



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

***Perkinsus* spp. (Perkinsozoa) e outros parasitos na ostra *Crassostrea rhizophorae*  
(Guilding, 1828) de cultivo e de estoques naturais da Baía de Camamu, Bahia**

**Mestranda: Mariane dos Santos Aguiar Luz**

**Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Guisla Boehs**

**ILHÉUS, BAHIA**

**2014**

**MARIANE DOS SANTOS AGUIAR LUZ**

***Perkinsus* spp. (Perkinsozoa) e outros parasitos na ostra *Crassostrea rhizophorae* (Guilding, 1828) de cultivo e de estoques naturais da Baía de Camamu, Bahia**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em  
Ciência Animal, da Universidade Estadual de Santa Cruz,  
como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre  
em Ciência Animal.

**Linhas de Pesquisa: Produção e Sanidade Animal**

**Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Guisla Boehs**

**ILHÉUS, BAHIA**

**2014**

L979 Luz, Mariane dos Santos Aguiar

Perkinsus spp. (Perkinsozoa) e outros parasitos na ostra *Crassostrea rhizophorae* (Guiding, 1828) de cultivo e de estoques naturais da Baía de Camamu, Bahia / Mariane dos Santos Aguiar Luz. – Ilhéus, BA: UESC, 2014.

xiv, 51 f.: il.

Orientador: Guisla Boehs.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Santa Cruz. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal.

Inclui referências.

1. Ostra – Parasito – Camamu (BA). 2. *Crassostrea rhizophorae* – Camamu (BA). 3. Ostra – Criação. 4. Histopatologia. I. Título.

CDD 639.41

**MARIANE DOS SANTOS AGUIAR LUZ**

***Perkinsus* spp. (Perkinsozoa) e outros parasitos na ostra *Crassostrea rhizophorae*  
(Guilding, 1828) de cultivo e de estoques naturais da Baía de Camamu, Bahia**

Ilhéus – BA, 07/02/2014

---

Dr<sup>a</sup> Guisla Boehs

UESC/DCB

(Orientadora)

---

Dr<sup>a</sup> Rachel Costa Sabry

IFCE

---

Dr<sup>o</sup> Amauri Arias Wenceslau

UESC/DCAA

**ILHÉUS-BAHIA**

**2014**

## **Dedicatória**

*Aos meus pais, como prova da minha gratidão e amor!*

## **Agradecimentos**

Agradeço ao meu amigo e companheiro de todas as horas, o meu amigo Jesus, Deus Emanuel, sempre aqui comigo. Obrigada, porque me concedeu vida, sabedoria e grandes lições que me fizeram ser melhor ao final desse processo. Sou grata por todas as pessoas que colocou em meu caminho e por tudo o que aprendi com elas. A honra e a glória seja todo ao Senhor!

O meu super hiper mega agradecimento a minha orientadora e amiga, professora Dr<sup>a</sup> Guisla Boehs! Em uma frase de autoria de Confúcio diz: “A palavra convence, mas o exemplo arrasta”, e é exatamente isso que a cada dia você me causa. É meu exemplo de disciplina, competência, qualidade e força de vontade. Obrigada por todos os conselhos, pelas broncas e pelas palavras de incentivo. Sempre olhei tudo isso com bons olhos, pois acredito que sempre me acrescentou e me fez uma pessoa muito mais madura para chegar onde cheguei...Sou muitíssimo grata por tudo!

O meu grande obrigada ao meu amor, meu companheiro de todas as horas e meu grande amigo, o meu lindo marido (Joaldo Luz). Sou muito grata por todo o seu apoio e incentivo. Sou grata por sempre me mostrar que havia caminhos mais além e mais altos, e que embora esses caminhos sejam árduos e difíceis é muito bom sentir que contribuímos e fomos mais distantes que a maioria. Obrigada por ser meu exemplo de humildade e bondade e por sempre me completar e me acrescentar tantas coisas boas. Te amo!

Aos meus pais (Esdras e Mariano) e irmãos (Mariana e Elsimar) pelo carinho e incentivo de perto e de longe.

Aos meus familiares, em especial a família Oliveira (Denise, Demerson, Tia Senir e Tio Nicó), pelas orações e pelas palavras sempre positivas. Obrigada!

Aos meus amigos e segunda família (Sônia, Marta e Tércio), por me acolherem e torcerem por mim.

Aos meus amigos e em especial a família malacostraca (Gabi, Guido, Paty, Sah, Milena, Verônica, Leiza, Karin, Everton, Lorena, Everlin, Aline, Platy, Dis, Nara) por toda a força, incentivo, pelas risadas e por tornar esse momento tão leve. Obrigada todo especial a minha amiga Leiza que eu tanto amo e admiro. Você sempre diz que eu sou seu orgulho, mas você é muito mais para mim!

Agradeço aos amigos e colegas de laboratório: Marisa, Tiago, Verena e em especial a Maxwell, por toda ajuda nos processamentos iniciais e na análise estatística.

A minha imensa gratidão à Augusta Miranda (Tuti) por toda a sua ajuda, pelas risadas que tanto me aliviaram quando a vontade era chorar. Obrigada minha amiga!

O meu grande agradecimento a Josiane e Fábio! Obrigada por elucidar esse mundo da genética, que no início me parecia tão confuso. Obrigada pela paciência, por me ensinarem tão bem as técnicas e pela confiança. Sou grata também por conviver com pessoas tão competentes e incentivadoras de boas descobertas. Valeu!

Obrigada aos professores George Albuquerque e Amauri Wenceslau, por permitirem o uso sem restrições de seus laboratórios. Muito obrigada pela confiança!

Agradeço aos professores Fábio Flores, Rosana Ferrari e Tânia Barth, do Laboratório de Histologia Animal pela torcida e incentivo. Obrigada!

Obrigada a professora Dr<sup>a</sup> Rachel Sabry, por contribuir com a existência desse trabalho. Há quatro anos você se disponibilizou e transmitiu conhecimentos tão necessários para expandir meus horizontes e também o de outros. Esse trabalho também é mérito seu e sou/serei imensamente grata por tudo isso!

Minha imensa gratidão a Liana Pinho! Você é minha companheira de barco que sempre me lembrarei com muito carinho. Sempre humilde, prestativa e minha colaboradora via *WhatsApp* (risos). Obrigada mais uma vez por tudo!

Agradeço a Universidade Estadual de Santa Cruz e ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal por todo o auxílio.

Agradeço a FABESP e a CAPES pelo financiamento do projeto e a concessão da bolsa, respectivamente.

“Não há no mundo exagero mais belo que a gratidão”

Jean de la Bruyere

“Porque assim como os céus são mais altos do que a terra, assim são os meus caminhos muito maiores do que os seus caminhos, e os meus pensamentos mais altos que os vossos pensamentos, diz o Senhor” Isaías 55:6



***Perkinsus* spp. (Perkinsozoa) e outros parasitos na ostra *Crassostrea rhizophorae* (Guilding, 1828) de estoques naturais e de cultivo da Baía de Camamu, Bahia**

**RESUMO**

Vários patógenos de diferentes grupos têm sido registrados em moluscos bivalves de interesse econômico na costa brasileira. O protozoário *Perkinsus* sp., associado a mortalidades em massa de vários bivalves no Hemisfério Norte, foi registrado no Brasil em 2009 na ostra *Crassostrea rhizophorae* e desde então tem sido foco de vários estudos no Nordeste brasileiro, região de sua ocorrência. Neste estudo, investigou-se este patógeno e outros parasitos em *C. rhizophorae* de estoque natural e cultivado na Baía de Camamu (BA). As coletas foram realizadas em outubro e novembro de 2012 e em janeiro de 2013. As ostras (n = 300) foram medidas e analisadas quanto a sinais macroscópicos de parasitos e/ou enfermidades. Para análise geral de parasitismo, uma secção diagonal de 5 mm de cada exemplar foi fixada em solução de Davidson por 24 h. Os tecidos foram processados por histologia convencional e corados com hematoxilina de Harris e eosina (HE). As sessões foram analisadas sob microscópio de luz (MO) quanto à presença de parasitos, injúrias nos tecidos e reações de defesa do hospedeiro. Para a detecção de *Perkinsus* na fase de hipnósporo, duas lamelas branquiais e o reto foram retirados e submetidos ao Meio Fluido de Tioglicolato de Ray (RFTM). Após incubação na ausência de luz e temperatura ambiente durante sete dias, os tecidos foram macerados e corados com lugol e depois observados em MO. Para a observação da esporulação deste patógeno, foi realizada uma coleta adicional no mês de dezembro de 2013 (n = 30). Para a confirmação e identificação do *Perkinsus*, foi feita Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). As análises histológicas evidenciaram: organismos assemelhados a *Rickettsiae* (RLOs), *Nematopsis* sp. (Apicomplexa), *Sphenophrya* sp. (Ciliophora), *Perkinsus* sp. (Perkinsozoa), *Urastoma* sp. (Turbellaria), *Bucephalus* sp. (Digenea), *Tylocephalum* spp. (Cestoda) e um copépode não identificado. *Perkinsus* spp. foi o parasito mais prevalente (média = 93,3). Hipnósporos foram observados no processo da esporulação. As amostras negativas para RFTM também foram negativas na PCR e 47% das ostras positivas para RFTM foram positivas na PCR. Apesar de aparentemente não ocorrer mortalidade na ostra relacionada aos parasitos observados, um monitoramento constante deve ser realizado.

**Palavras-chave:** *Dermo*, *RFTM*, *bivalves*, *parasitos*, *histopatologia*, *patógenos*, *PCR*, *esporulação*, *ostreicultura*

***Perkinsus* spp. (Perkinsozoa) and other parasites in the oyster *Crassostrea rhizophorae* (Guilding, 1828) of natural stocks and cultivation of Camamu Bay, Bahia**

**ABSTRACT**

Many pathogens of different groups have been recorded in bivalve mollusks of economic interest on the Brazilian coast. The protozoan *Perkinsus* sp., associated with mass mortalities of various bivalves in the Northern Hemisphere, was recorded in Brazil in 2009 in the oyster *Crassostrea rhizophorae* and has since been the focus of several studies in the Brazilian northeast, region of its occurrence. This study aimed to investigate this pathogen and other parasites in *C. rhizophorae* in natural and cultivated stock in Camamu Bay (BA). The samples were performed in October-November 2012 and in January 2013 (n = 300). The oysters were first measured and analyzed for macroscopic signs of parasites and/or diseases. For general analysis of parasitism, a diagonal section 5 mm thick of each specimen was removed and fixed in Davidson's solution for 24 h. The tissues were prepared according conventional histology technique and stained with Harris hematoxylin and eosin (H&E). The histological sections were analyzed under a light microscope for the presence of parasites, tissue injury and host defense reactions. For the detection of *Perkinsus* in hypnospore's phase, two gill lamellae and rectum of all specimens were removed and incubated in Ray's fluid thioglycollate medium (RFTM). The tissues were incubated for seven days in the dark at room temperature and subsequently macerated with a scalpel, stained with Lugol's solution and observed under a light microscope for the presence of hypnospores of *Perkinsus*. To observe *Perkinsus* sporulations, an additional sample was carried in December 2013 (n = 30). For the confirmation and identification of *Perkinsus*, oysters were submitted to PCR. Histological analysis showed: *Rickettsiae* like organisms (RLOs), *Nematopsis* sp. (Apicomplexa), *Sphenophrya* sp. (Ciliophora), *Perkinsus* spp. (Perkinsozoa), *Urastoma* sp. (Turbellaria), *Bucephalus* sp. (Digenea), *Tylocephalum* sp. (Cestoda) and an unidentified copepod. *Perkinsus* spp. was the most prevalent parasite (mean overall prevalence = 93.3%). Hypnospores were observed in the process of sporulation. The RFTM negative samples were also negative in PCR and 47% positive oysters for RFTM were positive in PCR. Although mortality apparently does not occur in the oyster related to parasites observed, a constant monitoring should be conducted.

**Keywords:** *Dermo*, *RFTM*, *bivalves*, *parasites*, *histopathology*, *pathogens*, *PCR*, *sporulation*, *oyster farming*

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 01.** Ciclo de vida de *Perkinsus olseni* no bivalve *Ruditapes philippinarum*. A = Trofozoítos em divisão no tecido do hospedeiro, fase visualizada em seção histológica. B = Hipnósporos observados em Meio Fluido de Tioglicolato de Ray (RFTM), quando tecidos contendo trofozoítos são incubados nesse meio. C = Divisão celular de hipnósporos em meio salino, com formação de tubo de descarga e liberação de zoósporos. Fonte: Adaptado de Choi e Park (2010).....11

**Figura 02.** Mapa da área de estudo, com a indicação do ponto de coleta (Porto do Campo) da ostras *Crassostrea rhizophorae* de cultivo e estoque natural na Baía de Camamu (Bahia).....16

**Figura 03.** Valvas de *Crassostrea rhizophorae* da região de Porto do Campo (Baía de Camamu, Bahia) sendo: à esquerda: valva direita, vista externa e à direita, valva esquerda, valva interna. Barra = 2cm.....18

**Figura 04.** *Crassostrea rhizophorae*, à esquerda fixada nas raízes do mangue e à direita em sistema de cultivo do tipo espinhel, em Porto do Campo, Baía de Camamu (Bahia).....18

**Figura 05.** Dados de temperatura (°C) e salinidade (‰) de Porto do Campo (Baía de Camamu, Bahia) durante o período de coletas (outubro de 2012 a janeiro de 2013) (n = 35).....23

**Figura 06.** Hipnósporos de *Perkinsus* spp. nos tecidos de *Crassostrea rhizophorae* de Porto do Campo (Baía de Camamu, Bahia) após incubação em Meio Fluido de Tioglicolato de Ray (RFTM) e maceração e coloração com lugol, sendo: (A) infecção muito leve, (B) infecção leve, (C) infecção moderada, (D) infecção intensa. Barras = 25 µm.....24

**Figura 07.** Níveis de intensidade de infecção de *Perkinsus* spp. em *Crassostrea rhizophorae* de cultivo (C) e do manguezal (M) de Porto do Campo (Baía de Camamu, Bahia) de outubro e novembro de 2012 a janeiro de 2013 (n = 300).....25

**Figura 08.** Trofozoítos de *Perkinsus* spp. em *Crassostrea rhizophorae* de Porto do Campo (Baía de Camamu, Bahia). **A.** No epitélio da glândula digestiva. Barra = 10 µm. **B.** Trofozoíto com vacúolo ocupando grande parte do volume celular e núcleo periférico

e trofozoítos em divisão (cabeça de seta) no tecido conjuntivo da glândula digestiva. Barra=10µm.....26

**Figura 09.** Zoosporulação de *Perkinsus* spp. em água salina, com formação de (A) pré-hipnósporos, (B) zoosporângios contendo zoósporos móveis e (C) formação de tubo de descarga.....27

**Figura 10.** Diagnóstico de *Perkinsus* por PCR: eletroforese em gel de agarose (1,5%) com ampliações de fragmentos de 700 bp, obtidos em PCR realizados com iniciadores PerkITS 85/750. A primeira coluna superior mostra o marcador molecular (M), seguido pelo controle positivo (C+), negativo (C-) e as amostras (1, 2, 3, 5, 6, 7 positivas e 4 negativas).....27

**Figuras 11-15.** Parasitos na ostra *Crassostrea rhizophorae* de Porto do Campo (Baía de Camamu, Bahia), sendo: (11) RLOs no epitélio da glândula digestiva. Barra = 10µm; *Sphenophrya* sp. no epitélio branquial (12) sem formação de xenoma e com formação de xenoma (13), Barra = 10 µm; (14) oocistos intrahemocíticos de *Nematopsis* sp. na região das brânquias, Barra = 10 µm; (15) *Urastoma* sp. entre os filamentos branquiais, Barra = 10 µm. Coloração: HE.....29

**Figura 16.** Esporocistos de *Bucephalus* sp. contendo massas germinativas e cercarias em *Crassostrea rhizophorae* de Porto do Campo (Baía de Camamu, Bahia). Barra = 25 µm. Coloração: HE.....31

**Figuras 17.** *Tylocephalum* sp. em *Crassostrea rhizophorae* de Porto do Campo (Baía de Camamu, Bahia) na região periférica da glândula digestiva, com formação de cápsula fibrosa. Barra = 25 µm. Coloração: HE.....32

**Figura 18.** Copépode não identificado em região próxima às brânquias de *Crassostrea rhizophorae* de Porto do Campo (Baía de Camamu, Bahia). Barra = 25 µm. Coloração: HE.....32

**LISTA DE TABELAS**

**Tabela 01.** Prevalência de *Perkinsus* spp. em *Crassostrea rhizophorae* de Porto do Campo, Baía de Camamu (Bahia) evidenciada através do uso das técnicas de Meio Fluido de Tioglicolato de Ray (RFTM) e Histologia em ambiente de manguezal (n = 150) e cultivo (n = 150) nos meses de outubro e novembro de 2012 e janeiro de 2013.....25

**Tabela 02.** Parasitos e suas prevalências (%) na ostra *Crassostrea rhizophorae* em ambiente de cultivo (n = 150) e no manguezal (n = 150) na localidade de Porto do Campo, Baía de Camamu (Bahia), nos meses de outubro e dezembro de 2012 e janeiro de 2013.....31

## SUMÁRIO

<b>RESUMO.....</b>	<b>viii</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>ix</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>2</b>
<b>2.1. Objetivo geral.....</b>	<b>2</b>
<b>2.2. Objetivos específicos.....</b>	<b>2</b>
<b>3. REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>3</b>
<b>3.1. As ostras no contexto da alimentação e aquicultura brasileira.....</b>	<b>3</b>
<b>3.2. O protozoário <i>Perkinsus</i>.....</b>	<b>5</b>
<b>3.2.1. Taxonomia e filogenia.....</b>	<b>5</b>
<b>3.2.2. Espécies e registros de <i>Perkinsus</i>.....</b>	<b>6</b>
3.2.2.1. <i>Perkinsus marinus</i> .....	7
3.2.2.2. <i>Perkinsus olseni</i> .....	8
3.2.2.3. <i>Perkinsus qugwadi</i> .....	8
3.2.2.4 Demais espécies.....	8
<b>3.2.3. Transmissão e ciclo de vida.....</b>	<b>9</b>
3.2.3.1. Transmissão.....	9
3.2.3.2. Ciclo de vida.....	10
3.2.3.3. Sintomas da Perkinsiose.....	12
3.2.3.4. Influência dos fatores abióticos na patogenicidade de <i>Perkinsus</i> ...	13
3.2.3.5. Registros na América do Sul e no Brasil.....	13
<b>3.3. Registros de parasitos na Bahia.....</b>	<b>15</b>
<b>3.4. Área de Estudo.....</b>	<b>16</b>
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>17</b>

4.1. Coleta e processamento das amostras.....	17
4.2. Análises macroscópicas e histologia.....	18
4.2.1. Estereologia.....	19
4.3. Diagnóstico de <i>Perkinsus</i> através de RFTM.....	19
4.4. Zoosporulação.....	20
4.5. Diagnóstico de <i>Perkinsus</i> por PCR.....	20
4.6. Análises estatísticas.....	23
5. RESULTADOS.....	23
5.1. Dados abióticos.....	23
5.2. Biometria e sexo.....	23
5.3. <i>Perkinsus</i> spp.....	23
5.3.1. Detecção de <i>Perkinsus</i> spp. em Meio Fluido de Tioglicolato de Ray (RFTM).....	23
5.3.2. Histologia.....	25
5.3.3. Esporulação de <i>Perkinsus</i> spp.....	26
5.3.4. Diagnóstico de <i>Perkinsus</i> spp. por PCR.....	27
5.4. Análises microscópicas de outros parasitos.....	28
6. DISCUSSÃO.....	32
7. CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	38
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA.....	39

## 1. INTRODUÇÃO

Os moluscos bivalves alimentam-se, em sua grande maioria, por filtração. Apesar de ser uma atividade seletiva, a filtração permite a entrada de muitos parasitos e patógenos junto com o alimento. Estes, na medida em que causam danos e redução do potencial ecológico do bivalve, geram perda de peso, redução do crescimento e muitas vezes, a morte do hospedeiro. Do ponto de vista econômico, tanto ao extrativismo de bivalves de estoques naturais quanto em cultivos, os patógenos podem trazer prejuízos e até levar ao estrangulamento da exploração desses recursos.

Patógenos de vários grupos, incluindo bactérias, fungos, protozoários e metazoários foram registrados, nos últimos dez anos, em diferentes bivalves de interesse econômico da costa brasileira. Dentre estes, no mundo todo, os protozoários são considerados os de maior importância para os bivalves, por abrigarem agentes causadores de grandes danos aos seus hospedeiros.

Os protozoários do gênero *Perkinsus* são responsáveis por mortalidades em massa em várias partes do mundo e foram registrados há poucos anos em algumas regiões do Nordeste brasileiro nos estados do Ceará, Bahia, Sergipe e Paraíba em ostras do gênero *Crassostrea*, sendo que no Ceará também foi registrado no berbigão *Anomalocardia brasiliiana*. Essas primeiras investigações sobre esse patógeno permitiram conhecer previamente a prevalência, a suscetibilidade à infecção, a intensidade de infecção, a resposta imune do hospedeiro e as espécies de *Perkinsus* presentes nessa região. Entretanto, dada a importância desse parasito em termos de patogenicidade e implicação para o cultivo de moluscos, especialmente para a ostreicultura, as informações são ainda escassas quando comparadas com as do Hemisfério Norte e insuficientes para o embasamento de cultivo de bivalves.

A ostra-do-mangue (*Crassostrea rhizophorae*), hospedeiro suscetível à infecção de *Perkinsus*, é um importante recurso extrativista em todo o litoral brasileiro. No estado da Bahia, o cultivo dessa ostra foi iniciado há alguns anos e é praticado de modo artesanal na Baía de Todos os Santos, Baía do Iguape e mais ao sul, na região do Baixo Sul, em Valença, Taperoá e Camamu.



A faixa litorânea e áreas de estuários e manguezais do estado da Bahia são extensas e abrigam uma alta diversidade de espécies, favorecendo a implantação de mais cultivos e a produção de bivalves em larga escala. Entretanto, o aumento na produção requer controle de qualidade e pesquisas que agreguem maior qualidade do produto, assim como controle rigoroso dos patógenos. Por isso, novos estudos são necessários para contemplar o aprofundamento na relação patógeno/hospedeiro no que tange a ostras do gênero *Crassostrea*, a distribuição geográfica das espécies de *Perkinsus* já registradas, a investigação de ocorrência de novas espécies e a ação desse patógeno em estoques naturais e de cultivo.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo Geral

- ✓ Analisar comparativamente *Perkinsus* spp. e outros parasitos na ostra *Crassostrea rhizophorae* de cultivo e de estoque natural na Baía de Camamu, Bahia.

### 2.2. Objetivos específicos

- ✓ Verificar a existência de sinais macroscópicos relacionados à presença de *Perkinsus* e outros patógenos em *C. rhizophorae*;
- ✓ Verificar a prevalência de infecção de *Perkinsus* em ostras de estoque natural (manguezal) e de cultivo do tipo espinhel;
- ✓ Verificar a intensidade de infecção de *Perkinsus* nos dois ambientes;
- ✓ Analisar a distribuição de *Perkinsus* e de outros parasitos nos tecidos e órgãos das ostras estudadas;
- ✓ Analisar a patogenicidade de *Perkinsus* sobre *C. rhizophorae*;
- ✓ Identificar a (s) espécie (s) de *Perkinsus*;
- ✓ Verificar a zoosporulação de *Perkinsus* sp. em condição experimental;
- ✓ Identificar outros parasitos associados com as ostras no cultivo e no manguezal;

- ✓ Comparar a prevalência, a intensidade de infecção e a patogenicidade de parasitos nas ostras de cultivo com as do manguezal.

### **3. REVISÃO DE LITERATURA**

#### **3.1. As ostras no contexto da alimentação e aquicultura brasileira**

A população mundial nos últimos 20 anos vem sofrendo um rápido crescimento e atingiu em 2011 os sete bilhões de habitantes. Segundo a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (= Food and Agriculture Organization of the United Nations - FAO), até 2030, a população mundial atingirá os 8,3 bilhões (FAO, 2011). Segundo essa organização, esse crescimento significativo vem sendo acompanhado pelo aumento da demanda alimentar e impulsionado pela busca por novas atividades que produzam alimentos de qualidade em menor tempo. Com isso, alguns setores vêm crescendo e mostrando-se como uma opção no mercado alimentício, como por exemplo, a aquicultura.

O cultivo de organismos aquáticos (Aquicultura) é uma atividade sustentável, pois, além de aumentar a oferta de proteínas para as populações humanas, contribui com a preservação de estoques naturais de moluscos, peixes e crustáceos na medida em que reduz o extrativismo desses recursos (BUYS, 2007).

De acordo com a FAO (2012), o Brasil possui mais de 8.000 km de faixa litorânea, 12% das reservas de água doce do planeta, mais de dois milhões de hectares de manguezais e grande potencial para os diversos tipos de cultivo. No entanto, segundo essa organização, a atividade ainda está sendo pouco explorada, estando concentrada praticamente no Sudeste e Sul do país. Ainda segundo a FAO, a aquicultura no Brasil teve grande crescimento na última década e com os investimentos para melhorar a qualidade dos animais cultivados, estima-se que nos próximos anos o país se torne mais competitivo nos mercados internacionais.

Segundo relatório do Ministério da Pesca e Aquicultura (MPA, 2010), a aquicultura no Brasil cresceu 15,3% entre 2009 e 2010 e 31,2% durante o triênio 2008-2010. Em dados mais recentes divulgados pela FAO (2012), foi apontado que mais da metade da produção total da aquicultura brasileira concentra-se no cultivo de peixes

(61%), seguido pelo cultivo de crustáceos (32,4%), de moluscos (3,9%) e por último, pelo cultivo de rãs (0,2%).

O cultivo de moluscos surgiu simultaneamente ao longo da costa brasileira na década de 1970 e é considerado uma atividade recente no Brasil quando comparada aos demais setores (aves, bovinos e suínos). O estado de Santa Catarina é o maior produtor até o momento, com 93% da produção nacional (FAO, 2012). As espécies cultivadas são: o mexilhão *Perna perna* (Linnaeus, 1758), as ostras *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1795), *Crassostrea rhizophorae* (Guilding, 1828) e *Crassostrea brasiliiana* (Lamarck, 1818) e o pectinídeo *Nodipecten nodosus* (Linnaeus, 1758) (SILVEIRA; SANTOS, 2010; BOEHS et al., 2012).

Com relação ao extrativismo e cultivo de ostras, segundo o MPA (2013), o levantamento de 2011 sugeriu 1.233,7 toneladas de ostras capturadas naquele ano e 2.538,4 toneladas produzidas via aquicultura, sendo que mais de 90% desse total foi produzido no estado de Santa Catarina.

A ostra japonesa (*C. gigas*) é uma espécie exótica, sendo atualmente cultivada apenas em Santa Catarina, pois requer baixas temperaturas. *Crassostrea brasiliiana*, também conhecida como *C. gasar*, é endêmica da costa brasileira e pode ser encontrada fixada a costões rochosos, geralmente no infralitoral.

*Crassostrea rhizophorae*, a ostra-do-mangue, ocorre desde o sul do Caribe até a Costa do Uruguai e também está presente em toda a costa brasileira (RIOS, 2009). Esta espécie fixa-se sobre substratos consolidados, incluindo rochas e principalmente nas raízes do mangue vermelho *Rhizophora mangle* L.. Assim como as demais espécies do gênero *Crassostrea* Sacco, 1897, *C. rhizophorae* espécie é hermafrodita sequencial protândrica e ovulípara (com fertilização externa em meio aquático), cujas larvas fixam-se sobre o substrato após aproximadamente duas semanas, ocasião em que sofrem metamorfose; as ostras desse gênero atingem a maturidade sexual com cerca de três centímetros (ALVES; MAGALHÃES, 2010; LENZ; BOEHS, 2011).

Na Baía de Camamu (BA), local do deste estudo, cultiva-se *C. rhizophorae* em pequena escala, predominantemente no sistema espinhel (*long line*), mas usa-se também o sistema mesa e estima-se um estoque aproximado de 15 mil ostras, somando os locais (Boehs, com. pessoal).

### 3.2. O protozoário *Perkinsus*

Atualmente, a Organização Internacional de Epizootias (OIE) considera sete espécies de parasitos de declaração obrigatória para os moluscos bivalves: herpesvírus, *Xenohaliotis californiensis*, *Bonamia ostreae*, *Bonamia exitiosa*, *Marteilia refringens*, *Perkinsus marinus* e *Perkinsus olseni*, sendo os cinco últimos protozoários (OIE, 2011).

Os protozoários do gênero *Perkinsus* são responsáveis por mortalidades em massa em moluscos em várias partes do mundo (BRANDÃO et al., 2013) e já foram descritos em gastrópodes, assim como em ostras, vieiras, mexilhões, e outros bivalves de interesse econômico cultivados (CASAS et al., 2002; PETTY, 2010; SANIL et al., 2010), inclusive no Brasil (SABRY et al., 2009; BRANDÃO et al., 2013; da SILVA et al., 2013; QUEIROGA et al., 2013; SABRY et al., 2013). Perkinsiose é o nome dado à doença causada por protozoários desse gênero.

Segundo Villalba et al. (2004), a taxonomia, a filogenia, o ciclo de vida, a transmissão, os sinais clínicos e os fatores que contribuem para a existência desse protozoário são os principais pontos já elucidados sobre esse patógeno.

#### 3.2.1. Taxonomia e filogenia

Em 1940 começou a ser observada frequente mortalidade em populações de ostras localizadas no Golfo do México e na Louisiana, costa atlântica dos Estados Unidos. Por muito tempo, as perdas e o comprometimento do bom aspecto destes animais foram atribuídos a poluição por óleo, que era comum nessas áreas (MACKIN et al., 1950; LAUCKNER, 1983). As perdas econômicas trazidas incentivaram a realização de pesquisas mais aprofundadas, que levaram a descoberta e descrição de *Perkinsus* em um estudo realizado por Mackin et al. (1950). Na época, o protozoário foi classificado como um fungo e denominado de *Dermocystidium marinum*, recebendo a doença o nome de Dermo, termo ainda utilizado por muitos autores.

Alguns anos depois, com base em estudos *in vitro*, Mackin e Ray (1966) mudaram o nome do parasito para *Labyrinthomyxa marina*, considerando que não se tratava de um fungo e sim de um Labyrinthomorpha, pois o parasito apresentava algumas

familiaridades com este grupo. Após esta mudança, muitas outras foram realizadas, mas sem evidências convincentes que permitissem classificar o parasito de maneira correta.

Em 1976, Perkins, realizando estudos com uso de microscopia eletrônica, observou um complexo apical, uma organela apenas presente em protozoários do filo Apicomplexa. Essa descoberta levou este pesquisador acreditar a que o parasito pertencesse a este grupo. Dois anos após esse registro, Levine (1978) estabeleceu a classe Perkinsea no filo Apicomplexa para acomodar *Perkinsus marinus*, baseado na descoberta da presença de uma membrana de micrósporos, característica também presente nos integrantes do filo. Porém, a membrana de micrósporo é uma estrutura também comum aos ciliados e aos dinoflagelados e a estrutura conóide encontrada no protozoário é incompleta, indicando que a afinidade é menor para pertencer a este filo (VIVIER, 1982).

Atualmente, *Perkinsus* está acomodado em um filo próprio, denominado Perkinsozoa, sugerido por Norén et al. (1999). Ainda não há um consenso sobre a criação do filo, pois se reconhece que esse protozoário possui muitas características presentes tanto no filo Apicomplexa quanto no Dinoflagellata, que foram comprovadas em estudos de análises por biologia molecular das regiões genômicas da subunidade pequena do RNA ribossomal (SSUrRNA), que sugerem que o protozoário está intimamente associado aos dinoflagelados (GOGGIN; BARKER, 1993).

### **3.2.2. Espécies e registros de *Perkinsus***

São conhecidas sete espécies do gênero *Perkinsus*, sendo elas: *P. marinus* (MACKIN et al., 1950), *P. olsenii* (em sinonímia com *P. atlanticus*) (Lester e Davis, 1981), *P. qugwadi* (BLACKBOURN et al., 1998), *P. chesapeakei* (MCLAUGHLIN et al., 2000) (em sinonímia com *P. andrewsi*), *P. mediterraneus* (CASAS et al., 2004), *P. honshuensis* (DUNGAN; REECE, 2006) e *P. beihaiensis* (MOSS et al., 2008). Das espécies citadas, *P. marinus* e *P. olsenii* são consideradas de declaração obrigatória pela OIE e as mais estudadas (VILLALBA et al., 2004; CHOI; PARK, 2010), por afetarem de maneira agressiva seus hospedeiros e levá-los a mortalidade em massa na maioria dos casos (BRANDÃO et al., 2013).

### 3.2.2.1. *Perkinsus marinus*

Essa espécie já foi encontrada na Baía de Delaware, Chesapeake, costa atlântica do Estado de Lousiana nos Estados Unidos e no Golfo do México (BOWER et al., 1994; VILLALBA et al., 2004; OIE, 2011) na ostra americana *Crassostrea virginica* (Gmelin, 1791). Também no México, *P. marinus* foi registrada na ostra nativa *Crassostrea corteziensis* (Hertlein, 1951) (CÁCERES-MARTÍNEZ et al., 2008) e na ostra *Saccostrea palmula* (Carpenter, 1875) (CÁCERES-MARTÍNEZ et al., 2012).

Além das ostras, este parasito também já foi encontrado no bivalve *Mercenaria mercenaria* (Linnaeus, 1758) na Flórida, Estados Unidos (MCCOY, 2005).

*Perkinsus marinus* tem sido associado a altas mortalidades de ostras, principalmente durante o verão e por isso é considerado de alta patogenicidade quando em temperaturas e salinidades adequadas para a sua proliferação.

Segundo Lester e Davis (1981), *P. marinus* apresenta trofozoítos com tamanho de 3-10 µm de diâmetro e parede proeminente, que deriva a partir do hospedeiro (MACKIN et al., 1950; PERKINS, 1969). Ainda segundo Lester e Davis (1981), o tubo de descarga, estrutura que permite a saída dos zoósporos do zoosporângio, é pouco desenvolvido e o vacúolo do parasito apresenta manchas sombreadas quando corado com hematoxilina e observado na técnica histológica.

Nos últimos anos, *P. marinus* continua causando efeito devastador nas populações de ostras do Atlântico Norte e no Golfo do México. Como medida de controle, outras espécies de ostras foram introduzidas nessas baías para substituir *C. virginica*, como *Crassostrea ariakensis* (Fujita, 1913) proveniente da China (MOSS et al., 2008). A ostra da China foi escolhida por apresentar melhor crescimento, mais resistência a este protozoário, assim como a outros parasitos como *Haplosporidium nelsoni*, por isso tem sido vista como uma nova opção para resolver as perdas sofridas (MOSS et al., 2008).

### 3.2.2.2. *Perkinsus olseni*

Infecções por *P. olseni* foram relatadas em *Ruditapes decussatus* em Portugal (AZEVEDO, 1989), nos gastrópodes *Haliotis ruber* Leach, 1814, *H. laevigata* Donovan, 1808, na Austrália (LESTER; DAVIS, 1981; ROBLEDO et al., 2000; IFREMER, 2009),

*Ruditapes philippinarum* (Adams e Reeve, 1850) na Coréia do Sul (CHOI; PARK, 2010) e Itália (ABOLLO et al., 2006), *Pitar rostrata* (Koch, 1844) no Uruguai (CREMONTE et al., 2005), *Protothaca jedomensis* (Lischke, 1874) na Coréia do Sul (PARK et al., 2006), *Austrovenus stuchburyi* (W. Wood, 1828) na Nova Zelândia (DUNGAN et al., 2007), *Tridacna crocea* Lamarck, 1819 no Vietnã (SHEPPARD; PHILLIPS, 2008) e em *Ruditapes decussatus* no Mediterrâneo espanhol (ELANDALOUSSI et al., 2009). Em ostras, foi registrada em *Crassostrea hongkongensis* Lam e Morton, 2003 e em *C. ariakensis* no Sul da China (MOSS et al., 2007).

Os trofozoítos de *P. olsenii* apresentam diâmetro de 13-16 µm, sendo grande parte de sua parede, parasitária. Seu vacúolo é fracamente eosinofílico e seu zoosporângio apresenta proeminente tubo de descarga (LESTER; DAVIS, 1981).

### **3.2.2.3. *Perkinsus qugwadi***

*Perkinsus qugwadi* foi registrada infectando a vieira japonesa *Patinopecten yessoensis* no Canadá, sendo inicialmente chamada de SPX (*Scallopprotistan X*) (BLACKBOURN et al., 1998). A validade desta espécie dentro do gênero *Perkinsus* tem sido questionada e muito discutida, visto que não é possível detectá-la através do método de cultivo Meio Fluido de Tioglicolato de Ray (RFTM), com coloração em iodo (lugol) (OIE, 2011) e também via região ITS (espaçador interno transcrito) do DNA comum entre as outras espécies (CASAS et al., 2002).

Este parasito pode ser detectado através de análise macroscópica, histologia, coloração de Giemsa, microscopia eletrônica e *primer* específico para a espécie; macroscopicamente, os animais infectados apresentam pústulas de até 5 mm de cor branca; na técnica histológica podem ser visualizados trofozoítos de até 10 µm; esfregaços com tecidos de ostras secos ao ar ambiente e corados com Giemsa, também auxiliam na visualização deste protozoário (BLACKBOURN et al., 1998).

A inviabilidade de detecção através do RFTM e do *primer* para o gênero, levou alguns autores a acreditarem que esta espécie apresenta esta peculiaridade pelo fato de ser encontrada, até então, somente na região de British Columbia, no Canadá, e que o seu

isolamento a tenha tornado geneticamente diferente das demais espécies conhecidas (BOWER, 2003; FERNÁNDEZ; PÉREZ, 2008).

### 3.2.2.5. Demais espécies

- *Perkinsus chesapeaki*

Só existem registros de *P. chesapeaki* em *Mya arenaria* (MCLAUGHLIN et al., 2000) e em *C. virginica* nos Estados Unidos (IFREMER, 2009).

- *Perkinsus mediterraneus*

Observada apenas na ostra *Ostrea edulis* na Espanha (VILLALBA et al., 2004).

- *Perkinsus honshuensis*

Encontrada no Japão infectando *Ruditapes philippinarum* (DUNGAN; REECE, 2006) e foi recentemente observada nesta mesma espécie em animais juvenis coexistindo com *P. olseni* em diferentes órgãos do animal (SHIMOKAWA et al., 2010).

- *Perkinsus beihaiensis*

Tem sido considerada a espécie mais nova do gênero e foi registrada por Moss et al. (2008) nas ostras *Crassostrea hongkongensis* e *C. ariakensis* no Sul da China, nas províncias de Fujian e Guangxi. Recentemente, foi registrada no Brasil no Estado do Ceará na região de Fortaleza na ostra *C. rhizophorae* por Sabry et al. (2013) e no berbigão *Anomalocardia brasiliiana* (FERREIRA, 2013).

### 3.2.3. Registros de *Perkinsus* na América do Sul e no Brasil

A primeira observação de *Perkinsus* para a América do Sul foi realizada por Cremonte et al. (2005) no Uruguai no venerídeo *Pitar rostrata*. Análises moleculares realizadas pelos autores indicaram tratar-se de *P. olseni*.



O primeiro registro de *Perkinsus* no Brasil ocorreu no Estado do Ceará em estudo realizado por Sabry et al. (2009) no Rio Pacoti em Fortaleza com populações naturais da ostra *C. rhizophorae*. As prevalências encontradas foram baixas (5,78%). Nesse estudo também foi constatada a ausência do protozoário nesta mesma espécie no Estado de Santa Catarina. Não foi observada mortalidade relacionada à ocorrência do protozoário. Sabry et al. (2013) identificaram, via técnica molecular, o referido protozoário, tratando-se de *P. beihaiensis*, que até então só era encontrado no Litoral Sul da China (MOSS et al., 2008).

No Estado de Sergipe, *Perkinsus* sp. foi encontrado em alta prevalência e em baixa intensidade na ostra *C. brasiliiana* infectando animais de estoques naturais e cultivados (MENDONÇA et al., 2010).

No Litoral Sul da Bahia, em um estudo realizado em dois pontos do Rio Maraú, Baía de Camamu e em um ponto do estuário do Rio Graciosa (Taperoá), Brandão et al. (2013) observaram *Perkinsus* sp. em prevalência média de 63% considerando o inverno e o verão. Apesar da alta intensidade e prevalência, os autores relataram resposta hemocitária eficiente das ostras ao patógeno e inferiram não ter havido mortalidade de ostras associadas à infecção.

Recentemente, na costa brasileira foi registrada a presença de *P. marinus* em populações naturais de *C. rhizophorae*, sendo também considerado o primeiro registro para a América do Sul (da SILVA et al., 2013). As prevalências foram acima de 80%, mas não houve menção de ocorrência de mortalidades ou resposta de defesa do hospedeiro. Também no mesmo Estado, foi realizado um estudo sobre resposta imunológica com a ostra *Crassostrea gasar* (*Crassostrea brasiliiana*), que comprovou que a infecção de *Perkinsus* sp. nesta espécie é deletéria e torna o hospedeiro mais suscetível a outros patógenos e doenças (QUEIROGA et al., 2013).

*Perkinsus* também foi registrado no berbigão *Anomalocardia brasiliiana* em dois estuários no Estado do Ceará, em animais de populações naturais (FERREIRA, 2013).

### 3.2.4. Transmissão e ciclo de vida

#### 3.2.4.1. Transmissão

A transmissão de *Perkinsus* spp. é direta e sem hospedeiros intermediários e envolve duas fases, a de vida livre e a parasitária. Estudos em ostras indicam que a transmissão ocorre de forma horizontal de duas maneiras: proximidade e alimentação (LAUCKNER, 1983; PARK et al., 2010). A proximidade é o método mais frequente e foi comprovada através de experimentos de Lauckner (1983), no qual ostras saudáveis e ostras doentes foram colocadas juntas, resultando em 95% de infecção e mortalidade de 50% nas ostras ora saudáveis. Neste mesmo estudo, o autor depositou fragmentos de ostras infectadas e como resultado obteve 87% das ostras de seu experimento contaminadas, supondo que esses fragmentos, contendo o patógeno, foram incorporados como alimento pelas ostras, via filtração.

Segundo Park et al. (2010), em estudo realizado na Coreia com *R. philippinarum*, foi possível isolar e identificar *P. olseni* através das fezes dos animais, comprovando que essa também é outra maneira de transmissão do protozoário.

#### 3.2.4.2. Ciclo de Vida

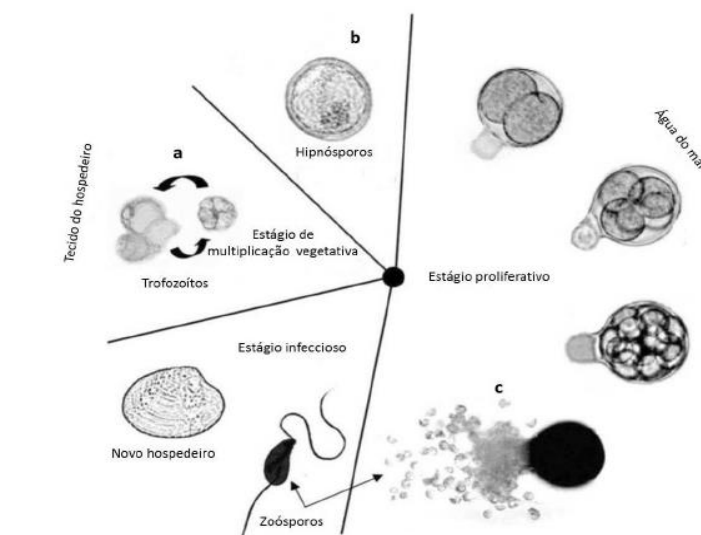
Todo o ciclo de vida de *Perkinsus* é infeccioso e caracterizado por três fases: **trofozoíto**, **hipnósporo** e **zoósporo** (RAY, 1954; CHU, 1996; BLACKBOURN et al., 1998; CASAS et al., 2002; VILLALBA et al., 2004; CHOI; PARK, 2010).

O **trofozoíto** é uma célula esférica com um vacúolo ocupando grande parte do volume celular, ocorrendo, geralmente, no tecido conjuntivo e epitelial do hospedeiro (**Figura 01a**). Após o seu amadurecimento, estas células entram em sucessivas divisões por bipartição, alterando entre cariocinese e citocinese para formar 4 a 64 células, que ficam envoltas por uma parede. Esse estágio é também chamado de **roseta**, **esporângio** ou **esquizonte**. Com o rompimento da parede, ocorre a liberação dos trofozoítos imaturos (aplanósporos), que medem de 2 a 4  $\mu\text{m}$ , que posteriormente terão o seu vacúolo ocupado, assim como na célula progenitora, dando início novamente a esta fase do ciclo (LAUCKNER, 1983; PERKINS, 1996; CASAS et al., 2002; CHOI; PARK, 2010). A proliferação dos trofozoítos parece estar associada a temperaturas maiores que 20°C e

ocorre sempre no tecido do hospedeiro vivo (BOWER et al., 1994; La PEYRE et al., 2010).

A fase de **hipnósporo** pode ser observada quando tecidos contendo trofozoítos são incubados em Meio Fluido de Tioglicolato de Ray (RFTM) (RAY, 1952). Nessa fase, o parasito apresenta-se com formato esférico, com paredes muito espessas e tem seu tamanho aumentado (30-60  $\mu\text{m}$ ) devido ao meio de cultura enriquecido com antibióticos (Penicilina e Streptomicina) (**Figura 01b**). Após o cultivo, é possível visualizar os hipnósporos mediante coloração com lugol (iodo), que confere aos mesmos a cor castanho-azulada (CASAS et al., 2002; OIE, 2011).

Em meio experimental ou em ambiente natural, quando os hipnósporos são transferidos para água salina com temperatura adequada, inicia-se a esporulação. Nessa fase ocorrem sucessivas divisões, formando vários **zoósporos** envolvidos pela parede celular. Como resultado das inúmeras cariocineses e citocineses, ocorre a liberação dos zoósporos através de uma estrutura chamada de tubo de descarga (**Figura 01c**). Os zoósporos, que são biflagelados e possuem forma elipsoidal, são liberados, iniciando novamente o ciclo do protozoário (CASAS et al., 2002, 2004; CHOI; PARK, 2010).



**Figura 01.** Ciclo de vida de *Perkinsus olseni* no bivalve *Ruditapes philippinarum*. A = Trofozoítos em divisão no tecido do hospedeiro, fase visualizada em seção histológica. B = Hipnósporos observados em Meio Fluido de Tioglicolato de Ray (RFTM), quando tecidos contendo trofozoítos são incubados nesse meio. C = Divisão celular de hipnósporos em meio salino, com formação de tubo de descarga e liberação de zoósporos. Fonte: Adaptado de Choi e Park (2010).

### 3.2.4.3. Sintomas da Perkinsiose

Na ostra americana *Crassostrea virginica* infectada por *P. marinus*, os sinais clínicos da Perkinsiose foram: grave emagrecimento, abertura das valvas, aparência pálida da glândula digestiva, encolhimento considerável dos tecidos moles, músculo adutor emacorado, encolhimento do manto e inibição no desenvolvimento das gônadas, com conseqüente redução da capacidade reprodutiva do indivíduo. Com estas implicações, a mortalidade ocorre quase sempre em 100% dos animais infectados (MARTINEZ; YEOMANS, 2001; VILLALBA, 2004; CHOI; PARK, 2010).

O acúmulo de *P. marinus* resulta na liberação do patógeno para o lúmen do sistema digestivo. As células também podem ser observadas dentro e/ou entre as células do hospedeiro (VILLALBA et al., 2005; MOSS et al., 2008; BRANDÃO et al., 2013; da SILVA et al., 2013; SABRY et al., 2013). Uma vez no tecido conjuntivo, o patógeno pode ser distribuído pela hemolinfa para todas as partes do corpo do animal (LAUCKNER, 1983).

As regiões anatômicas mais suscetíveis à infecção são: glândula digestiva, manto e brânquias. Após a invasão do parasito, a resposta inicial do hospedeiro consiste em uma tentativa de encapsulamento por várias camadas de hemócitos, mas pelo aumento do número de células do *Perkinsus*, essa cápsula desaparece, causando a liberação dos parasitos (MOSS et al., 2008; BRANDÃO et al., 2013; QUEIROGA et al., 2013).

Curiosamente, tecidos de ostras infectados por *P. marinus* apresentaram grande aumento no número e tamanho das “brown cells” (células marrons), cuja função parece estar relacionada com o sistema de defesa do organismo (MACKIN et al., 1950; LAUCKNER, 1983). Alguns autores atribuíram o aumento no número das células marrons em *C. virginica* infectada por *P. marinus* a mudanças no metabolismo de gordura causado pelo parasito (MACKIN, 1951; STEIN; MACKIN, 1955).

Em ostras e outros bivalves, a prevalência de *P. marinus* varia de acordo com a idade dos animais. Indivíduos adultos são mais suscetíveis a infecção imediatamente após a desova, pois há um grande investimento energético do organismo. Para indivíduos no primeiro ano de vida, as taxas são mais baixas (LAUCKNER, 1983; La PEYRE et al., 2010; CASAS; VILLALBA, 2012). Acredita-se que isto esteja intimamente relacionado

à taxa de filtração realizada pelos animais, que proporcionalmente aumenta com o seu crescimento (RAY, 1954).

Em infecções mais avançadas causadas por *P. olseni*, foram observadas pústulas nas brânquias de *Ruditapes decussatus* e *R. philippinarum* (AZEVEDO, 1989). Em estudos realizados na Coreia, Choi e Park (2005), observaram o retardamento das gônadas de *R. philippinarum* e infiltração hemocitária em torno de áreas infectadas. Nos gastrópodes *Haliotis rubra* e *H. laevigata*, as pústulas podem chegar a mais de 8 mm de diâmetro, ocorrendo no pé e no manto, causando destruição no tecido conjuntivo e do tecido epitelial do tubo digestório (BOWER et al., 1994).

#### **3.2.4.4. Influência dos fatores abióticos na patogenicidade de *Perkinsus***

Em estudos realizado com *P. marinus*, foi observado que fatores abióticos determinam a distribuição e o comportamento do protozoário (FISHER et al., 1992; CHU et al., 1993; RAGONE; BURRESON, 1993; CHOI; PARK, 2010).

A temperatura é um fator importante para a proliferação do protozoário, que ocorre facilmente acima de 20°C. No Hemisfério Norte foi observado que a incidência e a intensidade da infecção aumentam quase linearmente com esse fator, sendo relatadas mortalidades mais altas durante os meses mais quentes e declínio no início de meses mais frios, o que foi atribuído à redução do metabolismo dos bivalves (CHOI; PARK, 2010; La PEYRE et al., 2010; DANG et al., 2012). Portanto, a ocorrência desse parasito em águas tropicais e subtropicais sugere que a temperatura pode ser um fator limitante para a existência de *Perkinsus* spp. em algumas faixas geográficas (LAUCKNER, 1983; BOWER, 2003).

Segundo relatos de Ray (1954) e Dang et al. (2012), *P. marinus* requer salinidades entre 12 e 15‰ para o seu desenvolvimento proliferativo. Salinidades inferiores a esses valores ou excessivamente altas inibem a atividade do patógeno, mas não erradicam o parasito das ostras.

### 3.3. Registros de outros parasitos em moluscos na Bahia

O primeiro registro de parasitismo na Bahia foi realizado por Nascimento et al. (1986) em *C. rhizophorae* da Baía de Todos os Santos. Nesse estudo, foram evidenciados os protozoários *Nematopsis* sp., *Sphenophrya* sp. e *Ancistrocoma* sp., assim como os metazoários *Bucephalus* sp. (Digenea), *Tylocephalum* sp. (Cestoda), além de um metazoário não identificado. Pinto e Boehs (2008) registraram *Nematopsis* sp. em *Mytella guyanensis* do Rio Cachoeira em Ilhéus, sul da Bahia. Boehs et al. (2009) registraram xenomas, causados por *Sphenophrya* sp. em baixa prevalência e intensidade em *C. rhizophorae* da Baía de Camamu (BA), sem causar danos generalizados ao seu hospedeiro.

Ainda na região estuarina do Rio Cachoeira (Ilhéus, BA), um estudo de três bivalves de interesse econômico (*Anomalocardia brasiliana*, *Iphigenia brasiliana* e *M. guyanensis*) evidenciou bactérias do tipo RLOs (organismos assemelhados a *Rickettsiae*), *Nematopsis* sp., trematódeos digenéticos não identificados e o cestóide *Tylocephalum* sp. (BOEHS et al., 2010). A presença de RLOs, *Nematopsis* sp. e alguns platelmintos (um turbelário não identificado, *Bucephalus* sp. e *Tylocephalum*) foram observados por Ceuta e Boehs (2012) em *M. guyanensis* da Baía de Camamu, sendo que somente *Nematopsis* sp. causou alterações nos palpos labiais de animais com alta infecção. Parasitos também foram registrados em *M. guyanensis* e *C. rhizophorae* em três pontos do Litoral Sul da Bahia (Camamu, Canavieiras e Valença) por Zeidan et al. (2012). Esse estudo foi também realizado com *Lucina pectinata*, mas não foram observados parasitos neste bivalve. Os autores observaram colônias de RLOs, *Sphenophrya* sp., *Nematopsis* sp., *Urastoma* sp., *Bucephalus* sp. e *Tylocephalum* sp.

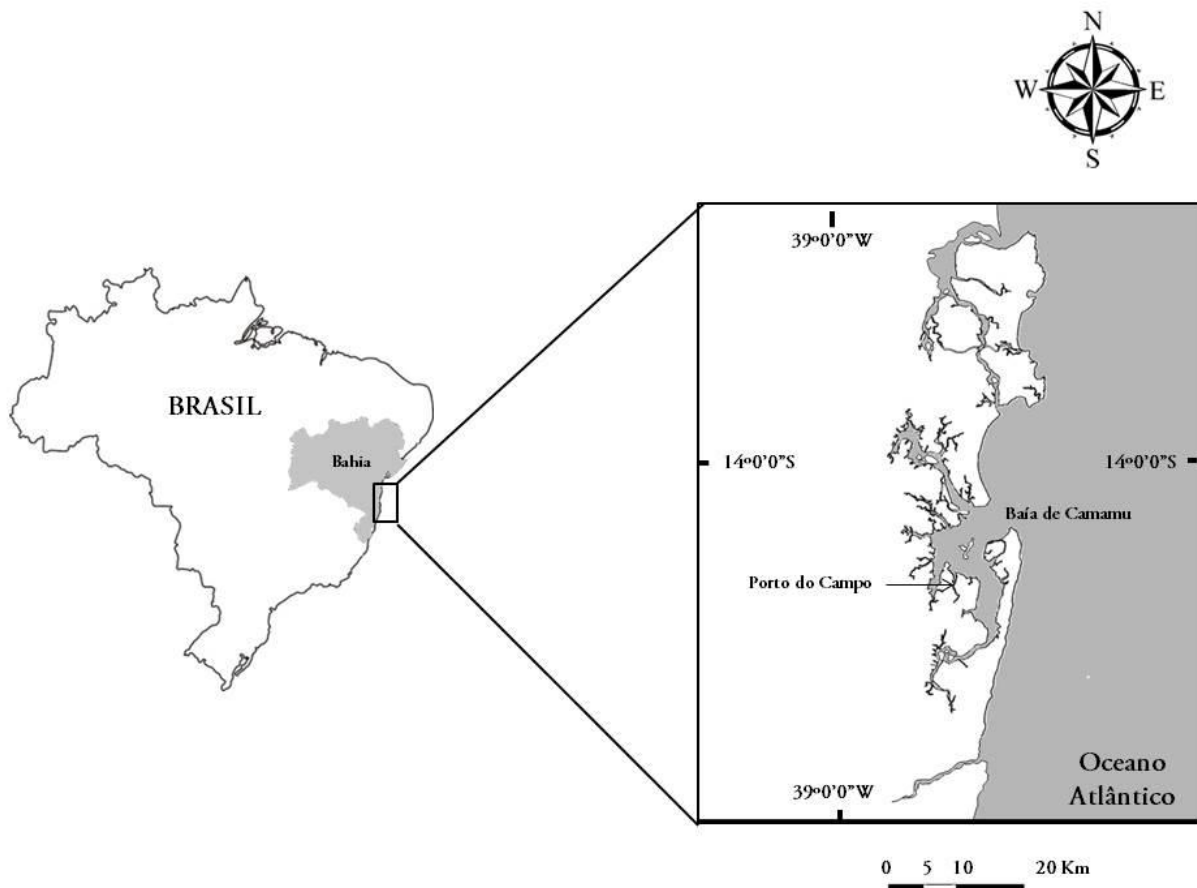
Em uma avaliação da saúde de *C. rhizophorae* de populações naturais, em três pontos da Baía de Camamu, realizado no verão e no inverno de 2010, foram também constatados RLOs, *Ancistrocoma* sp., *Sphenophrya* sp., *Trichodina* sp., *Nematopsis* sp. e metazoários (*Urastoma* sp., turbelário não identificado, *Bucephalus* sp., uma metacercária não identificada e *Tylocephalum* sp.), sem causar danos a este hospedeiro (BRANDÃO et al., 2013b).

Parasitos também foram encontrados na ostra *C. rhizophorae* da região do estuário do Rio Graciosa em Taperoá (BA), um pouco ao norte da Baía de Camamu, por Cova

(2013). Os parasitos observados foram: RLOs, *Nematopsis* sp., *Ancistrocoma* sp., *Urastoma* sp., *Tylocephalum* sp. e um platelminto não identificado.

### 3.4. Área de estudo

O Estado da Bahia possui, aproximadamente, 1.100 km de faixa litorânea, a maior dentre os estados brasileiros. Por possuir grande extensão, a diversidade biológica é alta e são encontradas amplas áreas de manguezais, baías e nascentes de muitos rios. A Baía de Camamu está inserida no Litoral Sul, entre as coordenadas 13°40,2'S; 38°55,8'W e 14°12,6'S; 39°09,6'W; possui 384 km<sup>2</sup> de área estuarina, sendo 44% de manguezais e no entorno ocorrem remanescentes de Mata Atlântica; a profundidade média é de 5 metros e a área inundável é de 383,67 km<sup>2</sup> (AMORIM, 2005; LENZ, 2008) (**Figura 02**).



**Figura 02.** Mapa da área de estudo, com a indicação do ponto de coleta (Porto do Campo) da ostras *Crassostrea rhizophorae* de cultivo e estoque natural na Baía de Camamu (Bahia).

O clima desta região é quente e úmido, com temperatura média anual de 25°C, com pluviosidade de 2.400 a 2.500 mm ano (CRA, 1995).

Os rios que desaguam na Baía de Camamu são o Serinhaém, o Igrapiúna, o Sorojó e o Maraú. As combinações entre esses rios permitem a preservação de muitos ecossistemas e grande produção orgânica, que por sua vez possibilita pequenos empreendimentos com peixes, crustáceos e moluscos (AMORIM, 2005). As comunidades desta baía vivem da pesca, artesanato e comércio local. Pequenos cultivos de ostras são desenvolvidos por algumas comunidades tradicionais da região.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Coleta e processamento das amostras

A ostra *C. rhizophorae* (**Figura 03**) foi obtida na região de Porto do Campo (Baía de Camamu) (13°57'S; 39°02'W) (**Figuras 02 e 04**) em três coletas, realizadas em outubro e novembro de 2012 e em janeiro de 2013. Em cada coleta foram obtidas 100 ostras medindo de 5-7 cm de altura, sendo 50 de um cultivo em sistema espínhel (= *long line*) existente no local e 50 coletadas nas raízes do mangue vermelho *R. mangle*, no entorno do cultivo, totalizando 300 animais (**Figura 04**).

Dados de temperatura e salinidade da água do local foram medidas com o uso de um termômetro de mercúrio padrão e de um refratômetro óptico manual da marca Atago S/Mill por ocasião das coletas e a cada três dias durante o período.

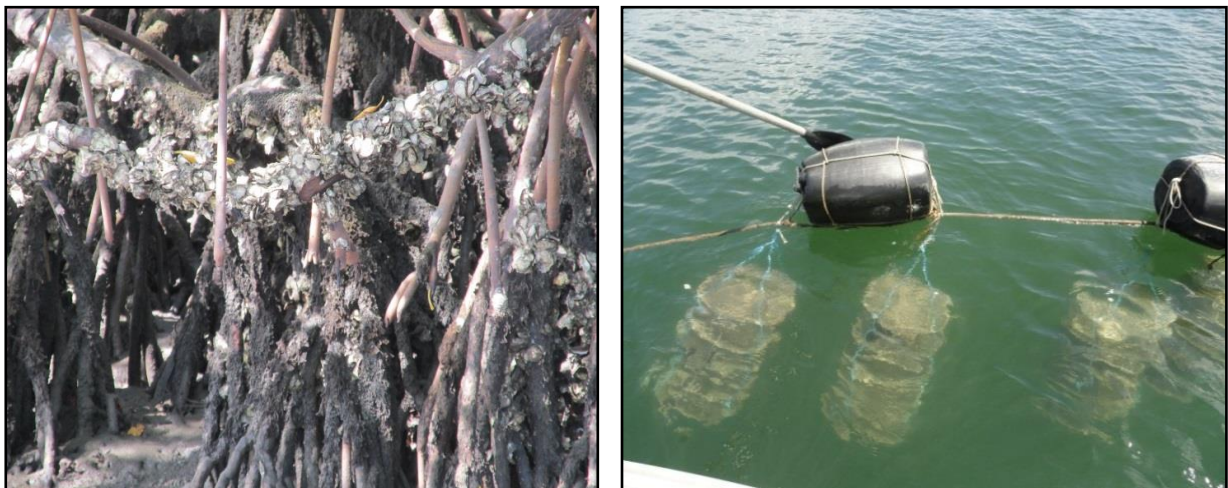
Os dados de chuvas do período foram obtidos a partir dos registros da Estação Meteorológica da Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira (CEPLAC) de Ituberá (BA). Os parâmetros mencionados foram acompanhados com a finalidade de relacioná-los com as prevalências e as intensidades de infecção tanto para *Perkinsus* quanto para os demais parasitos.

As ostras foram transportadas em baldes contendo água salina do ambiente para o Laboratório de Histologia Animal da Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC). Foram lavadas em água corrente e com o auxílio de uma pequena pá de metal, foram retirados resquícios do manguezal e incrustações presentes nas valvas. A medição do eixo dorso-ventral (altura) (GALTSOFF, 1964) foi feita com auxílio de um paquímetro digital.





**Figura 03.** Valvas de *Crassostrea rhizophorae* da região de Porto do Campo (Baía de Camamu, Bahia), sendo: à esquerda: valva direita, vista externa e à direita, valva esquerda, vista interna. Barra = 2cm.



**Figura 04.** *Crassostrea rhizophorae*, à esquerda fixada nas raízes do mangue e à direita nas lanternas de sistema de cultivo do tipo espinhel, em Porto do Campo, Baía de Camamu (Bahia).

#### 4.2. Análises macroscópicas e histologia

Todas as ostras ( $n = 300$ ) foram abertas e analisadas macroscopicamente quanto à presença e sinais clínicos de *Perkinsus* (emagrecimento do animal, aspecto pálido e presença de pústulas), assim como de outros parasitos (emaciamento, alterações de coloração e textura, etc.). Em seguida, uma secção longitudinal de, aproximadamente, 5 mm foi feita com auxílio de um bisturi, sendo fixada em solução de Davidson (SHAW; BATTLE, 1957) por 24-30 horas. Em seguida os tecidos foram lavados em água corrente, passados para etanol a 70%, e desidratados em série alcoólica crescente,

diafanizados em xilol e incluídos em parafina com cera de abelha a 60°C. Cortes de tecidos de 7µm de espessura foram obtidos por microtomia e posteriormente corados por hematoxilina de Harris e eosina (HE). As lâminas foram analisadas em microscopia de luz. A prevalência de cada parasito foi calculada como o número de ostras infectadas/número total de ostras coletadas (BUSH et al., 1997). O tamanho de cada parasito foi obtido com o auxílio de ocular com escala graduada da Olympus CX 35 acoplada.

#### **4.2.1. Estereologia**

Para calcular a intensidade de infecção dos parasitos, foi utilizada a gráticula de Weibel acoplada a ocular do microscópio óptico, seguindo a metodologia proposta por Lowe et al. (1994). A estereologia consiste na observação da área ocupada pelo(s) parasito(s), também chamado de Tecido Parasitado (TP), no qual são avaliados cinco campos do tecido do animal, com cálculo posterior da média. A análise do resultado foi realizada de acordo com a classificação de Lowe et al. (1994):

- I – Infestação leve = < 5% de TP;
- II – Infestação moderada = 5-25% de TP;
- III – Alta = 25-50% de TP;
- IV – muito alta = > 50% de TP.

Para ostras com parasitos em grau muito baixo de infecção foram realizadas contagens visuais e quantificados como número de parasitos/corte histológico.

#### **4.3. Diagnóstico de *Perkinsus* através de RFTM**

Duas lamelas branquiais e o reto de cada ostra (n = 300) foram incubados em Meio Fluido de Tioglicolato de Ray (RFTM), enriquecido com antibióticos (Penicilina e Estreptomicina) e antifúngico (Nistatina) para inibir o crescimento de microrganismos, garantindo a pureza do meio (OIE, 2011a). O meio foi incubado por sete dias abrigado da luz, em temperatura ambiente (20-25°C). Após esse período os tubos foram abertos e retirou-se os fragmentos dos tecidos da ostra, os quais foram macerados e posteriormente

corados em solução de iodo a 3% para visualização, em microscopia de luz, da ausência ou presença de hipnósporos de *Perkinsus*, seguindo protocolo da OIE (2011a).

A prevalência foi calculada como o número de ostras infectadas/número total de amostras (MARGOLIS et al., 1982).

A intensidade de infecção foi calculada de acordo com a escala desenvolvida por Ray (1954) e modificada por Sabry et al. (2009):

- Infecção nula: ausência de hipnósporos em toda a lâmina (100 x);
- Infecção muito leve: até 10 hipnósporos em toda a lâmina (100 x);
- Infecção leve: 11-100 hipnósporos em toda a lâmina (100 x);
- Infecção moderada: pelo menos 40 hipnósporos observados em 10 campos diferentes (400 x);
- Infecção severa: mais de 40 hipnósporos observados em 10 campos diferentes (400 x).

#### **4.4. Zoosporulação de *Perkinsus* spp.**

Para a observação de *Perkinsus* spp. na fase de vida de zoosporulação, foi realizada uma coleta adicional no mês de dezembro de 2013 de 15 ostras do manguezal e 15 do cultivo. As brânquias e reto das ostras foram incubados em RFTM por dois dias (período no qual é possível visualizar divisões de trofozoítos, hipnósporos e formação de zoosporângios contendo zoósporos) em temperatura ambiente e ausência de luz. Após esse período, os tubos foram abertos e analisados em microscópio de luz sem coloração, pois o iodo evidencia somente hipnósporos, impedindo a observação de outras fases de vida.

Quando era constatada a presença de divisões nas diferentes fases de vida, o líquido sobre a lâmina era transferido para 5 ml de água salina em placa de Petri em temperatura ambiente e observado em intervalos de 1 hora. As observações terminavam quando não eram mais constatadas divisões ou sinais de vida no protozoário. Os tubos em que não eram observados *Perkinsus* spp. no segundo dia, eram incubados novamente e observados nos dias seguintes até o sétimo dia de incubação. Após as análises, todo o

meio de cultura, resto de tecidos e material esporulado, foram autoclavados e logo após descartados.

#### **4.5. Diagnóstico de *Perkinsus* spp. por PCR**

As técnicas descritas são consideradas pela OIE (2011b) como presuntivas, e recomenda para a confirmação do protozoário no gênero *Perkinsus* e, também, para a sua identificação em nível de espécie, a realização de técnicas moleculares. Com base nisso, 23 animais positivos (um animal de cada nível de cada ambiente e coleta) e seis animais negativos (nível nulo de cada ambiente e coleta) para a técnica de RFTM foram submetidos à Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Para a realização da PCR, foram utilizadas secções da glândula digestiva e das brânquias, que foram conservadas em etanol a 95%.

Uma subamostra de 25-50 mg de tecido foi retirada e pesada em balança de precisão, transferida para tubo Eppendorf, ao qual foi adicionado 1mL de DNazol (*Invitrogen*®) para a extração do DNA total. O tecido foi macerado por cinco vezes com o auxílio de bastão de vidro e depois deixado em repouso por 10 minutos para que o reagente tivesse sua ação potencializada. Após esse tempo, o tubo foi levado a um agitador de tubos (homogeneizador) do tipo vortex por 1 minuto, aproximadamente, deixado em repouso por mais 10 minutos e depois centrifugado a 10.000 x g por 10 minutos a 4°C. Ao término da centrifugação, o sobrenadante foi transferido para outro tubo e iniciada a precipitação do DNA. Foram adicionados 0,5 ml de etanol 100% no tubo e o mesmo foi invertido por cerca de seis vezes e logo após incubado em temperatura ambiente por 1-3 minutos. Visto que não há como separar o DNA da ostra e do protozoário, é preciso garantir que a maior quantidade de DNA possível seja extraída e para isso outra centrifugação de 4.000 x g foi realizada por 1-2 minutos a 4°C.

Para purificar o DNA e obter amostras mais puras, após a centrifugação, o etanol 100% foi descartado e adicionado 0,8-1 mL de etanol 75% no *pellet* (precipitado) presente no fundo do tubo e invertido por 3-6 vezes e deixado em repouso de 30 segundos a 1 minuto e novamente centrifugado por 10 minutos a 4.000 x g. Com o término deste tempo, o sobrenadante era descartado com auxílio de pipeta de 200 µl e

novamente adicionado etanol 75% e centrifugado por 10.000 x g, sendo este passo repetido por mais 2-3 vezes.

Após a lavagem do material genético, o álcool foi descartado e os tubos permaneceram abertos até que o líquido presente houvesse secado. Concluindo a extração, foi adicionado 80 µl de água ultra pura e levado ao vortex.

Para as reações da PCR, foi utilizado o par de *primers* PerKITS – 85F (5'CCGCTTTGTTTGGATCCC) PerKITS–750R (5'ACATCAGGCCTTCTAATGATG 3') (CASAS et al., 2002), que alenelam especificamente em regiões conservadas dos espaçadores internos transcritos (ITS1 e 2) e a região 5.8S do complexo de genes do ácido ribonucléico ribossômico (rRNA), exclusivos para os membros do gênero *Perkinsus* (exceto para *P. qugwadi*). As reações da PCR foram realizadas em volume de 12,5 µl, contendo 100-200 ng de DNA genômico, tampão de PCR 1x concentrado, MgCl<sub>2</sub> a 1,5 mM, nucleotídeos a 0,2 mM cada, *primers* a 0,8 µM e uma unidade de *Taq* DNA polimerase. O controle positivo utilizado na PCR foi DNA de *Perkinsus beihaiensis* (cedido gentilmente pela Dr. Rachel Sabry e Maximiano P. Dantas Neto). O controle negativo foi utilizado água ultrapura. O protocolo incluiu desnaturação do DNA a 94°C por 10 minutos; 35 ciclos de amplificação a 94°C por 1 minuto, 58°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto, seguido de uma extensão final a 72°C por 10 minutos. Os produtos da PCR foram separados em gel de agarose 1,5-2%, em tampão Tris-ácido acético-EDTA (TAE), corados com Brometo de Etídio e visualizados usando luz UV.

Amostras positivas para a PCR de gênero foram submetidas a sequenciamento pela empresa Ludwig Biotecnologia Ltda. (Porto Alegre, RS), para identificação da (s) espécie(s).

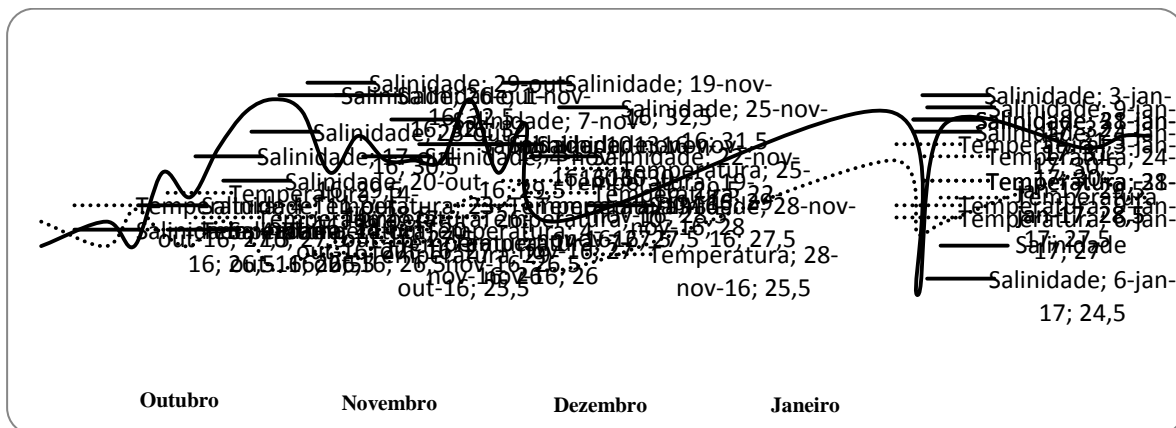
#### **4.6. Análises Estatísticas**

A Análise de Variância (ANOVA) de Fisher foi utilizada para comparar a altura das ostras do manguezal com as do cultivo. O teste Qui-quadrado ( $\chi^2$ ) foi utilizado para comparar as prevalências dos parasitos mais frequentes nas amostras (*Perkinsus* spp. e *Nematopsis* sp.) entre os ambientes (manguezal e cultivo). O nível de significância adotado foi o de 95%.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Dados abióticos

A temperatura da água variou entre 26 e 31°C, sendo que a média do período foi de  $29,9 \pm 2,14^\circ\text{C}$ . A salinidade variou entre 25,5 e 31‰, com média de  $28,4 \pm 1,5\text{‰}$  e foi negativamente influenciada pelas chuvas no mês de janeiro (**Figura 05**). A precipitação pluviométrica foi de 73 mm em outubro, 78,4 mm em novembro e 224,4 mm em janeiro.



**Figura 05.** Dados de temperatura ( $^\circ\text{C}$ ) e salinidade ( $\text{‰}$ ) de Porto do Campo (Baía de Camamu, Bahia) durante o período de coletas (outubro de 2012 a janeiro de 2013) ( $n = 35$ ).

### 5.2. Análises macroscópicas, biometria e sexo

As análises macroscópicas não evidenciaram a presença ou sinais clínicos de parasitos.

As ostras do ambiente do manguezal apresentaram altura média de 5,3 cm ( $\text{DP} \pm 0,7$ ;  $n = 150$ ) e as do cultivo, altura média de 5,7 cm ( $\text{DP} \pm 0,6$ ;  $n = 150$ ), sendo que estas últimas foram significativamente maiores ( $p < 0,05$ ) em relação às primeiras.

A proporção de ostras do manguezal com gônada em estágio feminino em relação a ostras apresentando gônada masculina foi de 3,4: 1 no mês de outubro, 8,8: 1 em novembro e 4,7: 1 em janeiro. No cultivo, a proporção foi de 1:1 em todas as coletas. Houve um caso de hermafroditismo simultâneo no mês de janeiro no manguezal.

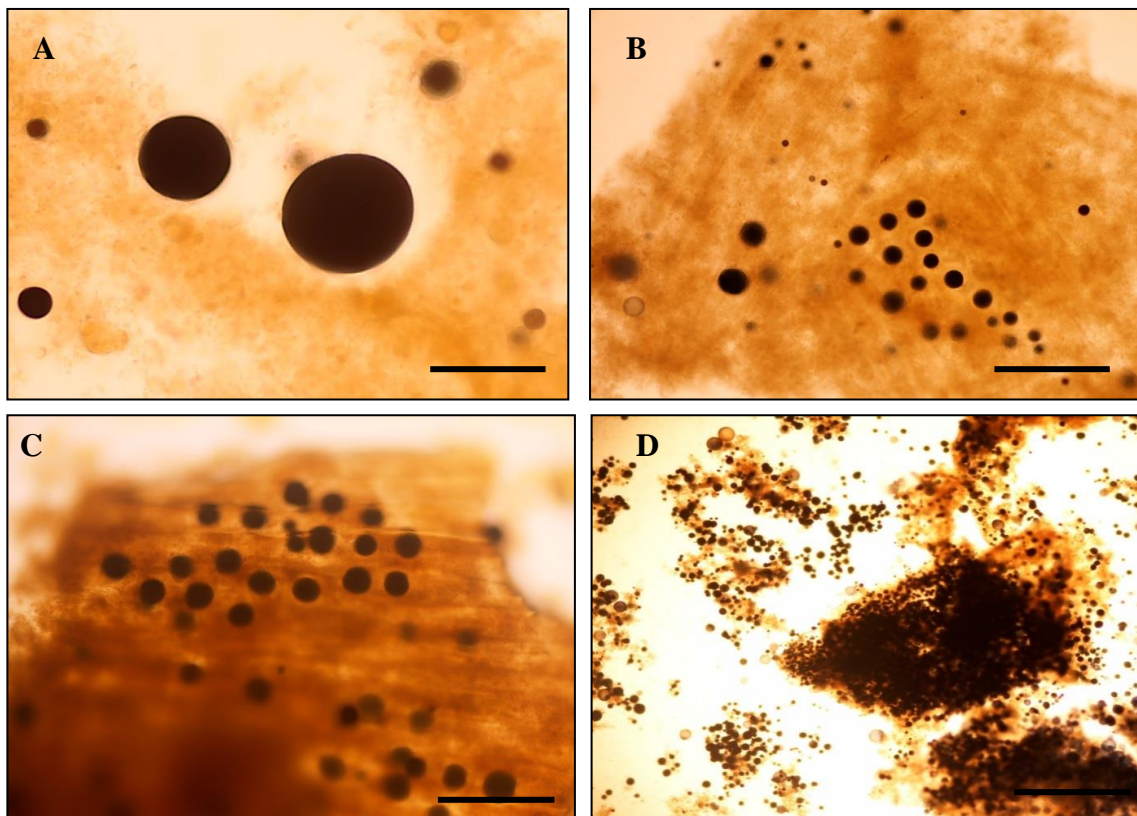
### 5.3. *Perkinsus* spp.

#### 5.3.1. Detecção de *Perkinsus* spp. em Meio Fluido de Tioglicolato de Ray (RFTM)

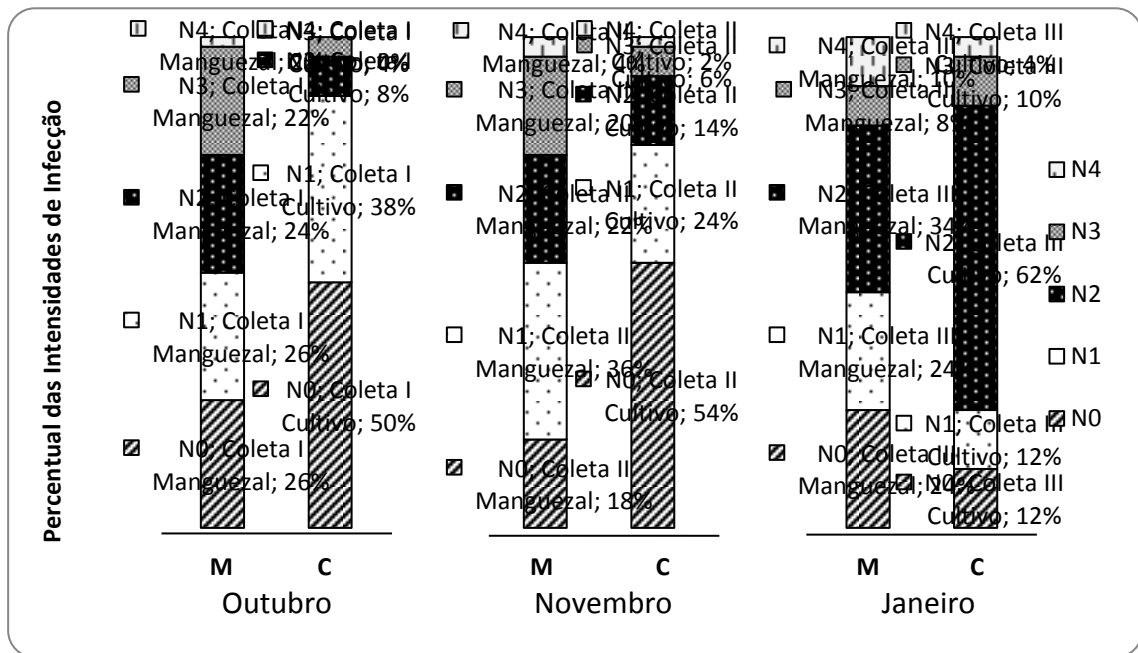
Os tecidos (reto e brânquias) das ostras incubadas no RFTM evidenciaram a presença de *Perkinsus* spp. na fase de hipnósporo. As células apresentaram parede espessa, com forma esférica, medindo entre 5 e 75  $\mu\text{m}$  de diâmetro. Quando coradas com lugol, os hipnósporos adquiriram coloração preto-azulada, variando de acordo a penetração do corante na célula (**Figura 06**).

Considerando o total de animais analisados ( $n = 300$ ), a prevalência média de *Perkinsus* evidenciada por RFTM foi de 69%. Apesar de terem sido verificadas altas prevalências nas ostras do manguezal das coletas de outubro e novembro (74% e 82%, respectivamente), a prevalência mais alta ocorreu em janeiro de 2013 no cultivo (88%) (**Tabela 01**).

Quanto à intensidade de infecção, todos os níveis foram observados, porém, os mais frequentes foram o nível I (infecção muito leve) e o nível II (infecção leve) no manguezal e o nível 0 e nível II (infecção nula) no cultivo (**Figura 07**).



**Figura 06.** Hipnósporos de *Perkinsus* spp. nos tecidos de *Crassostrea rhizophorae* de Porto do Campo (Baía de Camamu, Bahia) após incubação em Meio Fluido de Tioglicolato de Ray (RFTM) e maceração e coloração com lugol, sendo: (A) infecção muito leve, (B) infecção leve, (C) infecção moderada, (D) infecção intensa. Barras = 25  $\mu\text{m}$ .



**Figura 07.** Níveis de intensidade de infecção de *Perkinsus* spp. em *Crassostrea rhizophorae* do manguezal (M) e de cultivo (C) de Porto do Campo (Baía de Camamu, Bahia) de outubro e novembro de 2012 e janeiro de 2013 (n = 300).

### 5.3.2. Histologia

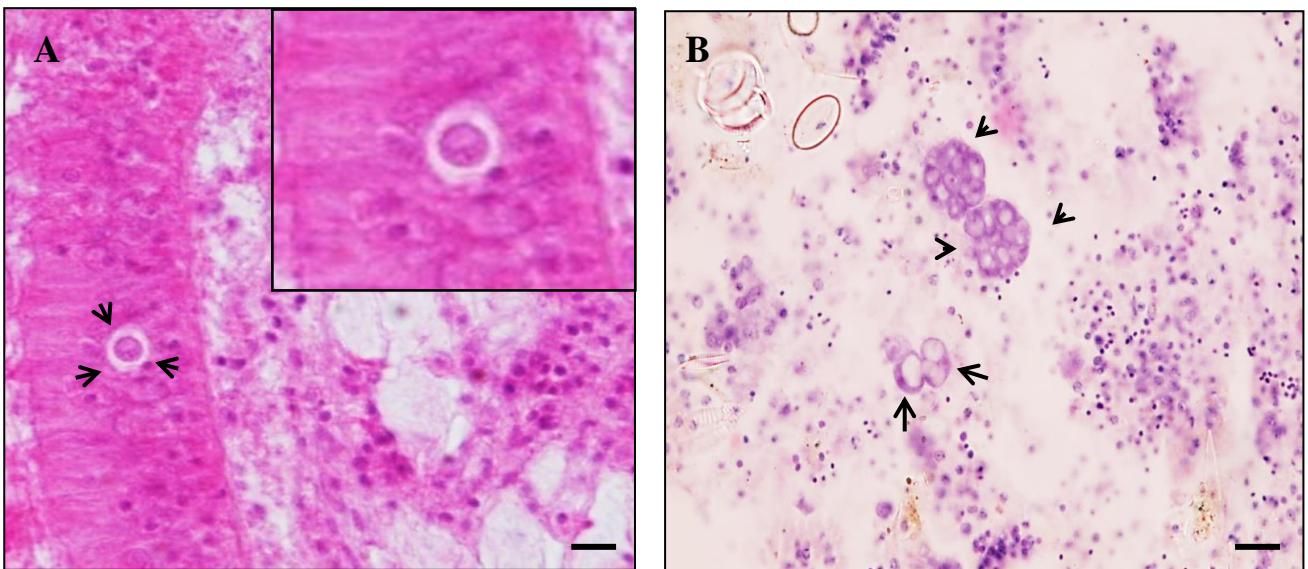
Trofozoítos e rosetas (trofozoítos em divisão) de *Perkinsus* spp. foram visualizados nos tecidos da ostra em todos os meses e em ambos os ambientes, com prevalência média de 93,3%. Prevalências de até 100% ocorreram no cultivo no mês de outubro e no manguezal no mês de novembro (**Tabelas 01 e 02**). Não houve diferença estatística ( $p = 0,16$ ;  $n = 300$ ) na prevalência desse patógeno entre as ostras do manguezal e do cultivo.

**Tabela 01.** Prevalência de *Perkinsus* spp. em *Crassostrea rhizophorae* de Porto do Campo, Baía de Camamu (Bahia) evidenciada através do uso das técnicas de Meio Fluido de Tioglicolato de Ray (RFTM) e Histologia em ambiente de manguezal (n = 150) e cultivo (n = 150) nos meses de outubro e novembro de 2012 e janeiro de 2013

	Manguezal		Cultivo	
	RFTM	Histologia	RFTM	Histologia
Outubro 2012	74%	92%	50%	100%
Novembro 2012	82%	100%	46%	86%
Janeiro 2013	76%	94%	88%	88%



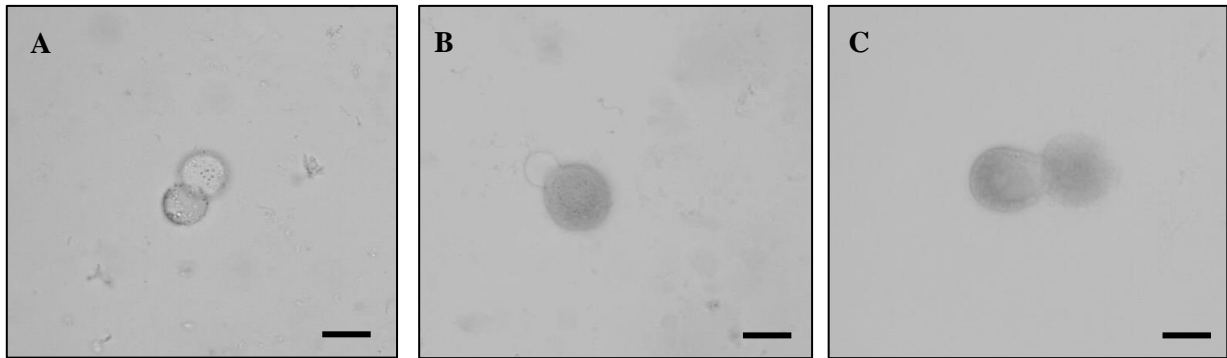
Os trofozoítos apresentaram formato arredondado, vacúolo ocupando grande parte do volume celular, núcleo na região periférica e nucléolo proeminente (**Figura 08**). Foram registrados no epitélio da glândula digestiva, no manto e nas paredes do estômago e do intestino e mediram entre 3 e 10  $\mu\text{m}$  (média:  $6,8 \pm 2,2 \mu\text{m}$ ;  $n = 30$ ). A presença mais conspícua do parasito ocorreu no epitélio estomacal. A fagocitose hemocitária do parasito e infiltração hemocitária nos locais com maior número de parasitos foram eventos frequentemente observados (**Figura 08**).



**Figura 08.** Trofozoítos de *Perkinsus* spp. em *Crassostrea rhizophorae* de Porto do campo ( Baía de Camamu, Bahia). **A.** No epitélio da glândula digestiva. Barra= 10  $\mu\text{m}$ . **B.** Trofozoíto com vacúolo ocupando grande parte do volume celular e núcleo periférico e trofozoítos em divisão (cabeça de seta) no tecido conjuntivo da glândula digestiva. Barra=10  $\mu\text{m}$ .

#### 5.4.3. Zoosporulação de *Perkinsus* spp.

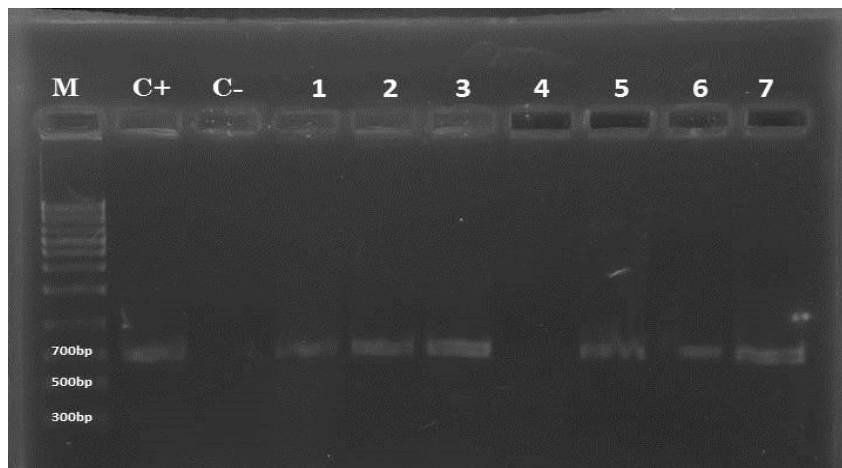
Após a incubação em RFTM por dois dias, 27 amostras ( $n = 30$ ) apresentaram pré-hipnósporos, zoosporângios contendo zoósporos móveis e formação de tubo de descarga (**Figura 09**). Em todos os casos foi observado apenas um tubo de descarga em cada zoosporângio. Nestas mesmas amostras foram observadas fases de vida até o quarto dia de incubação. As amostras nos quais não foram visualizadas divisões no segundo dia, apresentaram fases de vida a partir do terceiro dia de incubação. Após a transferência para a água do mar em temperatura ambiente, o protozoário resistiu por mais 14-20 horas.



**Figura 09.** Zoosporulação de *Perkinsus* spp. em água salina, com formação de (A) pré-hipnósporos, (B) zoosporângios contendo zoósporos móveis e (C) formação de tubo de descarga. Barra= 10µm.

#### 5.3.4. Diagnóstico de *Perkinsus* spp. por PCR

Das 23 amostras positivas (11 do manguezal e 12 do cultivo) para RFTM submetidas à técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), 11 foram positivas (47,82%), produzindo *amplicons* do tamanho esperado (700 pb) (**Figura 10**). Para as amostras restantes, o resultado foi divergente ao observado por RFTM. Quanto às amostras negativas para RFTM submetidas a PCR, o resultado para todas foi negativo.



**Figura 10.** Diagnóstico de *Perkinsus* por PCR: eletroforese em gel de agarose (1,5%) com amplificações de fragmentos de 700 bp, obtidos em PCR realizados com iniciadores PerkITS 85/750. A primeira coluna superior mostra o marcador molecular (M), seguido pelo controle positivo (C+), negativo (C-) e as amostras (1, 2, 3, 5, 6, 7 positivas e 4 negativa).

### 5.3. Análises microscópicas de outros parasitos

As observações microscópicas revelaram a presença dos seguintes parasitos: organismos assemelhados a *Rickettsiae* (RLOs), *Sphenophrya* sp. (Ciliophora: Sphenophryidae), *Nematopsis* sp. (Apicomplexa: Eugregarinidae), *Urastoma* sp. (Turbellaria: Urostomidae), *Tylocephalum* sp. (Cestoda: Tetragonocephalidae) e um metazoário não identificado. Destes, o protozoário *Nematopsis* sp. foi o que apresentou maior prevalência, tendo sido encontrado em todos os meses e em ambos os ambientes. (**Tabela 02**).

Colônias de RLOs foram observadas nas três coletas, com maior prevalência em outubro, em ostras do cultivo (8%) (**Tabela 02**). O diâmetro das colônias variou entre 4 e 10  $\mu\text{m}$  (média:  $7,1 \pm 2,7 \mu\text{m}$ ;  $n = 10$ ). As colônias, de formato arredondado, ocorreram no interior das células epiteliais da glândula digestiva. A intensidade de infecção foi de 1-2 colônias/corte histológico, porém, algumas ostras apresentaram até 9 colônias/corte histológico (**Figura 11**). Em alguns casos foram observadas rupturas das células infectadas, mas não houve resposta aparente do hospedeiro.

*Sphenophrya* sp. foi observada em baixa prevalência, sempre nas brânquias, na maior parte das vezes, formando xenoma, uma hipertrofia da célula hospedeira e do seu núcleo devido a presença intracelular desse parasito. Apresentou tamanho entre 3 e 10  $\mu\text{m}$  (média:  $9,8 \pm 2,8 \mu\text{m}$ ;  $n = 8$ ) (**Figura 12**). Nos casos em que foi observado xenoma, foram visualizados até 19 protozoários dentro da célula do hospedeiro e 1-3 tumores/corte histológico. O tamanho dos núcleos hipertrofiados variou entre 6 e 15  $\mu\text{m}$  e o xenoma entre 27 e 35  $\mu\text{m}$ . Foram observados xenomas em estágio inicial e mais desenvolvidos. As lesões ficaram restritas a célula parasitada e não houve resposta imunológica aparente do hospedeiro (**Figura 13**).

*Nematopsis* sp. foi observada em com prevalência média de  $69,3\% \pm 4,44$  ( $n = 150$ ) no manguezal e  $51,3\% \pm 2,8$  ( $n = 150$ ) no cultivo, parasitando intracelularmente hemócitos (fagócitos). Cada oocisto continha tipicamente um único esporozoíto. Em média, ocorreram de 1-3 oocistos/fagócito, mas em uma ostra foram observados até 8 oocistos/fagócito. Os esporozoítos apresentaram dimensões entre 3 e 6  $\mu\text{m}$  (média:  $5,5 \pm 1,7$ ;  $n = 30$ ) e os fagócitos entre 10-15  $\mu\text{m}$ . O parasito foi observado no manto, glândula

digestiva, brânquias e músculo, sendo mais frequente na glândula digestiva (**Figura 14**). A estereologia evidenciou intensidade de infecção leve (< 5% do tecido parasitado; n = 10 ostras) e moderada (5-25% do tecido parasitado; n = 20 ostras).

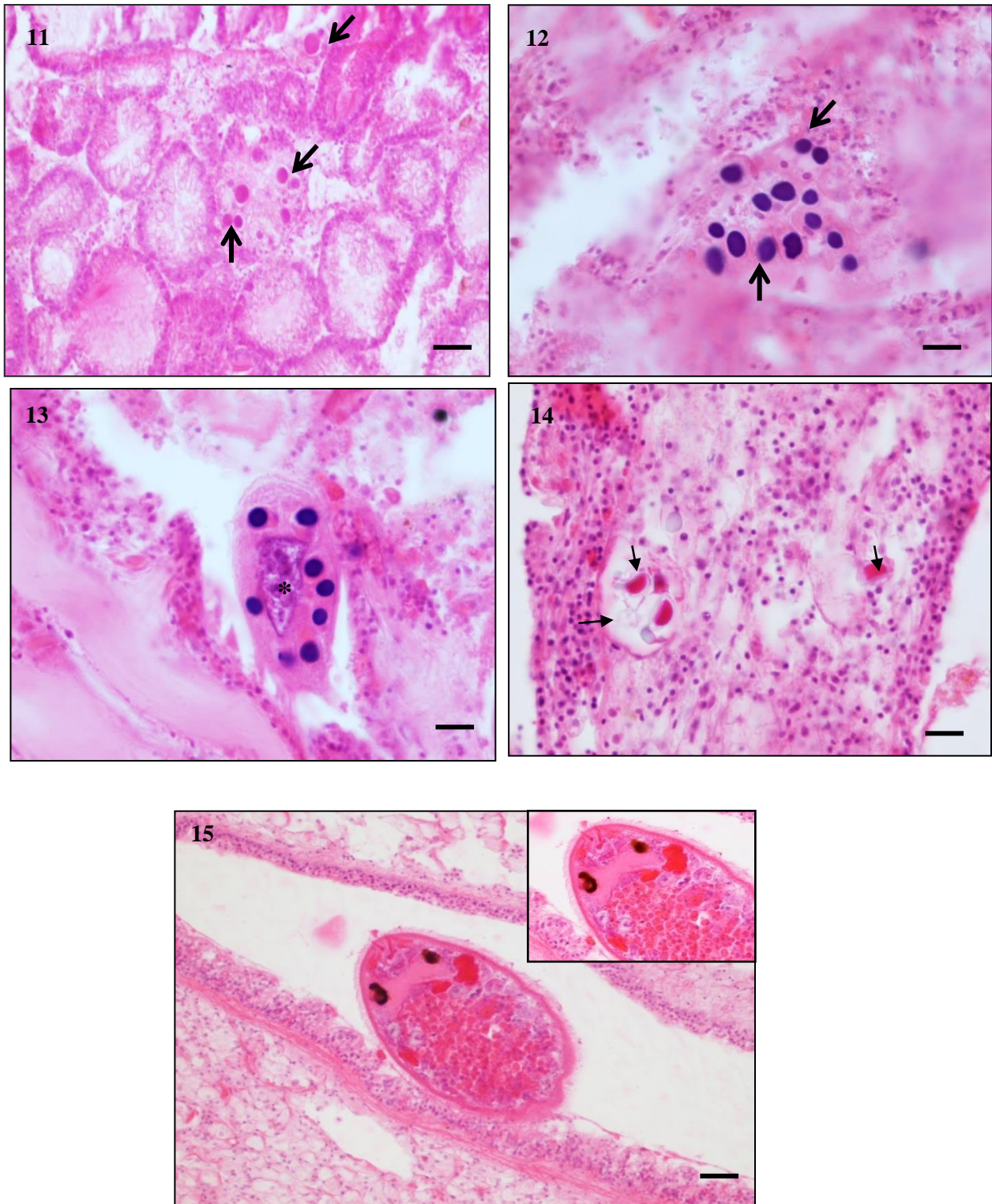
O teste de Qui-quadrado evidenciou que a ocorrência desse parasito está altamente associada ao ambiente, isto é, foi maior no manguezal em relação ao cultivo ( $p = 0,0006$ ).

*Urastoma* sp. foi observada em todos os meses em baixa prevalência e intensidade de infecção (1 parasito/corte histológico) (**Tabela 02**). Mediu entre 43-97  $\mu\text{m}$  de comprimento (média:  $78,6 \pm 19,9 \mu\text{m}$ ; n = 5) e todos os animais foram encontrados entre os filamentos branquiais da ostra (**Figura 15**). O turbelário apresentou formato típico ovoide, com parede espessa e presença de cílios recobrando o corpo, além de ocelos proeminentes.

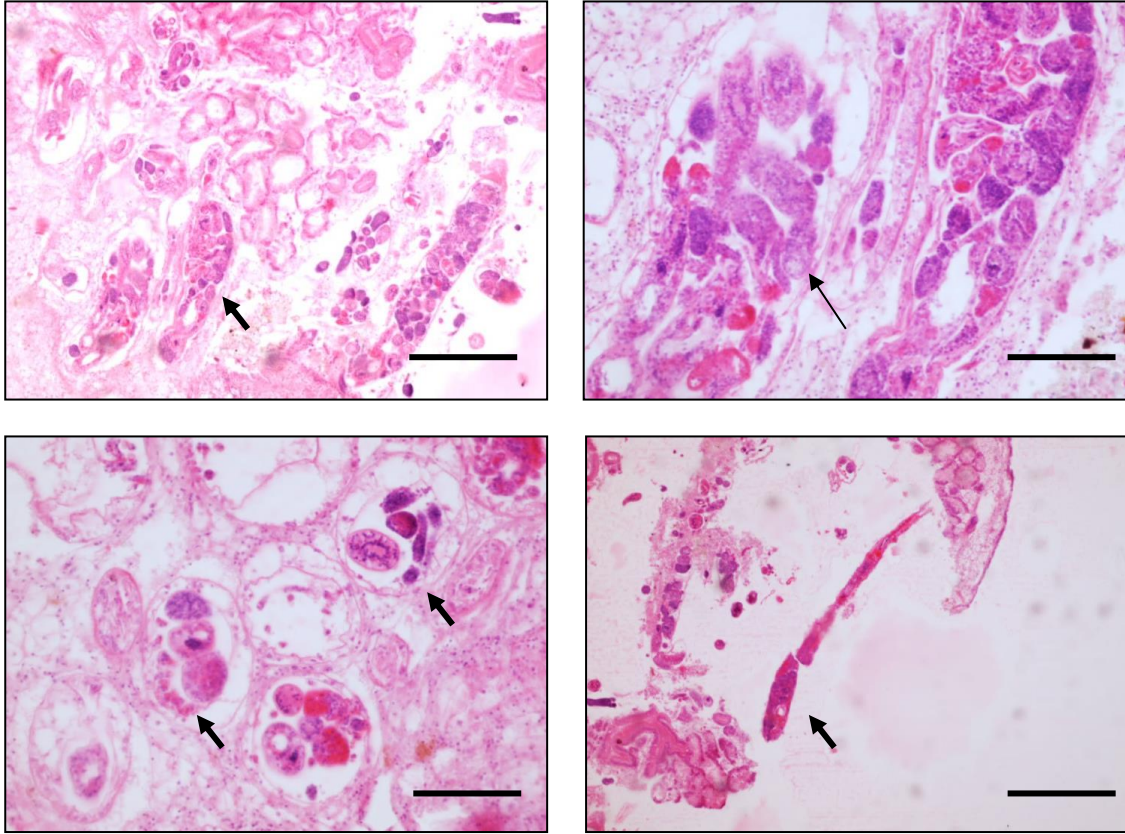
*Bucephalus* sp. em estágio larval esporocístico contendo cercárias e massas germinativas, foi encontrada apenas em uma ostra no mês de outubro no manguezal. A presença de furcas nas cercárias permitiu a identificação do gênero. O trematódeo ocorreu na glândula digestiva, no manto e na gônada. Houve evidência de castração parasitária, com destruição de folículos e gametas (**Figura 16**). O nível de infecção foi alto (> 25-50% de tecido parasitado). Os esporocistos apresentaram média de tamanho de 50,6  $\mu\text{m}$  (DP  $\pm 22,6$ ; n = 10).

*Tylocephalum* sp. foi observada em uma ostra da coleta realizada no mês de outubro no manguezal e em uma ostra do cultivo de novembro. O parasito, em estágio larval de metacestóide, estava localizado na região periférica da glândula digestiva, envolto por uma camada fibrosa de tecido conjuntivo do hospedeiro e por hemócitos. Mediu entre 73-80  $\mu\text{m}$  (média:  $76,5 \pm 3,5$ ; n = 2). Seu formato era tipicamente ovoide, com presença de cílios e vesículas internas (**Figura 17**). Nos dois casos, foi visualizado apenas um parasito/corte histológico.

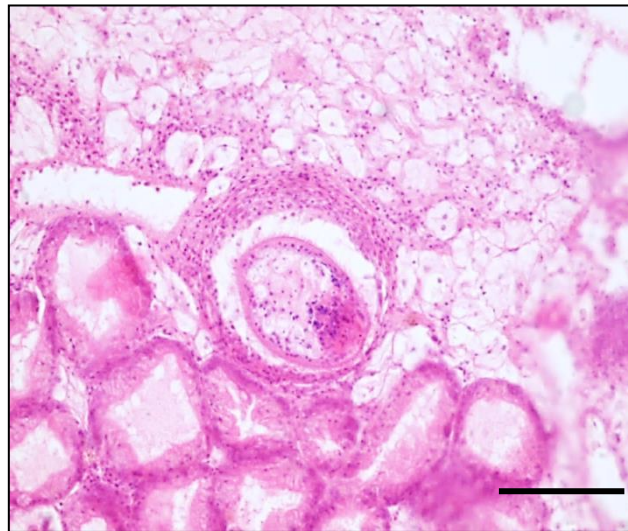
Um copépode não identificado foi observado em todas os meses de coletas em baixa prevalência e baixa intensidade de infecção (1 parasito/corte histológico) (**Figura 18**).



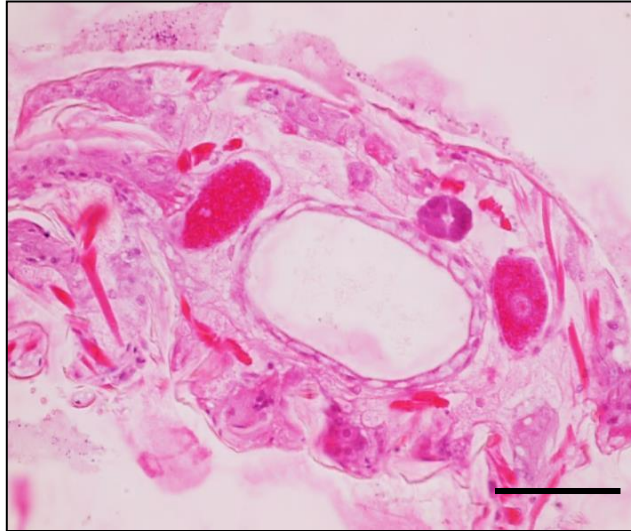
**Figuras 11-15.** Parasitos na ostra *Crassostrea rhizophorae* de Porto do Campo (Baía de Camamu, Bahia), sendo: (11) RLOs no epitélio da glândula digestiva. Barra = 10 $\mu$ m; *Sphenophrya* sp. no epitélio branquial (12) sem formação de xenoma e com formação de xenoma (13), Barra = 10  $\mu$ m; (14) oocistos intrahemocíticos de *Nematopsis* sp. na região das brânquias, Barra = 10  $\mu$ m; (15) *Urastoma* sp. entre os filamentos branquiais, Barra = 10  $\mu$ m. Coloração: HE.



**Figura 16.** Esporocistos de *Bucephalus* sp. contendo massas germinativas e cercárias em *Crassostrea rhizophorae* de Porto do Campo (Baía de Camamu, Bahia). Barra = 25  $\mu$ m. Coloração: HE.



**Figuras 17.** *Tylocephalum* sp. em *Crassostrea rhizophorae* de Porto do Campo (Baía de Camamu, Bahia) na região periférica da glândula digestiva, com formação de cápsula fibrosa. Barra = 25  $\mu$ m. Coloração: HE.



**Figura 18.** Copépode não identificado em região próxima às brânquias de *Crassostrea rhizophorae* de Porto do Campo (Baía de Camamu, Bahia). Barra = 25  $\mu$ m. Coloração: HE.

**Tabela 02.** Parasitos e suas prevalências (%) na ostra *Crassostrea rhizophorae* em ambiente de cultivo (n = 150) e no manguezal (n = 150) na localidade de Porto do Campo, Baía de Camamu (Bahia), nos meses de outubro e novembro de 2012 e janeiro de 2013, através da histologia.

Parasitos	Outubro		Novembro		Janeiro	
	Manguezal	Cultivo	Manguezal	Cultivo	Manguezal	Cultivo
RLOs	6%	8%	4%		2%	
<i>Sphenophrya</i> sp.*	6%		6%		2%	
<i>Sphenophrya</i> sp.				2%		
<i>Nematopsis</i> sp.	94%	56%	44%	38%	70%	60%
<i>Perkinsus</i> spp.	92%	100%	100%	86%	94%	88%
<i>Urastoma</i> sp.	4%	4%		2%		2%
<i>Bucephalus</i> sp.	2%					
<i>Tylocephalum</i> sp.	2%			2%		
Copépode não identificado	4%		2%	2%	2%	2%

\**Sphenophrya* sp. causando xenoma (hipertrofia da célula hospedeira)

## 6. DISCUSSÃO

A ostra *Crassostrea rhizophorae* é uma espécie hermafrodita sequencial protândrica, que tende a apresentar maior proporção de machos quando mais nova e uma relação inversa quando mais velha (GALTSOFF, 1964). Neste estudo, as ostras do manguezal tiveram um maior número de fêmeas com relação aos machos. Isso sugere que essas ostras sejam mais velhas do que as do estoque do cultivo, embora estas últimas tenham apresentado tamanho maior, o que, provavelmente, se deve ao fato de as ostras nas lanternas estarem em melhor condição de crescimento, favorecido principalmente pela submersão permanente.

Os parasitos mais prevalentes presentes em *C. rhizophorae* de Porto do Campo, tanto no cultivo quanto no manguezal, foram *Perkinsus* spp. e *Nematopsis* sp.

A técnica de RFTM está atestada pela OIE (2006) como um teste sensível e seguro para a observação de *Perkinsus* na fase de hipnósporos. Os hipnósporos visualizados nesse estudo apresentaram as mesmas características (aumento celular e espessura da parede) mencionadas para *C. rhizophorae* infectada por *Perkinsus* em outros locais do Nordeste brasileiro (SABRY et al., 2009; BRANDÃO et al., 2013a; da SILVA et al., 2013; SABRY et al., 2013).

A prevalência média de *Perkinsus* spp. evidenciada a partir da técnica de RFTM foi alta (69%) em relação à encontrada por Sabry et al. (2009) (5,78%) no estado do Ceará, e um pouco maior a encontrada por Brandão et al. (2013a) (63%) no litoral sul da Bahia nessa mesma espécie. Ferreira (2013) observou prevalência média de 14,7% em *A. brasiliiana* no estado do Ceará.

Quanto aos níveis de intensidade de infecção encontrados neste estudo, os mesmos variaram do nível nulo (N0) à infecção intensa (N4), resultado similar ao observado por Brandão et al. (2013a) também na Baía de Camamu (BA). No estudo realizado por Sabry et al. (2009) no Rio Pacoti (Ceará), os autores observaram grande parte das ostras em nível de infecção muito leve (N1) e uma pequena porcentagem no nível mais intenso (N4) no ano de 2008. Nos anos de 2009 e 2010, neste mesmo local, Sabry et al. (2013) observaram desde o nível nulo de infecção (N0) ao muito leve (N2). Ferreira (2013)



encontrou nível nulo a leve em *A. brasiliiana* do estuário do Rio Timonha (CE), em animais de população naturais.

Nossos resultados de histologia permitiram evidenciar trofozoítos de *Perkinsus* sp. com tamanho entre 3-10  $\mu\text{m}$ , com média de 6,8  $\mu\text{m}$ . Sabry et al. (2013) e Ferreira (2013) observaram células de *Perkinsus beihaiensis* com tamanhos variando entre 3 e 6  $\mu\text{m}$ , tratando-se esta de uma espécie com tamanho pequeno. Em um estudo realizado no México com a ostra *Saccostrea palmula* de cultivo e população natural, trofozoítos de *P. marinus* foram encontrados medindo até 5  $\mu\text{m}$  em ambos os ambientes. Mackin et al. (1950) observaram essa espécie medindo entre 3 e 10  $\mu\text{m}$  em *C. virginica*.

A morfologia típica dos trofozoítos do gênero *Perkinsus* também foi observada e os órgãos e tecidos infectados também coincidem com relatos anteriores para a costa brasileira (SABRY et al., 2009; BRANDÃO et al., 2013a; da SILVA et al., 2013; FERREIRA, 2013; SABRY et al., 2013).

Neste estudo, a presença de hemócitos fagocitando o protozoário, evidenciou a resposta de defesa do hospedeiro. Brandão et al. (2013), também observaram a presença de hemócitos na ostra *C. rhizophorae* da Baía de Camamu infectada por *Perkinsus* sp. e em ambos estudos não ficou evidente mortalidade de ostras associada a esse patógeno, o que indica que essa ostra mostra um certo grau de adaptação ao parasito e resposta hemocitária eficiente no combate ao parasito.

Segundo Queiroga et al. (2013), em um estudo sobre o sistema imunológico da ostra *C. gasar* infectada por *Perkinsus* sp., as altas intensidades podem tornar o hospedeiro mais suscetível a outros patógenos e doenças. A infecção por esse protozoário ainda pode promover alterações fisiológicas, lise de células, comprometimento do sistema imunológico e diminuição da capacidade reprodutiva (NAVAS et al., 1992; BOWER et al., 1994; BONDAD-REANTASO et al., 2001; CASAS; VILLALBA, 2012). Além desses danos, o crescimento e a sobrevivência do hospedeiro também podem ser comprometidos e indiretamente pode haver impactos sobre a produção desses animais.

Alterações histopatológicas causadas por *Perkinsus* sp. foram também observadas por Lee et al. (2001) em *Tapes philippinarum* da Coreia. Os autores observaram infiltração e encapsulamento hemocitário em vários tecidos e órgãos, e em alguns casos um atrofiamento do epitélio digestivo.

Quanto à eficiência das técnicas utilizadas neste estudo, apesar da técnica de RFTM ser considerada mais sensível que a histologia (OIE, 2006), curiosamente, a técnica histológica evidenciou maior prevalência de *Perkinsus* spp., resultado similar ao observado por Sabry et al. (2013). As técnicas de RFTM e histologia utilizam secções diferentes de tecidos do animal, isto é, enquanto a primeira utiliza apenas as brânquias e o reto, a segunda utiliza também outras regiões do corpo do animal (e.g., gônadas, tubo digestório), o que possibilita um aumento da prevalência.

A reação em Cadeia da Polimerase (PCR) confirmou que o protozoário encontrado nas técnicas de histologia e RFTM trata-se de um membro do gênero *Perkinsus*. Todas as amostras negativas para RFTM também foram negativas para PCR e 11 amostras positivas para ambas as técnicas e 12 amostras positivas para RFTM e negativas para a PCR. Os níveis de infecção muito leve e leve compreendem de 1-10 e 11-100 hipnósporos observados em toda a lâmina, respectivamente. Nestes níveis, o protozoário pode estar distribuído de maneira desproporcional entre os tecidos dos órgãos e possivelmente o fragmento (25-50 mg) utilizado para a PCR não contenha a presença do parasito. Brandão et al. (2013) e Sabry et al. (2009 e 2013) também relataram diferenças entre as técnicas de RFTM e PCR, que foram associadas a baixa intensidade e a quantidade de tecido diferente utilizado para as técnicas. Reece et al. (2008) também relataram divergência entre as técnicas e Burreson (2008) associou essas diferenças a falhas durante a amostragem.

Quanto à influência dos fatores abióticos sobre a prevalência e o desenvolvimento do patógeno *Perkinsus*, as médias de salinidade e temperatura têm sido associadas ao sucesso proliferativo deste patógeno em seus hospedeiros (CHOI; PARK, 2010; La PEYRE et al., 2010; DANG et al., 2012). Em um estudo realizado por La Peyre et al (2010) foi observado aumento da densidade celular de *P. marinus* em *C. virginica* quando eram combinadas temperatura de 28°C e salinidade de 25‰. Os autores também observaram que ocorreu uma queda na viabilidade celular em baixas temperaturas e salinidade, diminuindo também a prevalência e a intensidade de infecção. Durante os meses de coletas do presente estudo, tanto a salinidade quanto a temperatura foram altas e propícias para a sobrevivência e manutenção de *Perkinsus* sp., o que pode explicar as altas prevalências observadas.

As prevalências similares de *Perkinsus* sp. nas ostras do cultivo e do manguezal indicam não haver influência negativa do confinamento sobre a ocorrência do patógeno, o que foi evidenciado também pelos níveis de infecção, predominantemente nulos no cultivo no meses de outubro e novembro de 2012.

Quanto aos demais parasitos, organismos assemelhados a *Rickettsiae* (RLOs) foram encontrados nesse estudo em baixa prevalência e intensidade de infecção, causando hipertrofia das células epiteliais da glândula digestiva e em alguns casos a ruptura das mesmas. Em outros estudos realizados em *C. rhizophorae* na costa brasileira (ZEIDAN et al., 2012; SABRY et al., 2013; BRANDÃO et al., 2013b; COVA, 2013), também foram observados RLOs no mesmo órgão, com prevalências médias entre 3-13% e intensidade de infecção entre 1-5 colônias/seção histológica, coincidindo com os resultados do presente estudo. Colônias intracelulares de RLOs foram também registradas em *C. gigas* (PONTINHA, 2009; SABRY, et al., 2013b), em *Mytella guyanensis* (PINTO; BOEHS, 2008; BOEHS et al., 2010; CEUTA; BOEHS, 2012) e em *A. brasiliiana* (BOEHS et al., 2010). A lise celular observada em algumas ostras neste estudo também foi relatada por Cremonte et al. (2005) no venerídeo *Pitar rostrata* no Uruguai. Em todos os estudos mencionados, não houve evidente resposta hemocitária ou associação com mortalidade.

O ciliado *Sphenophrya* sp. foi observado em ambos os ambientes e nos três meses de coletas, nas brânquias, seja com localização entre os filamentos branquiais, seja com localização intracelular e nesse último caso formando xenoma, em sua maioria em estágio inicial. Nascimento et al. (1986), em um estudo realizado com *C. rhizophorae* na Baía de Todos os Santos (BA), encontraram baixa prevalência e intensidade de infecção desse protozoário, mas não relataram xenoma. Esse tipo de tumor já foi relatado em estudos anteriores no Hemisfério Norte (BOWER et al., 1994; WINSTEAD, 2004), sendo que no Brasil foi relatado apenas no sul da Bahia (BOEHS et al., 2009; ZEIDAN et al., 2012; BRANDÃO et al., 2013b). Winstead et al. (2004), relataram, em um estudo realizado na Flórida (EUA), xenomas com cerca de 3 mm de comprimento na ostra *C. virginica* em avançado nível de infecção por *Sphenophrya* sp.

Oocistos intrahemocíticos de *Nematopsis* sp. foram encontrados em alta prevalência tanto no cultivo quanto no manguezal, nas brânquias, manto e glândula

digestiva das ostras. A alta prevalência dessa gregarina e os órgãos de ocorrência, coincidem com registros já realizados em *C. rhizophorae* (NASCIMENTO et al., 1986; SABRY; MAGALHÃES, 2005; SABRY et al., 2007; ZEIDAN et al. 2012; BRANDÃO et al., 2013b; SABRY et al., 2013; COVA, 2013) e em outros bivalves de interesse econômico do litoral brasileiro (AZEVEDO; MATOS, 1999; LIMA et al., 2001; PINTO; BOEHS, 2008; CEUTA; BOEHS et al., 2012; BOEHS, 2012).

O protozoário *Nematopsis* utiliza moluscos bivalves como hospedeiros intermediários e completa seu ciclo de vida de vida no intestino de crustáceos (LAUCKNER, 1983). Em um estudo realizado em populações naturais de bivalves no Rio Cachoeira (Ilhéus, Bahia), com três espécies de interesse econômico, foi evidenciada uma maior prevalência em *M. guyanensis* quando comparada com *A. brasiliiana* (BOEHS et al., 2010). A maior prevalência em *M. guyanensis* foi atribuída pelos autores à proximidade deste bivalve com os crustáceos presentes no manguezal, já que o mesmo fixa-se nas raízes dessas plantas, enquanto *A. brasiliiana* habita a região entremarés e o infralitoral raso, onde a ocorrência de crustáceos é menor. No presente estudo prevalências significativamente mais baixas foram observadas no cultivo, no qual as ostras ficam submersas por tempo integral e em menor contato com crustáceos, o que pode justificar a diferença de prevalência de *Nematopsis* sp. entre os ambientes. Apesar da alta prevalência, nenhum dano, alteração histopatológica ou resposta imune foram observados nos tecidos da ostra relacionadas a este parasito.

Metazoários do filo Platyhelminthes foram observados nesse estudo em baixa prevalência e intensidade de infecção. *Urastoma* sp. já foi observada na costa brasileira em *C. rhizophorae* e em *C. gigas* de Santa Catarina (SABRY et al., 2007, 2013) e em *C. rhizophorae* e *M. guyanensis* da Bahia (ZEIDAN et al., 2012; BRANDÃO et al., 2013; COVA, 2013) na cavidade do manto e nos filamentos branquiais. Em todos os casos mencionados, não houve a observação de danos aos hospedeiros. Entretanto, em um estudo realizado por Robledo et al. (1994) em *Mytilus galloprovincialis* na região da Galícia na Espanha, foram observadas alterações nos tecidos das brânquias e ocorrência de infiltração hemocitária. Ainda não é conhecido o tipo de relação que esse turbelário possui com moluscos bivalves, mas seus registros tem sugerido uma relação mais comensal do que parasítica (BOEHS et al., 2012).

Esporocistos de *Bucephalus* sp. contendo massas germinativas e cercárias em diferentes estágios de desenvolvimento causando castração parasitária foram observados em uma ostra do manguezal. O exemplar não apresentou nenhum sinal macroscópico quanto à presença do bucefalídeo. Em mitilídeos, essa enfermidade é conhecida como “doença laranja”, pelo fato de macroscopicamente ser possível a visualização da coloração alaranjada e aspecto fibroso do manto dos indivíduos infectados, que é causada pelos próprios esporocistos (BOEHS et al., 2012; CEUTA; BOEHS, 2012). O ciclo de vida desses trematódeos digenéticos é considerado complexo, mas é conhecido que os mesmos utilizam os bivalves como hospedeiros intermediários (primários ou secundários) e os peixes como hospedeiros definitivos (LAUCKNER, 1983; CEUTA; BOEHS, 2012). Esse parasito já foi registrado em *C. rhizophorae* do litoral da Bahia (NASCIMENTO et al., 1986; ZEIDAN et al., 2012; BRANDÃO et al., 2013b) com prevalência e intensidade de infecção similares, assim como ausência de resposta de defesa do hospedeiro.

Larvas de metacestóides do gênero *Tylocephalum* já foram registradas em *C. rhizophorae* no Estado do Ceará (SABRY et al., 2007) e Bahia (NASCIMENTO et al., 1986; ZEIDAN et al., 2012; BRANDÃO et al., 2013b) com baixa prevalência e intensidade de infecção. Esse parasito também tem sido documentado em outros bivalves da costa brasileira como em *A. brasiliiana* (BOEHS; MAGALHÃES, 2004; BOEHS et al., 2009), *Iphigenia brasiliiana* (BOEHS et al., 2009) e *M. guyanensis* (CEUTA; BOEHS, 2012). Em todos os casos, foi observado o encapsulamento por fibras e células do hospedeiro e ausência de danos aos órgãos dos animais. Entretanto, em um estudo realizado na Baía de Todos os Santos, os autores observaram ruptura do tecido do animal, devido à penetração do cestóide, causando danos mecânicos no animal (NASCIMENTO et al., 1986). Nesse estudo não foi detectado dano histopatológico ou mecânico.

## **7. COCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Os resultados do estudo permitem tecer as seguintes considerações finais:

- Dentre os parasitos observados, *Perkinsus* spp. e *Nematopsis* sp. foram os mais prevalentes;
- As infecções, tanto por *Perkinsus* spp. quanto por *Nematopsis* sp., tiveram efeito localizado e aparentemente, não estão associadas a mortalidade da ostra *C. rhizophorae*;
- Apesar da alta prevalência, os níveis de infecção de *Perkinsus* spp. evidenciados pela técnica de RFTM em ambos os ambientes foram baixos;
- Na infecção por *Perkinsus* sp., a presença de hemócitos foi considerada positiva para o hospedeiro, pois evidencia que a sua resposta é eficiente com relação a esse patógeno;
- A maior prevalência detectada na técnica de histologia;
- As prevalências altas de *Perkinsus* spp. em Porto do Campo indicam que, aparentemente, as condições abióticas do local são favoráveis a proliferação desse patógeno;
- A similaridade de prevalência observada entre os ambientes, indica que o cultivo não está favorecendo a proliferação de *Perkinsus* spp. na ostra, o que foi atestado também pelos níveis mais baixos de infecção em relação ao manguezal;
- A prevalência mais alta de *Nematopsis* sp. no manguezal está, muito provavelmente, associada a presença de crustáceos nesse local, o que facilita a esse patógeno completar seu ciclo de vida;
- A infecção pelos outros parasitos neste estudo foi de baixa prevalência e intensidade de infecção e aparentemente os mesmos não estão causando danos, o que evidencia as boas condições de saúde da ostra do local;
- Apesar de vários estudos estarem sendo conduzidos envolvendo o gênero *Perkinsus* em ostras do nordeste do Brasil, há muitos aspectos ainda a serem elucidados, como por exemplo: as espécies ocorrentes em cada região, a patogenicidade sobre outros moluscos bivalves de interesse econômico e os possíveis efeitos sobre os humanos mediante consumo de ostras moluscos portadores da infecção.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOLLO, E.; CASAS, S. M.; CESCHIA, G.; VILLALBA A. Differential diagnosis of *Perkinsus* species by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism assay. **Molecular and Cellular Probes**, v. 20, p. 323-329, 2006. D.O.I. :10.1016/j.mcp.2006.04.001

ALVES, R.; MAGALHÃES, A.R.M. Método para obtenção de metáfases mitóticas de ostras para o estudo do cariótipo. **Biotemas**, v. 23, p. 111-119, 2010.

AMORIM, F.N. **Caracterização oceanográfica da Baía de Camamu e adjacências e mapeamento das áreas de risco a derrames de óleo**. 117 p. Dissertação Mestrado, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2005.

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

AZEVEDO, C.; MATOS, E. Description of *Nematopsis mytella* n. sp. (Apicomplexa), parasite of the mussel *Mytella guyanensis* (Mytilidae) from the Amazon Estuary and description of its oocysts. **European Journal of Protistology**, v. 35, p. 427-433, 1999. DOI: 10.1016/S0932-4739(99)80052-2

BLACKBOURN, J.; BOWER, S.M.; MEYER, G.R. *Perkinsus qugwadi* sp. nov. (incertae sedis), a pathogenic protozoan parasite of Japanese scallops, *Patinopecten yessoensis*, cultured in British Columbia, Canada. **Canadian Journal of Zoology**, v. 76, p. 942-953, 1998. DOI: 10.1139/z98-015

BOEHS, G.; LENZ, T.M.; VILLALBA, A. Xenomas in *Crassostrea rhizophorae* (Ostreidae) from Camamu Bay, Bahia, Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 69, p. 457-458, 2009. DOI: 10.1590/S1519-69842009000200032

BOEHS, G.; VILLALBA, A.; CEUTA, L. O.; LUZ, J.R. Parasites of three commercially exploited bivalve mollusc species of the estuarine region of the Cachoeira river (Ilhéus,

Bahia, Brazil). **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 103, p. 43-47, 2010. DOI: 10.1016/j.jip.2009.10.008

BOEHS, G.; MAGALHÃES, A.R.M. Simbiontes associados com *Anomalocardia brasiliiana* (Gmelin) (Mollusca, Bivalvia, Veneridae) na Ilha de Santa Catarina e região continental adjacente, Santa Catarina, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 21, p. 865–869, 2004.

BOEHS, G.; 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 de L.A.; TAKEMOTO, R. (org.). **Patologia e Sanidade de Organismos Aquáticos, Maringá, Associação Brasileira de Patologistas de Organismos Aquáticos**. 1º ed. Maringá: Massoni, Cap. 8. p. 165-193. 2012.

BONDAD-REANTASO, M.G.; McGLADDERY, S.E.; EAST, I.; SUBASINGHE, R.P. **Asia diagnostic guide to aquatic animal diseases**. FAO Fisheries Technical Paper 402/2. Rome: FAO, 2001.

BOWER, S.M.; McGLADDERY, S.E.; PRICE, I.M. Synopsis of Infectious Diseases and Parasites of Commercially Exploited Shellfish. **Annual Review of Fish Diseases**, v. 4, p. 1-199, 1994.

BOWER, S.M.; BURRESON, E.; REECE, K. **Working Group on Pathology and Diseases of Marine Organisms**. Mariculture Committee, Conseil International pour l'Exploration de la Mer, 2003.

BRANDÃO, R.P.; BOEHS, G.; SABRY, R.C.; CEUTA, L.O.; LUZ, M.S. A; QUEIROGA, F.R.; da SILVA, P. *Perkinsus* sp. infecting oyster *Crassostrea rhizophorae* (Guilding, 1828) on the coast of Bahia, Brazil. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 112, p. 138-141, 2013a. DOI: 10.1016/j.jip.2012.11.003

BRANDÃO, R.P.; BOEHS, G.; SILVA, P.M. Health assessment of the oyster *Crassostrea rhizophorae* on the southern coast of Bahia, northeastern Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 22, p. 84-91, 2013b.



BRASIL. **Produção pesqueira e aquícola: estatística 2008 e 2009.** Brasília: Ministério da Pesca e Aquicultura (MPA), 2010.

BUSH, A.O.; LAFFERTY, K.D.; LOTZ, J.M.; SHOSTAK, A.W. Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis et al. revisited. **Journal of Parasitology**, v. 83, n. 4, p. 575-583, 1997. PMID:9267395. <http://dx.doi.org/10.2307/3284227>

BURRESON, E.M. Misuse of PCR assay for diagnosis of mollusk protistan infections. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 80, p. 81-83, 2008. DOI: 10.3354/dao01925

BUYS, B. Mar brasileiro é rico em diversidade de espécies, mas os estoques são escassos. **Inovação Uniemp**, v.3, p. 12-15, 2007.

CÁCERES-MARTÍNEZ, J.; ORTEGA, M.G.; YEOMANS, R.V.; GARCÍA, T.J.P.; STOKES, N.A.; CARNEGIE, R.B. Natural and cultured populations of the mangrove oyster *Saccostrea palmula* from Sinaloa, Mexico, infected by *Perkinsus marinus*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 110, p. 321-325, 2012. D.O.I.: 10.1016/j.jip.2012.03.019

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. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.99, p. 66-73, 2008.DOI: 10.1016/j.jip.2008.03.005

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 a etiological agent and in vitro modulation of zoosporulation by temperature and salinity **Disease of Aquatic Organisms**, v. 50, p. 51-65, 2002.

CASAS, S.M.; VILLALBA, A. Study of perkinsosis in the grooved carpet shell clam *Ruditapes ecussatus* in Galicia (NW Spain). III. The effects of *Perkinsus olseni* infection on clam reproduction. **Aquaculture**, 2012. D.O.I.: 10.1016/j.aquaculture.2012.05.038

CASAS, S.M.; GRAU, A.; REECE, K.S.; APAKUPAKUL, K.; AZEVEDO, C.; VILLALBA, A. *Perkinsus mediterraneus* n. sp., a protistan parasite of the European flat

oyster *Ostrea edulis* from the Balearic Islands, Mediterranean Sea. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 58, p. 231-244, 2004. DOI: 35400011706604.0180

Centro de Recursos Ambientais, Área de Proteção Ambiental do Pratigi (CRA). Plano de Manejo, Zoneamento- Ecológico-Econômico, Plano de Gestão. Diagnóstico Ambiental. Meio Físico, 11p., 1995.

CEUTA, L.O.; BOEHS, G. Parasites of the mangrove mussel *Mytella guyanensis* (Bivalvia: Mytilidae) in Camamu Bay, Bahia, Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 72, p. 1-7, 2012. DOI: 10.1590/S1519-69842012000300002

CHOI, K.; PARK, K. **Current Status of *Perkinsus* Infection in Korean Waters**. In: WALKER, P.; LESTER, R.; BONDAD-RENTASO, M.G. Diseases in Asian Aquaculture V, p. 263-274. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, 2005.

CHOI, K.; PARK, K. Review on the Protozoan Parasite *Perkinsus olseni* (Lester and Davis 1981) Infection in Asian Waters. **Coast Environmental Ecosystem Issues East China Sea**. p. 269-281, 2010.

CHU, F.L.E. Laboratory investigations of susceptibility, infectivity and transmission of *Perkinsus marinus* in oysters. **Journal of Shellfish Research**, v. 15, p. 57-66, 1996.

CHU, F.L.E.; LA PEYRE, J.F.; BURRESON, C.S. *Perkinsus marinus* infection and potential defense-related activities in Eastern oysters, *Crassostrea virginica* salinity effects. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 62, p. 226-232, 1993. DOI: 10.1006/jipa.1993.1104

COVA, A. W. **Parasitos na ostra-do-mangue *Crassostrea rhizophorae* (GUILDING, 1828) cultivada no estuário do rio graciosa em Taperoá, Bahia**. 46p. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Recôncavo, 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. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 64, p. 85-90, 2005. DOI: 10.3354/dao064085

da SILVA, P. M.; VIANNA, R. T.; GUERTLER, C.; FERREIRA, L. P.; SANTANA, L. N.; FERNÁNDEZ-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 (NE, Brazil), **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 113, p. 96-103, 2013. D.O.I.: 10.1016/j.aquaculture.2012.05.038

DANG, V. T.; SPECK, P.; BENKENDORFF, K. Influence of elevated temperatures on the immune response of abalone, *Haliotis rubra*. **Fish & Shellfish Immunology**. v 32, p. 732-740, 2012. DOI:10.1016/j.fsi.2012.01.022

DUNGAN, C.F; REECE, K.S. In Vitro Propagation of Two *Perkinsus* spp. Parasites from Japanese Manila Clams *Venerupis philippinarum* and Description of *Perkinsus honshuensis* n. sp.. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 53, p. 316-326, 2006. DOI: 10.1111/j.1550-7408.2006.00120.x

DUNGAN, C.F.; REECE, K.S.; MOSS, J.A.; HAMILTON, R.M.; DIGGLES, B.K. *Perkinsus olseni* in vitro Isolates from the New Zealand Clam *Austrovenus stutchburyi*. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 54, p. 263–270, 2007. DOI: 10.1111/j.1550-7408.2007.00265.x

ELANDALOUSSI, L.M.; CARRASCO, N.; ROQUE, A.; ANDREE, K.; FURONES, M. D. First record of *Perkinsus olseni*, a protozoan parasite infecting the commercial clam *Ruditapes decussatus* in Spanish Mediterranean waters. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 100, p. 50-53, 2009. DOI:10.1016/j.jip.2008.09.004

FERNÁNDEZ, R.; PÉREZ, M. Perkinsosis and clam industry in Europe. *In*: VILLALBA, A. **Workshop for the analysis of the impact of Perkinsosis to the European Shellfish Industry**, Centro Tecnológico del Mar – Fundación CETMAR, Vigo, Espanha, 2008.

FERREIRA, L.P. **Diagnóstico e infecção experimental por *Perkinsus beihaiensis* em *Anomalocardia brasiliensis* em dois estuários do estado do Ceará**. 62p. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Ceará, 2013.

FISHER, W.S.; GAUTHIER, J.D.; WINSTEAD, J.T. Infection intensity of *Perkinsus marinus* disease in *Crassostrea virginica* (Gmelin, 1791) from the Gulf of Mexico maintained under different laboratory conditions. **Journal of Shellfish Research**, v. 11, p. 363-369, 1992.

GALTSOFF, P.S. The American oyster *Crassostrea virginica* (Gmelin). Washington, D. C.: US Government Printing Office, **Fish and Wildlife Service Bulletin**, v.. 64, 480p., 1964.

GOGGIN, C.L.; BARKER, S.C. Phylogenetic position of the genus *Perkinsus* (Protista, Apicomplexa) based on small subunit ribosomal RNA. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 65, p. 179-182, 1993. DOI : 10.1016/0166-6851(93)90029-W

IFREMER – Institut Français de Recherche pour l' Exploitation de la Mer. **Diagnosis by histopathology of *Perkinsus* sp. in molluscs**. Community Reference, Laboratory for Molluscs Diseases, 1<sup>a</sup> ed., 2009.

LEE, M.K.; CHO, B.Y.; LEE, S.J.; KANG, J.Y.; JEONG, H.D.; HUH, S.H.; HUH, M.D. Histopathological lesions of Manila clam, *Tapes philippinarum*, from Hadong and Namhae coastal areas of Korea. **Aquaculture**, v. 201, p.199-209, 2001.

LA PEYRE, M.K.; CASAS, S.M.; GAYLE, W.; LA PEYRE, J. The combined influence of sub-optimal temperature and salinity on the in vitro viability of *Perkinsus marinus*, a protistan parasite of the eastern oyster *Crassostrea virginica*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 105, p. 176-181, 2010. DOI: 10.1016/j.jip.2010.06.010

LAUCKNER, G. Diseases of Mollusca: Bivalvia. In: KINNE, O. (ed). **Diseases of Marine Animals**. Hamburg: Biologische Anstalt Helgoland. v. 2, 1983.

LENZ, M. L. **Biologia reprodutiva da ostra-do-mangue *Crassostrea rhizophorae* (Guilding, 1828) (Bivalvia: Ostreidae) como subsídio à implantação de ostreicultura na Baía de Camamu (BA)**. 54p. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Santa Cruz, 2008.

LENZ, T.; BOEHS, G. Ciclo reproductivo del ostión de manglar *Crassostrea rhizophorae* (Bivalvia: Ostreidae) en la Bahía de Camamu, Bahia, Brasil. **Revista de Biología Tropical**, v. 59, p. 137-149, 2011.

LESTER, R.J.G.; DAVIS, G.H.G. A new *Perkinsus* species (Apicomplexa, Perkinsea) from the Abalone *Haliotis ruber*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 37, p. 181-187, 1981. DOI: 10.1016/0022-2011(81)90073-2

LEVINE, N.D. *Perkinsus* gen. n. and other new taxa in the protozoan Phylum Apicomplexa. **Journal for Parasitology**, v. 64, p. 549, 1978. DOI: 10.2307/3279807

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

LOWE, D.M.; SALKELD, P.N., CARR, M. R. The effect of geographical location on the cellular composition of the mantle tissue of the mussel, *Mytilus edulis*. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, v. 74, p. 225-232, 1994. DOI: 10.1017/S0025315400035785

MACKIN, J.G.; OWEN, H.M.; COLLIER, A. Preliminary note on the occurrence of a new protistan parasite, *Dermocystidium marinum* n. sp. in *Crassostrea virginica* (Gmelin). **Science**, v. 111, p. 328-329, 1950. DOI: 10.1126/science.111.2883.328

MACKIN, J.G. Histopathology of infection of *Crassostrea virginica* (Gmelin) by *Dermocystidium marinum* Mackin, Owen, and Collier. **Bulletin of Marine Science of the Gulf and Caribbean**, v. 1, 72-87, 1951.

MARGOLIS, L.; ESCH, G.W.; HOLMES, J.C.; KURIS, A.M.; SCHAD, G.A. The use of ecological terms in parasitology (report of an ad hoc Committee of the American Society of Parasitologists). **Journal of Parasitology**, v. 98, p. 131-133, 1982. DOI: 10.2307/3281335

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

MCLAUGHLIN, S.M.; TALL, B.D.; SHAHEEN, A.; ELSAYED, E.E.; FAISAL, M. Zoosporulation of a new *Perkinsus* species isolated from the gills of the soft shell clam *Mya arenaria*. **Parasite**, v. 7, p. 115-122, 2000.

MENDONÇA, R.C.; SCARDUA, M.P.; LEAL, A.L.L.; DA SILVA, P.M. Primeiro registro de *Perkinsus* sp. infectando ostras *Crassostrea brasiliiana* no estuário do rio São Francisco, Brasil. In: XI ENBRAPOA Encontro Brasileiro de Patologistas de Organismos Aquáticos. **Resumos...** Campinas, SP. 19-22 de julho, 2010.

MOSS, J.A.; BURRESON, E.M.; CORDES, J.F.; DUNGAN, C.F.; BROWN, G.D.; WANG, A.; WU, X.; REECE, K.S. Pathogens of *Crassostrea ariakensis* and other Asian oyster species: implications for non-native oyster introduction to Chesapeake Bay. **Disease of Aquatic Organisms**, v. 77, p. 207–223, 2007. DOI: 10.33754/dao01829

MOSS, J.A.; XIAO, J.; DUNGAN, C.F.; REECE, K.S. Description of *Perkinsus beihaiensis* n. sp., a new *Perkinsus* sp. Parasite in Oysters of Southern China. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 55, n. 2, p. 117-130, 2008. DOI: 10.1111/j.1550-7408.2008.00314.x

NASCIMENTO, I.A.; SMITH, D.H.; KERN I.I.F.; PEREIRA, A.S. Pathological findings in *Crassostrea rhizophorae* from Todos os Santos Bay, Bahia, Brazil. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 47, p. 340-349, 1986. DOI: 10.1016/0022-2011(86)90105-9

NAVAS, J.I.; CASTILLO, M.C.; RUIZ-RICO, P.M. Principal parasites observed in the clams, *Ruditapes decussatus* (L), *Ruditapes philippinarum* (Adams et Reeve), *Venerupis pullastra* (Montagu), and *Venerupis aureus* (Gmelin), from Huelva coast (S.W. Spain). **Aquaculture**, v. 107, p. 193-199, 1992.

NÓREN, F.; MOESTRUP, O.; REHNSTAM-HOLM, A.S. Parvilucifera infectans Nóren et Möestrup gen. et sp. nov. (Perkinsozoa phylum nov.): a parasitic flagellate capable of killing toxic microalgae. **European Journal of Protistology**, v. 35, p. 233-254, 1999.

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

OIE – World Animal Health Organization (Office International des Épizooties). **Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals**. 2011a.

OIE – World Animal Health Organization (Office International des Épizooties). **Aquatic Animal Health Code**. 2011b.

PARK, K.; NGO, T.T.T.; CHOI, S.D.; CHO, M.; CHOI, K.S. Occurrence of *Perkinsus olseni* in the Venus clam *Protothaca jedoensis* in Korean waters. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 93, p. 81-87, 2006.

PARK, K.; YANG, H. S.; KANG, H. S.; CHO, M.; PARK, K. J.; CHOI, K.S. Isolation and identification of *Perkinsus olseni* from feces and marine sediment using immunological and molecular techniques. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 105, p. 261-269, 2010. DOI:10.1016/j.jip.2010.07.006

PERKINS, F. O. Zoospore of the oyster pathogen, *Dermocystidium marinum*. Fine structure of the conoid and other sporozoan-like organelles. **Journal of Parasitology**, v. 62, p. 959-974, 1976.

PERKINS, F. Ultrastructure of Vegetative Stages in *Labyrinthomyxa marina* (= *Dermocystidium marinum*), a Commercially Significant Oyster Pathogen. **Journal of Invertebrate Pathology**. v. 13, p. 199-222, 1969.

PETTY, D. ***Perkinsus* Infections of Bivalve Molluscs**. University of Florida, 2010.

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

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

QUEIROGA, F.R.; MARQUES-SANTOS, L.F.; HÉGARET, H.; SOUDANT, P.; FARIAS, N.D.; SCHLINDWEIN, A.D. ; da SILVA, P.M. Immunological responses of

the mangrove oysters *Crassostrea gasar* naturally infected by *Perkinsus* sp. in the Mamanguape Estuary, Paraíba state (Northeastern, Brazil). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 35 p. 319 – 327. 2013. DOI: 10.1016/j.fsi.2013.04.034.

RAGONE, L.M.; BURRESON, E.M; Effect of salinity on infection progression and pathogenicity of *Perkinsus marinus* in the eastern oyster, *Crassostrea virginica* (Gmelin). **Journal of Shellfish Research**, v. 12, p. 1-7, 1993.

RAY, S.M. A culture technique for the diagnosis of infection with *Dermocystidium marinum* Mackin, Owell and Collier in oysters. **Science**, v. 116, p. 360-361, 1952.

RAY, S.M. Biological studies of *Dermocystidium marinum*. **Rice Institute Pamphlet.**, v. 41, p. 1-114, 1954.

REECE, K.S.; DUNGAN, C.F.; BURRESON, E.M. Molecular epizootiology of *Perkinsus marinus* and *P. chesapeaki* infections among wild oyster and clams in Chesapeake Bay, USA. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 82, p. 237-248, 2008.

RIOS, E.C. **Compendium of Brazilian Sea Shells**. Rio Grande, Porto Alegre, 2009.

ROBLEDO, J.A.F.; CÁCERES-MARTÍNEZ, J.; SLUYS, R.; FIGUERAS, A. The parasitic turbellarian *Urastoma cyprinae* (Platyhelminthes: Urastomidae) from blue mussel *Mytilus galloprovincialis* in Spain: occurrence and pathology. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 18, p. 203-210, 1994. DOI: 10.3354/dao018203.

SABRY, R.C.; GESTEIRA, T.C.V.; BOEHS, G. First record of parasitism in the mangrove oyster *Crassostrea rhizophorae* (Bivalvia: Ostreidae) at Jaguaribe River estuary – Ceará, Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 67, n. 4, p. 755-758, 2007.

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

SABRY, R.C., GESTEIRA T.C.V.; MAGALHÃES, A.R.M; BARRACCO, M.A; GUERTLER, C.; FERREIRA, L.P.; VIANNA, R.T.; da SILVA, P.M. Parasitological



survey of mangrove oyster, *Crassostrea rhizophorae*, in the Pacoti river estuary, Ceará state, Brazil. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 112, p. 24-32, 2013.

SABRY, R.C.; ROSA, R.D.; MAGALHÃES, A.R.M.; BARRACCO, M.A.; GESTEIRA, T.C.V.; DA SILVA, P.M. First report of a *Perkinsus* sp. infecting Mangrove oysters *Crassostrea rhizophorae* (Bivalvia: Ostreidae) at Jaguaribe River estuary - Ceará, Brazil. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 67, p. 755-758, 2009.

SANIL, N.K. Occurrence of the protozoan parasite, *Perkinsus olseni* in the wild and farmed Pearl Oyster, *Pinctada fucata* (Gould) from the Southeast coast of India. **Aquaculture**, v. 299, p. 8-14, 2010.

SHAW, B.L.; BATTLE, H.I. The gross and microscopic anatomy of the digestive tract of the oyster *Crassostrea virginica* (Gmelin). **Canadian Journal of Zoology**, v. 35, p. 325-347, 1957. DOI: 10.1139/z57-026

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, p. 229-235, 2008.

SHIMOKAWA, J.; YOSHINAGA, T.; OGAWA, K. Experimental evaluation of the pathogenicity of *Perkinsus olseni* in juvenile Manila clams *Ruditapes philippinarum*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 105, p. 347-351, 2010. DOI: 10.1016/j.jip.2010.08.007

SILVEIRA, F.S.; SANTOS, A. A. **Síntese anual da agricultura de Santa Catarina 2008-2009**. Florianópolis, SC: Epagri/Cepa, 2010.

STEIN, J.E.; MACKIN, J.G. A study of the nature of pigment cells of oysters and the relation of their numbers to the fungus disease caused by *Dermocystidium marinum*. **Texas Journal of Science**, v. 7, p. 422-429, 1955.

VILLALBA, A.; REECE, K.S.; ORDÁS, M.C.; CASAS, S.M.; FIGUERAS, A. Perkinsosis in molluscs: a review. **Aquatic Living Resources**, v. 17, p. 411-432, 2004. DOI: 10.1051/alr:2004050

VILLALBA, A.; CASAS, S.M.; LÓPEZ, C.; CARBALLAL, M.J. Study of perkinsosis in the carpet shell clam *Tapes decussatus* in Galicia (NW Spain). II. Temporal pattern of disease dynamics and association with clam mortality. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 65, p. 257-267, 2005.

VIVIER, E. Réflexions et suggestions à propos de la systématique des sporozoaires: création d'une classe des Hematozoa. **Protistology**, v. 18, p. 449-457, 1982.

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

ZEIDAN, G.C.; LUZ, M.S.A.; BOEHS, G. Parasites of economically important bivalves from the southern coast of Bahia State, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 21, n. 4, p. 391-398. 2012.