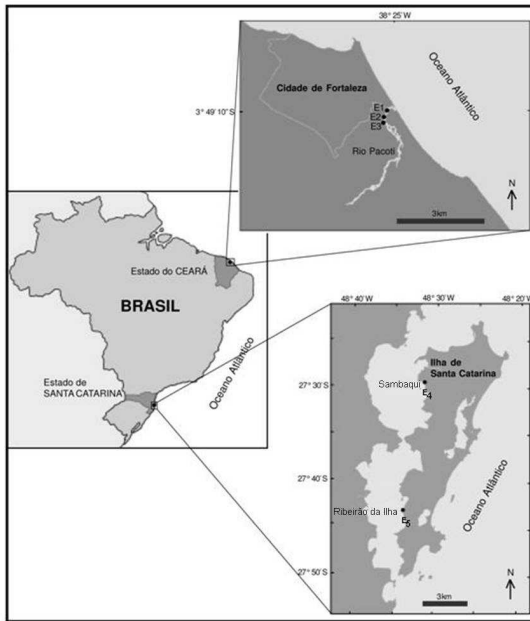
## MATERIAIS E MÉTODOS

### Amostragem

Ostras-de-mangue *Crassostrea rhizophorae* adultas foram coletadas na Ilha de Santa Catarina durante os meses de março e abril de 2008 e em Fortaleza, durante o mês de agosto de 2008. Na Ilha de Santa Catarina, as amostras foram coletadas no verão, por causa do aumento da temperatura da água do mar que poderia favorecer a proliferação do parasita. Em Fortaleza, as amostras foram coletadas durante o inverno, porque a temperatura da água do mar praticamente não varia durante o ano (comunicação pessoal dos autores). As ostras foram coletadas e mantidas em tanques com água do mar e aeração até as análises, por um máximo de 3 dias.

Na Ilha de Santa Catarina, ostras nativas foram amostradas em dois locais situados: no norte (Sambaqui; 27°29'18" S, 48°32'1" W) e no sul (Ribeirão da Ilha; 27°42'51" S, 48°34'6" W) (Fig. 1). As ostras desses locais se encontravam em zona entremarés, situada entre 200 m (Ribeirão) e 450 m (Sambaqui), das áreas de cultivo de *Crassostrea gigas*.

Em Fortaleza, as ostras *C. rhizophorae* foram coletadas em três diferentes pontos localizados dentro do Estuário do Rio Pacoti: Ponto 1 (3°49'8" S, 38°25'9" W), Ponto 2 (3°49'15" S, 38°25'10" W), e Ponto 3 (3°49'19" S, 38°25'11" W), onde não há cultivo de ostras *C. gigas* (Fig. 1). O Rio Pacoti é a mais importante via navegável que atravessa a região metropolitana de Fortaleza. O estuário é caracterizado por uma rica vegetação de mangue, incluindo *Rhizophora mangle*, cujas “raízes aéreas” (rizóforos) formam o substrato natural para a fixação de ostra. Para o presente estudo, as ostras foram coletadas neste substrato.



**Figura 1.** Locais de amostragem de ostras (S) no estuário do Rio Pacoti (Fortaleza) e na Ilha de Santa Catarina (Ribeirão da Ilha e Sambaqui).

A temperatura e a salinidade da água do mar foram medidas no dia da amostragem, em cada local, próximo à superfície (0,5 m), usando um termômetro de imersão e um refratômetro, respectivamente. Um total de 150 ostras foi analisado de cada local. As ostras ( $n = 750$ ) foram abertas, observadas macroscopicamente para anomalias, e processadas utilizando as técnicas recomendadas pela Organização Internacional de Epizootias (OIE) para a análise de *Perkinsus* sp. usando RFTM (OIE, 2006). Além disso, os tecidos de várias ostras foram aleatoriamente ou especificamente selecionados para outras técnicas de diagnóstico, como descrito em seguida.

### **Análise histológica**

Entre as 150 ostras coletadas por local, 30 foram selecionadas aleatoriamente para histologia. As ostras foram abertas e uma seção transversal de 5 mm de espessura, incluindo brânquias, gônadas e

tecidos digestivos foi retirada e fixada em fixador de Davidson (Shaw & Battle 1957) por 48 h. Os tecidos fixados foram incluídos em parafina, seccionados a 5 µm de espessura e corados com hematoxilina e eosina (HE) (Howard et al. 2004).

### **Detecção de *Perkinsus*. sp. por ensaios RFTM**

As ostras coletadas em cada local (n = 150) foram abertas e as duas lamelas branquiais de um lado do corpo e o reto foram extirpados e incubados em RFTM por 7 dias, no escuro, à temperatura ambiente. As amostras foram preparadas para análises microscópicas triturando-se as brânquias com um bisturi, adicionando gotas de solução de Lugol e posteriormente foram observadas para hipnósporos esféricos de *Perkinsus* sp. que se coram em preto. As prevalências das infecções por *Perkinsus* sp. foram estimadas pelas percentagens de ostras infectadas em cada amostra (n = 150).

Cada ostra foi avaliada utilizando a seguinte escala de intensidade de infecção: 0 = sem infecção, hipnósporos não foram observados em toda a lâmina; 1 = infecção muito leve, até 10 hipnósporos observados em toda a lâmina; 2 = infecção leve, de 11 a 100 hipnósporos observados em toda a lâmina; 3 = infecção moderada, pelo menos 40 hipnósporos observados em cada um dos 10 campos do microscópio (40x) espalhados pelo tecido e 4 = infecção intensa, mais de 40 hipnósporos observados em cada um dos 10-campos do microscópio (40x) espalhados pelo tecido.

### **Zoosporulação *in vitro***

Dois tecidos RFTM-positivos foram selecionados de uma amostragem extra de ostras coletadas em Fortaleza em agosto de 2008, lavados duas vezes com água do mar filtrada esterilizada (FSSW) e transferidos para placas de 24 poços de cultivo contendo 2 mL de FSSW. As placas foram incubadas por um período de 48 a 96 h em temperatura ambiente (cerca de 28°C) e analisadas periodicamente para zoosporulação em microscopia óptica.

### **Extração de DNA e ensaios de PCR**

Tecidos de brânquias de ostras selecionadas foram conservados em etanol 95% para posterior extração de seu DNA preservado para PCR. Dentre as 150 ostras coletadas em cada um dos dois locais de

amostragens da Ilha de Santa Catarina, o DNA dos tecidos branquiais das mesmas 30 ostras, aleatoriamente selecionadas para os testes histológicos, também foi preservado para ensaios de PCR ( $n = 60$ ). A partir de três amostras coletadas nos pontos do Estuário do Rio Pacoti próximo a Fortaleza, tecidos de brânquias de todas as 150 ostras dos pontos 1 e 3 foram preservados para ensaios de PCR, enquanto apenas 30 ostras do ponto 2 selecionadas para a histologia foram preservadas para testes de PCR ( $N_{\text{total}} = 330$ ).

O DNA de 29 ostras de Fortaleza foi analisado para *Perkinsus* sp. através de PCR, incluindo 21 que foram positivas em ensaios de RFTM, 6 que foram selecionadas aleatoriamente entre as ostras que foram RFTM-negativas (duas de cada local) e duas cujos tecidos foram usados para confirmar a indução da zoosporulação após incubação em RFTM. Nenhuma amostra da Ilha de Santa Catarina foi analisada através de PCR porque todos os ensaios de RFTM foram negativos.

A extração do DNA foi realizada com reagente DNAzol® (*Invitrogen*) seguindo o protocolo do fabricante. Para os ensaios de PCR foram utilizados *primers* PerKITS 85/750 que hibridizam especificamente regiões conservadas de espaçadores internos transcritos (ITS) da região do complexo de genes do ácido ribonucléico ribossômico (rRNA), que são exclusivos para membros do gênero *Perkinsus* (exceto para *P. qugwadi incertae sedis*) (Casas et al. 2002). O controle positivo foram células isoladas de um cultivo *in vitro* de *Perkinsus olsenii* oriundas de Galícia, Espanha (fornecido pelo Dr. Antonio Villalba). Para os controles negativos foi usada água livre de nuclease em vez de amostra de DNA.

As reações de PCR foram realizadas em reações de 25  $\mu$ l contendo 1  $\mu$ l (50 a 100 ng) da amostra de DNA genômico, tampão de PCR 1x concentrado,  $MgCl_2$  a 1,5 mM, nucleotídeos a 0,2 mM cada, iniciadores a 0,8  $\mu$ M e 1 unidade de *Taq* DNA polimerase (*Invitrogen*). O protocolo incluiu desnaturação do DNA a 94°C por 10 min.; 35 ciclos de amplificação a 94°C por 1 min, 55°C por 1 min e 72°C por 1 min seguido de uma extensão final a 72°C por 10 min. Os produtos da PCR foram separados num gel de agarose 1,5%, lavados em tampão 1x Tris-EDTA (TE) e corados com brometo etídio.

### Ensaio de PCR-RFLP

A identificação de *Perkinsus* spp. foi realizada utilizando ensaios de restrição do comprimento de fragmento de polimorfismo (RFLP) baseados na amplificação do PCR e digestões com endonuclease de

restrição da região-ITS (Abollo et al. 2006). As amplificações de PCR foram realizadas como descrito acima e as reações de digestão foram realizadas com as enzimas *RsaI* ou *HinfI*, seguindo as instruções do fabricante (*Promega*). Resumidamente, as reações de restrição foram realizadas num volume final de 20 µl contendo 3 µl de produtos de PCR, 2 µl de enzima tampão, de 0,2 µL de BSA, 0,5 µL de enzima de restrição (*RsaI* ou *HinfI*), diluído em água destilada esterilizada. As digestões foram realizadas durante 2 h a 37°C, seguidas por inativação da endonuclease por 20 min, a 65°C. Para melhorar a visualização dos padrões de fragmentos de restrição, 10 µL de produtos de PCR de endonuclease-digerida foram separados num gel de poliacrilamida não-desnaturante a 6%, corado com brometo de etídio. Perfis de restrição (n = 7) foram comparados com aqueles descritos para outras espécies de *Perkinsus* (Abollo et al. 2006), bem como com os isolados de DNA de *P. olsenii*. Os perfis de restrição esperados pela digestão da região ITS do DNA de *Perkinsus* sp. com *RsaI* ou *HinfI* foram determinados utilizando um software específico Mapper v.3.0 (<http://www.restrictionmapper.org>).

### **Clonagem molecular, sequenciamento de DNA e análises filogenéticas**

Produtos de PCR recém-amplificados da região ITS de *Perkinsus* sp. de 2 ostras *Crassostrea rhizophorae* infectadas foram clonados em um vetor de clonagem de PCR 2,1 TA usando um kit de clonagem TA (*Invitrogen*). Os clones recombinantes positivos foram identificados PCR de colônia com os *primers* de vetor M13 (*Invitrogen*) e 1 colônia de bactérias de cada amostra foi sequenciada em ambos sentidos. O sequenciamento foi realizado de forma automatizada por um Sistema de Análise de DNA MegaBace 1000, utilizando o kit Terminator DYEnamic ET Dye (GE Healthcare).

As sequências do ITS de *Perkinsus* sp. obtidas foram submetidas a buscas no BLASTN (Altschul et al. 1997) contra sequências do Centro Nacional para Informações de Biotecnologia (NCBI). As sequências foram alinhadas com sequências ITS previamente registradas obtidas no banco de dados do GenBank utilizando o programa Clustal X (Thompson et al. 1997). As sequências do GenBank incluídas na análise da região ITS são apresentadas na Tabela 1. A árvore filogenética foi construída utilizando o software MEGA 4 (Tamura et al. 2007), pelo método de máxima parcimônia.

Os valores percentuais do Bootstrap foram calculados a partir de 1.000 réplicas e o valor de corte para uma árvore condensada foi de 65%.

## RESULTADOS

As alturas médias ( $\pm$  DP) das ostras coletadas no Sambaqui, Ribeirão da Ilha e nos pontos 1, 2 e 3 do estuário do Rio Pacoti foram  $57 \pm 4,5$  mm,  $55 \pm 4,4$  mm,  $58 \pm 8,4$  mm,  $50 \pm 5,4$  mm e  $50 \pm 5,2$  mm, respectivamente. As temperaturas (e salinidades) da água do mar nesses locais foram  $24,2^{\circ}\text{C}$  (33,5 ‰),  $22,0^{\circ}\text{C}$  (26,5‰),  $30,8^{\circ}\text{C}$  (32 ‰),  $29,0^{\circ}\text{C}$  (29‰) e  $29,8^{\circ}\text{C}$  (23‰), respectivamente.

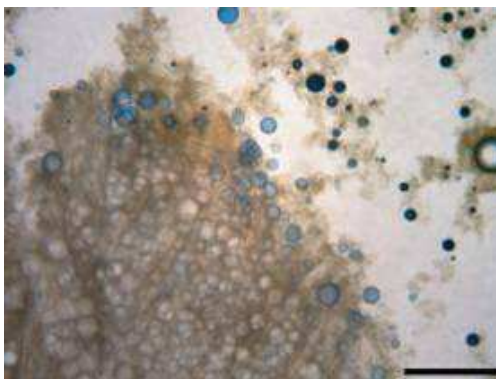
**Tabela 1.** Sequência do Genbank incluídas na análise da região do espaçador interno transcrito (*Internal Transcribed Spacer - ITS*) de *Perkinsus* sp.

Espécies	Números de acesso
<i>P. beihaiensis</i>	EF204019, EF204020, EF204021, EU068087, EU068091, EU068092
<i>P. chesapeaki</i>	AY876302, AY876304, AY876305, AY876311, AY876314
<i>P. honshuensis</i>	DQ516696, DQ516697, DQ516698, DQ516701, DQ516702
<i>P. marinus</i>	AY295180, AY295188, AY295189, AY295194, AY295199
<i>P. mediterraneus</i>	AY487834, AY487837, AY487842, DQ370491, DQ370492
<i>P. olseni</i>	AF441207, AF441209, AF441213, AY435092, AY820757
<i>P. qugwadi</i> (táxon fora do grupo)	AF151528

### Diagnóstico de *Perkinsus* sp. por ensaios RFTM

O ensaio RFTM foi usado como a primeira e principal técnica de diagnóstico para *Perkinsus* sp. Todas as ostras em Sambaqui e Ribeirão da Ilha (Florianópolis) foram negativas para perkinsiose em ensaios RFTM. Em contrapartida, o Estuário do Rio Pacoti (Fortaleza) teve ostras infectadas por *Perkinsus* sp. As células aumentadas do patógeno tinham forma esférica, de 5 a 55  $\mu\text{m}$  de diâmetro e foram coradas em

claro ou escuro dependendo da profundidade de penetração do lugol (Fig. 2). A prevalência média de ostras infectadas de amostras do estuário do Rio Pacoti foi de 5,78% (26 de 450) com uma variação nos diferentes locais de 5,3 a 6,7% (Tabela 2). Dentre 26 ostras RFTM-positivas, 22 apresentaram infecção muito leve e 4 (dos locais 1 e 3) apresentaram infecção intensa (Fig. 2).



**Figura 2.** Preparação das brânquias de *Crassostrea rhizophorae* incubadas em RFTM e coradas com lugol. Observam-se numerosos hipnósporos de *Perkinsus* sp., em um caso de intensidade avançada. Barra da escala = 200  $\mu$ m.

**Tabela 2.** Prevalência (%) da infecção por *Perkinsus* sp. na ostra *Crassostrea rhizophorae* do estuário do Rio Pacoti (Fortaleza), baseada em ensaios com Meio Fluido de Tioglicolato de Ray (RFTM) e histologia. Os números entre parênteses representam o número de ostras positivas em relação ao número total de amostras analisadas por cada técnica.

RFTM	Local da amostra	Histologia
5,3% (8 de 150)	1	3,3% (1 de 30)
5,3% (8 de 150)	2	10,0% (3 de 30)
6,7% (10 de 150)	3	10,0% (3 de 30)

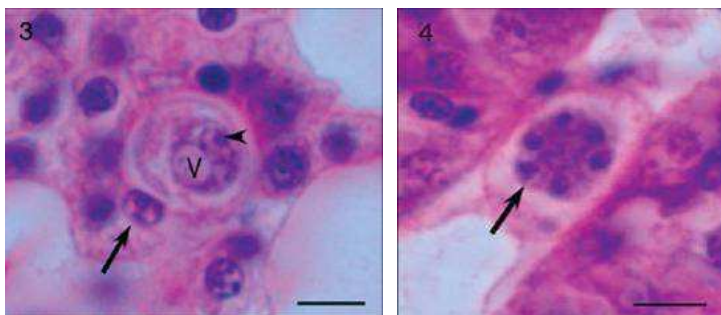
## **Análise histológica**

As ostras coletadas na Ilha de Santa Catarina não apresentaram qualquer trofozoíto de *Perkinsus* sp. em análises histológicas. Amostras de ostras do Estuário do Rio Pacoti continham 26 ostras com hipnósporos aumentados de *Perkinsus* sp. após incubação em RFTM, porém tecidos de apenas 7 destas ostras foram fixados e incluídos em parafina para análise histológica (Tabela 2). Destas 7 ostras, apenas uma (oriunda do ponto 3; encontrava-se intensamente infectada por *Perkinsus* sp. em RFTM) foi positiva nos cortes histológicos e as ostras restantes (com infecção muito leve em RFTM) não apresentaram qualquer parasita nos cortes histológicos. A infecção de *Perkinsus* confirmada histologicamente foi caracterizada pela presença de trofozoítos (3 a 6  $\mu\text{m}$  de diâmetro) e esquizontes proliferando ativamente (4 a 6  $\mu\text{m}$  de diâmetro) entre o tecido conjuntivo (Figs. 3 e 4) do manto, palpos labiais e glândula digestiva, embora algumas células epiteliais dos túbulos digestivos também tenham sido infectadas nessas ostras. Os trofozoítos de *Perkinsus* sp. apresentaram morfologia típica de anel com um vacúolo excêntrico ocupando uma grande área do citoplasma e um núcleo excêntrico com um nucléolo proeminente (Fig. 3). Trofozoítos e esquizontes foram sistematicamente observados fagocitados por hemócitos (Figs. 3 e 4), rodeados por uma matriz acidofílica acelular e, aparentemente, saudável. A infiltração hemocítica não foi associada com patógenos. Observações adicionais em ostras infectadas são necessárias para conhecer de forma abrangente os efeitos dessa espécie de *Perkinsus* sp. sobre os tecidos do hospedeiro *Crassostrea rhizophorae*.

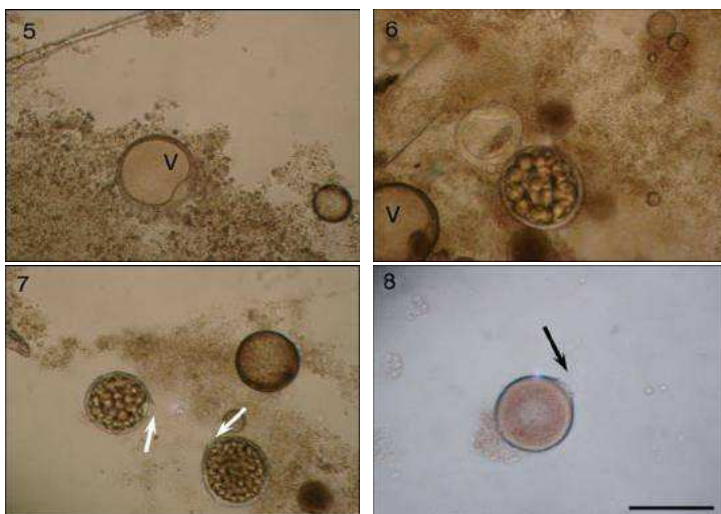
## **Zoosporulação do parasita**

Após 48 a 96 h de incubação em FSSW dos hipnósporos aumentados de *Perkinsus* sp. em RFTM, a zoosporulação ocorreu. Vários estágios da vida do parasita foram observados, incluindo maduros, esporulação de pré-hipnósporos, zoosporângio mostrando subdivisões redutivas progressivas e proliferativas de zoosporontes, agrupamentos de células-irmãs de zoosporonte e zoosporângio maduro contendo numerosos zoósporos móveis (Figs. 5 a 8). Apenas um tubo de descarga ocorreu em cada zoosporângio (Figs. 7 e 8). Zoósporos (2  $\mu\text{m}$ ) foram observados deixando o tubo de descarga.





**Figuras 3 e 4.** *Perkinsus* sp. infectando o tecido conjuntivo da ostra-de-mangue *Crassostrea rhizophorae*. Figura 3. Trofozoíto fagocitado mostrando uma típica aparência anelada, um grande vacúolo (V) e um núcleo excêntrico com nucléolo proeminente (ponta de seta). Nota: núcleo (seta) do hemócito que fagocitou o trofozoíto. Figura. 4. Esquizonte de *Perkinsus* sp. (seta) contendo pequenas células-filhas no interior do tecido conjuntivo entre dois túbulos da glândula digestiva. Hematoxilina e eosina. Barras de escala = 5 µm.



**Figuras 5 a 8.** Esporulação *in vitro* de *Perkinsus* sp. em água do mar filtrada esterilizada. Fig. 5. Hipnósporo com um grande vacúolo central (V) e um núcleo periférico excêntrico. Fig. 6. Zoosporângio contendo aproximadamente 32 células zoosporantes em subdivisão. Fig. 7. Dois zoosporantes em estágios avançados de zoosporulação e mostrando tubos de descarga (setas). Fig. 8. Zoosporângio com tubo de descarga distendido (seta) e numerosos zoósporos. Barras da escala = 50 µm.

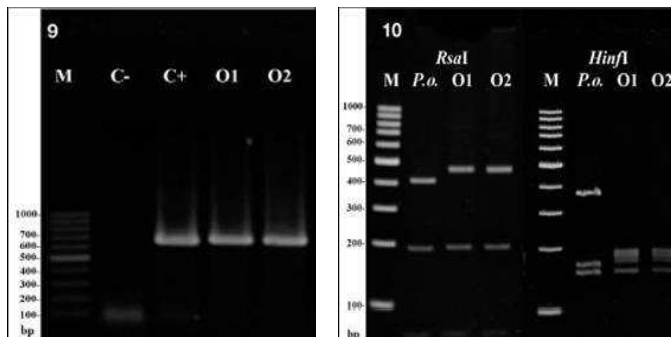
## Detecção de *Perkinsus* sp. por PCR

Em um total de 26 ostras do Estuário do Rio Pacoti o resultado foi positivo para *Perkinsus* sp. por ensaios RFTM: 8 do ponto 1; 8 do ponto 2 e 10 do ponto 3. Dentre as 26 ostras RFTM-positivas, 21 tinham tecidos de DNA preservados para análise de PCR: 8, 3 e 10 ostras dos pontos 1, 2 e 3 respectivamente. O par de *primers* PerkITS resultou em *amplicons* do tamanho esperado (687 bp) em 16 das 21 (76%) amostras (Fig. 9) e 5 foram negativas (2 do ponto 1 e 3 do ponto 3). Os ensaios foram repetidos duas vezes para as amostras negativas. As ostras que foram RFTM-positivas e PCR-negativas para *Perkinsus* sp. apresentaram brânquias com baixas intensidades de infecção nos ensaios de RFTM. Seis amostras RFTM-negativas (duas de cada ponto do estuário do Rio Pacoti) também foram negativas por PCR. Duas amostras extras utilizadas para experimentos de zoosporulação do parasita foram analisadas por PCR e ambas produziram *amplicons* positivos.

## Ensaio de PCR-RFLP

A endonuclease *RsaI* produziu três fragmentos a partir de *amplicons* de PCR para todas as sete ostras infectadas por *Perkinsus* sp. (Fig. 10). Os tamanhos destes fragmentos corresponderam a cerca de: 74, 195 e 418 pb, como previsto pela análise da sequência posterior com o software. Os isolados *in vitro* de *P. olseni* produziram três fragmentos com tamanhos de banda semelhantes, mas não idênticos (Fig. 10).

Os padrões de RFLP, a partir de digestões de *HinfI* de *amplicons* de PCR oriundos de *Perkinsus* sp. que infectou as ostras *Crassostrea rhizophorae* brasileiras, todos continham cinco fragmentos. Quatro deles foram individualmente separados no gel poliacrilamida a 189, 173, 161 e 153 pb. Um adicional não foi visualizado por ser muito pequeno (Fig. 10), de 11 pb previsto pela análise da sequência posterior. Ao contrário, por análise semelhante com a mesma endonuclease, *P. olseni* mostrou apenas três fragmentos (Fig. 10).



**Figuras 9 e 10.** Diagnóstico molecular de *Perkinsus* sp. infectando a ostra-de-mangue *Crassostrea rhizophorae*. Figura 9. Detecção da região ITS do rDNA de *Perkinsus* sp por PCR. M: marcadores de tamanho molecular 100 bp; C-: controle negativo (água); C+: controle positivo (DNA isolado de *P. olseni*); O1: ostra 1 (*Perkinsus* sp.); O2: ostra 2 (*Perkinsus* sp.). Figura 10. PCR-RFLP para o diagnóstico diferencial de *Perkinsus* spp. A fragmentação dos padrões de produtos amplificados de PCR da região ITS do rDNA de *P. olseni* (*P.o.*) e o *Perkinsus* sp. (O1 e O2), após digestão com endonucleases *RsaI* e *HinfI*.

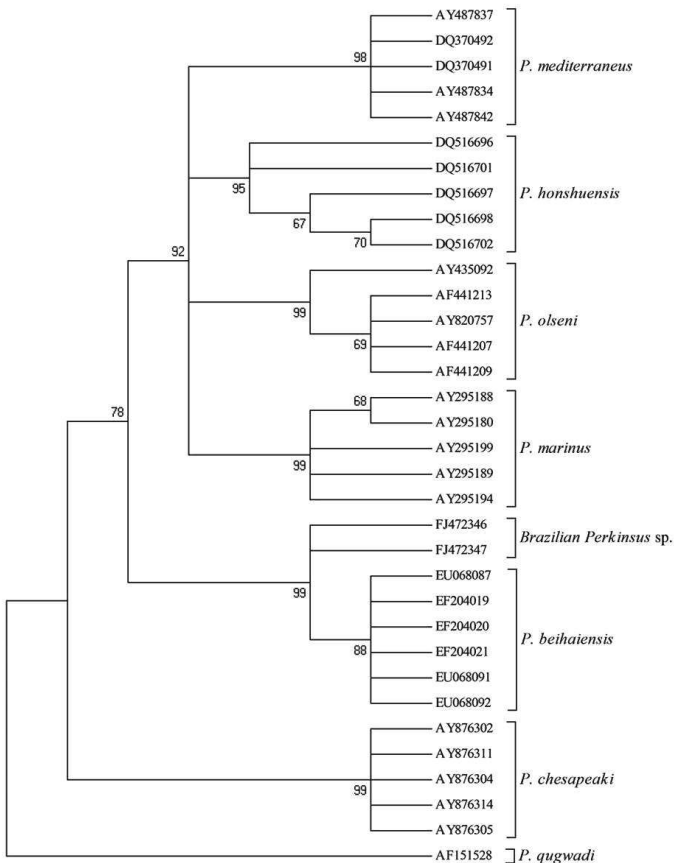
### **Análise filogenética da região ITS do rDNA**

A análise filogenética das sequências de DNA da região ITS do parasita foi realizada para avaliar as afinidades taxonômicas de *Perkinsus* sp. do Brasil. Os produtos esperados da região ITS de 687 pb amplificados a partir de duas ostras *Crassostrea rhizophorae* PCR-positiva foram sequenciados e comparados com sequências relatadas para outras espécies de *Perkinsus*. Sequências de nucleotídeo da região ITS de *Perkinsus* sp. do Brasil foram depositadas no *GenBank* sob os números de acesso FJ472346 e FJ472347.

Pesquisas no BLASTN indicaram que sequências de nucleotídeos da região ITS de ambos isolados de PCR brasileiros apresentaram a maior identidade (97%) e também mostrou similaridades próximas para sequências oriundas de regiões ITS de outras espécies de *Perkinsus*. Ambas as sequências da espécie *Perkinsus* sp. brasileira compartilharam identidades altas de nucleotídeos (~ 98%) com aqueles recentemente descritos para infecção por *P. beihaiensis* nas ostras chinesas *Crassostrea ariakensis* e *C. hongkongensis* (Moss et al. 2008). Houve também sequências da região ITS moderadamente semelhantes às sequências da região ITS de *P. mediterraneus* (~ 87%), *P. olseni* (~ 86%), *P. honshuensis* (~ 86%), *P. marinus* (~ 82%) e *P. chesapeakei* (~ 82%);

enquanto que *Perkinsus qugwadi* (grupo de fora) apresentou a menor homologia (<40%).

A análise de máxima de parcimônia indicou uma relação filogenética próxima entre isolados por PCR de *Perkinsus* brasileiro e *P. beihaiensis*. As sequências da região ITS obtidas foram agrupadas com forte apoio num clado monofilético próximo de *P. beihaiensis*, o qual é irmã de um outro clado monofilético contendo *Perkinsus olseni*, *P. marinus*, *P. mediterraneus* e *P. honshuensis*. O grupo mais distante dos isolados por PCR brasileiros, fora o grupo de fora de *P. qugwadi*, foi *P. chesapeaki* (Fig. 11).



**Figura. 11.** Análise de máxima parcimônia das sequências da região ITS do rDNA de diferentes espécies de *Perkinsus*. Os números mostram valores bootstrap (%) para 1.000 réplicas.

## DISCUSSÃO

Este estudo descreve, pela primeira vez em um molusco brasileiro, a presença de uma infecção pelo protozoário *Perkinsus* sp. em ostras-do-mangue *Crassostrea rhizophorae* do estuário do Rio Pacoti e que não foi detectado em ostras do sul do Brasil. O parasita foi detectado por ensaios de RFTM, que são relatados como sendo uma técnica sensível e confiável de diagnóstico para a detecção de *Perkinsus* sp. (Reece & Dungan 2006) e confirmado histologicamente. Ensaios de PCR específicos para o gênero *Perkinsus*, seguidos por clonagem e sequenciamento de *amplicons* da região ITS conservada entre as espécies conhecidas de *Perkinsus* spp. (exceto *P. qugwadi sincertae sedis*) (Casas et al. 2002a), posteriormente confirmaram esses achados.

As diferenças de tamanho entre os trofozoítos observados em cortes histológicos e os hipnósporos observados após a incubação de tecidos infectados em RFTM demonstraram o alargamento de trofozoítos em RFTM, que é característico em *Perkinsus* spp. (Ray 1954, 1966), exceto *P. qugwadi* (Blackbourn et al. 1998). A duração de tempo nas mudanças morfológicas através de todo o processo de zoosporulação e as características morfológicas dos zoósporos são todas consistentes com as observações de outros *Perkinsus* spp. (Sunila et al. 2001, Casas et al. 2002b, Dungan & Reece 2006, Dungan et al. 2007, Moss et al. 2008).

Em cortes histológicos, as células de *Perkinsus* sp. infectando *C. rhizophorae* eram pequenas (3 a 6  $\mu\text{m}$ ) e mostraram a morfologia anelada típica de membros do gênero. Além disto, este *Perkinsus* sp. apresentou algumas semelhanças com a infecção por *P. beihaiensis* em ostras chinesas (Moss et al. 2008), tais como o tamanho pequeno, prevalências de infecções com intensidade baixa do epitélio digestivo. Em contraste, epitélios de bivalves japoneses *Ruditapes philippinarum* não foram tipicamente infectados por *P. honshuensis* ou *P. olseni* (Dungan & Reece 2006), os quais possuem distribuições quase exclusivas entre os tecidos conjuntivos (Dungan et al. 2007). No entanto, as consequências patológicas de infecções entre *C. rhizophorae* do nordeste do Brasil podem ter sido subestimadas devido ao baixo número de ostras com intensidade avançada (1 de 26, 3,85%) que estiveram disponíveis para análise histológica. No presente trabalho relata-se os resultados histológicos de uma ostra intensamente infectada. *Perkinsus beihaiensis* causou lesões necróticas dentro o estômago,

intestino e epitélios da glândula digestiva de ostras chinesas infectadas (Moss et al. 2008).

A fagocitose é o mecanismo de defesa celular mais importante dos bivalves, e as células de *Perkinsus* sp., devido ao seu pequeno tamanho, foram encontradas fagocitadas pelos hemócitos de *Crassostrea rhizophorae*. No entanto, a resposta pode ter sido ineficaz para matar o parasita, uma vez que esquizontes íntegros e trofozoítos foram observados dentro de vacúolos fagocíticos. Esta resposta é comum entre ostras infectadas por *P. marinus* (La Peyre et al. 1995, Villalba et al. 2004) e foi observada em ostras intensamente infectadas por *P. beihaiensis* (Moss et al. 2008). Em contraste, *P. olsenii*, cujos trofozoítos são maiores, muitas vezes mostram encapsulamento em vez de fagocitose como reação do hospedeiro contra o patógeno (Montes et al. 1995, Park & Choi 2001, Dungan & Reece, 2006).

No presente estudo, a prevalência de infecções de *Perkinsus* sp. foi relativamente baixa e consistente com o fato que não ocorreram mortalidades entre ostras nas populações afetadas que foram pesquisadas durante esta investigação. *P. marinus*, uma das espécies mais nocivas para seu hospedeiro, a ostra *Crassostrea virginica* nos Estados Unidos, regularmente causa prevalências elevadas de infecções de alta intensidade, que resultam em mortalidades sazonais de ostras (Ragone-Calvo et al. 2003). Em contraste, *P. marinus* infectando *Crassostrea corteziensis* no México mostrou prevalências muito baixas (1 a 6%) e infecções tipicamente de baixa intensidade (Gullian-Klanian et al. 2008). *Perkinsus beihaiensis*, que é largamente difundido ao longo da costa sul da China, infecta pelo menos duas espécies de ostras com prevalência variável, dependendo do local (Moss et al. 2008).

No presente trabalho, ensaios de PCR não confirmaram (5 de 21, 25%) casos de RFTM-positivos. A razão mais provável para esta discrepância é a intensidade geralmente baixa da maioria das infecções e os pequenos volumes de tecidos de brânquia, a partir dos quais o DNA para os ensaios de PCR foram extraídos e amplificados. Em nosso protocolo, relativamente grandes volumes de tecidos branquiais foram analisados por ensaios de RFTM, enquanto relativamente pequenas subamostras de DNA desses tecidos foram testadas por ensaios de PCR. Discrepâncias semelhantes entre os resultados de ensaios de RFTM e PCR têm sido descritos por outros autores (Reece et al. 2009) e diversas fontes de artefatos de erro de amostragem que qualificam a acuidade de ensaios de PCR têm sido revistas, incluindo os efeitos de lesões focais ou localizadas (Burreson 2008).

Apesar do fato de que as infecções por *Perkinsus olseni* são relatadas em bivalves *Pitar rostrata* da vizinhança do Uruguai (Cremonte et al. 2005), nenhuma infecção por *Perkinsus* sp. foi encontrada entre as ostras amostradas nos locais do presente trabalho na maior região produtora de ostra do sul do Brasil, que é localizada a 1.360 km da capital uruguaia. A atribuição do patógeno brasileiro para o gênero *Perkinsus* foi confirmada posteriormente quando a região ITS foi amplificada através da PCR com iniciadores específicos para o gênero (Casas et al. 2002a). Os padrões de restrição da região amplificada obtidos através da digestão com duas endonucleases permitem a discriminação entre a infecção por *Perkinsus* sp., em *C. rhizophorae* da costa brasileira de pelo menos quatro *Perkinsus* spp. (*P. marinus*, *P. chesapeakei*, *P. olseni* e *P. mediterraneus*), cujos perfis de PCR-RFLP estão disponíveis para comparação (Abollo et al. 2006). Esses resultados indicam que *Perkinsus* sp. infectando *C. rhizophorae* não pertence nem à espécie de *Perkinsus* previamente relatada no Uruguai (*P. olseni*) (Cremonte et al. 2005), nem mesmo àquela infectando a mesma espécie de ostra na Jamaica (*Perkinsus* cf. *marinus*) (Littlewood 2000), embora o último estudo não tenha utilizado ferramentas moleculares para a identificação da espécie do parasita.

O padrão de RFLP de endonuclease *Rsa*I de *Perkinsus* sp. brasileiro diferiu ligeiramente daquele de *P. olseni* e *P. mediterraneus* e consistentemente diferiu daquele de *P. chesapeakei* e *P. marinus* (Abollo et al. 2006). Em contrapartida, o padrão *Hinf*I RFLP de *Perkinsus* sp. só foi similar ao daquele de *P. mediterraneus*, que também mostrou quatro fragmentos (149, 162, 179 e 192 pb) (Abollo et al. 2006). Diferenças sutis entre padrões de banda de RFLP obtidos a partir de *Perkinsus* sp. brasileiro, *P. olseni* (*Rsa*I) e *P. mediterraneus*. (*Hinf*I), foram mais facilmente separados em géis de poliacrilamida 6% do que em géis de agarose (Abollo et al. 2006). Assim, recomenda-se o uso de gel não-desnaturante de poliacrilamida para melhorar a sensibilidade de diagnóstico diferencial de *Perkinsus* spp. por PCR-RFLP. No entanto, a RFLP sozinha não pode ser usada para determinar a identificação do parasita, especialmente para um eventual novo membro do gênero *Perkinsus*. A análise filogenética baseada em sequências de nucleotídeos na região ITS do rDNA, consistentemente alocou os isolados brasileiros de PCR no gênero *Perkinsus* e revelou alta homologia com sequências oriundas da infecção descrita recentemente por *Perkinsus beihaiensis* de ostras chinesas (Moss et al. 2008). Infelizmente, o padrão de RFLP para *P. beihaiensis* e *P. honshuensis* e de mais duas espécies descritas

recentemente de *Perkinsus* não puderam ser incluídos na análise desta pesquisa, uma vez que o DNA não estava disponível para o teste.

A análise de máxima parcimônia mostrou que as duas sequências de *Perkinsus* sp. brasileiro formaram clado monofilético distinto próximo ao clado de *Perkinsus beihaiensis*. No entanto, para avaliar rigorosamente as aparentes relações filogenéticas que possam existir entre *P. beihaiensis* e infecções por *Perkinsus* sp. em ostra-de-mangue, *C. rhizophorae* exigirá extensa análise de sequências de nucleotídeos de genes adicionais.

Conclui-se que as características morfológicas observadas por microscopia óptica tais como o alargamento de RFTM, o surgimento de trofozoítos anelados, assim como os diversos e consistentes resultados de genética molecular obtidos, conclusivamente apoiam a inclusão do patógeno infectando *C. rhizophorae* como um membro do gênero *Perkinsus*. Além disso, algumas semelhanças entre este *Perkinsus* sp. e *P. beihaiensis*, baseado em características histológicas e genética molecular sugerem uma afinidade taxonômica. É surpreendente que um *Perkinsus* sp. encontrado em um molusco hospedeiro brasileiro pudesse mostrar afinidades taxonômicas em potencial com um parasita encontrado em ostras chinesas e não com *Perkinsus* spp. oriundo de regiões vizinhas, incluindo *P. marinus* infectando *C. virginica* no Golfo do México (Gullian-Klanian et al. 2008) e *Perkinsus olseni* infectando *Pitar rostrata* ao longo da costa do Uruguai (Cremonte et al. 2005). Futuros desafios incluem uma descrição completa da infecção de *Perkinsus* sp., na ostra brasileira *C. rhizophorae*; o estabelecimento de culturas isoladas *in vitro* para a identificação definitiva; determinação da gama de hospedeiros, efeitos patológicos e epidemiologia das infecções.

### **Agradecimentos**

Os autores são gratos ao Dr. A. Villalba do Centro de Investigaciones Marinas (CIMA, Galicia, Espanha), que gentilmente proveu culturas isoladas preservadas de *Perkinsus olseni*. Agradecemos também a Bolsa de Pós-Doutoramento para P.M.S. do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Bolsa de Doutorado Amazônia Azul para R.C.S. da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). Este trabalho foi financiado pelo MCT/CNPq/MAPA/SDA (Nº 64/2008).



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abollo, E.; Casas, S.M.; Ceschia, G.; Villalba, A. (2006). Differential diagnosis of *Perkinsus* species by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism assay. *Mol Cell Probes* 20: 323–329.
- Altschul, S.F.; Madden, T.L.; Schaffer, A.A.; Zhang, J.; Zhang, Z.; Miller, W.; Lipman, D.J. (1997). Gapped BLAST and PSIBLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25: 3389–3402.
- 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.
- Blackbourn, J.; Bower, S.M.; Meyer, G.R. (1998). *Perkinsus qugwadi* sp. nov. (*incertae sedis*), a pathogenic protozoan parasite of Japanese scallops, *Patinopecten yessoensis*, cultured in British Columbia, Canada. *Can. J. Zool.* 76: 942–953.
- Burreson, E.M. (2008). Misuse of PCR assay for diagnosis of mollusk protistan infections. *Dis. Aquat. Org.* 80: 81–83.
- Burreson, E.M.; Reece, K.S.; Dungan, C.F. (2005). Molecular, morphological, and experimental evidence support the synonymy of *Perkinsus chesapeaki* and *Perkinsus andrewsi*. *J. Eukaryot. Microbiol.* 52: 258–270.
- Bushek, D.; Scarpa, J.; Laramore, S.E. (2002). Susceptibility of the Caribbean oyster *Crassostrea rhizophorae* to *Perkinsus marinus*. (Abstract). *J. Shellfish Res.* 21: 371–372.
- Casas, S.M.; Villalba, A.; Reece, K.S. (2002a). Study of perkinsosis 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: 51–65.
- Casas, S.M.; La Peyre, J.F.; Reece, K.S.; Azevedo, C.; Villalba, A. (2002b). Continuous *in vitro* culture of the carpet shell clam *Tapes decussates* protozoan parasite *Perkinsus atlanticus*. *Dis. Aquat. Org.* 52: 217–231.

Cremonte, F.; Figueras, A.; Burreson, E.M. (2005). A histopathological survey of some commercially exploited bivalve molluscs in northern Patagonia, Argentina. *Aquaculture* 24 9:23–33.

Dungan, C.F.; Reece, K.S.(2006). *In vitro* propagation of two *Perkinsus* spp. parasites from Japanese Manila clams *Venerupis philippinarum* and description of *Perkinsus honshuensis* n. sp. *J. Eukaryot. Microbiol.* 53: 316–326.

Dungan, C.F.; Reece, K.S.; Moss, J.A.; Hamilton, R.M.; Diggles, B.K. (2007). *Perkinsus olseni* *in vitro* isolates from the New Zealand clam *Austrovenus stutchburyi*. *J. Eukaryot. Microbiol.* 54: 263–270.

Elandaloussi, L.M.; Carrasco, N.; Roque, A.; Andree, K.; Furones, M.D. (2009). First record of *Perkinsus olseni*, a protozoan parasite infecting the commercial clam *Ruditapes decussatus* in Spanish Mediterranean waters. *J. Invertebr. Pathol.* 100: 50–53.

Gullian-Klanian, M.; Herrera-Silveira, J.A.; Rodríguez-Canul, R.; Aguirre-Macedo, L. (2008). Factors associated with the prevalence of *Perkinsus marinus* in *Crassostrea virginica* from the southern Gulf of Mexico. *Dis. Aquat. Org.* 79: 237–247.

Howard, D.W.; Lewis, E.J.; Keller, B.J.; Smith, C.S. (2004). *Histological techniques for marine bivalve mollusks and crustaceans*, 2nd edn. NOAA Technical Memorandum NOS NCCOS 5.

La Peyre, J.F.; Chu, F.E.; Vogelbein, W.K. (1995). *In vitro* interaction of *Perkinsus marinus* merozoites with eastern and Pacific oyster hemocytes. *Dev. Comp. Immunol.* 19: 291–304.

Lester, R.J.G.; Davis, G.H.G. (1981). A new *Perkinsus* species (Apicomplexa, Perkinsa) from the abalone *Haliotis ruber*. *J. Invertebr. Pathol.* 37: 181–187.

Littlewood, D.T.J. (2000). First report of the protozoan *Perkinsus* cf. *marinus* in the Mangrove oyster *Crassostrea rhizophorae* (Guilding). *Caribb. J. Sci.* 36: 153–154.

- Mackin, J.G.; Owen, H.M.; Collier, A. (1950). Preliminary note on the occurrence of a new protistan parasite, *Dermocystidium marinum* n. sp., in *Crassostrea virginica* (Gmelin). *Science* 111: 328–329.
- Montes, J.F.; Durfort, M.; García-Valero, J. (1995). Cellular defence mechanism of the clam *Tapes semidecussatus* against infection by the protozoan *Perkinsus* sp. *Cell Tissue Res.* 279: 529–538.
- Moss, J.A.; Xiao, J.; Dungan, C.F.; Reece, K.S. (2008). Description of *Perkinsus beihaiensis* n. sp., a new *Perkinsus* sp. Parasite in oysters of southern China. *J. Eukaryot. Microbiol.* 55: 117–130.
- Navas, J.I.; Castillo, M.C.; Vera, P.; Ruiz-Rico, M. (1992). Principal parasites observed in clams, *Ruditapes decussates* (L. ), *Ruditapes philippinarum* (Adams et Reeve), *Venerupis pullastra* (Montagu) and *Venerupis aureus* (Gmelin), from the Huelva coast (S.W. Spain). *Aquaculture* 107: 193–199.
- OIE (Office International des Épizooties) (2006). *Manual of diagnostic test for aquatic animals*, 5th edn. OIE, Paris.
- Ordás, M.C.; Gomez-Leon, J.; Figueras, A.(2001). Histopathology of the infection by *Perkinsus atlanticus* in three clam species (*Ruditapes decussatus*, *R. philippinarum* and *R. pullastra*) from Galicia (NW Spain). *J. Shellfish Res.* 20: 1019–1024.
- Park, K.Y.; Choi, K.S. (2001). Spatial distribution and infection intensity of the protozoan parasite *Perkinsus* sp. in the Manila clam *Ruditapes philippinarum* in Korea. *Aquaculture* 203: 9–22.
- Park, K.I.; Park, J.K.; Lee, J.; Choi, K.S. (2005). Use of molecular markers for species identification of Korean *Perkinsus* sp. isolated from Manila clams *Ruditapes philippinarum*. *Dis. Aquat. Org.* 66: 255–263.
- Park, K.I.; Ngo, T.T.; Choi, S.D.; Cho, M.; Choi, K.S. (2006). Occurrence of *Perkinsus olseni* in the Venus clam *Protothaca jedoensis* in Korean waters. *J. Invertebr. Pathol.* 93: 81–87.
- Ragone Calvo, L.M.; Dungan, C.F.; Roberson, B.S.; Bureson, E.M. (2003). Systematic evaluation of factors controlling *Perkinsus marinus*

transmission dynamics in lower Chesapeake Bay. *Dis. Aquat. Org.* 56: 75–86.

Ray, S.M. (1952). A culture technique for the diagnosis of infection with *Dermocystidium marinum* Mackin, Owen, and Collier in oysters. *Science* 116: 360–361.

Ray, S.M. (1954). *Biological studies of Dermocystidium marinum, a fungus parasite of oysters*. Rice Institute pamphlet (Monogr Biol Spec Ser Iss), Rice Institute, Washington, DC.

Ray, S.M. (1966). A review of the culture method for detecting *Dermocystidium marinum*, with suggested modifications and precautions. *Proc. Natl. Shellfish Assoc.* 54: 55–69.

Reece, K.; Dungan, C. (2006). *Perkinsus* sp. infections of marine molluscs. In: AFS-FHS *Blue Book: suggested procedures for detection and identification of certain finfish and shellfish pathogens*, 6th edn., Chap. 5.2: 1–17. Fish Health Section, American Fisheries Society, Bethesda, MD.

Reece, K.S.; Dungan, C.F.; Burreson, E.M. (2008). Molecular epizootiology of *Perkinsus marinus* and *P. chesapeakei* infections among wild oysters and clams in Chesapeake Bay, USA. *Dis. Aquat. Org.* 82: 237–248.

Sagrìstà, E.; Durfort, M.; Azevedo, C. (1995). *Perkinsus* sp. (Phylum Apicomplexa) in Mediterranean clam *Ruditapes semidecussatus*: ultrastructural observations of the cellular response of the host. *Aquaculture*. 132: 153–160.

Shaw, B.L.; Battle, H. (1957). The gross and microscopic anatomy of the digestive tract of the oyster *Crassostrea virginica* (Gmelin). *Can. J. Zool.* 35: 325–347.

Sheppard, B.J.; Phillips, A.C. (2008). *Perkinsus olseni* detected in Vietnamese aquacultured reef clams *Tridacna crocea* imported to the USA, following a mortality event. *Dis. Aquat. Org.* 79: 229–235.

Sunila, I.; Hamilton, R.M.; Dungan, C.F. (2001). Ultrastructural characteristics of the in vitro cell cycle of the protozoan pathogen of oysters, *Perkinsus marinus*. *J. Eukaryot. Microbiol.* 48: 348–361.

Tamura, K.; Dudley, J.; Nei, M.; Kumar, S. (2007). Mega4: molecular evolutionary genetics analysis (Mega) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24: 1596–1599.

Thompson, J.D.; Gibson, T.J.; Plewniak, F.; Jeanmougin, F.; Higgins, D.G. (1997). The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 25: 4876–4882.

Villalba, A.; Reece, K.S.; Ordás, M.C.; Casas, S.M.; Figueras, A. (2004). Perkinsosis in molluscs: a review. *Aquat. Living Resour.* 17: 411–432.

Zhang, X.; Liang, Y.; Fan, J.; Zhang, W. et al. (2005). Identification of *Perkinsus*-like parasite in Manila clam, *Ruditapes philippinarum* using DNA molecular marker at ITS region. *Acta Oceanol Sin* 24:139–144.

**CAPÍTULO IV – Estudo patológico da ostra de mangue *Crassostrea rhizophorae* no Estuário do Rio Pacoti, CE, Brasil.**

**O artigo será enviado para publicação no periódico Journal of Invertebrate Pathology, tendo sido redigido segundo as normas da referida revista científica**

**Estudo patológico da ostra de mangue *Crassostrea rhizophorae* no Estuário do Rio Pacoti, CE, Brasil.**

Rachel Costa Sabry<sup>a</sup>, Tereza Cristina Vasconcelos Gesteira<sup>a</sup>, Aimê Rachel Magenta Magalhães<sup>b</sup>, Liana Pinho Pessoa<sup>a</sup>, Patrícia Mirella da Silva<sup>c,\*</sup>.

<sup>a</sup>Instituto de Ciências do Mar, Universidade Federal do Ceará, Av. da Abolição, 3507, Meireles, CEP: 60165-081, Fortaleza, CE, Brasil. [rachelsabry@yahoo.com.br](mailto:rachelsabry@yahoo.com.br); [gesteira@ufc.br](mailto:gesteira@ufc.br)

<sup>b</sup>Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Aquicultura, Núcleo de Estudos em Patologia Aquícola, Rodovia Admar Gonzaga, 1346, Itacorubi, CEP 88040-900, Florianópolis, SC, Brasil. [rachel@cca.ufsc.br](mailto:rachel@cca.ufsc.br)

<sup>c</sup>Universidade Federal da Paraíba, Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Departamento de Biologia Molecular, Cidade Universitária – Campus I. CEP, 58059-900, João Pessoa, PB, Brasil. [mirella\\_dasilva@hotmail.com](mailto:mirella_dasilva@hotmail.com)

\*<sup>c</sup>Universidade Federal da Paraíba, Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Departamento de Biologia Molecular, Cidade Universitária – Campus I. CEP, 58059-900, João Pessoa, PB, Brasil.

E-mail: [mirella\\_dasilva@hotmail.com](mailto:mirella_dasilva@hotmail.com)

Telefone: (55) (83) 3216 7787

## RESUMO

A ostra-do-mangue *Crassostrea rhizophorae* (Bivalvia, Ostreidae) é comumente coletada por marisqueiras nos estuários do Estado do Ceará, Nordeste do Brasil. Apesar da importância socioeconômica desse recurso natural, são escassos os estudos relacionados às condições de saúde das ostras nessa região. Este trabalho teve como objetivo investigar a presença de alterações patológicas na ostra-de-mangue *C. rhizophorae* no Estuário do Rio Pacoti, CE. Em agosto de 2008 e dezembro de 2009, amostras de ostras adultas dessa espécie (N= 900) foram coletadas em 3 pontos do estuário. As técnicas para avaliar as alterações patológicas foram: análises macroscópicas, cultivo de tecidos em meio líquido de tioglicolato (RFTM), reação em cadeia da polimerase (PCR) para confirmação de *Perkinsus* e histologia. Em 2009, os ensaios de RFTM detectaram a presença de *Perkinsus* sp. infectando os tecidos de *C. rhizophorae* com prevalência média de 5,1%, sendo de 1,3%, 6,7% e 7,3% nos pontos 1, 2 e 3, respectivamente. Os resultados das análises de PCR nas amostras positivas em RFTM foram negativos, possivelmente devido à baixa intensidade de infecção. Os cortes histológicos confirmaram a presença de células de *Perkinsus* sp. infectando o epitélio do intestino e o tecido conjuntivo em torno da glândula digestiva de *C. rhizophorae* com prevalências de 3,3%; 20% e 13,3% nos pontos 1, 2 e 3 respectivamente, sem causar danos no hospedeiro. *Nematopsis* sp. foi o protozoário observado com maior prevalência (até 100%) porém com baixa intensidade de infecção e sem resposta de defesa do hospedeiro. Outros protozoários observados foram: *Trichodina*, *Sphenophrya*, *Ancistrocoma* e um protozoário tipo-*Steinhausia*, todos com baixas intensidades. Entre os metazoários as análises macroscópicas mostraram o poliqueta *Polydora* com prevalências de até 93,3%. As análises histológicas detectaram com baixa prevalência: um turbelário possivelmente do gênero *Urastoma*, metacercárias de digenéticos não identificadas infectando a gônada de machos e fêmeas de *C. rhizophorae* e larvas de cestóides do gênero *Tylocephalum*. Nenhum dos patógenos detectados parece representar um problema grave para a saúde da ostra *C. rhizophorae* do Estuário do Rio Pacoti, uma vez que não há relato de mortalidades e a maior parte deles ocorreu com baixa intensidade. No entanto, um monitoramento contínuo das enfermidades nestes e em outros moluscos nesse banco natural é recomendável, uma vez que foi detectada a presença de um protozoário do gênero *Perkinsus* cuja espécie ainda não foi identificada e nem seu potencial patogênico.

Palavras chave: *Crassostrea rhizophorae*, histopatologia, *Steinhausia*, *Perkinsus* sp., ostras.



## 1. Introdução

O Estado do Ceará, no Nordeste do Brasil, apresenta várias áreas de manguezais onde habitam inúmeras espécies de bivalves, entre elas ostras-de-mangue (*Crassostrea* spp. Ostreidae), sururus (*Mytella falcata* e *M. guyanensis*, Mytilidae) e o berbigão (*Anomalocardia brasiliana*, Veneridae). No Estuário do Rio Pacoti, localizado no litoral Leste do Ceará, os bivalves são um recurso comumente explotado pelas marisqueiras, denominação das mulheres que coletam os mariscos nesta região. Este recurso representa uma atividade socioeconômica importante para a região, contribuindo para a subsistência das comunidades que vivem em seu entorno.

Existem poucos estudos sobre a ocorrência de patógenos que afetam as populações naturais de bivalves do Estado do Ceará. Até o momento foram detectados nos moluscos bivalves do Estuário do Rio Jaguaribe, trematódeos digenéticos em berbigões *A. brasiliana* (Araújo e Rocha-Barreira, 2004); o protozoário *Nematopsis* sp. (Apicomplexa, Porosporidae) na ostra-de-mangue *Crassostrea rhizophorae* e o metacestóide *Tylocephalum* (Cestoda, Tetragonocephalidae) (Sabry et al. 2007). No Estuário do Rio Pacoti foram detectados *Nematopsis* sp. infectando a ostra *C. rhizophorae*; colônias bacterianas do tipo rickettsia e larvas de trematódeos digenéticos infectando as brânquias e a gônada de *A. brasiliana*, respectivamente (Ferreira et al. 2008).

Estudos sobre patologias em moluscos são importantes, uma vez que alguns patógenos podem afetar e até causar mortalidades massivas entre as populações sejam elas de bancos naturais ou cultivadas. Os trematódeos digenéticos do gênero *Bucephalus* (Digenea, Bucephalidae) são importantes parasitas de bivalves marinhos, podendo causar danos patológicos significativos, caracterizados principalmente pela castração do hospedeiro (Lauckner, 1983). Por outro lado, larvas de *Tylocephalum* já foram registradas em uma grande variedade de moluscos sem causar patologias (Cheng, 1967; Nascimento et al. 1986; Hine e Thorne, 2000; Boehs e Magalhães, 2004; Winstead et al. 2004; Sabry e Magalhães, 2005; Boehs et al. 2010), porém em elevadas intensidades de infecções poderiam causar estresse fisiológico e, conseqüentemente, afetar o crescimento e a reprodução dos moluscos (McGladdery et al. 2006).

A Organização Mundial para a Saúde Animal (OIE), em sua lista de patógenos de declaração obrigatória para moluscos cita os seguintes organismos: protozoários, Haplosporidia: *Bonamia ostreae* e *B. exitiosa*; Paramyxia: *Marteilia refringens*; Perkinsozoa: *Perkinsus marinus* e

*Perkinsus olseni*; a bactéria *Xenohalictis californiensis* e o vírus de tipo Herpes que afeta abalones.

As duas espécies do gênero *Perkinsus*, acima citadas, têm causado impactos significativos nas populações de moluscos em todo o mundo (Villalba et al. 2004; Choi e Park, 2010). *Perkinsus marinus* é responsável por mortalidades da ostra americana *Crassostrea virginica* ao longo da costa Atlântica dos Estados Unidos e Golfo do México (Burreson et al. 1996). A ostra *Crassostrea rhizophorae* mostrou-se suscetível a infecções por *P. marinus* após ensaios experimentais (Bushek et al. 2002). *Perkinsus olseni* causou mortalidades no abalone *Haliotis rubra* na Austrália (Lester e Davis, 1981); no berbigão *Ruditapes decussatus* de Portugal (Azevedo, 1989) e foi descrito em diversos bivalves de diferentes países (Cremonte et al. 2005a; Dungan et al. 2007; Elandaloussi et al. 2009; Choi e Park, 2010).

Considerando a importância dos bivalves como recurso natural de subsistência para as populações ribeirinhas do Estuário do Pacoti e prevendo o desenvolvimento futuro da ostreicultura no Estado do Ceará, o presente trabalho realizou um estudo dos patógenos encontrados nas ostras nativas *C. rhizophorae* do Estuário do Rio Pacoti, Ceará.

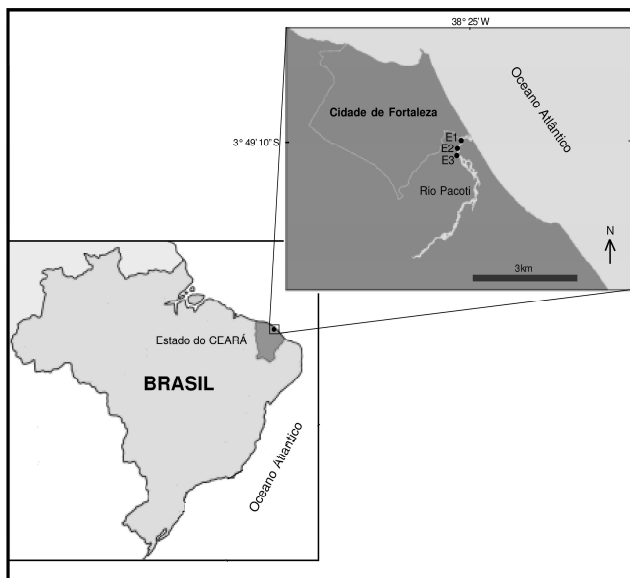
## 2. Material e Métodos

### 2.1. Amostragem das ostras

As ostras da espécie *C. rhizophorae* foram coletadas das raízes do mangue vermelho *Rhizophora mangle* em três pontos do Estuário do Rio Pacoti (Ponto 1: 3°49'8" S, 38°25'9" W; próximo a desembocadura do estuário; Ponto 2: 3°49'15" S, 38°25'10" W, situado próximo a um cultivo de ostra do mangue e o Ponto 3: 3°49'19" S, 38°25'11" W, localizado mais afastado da desembocadura do Rio (Figura 1). Cada um dos pontos dista aproximadamente 1 km um do outro. As coletas foram realizadas no mês de agosto de 2008 (inverno) e dezembro de 2009 (verão), retirando-se a cada mês e ponto de coleta 150 ostras, totalizando 900 amostras para as análises.

A temperatura e a salinidade da água do estuário foram medidas em cada ponto no dia da coleta das ostras. A temperatura nos pontos 1 e 3 do estuário foi de 29°C e no ponto 2 foi de 30°C, no ano de 2008. Em 2009 a temperatura foi de 29°C (pontos 1 e 3) e de 28°C (ponto 2). Já a salinidade foi de 32, 29 e 23 ‰ (2008) e de 38, 40 e 35 ‰ (2009) para os pontos 1, 2 e 3, respectivamente (Tabela 1).

No laboratório as ostras foram medidas (altura da concha) segundo Galtsoff (1964) e abertas para observação macroscópica da concha e órgãos internos (manto, brânquias, gônada e glândula digestiva), para verificar a ocorrência de alterações patológicas.



**Figura 1.** Mapa ressaltando o Rio Pacoti, Ceará onde se localiza os três pontos de amostragem de ostras na região estuarina. **E<sub>1</sub>**, ponto próximo a desembocadura do estuário. **E<sub>2</sub>**, ponto localizado próximo a um cultivo de ostra do mangue. **E<sub>3</sub>**, ponto afastado da desembocadura do Rio.

Todos os animais coletados em cada um dos 3 pontos de coleta dentro do estuário (N= 150) tiveram seus tecidos processados para a técnica do cultivo em meio líquido de tioglicolato (*Ray's fluid thioglycollate medium*, RFTM (item 2.2) e tiveram as brânquias fixadas em álcool 95% para análises posteriores de confirmação da presença de *Perkinsus* por reação em cadeia da polimerase (PCR). Do total de 150 ostras de cada ponto, 30 foram preparadas para cortes histológicos (item 2.3), totalizando 180 indivíduos.

Vale ressaltar que os resultados das amostras coletadas em 2008 que dizem respeito à ocorrência de *Perkinsus* sp. encontram-se descritos em Sabry et al. (2009).

## 2.2. Incubação de tecidos em meio líquido de tioglicolato de Ray (RFTM)

Duas demibrânquias e o reto de cada animal foram incubados em meio líquido de tioglicolato por 7 dias no escuro e a temperatura ambiente. Após o período de incubação, os tecidos foram coletados, macerados sobre uma lâmina e corados com solução de lugol (OIE, 2009), segundo o método descrito por Ray (1954). O preparado foi observado ao microscópio óptico para confirmar a presença de hipnósporos do gênero *Perkinsus*, os quais são esféricos e as paredes se coram de azul ou negro azulado.

A intensidade de infecção por *Perkinsus* nos tecidos das ostras *Crassostrea rhizophorae* foi adaptada a partir da escala de Mackin (Ray, 1954), onde:

0 = sem infecção: nenhum hipnósporo observado após minuciosa observação de toda a lâmina em objetiva de 10x;

1 = infecção muito leve: até 10 hipnósporos observados em objetiva de 10x;

2 = infecção leve: de 11 a 100 hipnósporos observados em objetiva de 10x;

3 = infecção moderada: até 40 hipnósporos observados no total de 10 campos aleatórios em objetiva de 40x espalhados por toda a preparação;

4 = infecção avançada: mais de 40 hipnósporos observados no total de 10 campos aleatórios em objetiva de 40x e espalhados por toda a preparação.

## 2.3. Preparações histológicas

De cada ostra (N= 180), uma secção transversal do animal foi retirada amostrando-se vários órgãos, entre eles brânquias, gônada e glândula digestiva. Os tecidos foram fixados em solução de Davidson (Shaw e Battle, 1957) por 24 h, desidratados em uma série gradativa de álcool até 100%, diafanizados em xilol e impregnados em parafina histológica a 60 °C. Cortes de 5 µm foram realizados e posteriormente corados com hematoxilina de Harris e eosina (Howard et al. 2004). Os cortes obtidos foram analisados em microscópio óptico.

A prevalência dos parasitas foi calculada como sendo o número total de animais parasitados sobre o número total de ostras coletadas em cada ponto de coleta (Bush et al. 1997).

#### 2.4. Diagnóstico de *Perkinsus* por reação em cadeia da polimerase - PCR

A extração do DNA foi realizada com o kit DNAzol® (*Invitrogen*) seguindo o protocolo descrito pelo fabricante. Para a reação de PCR foram utilizados os iniciadores PerkITS 85/750 (Casas et al. 2002) que hibridizam especificamente com regiões conservadas do espaçador interno transcrito (ITS) da região do complexo de genes que codificam para o ácido ribonucléico ribossômico (rRNA), que são exclusivos para membros do gênero *Perkinsus* (exceto para *Perkinsus qugwadi incertae sedis*). Como controle positivo utilizou-se DNA extraído de células de *Perkinsus olseni* de cultivo *in vitro* gentilmente cedidas pelo Dr. Antonio Villalba do Centro de Investigaciones Marinas (CIMA) da Espanha. No controle negativo o DNA foi substituído por H<sub>2</sub>O Milli-Q.

As reações de PCR foram realizadas em reações de 25 µl contendo 1 µl (50 a 100 ng) da amostra de DNA genômico, tampão de PCR 1x concentrado, MgCl<sub>2</sub> a 1,5 mM, nucleotídeos a 0,2 mM cada, iniciadores a 0,8 µM e 1 unidade de *Taq* DNA polimerase (*Invitrogen*). O protocolo incluiu desnaturação do DNA a 94°C por 10 min.; 35 ciclos de amplificação a 94°C por 1 min, 55°C por 1 min e 72°C por 1 min seguido de uma extensão final a 72°C por 10 min. Os produtos da PCR foram separados num gel de agarose 1,5%, lavados em tampão 1x Tris-EDTA (TE) e corados com brometo etídio.

### 3. Resultados

#### 3.1. Biometria

A biometria das ostras *Crassostrea rhizophorae* do Estuário do Rio Pacoti teve como objetivo apenas verificar o tamanho dos animais que seriam submetidos às análises patológicas, sem, contudo, fazer comparações de crescimento entre os animais nos pontos de amostragem e também não teve o objetivo de relacionar o tamanho dos animais com a presença e/ou ausência de parasitismo.

As alturas médias das ostras coletadas nos pontos 1, 2 e 3 do estuário do Rio Pacoti, em 2008 e 2009 encontram-se na tabela 1.

### 3.2. Análises macroscópicas

As observações macroscópicas das ostras *C. rhizophorae* coletadas em 2008 e 2009 não evidenciaram a presença de alterações aparentes, mas observou-se o parasitismo pelo poliqueta do gênero *Polydora* (Polychaeta: Spionidae), nas valvas das ostras. A infestação por *Polydora* foi caracterizada pela presença de tubos horizontais com coloração preta. A espécie de *Polydora*, na ocasião, não foi identificada.

Em 2008, a infestação por *Polydora* foi elevada em todos os pontos do estuário, chegando a atingir uma prevalência máxima de 93,3% no ponto 1. Em 2009, a prevalência máxima foi de 48,7%, registrada no ponto 1 do estuário (Tabela 1).

### 3.3. Incubação de tecidos em meio líquido de tioglicolato de Ray (RFTM)

Em 2009, a incubação das brânquias e do reto das ostras *Crassostrea rhizophorae* em meio líquido de tioglicolato mostrou a presença de hipnósporos típicos de *Perkinsus*. As células do patógeno eram esféricas, tinham tamanhos variando de 10 a 55  $\mu\text{m}$  de diâmetro e se coraram fortemente de preto-azulado pelo lugol (Fig. 2A).

A prevalência média de ostras infectadas por *Perkinsus* sp., nos 3 pontos foi de 5,1% (23 ostras de 450). As prevalências em cada ponto do estuário variaram de 1,3% a 7,3% (Tabela 2). Das 23 ostras diagnosticadas positivas por RFTM, 20 (87%) apresentaram infecção muito leve e apenas 3 ostras (13%) apresentaram infecção leve, sendo duas delas do ponto 2 e uma do ponto 3 do estuário. O número de hipnósporos nos animais com intensidade muito leve variou de 1 a 9 ( $3,3 \pm 2,3$ ; N = 20) e nos com intensidade leve de 15 a 50 células ( $31,7 \pm 14,3$ ; N = 3).

A técnica do cultivo dos tecidos em meio líquido de tioglicolato (RFTM) também se mostrou eficaz para a detecção do protozoário *Nematopsis*. Ainda que *Nematopsis* não tenha se corado de preto pelo lugol, este se apresentou bastante refringente e era facilmente observado entre as células das brânquias da ostra em objetiva de 20x ao microscópio. Este patógeno foi detectado em todas as coletas realizadas nos dois períodos (2008 e 2009) e nos três pontos do Estuário do Rio Pacoti. Em 2008, as prevalências de *Nematopsis* sp. foram elevadas e variaram de 96% (ponto 2) a 100% (pontos 1 e 3) enquanto que curiosamente em 2009 as prevalências foram muito baixas, alcançando um máximo de 2% (ponto 2) (Tabela 1).

### 3.4. Análises histopatológicas

As análises histológicas evidenciaram vários parasitas nas ostras utilizadas neste estudo (Tabela 1) sendo eles: protozoários dos gêneros *Perkinsus*, *Trichodina*, *Sphenophrya*, *Ancistrocoma*, *Steinhausia* e *Nematopsis*. Entre os metazoários foram observados turbelários possivelmente do gênero *Urastoma*, metacercárias de trematódeos e cestóides do gênero *Tylocephalum*.

#### 3.4.1. Protozoários

O protozoário do gênero *Perkinsus* foi detectado novamente nas ostras coletadas em 2009 no Estuário do Rio Pacoti. Os trofozoítos de *Perkinsus* sp. foram observados infectando o epitélio dos órgãos digestivos e o tecido conjuntivo das ostras (Figs. 2B e 2C). As células do patógeno eram arredondadas com diâmetro variando entre 3 e 6  $\mu\text{m}$ , apresentavam um vacúolo ocupando grande parte do volume interno da célula, núcleo excêntrico e um nucléolo proeminente (Fig. 2C). *Perkinsus* sp. causou alteração da estrutura normal do tecido epitelial e conjuntivo das ostras infectadas.

As prevalências de *Perkinsus* sp. observadas nos cortes histológicos foram baixas sendo: 3,3; 20,0 e 13,3% nos pontos 1, 2 e 3, respectivamente (Tabela 2). Considerando os três pontos do estuário juntos, a prevalência média de *Perkinsus* sp. detectada em cortes histológicos foi de 12,2% (11/90). A histologia confirmou todos os casos positivos diagnosticados por RFTM e ainda revelou dois casos a mais de ostras infectadas por *Perkinsus* sp. que não haviam sido diagnosticados pela técnica RFTM.

Somente um ciliado do gênero *Trichodina* (Ciliophora: Trichodinidae) foi visualizado próximo às lamelas branquiais de uma ostra coletada no ponto 1, em 2008. O ciliado tinha formato oval e media 13  $\mu\text{m}$  em seu maior eixo (Fig. 2D).

Ciliados do tipo *Sphenophrya* (Ciliophora: Sphenophryidae) foram detectados em contato com os filamentos branquiais das ostras. Estes ciliados eram ovais, mediam de 5 a 18  $\mu\text{m}$  em seu maior eixo e apresentavam macronúcleos basófilos e um citoplasma eosinófilo (Fig. 2E). A máxima prevalência de *Sphenophrya* foi observada no ponto 3 do estuário em 2009 (23,3%) e as menores nos pontos 1 e 2 em 2008 (3,3%) (Tabela 1). A intensidade foi baixa e variou de 1 a 11 ciliados/corte histológico. Nenhum dano foi observado nas brânquias dos animais infectados.

**Tabela 1.** Prevalência (%) de patógenos detectados na ostra-de-mangue *Crassostrea rhizophorae* em 3 pontos (pontos: 1, 2 e 3) do Estuário do Rio Pacoti, Ceará, em agosto de 2008 e dezembro de 2009. Análise macroscópica (AM, N=150), incubação de tecidos em meio líquido de tioglicolato de Ray (RFTM, N=150) e corte histológico (CH, N=30). Altura média das ostras (mm) e Desvio Padrão (DP).

Patógenos	Prevalências (%)					
	2008			2009		
	Ponto 1	Ponto 2	Ponto 3	Ponto 1	Ponto 2	Ponto 3
	Altura média (mm) ± DP					
	58±8,4	50±5,3	49,8±5,1	56,7±6,2	52,6±10	51,8±4,9
T. 29 °C	T. 30 °C	T. 29 °C	T. 29 °C	T. 28 °C	T. 29 °C	
Sal. 32 ‰	Sal. 29 ‰	Sal. 23 ‰	Sal. 38 ‰	Sal. 40 ‰	Sal. 35 ‰	
<b>Protozoários</b>						
<i>Trichodina</i> sp.	3,3	-	-	-	-	-
<i>Sphenophrya</i> sp.	3,3	3,3	-	20,0	13,3	23,3
<i>Ancistrocoma</i> sp.	20,0	17,2	16,7	3,3	-	-
<i>Steinhausia</i> sp.	36,7	24,1	23,3	16,7	6,7	10,0
<i>Nematopsis</i> sp. (CH)	93,3	93,1	93,3	-	-	-
<i>Nematopsis</i> sp. (RFTM)	100	96	100	1,3	2,0	1,3
<b>Metazoários</b>						
<i>Polydora</i> sp. (AM)	93,3	70,0	78,0	48,7	10,7	45,3
<i>Urustoma</i> sp.	-	3,3	-	-	-	-
Metacercárias	-	-	-	-	16,7	6,7
<i>Tylocephalum</i> sp.	-	-	3,3	3,3	13,3	10,0



**Tabela 2.** Prevalência (%) da infecção por *Perkinsus* sp. na ostra-de-mangue *Crassostrea rhizophorae* do Estuário do Rio Pacoti, em 2009. Análises de incubação de tecidos em meio líquido de tioglicolato de Ray (RFTM) e cortes histológicos.

Pontos de coleta	RFTM Infectados/total	Corte histológico Infectados/total
1	1,3 (2/150)	3,3 (1/30)
2	6,7 (10/150)	20,0 (6/30)
3	7,3 (11/150)	13,3 (4/30)
<b>Prevalência Média</b>	5,1 (23/450)	12,2 (11/90)

Ciliados pertencentes ao gênero *Ancistrocoma* (Ciliophora: Ancistrocomidae) foram evidenciados no lúmen dos túbulos digestivos. Estes ciliados tinham formato de pera, com tamanho de 10 a 27  $\mu\text{m}$  em seu maior eixo (Fig. 2F). Em 2008, as prevalências variaram de 16,7 a 20%, enquanto em 2009 só ocorreram em ostras do ponto 1 com baixa prevalência (3,3%) (Tabela 1). A intensidade foi baixa (1 a 4 ciliados/corte histológico). Apenas uma ostra coletada em 2008 (ponto 1) apresentou 9 ciliados com até 3 exemplares em um único tubo digestivo. No entanto, nenhuma reação de defesa por parte do hospedeiro foi evidenciada e nenhuma lesão foi observada no epitélio do órgão.

Microsporídeos do tipo *Steinhausia* (Microspora) foram observados infectando o citoplasma dos ovócitos das ostras de mangue *Crassostrea rhizophorae* do Estuário do Rio Pacoti (Fig. 3A). O protozoário caracterizou-se por apresentar um vacúolo parasitário contendo de 1 até 9 esporos em desenvolvimento. Os tamanhos dos vacúolos variaram de 4 a 8  $\mu\text{m}$ . As máximas prevalências (36,7%, 24,1 e 23,3 nos pontos 1, 2 e 3, respectivamente) desse patógeno foram observadas nas ostras coletadas em 2008 (Tabela 1), em 2009 elas variaram de 6,7 a 16,7%. A prevalência média em 2008 foi de 28% e em 2009 foi de 11,1%. A intensidade de infecção foi baixa e similar entre os anos, variando de 1 a 7 ovócitos infectados/corte histológico em 2008 e de 1 a 11 em 2009.

Protozoários do gênero *Nematopsis* sp. foram detectados infectando o tecido conjuntivo próximo à glândula digestiva, brânquias e manto das ostras *C. rhizophorae* (Fig. 3B). Os oocistos de *Nematopsis* sp. tinham caráter basófilo e mediam de 9 a 14  $\mu\text{m}$  em seu maior eixo.

Em 2008, as prevalências de *Nematopsis* sp. foram elevadas e muito similares nos três pontos do estuário. Ao contrário, nas amostras de 2009 nenhum *Nematopsis* foi detectado pela histologia (Tabela 1). A intensidade de infecção por *Nematopsis* sp. foi baixa com poucos oocistos (1 a 6) por corte histológico. Não foram observadas lesões no tecido conjuntivo, nem infiltrações de hemócitos associadas à infecção.

#### 3.4.2. Metazoários

Um turbelário, possivelmente do gênero *Urastoma* (Turbellaria: Urastomidae) foi observado pela primeira vez em uma única ostra do ponto 2, em 2008. O turbelário encontrava-se no tecido conjuntivo do manto da ostra, apresentava um tamanho de 440 µm e caráter eosinófilo (Fig. 3C). Não foi observada reação do hospedeiro à presença do parasita.

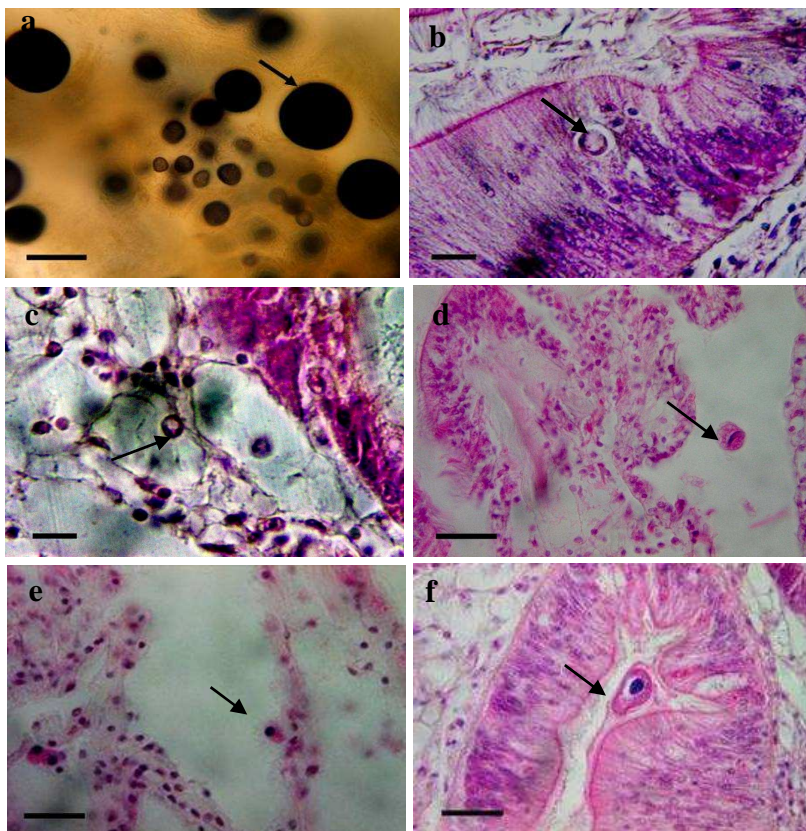
Metacercárias de trematódeos foram detectadas no interior dos folículos gonádicos de ostras macho e fêmeas coletadas somente em 2009, nos pontos 2 (16,7%) e 3 (6,7%) (Figs. 3D e 3E). As metacercárias tinham um tamanho variando 117,5 a 177,5 µm. Os folículos das ostras infestadas encontravam-se no mesmo estado de desenvolvimento gonádico que outros folículos não infestados. Não foram observados hemócitos infiltrados nos folículos.

Larvas de cestóides (denominadas de metacestóides), possivelmente do gênero *Tylocephalum* foram detectadas infestando as ostras no presente estudo. Observou-se uma reação imunológica do hospedeiro que culminou com o encapsulamento da larva por várias camadas de hemócitos (Fig. 3F). Os metacestóides mediam de 80 a 145 µm em seu maior eixo foram observados no tecido conjuntivo na região próxima a glândula digestiva e houve um caso em que o metacestóide foi encontrado no tecido conjuntivo da brânquia. Além da reação de encapsulamento, observou-se uma forte modificação da arquitetura da brânquia (Fig. 3F). Em 2008, uma ostra (3,3%) do ponto 3 foi encontrada infestada com metacestóides enquanto que em 2009 esse parasita esteve presente em ostras dos três pontos do estuário, com maior prevalência no ponto 2 (13,3%).

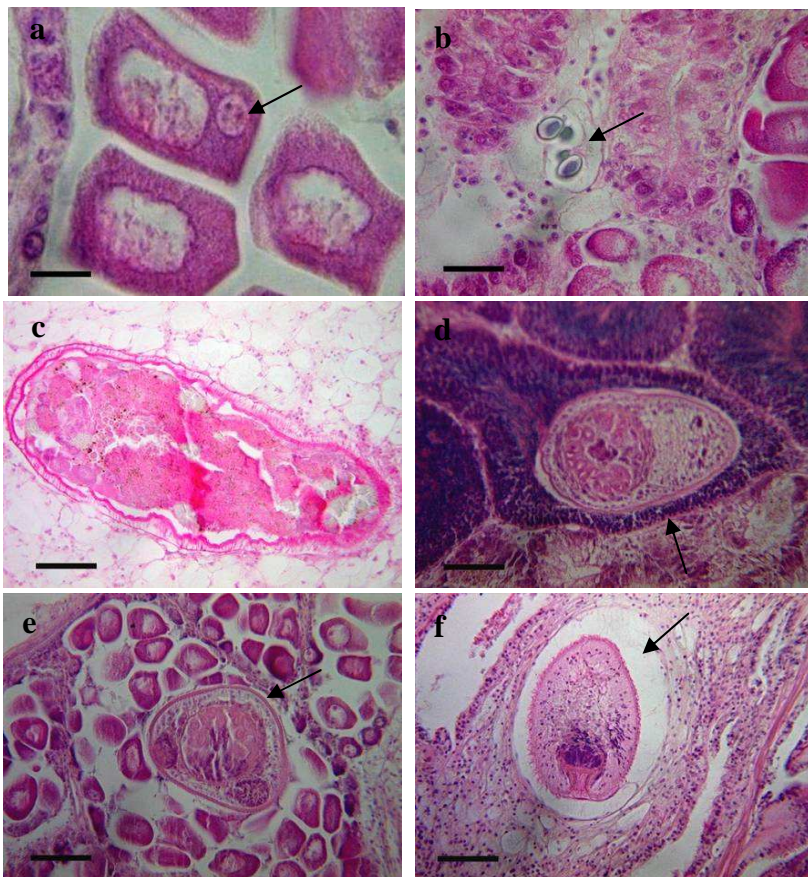
#### 3.5. Diagnóstico de *Perkinsus* sp. por PCR

As 23 ostras diagnosticadas positivas por RFTM e submetidas à técnica da PCR para a confirmação da infecção por *Perkinsus* sp. foram

todas negativas. Duas amostras aleatórias negativas por RFTM de cada ponto de coleta foram confirmadas como negativas por PCR.



**Figura 2.** Patógenos detectados em tecidos de *Crassostrea rhizophorae* no Estuário do Rio Pacoti, Ceará, em agosto de 2008 e dezembro de 2009. **Fig. 2a.** Hipnósporos de *Perkinsus* sp. (seta) infectando as brânquias de *C. rhizophorae* após incubação em meio líquido de tioglicolato e corados com solução de Lugol. **Fig. 2b.** Trofozoítos de *Perkinsus* sp. infectando o epitélio do intestino. Note o vacúolo ocupando grande parte do citoplasma da célula do parasita (seta). **Fig. 2c.** Trofozoíto de *Perkinsus* sp. (seta) no tecido conjuntivo próximo à glândula digestiva. **Fig. 2d.** *Trichodina* sp. (seta) nas brânquias. **Fig. 2e.** *Sphenophrya* sp. (seta) em contato com as brânquias das ostras. **Fig. 2f.** *Ancistrocoma* sp. (seta) no lúmen de um túbulo digestivo. Barras: Fig. a=50  $\mu\text{m}$ ; Figs. b; c. =10  $\mu\text{m}$ ; Figs. d; e; f. = 20 $\mu\text{m}$ .



**Figura 3.** Patógenos detectados em tecidos de *Crassostrea rhizophorae* no Estuário do Rio Pacoti, Ceará em agosto de 2008 e dezembro de 2009. **Fig. 3a.** *Steinhausia* sp. (seta) no citoplasma de um ovócito **Fig. 3b.** Oocistos de *Nematopsis* sp. (seta) no tecido conjuntivo próximo aos túbulos digestivos. **Fig. 3c.** Turbelário infectando o tecido conjuntivo do manto. Figs. **3d e 3e.** Metacercárias de trematódeos (setas) infectando os folículos gonádicos de machos e fêmeas, respectivamente. **Fig. 3f.** Metacestóide *Tylocephalum* sp. (seta) no tecido conjuntivo da brânquia. Note a alteração da configuração normal da brânquia. Barras = Figs. a; b = 20 $\mu$ m. Figs. c; d; e; f. = 50 $\mu$ m.

#### 4. Discussão

De acordo com a Fundação Cearense de Meteorologia e Recursos Hídricos, a condição climática no Estado do Ceará é caracterizada por um período bem marcado de chuvas que tem início geralmente no mês de janeiro (verão) estendendo-se até maio (inverno) (FUNCEME, 2009). No presente estudo, dois parâmetros físico-químicos foram medidos, a temperatura que não sofreu variação e a salinidade que mostrou valores menores (média de 28 ‰) em agosto de 2008 (inverno) e maiores (38‰), em dezembro de 2009 (verão). Estas diferenças nos valores de salinidade caracterizam bem a sazonalidade na região. Este fato poderia explicar os valores distintos de prevalência de alguns organismos encontrados nas ostras *Crassostrea rhizophorae* entre os dois períodos estudados.

As prevalências de infestações por *Polydora* sp. em ostras coletadas em agosto de 2008 nos três pontos do estuário do Rio Pacoti foram muito elevadas e representaram o dobro das observadas em dezembro de 2009. Em 2009, os valores de salinidades registrados na ocasião da coleta foram maiores quando comparados aos medidos em 2008. Apesar disto, em 2009 o período chuvoso no Estado foi prolongado e caracterizado por chuvas intensas ficando acima da média histórica (622 mm) e estendendo-se até o início da primavera (FUNCEME, 2009). Este grande aporte de água doce no referido estuário poderia ter contribuído para manter a salinidade baixa por um período maior de tempo. No período chuvoso de 2009, houve alta mortalidade de ostras (marisqueiras, com. pess.) e o estoque natural praticamente se renovou a partir do início de outubro, portanto, as ostras certamente mais jovens que as coletadas em agosto 2008 tiveram um menor tempo de exposição aos patógenos, o que explica as menores prevalências encontradas no período. Em *Crassostrea madrasensis* do estuário Mulki, na Índia, a quantidade de bolhas de lama nas conchas causadas por *Polydora ciliata*, diminuiu nos meses da estação chuvosa, possivelmente devido o decréscimo da salinidade (Stephen, 1978) não sendo o que ocorreu no presente estudo. Ainda, em condições experimentais quando a ostra *Crassostrea gigas* foi exposta artificialmente a banhos de água doce, a infestação por *Polydora* sp. diminuiu significativamente (Nel et al. 1996). Em cultivos de *C. gigas* na Baixa Califórnia, México, as ostras cultivadas submersas continuamente na água apresentaram uma maior prevalência de *Polydora* em relação às cultivadas em sistemas expostos ao ar livre, nas marés baixas. A maior prevalência de *Polydora* encontrada nas ostras

foi relacionada ao maior de tempo de exposição aos poliquetos (Cáceres-Martínez et al. 1998).

*Polydora* sp. (Polychaeta, Spionidae) infestam bivalves em várias partes do mundo, porém não causam mortalidades (Ambariyanto, 1991; Bower et al. 1994). A consequência da infestação é o aspecto desagradável que causa devido à formação de bolhas e tubos contendo sedimento e fezes do poliqueto com coloração escura e consequentemente prejudica sobremaneira a sua comercialização. *Polydora* já foi registrada em outros moluscos da costa brasileira sem causar mortalidade (Ibbotson e Magalhães, 2002; Boehs e Magalhães, 2004; Sabry e Magalhães, 2005).

Os resultados do presente estudo mostram que as ostras coletadas em agosto de 2008 encontravam-se magras quando comparadas as de 2009, devido à alta prevalência de *Polydora*. No Brasil, a polidioriose é uma doença bem conhecida entre os produtores de ostras do litoral catarinense, especialmente na região de Florianópolis, onde as prevalências de *Polydora websteri* costumam ser bastante elevadas na ostra japonesa *Crassostrea gigas* cultivada (Ibbotson e Magalhães, 2002; Sabry e Magalhães, 2005).

No presente trabalho vários protozoários foram observados, entre eles o do gênero *Perkinsus*, que tem duas espécies listadas pela OIE. *Perkinsus* sp. foi detectado nos tecidos (reto e brânquia) das ostras *Crassostrea rhizophorae* após incubação em RFTM com prevalências baixas, similares àquelas detectadas em 2008 (Sabry et al. 2009). Os resultados das análises histológicas corroboraram os resultados do RFTM e, ainda, detectaram mais 2 casos positivos, ou seja, negativos por RFTM. Este fato é surpreendente, pois a técnica do RFTM é considerada mais sensível que a análise histológica para este patógeno (OIE, 2006) e envolve a utilização de uma grande quantidade de tecidos para análise, enquanto a histologia e o PCR não. Também foi curioso o resultado das análises de PCR, a técnica mais específica, que não confirmou nenhum caso positivo por RFTM. A razão para estes resultados pode dever-se ao fato de praticamente todos os animais terem apresentado intensidade de infecção muito leve, ou seja, entre 1 a 50 hipnósporos na brânquia analisada por RFTM. É possível que no pequeno pedaço de brânquia conservado para álcool e utilizado para o PCR não tivessem parasitas. Bureson (2008) tem discutido sobre a ocorrência de falsos negativos por PCR em análises de detecção de parasitas de bivalves, e chegado à mesma conclusão.

Pela técnica de histologia, as células de *Perkinsus* sp. foram observadas com maior frequência no epitélio digestivo e com menor no

tecido conjuntivo em torno da glândula digestiva das ostras nativas *Crassostrea rhizophorae* e causaram alteração da estrutura normal do tecido epitelial e conjuntivo. Em infecções por *Perkinsus behaiensis* em ostras *Crassostrea hongkongensis* e *C. ariakensis* do sul da China (Moss et al. 2008) e por *Perkinsus marinus* em *C. corteziensis* da costa do México (Cáceres-Martínez et al. 2008), as células do epitélio do intestino foram o principal alvo de infecção pelos patógenos. Ao contrário, *Perkinsus olseni* não costuma infectar os epitélios digestivos do berbigão *Ruditapes philippinarum* (Dungan e Reece, 2006). *Perkinsus chesapeakei* não causou lesões nos tecidos de *Tagelus plebeius* da Baía de Delaware (Bushek et al. 2008). Elevadas infecções por *Perkinsus marinus* em ostras *C. corteziensis* da costa do México, causaram destruição dos tecidos das brânquias e gônada, inclusive danificando severamente os folículos germinativos (Cáceres-Martínez et al. 2008). Já *P. olseni* foi detectada infectando as brânquias e vários órgãos do bivalve *Ruditapes decussatus* da Espanha, causando uma indução da infiltração de hemócitos nos tecidos infectados (Elandaloussi et al. 2009).

Vale ressaltar que recentemente foi feito o segundo registro de *Perkinsus* sp. no Brasil e o primeiro no Estado de Sergipe. *Perkinsus* sp. foi detectado infectando a ostra *Crassostrea brasiliana* de populações naturais e cultivadas, do Estuário do Rio São Francisco, com prevalências de até 82% nas amostras de cultivo. No entanto, os autores não relataram danos aos hospedeiros devido à presença do patógeno (Mendonça et al. 2010).

No presente estudo, até o momento, *Perkinsus* sp. não representa risco à saúde das ostras *C. rhizophorae* devido à baixa prevalência e intensidade de infecção no Estuário do Rio Pacoti.

Um ciliado do gênero *Trichodina* foi observado infectando as brânquias de uma ostra coletada em agosto de 2008. Ciliados são organismos comensais que geralmente não afetam os moluscos bivalves (Bower et al. 1994) no entanto, *Trichodina* pode aderir-se às brânquias dos bivalves e quando em grande número causam lesões nos filamentos branquiais, como observado em *Crassostrea angulata* (Bower et al. 1994). *Trichodina* já foi registrado em várias espécies de moluscos bivalves (Carballal et al. 2001; Boehs e Magalhães, 2004; Cremonte et al. 2005b; Sabry e Magalhães 2005). Em ostras, *Trichodina* pode interferir no funcionamento normal das brânquias e causar lesões no epitélio branquial (Figueras e Villalba, 1988) e já foi associada a mortalidades em venerídeos e ostreídeos (Bower et al. 1994; Boussaïd et al. 1999). *Trichodina* foi detectada com prevalência moderada (24%) em

ostras *Crassostrea gigas* e muito baixa (1,2%) em berbigões *Anomalocardia brasiliana* da Ilha de Santa Catarina (da Silva et al. 2010).

*Sphenophrya* e *Ancistrocoma* são comumente encontrados em ostras sem causar danos ou mortalidades (Bower et al. 1994; Villalba et al. 1997; Hine e Thorne 2000; Winstead et al. 2004). A prevalência de *Sphenophrya* sp. nas amostras do ponto 3 do estuário em 2009 foi relativamente alta (23,3%) quando comparada com a de 2% registrada para *Crassostrea rhizophorae* da Baía de Todos os Santos, BA (Nascimento et al. 1986), porém foi inferior a registrada para *C. gigas* (42%) da região de Florianópolis, SC (Pontinha, 2009). Os trabalhos acima citados também não relatam danos causados pelo parasita em concordância com os resultados obtidos no presente estudo. Ao contrário, a formação de tumores conhecidos como xenomas nos tecidos de *C. rhizophorae* da Baía de Camamu, BA foi associado à presença de *Sphenophrya* (Boehs et al. 2009). *Ancistrocoma* sp. foi observado nas ostras sem causar qualquer tipo de danos nos tecidos, corroborando as observações feitas por Nascimento et al. (1986) para *C. rhizophorae* da Bahia e por Pontinha (2009) para *C. gigas* de Santa Catarina. As baixas intensidades de ciliados dos gêneros *Sphenophrya* e *Ancistrocoma* nas ostras do presente trabalho indicam que esses organismos estavam presentes simplesmente como comensais.

Microsporídeos do tipo *Steinhausia* foram observados infectando o citoplasma dos ovócitos das ostras, chegando a alcançar uma prevalência máxima de 36,7% em 2008. Esses patógenos infectam o citoplasma dos ovócitos, podendo resultar em uma forte infiltração de hemócitos (Bower et al. 1994; Green et al. 2008). Tanto nas amostras de 2008 quanto nas de 2009 a intensidade de infecção foi baixa e não foram observados danos aos folículos que estavam em gametogênese avançada. O protozoário *Steinhausia* foi encontrado parasitando ovócitos de mexilhões *Mytilus galloprovincialis* da Espanha (Robledo et al. 1994); Golfo Thermaikos (norte do Mar Egeu, Grécia) (Rayyan e Chintiroglou, 2003); do noroeste da Austrália (Jones e Creeper, 2006) e em *Mytilus* sp. da França (Comtet et al. 2004). *Steinhausia* também foi detectado em ostras *Crassostrea hongkongensis* do Sul da China (Moss et al. 2007) e *Saccostrea glomerata* do Rio Pimpama, Sudeste de Queensland (Green et al. 2008) e em berbigões *Cerastoderma edule* da costa da Galícia, Espanha (Carballal et al. 2001). Já na ostra *Saccostrea glomerata* da Austrália, a ocorrência de *Steinhausia* sp. causou reabsorção dos ovócitos e epitélio germinal e induziu a infiltração de hemócitos dentro dos folículos gonádicos (Green et al.



2008). No Brasil, *Steinhausia mytilovum* foi relatada no mexilhão *Mytella guyanensis* de um banco natural no Estuário do Rio Amazonas, Pará, com prevalência de 6,6% (Matos et al. 2005). Em espécies de bivalves da Ilha de Santa Catarina o protozoário *Steinhausia* sp. foi observado em ostras *Crassostrea gigas* de cultivo (Pontinha, 2009), berbigões *Anomalocardia brasiliana* explotados comercialmente (da Silva et al. 2010) e no mitilídeo *Brachidontes solisianus* (Pontinha et al. 2010). Neste último bivalve, a prevalência foi moderada (38%).

No presente estudo, as análises histológicas detectaram *Nematopsis* sp. apenas em ostras de 2008 com elevadíssima prevalência e não induziu resposta do hospedeiro. *Nematopsis* utiliza bivalves marinhos como hospedeiros intermediários (Lauckner, 1983) e em elevadas intensidades de infecção foram responsáveis por mortalidades no berbigão *Cerastoderma edule* (Azevedo e Cachola, 1992) e ainda, nessa mesma espécie de bivalve, causaram lesões principalmente nos filamentos branquiais (Carballal et al. 2001). Elevadas prevalências de *Nematopsis* sp. também foram documentadas em vários moluscos da costa brasileira (Nascimento et al., 1986; Sabry e Magalhães, 2005, Sabry et al. 2007; Pinto e Boehs, 2008). Em *Mytella guyanensis* da Bahia *Nematopsis* sp. causou alterações na morfologia do manto e brânquias (Boehs et al. 2010) e também nos palpos labiais desse bivalve (Ceuta, 2010).

Curiosamente no presente trabalho a técnica de RFTM mostrou-se bastante sensível para a detecção do protozoário *Nematopsis* sp. quando comparada a técnica de histologia, apresentando-se portanto, como uma ferramenta útil também para estudos deste patógeno.

Ainda que os metazoários sejam menos preocupantes para os moluscos, alguns deles podem afetar e causar danos significativos, como castração do hospedeiro. Entre eles destacam-se os trematódeos digenéticos, considerados os mais importantes parasitas metazoários que afetam os moluscos (Lauckner, 1983). No presente estudo, alguns metazoários foram observados em cortes histológicos, porém todos com baixas prevalências e intensidades.

Um turbelário, possivelmente do gênero *Urastoma* foi observado no tecido conjuntivo do manto de *Crassostrea rhizophorae*. Em mexilhões, esses turbelários quando em grande número ocasionalmente têm sido associados à destruição nas brânquias (Robledo et al. 1994) mas em ostras não existem relatos dessa natureza (Brun et al. 2000). A ocorrência desse turbelário no tecido conjuntivo foi possivelmente acidental uma vez que seu sítio habitual é na cavidade das brânquias.

Metacercárias de trematódeos não identificados foram detectadas infestando as gônadas de ostras de ambos os sexos. As metacercárias pareciam não causar prejuízos significativos a gametogênese. Esporocistos da família Bucephalidae são comumente observados nas gônadas de bivalves causando a castração do hospedeiro. As larvas cercárias se desenvolvem em esporocistos sendo o bivalve o primeiro hospedeiro intermediário (Lauckner, 1983; Bower, 1992). Já as metacercárias observadas neste estudo indicam outra família de trematódeos, ainda não identificada. Metacercárias de digenéticos não identificadas foram registradas em *Anomalocardia brasiliiana* e em *Iphigenia brasiliiana* (Bivalvia, Donacidae) na Bahia, em baixas intensidades de infestação, porém com resposta de defesa do hospedeiro evidenciada pelo encapsulamento do parasita e infiltração de hemócitos (Boehs et al. 2010) e em *A. brasiliiana* da Ilha de Santa Catarina (da Silva et al. 2010). Metacercárias de *Parvatrema* sp. (Digenea, Gymnophallidae) ocorreram com prevalências elevadas em uma população de unha de velho *Tagelus plebeius* da Ilha de Santa Catarina afetada por um evento de mortalidade (da Silva et al. 2009).

Larvas de cestóides possivelmente *Tylocephalum* sp., foram detectadas em baixas prevalências em 2008 e 2009. Nas ostras infestadas foi observada reação hemocitária e uma camada de células de natureza fibrosa resultando no encapsulamento do parasita. *Tylocephalum* sp. foi observado com prevalência alta (51,7%) em *Pinctada albina* (Hine e Thorne, 2000) e variou de 7% a 58% em *Crassostrea virginica* da Flórida (Winstead et al. 2004). No Brasil, larvas de *Tylocephalum* já foram detectadas em prevalências baixas em várias espécies de moluscos bivalves (Nascimento et al. 1986; Boehs e Magalhães 2004; Sabry e Magalhães, 2005; Sabry et al. 2007; Boehs et al. 2010, da Silva et al. 2010). Em todos esses trabalhos os autores relataram respostas dos hospedeiros evidenciadas pela infiltração de hemócitos em torno do parasita.

No presente trabalho, os patógenos encontrados não causaram danos ao hospedeiro e, com exceção de *Nematopsis* sp. e de *Tylocephalum* sp. todos estão sendo registrados pela primeira vez em ostras *Crassostrea rhizophorae* do Estuário do Rio Pacoti, Ceará.

Até o momento, nenhum dos patógenos presentes na ostra-de-mangue, *C. rhizophorae*, do Estuário do Rio Pacoti representa risco à saúde desse bivalve, uma vez que foram detectados com baixa intensidade. No entanto, programas de monitoramento das doenças na ostra são recomendados, principalmente aqueles voltados para detecção

de patógenos considerados de declaração obrigatória a OIE, que representam alto risco para as populações naturais e cultivadas.

## 5. Agradecimentos

Os autores são gratos pelo apoio financeiro, através do edital N<sup>o</sup> 64/2008 do MCT/CNPq/MAPA/SDA que tornou viável essa pesquisa; à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela Bolsa de Doutorado do Programa Amazônia Azul para Rachel C.Sabry.

## 6. Referências

Ambariyanto, S.R., 1991. The infestation of *Mytilus edulis* Linnaeus by *Polydora ciliate* (Johnston) in the Conwy Estuary, North Wales. J. Moll. Stud. 57, 413-424.

Araújo, M.L.R., Rocha-Barreira, C.A., 2004. Occurrence of *Bucephalus* sp. (Trematoda: Bucephalidae). in *Anomalocardia brasiliiana* (Gmelin, 1791) (Mollusca: Veneridae) from Canto da Barra Beach, Fortim, Ceará State, Brazil. Arq. Ciên. Mar. 37, 35–38.

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.

Azevedo, C., Cachola, R., 1992. Fine structure of the apicomplexa oocyst of *Nematopsis* sp. of two marine bivalve molluscs. Dis. Aquat. Org. 14, 69–73.

Boehs, G., Lenz, T.M., Villalba, A. 2009. Xenomas in *Crassostrea rhizophorae* (Ostreidae) from Camamu Bay, Bahia, Brazil. Braz. J. Biol. 69, 457-458.

Boehs, G., Magalhães, A.R.M., 2004. Simbiontes associados com *Anomalocardia brasiliiana* (Gmelin) (Mollusca, Bivalvia, Veneridae) na Ilha de Santa Catarina e região continental adjacente, Santa Catarina, Brasil. Rev. Bras. Zool. 21, 865–869.

Boehs, G., Villalba, A., Ceuta, L.O., Luz, J.R., 2010. Parasites of three commercially exploited bivalve mollusc species of the estuarine region of the Cachoeira River (Ilhéus, Bahia, Brazil). *J. Invertebr. Pathol.* 103, 43–47.

Bossaïd, B., Grippari, J.L., Renault, T., Tige, G., Dorange, G., 1999. *Trichodina* sp. infestation of *Crassostrea gigas* oyster gills in Brittany, France. *J. Invert. Pathol.* 73, 339–342.

Bower, S.M., 1992. Diseases and parasites of mussels, in: Gosling, E. (ed.), *The Mussel Mytilus: Ecology, Physiology, Genetics and Culture*. Elsevier., Amsterdam, pp. 543–563.

Bower, S.M., McGladdery, S.E., Price, I.M., 1994. Synopsis of infectious diseases and parasites of commercially exploited shellfish. *Annu. Rev. Fish Dis.* 4, 1–199.

Brun N.T., Ross, N.W., Bogen, A.D., 2000. Changes in the Electrophoretic Profiles of Gill Mucus Proteases of the Eastern Oyster *Crassostrea virginica* in Response to Infection by the Turbellarian *Urastoma cyprinae*. *J. Invertebr. Pathol.* 75, 163–170.

Burreson, E.M., 2008. Misuse of PCR assay for diagnosis of mollusc protistan infections. *Dis. Aquat. Org.* 80, 81–83.

Burreson, E.M., Ragone Calvo, L.M., 1996. Epizootiology of *Perkinsus marinus* disease of oysters in Chesapeake Bay, with emphasis on data since 1985. *J. Shellfish Res.* 15, 17–34.

Bush, A.O., Lafferty, A.D., Lotz, J.M., Shostak, A.W., 1997. Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis et al. revisited. *J. Parasitol.* 83, 575–583.

Bushek, D., Landau, B., Scarp, E., 2008. *Perkinsus chesapeaki* in stout razor clams *Tagelus plebeius* from Delaware Bay. *Dis. Aquat. Org.* 78, 243–247.

Bushek, D., Scarpa, J., Laramore, S.E., 2002. Susceptibility of the Caribbean oyster *Crassostrea rhizophorae* to *Perkinsus marinus*. *J. Shellfish Res.* 21, 371–372.

- Cáceres-Martínez, J., Macías-Montes de Oca, P., Vásquez-Yeomans, R., 1998. *Polydora* sp. infestation and health in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* cultured in Baja California, NW México. *J. Shellfish Res.* 17, 259–264.
- Cáceres-Martínez J. Vásquez-Yeomans, R., Padilla-Lardizábal, G., Del Río Portilla, M.A., 2008. *Perkinsus marinus* in pleasure oyster *Crassostrea corteziensis* from Nayarit, Pacific Coast of México. *J. Invert. Pathol.* 99, 66–73.
- Carballal, M.J., Iglesias, D., Santamarina, J., Ferro-Soto, B., Villalba, A., 2001. Parasites and Pathologic Conditions of the Cockle *Cerastoderma edule* Populations of the Coast of Galicia (NW Spain). *J. Invert. Pathol.* 78, 87–97.
- Casas, S.M., Villalba, A., Reece, K.S., 2002. Study of perkinsosis 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, 51–65.
- Cheng, T.C., 1967. Marine molluscs as hosts for symbioses – with a review of known parasites of commercially important species, in: Russell, F.S. (Ed.), *Advances in Marine Biology*. Academic Press, London, pp. 5–34.
- Comtet, T., Garcia C., Le Coguic Y., Joly J.P., 2004. First record of the microsporidian parasite *Steinhausia mytilovum* in *Mytilus* sp. (Bivalvia: Mytilidae) from France. *Dis. Aquat. Org.* 58: 261–264.
- Cremonte, F., Balseiro, P., Figueras, A., 2005a. Occurrence of *Perkinsus olseni* (Protozoa: Apicomplexa) and other parasites in the venerid commercial clam *Pitar rostrata* from Uruguay, southwestern Atlantic coast. *Dis. Aquat. Org.* 64, 85–90.
- Cremonte, F., Figueras, A., Burreson, E.M. 2005b. A histopathological survey of some commercially exploited bivalve molluscs in northern Patagonia, Argentina. *Aquaculture* 24, 23–33.
- da Silva, P.M., Cremonte, F., Sabry, R.C., Rosa, R.D., Cantelli, L., Barracco, M.A., 2009. Presence and histopathological effects of the *Parvatrema* sp. (Digenea, Gymnophallidae) in the stout razor clam

*Tagelus plebeius* (Bivalvia, Psammobiidae). J. Invert. Pathol. 102, 14–20.

da Silva, P.M., Leal, A.L.L., Magalhães, A.R.M., Barracco, M.A., 2010. Pathological survey on the commercial edible bivalve species from Santa Catarina (South Brazil), in: Aquaculture 2010. San Diego, California, p. 244.

Dungan, C.F., Reece K.S. 2006. In Vitro Propagation of Two *Perkinsus* spp. Parasites from Japanese Manila Clams *Venerupis philippinarum* and Description of *Perkinsus honshuensis* n. sp. J. Eukaryot. Microbiol. 53, 316–326.

Dungan, C.F., Reece, K.S., Moss, J.A., Hamilton, R.M., Diggles, B.K., 2007. *Perkinsus olseni* in vitro isolates from the New Zealand clam *Austrovenus stutchburyi*. J. Eukaryot. Microbiol. 54, 263–270.

Elandaloussi, L.M., Carrasco, N., Roque A., Andree K., Furones, M.D., 2009. First record of *Perkinsus olseni*, a protozoan parasite infecting the commercial clam *Ruditapes decussatus* in Spanish Mediterranean waters. J. Invert. Pathol. 100, 50–53.

Ferreira, L.P., Sabry, R.C., da Silva, P.M., Romão, L.S., Araújo, R. L., Silveira, F.F., Gesteira, T.C.V., 2008. Ocorrência de parasitas em *Anomalocardia brasiliiana* (Bivalvia: Veneridae) do Estuário do Rio Pacoti, Ceará, in: Encontro Brasileiro de Patologistas de Organismos Aquáticos (ENBRAPOA), 2008. Campinas, São Paulo, Brasil, p. 238.

Figueras, A.J., Villalba, A., 1988. Patología de moluscos, in: Monteros, J.E., Labarta, U. (Eds.), Patología en acuicultura. Mundi-Prensa Libros., Madrid, pp. 327–389.

FUNCEME (Fundação Cearense de Meteorologia e Recursos Hídricos). 2009. Boletim da quadra chuvosa, FUNCEME, Fortaleza, Ceará, Brasil.

Galtsoff, P.S., 1964. The American oyster *Crassostrea virginica*. Fishery Bulletin. 64, 1-480.

Green, T.J., Jones, B.J., Adlard, R.D., Barnes, A.C., 2008. Parasites, pathological conditions and mortality in QX-resistant and wild-caught Sydney rock oysters, *Saccostrea glomerata*. Aquaculture. 280, 35–38.

- Hine, P.M., Thorne T., 2000. Survey of some parasites and diseases of several species of bivalve mollusc in northern Western Australia. *Dis. Aquat. Org.* 40, 67–78.
- Howard, D.W., Lewis, E.J., Keller, B.J., Smith, C.S., 2004. *Histological Techniques for Marine Bivalve Mollusks and Crustaceans*. NOAA Technical Memorandum. NOS NCCOS5, Oxford, MD. 218p.
- Ibbotson, D.P., Magalhães, A.R.M., 2002. Polidiariose em *Crassostrea gigas* cultivadas na praia da Ponta do Sambaqui, Florianópolis, SC, Brasil, in: Encontro Brasileiro de Patologistas de Organismos Aquáticos e Encontro Latino-Americano de Patologistas de Organismos Aquáticos (ENBRAPOA), 2002. Foz do Iguaçu, Paraná, Brasil, p. 192.
- Jones, J.B., Creeper J., 2006. Diseases of pearl oysters and other molluscs: a Western Australian perspective. *J. Shellfish Res.* 25, 233–238.
- Lauckner, G. 1983. Diseases of Mollusca: Bivalvia diseases of marine animals, in: Kinne, O. (Ed.), *Introduction Bivalvia to Scaphopoda*. Biologische Anstalt Helgoland., Hamburg, pp. 477– 977.
- Lester, R.J.G., Davis, G.H.G., 1981. A new *Perkinsus* species (Apicomplexa, Perkinsea) from the abalone *Haliotis ruber*. *J. Invertebr. Pathol.* 37, 181–187.
- McGladdery, S.E., Bower, S.M., Getchell, R.G., 2006. Diseases and parasites of scallops. In: shumway, S.E., Parsons, G.J. (Editors), *Scallops: Biology, Ecology and Aquaculture*. p. 595 – 650.
- Matos, E., Matos, P., Azevedo, C., 2005. Observations on the intracytoplasmatic microsporidian *Steinhausia mytilovum*, a parasite of mussel (*Mytella guyanensis*) oocytes from the Amazon River estuary. *Braz. J. Morphol.* 22, 183–186.
- Mendonça; R.C., Scardua M.P.; Leal, A.L.L., da Silva, P.M. 2010. Primeiro registro de *Perkinsus* sp. infectando ostras *Crassostrea brasiliiana* no Estuário do Rio São Francisco, Brasil, in: Encontro Brasileiro de Patologistas de Organismos Aquáticos (ENBRAPOA), 2010. Campinas, São Paulo, Brasil, p. 7.

Moss, J.A., Burreson, E.M., Cordes, J.F., Dungan, C.F., Brown, G.D., Wang, A., Wu, X., Reece, K.S., 2007. Pathogens in *Crassostrea ariakensis* and other Asian oyster species: implications for non-native oyster introduction to Chesapeake Bay. *Dis Aquat. Org.* 77, 207–223.

Moss, J.A., Xiao, J., Dungan, C.F., Reece, K.S., 2008. Description of *Perkinsus beihaiensis* n. sp., a new *Perkinsus* sp. Parasite in oysters of southern China. *J. Eukaryot. Microbiol.* 55, 117–130.

Nascimento, I.A., Smith, D.H., Kern II, F., Pereira, S.A., 1986. Pathological Findings in *Crassostrea rhizophorae* from Todos os Santos Bay, Bahia, Brazil. *J. Invertebr. Pathol.* 47, 340–349.

Nel, R., Coetzee, P.S., Van Niekerk, G., 1996. The evaluation of two treatments to reduce mud worm (*Polydora Hoplura* Claparède) infestation in commercially reared oysters (*Crassostrea gigas* Thunberg). *Aquaculture.* 141, 31-39.

OIE (Office International des Èpizooties/World Animal Health Organization). 2006. Manual of diagnostic test for aquatic animals, OIE, Paris.

OIE (Office International des Èpizooties/World Animal Health Organization). 2009. Manual of diagnostic test for aquatic animals, OIE, Paris.

Pinto, T.R., Boehs, G., 2008. *Nematopsis* sp. (Apicomplexa: Eugregarinida) em *Mytella guyanensis* (Lamarck, 1819) (Bivalvia: Mytilidae) da região estuarina do Rio Cachoeira, Ilhéus, Bahia, Brasil. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.* 45, 95–100.

Pontinha, V.A., 2009. Diagnóstico da saúde da ostra *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) cultivada em Florianópolis/SC. Dissertação de Mestrado, UFSC, Florianópolis, Brasil, 53p.

Pontinha, V.A; Sabry R.C., da Silva, P.M., Magalhães, A.R., 2010. Protozoários do tipo steinhausia parasitando ovócitos do marisco *Brachidontes solisianus* d'Orbigny, 1846, coletados em costão rochoso na praia da armação em Florianópolis, SC, in: Encontro Brasileiro de Patologistas de Organismos Aquáticos (ENBRAPOA), 2010. Campinas, São Paulo, Brasil, p. 29.



- Ray, S.M., 1954. Biological studies of *Dermocystidium marinum*, a fungus parasite of oysters. Rice Institute pamphlet (Monogr Biol Spec Ser Iss), Rice Institute, Washington, DC.
- Rayyan, A., Chintiroglou C.C., 2003. *Steinhausia mytilovum* in cultured mussels *Mytilus galloprovincialis* in the Thermaikos Gulf (northern Aegean Sea, Greece). Dis. Aquat. Org. 57, 271–273.
- Robledo, J.A.F., Cáceres-Martínez, J., Sluys, R., Figueras, A., 1994. The parasitic turbellarian *Urastoma cyprinae* (Platyhelminthes: Urastomidae) from blue mussel *Mytilus galloprovincialis* in Spain: Occurrence and pathology. Dis. Aquat. Org. 18, 203–210.
- Sabry, R.C, Gesteira, T.C.V, Boehs, G., 2007. First record of parasitism in the mangrove oyster *Crassostrea rhizophorae* (Bivalvia: Ostreidae) at Jaguaribe River estuary – Ceará, Brazil. Braz. J. Biol. 67, 755-758.
- Sabry, R.C., Magalhães, A.R.M., 2005. Parasitas em ostras de cultivo (*Crassostrea rhizophorae* e *Crassostrea gigas*) da Ponta do Sambaqui, Florianópolis, SC. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 57, 194–2203.
- Sabry, R C., Rosa, R. D., Magalhães, A.R., Barracco, M., Gesteira, T.C.V, da Silva, P. M., 2009. First report of *Perkinsus* sp. infecting mangrove oysters *Crassostrea rhizophorae* from the Brazilian coast. Dis. Aquat. Org. 88, 13-23.
- Shaw, B.L., Battle, H.I., 1957. The gross and microscopic anatomy of the digestive tract of the oyster *Crassostrea virginica* (Gmelin). Can. J. Zool. 35, 325–347.
- Stephen, D., 1978. Mud blister formation by *Polydora ciliate* in the Indian backwater oyster *Crassostrea madrasensis* (Preston). Aquaculture. 13, 347-350.
- Villalba, A., Mourelle, S.G., CarballaL, M.J., López, C., 1997. Symbionts and diseases of farmed mussels *Mytilus galloprovincialis* throughout the culture process in the Rías of Galicia (NW Spain). Dis. Aquat. Org. 31, 127-139.
- Villalba, A., Reece, K.S. Ordás, M.C. Casas, S.M. Figueras, A., 2004. Perkinsosis in molluscs: A review. Aquat. Living Resour. 17, 411–432.

Winstead, J.T., Volety, A.K., Tolley, S.G., 2004. Parasitic and symbiotic fauna in oyster (*Crassostrea virginica*) collected from the Caloosahatchee River and Estuary in Florida. J. Shellfish Res. 23, 831–840.

## CAPÍTULO V - Considerações Finais

- As análises patológicas realizadas nas ostras nativas *Crassostrea rhizophorae* (costão) e *C. gigas* (cultivo) do Sambaqui (Baía Norte) e Ribeirão da Ilha (Baía Sul) de Santa Catarina e nas ostras *C. rhizophorae* do Estuário do Rio Pacoti, Ceará, mostraram: a ocorrência de algumas alterações e a presença de vários microorganismos sendo: hipertrofia dos gametas, bactérias do tipo rickettsia, protozoários do tipo *Trichodina*, *Sphenophrya*, *Ancistrocoma*, *Steinhausia* e *Nematopsis* e metazoários dos gêneros *Polydora*, *Urastoma*, larvas de digenéticos não identificadas, *Tylocephalum* e o copépode possivelmente do gênero *Pseudomiycola*.
- A intensidade de infecção e/ou infestação por parasitas (protozoários e metazoários) encontrados nas ostras *Crassostrea rhizophorae* (costão) e *C. gigas* (cultivo) do Sambaqui (Baía Norte) e Ribeirão da Ilha (Baía Sul) de SC e nas do Estuário do Rio Pacoti/CE foram considerados baixas, mesmo quando as prevalências eram elevadas.
- A técnica de cultivo em meio líquido de tioglicolato (RFTM) diagnosticou pela primeira vez no Brasil o protozoário do gênero *Perkinsus* nas ostras *Crassostrea rhizophorae* do Estuário do Rio Pacoti, mas não nas duas espécies de ostras dos dois locais estudados em Santa Catarina, indicando serem regiões livres do patógeno.
- As análises de PCR seguida de técnicas adicionais de clonagem e sequenciamento da região ITS do espaçador interno transcrito (ITS) do RNA ribossomal (RNAr) confirmaram se tratar do gênero *Perkinsus* e mostraram que a espécie tem similaridade com a espécie *P. beihaiensis* que infecta ostras na China.

- Os parasitas encontrados nas ostras do Sambaqui (SC) Ribeirão da Ilha (SC) e Estuário do Rio Pacoti (CE) incluindo as ostras infectadas por *Perkinsus* sp. do Ceará, até o momento parecem não causar impacto sobre essas populações de ostras.

## SUGESTÕES

No Brasil ainda são poucos os estudos na área de patologia de moluscos. O conhecimento das enfermidades que acometem esses animais é fundamental para a prevenção e controle das doenças, uma vez que alguns patógenos constituem um risco potencial para as populações naturais e cultivadas. Esse fato indica a necessidade de intensificação de pesquisas na área de patologia de moluscos.

Alguns trabalhos, sobre parasitas em moluscos, já foram realizados em bivalves da costa brasileira, contudo, estudos voltados para a investigação de patógenos de declaração obrigatória pela Organização Mundial para Saúde Animal foram iniciados apenas recentemente.

O presente trabalho registrou pela primeira vez a ocorrência de um patógeno do gênero *Perkinsus* cuja espécie ainda não foi identificada e cujo gênero inclui duas espécies de declaração obrigatória pela Organização Mundial para Saúde Animal – OIE. Vale ressaltar que no Estado do Ceará a pesquisa para *Perkinsus* foi feita somente no Estuário do Rio Pacoti próximo a Fortaleza e em uma única espécie de ostra. É importante que esse estudo tenha continuidade ao longo de vários anos para se conhecer a dinâmica da infecção e o impacto no hospedeiro e nas demais espécies de bivalves da região. Estudo mais detalhado faz-se necessário para que se conheça a distribuição desse protozoário em toda a costa brasileira, seus efeitos sobre as ostras e sua relação com as variáveis temperatura e salinidade ao longo do ano.

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA INTRODUÇÃO GERAL**

ABOLLO, E. et al. Differential diagnosis of *Perkinsus* species by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism assay. **Molecular and Cellular Probes**, v. 20, p. 323–329, 2006.

ARAÚJO, M.L.R.; ROCHA-BARREIRA, C.A. Occurrence of *Bucephalus* sp. (Trematoda, Bucephalidae) in *Anomalocardia brasiliiana* (Gmelin, 1791) (Mollusca, Veneridae) from Canto da Barra Beach, Fortim, Ceará State, Brazil. **Arquivos de Ciências do Mar**, v. 37, p. 35–38, 2004.

AZEVEDO, C. Fine structure of *Perkinsus atlanticus* n. sp. (Apicomplexa, Perkinsea) parasite of clams, *Ruditapes decussatus*, from Portugal. **Journal of Parasitology**, v. 75, p. 627–635, 1989.

AZEVEDO, C.; CACHOLA, R. Fine structure of the apicomplexa oocyst of *Nematopsis* sp. of two marine bivalve molluscs. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 14, p. 69–73, 1992.

AZEVEDO, C.; MATOS, E. Description of *Nematopsis mytella* n. sp. (Apicomplexa), parasite of the mussel *Mytella guyanensis* (Mytilidae) from the Amazon Estuary and description of its oocysts. **European Journal Protistology**, v. 35, p. 427–433, 1999.

BERTHE, F. 2001. Seminario de Enfermedades Animales Acuáticos. Disponível em: <[http://www.rr-americas.oie.int/es/proyectos/Acuaticos/es\\_acuaticos\\_semcostarica\\_moluscos.htm](http://www.rr-americas.oie.int/es/proyectos/Acuaticos/es_acuaticos_semcostarica_moluscos.htm)>; Acesso em 28 outubro de 2010.

BOEHS, G.; LENZ, T.M.; VILLALBA, A. Parasitos na ostra-domangue *Crassostrea rhizophorae* (Ostreidae) da Baía de Camamu, Bahia. In: ENCONTRO BRASILEIRO DE PATOLOGISTAS DE ORGANISMOS AQUÁTICOS, X., 2008, Búzios. **Resumos...Búzios**, 2008. p. 63.

BOEHS, G.; LENZ, T.M.; VILLALBA, A. Xenomas in *Crassostrea rhizophorae* (Ostreidae) from Camamu Bay, Bahia, Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 69, p. 457–458, 2009.

- BOEHS, G.; MAGALHÃES, A.R.M. Simbiontes associados com *Anomalocardia brasiliiana* (Gmelin) (Mollusca, Bivalvia, Veneridae) na Ilha de Santa Catarina e região continental adjacente, Santa Catarina, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 21, p. 865–869, 2004.
- BOEHS, G.; VILLALBA, A.; CEUTA, L.O.; LUZ, J.R. Parasites of three commercially exploited bivalve mollusc species of the estuarine region of the Cachoeira River (Ilhéus, Bahia, Brazil). **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 103, p. 43–47, 2010.
- BOWER, S.M.; MCGLADDERY, S.E.; PRICE, I.O. Synopsis of infectious diseases and parasites of commercially exploited Shellfish. **Annual Review of Fish Diseases**, v. 4, p.1–199, 1994.
- BUSHEK D.; SCARPA J.; LARAMORE, S.E. Susceptibility to the Caribbean oyster *Crassostrea rhizophorae* to *Perkinsus marinus*. **Journal of Shellfish Research**, v. 21, p. 371–372, 2002.
- CARBALLAL, M.J.; IGLESIAS, D.; SANTAMARINA, J.; FERRO-SOTO, B.; VILLALBA, A. Parasites and Pathologic Conditions of the Cockle *Cerastoderma edule* Populations of the Coast of Galicia (NW Spain). **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 78, p. 87–97, 2001.
- CEUTA, L.O. **Parasitos e histopatologia do marisco-do-mangue, *Mytella guyanensis* (Lamarck, 1819) (Bivalvia: Mytilidae), da Baía de Camamu (Bahia)**. 2010. 43. f. Dissertação (Mestrado em Sistemas Aquáticos Tropicais – Ecologia) – Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, 2010.
- CHENG, Thomas Clément. **Parasitologia General**. 2. ed. Madrid: Editorial AC, 1978. 965 p.
- COCHÔA A.R.; MAGALHÃES, A.R.M. Perdas de sementes de mexilhões *Perna perna* (L., 1758), cultivados na baía norte - Ilha de Santa Catarina/SC. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 34, p. 1–10, 2008.
- CREMONTE, F; BALSEIRO, P.; FIGUERAS, A. Occurrence of *Perkinsus olseni* (Protozoa: Apicomplexa) an other parasites in the venerid commercial clam *Pitar rostrata* from Uruguay, southwestern Atlantic coast. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 64, p. 85–90, 2005.

da COSTA, R.L. **Prevalência de enfermidades e histopatologia de *Perna perna* (Mollusca) em Florianópolis/SC, Brasil**. 2007. 31 f. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007.

da SILVA, P.M.; LEAL, A.L.L.; MAGALHÃES, A.R.M.; BARRACCO, M.A. Pathological survey on the commercial edible bivalve species from Santa Catarina (South Brazil). In.: AQUACULTURE, 2010, San Diego, California. **Resumos...** San Diego, 2010. p. 244.

DITTMAN, D.E.; FORD, S.E.; PADILLA, D.K. Effects of *Perkinsus marinus* on reproduction and condition of the eastern oyster, *Crassostrea virginica* depend on timing. **Journal of Shellfish Research**, v. 20, p.1025–1034, 2001.

dos SANTOS. et al. A Maricultura: Mexilhões, Ostras e Vieiras. Síntese Informativa da Maricultura. EPAGRI/CEDAP; outubro de 2010; disponível em: < <http://www.epagri.sc.gov.br>; acesso em 20 outubro de 2010.

DUNGAN, C.F. et al. *Perkinsus olseni* in vitro isolates from the New Zealand clam *Austrovenus stutchburyi*. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 54, p. 263–270, 2007.

DUNGAN, C.F.; REECE, K.S. In vitro propagation of two *Perkinsus* spp. parasites from Japanese Manila clams *Venerupis philippinarum* and description of *Perkinsus honshuensis* n. sp. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 53, p. 316–326, 2006.

ELANDALOUSSI, L.M. et al. First record of *Perkinsus olseni*, a protozoan parasite infecting the commercial clam *Ruditapes decussatus* in Spanish Mediterranean waters. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 100, p. 50–53, 2009.

FERREIRA, L.P.; SABRY, R.C.; DA SILVA, P.M.; ROMÃO, L.S.; ARAÚJO, R. L.; SILVEIRA, F.F.; GESTEIRA, T.C.V. Ocorrência de parasitas em *Anomalocardia brasiliiana* (Bivalvia: Veneridae) do Estuário do Rio Pacoti, Ceará. In: ENCONTRO BRASILEIRO DE PATOLOGISTAS DE ORGANISMOS AQUÁTICOS, X., 2008, Búzios, **Resumos...**Búzios, 2008a. p. 238.

FERREIRA, J.F.; SABRY, R.C.; GOMES, C.H.A.M.; MAGALHÃES, A.R.M. Influência do parasitismo por *Bucephalus* sp. (Trematoda: Bucephalidae) sobre a eficiência de desova do mexilhão *Perna perna*. In: ENCONTRO BRASILEIRO DE PATOLOGISTAS DE ORGANISMOS AQUÁTICOS, X., 2008, Búzios, **Resumos...Búzios**, 2008b.

FIGUERAS, A. J.; VILLALBA, A. Patología de moluscos. In: MONTEROS, J.E., LABARTA, U. (Eds.), **Patología en Acuicultura**. Madrid, 1988. p. 327–389.

GALVÃO, M.S.N. et al. Ciclo reprodutivo e infestação parasitária de mexilhões *Perna perna* (Linnaeus, 1758). **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 32, p. 59–71, 2006.

GOSLING, E. **Bivalve molluscs. Biology, ecology and culture**. Blackwell Science, Oxford., 2003, 431p.

GREEN, T.J. et al. Parasites, pathological conditions and mortality in QX-resistant and wild-caught Sydney rock oysters *Saccostrea glomerata*. **Aquaculture**, 280, 35–38, 2008.

GULKA, G.; CHANG, P.W.; MARTI, K.A. Procaryotic infection associated with mass mortality of the sea scallop *Placopecten magellanicus*. **Journal of Fish Diseases**, v. 6, p. 355–364, 1983.

GULLIAN-KLANIAN, M. et al. Factors associated with the prevalence of *Perkinsus marinus* in *Crassostrea virginica* from the southern Gulf of Mexico. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 79, p. 237–247, 2008.

KAROLUS, J. et al. Prevalence of *Perkinsus marinus* (Dermo) in *Crassostrea virginica* along the Connecticut shoreline. **Aquaculture**, v.183, p. 215–221, 2000.

LAUCKNER, G. Diseases of Mollusca: Bivalvia diseases of marine animals, In: KINNE, O. (Ed.), **Introduction Bivalvia to Scaphopoda**. Biologische Anstalt Helgoland, Hamburg, 1983. p. 477–977.

LEITE, L.A. **Influência da predação, parasitismo e densidade de sementes nas perdas de mexilhões *Perna perna* (L., 1758), cultivados na Baía Norte da Ilha de Santa Catarina. Florianópolis, SC. 2007.**

39 f. Dissertação (Mestrado em Aqüicultura) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007.

LESTER, R.J.G.; DAVIS, G.H.G. A new *Perkinsus* species (Apicomplexa, Perkinsea) from the abalone *Haliotis ruber*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 37, p. 181–187, 1981.

Levine N.D., 1978, *Perkinsus* gen. n. and other new taxa in the protozoan phylum Apicomplexa. *J. Parasitol.* 64, 549.

LIMA, F.C.; DE ABREU, M.G.; MESQUITA, E.F.M. Monitoramento histopatológico de mexilhão *Perna perna* da Lagoa de Itaipu, Niterói, RJ. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 53, p. 203–206, 2001.

MACKIN, J.G.; OWEN, H.M.; COLLIER, A. Preliminary note on the occurrence of a new protistan parasite, *Dermocystidium marinum* n. sp., in *Crassostrea virginica* (Gmelin). **Science**, v. 111, p. 328–329, 1950.

MAGALHÃES, A.R.M. **Efeito da parasitose por Trematoda Bucephalidae na reprodução, composição bioquímica e índice de condição de mexilhões *Perna perna* (L.)**. 1998. 185 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 1998.

MAGALHÃES, A.R.M.; FERREIRA, J.F. Patologias e manejo em malacocultura, In: SILVA-SOUZA, A. (Org.), Sanidade de Organismos Aquáticos no Brasil. Maringá, 2006, p.79–94.

MAGALHÃES, A.R.M.; MATOS, E.R.; AZEVEDO, C. Dados ultraestruturais do oocisto de *Nematopsis* sp. (Phylum Apicomplexa) parasita do berbigão, *Anomalocardia brasiliana* Gmelin, 1791 (Mollusca, Bivalvia, Veneridae) da região de Florianópolis, Santa Catarina. In: ENCONTRO BRASILEIRO DE PATOLOGISTAS DE ORGANISMOS AQUÁTICOS, VII, ENCONTRO LATINO AMERICANO DE PATOLOGISTAS DE ORGANISMOS AQUÁTICOS, III., 2002, Foz do Iguaçu. **Resumos...** Foz do Iguaçu, 2002. p.191.

MARCHIORI, N.C.; MAGALHÃES, A.R.M.; PEREIRA JR, J. Ciclo de vida de *Bucephalus margaritae* Ozaki e Ishibashi, 1934 (Digenea,



Bucephalidae) do litoral de Santa Catarina, Brasil. **Acta Scientiarum Biological Sciences**, v. 32, p. 71–78, 2010.

MATOS, E.; MATOS, P.; AZEVEDO, C. Observations on the intracytoplasmatic microsporidian *Steinhausia mytilovum*, a parasite of mussel (*Mytella guyanensis*) oocytes from the Amazon River estuary. **Brazilian Journal of Morphology**, v. 22, p. 183–186, 2005.

MCCOY, A. **Examination of *Mercenaria mercenaria* as a host for *Perkinsus marinus***. 2005. 67 f. Thesis (Degree of Master of Science) – Graduate School of the University of Florida, University of Florida, Florida, 2005.

MOSS, J.A. et al. Description of *Perkinsus beihaiensis* n. sp., a new *Perkinsus* sp. Parasite in oysters of southern China. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 55, p. 117–130, 2008.

NASCIMENTO, I.A. et al. Pathological findings in *Crassostrea rhizophorae* from Todos os Santos Bay, Bahia, Brazil. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 47, p. 340–349, 1986.

OIE World Organization for Animal Health. Manual of diagnostic test for aquatic animals 2006.

Disponível: < [http://www.oie.int/eng/en\\_index.htm](http://www.oie.int/eng/en_index.htm)>. Acesso em 03 de novembro de 2007.

OIE World Organization for Animal Health. Manual of diagnostic test for aquatic animals 2009.

Disponível: < [http://www.oie.int/eng/en\\_index.htm](http://www.oie.int/eng/en_index.htm)>. Acesso em 18 outubro de 2010.

PARK, K.I. et al. Occurrence of *Perkinsus olseni* in the Venus clam *Protothaca jadoensis* in Korean waters. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 93, p. 81–87, 2006.

PERKINS, F.O. The structure of *Perkinsus marinus* (Mackin, Owen & Collier, 1950) Levine, 1978 with comments on taxonomy and phylogeny of *Perkinsus* spp. **Journal of Shellfish Research**, v. 15, p. 67–87, 1996.

PINTO, T.R.; BOEHS, G. *Nematopsis* sp. (Apicomplexa: Eugregarinida) em *Mytella guyanensis* (Lamarck, 1819) (Bivalvia: Mytilidae) da região estuarina do Rio Cachoeira, Ilhéus, Bahia, Brasil. **Brazilian Journal of Veterinay Research and Animal Science**. v. 45, p. 95–100, 2008.

PIRKOVA, A.V.; DEMENKO, D. P. Cases of shell disease in the giant oyster *Crassostrea gigas* (Bivalvia) cultivated in the Black Sea, **Biologiya Morya**, v. 34, p. 359–364, 2008.

POLI, C. R. Cultivo de ostras do Pacífico. In: POLI, C.R. et al. (Org). **Aquicultura: Experiências brasileiras**. Florianópolis, 2004. p. 251–266.

PONTINHA, V.A. **Diagnóstico da saúde da ostra *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) cultivada em Florianópolis/SC**. 2009. 53 f. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.

PONTINHA, V.A.; SABRY, R.C.; DA SILVA, P.M.; MAGALHÃES, A.R. Protozoários do tipo *Steinhausia* parasitando ovócitos do marisco *Brachidontes solisianus* d'Orbigny, 1846, coletados em costão rochoso na Praia da Armação em Florianópolis, SC. In: ENCONTRO BRASILEIRO DE PATOLOGISTAS DE ORGANISMOS AQUÁTICOS, X., 2010, Campinas, São Paulo. **Resumos...** Campinas, 2010. p. 29.

RIOS, Eliézer de Carvalho. **Seashells of Brazil**. 2. ed. Rio Grande: Editora da Fundação Universidade do Rio Grande, 1994. 492p.

ROBLEDO, J. A. F; COSS, C; VASTA, G.R. Characterization of the ribosomal RNA locus of *Perkinsus atlanticus* and development of a polymerase chain reaction-based diagnostic assay. **Journal of Parasitology**, v. 86, p. 972–978, 2000.

ROMÃO, L.S.; SABRY, R.C.; FERREIRA, L.P.; PRAXEDES, G.F.; MAGGIONI, R.; GESTEIRA, T.C.V. Investigação de parasitas na ostra do mangue *Crassostrea rhizophorae* (Bivalvia, Ostreidae) do Estuário do Rio Pacoti – Ceará. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE OCEANOGRAFIA , III., 2010, Rio Grande. **Resumos...** Rio Grande, 2010. p. 1785–1787.

SABRY, R.C.; GESTEIRA, T.C.V.; ASSIS, C.P.; SILVEIRA, F.F. Ocorrência de parasitismo no sururu *Mytella falcata* (Orbigny, 1846), do Estuário do Rio Jaguaribe – CE. In: ENCONTRO BRASILEIRO DE PATOLOGISTAS DE ORGANISMOS AQUÁTICOS, IX., 2006, Maceió. **Resumos...** Maceió, 2006. p. 88.

SABRY, R.C.; GESTEIRA, T.C.V.; BOEHS, G. First record of parasitism in the mangrove oyster *Crassostrea rhizophorae* (Bivalvia: Ostreidae) at Jaguaribe River estuary – Ceará, Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 67, p. 755–758, 2007.

SABRY, R.C.; MAGALHÃES, A.R.M. Parasitas em ostras de cultivo (*Crassostrea rhizophorae* e *Crassostrea gigas*) da Ponta do Sambaqui, Florianópolis, SC. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 57, p. 194–203, 2005.

SAMAIN, J-F. et al. Genetically based resistance to summer mortality in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) and its relationship with physiological, immunological characteristics and infection processes. **Aquaculture**, v. 268, p. 227–243, 2007.

SANTOS, J.J.B.; BOEHS, G.; CEUTA, L.O. Ocorrência de *Nematopsis* sp. (Apicomplexa: Eugregarinida) no molusco *Tagelus plebeius* (Bivalvia: Psammobiidae) da região estuarina do Rio Cachoeira, Ilhéus (BA). In: ENCONTRO DE ECOLOGIA DO BRASIL, 8., 2007, Caxambu, **Resumos...** Caxambu, 2007. p. 128.

SHEPPARD, B.J.; PHILLIPS, A.C. *Perkinsus olseni* detected in Vietnamese aquacultured reef clams *Tridacna crocea* imported to the USA, following a mortality event. **Disease of Aquatic Organisms**, v. 79, p. 229–235, 2008.

SILVA, P.M.; MAGALHÃES, A.R.M.; BARRACCO, M.A. Effects of *Bucephalus* sp. (Trematoda: Bucephalidae) on *Perna perna* mussels from a culture station in Ratonés Grande Island, Brazil. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 79, p.154–162, 2002.

SILVEIRA JR., N. **Predadores, incrustantes e enfermidades**. In: **Manual de cultivo de ostras. Laboratório de Cultivo de Moluscos Marinhos**. Florianópolis, 1997, p. 39–55.

SILVEIRA JR., N.; MAGALHÃES, A.R.M.; BRAGA, F.E. Evolução e sintomatologia da “doença do pé” em ostras do Pacífico (*Crassostrea gigas*) cultivadas em Florianópolis/SC-Brasil. In: ENCONTRO BRASILEIRO DE PATOLOGISTAS DE ORGANISMOS AQUÁTICOS E ENCONTRO LATINO-AMERICANO DE PATOLOGISTAS DE ORGANISMO AQUÁTICOS, 6., 2000, Florianópolis. **Resumos...** Florianópolis, 2000. p. 26.

SINDERMANN, C.J. Diseases of marine shellfish. In: **Principal diseases of marine fish and shellfish**. San Diego, 1970. 516p.

SMOLOWITZ, R.; FORD, S. Prevalence and intensity of *Perkinsus marinus* (Dermo) in the Northeast U.S.J. Milford, Connecticut. **Journal of Shellfish Research**, v. 17, p. 363, 1998.

UMIJI, S. et al. Infestation of the mussel *Perna perna* by digenetic trematodes of the Bucephalidae family, gen. *Bucephalus*. **Anais da Academia Brasileira de Ciência**, v. 47, p.115–117, 1976.

VILLALBA, A. et al. Branchial *Rickettsia*-like infection associated with clam *Venerupis rhomboides* mortality. **Disease of Aquatic Organisms**, v. 36, p. 53–60, 1999.

VILLALBA, A. et al. Perkinsosis in molluscs: A review. **Aquatic of Living Resources**, v. 17: p. 411–432, 2004.

WINSTEAD, J.T.; VOLETY, A.K.; TOLLEY, S.G. Parasitic and symbiotic fauna in oyster (*Crassostrea virginica*) collected from the Caloosahatchee River and Estuary in Florida. **Journal of Shellfish Research**., v. 23, p. 831–840, 2004.