

Ana Carolina Luz Braz da Cunha

Diagnóstico de *Perkinsus* em ostras no litoral catarinense

Dissertação submetida ao Programa de Pós Graduação em Aquicultura da Universidade Federal de Santa Catarina para obtenção de grau de Mestre em Aquicultura.

Orientador: José Luíz Pedreira Mouriño.
Coorientadora: Aimê Rachel Magalhães.

Florianópolis
2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Luz , Ana Carolina

Diagnóstico de Perkinsus em ostras no litoral
catarinense / Ana Carolina Luz ; orientador, José Luíz
Pedreira Mouriño ; coorientadora, Aimê Rachel Magenta
Magalhães. - Florianópolis, SC, 2015.

65 p.

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

Inclui referências

1. Aquicultura. 2. ostreicultura. 3. patologia. 4.
Perkinsozoa. 5. perkinsiose. I. Mouriño, José Luíz Pedreira
. II. Magalhães, Aimê Rachel Magenta . III. Universidade
Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em
Aquicultura. IV. Título.

Diagnóstico de *Perkinsus* em ostras no litoral catarinense

Por

ANA CAROLINA LUZ BRAZ DA CUNHA

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de

MESTRE EM AQUICULTURA

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



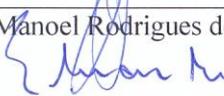
Prof. Alex Pires de Oliveira Nuñez, Dr.
Coordenador do Programa

Banca Examinadora:

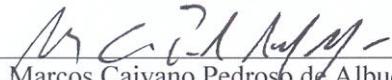


Dr. José Luiz Pedreira Moura – *Orientador*

Dr. Cláudio Manoel Rodrigues de Melo - UFSC



Dr. Eduardo Cargini Ferreira - IFSC



Dr. Marcos Caivano Pedrosa de Albuquerque - UFSC

Este trabalho é dedicado ao meu filho João Francisco, que aceitou sair do lugar que mais gostava para me acompanhar na busca pelo Mestrado e à minha mãe Ângela, sempre presente em todas as fases de minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Pai Celestial a oportunidade de evolução.

Agradeço ao meu orientador, José Luíz Pedreira Mouriño e à minha coorientadora, Aimê Rachel Magenta Magalhães, por me aceitarem, por acreditarem no meu potencial, por me mostrarem os passos corretos das pesquisas e por serem verdadeiros amigos e orientadores, também fora da universidade, me auxiliando nos obstáculos que surgiram na vida pessoal durante este período.

Agradeço ao meu filho João Francisco por entender e aceitar as mudanças que impus, para que este mestrado fosse possível. Mais que agradecimento, peço perdão por ter “destruído” a infância dele, como ouvi muitas vezes ao longo destes dois anos.

À minha mãe Ângela, que nunca me faltou. Com um amor incondicional me aplicava doses diárias de carinho, paciência e incentivo. Se mostrou a avó que qualquer um gostaria de ter. Sem ela eu não teria conseguido. Muito obrigada!

Ao meu avô Acyr Ávila da Luz, que sempre foi meu “porto seguro”.

À minha filha Lysete Moura, que me permitiu algumas horas do dia para finalizar esta dissertação.

Ao Gian Carlo da Silva, por estar ao meu lado, aguentar os altos e baixos do meu humor e por mostrar que sou autossuficiente.

À Tia Rê pelas palavras animadoras em todos os momentos de fragilidade, pelos dias de cinema, por todos os outros “mimos” que recebi e por ser minha segunda mãe.

Ao Professor Doutor Edemar Roberto Andreatta por se mostrar um verdadeiro amigo.

Aos Professores Doutores, Aimê Rachel Magenta Magalhães, Luis Alejandro Vinatea Arana, Edemar Roberto Andreatta, Walter Quadros Seiffert, Vinícius Ronzani Cerqueira, Maurício Laterça Martins, Felipe do Nascimento Vieira e José Luíz Pedreira Mouriño, por todo conteúdo e experiência compartilhados durante as disciplinas do mestrado.

Ao Carlito, por estar sempre pronto para responder a todas as minhas dúvidas, mesmo estando todas as respostas “no *site* do Programa de Pós-graduação em Aquicultura”.

À “santa” Jussara, por ajudar a todos, em tudo, sempre.

À equipe da Biblioteca do CCA, Tatiana, Anderson, Anira e Nilton, que nos atendem com paciência e educação.

Ao Walmor e ao Luís, que me “salvaram” as inúmeras vezes que meu *notebook* não respondia aos meus comandos.

Ao Vitor Pontinha, que me “apresentou” o *Perkinsus* e me ensinou as técnicas necessárias para iniciar minhas coletas.

Aos colegas dos Laboratórios do NEPAq, Hugo, Tamiris, Lucas, Monyele, Jorge, Gabriel, Carol “Téfi”, Gabriela, Lilian, Maria Luiza, Scheila, Aline, Karen, Dudu, Marcos, Zé, Paula, Iasmin, Michele, Fernanda, Marcela, Natyta, Jacob, Ana Lúcia, Seu Keka, Anita e Juliano.

Ao estagiário Hugo que me acompanhou e auxiliou nas coletas.

Ao Doutor Leonardo Tachibana, que providenciou meu ingresso no Instituto Biológico de São Paulo.

Ao Doutor Ricardo Harakava, que abriu as portas de seu laboratório, patrocinou as análises de biologia molecular desta pesquisa, capacitou-me para realizar tais análises e fez, junto com seus alunos, com que me sentisse em casa dentro do Instituto Biológico de São Paulo.

Ao Instituto Biológico de São Paulo por permitir-me livre acesso às dependências em todos os turnos, durante o período de minha permanência e, também, por me oferecer alojamento e alimentação.

Aos Laboratórios da Universidade Federal de Santa Catarina – LAMEX, AQUOS, LABCAI, LMM e LCM, que tornaram possíveis grande parte das coletas e análises.

À CAPES pela concessão da bolsa de mestrado que auxiliou na realização desta pesquisa.

A todas as pessoas que não foram citadas, mas que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, muito obrigada!

Não é a saída do porto, mas a chegada que determina o sucesso de uma viagem.

Henry Ward Beecher

Ensinar não é transferir conhecimento, mas criar as possibilidades para a sua própria produção ou construção.

Paulo Freire

A educação é a arma mais poderosa que você pode usar para mudar o mundo.

Nelson Mandela

A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará ao seu tamanho original.

Albert Einstein

Quando a vida decepciona, qual é a solução? Continue a nadar! Continue a nadar! Continue a nadar, nadar, nadar! Para achar a solução, nadar, nadar!

Dory – Procurando Nemo

O mar não é um obstáculo: é um caminho.

Amyr Klink

RESUMO

Na lista das doenças de declaração obrigatória da Organização Internacional de Epizootias, da Organização Mundial de Saúde Animal, duas enfermidades são causadas pelo protozoário do gênero *Perkinsus*: *Perkinsus olseni* e *Perkinsus marinus*, que causam grande mortalidade em ostras. Os primeiros registros de *Perkinsus* na costa brasileira foram em ostras nativas no litoral da Bahia, Ceará e Paraíba, estados do Nordeste do Brasil. O presente trabalho teve como objetivo investigar a ocorrência de *Perkinsus* em ostras *Crassostrea gigas* e *Crassostrea gasar* do litoral de Santa Catarina. Foram escolhidos ao longo do litoral catarinense seis pontos de coleta e realizadas sete amostras de 30 animais para cada espécie, no período de janeiro 2013 a dezembro de 2014. A metodologia de diagnóstico incluiu exames macro e microscópicos, com tecidos fixados em solução de Davidson, inclusão em parafina, cortes de 5 µm e coloração HHE. Foi realizada cultura de amostras de brânquias e reto em meio fluido tioglicolato (RFTM) e confirmação de resultados por amplificação de 16s RNA. Os resultados de RFTM mostraram *Perkinsus* spp. infectando *Crassostrea gasar* em Balneário Barra do Sul, com prevalência variando de 26,7 a 70,0% e 96,6% em São Francisco do Sul. Também houve diagnóstico positivo em *Crassostrea gigas*, com prevalência de 43,3%, em ostras coletadas em São Francisco do Sul. Os resultados moleculares confirmaram *Perkinsus marinus* infectando *Crassostrea gigas* e *Crassostrea gasar* dessa última localidade e *Perkinsus beihaiensis* em *Crassostrea gasar* de Balneário Barra do Sul. Este resultado é o primeiro relato do protozoário *Perkinsus marinus* infectando *Crassostrea gigas* na América do Sul.

Palavras-chave: Aquicultura, ostreicultura, patologia, Perkinsozoa, perkinsiose.

ABSTRACT

Among the mandatory reporting diseases from the list of International Organisation of Epizootics, by World Organisation for Animal Health (OIE) for mollusks, two are caused by the protozoan of the genus *Perkinsus*: *Perkinsus olseni* and *Perkinsus marinus*, protozoan that causes massive oyster mortality. The first reports of *Perkinsus* in the Brazilian coast were related to native oysters from Brazilian Northeast coast, Bahia, Ceará and Paraíba states. This study aimed to verify the occurrence of *Perkinsus* in oyster species *Crassostrea gigas* and *Crassostrea gasar*, present in Santa Catarina's coast. Those species were chosen in six collection points along the coast of Santa Catarina. Seven samples of 30 animals for each species were collected from January 2013 to December 2014. The diagnostic methodology includes macro and microscopic examinations, using tissues fixed in Davidson solution, embedded in paraffin, with 5 µm cuts, and HHE coloring. The culture of gills and rectum samples was performed inside thioglycolate fluid (RFTM), and results were confirmed by amplification of 16S RNA. The RFTM results demonstrated prevalence of *Perkinsus* spp. infecting *Crassostrea gasar* ranging from 26,7% to 70,0% for Balneário Barra do Sul and 96,6% from São Francisco do Sul. Positive diagnoses were detected on the *Crassostrea gigas*, with the prevalence of 43,3%, for animals collected from São Francisco do Sul. The molecular results also detected *Perkinsus marinus* infecting *Crassostrea gigas* and *Crassostrea gasar* from São Francisco do Sul samples and *Perkinsus beihaiensis* infecting *Crassostrea gasar* from Balneário Barra do Sul samples. Those results are the first report of protozoa *Perkinsus marinus* infecting *Crassostrea gigas* at South America.

Keywords: Aquaculture, oyster farming, pathology, Perkinsozoa, perkinsosis.

LISTA DE FIGURAS

Da introdução

- Figura 1 - Ciclo de vida de *Perkinsus olseni* parasitando o bivalve *Ruditapes philippinarum*..... 34
- Figura 2 - Análise em Meio Fluido de Tioglicolato – RFTM de macerado de intestino e brânquias de ostra *Crassostrea gigas*, infectado com *Perkinsus marinus* 35
- Figura 3 - Análise histológica de epitélio intestinal de ostra do gênero *Crassostrea*, infectado com *Perkinsus beihaiensis* 36

Do artigo científico

- Figura 4 - Regiões brasileiras indicando os locais onde foram registrados protozoários do gênero *Perkinsus* em moluscos bivalves 41
- Figura 5 - Litoral de Santa Catarina, indicando os locais de coleta de amostras de ostra 42
- Figura 6 - *Perkinsus* spp. na forma de hipnósporos (H), em tecido branquial de ostra nativa *Crassostrea gasar*, após incubação em meio fluido de tioglicolato de Ray (RFTM)..... 47
- Figura 7 - *Perkinsus* sp. no tecido epitelial de glândula digestiva da ostra nativa *Crassostrea gasar*. 48
- Figura 8 - Análise de parcimônia do DNAr sequências ITS das regiões de diferentes espécies de *Perkinsus*..... 49
- Figura 9 - Análise de parcimônia das sequências de DNA para identificação das espécies *Crassostrea gigas* e *Crassostrea gasar*..... 50

LISTA DE TABELAS

Do artigo científico

- Tabela 1. Resultados para a presença do protozoário *Perkinsus* ssp. em ostras, obtidos através dos métodos de diagnóstico: RFMT, histologia e PCR..... 45
- Tabela 2. Prevalência (%) de *Perkinsus beihaiensis* em ostras *Crassostrea gasar* coletadas em costões de Balneário Barra do Sul..... 46
- Tabela 3. Prevalência (%) de *Perkinsus marinus* em ostras *Crassostrea gasar* e *Crassostrea gigas* de cultivo de São Francisco do Sul..... 48

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	21
Principais enfermidades em moluscos bivalves	23
Doenças de Notificação Obrigatória em Ostras.....	30
O gênero <i>Perkinsus</i>	30
<i>Perkinsus</i> no Brasil.....	32
Ciclo de vida do protozoário <i>Perkinsus</i>	33
Diagnóstico para <i>Perkinsus</i>	34
JUSTIFICATIVA.....	37
OBJETIVOS	37
Objetivo geral	37
Objetivos específicos.....	37
ARTIGO CIENTÍFICO.....	39
Resumo	39
Introdução.....	40
Materiais e Métodos	42
Resultados	44
Discussão.....	50
Agradecimentos	52
Referências	53
REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO GERAL.....	57

INTRODUÇÃO

A aquicultura mundial produziu em 2014 mais de 158 milhões de toneladas de alimento, movimentando cerca de 144,4 bilhões de dólares, representando hoje mais de 40% da produção de pescado. Essa atividade vem se destacando com o aumento de produção, crescendo de forma rápida e sustentável. A média anual desde 2000, é de 6,2%. Iniciou com 32,4 milhões de toneladas em 2000 para 70,1 milhões em 2013. Os produtores mundiais da aquicultura de maior destaque são a China, em 1º lugar com 43 milhões de toneladas, a Índia com 4,5 milhões, a Indonésia com 3,8 milhões, o Vietnã com 3,2 milhões de toneladas, seguidos por Bangladesh, Noruega, Egito, Tailândia, Chile, Mianmar, Filipinas, Japão e Brasil (FAO, 2016).

Os organismos aquáticos cultivados em maior volume são os peixes, com produção de 47 milhões de toneladas, seguido pelos moluscos com 15,5 milhões de toneladas, sendo 5.155.257t por ostras, 1.901.962 por mexilhões, 1.922.345 por vieiras e 5.360.280 por Almeijoas e berberechos, 1t por polvos e lulas, 1.134.531 por moluscos marinhos diversos, e crustáceos com 6,7 milhões de toneladas. O Brasil ocupa a 13ª posição no “ranking” mundial de países produtores aquícolas, com uma produção de 474.159 toneladas em 2013 (FAO, 2016).

A produção de moluscos (malacocultura) destaca-se pelo rápido desenvolvimento da tecnologia de cultivo, baixo custo de implantação e manutenção, acelerado crescimento dos animais e baixa taxa de mortalidade (DORE, 1991; COVA, 2013). Desde a primeira metade do século XX, a malacocultura é praticada no mundo.

Somente na década de 70 esta atividade teve início no Brasil, sem um motivo aparente, a não ser científico ou econômico, já que não havia nenhum plano de incentivo do governo (POLI *et al.* 2004). Comercialmente, a malacocultura começou a desenvolver-se na década de 90, inicialmente em Santa Catarina e posteriormente no Paraná, em São Paulo, no Rio de Janeiro, no Espírito Santo, em Pernambuco, em Alagoas, em Sergipe e na Paraíba. Embora praticamente todos os Estados litorâneos apresentem alguma produção de moluscos, a região Sul concentra a maior produção nacional, sendo Santa Catarina o principal produtor (POLI *et al.* 2004).

A Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (EPAGRI), comunica, em sua Síntese Informativa da Maricultura 2015, que a produção de moluscos comercializados em 2014 por Santa Catarina foi de 20.438 toneladas (t), sendo 17.370,1

toneladas de mexilhões (*Perna perna*), 3.030,26t de ostras (*Crassostrea gigas*) e 37,21t de vieiras (*Nodipecten nodosus*) (EPAGRI, 2016).

O número total de produtores de ostras no Estado diminuiu 17,05%, sendo 61 em Florianópolis, 16 em Palhoça e 9 em São José, 3 em Governador Celso Ramos e 1 em Biguaçu, totalizando 84,11% dos ostreicultores localizados nas Baías Norte e Sul. Isso mostra a importância dessa região para o Estado e ao mesmo tempo a fragilidade relacionada à concentração produtiva em uma única região. Os municípios que mais contribuíram para a produção total do Estado foram Florianópolis, com uma produção de 2.187,7t, seguido por Palhoça, com 482t; São José, com 225,5t e São Francisco do Sul. Considerando os municípios que se localizam dentro das Baías Norte e Sul, equivale dizer que essas baías são responsáveis por 96,8% (2.935,3t) da produção estadual de ostras cultivadas e comercializadas em 2015 (EPAGRI, 2016).

Os moluscos bivalves constituem, dentre os invertebrados marinhos, o grupo de maior importância econômica e que inclui, entre outras, várias espécies de ostras, mexilhões e vieiras. Os bivalves de maior interesse econômico do litoral brasileiro são representados pelas ostras *Crassostrea rhizophorae* (Guilding 1828) e *Crassostrea gasar* (Adanson 1757), pelo mexilhão *Perna perna* (Linnaeus 1758), pelo berbigão *Anomalocardia brasiliana* (Gmelin 1791) e pela vieira *Nodipecten nodosus* (Linnaeus 1758) (LAUCKNER, 1983).

O cultivo da ostra *Crassostrea gigas* em Santa Catarina teve início em 1991 e cresceu rapidamente, transformando-se numa alternativa de renda para as famílias das comunidades pesqueiras (POLI *et al.* 2004).

Dentre as espécies de moluscos cultiváveis a ostra do Pacífico *Crassostrea gigas* (Thunberg 1793) é uma das espécies de maior interesse comercial devido à sua rusticidade, rapidez de crescimento e valor comercial (DORE, 1991). A *C. gigas* é uma espécie originária de águas frias e salinas, pouco tolerantes ao clima tropical e temperaturas altas. Essa espécie adaptou-se muito bem às condições de cultivo na região Sul do Brasil (POLI *et al.* 2004). Nas espécies nativas brasileiras de ostras destaca-se a *Crassostrea gasar* encontrada principalmente fixada nas raízes aéreas da árvore do mangue *Rhizophora mangle*, nos costões rochosos e em cultivos (NASCIMENTO, 1983).

Devido à forte influência de fatores ambientais na morfologia das valvas das ostras do gênero *Crassostrea*, a identificação das espécies nativas torna-se muito complexa. Estudos moleculares têm indicado a existência de duas espécies de ostras nativas do gênero *Crassostrea*

comumente encontradas no litoral brasileiro: *C. rhizophorae* e *C. gasar* (LAPÈGUE *et al.* 2002; VARELA *et al.* 2007; MELO *et al.* 2010; LAZOSKI *et al.* 2011). Resultados recentes indicam que *Crassostrea brasiliiana* (Lamarck 1819) e *C. gasar*, são a mesma espécie (MELO *et al.* 2010) e neste caso deve ser utilizada a nomenclatura *C. gasar* por ser a mais antiga.

Na região de Florianópolis, alguns poucos cultivos vêm utilizando as espécies nativas de ostras, sendo cultivadas em regiões mais quentes, como na Baía da Babitonga no norte do Estado, ambiente não adequado para *Crassostrea gigas*. Percebe-se que há pouca sobreposição do cultivo de *C. brasiliiana* e de *C. gigas*, devido apresentarem preferência por temperaturas diferentes como requisito para seus habitats (POLI *et al.* 2004). Ramos (2011) cita que 10% do cultivo nacional de ostras ocorrem com as espécies nativas *Crassostrea gasar* e *Crassostrea rhizophorae*.

Principais enfermidades em moluscos bivalves no mundo

Em muitos locais a história da produção de ostras tem sido de ciclos de crescimento e perdas, causadas por doenças, predadores ou outros riscos naturais. Ostras são animais bastante sensíveis e particularmente vulneráveis a doenças e poluição industrial (DORE, 1991).

Surtos de enfermidades e de mortalidades em massa têm afetado populações de bivalves marinhos em diversas partes do mundo (PAVANELLI *et al.* 2000). Além disso, o cultivo pode propiciar condições estressantes aos animais ou condições ambientais que facilitem a presença e a atuação de organismos prejudiciais aos moluscos (MAGALHÃES & FERREIRA, 2006).

As doenças podem afetar a eficiência dos processos metabólicos, reduzindo o potencial de crescimento e reprodução, assim como a resistência ao estresse, a competitividade e a sobrevivência do animal. Nos bivalves marinhos, as enfermidades representam um importante fator de contribuição para a mortalidade em massa, tanto de estoques naturais quanto de cultivos (BOWER *et al.* 1994).

Dentre os principais agentes patogênicos em bivalves marinhos estão os vírus, bactérias, fungos, protozoários, trematódeos, poliquetas e copépodes (ELSTON, 1990). As maiores mortalidades e morbidades de bivalves em cultivo são promovidas por bactérias e protozoários dos gêneros *Bonamia*, *Mikrocytos*, *Marteilia*, *Perkinsus* e *Haplosporidium*. A grande maioria dos patógenos conhecidos como causadores de

morbidade e mortalidade em bivalves são os pertencentes ao grupo das bactérias e ao dos protozoários (BOWER *et al.* 1994).

Principais enfermidades em moluscos bivalves no Brasil

No Brasil, o primeiro registro conhecido de parasitos em bivalves foi feito por Narchi (1966). Seguiram-se os trabalhos de Umiji *et al.* (1976) e de Nascimento *et al.* (1986). Vários estudos foram realizados principalmente em Santa Catarina, mas também no Ceará, Bahia, Amazonas, Pernambuco, Rio de Janeiro, São Paulo e Paraná.

Recentemente, pesquisas sobre patologias de bivalves vem crescendo no Brasil, evidenciando a presença de protozoário e outros organismos, como vírus, bactérias e metazoários parasitando ostras de diferentes regiões, presentes nos trabalhos de Sabry e Magalhães (2005); Pontinha (2009); Sabry *et al.* (2009, 2011 e 2013); Boehs *et al.* (2012); Da Silva *et al.* (2012).

Procariontes

Os procariontes pertencentes ao grupo das Rickettsiae e Chlamydiae, considerados bactérias e os micoplasmas, assemelhados a bactérias (diferem destas por não apresentar parede celular), também apresentam importância na patologia de bivalves marinhos. Conforme revisão de LAUCKNER (1983), organismos assemelhados a Rickettsiae (RLOs) foram registrados em vários bivalves, como em *Mya arenaria*, *Crassostrea gigas*, *C. virginica*, *Ostrea edulis* e *Tellina tenuis*. No Brasil, registros de RLOs foram realizados em *Anomalocardia brasiliiana* do Ceará (FERREIRA *et al.* 2008) e em *Mytella guyanensis* do litoral sul da Bahia (BOEHS *et al.* 2009b).

Vírios e Microbactérias

Vírios e microbactérias presentes em *Crassostrea gigas* cultivadas em Santa Catarina foram relatados por BENFATTI NETO *et al.* (2000), apud MAGALHÃES & FERREIRA (2006), mas as quantidades encontradas estavam, segundo os autores, dentro dos valores aceitáveis para a saúde humana e do molusco. Também em ostras *C. gigas* de Santa Catarina, bactérias do gênero *Nocardia* foram indicadas como prováveis causadoras de mortalidades recorrentes durante o verão. Essa enfermidade é conhecida também em outros países, pelo nome de Mortalidade em Massa do Verão (MMV). Conforme Silveira Jr. (1997), a MMV em Santa Catarina foi verificada pela primeira vez em 1987 e, no verão de 89/90, a mortalidade chegou a 89,5%. A MMV não mais ocorre com a intensidade do início do cultivo

das ostras japonesas no litoral catarinense. Com o passar do tempo, a seleção dos reprodutores mais aclimatados às condições ambientais locais e com o manejo correto das ostras em cultivo, mortalidades massivas não têm sido relatadas.

Fungos

Várias espécies de fungos utilizam a matriz orgânica de conchas de bivalves, mortos ou vivos, como fonte de energia (LAUCKNER, 1983). Ao menos uma espécie, *Ostracoblabe implexa*, provoca a enfermidade da concha, do pé ou da charneira (FIGUERAS & VILLALBA, 1988). O fungo desenvolve-se a partir da matriz proteica da concha e quando as hifas alcançam a superfície de contato entre o manto e a parte interna da concha, as células epiteliais do manto afetado reagem ativando a secreção de material proteico típico de ligamento, originando depósitos de conchiolina na região interna das valvas. No Brasil, essa micose foi observada em ostras do gênero *Crassostrea* de Santa Catarina, afetando a região de inserção do músculo adutor. Nesse caso, a doença é conhecida como “mal do pé” (embora a ostra não possua pé, que é perdido durante o processo da metamorfose da larva). Em Santa Catarina, Silveira Jr. *et al.* (2000) fizeram o registro dessa enfermidade na ostra japonesa *Crassostrea gigas* e Sabry & Magalhães (2005), nesta e na ostra-do-mangue, *C. rhizophorae*, com prevalência mais alta em *C. gigas*. Essas autoras citaram a formação de nódulos de conchiolina na região mencionada, que podem afetar o fechamento das valvas.

Tubelários

Vários turbelários habitam a cavidade do manto, o tubo digestivo e outros locais de bivalves marinhos e nem sempre está claro se desempenham o papel de comensais ou de parasitos. Este é o caso de espécies do gênero *Paravortex*, relatadas em vários bivalves (LAUCKNER, 1983). Turbelários do tipo *Urastoma* foram observados nas brânquias de ostras (*Crassostrea rhizophorae*) no litoral sul da Bahia, em baixa prevalência e, aparentemente, sem causar danos ao hospedeiro (BOEHS *et al.* 2012).

Trematódeos

Os trematódeos digenéticos são parasitos comuns e importantes de bivalves marinhos, aos quais causam danos significativos, inclusive castração parasitária. Espécies das famílias Bucephalidae, Sanguinicolidae, Monorchidae, Fellodistomidae e Gymnophallidae

utilizam os bivalves como primeiros hospedeiros intermediários (fase de esporocistos e cercárias); e Echinostomatidae, Monorchidae e Gymnophallidae, entre outras famílias, como segundos hospedeiros intermediários (fase de metacercária), ou ainda excepcionalmente como hospedeiros definitivos (LAUCKNER, 1983).

Os bucefalídeos estão entre os mais importantes trematódeos para os bivalves. Possuem ciclos de vida complexos e utilizam o molusco como primeiro hospedeiro intermediário e peixes como segundo intermediário e como hospedeiro definitivo. Boehs e Magalhães (2004) relataram esporocistos de trematódeos digenéticos em *Anomalocardia brasiliana*. Marchiori *et al.* (2009) obtiveram êxito na identificação de *Bucephalus margaritae* = *Bucephalus varicus* como primeiro hospedeiro intermediário do mexilhão *Perna perna* em Santa Catarina. Os autores observaram que as cercárias se desenvolvem dentro dos esporocistos, que têm a forma de filamentos alaranjados e ramificados, no mexilhão. As metacercárias encistam nas brânquias e cavidade branquial do segundo hospedeiro intermediário, o peixe blenídeo *Hypleurochilus fissicornis*, popularmente denominado “Maria-da-toca”. O hospedeiro definitivo, o peixe *Menticirrhus americanus* (Scianidae), conhecido como “papa-terra”, é infectado quando ingere blenídeos com metacercárias.

Nos mitilídeos, a bucefalose é também conhecida como doença laranja, já que é evidenciada macroscopicamente pela coloração alaranjada do manto, que assume também, em casos de infestações médias e altas, um aspecto fibroso, devido a presença dos esporocistos (MAGALHÃES & FERREIRA, 2006). O reconhecimento macroscópico da bucefalose não é possível em ostras (BOEHS *et al.* 2009b). A destruição das gônadas, em função de danos mecânicos e decomposição fisiológica de tecidos pelos esporocistos, parece ser o principal prejuízo causado pelos bucefalídeos. As metacercárias causam danos menos significativos aos bivalves do que os esporocistos e cercárias e não provocam castração parasitária (LAUCKNER, 1983; BOWER *et al.* 1994).

Protozoários

Protozoários como Gregarinas do gênero *Nematopsis*, utilizam bivalves como hospedeiros intermediários e completam seu ciclo de vida em crustáceos (LAUCKNER, 1983; AZEVEDO & MATOS, 1999; CARBALLAL *et al.* 2001). Os sítios preferenciais de infecção são as brânquias e o manto, mas são encontrados, também, em outros locais como na glândula digestiva, palpos labiais e no pé. Segundo revisão de

Lauckner (1983), vários bivalves marinhos (*Crassostrea virginica*, *Mytilus edulis*, *Macoma balthica* e *Cardium edule*) hospedam *Nematopsis*. Boehs *et al.* (2009b) evidenciaram que a frequência de ocorrência destes parasitos nos moluscos está associada à presença de crustáceos no mesmo habitat.

Microsporídeos

Microsporídeos são protozoários intracelulares que parecem completar seu ciclo de vida em um único hospedeiro. Conforme Lauckner (1983), *Steinhausia mytilovum*, uma das espécies mais conhecidas deste pequeno grupo, foi observada em oócitos de *Mytilus edulis* da costa Atlântica dos Estados Unidos e em *M. galloprovincialis* na Itália. Essa espécie foi observada, também, em populações de *Cerastoderma edule* (Bivalvia da família Cardiidae) da costa da Galícia (Espanha), sem causar danos patológicos significativos nos animais infectados (CARBALLAL *et al.* 2001). No Brasil, Nascimento *et al.* (1986), fizeram o registro de um microsporídeo, não identificado, em *Crassostrea rhizophorae* (BA). Azevedo & Matos (1999) observaram *Steinhausia mytilovum* em oócitos do marisco-do-mangue, *Mytella guyanensis*, no estuário do rio Amazonas. Os parasitos foram observados em vacúolos intracitoplasmáticos contendo um número variável de esporos, sempre superior a 14. Conforme Lauckner (1983), não há razão para crer que este microsporídeo seja economicamente importante, porque parece ocorrer em baixa prevalência e geralmente com poucos cistos/oócito.

Tumores

Um tumor resulta de uma proliferação controlada (hiperplasia) ou incontrolada de um tecido (neoplasia) (LAUCKNER, 1983). Xenomas são relatados como tumores caracterizados por hipertrofias celulares, incluindo o núcleo, causados pela entrada e proliferação de parasitos intracelulares. Em ostras *Crassostrea virginica* foram relacionados a ciliados do gênero *Sphenophrya* (BOWER *et al.* 1994; SCARPA *et al.* 2006). Os xenomas podem comprometer a atividade de fluxo da água nas brânquias (SCARPA *et al.* 2006) e, portanto, podem prejudicar as atividades de filtração e alimentação do bivalve. No Brasil, há um registro de xenomas em *C. rhizophorae* de populações naturais da Baía de Camamu/BA (BOEHS *et al.* 2009a). Por se disseminarem pelo tecido conjuntivo de vários órgãos e também nos seios de hemolinfa, as neoplasias são, geralmente, denominadas neoplasias disseminadas e vírus são apontados como um dos prováveis agentes etiológicos

(ELSTON *et al.* 1990). No Brasil, há registro de neoplasia em um único indivíduo de *Crassostrea rhizophorae*, proveniente da Baía de Todos os Santos/BA (NASCIMENTO *et al.* 1986).

Cestóides

A presença de larvas de cestóides (metacestóides) do gênero *Tylocephalum* (Linton 1890) em bivalves marinhos, principalmente em regiões subtropicais e tropicais (onde elasmobrânquios, os hospedeiros definitivos, são abundantes), está documentada também para a costa brasileira, para *Crassostrea rhizophorae*, *C. gigas*, *Anomalocardia brasiliiana*, *Mytella falcata* e *Iphigenia brasiliiana*. A localização preferencial dos metacestóides é na glândula digestiva, geralmente na área periférica deste órgão. Há a formação de uma cápsula em volta do parasito, com reação hemocitária focal, mas sem lesões óbvias ao hospedeiro (BOEHS *et al.* 2012).

Poliquetas

Poliquetas do gênero *Polydora* escavam galerias na concha de uma série de bivalves, principalmente das ostras; quando as galerias ou túneis alcançam o manto, a ostra reage depositando camadas de conchiolina e calcita; o poliqueta, por sua vez, preenche essas camadas com lodo, o que causa um aspecto muito desagradável quando se abre a ostra para o consumo (FIGUERAS & VILLALBA, 1988). No litoral de Santa Catarina, a presença desses poliquetas em ostras do gênero *Crassostrea* foi registrada por Ibbotson e Magalhães (2002) e por Sabry e Magalhães (2005). Estes últimos autores registraram prevalências altas de *P. websteri* tanto em *C. gigas* quanto em *C. rhizophorae*. Aparentemente, esses parasitos não causam danos mais sérios ao hospedeiro. A principal problemática é o comprometimento da comercialização dos bivalves, principalmente no caso das ostras.

Crustáceos

Caranguejos da família Pinnotheridae (Crustacea, Decapoda) podem viver como endossimbiontes em vários bivalves, como mexilhões, ostras e berbigões. Os pinoterídeos parecem atuar mais como comensais do que como parasitos propriamente ditos, mas em alguns casos pode haver danos mecânicos às brânquias (BOEHS & MAGALHÃES, 2004).

Copépodes

Copépodes são um importante grupo de parasitos em bivalves marinhos, sendo *Mytilicola intestinalis* a espécie mais conhecida e que

habita o intestino de mexilhões, mas há espécies que parasitam ostras dos gêneros *Ostrea* e *Crassostrea* (LAUCKNER, 1983; FIGUERAS & VILLALBA, 1988). Sabry *et al.* (2011), registraram a ocorrência de *Pseudomyicola spinosus* (Copepoda) em *Crassostrea rhizophorae* e em *Anomalocardia brasiliiana* da Ilha de Santa Catarina, com prevalência de 26,7% e 83,3%, respectivamente. Foram encontrados até 12 copépodes/animal. Não foram detectados danos histopatológicos aos hospedeiros. Essa ausência de danos nos tecidos também foi verificada por Carneiro-Schaefer (2015) em mexilhões com infestações por *Pseudoyicola spinosus*. No referido trabalho não foram encontradas doenças de notificação obrigatória em mexilhões cultivados no litoral catarinense.

Organização Mundial de Epizootias

A Organização Mundial de Epizootias (OIE) é encarregada pela melhoria da sanidade animal em todo o mundo. É reconhecida pela Organização Mundial do Comércio como referência para os assuntos que envolvem o Serviço Veterinário Oficial (SVO), incluindo a sanidade pesqueira e aquícola. O Brasil é país membro da OIE e um de seus fundadores, em 1924.

Uma das obrigações da vigilância epidemiológica em sanidade de animais aquáticos é aportar informações ao Delegado do Brasil na OIE (cargo ocupado por Fiscal Federal Agropecuário do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA) acerca da ocorrência de doenças de peixes, crustáceos, moluscos e anfíbios de notificação obrigatória.

A ocorrência de casos novos de uma doença (transmissível ou não) ou agravamento (inusitado ou não), passível de prevenção e controle pelos serviços de saúde, indica que a população está sob risco e pode representar ameaças à saúde e precisam ser detectadas e controladas ainda em seus estágios iniciais.

A notificação compulsória consiste na comunicação da ocorrência de casos individuais, agregados de casos ou surtos, suspeitos ou confirmados, da lista de agravos relacionados na Portaria, que deve ser feita às autoridades sanitárias por profissionais de saúde ou qualquer cidadão, visando a adoção das medidas de controle pertinentes. É obrigatória a notificação de doenças, agravos e eventos de saúde pública constantes da Portaria nº 104, de 25 de janeiro de 2011, do Ministério da Saúde (MINISTÉRIO, 2014).

Segundo a OIE (2016), as doenças de Notificação Obrigatória de Moluscos são: infecção com Abalone herpesvirus e *Xenohaliotis*

californiensis em Abalone e infecção com *Bonamia exitiosa*, *Bonamia ostreae*, *Marteilia refringens*, *Perkinsus marinus* e *Perkinsus olseni* em ostras. Os organismos do grupo dos protozoários estão entre os mais importantes causadores de enfermidades em moluscos marinhos e merecem especial atenção na ostreicultura, sendo responsáveis pelas cinco espécies de notificação obrigatória que podem acometer as ostras, causando mortalidades em massa.

Doenças de Notificação Obrigatória em Ostras

Bonamiose

No Filo Haplosporidia está o gênero *Bonamia*, com duas espécies: *B. ostreae* e *B. exitiosa*, ambas incluídas na lista de notificação obrigatória da Organização Mundial para a Saúde Animal (OIE). Estes protozoários causam a enfermidade denominada bonamiose, responsável por elevadas taxas de mortalidade. No Brasil, até o momento, não há registros desse protozoário.

Marteiliose

No grupo Paramyxia encontram-se os protozoários do gênero *Marteilia*, sendo que *M. refringens* é considerada de declaração obrigatória a OIE. Causa a enfermidade conhecida por marteiliose e é responsável por infectar e causar mortalidade na ostra nativa da costa da Europa desde 1968 (BERTHE *et al.* 2004). Entre as espécies hospedeiras desse patógeno, encontram-se as ostras do gênero *Ostrea* e mexilhões. Até o momento, não existe relato de ocorrência desse protozoário infectando moluscos na costa brasileira.

Perkinsiose

O protozoário do gênero *Perkinsus* possui duas espécies de notificação obrigatória à OIE que acometem as ostras (OIE, 2016).

O gênero *Perkinsus*

O gênero *Perkinsus*, responsável pela enfermidade Perkinsiose, pode causar mortalidades massivas em muitas espécies de bivalves de águas tropicais e subtropicais em todo o mundo (VILLALBA *et al.* 2004). Estão documentadas as espécies: *P. marinus*, *P. olseni*, *P. qugwadi*, *P. mediterraneus*, *P. beihaiensis*, *P. honshuensis*, *P. andrewsi* e *P. chesapeaki*.

Perkinsus beihaiensis foi registrado pela primeira vez em 2008, na China, infectando *Crassostrea hongkongensis* (MOSS *et al.* 2008).

Somente *P. marinus* e *P. olseni* são de declaração obrigatória, segundo a Organização Mundial para Saúde Animal. De acordo com Perkins (1976) *Pekinsus* spp. foram classificadas como pertencentes ao grupo Apicomplexa. Entretanto, análises filogenéticas moleculares realizadas por Reece *et al.* (1997) e Siddall *et al.* (2001), colocaram estes parasitas como pertencentes aos Dinoflagelada. Posteriormente, esses protozoários foram incluídos no Filo Perkinsozoa (VILLALBA *et al.* 2004), ou no Filo Dinozoa, subfilo Protoalveolata (OIE, 2016).

Perkinsus foi identificado pela primeira vez na década de 1940, na costa atlântica dos EUA onde causou mortalidades em ostras americanas. Recebeu 7 nomes, dentre eles, *Dermocystidium marinum* e *Labyrinthomyxa marina* (VILLALBA *et al.* 2004; OIE, 2016) sendo descrito como um fungo e, posteriormente, como *Perkinsus marinus*, em 1987. Ocorreram severas perdas no cultivo de *Crassostrea virginica* devido a doenças causadas por este protozoário nos Estados Unidos da América (Baía de Delaware, New Jersey, Cape Cod, Maine à Florida). Esta espécie também já foi detectada em *Mercenaria mercenaria*, na Flórida (McCOY, 2005), em *Crassostrea corteziensis* no Golfo do México (CÁCERES-MARTÍNEZ *et al.* 2008), Venezuela, Porto Rico, Cuba e Hawaii (VILLALBA *et al.* 2004).

Perkinsus marinus se multiplica e causa liquefação dos tecidos infectados das ostras. As lises de tecidos e o bloqueio de algumas defesas das ostras podem ser devido a produção de fatores proteolíticos, liberados extracelularmente, observados por CASTILLO (1998), em estudo *in vitro*. Ostras infectadas com *P. marinus* apresentam glândula digestiva com “aspecto pálido”, redução do índice de condição, severa emaciação, abertura da concha (gaping), retração do manto, inibição do desenvolvimento gonádico, crescimento retardado, abscessos e lesões, ocorrendo 95% de mortalidade nas mesmas (BOWER *et al.* 1994; OIE, 2016).

Embora infecções em *Crassostrea gigas* sejam possíveis, esta espécie parece ser mais resistente ao *Perkinsus* (BARBER; MANN, 1994).

Perkinsus olseni foi descrito a partir de *Haliotis ruber rubra*, em 1981, na Austrália, e *P. atlanticus* a partir de *Ruditapes decussatus* em Portugal (AZEVEDO, 1989). Similaridades nas sequências de nucleotídeos dos espaçadores internos transcritos (ITS) e da região dos espaçadores não transcritos (NTS) do RNA ribossomal sugeriram “co-especificidade” de *P. olseni* e *P. atlanticus*. A sinonímia das duas espécies foi estabelecida e *Perkinsus olseni* tem prioridade taxonômica (OIE, 2016).

Esse patógeno tem infectado várias espécies de moluscos em várias partes do mundo, como por exemplo *Pitar rostrata* do Uruguai (CREMONTE *et al.* 2005), *Austrovenus stutchburyi* da Nova Zelândia (DUNGAN *et al.* 2007) e *Tridacna crocea* do Vietnã (SHEPPARD & PHILLIPS, 2008).

Animais infectados apresentam ruptura do tecido conjuntivo, cistos macroscópicos nas brânquias, abscessos e pústulas, emagrecimento, abertura involuntária das valvas, inibição do desenvolvimento gonádico, comprometimento do sistema imune, destruição do epitélio do tubo digestório e mortalidade (BOWER *et al.* 1994; VILLALBA *et al.* 2004). Em 2005, Cremonte *et al.*, encontraram *P. olseni* no litoral do Uruguai, o que motivou a realização de estudos no Brasil.

***Perkinsus* no Brasil**

O primeiro registro de *Perkinsus* no Brasil foi em 2008, infectando a ostra-do-mangue *Crassostrea rhizophorae* no estuário do Rio Pacoti, Ceará (SABRY *et al.*, 2009). Simultaneamente, pelos mesmos pesquisadores, também foram feitas análises em ostras nativas e na ostra-do-pacífico, *C. gigas*, cultivadas no litoral de Santa Catarina e os resultados mostraram ausência de *Perkinsus* sp.. Posteriormente, espécies não identificadas de *Perkinsus* sp. foram detectadas em *C. gasar* do estuário do Rio São Francisco, Sergipe (DA SILVA *et al.* 2012) e do Rio Mamanguape, Paraíba (QUEIROGA *et al.* 2013 e 2015); em *M. falcata* do estuário do Rio Jaguaribe, Ceará (PRAXEDES, 2010); em *C. rhizophorae* do litoral da Bahia (BRANDÃO *et al.* 2013) e do Piauí e do Maranhão (DANTAS NETO *et al.* 2015).

Em 2013, da Silva *et al.* registraram a presença de *Perkinsus marinus* em ostras *Crassostrea rhizophorae* na Paraíba. No ano seguinte, foi registrada a presença de *Perkinsus olseni* em ostras nativas na Paraíba e pela primeira vez a presença de *P. olseni* e *P. marinus* infectando o mesmo exemplar de ostra nativa *Crassostrea gasar* (DA SILVA *et al.* 2014).

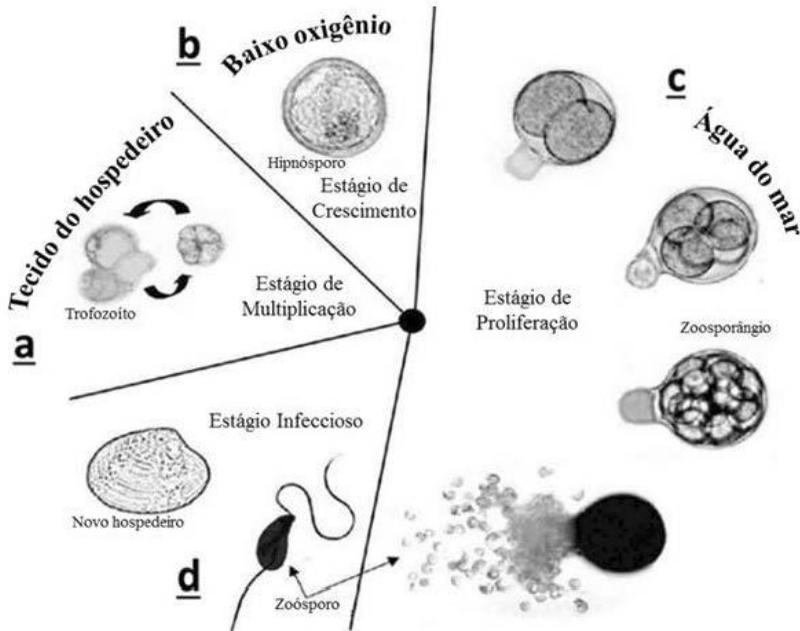
Em 2014, foi notificada ao MAPA a presença de *Perkinsus* no litoral de Santa Catarina. Análises moleculares indicaram se tratar de *P. beihaiensis* (pesquisa presente no artigo científico que faz parte desta Dissertação). Foi a primeira detecção feita no estado de Santa Catarina. *P. beihaiensis* não é uma espécie de notificação obrigatória. Caracteriza-se por pequeno tamanho e prevalências de infecções com intensidade baixa no epitélio do intestino do bivalve (MOSS *et al.* 2008).

Ciclo de vida do protozoário *Perkinsus*

A morfologia dos estágios e ciclo vital de *Perkinsus* é similar para todas as espécies desse gênero (Figura 1). O ciclo vital de *P. marinus* ocorre, geralmente, dentro de fagócitos ou “bolsas”. A proliferação de *Perkinsus* está correlacionada ao aumento de temperatura da água acima de 20°C, quando a patogenicidade e mortalidade associadas se elevam. Trofozoítos maduros, com grandes vacúolos que se deslocam para a periferia da célula (núcleo excêntrico), têm de 3 a 10 µm de diâmetro. Estes trofozoítos ocorrem dentro das células do tecido conjuntivo e epitelial, onde realizam cissiparidade sucessiva (zoosporulação). Neste estágio de “roseta”, esporângios ou esquizontes, medem de 4 a 15 µm de diâmetro e contém 2, 4, 8, 16 ou 32 trofozoítos em desenvolvimento. No final do processo ocorre liberação de 8 a 32 trofozoítos imaturos. Estes trofozoítos imaturos, merontes, merozoítos ou aplanósporos, têm 2-3 µm de diâmetro. Os hospedeiros são infectados através de zoósporos biflagelados (VILLALBA *et al.* 2004; OIE, 2016).

Quando os tecidos do hospedeiro infectado por *Perkinsus* são incubados em meio líquido de tioglicolato, no escuro e em condições anaeróbias, os trofozoítos aumentam em muitas vezes seu tamanho e sua parede celular fica mais espessa, transformando-se no estágio denominado de hipnósporo ou pré-zoosporângio. Os hipnósporos podem sobreviver durante longos períodos, em condições adversas, sendo consideradas formas de resistência (CASAS *et al.* 2002). No entanto, eles mantêm a capacidade de transformarem-se em zoosporângio, ao encontrar condições favoráveis. Este fato foi constatado quando os hipnósporos foram incubados em água do mar e observou-se a zoosporulação, culminando com a formação e a liberação de zoósporos biflagelados (CHOI; PARK, 2010). O mecanismo de transmissão da Perkinsiose é horizontal, isto é, ocorre diretamente entre indivíduos, sem a necessidade de hospedeiros intermediários e todos os estágios do ciclo de vida podem causar infecção (VILLALBA *et al.* 2004 e 2011).

Figura 1 - Ciclo de vida de *Perkinsus olseni* parasitando o bivalve *Ruditapes philippinarum*. (a) Estágio de Multiplicação – Trofozoítos no tecido do hospedeiro; (b) Estágio de crescimento – Formação do hipnósporo; (c) Estágio de proliferação – zoosporângio em proliferação na água do mar, (d) Estágio Infectante. Modificado de Choi e Park (2010).



Diagnóstico para *Perkinsus*

Há três testes presuntivos para detecção de *Perkinsus* spp.. A histologia clássica (Figura 02) não é suficiente em infestações leves, porém associada à cultura em Meio Fluido de Tioglicolato – RFTM (Ray, 1966) é eficiente no diagnóstico (Figura 03). O teste de Reação em Cadeia Polimerase – PCR (Polymerase Chain Reaction), identifica a presença do parasito, mas não pode ser usado para separar as espécies entre si.

Para o diagnóstico de confirmação da identificação de *Perkinsus* spp., recomenda-se a análise da sequência da região ITS.

O DNA que codifica para RNA ribossômico apresenta-se como um cluster gênico, no qual há o gene 18S, o gene 5,8S e o gene 28S. Estes genes são separados por regiões denominadas ITS1 e ITS2, as quais são transcritas e processadas para dar origem ao RNA ribossômico maduro. As regiões ITS evoluem rapidamente e, então, são apropriadas para discriminar espécies relacionadas ou até mesmo variedades de uma mesma espécie. O fato das regiões ITS serem flanqueadas por segmentos conservados, serem relativamente curtas e aparecerem em grande número de cópias no genoma, permite que sejam amplificadas e sequenciadas com facilidade (FUNGARO, 2000).

Figura 2 - Análise em Meio Fluido de Tioglicolato – RFTM de macerado de intestino e brânquias de ostra *Crassostrea gigas*, infectado com *Perkinsus marinus*.

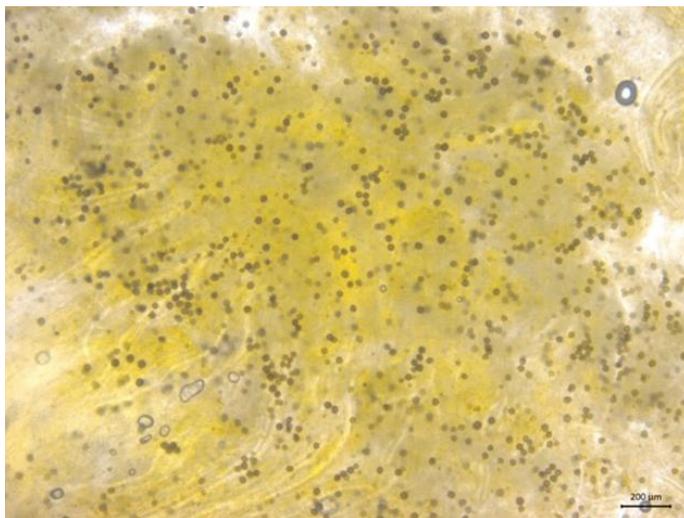
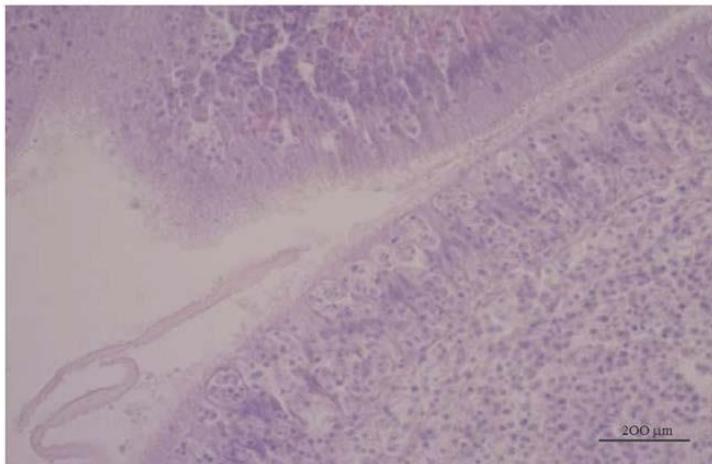


Figura 3 - Análise histológica de epitélio intestinal de ostra do gênero *Crassostrea*, infectado com *Perkinsus beihaiensis* (PONTINHA, 2009).



JUSTIFICATIVA

A Perkinsiose traz graves danos à ostreicultura mundial, por causar mortalidade massiva, resultando em prejuízos à cadeia produtiva. Com a gradativa expansão dos cultivos de moluscos na costa brasileira, deve-se atentar para que haja um monitoramento adequado da sanidade desses organismos. Mostra-se necessária a pesquisa sobre o *Perkinsus* no intuito de melhor conhecimento das medidas e ações a serem adotadas, para que esta atividade aquícola não seja abalada em Santa Catarina e para a sustentabilidade futura da malacocultura no Brasil.

OBJETIVOS

Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho é fornecer informações epidemiológicas do protozoário *Perkinsus* em ostras no litoral catarinense.

Objetivos específicos

Os objetivos específicos desta pesquisa foram de estudar a prevalência de *Perkinsus* em ostras de interesse econômico no litoral catarinense e identificar as espécies de *Perkinsus* presentes.

Formatação do artigo

O artigo científico foi formatado segundo as normas da revista “Diseases Aquatic Organisms – DAO”.

ARTIGO CIENTÍFICO

Título: *Perkinsus marinus* infectando ostras *Crassostrea gasar* e *Crassostrea gigas* no litoral catarinense

Título curto: *Perkinsus marinus* em Santa Catarina

Ana Carolina Luz Cunha, Vitor de Almeida Pontinha, Ângela Mara Moura da Luz, Ricardo Harakava, Leonardo Tachibana, Stephanie Caroline Medeiros, Maria Alcina M. de Castro, Simone Sühnel, Danielle Ferraz Mello, Naissa Maria Danielli, Alcir Luiz Dafre, Aimê Rachel Magenta Magalhães & José Luiz Pedreira Mourinho*.

* Departamento de Aquicultura, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

Rodovia Admar Gonzaga, 1123, Bairro Itacorubi, Florianópolis/SC, Brazil.

Email do autor correspondente: jose.mourino@ufsc.br

Resumo

Na lista das doenças para os moluscos de declaração obrigatória da Organização Internacional de Epizootias, da Organização Mundial de Saúde Animal, duas são causadas pelo protozoário do gênero *Perkinsus* (*Perkinsus olseni* e *Perkinsus marinus*), que causa mortalidade massiva de ostras. O primeiro registro de Perkinsiose na costa brasileira foi em ostras nativas (*Crassostrea* sp.) no litoral da Bahia, Ceará e Paraíba. No Brasil, 95% da produção nacional de ostras concentra-se no litoral catarinense e está focada na ostra japonesa *Crassostrea gigas*. O objetivo deste estudo foi avaliar se essa espécie e a ostra nativa *Crassostrea gasar*, no litoral de Santa Catarina, apresentam o protozoário *Perkinsus*. Foram escolhidos ao longo do litoral catarinense cinco pontos de coleta e realizadas seis amostras de 30 animais para cada espécie, no período de janeiro de 2013 a agosto de 2014 e outros cinco pontos, também com amostra de 30 animais para cada espécie, em coleta única adicional no mês de dezembro de 2014. O diagnóstico de *Perkinsus* foi realizado através de cultura em meio fluido tioglicolato (RTFM) e histopatologia. A confirmação das espécies de *Perkinsus* foi realizada por biologia molecular, através da amplificação de 16sRNA. Os resultados de RTFM mostraram *Perkinsus* infectando *Crassostrea gasar* em ostras de Balneário Barra do Sul, com prevalências de 26,7 a 70,0% e 96,6% para ostras de São Francisco do Sul. Também foi

observado *Perkinsus* spp. infectando *Crassostrea gigas*, com prevalência de 43,3%, para ostras coletadas de São Francisco do Sul. Os resultados moleculares confirmaram ser *Perkinsus marinus* infectando *Crassostrea gigas* e *Crassostrea gasar* de São Francisco do Sul e *Perkinsus beihaiensis* em *Crassostrea gasar* de Balneário Barra do Sul. Este resultado é o primeiro relato do protozoário *Perkinsus marinus* infectando *Crassostrea gigas* em ostras na América do Sul.

Palavras-chave: ostreicultura, maricultura, patologia, Perkinsozoa, perkinsiose.

Introdução

A aquicultura mundial vem se destacando com a crescente demanda de pescado, crescendo de forma rápida e sustentável. A média anual desde 2000 é de 6,2%. Iniciou com 32,4 milhões de toneladas em 2000 para 70,1 milhões em 2013 (FAO, 2016).

O Brasil ocupa a 13ª posição no “ranking” mundial de países produtores aquícolas, com uma produção de 474.159 toneladas em 2013 (FAO, 2016).

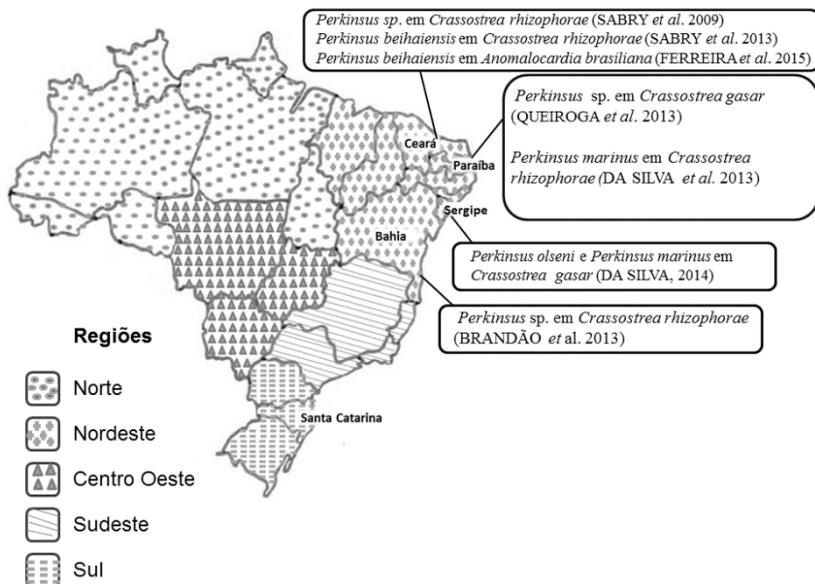
A Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina comunica na Síntese Informativa da Maricultura (EPAGRI, 2016), que a produção de moluscos comercializados em 2015 por Santa Catarina (mexilhões, ostras e vieiras) foi de 20.438 toneladas (t), representando uma redução de 5,18% em relação a 2014 (21.554t).

A questão das enfermidades é sempre preocupante na produção animal. Entre a lista das doenças de declaração obrigatória da Organização Mundial de Saúde Animal (OIE 2016) para moluscos, cinco dos agentes causadores são protozoários. Os agentes patogênicos causadores da perkinsiose, *Perkinsus marinus* e *Perkinsus olseni* (protozoários apicomplexa), são conhecidos por causar mortalidade massiva em ostras.

O primeiro relato de *Perkinsus olseni* na América do Sul foi realizado por Cremonte *et al.* (2005), que registrou esse protozoário infectando o venerídeo *Pitar rostrata*, no Uruguai. No Brasil, os registros do protozoário *Perkinsus* infectando moluscos bivalves encontra-se representado na Figura 1. O primeiro relato de *Perkinsus* infectando bivalves no Brasil foi feito por Sabry *et al.* (2009), que registrou *Perkinsus* infectando a ostra nativa *Crassostrea rhizophorae* coletada no litoral do estado do Ceará. Os agentes patogênicos notificáveis, *P. marinus* e *P. olseni*, foram relatados infectando *Crassostrea rhizophorae* (DA SILVA *et al.* 2013) e *C. gasar* (DA

SILVA *et al.* 2014, QUEIROGA *et al.* 2015), ambos em ostras nativas coletadas do litoral do estado da Paraíba. Outros relatos para *Perkinsus* no Brasil também são para o litoral do nordeste: em ostras nativas *C. rhizophorae* da Bahia (BRANDÃO *et al.* 2013); em *C. gasar* nos estados do Ceará (SABRY *et al.* 2013) e da Paraíba (QUEIROGA *et al.* 2013 e 2015). *P. beihaiensis* foi registrado infectando *C. rhizophorae* na Paraíba (DA SILVA *et al.* 2013) e no Ceará (SABRY *et al.* 2013). Da Silva *et al.* (2014) observaram pela primeira vez a presença de *P. marinus* e *P. olseni* infectando o mesmo exemplar da espécie *C. gasar*, no litoral de Sergipe.

Figura 4 - Regiões brasileiras indicando os locais onde foram registrados protozoários do gênero *Perkinsus* em moluscos bivalves.

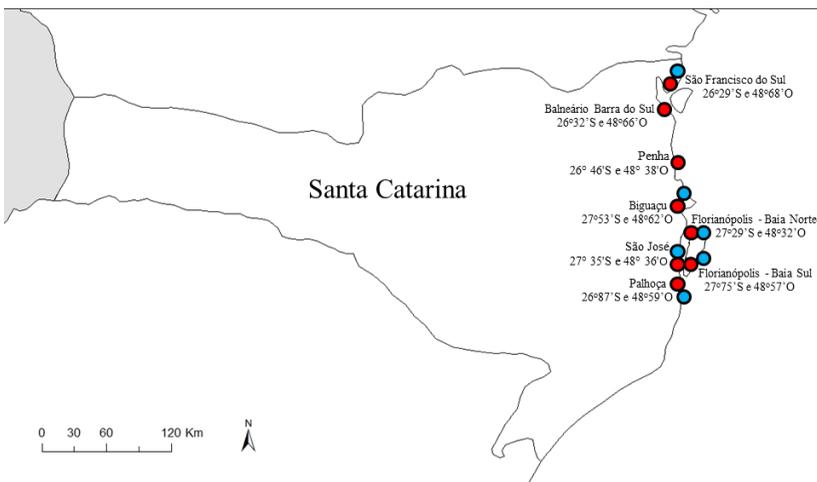


O presente estudo avaliou a presença de *Perkinsus* infectando ostras *C. gigas* e *C. gasar* cultivadas no litoral do estado de Santa Catarina, sul do Brasil.

Materiais e Métodos

O material biológico deste estudo foi a ostra nativa *Crassostrea gasar* e a ostra japonesa *Crassostrea gigas*, na fase adulta. O total de 720 ostras japonesas foram coletadas em cinco pontos no litoral catarinense e 390 ostras nativas foram coletadas em três locais, durante janeiro, março, agosto e dezembro de 2013 e março e agosto de 2014. Em dezembro de 2014 foram coletadas amostras de 30 ostras de cultivo *C. gigas* e *C. gasar* em São Francisco do Sul, São José e Florianópolis/Baía Norte e 30 ostras nativas de costões em Balneário Barra do Sul e Penha (Fig. 2).

Figura 5 - Litoral de Santa Catarina, indicando os locais de coleta de amostras de ostras. ● = Coleta de *Crassostrea gasar* e ● = Coleta de *Crassostrea gigas*.



Cada ostra coletada foi colocada em saco plástico individual e mantidas em caixa de plástico térmica com gelo e levada para o Núcleo de Estudo em Patologia Aquícola (NEPAq), do Departamento de Aquicultura/UFSC, para análise histológica e cultura em meio de tioglicolato fluido de Ray (RFTM).

Após abertura da concha e análise macroscópica, fragmentos de brânquias e o reto de cada ostra foram excisadas para incubação em

RFTM. Em seguida, esses tecidos foram colocados em tubos de 15 mL contendo 5 mL de meio de cultura de tioglicolato (RAY, 1966) e incubadas no escuro durante 7 dias, para induzir a formação hipnosporos. As amostras de tecidos incubados foram cortados, corados com lugol e analisados em microscopia de luz, conforme os protocolos da OIE (2016).

Após amostragem de tecido para RFTM, uma secção transversal da ostra contendo glândula digestiva e brânquias (HOWARD *et al.* 2004) foi fixada em 95% de etanol para análise molecular. Em seguida, uma outra secção transversal contendo glândula digestiva, brânquias, gônadas e manto foi fixado em solução de Davidson (SHAW; BATTLE, 1957) para análise histopatológica. Estas secções fixadas foram cortadas em lâminas finas 5µm e corado com hematoxilina de Harris e eosina (HHE) (SUHNEL *et al.* 2014).

Após resultados destas análises, fragmentos de ostras foram encaminhadas ao Laboratório de Biologia Molecular, do Instituto Biológico de São Paulo.

A análise RFTM foi realizada em todas as amostras, enquanto que a histologia foi feita nas amostras de janeiro, março, agosto e dezembro de 2013 e dezembro de 2014. As amostras positivas para a presença de *Perkinsus* spp. em RFTM das ostras coletadas em dezembro de 2014, foram selecionadas para a identificação molecular do parasita e para a determinação da espécie de ostra. Uma amostra aleatória de DNA foi tomada a partir de 4 *C. gigas* e 4 *C. gasar*. O DNA genômico das ostras foi extraído por método CTAB reagente (brometo de cetiltrimetilamônio) (GUSMÃO; SOLÉ-CAVA 2002). Brânquias e tecido das glândulas digestivas foram triturados com o auxílio de uma lâmina de bisturi em uma placa de Petri e transferidos para tubos de microcentrífuga Eppendorf. Em seguida, 700 µL de tampão de lise (2% CTAB, 20 mM EDTA, 100 mM Tris, 1M NaCl, 4M e 10 µg proteinase K por mL, pH 8.0) foi adicionado ao tubo. Após incubação a 60° C durante 2 a 3 horas, um volume igual de clorofórmio: álcool isoamílico na proporção 24/1 foi adicionado, misturado e centrifugado a 12000 rpm durante 10 minutos. A fase aquosa foi transferida para um tubo de microcentrífuga novo ao qual foi adicionado 0,7 volumes de isopropanol. O DNA foi sedimentado por centrifugação a 12.000 rpm durante 10 min, sendo lavado com 1 mL de etanol a 70%, seco a 37°C e ressuspenso em 50 µL de água MilliQ.

A detecção de *Perkinsus* spp. com Reação em Cadeia Polimerase (PCR), foi realizada utilizando os iniciadores oligonucleotídicos ITS e ITS-85-750. A região amplificada por PCR foi

o ITS (espaçador interno transcrito), localizado entre os genes codificadores do RNA ribossômico 18S e 28S, que contém diferenças permitindo a distinção do gênero *Perkinsus* (CASAS *et al.* 2002). A reação foi realizada com a enzima polimerase de DNA GoTaq (Promega) e os iniciadores, a uma concentração de 400 nM. O programa de termociclador (T100, BioRad) consistiu de: desnaturação inicial a 94°C durante 2 min, seguido de 40 ciclos de amplificação a 94°C durante 10 seg, 52°C durante 30 seg e 72°C durante 40 seg, com passo final de alongamento a 72°C durante 4 min. Para a amplificação da região de ostras [ITS-F (5' - TCYGTAGGTGAACCTGC - 3') e ITS-R (5' - TCCTSCCTTAGTGATATGC - 3')], ITS, foram usadas as mesmas condições, exceto a temperatura de emparelhamento que foi de 54°C durante 30 seg e 72°C durante 40 seg.

Foi avaliada a amplificação por eletroforese em gel de agarose a 0,8% em TAE de tampão e coloração com brometo de etídio e realizada a verificação da presença ou ausência de DNA de amplificação do tamanho do produto esperado (672 pb para *Perkinsus* spp. e 1200 pb para *Crassostrea* sp.).

O produto de PCR positivo para *Perkinsus* spp. e para *Crassostrea* sp. seguiu para purificação por precipitação com PEG 6000 (polietilenoglicol) de acordo com Schmitz e Riesner (2006). O produto purificado foi submetido a sequenciamento pelo método de terminação utilizando o reagente Big Dye 3,1 (Life Technologies). A reação de sequenciamento consistiu em 5,0 µL de produto purificado, 1,0 µL de Big Dye, 1,5 µL de tampão de diluição, 0,3 µL de oligonucleótido kits e 2.2 µL de água MilliQ. O programa de termociclador consistiu de: desnaturação inicial a 95°C durante 1 min, seguido de 25 ciclos de amplificação a 95°C durante 5 seg, 50°C durante 30 seg e 60°C durante 4 min. A reação de sequenciamento foi precipitada pela adição de 40 µL de 75% de isopropanol, seguida por centrifugação a 4000 rpm durante 30 min. O precipitado foi ressuspenso em 10 µL de formamida e desnaturadas a 95°C durante 2 min. O sequenciamento foi realizado utilizando sequenciador capilar 3500xL (Life Technologies). As seqüências obtidas foram comparadas com seqüências depositadas no NCBI (National Center for Biotechnology Information), utilizando o programa BLAST.

Resultados

As ostras *Crassostrea gigas* e *C. gasar* dos pontos de coleta em Palhoça, São José, Florianópolis (litoral norte e sul), Biguaçu e Penha mostraram ausência do protozoário *Perkinsus*, através de todas as

técnicas utilizadas. As duas espécies de ostras provenientes de São Francisco do Sul apresentaram resultado positivo para a presença de *Perkinsus marinus*, em todas as técnicas utilizadas, assim como *Crassostrea gasar* coletadas em Balneário Barra do Sul, como pode ser visualizado na Tabela 1.

Em Balneário Barra do Sul, os tecidos das ostras *C. gasar* incubados em RFTM revelaram a presença de hipnósporos esféricos de *Perkinsus* spp., com prevalências altas, como 60,9% em março de 2013 (Tabela 2). Em março e agosto de 2014 esses valores foram de 40 e 26,7%, respectivamente, com maior valor de prevalência tendo ocorrido em dezembro de 2014: 70%.

Tabela 1. Resultados para a presença do protozoário *Perkinsus* ssp. em ostras, obtidos através dos métodos de diagnóstico: RFTM, histologia e PCR. (+) = resultado positivo; (-) = resultado negativo.

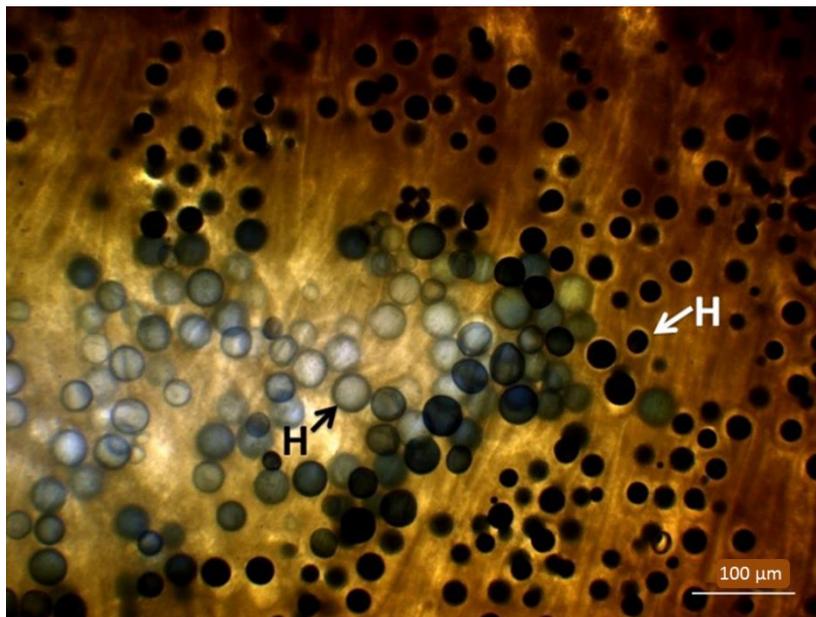
Local	Espécie de ostra	Resultados através dos métodos de:		
		RFTM	Histologia	PCR
Palhoça	<i>Crassostrea gasar</i>	-	-	-
Palhoça	<i>Crassostrea gigas</i>	-	-	-
São José	<i>Crassostrea gasar</i>	-	-	-
São José	<i>Crassostrea gigas</i>	-	-	-
Florianópolis (Baía Sul)	<i>Crassostrea gasar</i>	-	-	-
Florianópolis (Baía Sul)	<i>Crassostrea gigas</i>	-	-	-
Florianópolis (Baía Norte)	<i>Crassostrea gasar</i>	-	-	-
Florianópolis (Baía Norte)	<i>Crassostrea gigas</i>	-	-	-
Biguaçu	<i>Crassostrea gasar</i>	-	-	-
Biguaçu	<i>Crassostrea gigas</i>	-	-	-
Penha	<i>Crassostrea gasar</i>	-	-	-
Balneário Barra do Sul	<i>Crassostrea gasar</i>	+	+	+
São Francisco do Sul	<i>Crassostrea gasar</i>	+	+	+
São Francisco do Sul	<i>Crassostrea gigas</i>	+	+	+

Tabela 2. Prevalência (%) de *Perkinsus beihaiensis* em ostras *Crassostrea gasar* coletadas em costões de Balneário Barra do Sul.

	RFTM			Histologia		
	Prevalência (%)	Nº absoluto de ostras infectadas	Total de indivíduos na amostra	Prevalência (%)	Nº absoluto de ostras infectadas	Total de indivíduos na amostra
jan/13	53,3	16	30	6,6	2	30
mar/13	60,9	14	23	3,3	1	30
ago/13	0	0	30	0	0	30
dez/13	53,3	16	30	6,6	2	30
dez/14	70	21	30	56,6	17	30

Devido ao resultado positivo em Balneário Barra do Sul, realizou-se a coleta de dezembro de 2014, que revelou *Perkinsus* em *Crassostrea gasar* e *Crassostrea gigas*. Para São Francisco do Sul, a prevalência da presença de hipnósporos de *Perkinsus* spp. em ostra japonesa, *C. gigas* foi de 43,3%, 13 animais em 30 e em *C. gasar* de 96,6%, 28 ostras em 30, em dezembro de 2014 (Figura 3). Trata-se do primeiro registro de *Perkinsus* na ostra *Crassostrea gigas* na América do Sul. Nos outros locais revisitados, no município de Florianópolis e nos novos municípios onde houve coleta de ostras: São José e Penha, os resultados foram negativos para a presença de *Perkinsus*.

Figura 6 - *Perkinsus* spp. na forma de hipnósporos (H), em tecido branquial de ostra nativa *Crassostrea gasar*, após incubação em meio fluido de tioglicolato de Ray (RFTM).



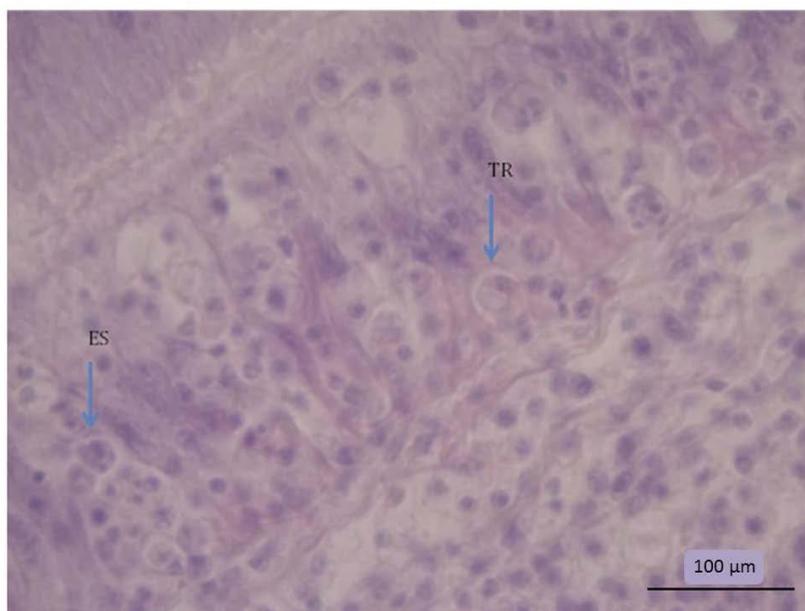
Através da histopatologia observou-se baixa prevalência (3,3 a 6,6%) de *Perkinsus* sp. no epitélio da glândula digestiva em ostras nativas (*Crassostrea* sp.) coletadas em Balneário Barra do Sul, quando comparado com os resultados obtidos através do método RFTM:53,3 a 60,9%, no mesmo período. Menores prevalências nos resultados obtidos com a histopatologia em relação aos do RFTM também ocorreram para *Perkinsus* em ostras *C. gigas* e *C. gasar* coletadas em São Francisco do Sul em dezembro de 2014, como pode ser observado na Tabela 3.

A Figura 4 mostra o protozoário *Perkinsus* na glândula digestiva da ostra *Crassostrea gasar*.

Tabela 3. Prevalência (%) de *Perkinsus marinus* em ostras *Crassostrea gasar* e *Crassostrea gigas* de cultivo de São Francisco do Sul.

	RFTM			Histologia			PCR		
	Prevalência (%)	Nº absoluto de ostras infectadas	Total de indivíduos na amostra	Prevalência (%)	Nº absoluto de ostras infectadas	Total de indivíduos na amostra	Prevalência (%)	Nº absoluto de ostras infectadas	Total de indivíduos na amostra
<i>Crassostrea gasar</i>	96,6	28	30	96,6	17	30	96,6	28	30
<i>Crassostrea gigas</i>	43,3	13	30	26,6	8	30	43,3	13	30

Figura 7 - Protozoário *Perkinsus* sp. (TR = trofozoíto; ES = esquizontes) na glândula digestiva da ostra nativa *Crassostrea gasar*. Coloração HHE.



A presença de *Perkinsus* spp. nas 2 espécies de ostra foi também confirmada por análise molecular. Os resultados do sequenciamento dos produtos de PCR de *C. gigas* e *C. gasar* de São Francisco do Sul mostraram sequências idênticas (100% de similaridade) para todas as amostras entre si e com sequências depositadas no NCBI, identificado como *Perkinsus marinus* (Figura 5). Igualmente ao CBMA79 isolado (código KP160922 de acesso), encontrado para animais do estado da Paraíba (QUEIROGA *et al.* 2015) e MEX-47 NW DC (JQ266249), encontrado no México (ESCOBEDO-

FREGOSO *et al.* 2015). Além disso, as sequências identificadas como *Perkinsus beihaiensis* em *C. gasar* de Balneário Barra do Sul apresentaram 100% de similaridade entre si e com sequências depositadas no NCBI.

Em relação à certificação taxonômica das ostras, as sequências obtidas para as amostras 1BN11 e 1FG26 foram comparadas com sequências depositadas no GenBank, apresentando 99,5% de semelhança com *Crassostrea brasiliana* (FJ544304) (sinonímia *C. gasar*) e 100% com *Crassostrea gigas* (FJ356675), respectivamente (Figura 6).

Figura 8 - Análise de parcimônia do DNAr sequências ITS das regiões de diferentes espécies de *Perkinsus*. BN = ostra nativa de Balneário Barra do Sul; FN = ostra nativa de São Francisco do Sul; FG = ostra japonesa de São Francisco do Sul.

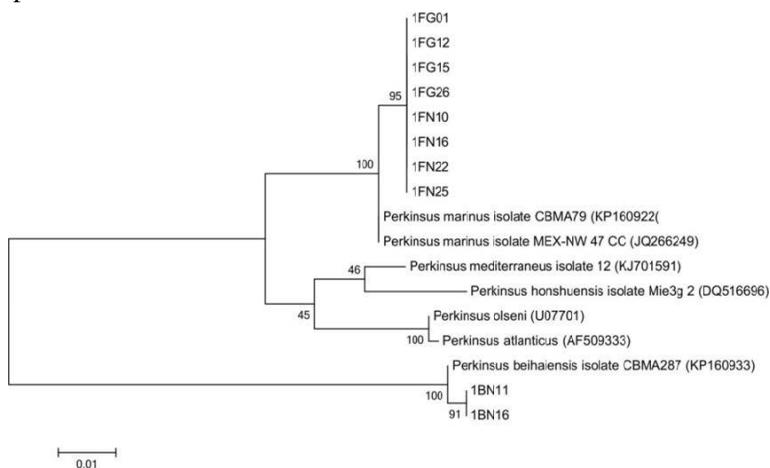
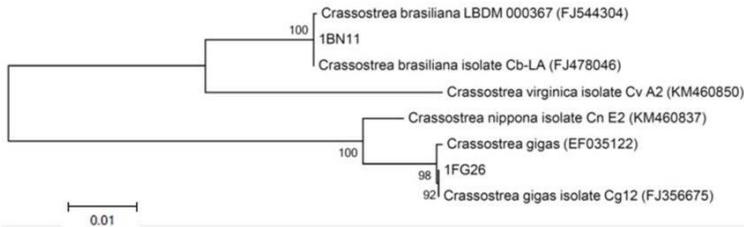


Figura 9 - Análise de parcimônia das sequências de DNA para identificação das espécies *Crassostrea gigas* e *Crassostrea gasar*. Cb = ostra nativa *Crassostrea gasar* (sinonímia, *Crassostrea brasiliana*); Cg = ostra japonesa *Crassostrea gigas*.



Discussão

A partir dos pontos de coleta selecionados, no litoral norte, meio e sul da costa de Santa Catarina, apenas no norte, em São Francisco do Sul, houve a presença do patógeno de notificação obrigatória em ambas as espécies estudadas: ostra japonesa *C. gigas* e ostra nativa *C. gasar*. Na América Latina, o primeiro relato de *P. marinus* foi em 2010 por Enríquez-Espinoza *et al.* (2010), que observou o protozoário presente no epitélio digestivo de *C. gigas* do Golfo da Califórnia, noroeste do México. Esses autores sugerem que esta doença de notificação obrigatória, juntamente com outros fatores ambientais, podem ser responsáveis por mortalidades massivas em ostras *C. gigas* do Golfo da Califórnia.

Utilizando a prevalência para comparar os resultados, percebemos que a análise em RFTM, em relação à histopatologia, mostra-se mais simples e eficaz para diagnosticar a presença do protozoário *Perkinsus* (Tabela 1). Provavelmente isto se dá pela diferença na quantidade de tecido utilizada em cada técnica. Deve-se levar em consideração que para a análise com RFTM o reto e fragmentos de tecido branquial são cultivados, fazendo com que os trofozoítos aumentem em muitas vezes seu tamanho e sua parede celular fica mais espessa, tornando mais fácil a leitura do resultado através observação da presença de esferas com coloração que variam do preto ao azulado. Na histopatologia o tecido é fixado mantendo o número e tamanho do patógeno, seguindo para leitura da lâmina pouca quantidade de tecido (uma seção de 5 µm de espessura), sendo necessário que o

pesquisador tenha bom treinamento para a identificação das estruturas a serem diferenciadas.

No período de tempo estudado, a prevalência de *P. beihaiensis* em *C. gasar* foi mais intensa nos meses de verão. Já no nordeste do Brasil, as maiores prevalências de *Perkinsus* spp., foram observadas em todos os momentos de amostragem (inverno, primavera e verão) para *C. rhizophorae* (DA SILVA *et al.*, 2013) e no final do verão e do outono para *C. gasar* (QUEIROGA *et al.*, 2015). Isto sugere que a infecção pode estar relacionada com a temperatura. Burreson & Ragone-Calvo (1996) sugerem que a infecção de *C. virginica* por *P. marinus* na América do Norte está relacionada à alta salinidade e temperatura. De acordo com estes autores, em Chesapeake Bay (EUA), a infecção do agente patogênico começa quando a temperatura se aproxima de 20°C, atingindo o pico de infecção após um período de temperaturas elevadas. Quando a salinidade é inferior a 9‰, a infecção permanece no hospedeiro por longos períodos sem espalhar ou causar lesão, mas quando a salinidade é maior do que 15‰, a doença se espalha rapidamente e causa mortalidade (Burreson & Ragone-Calvo 1996). Andrews & Ray (1988), sugeriram como medida preventiva, que o desvio de água doce para áreas de alta salinidade poderia ser um meio eficaz de controle de *Perkinsus marinus* no Golfo do México. Os estudos de La Peyre *et al.* (2003) apoiam a idéia de que a redução da salinidade em eventos repetitivos podem prevenir a infecção de ostras com *P. marinus* ou manter baixa letalidade da infecção em populações de ostras. Mais estudos devem ser desenvolvidos para melhor compreensão da relação entre a perkinsiose e a temperatura da água e salinidade, bem como de outros fatores ambientais.

O aumento da resistência à patogenicidade de *P. marinus* por *C. gigas* pode estar relacionada com alguns parâmetros imunológicos, incluindo proteases (Tanguy *et al.*, 2004). Avaliando a resposta imunológica, La Peyre *et al.* (1995) observaram que a ostra *C. gigas* proporciona um ambiente menos favorável para o desenvolvimento de *P. marinus*, em comparação com a ostra americana *C. virginica*, provavelmente devido aos baixos níveis de proteínas plasmáticas, gerando limitação nutricional para o agente patogênico e a alta atividade celular e humoral que podem degradar o parasita de forma mais eficaz.

No município de Balneário Barra do Sul, tem sido relatada pela Companhia Integrada de Desenvolvimento Agrícola de Santa Catarina (CIDASC) e pelos produtores, ocorrência de níveis de mortalidade elevados de ostra nativa, tanto de cultivo com 100%, como de costão com 86%. Curiosamente, a única espécie de *Perkinsus* positiva, neste

local, foi *P. beihaiensis*, que não é de notificação obrigatória. Esta mortalidade de ostras precisa ser acompanhada, incluindo o monitoramento de parâmetros patológicos e ambientais.

Em dezembro de 2014, nenhuma morte de *C. gigas* foi relatada pelos produtores locais em São Francisco do Sul, mesmo quando foi diagnosticada a presença de *P. marinus*.

A notificação de *Perkinsus* spp. infectando *C. gasar* de Balneário Barra do Sul e de *P. marinus* em *C. gigas*, de São Francisco do Sul, à CIDASC e ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) foi realizada em março 2014 e abril de 2015, respectivamente. O MAPA recomenda cautela quanto às medidas a serem tomadas e assinala que, embora esta doença seja de doença de notificação obrigatória, não é zoonótica e não causou mortalidade em ostra nas áreas descritas, enfatizando a necessidade do levantamento epidemiológico em todo o litoral do estado de Santa Catarina, para potenciais medidas de mitigação.

A gestão que envolve a remoção de animais mortos (que servem como fonte de proliferação) e vazio sanitário são estratégias para animais terrestres. Para animais aquáticos, a seleção genética dos animais sobreviventes, tolerantes e ou resistentes constitui a prática recomendada.

Como não existe um tratamento totalmente eficaz ou medidas preventivas para perkinsiose, mais estudos são necessários para verificar a propagação ou não e tentar minimizar os impactos econômicos que podem ser causados por este patógeno. Até agora não há relatos de mortalidades causadas por *P. marinus* em Santa Catarina, recomendando-se estudos para verificar a resistência e tolerância das ostras a este patógeno. O conhecimento das possíveis causas ambientais sobre a ocorrência de mortalidade deve ser mais uma medida preventiva para desenvolver uma gestão destinada a prevenir mortalidades.

Este relato de protozoário *Perkinsus marinus* infectando *Crassostrea gigas* no sul do Brasil preocupa toda a vigilância sanitária brasileira, especialmente porque é a maior região de produção de bivalves. O contínuo diagnóstico sobre enfermidades é necessário para verificar se outras espécies de bivalves podem ser infectados e assim, tentar compreender mortalidades em moluscos cultivados ou não.

Este é o primeiro relato de *Perkinsus marinus* infectando *Crassostrea gigas* na América do Sul.

Agradecimentos

Os autores gostariam de agradecer ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brasil, (CNPq-406.426 / 2012-0) e CNPq- 308292 / 2014-6) pelo apoio financeiro e Bolsa Produtividade de Dr. José Luiz Pedreira Mourião.

Referências

Andrews JD; Ray SM (1988) Management strategies to control the disease caused by *Perkinsus marinus*. In Disease Processes in Marine Bivalve Molluscs. American Fisheries Society, Bethesda, USA 18:257–264

Brandão RP, Boehs G, Sabry RC, Ceuta LO, Luz MSA, Queiroga FR, da Silva PM (2013) *Perkinsus* sp. infecting oyster *Crassostrea rhizophorae* (Guilding, 1828) on the coast of Bahia, Brazil. J Invertebr Pathol 112:138-141

Burreson EM & Ragone-Calvo LM (1996) Epizootiology of *Perkinsus marinus* disease of oysters in Chesapeake Bay, with emphasis on data since 1985. J Shellfish Res 15:17–34

Casas SM, Villalba A, Reece KS (2002) Study of perkinsosis in the carpet shell clam *Tapes decussatus* in Galicia (NW Spain). I. Identification of the etiological agent and *in vitro* modulation of zoosporulation by temperature and salinity. Dis Aquat Org 50:51–65

Cremonte F, Balseiro P, Figueras A (2005) 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

Da Silva PM, Vianna RT, Guertler C, Ferreira LP, Santana LN, Fernandez-Boo S, Ramilo A, Cao A, Villalba A (2013) First report of the protozoan parasite *Perkinsus marinus* in South America, infecting mangrove oysters *Crassostrea rhizophorae* from the Paraíba River, Paraíba (NE Brazil). J Invertebr Pathol 113:96–103

Da Silva PM, Scardua MP, Vianna RT, Mendonça RC, Vieira CB, Dungan CF, Scott GP, Reece KS (2014) Two *Perkinsus* spp. infect *Crassostrea gasar* oysters from cultured and wild populations of the Rio

São Francisco estuary, Sergipe, northeastern Brazil. *J Invertebr Pathol* 119:62–71

Enríquez-Espinola TL, Grijalva-Chon JM, Castro-Longoria R, Ramos-Paredes J (2010) *Perkinsus marinus* in *Crassostrea gigas* in the Gulf of California. *Dis Aquat Org* 89:269-273

EPAGRI (2016) Síntese Informativa da Maricultura. <http://www.epagri.sc.gov.br/> (acesso em jun 2016)

Escobedo-Fregoso C, Arzul I, Carrasco N, Gutiérrez-Rivera JN, Llera-Herrera R, Vázquez-Juárez R (2015) Polymorphism at the ITS and NTS Loci of *Perkinsus marinus* isolated from cultivated oyster *Crassostrea corteziensis* in Nayarit, Mexico and phylogenetic relationship to *P. marinus* along the Atlantic Coast. *Transbound Emerg Dis* 62:137-147

FAO (2016) Food and Agriculture Organization of United Nations. Seção Fisheries and Aquaculture Department. Roma SOFIA. Disponível em: http://www.fao.org/figis/servlet/TabLandArea?tb_ds=Aquaculture&tb_mode=TABLE&tb_act=SELECT&tb_grp=COUNTY (acesso em jan 2016)

Gusmão J & Solé-Cava AM (2002) Um sistema de diagnóstico molecular para a identificação de espécies comerciais de camarões marinhos brasileiros. *In* Ignacio de Blas (Org.). *Civa* 1:754-764

Howard DW, Lewis EJ, Keller BJ, Smith CS (2004) Histological techniques for marine bivalve mollusks and crustaceans. NOAA Technical Memorandum NOS NCCOS 5, 218 pp

La Peyre JF, Chu FE, Vogelbein WK, Meyers, Judith M (1995) Haemocytic and humoral activities of eastern and Pacific oysters following challenge by the protozoan *Perkinsus marinus*. *Fish & Shellfish Immun* 3:179-190

La Peyre MK, Nickens AD, Volety AK, Tolley GS (2003) Environmental significance of freshets in reducing *Perkinsus marinus* infection in eastern oysters *Crassostrea virginica*: potential management applications. *Mar Ecol Prog Ser* 248:165-176

OIE (2016) Manual of Diagnostic Test for Aquatic Animals. <http://www.oie.int/international-standard-setting/aquatic-manual/access-online/> (acesso em nov 2015)

Queiroga FR, Marques-Santos LF, Hégaret H, Soudant P, Farias ND, Schlindwein AD; Da Silva MP. 2013. Immunological responses of the mangrove oysters *Crassostrea gasar* naturally infected by *Perkinsus* sp. in the Mamanguape Estuary, Paraíba state (Northeastern, Brazil). Fish Shellfish Immunol 35:319-327

Queiroga FR, Vianna RT, Vieira CB, Farias ND, da Silva PM (2015) Parasites infecting the cultured oyster *Crassostrea gasar* (Adanson, 1757) in Northeast Brazil. Parasitology 142:756-766

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

Sabry RC, Rosa RD, Magalhães AR, Barraco MA, Gesteira TC, da Silva PM (2009) First report of a *Perkinsus* sp. infecting mangrove oysters *Crassostrea rhizophorae* of the Brazilian coast. Dis Aquat Org 88:13-23

Sabry RC, Gesteira TC, Magalhães ARM, Barraco MA, Guertler C, Ferreira LP, Vianna RT; Da Silva PM (2013) Parasitological survey of mangrove oyster, *Crassostrea rhizophorae*, in the Pacoti River Estuary, Ceará State, Brazil. J Invertebr Pathol 112:24-32

Schmitz A; Riesner D (2006) Purification of nucleic acids by selective precipitation with polyethylene glycol 6000. Anal Biochem 354:311-313

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

Sühnel S, Ivachuk CS, Schaefer ALC, Pontinha, VA, Martins, ML, Figueiras A, Meyer GR, Jones SRM, Stewart JC, Gurney-Smith HJ, Magalhaes, ARM, Bower SM. (2014) Detection of a parasitic amoeba (Order Dactylopodida) in the female gonads of oysters in Brazil. Dis. Aquat. Org. 109: 241-250

Tanguy A, Guo X, Ford SE (2004) Discovery of genes expressed in response to *Perkinsus marinus* challenge in Eastern (*Crassostrea virginica*) and Pacific (*C. gigas*) oysters. *Gene* 338:121-131

REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO GERAL

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. **Europ. J. Protistol.**, v. 35, p. 427-433, 1999.

AZEVEDO, C. Fine structure of n. sp. (Apicomplexa, Perkinsea) parasite of the clam from Portugal. *Perkinsus atlanticus Ruditapes decussatus*. **The Journal of Parasitology**, v. 75, n. 4, p. 627-635, 1989.

BARBER; MANN. Growth and mortality of eastern oyster, *Crassostrea virginica* (Gmelin, 1791), and Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) under challenge from the parasite, *Perkinsus marinus*. **J Shellfish Res.**, v. 13, p. 109-114, 1994.

BERTHE, F.C.J.; Le ROUX, F.; ADLARD, R.D.; FIGUERAS, A. Marteiliosis in molluscs: a review. **Aquat. Living Resour.**, v. 17, p. 433-448, 2004.

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. **Rev. Bras. Zool.**, v. 21, n. 4, p. 865-869, 2004.

BOEHS, G.; LENZ, T.M.; VILLALBA, A. Xenomas in *Crassostrea rhizophorae* (Ostreidae) from Camamu Bay, Bahia, Brazil. **Braz. J. Biol.**, v. 69, p. 457-458, 2009a.

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). **J. Invertebr. Pathol.**, v. 103, p. 43-47, 2009b.

BOEHS, G.; MAGALHÃES, A.R.M.; SABRY, R.C.; CEUTA, L.O. Parasitos e patologias de bivalves marinhos de importância econômica da costa brasileira. In: SILVA-SOUZA, A.T.; LIZAMA, M.A.P.;

TAKEMOTO, R.M. **Patologia e sanidade de organismos Aquáticos.**

Maringá: Massoni, 2012. p. 165-193.

BOWER, S.M.; MCGLADDERY, S.E.; PRICE, I.O. Synopsis of infectious diseases and parasites of commercially exploited shellfish.

Annual Review of Fish Disease, v. 4, p. 1-199, 1994.

BRANDÃO, R.P.; BOEHS, G; SABRY, R.C.; CEUTA, L.O.; LUZ, M. S.A.; QUEIROGA, F.R.; DA SILVA, P.M.; *Perkinsus* sp. infecting oyster *Crassostrea rhizophorae* (Guilding, 1828) on the coast of Bahia, Brazil. **J. Invertebr. Pathol.**, v. 112, p. 138-141, 2013.

CÁCERES-MARTÍNEZ J.; VÁSQUEZ-YEOMANS, R.; PADILLA-LARDIZÁBAL, G.; DEL RÍO PORTILLA, M.A. *Perkinsus marinus* in pleasure oyster *Crassostrea corteziensis* from Nayarit, Pacific Coast of México. **J. Invertebr. Pathol.**, v. 99, p. 66-73, 2008.

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). **J. Invert. Pathol.**, v. 78, p. 87-97, 2001.

CARNEIRO-SCHAEFER, A.L. **Macro e micropatógenos em mexilhões *Perna perna* (Linnaeus, 1758) e implicações na mitilicultura catarinense.** 2015. 123 p. Tese (Doutorado em aquicultura) – UFSC, Florianópolis, 2015.

CASAS, S.M.; VILLALBA, A; REECE, K.S. 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.**, v. 50, p. 51–65, 2002.

CASTILLO, J.A. Enfermedades de Declaración Obligatoria em Moluscos (y II): Perkinsosis (*Perkinsus marinus* y *Perkinsus olseni*) **AquaTIC**, nº 4. 1998. <<http://www.revistaaquatic.com/>>. Acesso em: 24 jun. 2016

CHOI, K.S.; PARK, K.I. Review on the protozoan parasite *Perkinsus olseni* (Lester and Davis, 1981) infection in Asian waters. **Coastal Environmental and Ecosystem Issues of the East Coast Sera**. Cidade: Editora, 2010. p. 269-281.

COVA, A.W. **Parasitos na ostra-do-mangue *Crassostrea rhizophorae* (Guilding, 1828) cultivada no estuário do Rio Graciosa em Taperoá, Bahia**. 2013. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, 2013.

CREMONTE, F.; BALSEIRO, P.; FIGUERAS, A. Occurrence of *Perkinsus olseni* (Protozoa: Apicomplexa) and other parasites in the venerid commercial clam *Pitar rostrata* from Uruguay, southwestern Atlantic coast. **Dis Aquat Org.**, v. 64, p. 85–90, 2005.

DA SILVA, P.M.; MAGALHÃES, A.R.M.; BARRACCO, M.A. Pathologies in commercial bivalve species from Santa Catarina State, southern Brazil. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, v. 92, n. 3, p. 571–579, 2012.

DA SILVA, P.M.; SCARDUA, M.P.; VIANNA, R.T.; MENDONÇA, R.C.; VIEIRA, C.B.; DUNGAN, C.F.; SCOTT, G.P.; REECE, K.S. Two *Perkinsus* spp. infect *Crassostrea gasar* oysters from cultured and wild populations of the Rio São Francisco estuary, Sergipe, northeastern Brazil. **J. Invertebr. Pathol.**, v. 119, p. 62–71, 2014.

DA SILVA, P.M.; VIANNA, R.T.; GUERTLER, C.; FERREIRA, L.P.; SANTANA, L.N.; FERNANDEZ-BOO, S.; RAMILO, A.; CAO, A.; VILLALBA, A. First report of the protozoan parasite *Perkinsus marinus* in South America, infecting mangrove oysters *Crassostrea rhizophorae* from the Paraíba River, Paraíba. **J Invertebr Pathol**, v. 113, p. 96–103, 2013.

DANTAS NETO, M.P. ; SABRY, R.C.; FERREIRA, L.P. ; ROMÃO, L.S. ; MAGGIONI, R. *Perkinsus* sp. infecting the oyster *Crassostrea rhizophorae* from estuaries of the septentrional Northeast, Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, p. 1030-1034, 2015.

DORE, I. **Shellfish: a guide to oysters, mussels, scallops, clams, and similar products for the commercial user.** New York: Van Nostrand Reinhold, 1991.

DUNGAN, C.; REECE, K.S.; MOSS, J.A.; HAMILTON, R.M.; DIGGLES, B.K.. *Perkinsus olseni* in vitro isolates from the New Zealand clam *Austrovenus stutchburyi*. J. **Eukaryot. Microbiol.**, v. 54, p. 263-270, 2007.

ELSTON, R.A. **Mollusc diseases: guide for the shellfish farmer.** Washington, D.C.: University of Washington, 1990. 73p.

EPAGRI Síntese informativa da maricultura 2015.
<http://www.epagri.sc.gov.br/wp-content/uploads/2013/08/Sintese-Informativa-Maricultura-2015.pdf>. Acesso em: 30 jun. 2016

FAO (Food and Agriculture Organization of United Nations). Seção Fisheries and Aquaculture Department. Roma SOFIA. 2016.
http://www.fao.org/figis/servlet/TabLandArea?tb_ds=Aquaculture&tb_mode=TABLE&tb_act=SELECT&tb_grp=COUNTY. Acesso em: 16 jan. 2016.

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, 10, 17-20 de novembro, Búzios, RJ, 2008. Resumos... Associação Brasileira de Patologistas de Organismos Aquáticos.

FIGUERAS, A.J.; VILLALBA, A. Patología de moluscos. In: MONTEROS, J.E. & LABARTA, U. (eds.). **Patología en Acuicultura.** Madrid: Mundi-Prensa, 1988. p. 327-389.

FUNGARO, M.H.P. PCR na micologia. Biotecnologia: **Ciência & Desenvolvimento**, v. 3, p. 12-16, 2000.

IBBOTSON, D.P.; MAGALHAES, A.R.M. Abundância de larvas de poliquetas espionídeos no plancton da Praia da Ponta do Sambaqui.. In: III ELAPOA (Encontro Latino-Americano de Patologistas de Organismos Aquáticos) e VII ENBRAPOA (Encontro Brasileiro de Patologistas de Organismos Aquáticos), 2002, Foz do Iguaçu - PR. Resumos do II ELAPOA e VII ENBRAPOA. Foz do Iguaçu: ABRAPOA - Associação Brasileira de Patologistas de Organismos Aquáticos, 2002. p. 193-193.

LAPÈGUE, S.; BOUTET, I.; LEITÃO, A.; HEUERTEBISE, S.; GARCIA, P. Trans-Atlantic distribution of mangrove oyster species revealed by 16S mtDNA and karyological analyses. **Biol Bull**, v. 202, p. 232-242, 2002.

LAUCKNER, G. Diseases of mollusca: Bivalvia. In: **Diseases of Marine Animals**, “Bivalvia to Scaphopoda”. Hamburg: Biologische Anstalt Helgola. 1983. p. 477–961.

LAZOSKI, C.; GUSMÃO J.; BOUDRY, P.; SOLÉ-CAVA, A.M. Phylogeny and phylogeography of Atlantic oyster species: evolutionary history, limited genetic connectivity and isolation by distance. **Marine Ecology Progress Series**, v. 426, p. 197-212, 2011.

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

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 Sci. Biol. Sci.** 2009.

McCOY, A.M. Examination of *Mercenaria mercenaria* as a host for *Perkinsus marinus*. 2005. 67 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade da Flórida, Flórida, 2005.

MELO, C.M.R.; SILVA, F.C.; GOMES, C.H.A.M.; SOLÉ-CAVA, A.M.; LAZOSKI, C. *Crassostrea gigas* in natural oyster banks in southern Brazil. **Biological Invasions**, v. 12, p. 441-449, 2010.

MINISTÉRIO DA SAÚDE - <http://notificacao.pbh.gov.br>. 2014.
Acesso em: 07 out. 2014.

MOSS, J.A.; JIE, X.; CHRISTOPHER, F.D.; KIMBERLY, S.R. 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.

NARCHI, W. Encontro de *Bucephalopsis haimeana* (Lacaze-Duthiers) no Brasil. **Ciência e Cultura**, v. 18, p. 22-241, 1966.

NASCIMENTO, I.A. Cultivo de ostras no Brasil: Problemas e perspectivas. **Ciência e Cultura**, v. 35, n. 7, p. 871-876, 1983.

NASCIMENTO, I.A.; SMITH, D.H.; KERN II, F.; PEREIRA, S.A. Pathological findings in *Crassostrea rhizophorae* from Todos os Santos Bay, Bahia, Brazil. **J. Invertebr. Pathol.**, v. 47, p. 340-349, 1986.

OIE-World Organization for Animal Health. www.oie.int/Acesso em: 28 jun. 2016.

PAVANELLI, C.G.; EIRAS, J.C.; TAKEMOTO, R.M.; RANZANI-PAIVA, M.J.; MAGALHÃES, A.R.M.. **Aquicultura no Brasil: bases para um desenvolvimento sustentável**. In: VALENTI, W.C. (ed) Brasília: CNPq. Ministério da Ciência e Tecnologia, 2000. p. 197-245.

PERKINS, F.O. *Dermocystidium marinum* infection in oysters. **Marine Fisheries Review**, v. 38, p. 19-21, 1976.

POLI, C.R.; POLI, A.T.B.; ANDREATTA, E.; BELTRAME, E.. **Aquicultura: experiências brasileiras**. Florianópolis: Multitarefa, 2004. P. 251-266.

PONTINHA, V.A. **Diagnóstico da saúde da ostra *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) cultivada em Florianópolis/SC.** 2009. 53 p.

Dissertação (Mestrado em Aquicultura) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.

PRAXEDES, G.F. **Detecção de Parasitas no sururu *Mytella falcata* (Orbigny, 1846) do Estuário do Rio Jaguaribe – CE, com especial enfoque para o diagnóstico do protozoário de declaração obrigatória *Perkinsus* sp.** 2010. 33 p. Monografia – Departamento de Engenharia de Pesca, UFC, Fortaleza, 2010.

QUEIROGA, F.R.; MARQUES-SANTOS, L.F.; HÉGARET, H.; SOUDANT, P.; FARIAS, N.D.; SCHLINDWEIN, A.D.; DA SILVA, M.P.. Immunological responses of the mangrove oysters *Crassostrea gasar* naturally infected by *Perkinsus* sp. in the Mamanguape Estuary, Paraíba state (Northeastern, Brazil). **Fish Shellfish Immunol**, v. 35, p. 319-327, 2013.

QUEIROGA, F.R.; VIANNA, R.T.; VIEIRA, C.B.; FARIAS, N.D.; DA SILVA, P.M. Parasites infecting the cultured oyster *Crassostrea gasar* (Adanson, 1757) in Northeast Brazil. **Parasitology**, v. 142, p. 756-766, 2015.

RAMOS, C. **Ciclo gonádico da ostra nativa *Crassostrea gasar* em laboratório.** 2011. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2011.

RAY, S.M. A review of the culture method of detecting *Dermocystidium marinum* with suggested modifications and precautions. **Proceedings of the National Shellfisheries Association**, v. 54, p. 55–69, 1966.

REECE, K.S.; SIDDALL, M.E.; BURRESSON, E.M.; GRAVES, J.E. Phylogenetic analyses of *Perkinsus* based on actin gene sequences. **Journal of Parasitology**, v. 83, p. 17-423, 1997.

SABRY, R.C.; MAGALHÃES, A.R.M. Parasitas em ostras de cultivo (*Crassostrea rhizophorae* e *Crassostrea gigas*) da Ponta do Sambaqui, Florianópolis, SC. **Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.**, v. 27, p. 194-202, 2005.

SABRY, R.C.; GESTEIRA, T.C.V.; MAGALHÃES, A.R.M.; BARRACCO, M.A.; GUERTLER, C.; FERREIRA, L.P.; VIANNA, R.T.; SILVA, P.M. Parasitological survey of mangrove oyster, *Crassostrea rhizophorae*, in the Pacoti River Estuary, Ceará State, Brazil. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 112, n. 1, p. 24-32, 2013.

SABRY, R.C.; ROSA, R.D.; MAGALHÃES, A.R.M.; BARRACCO, A.M.; GESTEIRA, T.C.; SILVA, P.M. First report of *Perkinsus* sp. infecting mangrove oysters. *Crassostrea rhizophorae* from the Brazilian coast. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 88, n. 1, p. 13-23, 2009.

SABRY, R.C.; DA SILVA, P.M.; GESTEIRA, T.C.V.; PONTINHA, V.A.; MAGALHÃES, A.R.M. Pathological study of oysters *Crassostrea gigas* from culture and *C. rhizophorae* from natural stock of Santa Catarina Island, SC, Brazil. **Aquaculture**, v. 60, p. 43-50, 2011.

SCARPA, E.; FORD, S.; SMITH, B.; BUSHEK, D. An investigation of ciliate xenomas in: *Crassostrea virginica*. **J. Shellfish Res.**, v. 25, p. 772-773, 2006.

SHEPPARD, B.J.; PHILLIPS, A.C. *Perkinsus olseni* detected in Vietnamese aquacultured reef clams *Tridacna crocea* imported to the USA, following a mortality event. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 79, n. 3, p. 229-235, 2008.

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 e 2, FLORIANÓPOLIS, 2000. Resumos... Florianópolis, UFSC/ABRAPOA, p. 26. 2000.

SILVEIRA, J.R., N. 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. 1997.

SIDDALL, M.E.; REECE, K.S.; NERAD, T.A.; BURRESON, E.M. Molecular determination of the phylogenetic position of a species in the genus *Colpodella* (Alveolata). **American Museum Novitates**, v. 3314, p. 1-10, 2001.

UMIJI, S.; LUNETTA, J.E.; LEONEL, R.M.V. Infestation of the mussel *Perna perna* by digenetic trematodes of the Bucephalidae family, gen. *Bucephalus*. **Anais... Acad. Bras. Cienc.**, v. 47, p. 115-117, 1976.

VARELA, E.S.; BEASLEY, C.R.; SCHNEIDER, H.; IRACILDA, S.; MARQUES-SILVA, N.S.; TAGLIARO, C.H. Filogenia molecular da ostra de mangue (*Crassostrea*) do Brasil. **Revista de Estudos de moluscos**, v. 73, n. 3, p. 229-234, 2007.

VILLALBA, A.; REECE, K.S.; ORDÁS, M.C.; CASAS, S.M.; FIGUERAS, A. Perkinsiosis in mollusks: a review. **Aquatic Living Resources**, v. 17, n. 4, p. 411-432, 2004.

VILLALBA, A.; GESTAL, C.; CASAS, S.M.; FIGUERAS, A. Perkinsiosis en moluscos. In: FIGUERAS, A.; NOVOA, B. Enfermedades de moluscos bilvalvos de interés en acuicultura. Madrid: Fundación Observatorio Español de Acuicultura; 2011. p. 181-242.