



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DO MAR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MARINHAS TROPICAIS

MAXIMIANO PINHEIRO DANTAS NETO

**Patógenos na ostra *Crassostrea rhizophorae* de estuários da costa
setentrional do nordeste brasileiro.**

FORTALEZA

2015

MAXIMIANO PINHEIRO DANTAS NETO

**Patógenos na ostra *Crassostrea rhizophorae* de estuários da costa
setentrional do nordeste brasileiro.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Marinhas Tropicais da Universidade Federal do Ceará, como requisito à obtenção do título de Doutor em Ciências Marinhas Tropicais, área de concentração: Utilização e manejo de ecossistemas marinhos e estuarinos.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Maggioni

Coorientadora: Profa. Dra. Rachel Costa Sabry

FORTALEZA, 2015

À Rachel,

pele amor incondicional

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, Criador e Senhor de tudo, pela oportunidade, força e condição de realizar mais um grande sonho em minha vida.

A minha Mãe, **Margarida Araújo**, pela vida, por todos os anos convividos e pelo suporte dado a mim durante a maior parte dessa pesquisa.

Ao meu orientador, Prof. Dr. **Rodrigo Maggioni**, pela confiança, amizade e apoio no desenvolvimento dessa Tese.

A minha sempre orientadora, Profa. Dra. **Cristina Gesteira**, pelo carinho e por todos os ensinamentos ao longo dos anos que culminaram neste momento.

Ao grande amor, **Rachel Sabry**, pelos incontáveis momentos de dedicação e carinho e pela orientação dada a mim durante toda a caminhada.

A **Rubens Feijó**, amigo e incentivador, pelas imprescindíveis contribuições nas análises moleculares.

A **João Mafaldo**, companheiro de sonhos e angústias, por ter diminuído um pouco mais a aridez desse doutorado.

A **Janaína Araújo** e **Jamille Forte**, pela troca de idéias e por todo o suporte na realização do sequenciamento das amostras deste trabalho.

A **Liana Ferreira** e **Lidiane Romão**, pela ajuda no processamento das amostras e contribuições na elaboração do primeiro *paper* dessa Tese.

A **Tainá Sabino**, por ter participado e ajudado nos primeiros passos para o desenvolvimento dessa investigação.

A turma do VI Curso de Bioinformática em Recife: **João Mafaldo, Jamille Forte, Janaína Araújo, Daniel dos Santos, André Santiago, e Marcela Paz**, pelo companheirismo e momentos de descontração durante a jornada em Pernambuco.

Aos colegas de laboratório **Fagner Nogueira, Graça Coelho, Juliana Gaeta e Vanessa Teles**, sem os quais a estrada seria mais tortuosa.

A **Mayara Barreto**, pela dedicação e ajuda em todos os momentos necessários.

A **Ryan Ramalho**, pelo altruísmo, ajuda na bioinformática e elaboração da árvore de *Neighbor-joining*.

Ao Prof. Dr. **Vicente Faria**, pela amizade e orientações indispensáveis no âmbito da redação científica.

A Dra. **Patrícia Bordallo**, por ter cedido as dependências do Laboratório de Biologia Molecular da EMBRAPA Agroindústria Tropical para as quantificações de DNA.

Ao Prof. Dr. **Raul Isquierdo**, pelas numerosas e úteis informações sobre a problemática da pesca mundial.

A **Lincoln Fernandes** por sua valiosa contribuição na edição do mapa dos estuários investigados nesse estudo.

A **Rivanda Simões**, pelo suporte nas coletas no estuário do Rio Jaguaribe, Ceará.

Aos desconhecidos e eficientes coletores de ostras dos estuários dos rios Carnaubeiras, Maranhão e Camurupim, Piauí.

A **D. Maria do Brazão e Bruno Sabry**, pelos maravilhosos momentos de convivência e simpatia que compartilhamos juntos.

A **Buttowski**, que mesmo sem saber o quanto me fazia feliz, agora sabe o quanto foi importante em todos os momentos que vivemos.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela concessão da bolsa de doutorado.

Ao Instituto de Ciências do Mar – LABOMAR e ao Centro de Diagnóstico de Enfermidades de Organismos Aquáticos – CEDECAM, pela infraestrutura e equipamentos necessários para a realização desta pesquisa.

A Dra. **Isabelle Arzur**, do Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer, por gentilmente ter cedido amostras de controle positivo para as investigações patológicas das ostras desse trabalho.

A Dra. **Noèlia Carrasco**, do Institut Recerca i Tecnologia Agroalimentàries da Catalunya, Espanha, pela atenção e envio de amostras de DNA genômico para as pesquisas patológicas.

A todos os meus amigos e amigas que compartilharam os momentos extra-tese com alegria, força, fé e trabalho. Ao apoio incondicional dado por estes para eu sublimar os percalços da longa jornada da seara científica.

*“Se as coisas são inatingíveis... ora!
Não é motivo para não querê-las...
Que tristes os caminhos,
se não fora a presença distante das estrelas”*

Mário Quintana

Escritor

RESUMO

Os moluscos bivalves, incluindo as ostras, podem ser afetados por uma grande diversidade de patógenos, os quais podem vir a causar enfermidades. Entre estes agentes etiológicos, estão os vírus, bactérias, protozoários e metazoários. Na região nordeste do Brasil, a ostra *Crassostrea rhizophorae* é um recurso estuarino bastante explorado pelas comunidades ribeirinhas e, portanto, estudos que avaliem o estado de saúde desse molusco são importantes. Este trabalho teve como objetivo investigar a ocorrência de parasitas em três importantes estuários do nordeste brasileiro: Jaguaribe (Ceará), Camurupim (Piauí) e Carnaubeiras (Maranhão). As coletas de *C. rhizophorae* em cada estuário foram realizadas nos meses de agosto e setembro de 2011 (período seco; N=450); março, abril (período chuvoso; N=450), outubro e novembro (período seco; N=450) de 2012 e maio e junho (período chuvoso; N= 450) de 2013, totalizando 1.800 animais. As técnicas utilizadas para a detecção dos patógenos foram: cultivo em meio fluido de tioglicolato de Ray (RFTM), reação em cadeia da polimerase (PCR), sequenciamento e histologia. As primeiras análises foram realizadas com as ostras coletadas em 2011. Os ensaios de RFTM revelaram *Perkinsus* sp. com as seguintes prevalências: Jaguaribe = 17,3%, Camurupim = 5,3% e Carnaubeiras = 10,6%. A intensidade de infecção variou de muito leve a severa nos três estuários. As análises de PCR confirmaram *Perkinsus* sp. em 6 ostras e a histologia confirmou 21 casos. As análises histológicas das ostras de todo o período de coletas (2011, 2012 e 2013) evidenciaram hipertrofia dos gametas masculinos, bactérias do tipo *Rickettsia*, protozoários dos gêneros *Sphenophrya*, *Ancistrocoma*, *Steinhausia* e *Nematopsis* e metazoários dos gêneros *Urastoma*, *Tylocephalum* e *Bucephalus*, além de um metazoário não identificado. A hipertrofia de gametas ocorreu em Carnaubeiras (3,3%). Bactérias *Rickettsia* estiveram presentes nos três estuários (período chuvoso e seco), com prevalências variando de 30 a 80%. As prevalências de *Sphenophrya* sp., *Ancistrocoma* sp. e *Steinhausia* sp. foram geralmente baixas. Duas ostras apresentaram hipertrofia celular (xenoma), causada por *Sphenophrya* sp. As prevalências de *Nematopsis* sp. foram elevadas (até 100%) e dos metazoários baixas (3,3% a 10%). As intensidades de infecção foram baixas para todos os patógenos encontrados. Nas ostras coletadas em 2012 e 2013, a maior prevalência de *Perkinsus* spp. observada em RFTM foi de 34%, no estuário do Rio Carnaubeiras, durante o período chuvoso de 2013. Os ensaios por PCR confirmaram 29,89% (87/291) dos resultados positivos em RFTM. O sequenciamento dos fragmentos amplificados da região ITS de *Perkinsus* confirmou a presença de três espécies do patógeno infectando *C. rhizophorae* na região: *P. beihaiensis*, *P. marinus* e *P. chesapeakei*. Análises filogenéticas

colocam a espécie *P. chesapeaki* identificada neste estudo em um grupamento bem definido com outros isolados dos EUA e do Mediterrâneo. Este é o primeiro registro de *P. chesapeaki* infectando *C. rhizophorae* na América do Sul. Considerando os resultados obtidos, é aconselhável um monitoramento constante sobre o estado de saúde de populações de ostras desta e de outras regiões do Nordeste brasileiro.

Palavras-chave: *Perkinsus chesapeaki*, *P. beihaiensis*, *P. marinus*, sanidade, bivalves.

ABSTRACT

Bivalve mollusks, including oysters, can be affected by a wide variety of pathogens which may be causative agents of diseases. Among these etiological agents are viruses, bacteria, protozoa and metazoa. In Northeastern Brazil, the oyster *Crassostrea rhizophorae* is an estuarine resource often exploited by coastal communities and therefore studies that evaluate the health status of this mollusk are important. This study aimed to investigate the occurrence of parasites in three significant estuaries of Northeastern Brazil: Jaguaribe (Ceará), Camurupim (Piauí) and Carnaubeiras (Maranhão). The collections of *C. rhizophorae* in each estuary were held in August and September of 2011 (dry season; N= 450); March, April (rainy season; N= 450), October and November (dry season; N= 450) of 2012 and May and June (rainy season; N= 450) of 2013, totaling 1800 animals. The techniques used for pathogens detection were culture in Ray's fluid thioglycollate medium (RFTM), polymerase chain reaction, (PCR), sequencing and histology. The first analyses were held with oysters collected in 2011. The RFTM assays revealed *Perkinsus* with the follow prevalences: Jaguaribe= 17.3%, Camurupim= 5.3%, Carnaubeiras= 10.6%. The intensity of infection ranged from very light to severe in the three estuaries. PCR analyzes confirmed *Perkinsus* sp. in 6 oysters and histology confirmed 21 cases. Histological analyses of oysters in all collection periods (2011, 2012 and 2013) evidenced hypertrophy of male gametes, *Rickettsia*-type bacteria and protozoa of genera *Sphenophrya*, *Ancistrocoma*, *Steinhausia* and *Nematopsis* and metazoa of genera *Urastoma*, *Tylocephalum* and *Bucephalus*, and yet an unidentified metazoa. Hypertrophy of gametes occurred in Carnaubeiras (3.3%). Bacteria *Rickettsia* were present in the three estuaries (rainy and dry season) with prevalences ranging from 30 to 80%. The prevalences of *Sphenophrya* sp., *Ancistrocoma* sp., and *Steinhausia* sp. were generally low. Two oysters presented cellular hypertrophy (xenoma) caused by *Sphenophrya* sp. *Nematopsis* sp. prevalences were high (up to 100%) and low in metazoa (3.3 to 10%). The intensities of infection were low to all found pathogens. In oysters collected in 2012 and 2013, the highest prevalence observed in RFTM was 34% in the estuary of Carnaubeiras River during the rainy season of 2013. PCR assays confirmed 29.89% (87/291) of positive results in RFTM. The sequencing of the amplified fragments from the ITS region of *Perkinsus* confirmed the presence of three species infecting *C. rhizophorae* in the region: *P. beihaiensis*, *P. marinus* and *P. chesapeaki*. Phylogenetic analyzes place the species *P. chesapeaki* identified in this study in a well-defined grouping with other isolates from the USA and the Mediterranean. This is the first record of *P. chesapeaki* infecting *C. rhizophorae*

in South America. Considering these findings, it is recommended a constant monitoring of the health status of populations of oysters from this and other regions of Northeastern Brazil.

Keywords: *Perkinsus chesapeaki*, *P. beihaiensis*, *P. marinus*, sanity, bivalves.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO II

- Figura 1.** Seções histológicas mostrando células de *Perkinsus* sp. infectando a ostra *Crassostrea rhizophorae*. (A) Hipnósporos de *Perkinsus* sp. em tecidos de brânquias de *C. rhizophorae* após incubação em RFTM e corados com solução de lugol. Barra de escala= 50 μ m. (B) Trofozoíto de *Perkinsus* sp. (seta) no tecido conjuntivo próximo a glândula digestiva. Barra de escala= 20 μ m.....44
- Figura 2.** Diagnóstico molecular de *Perkinsus* sp. em gel de agarose 1,5%. Detecção da região ITS do rDNA de *Perkinsus* sp. por PCR. M: marcador molecular (1 Kb Plus, Invitrogen), C-: controle negativo (água ultra pura); C+: controle positivo; linhas 1 (CE); 2 (CE), 3 (PI); 4 (MA); 5 (PI) e 6 (CE): amostras positivas.....44

CAPÍTULO III

- Figura 1** – Coleta de ostras *Crassostrea rhizophorae* no estuário do Rio Camurupim no Estado do Piauí 55
- Figura 2** – Célula hipertrofiada (seta) no folículo masculino de *Crassostrea rhizophorae*. Barra de escala= 20 μ m. Coloração: HE..... 57
- Figura 3** – Colônias de bactérias do tipo *Rickettsia* detectadas em *Crassostrea rhizophorae*. Barra de escala= 20 μ m. Coloração: HE..... 58
- Figura 4-** Protozoários observados em tecidos de *Crassostrea rhizophorae* dos estuários dos rios Jaguaribe (CE), Camurupim (PI) e Carnaubeiras (MA) em 2011, 2012 e 2013. (A) *Sphenophrya* sp. nas brânquias (seta). *Sphenophrya* sp. causando xenoma nos filamentos branquiais: estágio inicial (B) e em estágio avançado (C). (D) *Ancistrocoma* sp. (seta) em um túbulo digestivo. (E). Oócito mostrando vacúolo parasitário com esporos de *Steinhausia* sp. (seta) no citoplasma. (F) Oocistos de *Nematopsis* sp. (seta) no tecido conjuntivo. Barras de escala: Figs. A, D, E e F = 20 μ m; Figs. B e C = 200 μ m. Coloração: HE.....61

Figura 5 - Metazoários observados na ostra *Crassostrea rhizophorae* dos estuários dos rios Jaguaribe, Camurupim e Carnaubeiras em 2011, 2012 e 2013. (A) *Urastoma* sp. entre os filamentos branquiais. (B) Esporocistos de *Bucephalus* sp. (C) *Tylocephalum* sp. (seta) no tecido conjuntivo em torno da glândula digestiva. (D) Metazoário não identificado encistado no tecido conjuntivo das brânquias (seta). Barras de escala: Figs. A e D= 200 µm; Figs. B e C= 50 µm. Coloração: HE..... 63

CAPÍTULO IV

Figura 1 - Mapa indicando os estuários nos estados do Ceará, Piauí e Maranhão onde foram realizadas as coletas da ostra *Crassostrea rhizophorae*. (1) Rio Jaguaribe; (2) Rio Camurupim e (3) Carnaubeiras. Área mais clara do mapa do Brasil indica a região Nordeste. 81

Figura 2 – Hipnósporos de *Perkinsus* sp. (seta) infectando brânquias da ostra *Crassostrea rhizophorae* após incubação em meio líquido de tioglicolato de Ray. Barra de escala=50µm.....89

Figura 3 – Diagnóstico molecular da região ITS do DNA ribossômico de espécies do gênero *Perkinsus* em *Crassostrea rhizophorae*. Eletroforese em gel de agarose 1%. M: marcador molecular; BR: branco; C+: controle positivo; MA: Maranhão; PI: Piauí; CE: Ceará; Pb: *Perkinsus beihaiensis*. Pc: *Perkinsus chesapeaki*; Pm: *Perkinsus marinus*..... 90

Figura 4 – Árvore gerada a partir da análise de *Neighbor-Joining* baseada nas sequências obtidas nesse trabalho e as demais acessadas no GenBank. As amostras sequenciadas neste estudo estão em destaque. Valores de *bootstrap* (10.000 réplicas) estão indicados nos nós.... 91

Figura 5 – *Perkinsus beihaiensis* (seta) infectando o tecido conjuntivo da ostra *Crassostrea rhizophorae*. (A) Trofozoíto mostrando uma forma anelada. (B) Detalhe do vacúolo (v) ocupando um grande volume da célula. Barras de escala= 10µm. Coloração: HE.....92

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II

Tabela 1. Prevalência (%) de infecção por *Perkinsus* sp., em 450 espécimes da ostra *Crassostrea rhizophorae* coletada em três estuários no Nordeste do Brasil: Jaguaribe (Ceará), Camurupim (Piauí) e Carnaubeiras (Maranhão). O número de ostras positivas para *Perkinsus* é mostrado entre parênteses para cada técnica de diagnóstico.....44

CAPÍTULO III

Tabela 1 – Prevalência (%) de parasitas detectados na ostra *Crassostrea rhizophorae* nos estuários dos Rios Jaguaribe (JAG), Camurupim (CAM) e Carnaubeiras (CAR) em 2011, 2012 e 2013. PS= Período Seco, PC= Período Chuvoso. Corte histológico (N=30)..... 60

CAPÍTULO IV

Tabela 1 – Prevalência (%) e intensidade média de infecção (1–4) de *Perkinsus* sp., infectando a ostra *Crassostrea rhizophorae* coletada nos estuários dos rios Carnaubeiras (CAR), Camurupim (CAM) e Jaguaribe (JAG) e através do cultivo em RFTM. *n*= número de ostras analisadas; A: altura ostras em mm (*n*=30) (média ± DP). PC (Período chuvoso) e PS (período seco); T°C= temperatura da água; S(PSU)= Salinidade.....88

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- BLAST – Ferramenta de Busca de Alinhamento Básico Local (*Basic Local Alignment Search Tool*)
- bp – pares de base (*base pairs*)
- CAM – Rio Camurupim (PI)
- CAR – Rio Carnaubeiras (MA)
- CAS- Síndrome do abscesso crônico (*Chronic Abscess Syndrome*)
- CE – Estado do Ceará
- CEDECAM – Centro de Diagnóstico de Enfermidades de Organismos Aquáticos
- DNA – Ácido Desoxirribonucléico (*Deoxyribonucleic Acid*)
- DNAzol® – Reagente para extração de DNA
- dNTP – Desoxirribonucleotídeo Trifosfato (*Deoxynucleotide Tri-Phosphate*)
- EDAS – Sistema de Análise e Fotodocumentação de Eletroforese (*Electrophoresis Documentation and Analysis System*)
- EDTA – Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético (*Ethylene Diamine Tetra Acetic Acid*)
- EUA – Estados Unidos da América
- FASTA – Formato em texto para representar sequências de nucleotídeos
- FAO- Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (*Food and Agriculture Organization of the United Nations*)
- GenBank – Banco de dados de armazenamento de informação sobre sequências nucleotídicas
- GNV – Vírus da necrose das brânquias (*Gill Necrose Vírus*)
- HIV – Vírus da infecção hemocítica (*Hemocytic Infection Vírus*)
- IFREMER- Instituto francês de pesquisas para a exploração do mar (*Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer*)
- ISH – Hibridização *in situ* (*In Situ Hybridization*)
- ITS – Forward e ITS-Reverse- Par de iniciadores *forward* e *reverse* da região do espaçador interno transcrito do rDNA
- JAG – Rio Jaguaribe
- JOD – Doença da ostra juvenil (*Juvenile Oyster Disease*)
- KCl-- Cloreto de potássio
- LABOMAR – Instituto de Ciências do Mar
- LB Agar – Meio enriquecido em ágar utilizado para crescimento de bactérias (*Lysogeny Broth*)

MA – Estado do Maranhão

MgCl₂ – Cloreto de Magnésio

MPA – Ministério da Pesca e Aquicultura do Brasil

NaCl – Cloreto de sódio

NANODROP – Aparelho espectrofotômetro utilizado para quantificação de ácidos nucleicos

NCBI – Centro Nacional para Informações de Biotecnologia (*National Center for Biotechnology Information*)

OIE – Organização Mundial para a Saúde Animal (*World Organization for Animal Health*)

OVVD – Vírus da Doença Velar em Ostras (*Oyster Velar Virus Disease*)

PC – Período chuvoso

PCR – Reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction*)

Perk ITS – Iniciadores da região do espaçador interno transcrito do rDNA de *Perkinsus*

PI – Estado do Piauí

pGEM-T – Sistema utilizado para clonagem de produtos de PCR

PS – Período seco

PSU – Unidade prática de salinidade (*Practical Salinity Unit*)

PureLink™ – Kit de extração e purificação de gel de agarose

RFTM – Meio fluido de tioglicolato de Ray (*Ray's Fluid Thioglycollate Medium*)

rRNA – Ácido ribonucleico ribossômico (*ribosomal Ribonucleic Acid*)

SDS – Detergente utilizado para desnaturação de proteínas (*Sodium Dodecyl Sulfate*)

SOC – Meio de cultura utilizado na etapa final de transformação da bactéria *Escherichia coli*

TAE – Solução-tampão para eletroforese contendo uma mistura de Tris-base, ácido acético e EDTA

Taq DNA polimerase – Enzima termoestável, utilizada na amplificação de fragmentos de DNA através da PCR

TE – Solução-tampão utilizada para solubilizar e evitar degradação do DNA

TEM – Microscopia eletrônica de transmissão (*Transmission Electron Microscopy*)

TRIS – Composto orgânico utilizado como componente de soluções-tampão

TOP10F – Células quimicamente competentes de *E. coli*

Tris-HCl – Solução-tampão utilizada na extração de DNA por fenol (*Tris-Hydrochloride*)

VGH – Hipertrofia gametocítica viral (*Viral Gametocytic Hypertrophy*)

SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO	22
2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA (CAPÍTULO I)	24
2.1 Doenças causadas por vírus.....	24
2.1.1. Iridovírus.....	24
2.1.2. Herpesvírus.....	25
2.1.3. Hipertrofia Gametocítica Viral (VH).....	25
2.2. Doenças causadas por bactérias.....	25
2.3. Doenças causadas por fungos.....	26
2.4. Doenças causadas por protozoários.....	27
2.4.1. <i>Steinhausia</i> sp. (Microspora).....	27
2.4.2. <i>Trichodina</i> , <i>Ancistocroma</i> e <i>Sphenophrya</i> (Ciliophora).....	27
2.4.3. <i>Nematopsis</i> sp. (Apicomplexa).....	28
2.5. Doenças causadas por metazoários.....	29
2.5.1. Trematódeos digenéticos.....	29
2.5.2. <i>Tylocephalum</i> sp.....	29
2.5.3. <i>Polydora</i> sp.....	30
2.5.4. <i>Urastoma</i> sp.....	30
2.6. Patógenos de declaração obrigatória a Organização Mundial para Saúde Animal OIE.....	30
2.6.1. <i>Bonamia exitiosa</i> e <i>B. ostreae</i>	31
2.6.2. <i>Marteilia refringens</i>	31
2.6.3. <i>Perkinsus marinus</i> e <i>P. olseni</i>	32
2.7. Outras espécies de <i>Perkinsus</i>	34
2.7.1. <i>Perkinsus beihaiensis</i>	34
2.7.2. <i>Perkinsus chesapeakei</i>	34
3- OBJETIVOS	35
3.1. Objetivo geral.....	35
3.2. Objetivos específicos.....	35

CAPÍTULO II - <i>Perkinsus</i> sp. infectando a ostra <i>Crassostrea rhizophorae</i> de estuários do nordeste setentrional, Brasil	36
RESUMO	37
ABSTRACT	38
1- INTRODUÇÃO	39
2- MATERIAL E MÉTODOS.	41
2.1. Amostragem das ostras	41
2.2. Incubação em RFTM	41
2.3. Detecção de <i>Perkinsus</i> pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	42
2.4. Seções histológicas	42
3- RESULTADOS.	43
3.1. Detecção de <i>Perkinsus</i> por análise RFTM	43
3.2. Detecção de <i>Perkinsus</i> por PCR.....	43
3.3. Análises histopatológicas	43
4- DISCUSSÃO.....	45
REFERÊNCIAS.	46
CAPÍTULO III – Parasitas na ostra do mangue <i>Crassostrea rhizophorae</i> de regiões estuarinas do nordeste setentrional, Brasil	50
RESUMO.	51
ABSTRACT.	52
1- INTRODUÇÃO.....	53
2- MATERIAL E MÉTODOS.	55
2.1. Área de estudo	55
2.2. Amostragem das ostras	55
2.3. Procedimentos histológicos.....	56
3- RESULTADOS.	56
3.1. Hipertrofia gametocítica viral	57
3.2. Bactérias do tipo <i>Rickettsia</i>	57
3.3. Protozoários.....	58

3.4. Metazoários	62
4- DISCUSSÃO.....	63
REFERÊNCIAS	67
CAPÍTULO IV – Primeiro registro de <i>Perkinsus chesapeaki</i> infectando a ostra <i>Crassostrea rhizophorae</i> na América do Sul	76
RESUMO.	77
ABSTRACT.	78
1- INTRODUÇÃO.....	79
2- MATERIAL E MÉTODOS.	81
2.1. Área de estudo	81
2.2. Amostragem das ostras	82
2.3. . Incubação de tecidos em meio líquido de tioglicolato de Ray (RFTM)	82
2.4. Extração de DNA total.....	83
2.5. Clonagem e produção de controles positivos para detecção de <i>Perkinsus</i> spp	84
2.6. Detecção de <i>Perkinsus</i> por reação em cadeia da polimerase (PCR)	85
2.7. Sequenciamento do DNA.....	85
2.8. Elaboração da árvore filogenética	86
2.9. Procedimentos histológicos.....	86
3- RESULTADOS.	87
3.1. Ensaio de RFTM	87
3.2. Detecção de <i>Perkinsus</i> por reação em cadeia da polimerase (PCR)	89
3.3. Sequenciamento do DNA.....	89
3.4. Análises histológicas.....	92
4- DISCUSSÃO.....	92
REFERÊNCIAS	95
4. CONCLUSÕES GERAIS.	100
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	101
6. REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO.....	102

1. INTRODUÇÃO

A aquicultura tem experimentado, nos últimos anos, um desenvolvimento extraordinário e se apresentado como uma atividade promissora no cenário mundial, pois é uma importante fonte de proteína voltada para alimentação humana. Em nível mundial, a aquicultura produziu 90,4 milhões de toneladas em 2012, sendo que destes, 66,6 milhões referem-se à produção de peixes planos, crustáceos, moluscos e outros animais aquáticos e 23,8 milhões corresponderam a algas. Entre os anos de 1980 e 2012, o volume de produção dessa atividade cresceu a uma taxa média de 8,6% ao ano (FAO, 2014).

O Brasil, segundo um levantamento do Ministério da Pesca e Aquicultura realizado em 2013, produziu, aproximadamente, 2 milhões de toneladas de pescado, sendo 40% cultivados (MPA, 2014). Entre as atividades aquícolas, a malacocultura (cultivo de moluscos) representa um papel importante, sendo o Estado de Santa Catarina destaque nesse setor. A produção total de moluscos (mexilhões – *Perna perna*, ostras - *Crassostrea gigas* e vieiras – *Nodipecten nodosus*) comercializados em 2013 naquele Estado foi de 19.082,4 toneladas (t), sendo 16.147t, 2.932,5t e 28,7t, para mexilhões, ostras e vieiras, respectivamente (SANTOS; COSTA, 2014).

No que diz respeito ao extrativismo nacional entre os moluscos, o mexilhão *P. perna* apareceu como a espécie mais capturada em 2011, com 3.772,5t, o que representou aproximadamente 27% do total desta categoria. A segunda espécie mais capturada foi o sururu (*Mytella guyanensis*), com 2.133,3t, seguida do polvo com 2.089,6t. A captura de lulas foi de 1.623,6t e de ostras foi de 1.233,7t nesse mesmo ano (MPA, 2011).

Os bivalves marinhos pertencem a uma classe de invertebrados amplamente distribuídos e comercializados em todo o mundo. No Brasil, estes organismos têm importante papel alimentar e comercial, principalmente entre populações ribeirinhas localizadas às margens de rios e estuários. Devido à expansão da produção aquícola, sobre-exploração de bancos naturais e ao transporte indiscriminado entre regiões produtoras, enfermidades introduzidas nestes ambientes podem causar relevantes danos econômicos nos cultivos, assim como impactos deletérios nas populações silvestres (MAGALHÃES; FERREIRA, 2006). Desta forma, a avaliação e o monitoramento de patógenos que afetam as atividades aquícolas se apresentam como importantes ferramentas para o manejo e para a sanidade dos estoques naturais e cultivados. A transferência de moluscos entre regiões pode propagar patógenos de

grande importância para a sanidade destes organismos, como foi o caso de *Bonamia ostrea* em *Ostrea edulis* da América do Norte para a França (BOWER; McGLADDERY; PRICE, 1994) e posteriormente, para a maior parte da costa atlântica da Europa (SINDERMANN, 1991). Além disso, a internacionalização do comércio e o transporte de pescado vivo (dentro destes os moluscos) faz da aquicultura um vetor potencial de disseminação de patologias, que, por sua vez, podem alterar a biologia populacional de espécies silvestres. Desta forma, a avaliação e o monitoramento de patógenos que afetam as atividades aquícolas se apresentam como importantes ferramentas para o manejo e para a sanidade dos estoques naturais e cultivados.

Segundo Boehs *et al.* (2012) os bivalves de maior interesse econômico da costa brasileira são representados pelas espécies: *Crassostrea rhizophorae* (Guilding, 1828) e *C. gigas* (Thunberg, 1793) – Ostreidae; *Perna perna* (Linnaeus, 1758), *Mytella guyanensis* (Lamarck, 1819) e *M. falcata* (Orbigny, 1846) – Mytilidae; *Lucina pectinata* (Gmelin, 1791) – Lucinidae; *Tagelus plebeius* (Lightfoot, 1786) – Psammobiidae; *Anomalocardia brasiliiana* (Gmelin, 1791) – Veneridae e *Nodipecten nodosus* (Linnaeus, 1758) – Pectinidae. Na região Nordeste do país, quase todas essas espécies ocorrem em abundância, sendo consumidas e comercializadas pelas comunidades ao longo dos estuários.

Pelo exposto e pela relevância das pesquisas sobre patologias em organismos aquáticos realizadas no mundo e no Brasil, no presente trabalho foram estudadas populações nativas da ostra do mangue *C. rhizophorae* ao longo de dois anos em três estuários da costa nordeste brasileira – setor setentrional, com a finalidade de se avaliar o estado de saúde dessas populações e identificar patógenos que podem ter potenciais impactos em futuras iniciativas de malacocultura na região.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA (CAPÍTULO I)

2.1. Doenças causadas por vírus

Mortalidades em moluscos bivalves têm sido associadas a vírus pertencentes a diferentes famílias (RENAULT; NOVOA, 2004). Comps *et al.* (1976), Comps e Bonami (1977); Comps e Duthoit (1979) relataram mortalidades em massa da ostra portuguesa *Crassostrea angulata* em cultivos na França no final da década de 1960 e início da década de 1970 associadas a infecções por iridovírus. Outras viroses descritas para bivalves são pertencentes às famílias Herpesviridae, Papovaviridae, Togaviridae, Retroviridae, Birnaviridae, Reoviridae e Picornaviridae (RENAULT; NOVOA, 2004). As famílias Papillomaviridae e Polyomaviridae foram descritas como agentes causadores da Hipertrofia Gametocítica Viral (VGH) (BOWER *et al.*, 1994).

2.1.1. Iridovírus

De acordo com Renault e Novoa (2004) doenças causadas por iridovírus em bivalves têm sido relatadas em diferentes países do mundo. Esses autores relataram mortalidade massiva na ostra portuguesa *C. angulata* na costa da França entre 1966 e 1968 e novamente em 1970, causada pelo vírus da necrose das brânquias (GNV) e o vírus da infecção hemocítica (HIV). Entre os sintomas da GNV estão o aparecimento de manchas amarelas nas brânquias e nos palpos labiais, com total destruição dos filamentos branquiais. Quanto ao HIV, apesar de este aparentemente não causar sinais externos da doença, pode-se ter uma coloração acinzentada da massa visceral em alguns casos e degeneração do tecido conjuntivo.

Outros autores (ELSTON, 1979; ELSTON; WILKINSON, 1985) relataram mortalidade causada pelo vírus da doença velar em ostras (OVVD), o qual foi registrado em larvas de ostras *Crassostrea virginica* da costa oriental da América do Norte. Indivíduos infectados com OVVD são menos ativos que animais normais, devido ao aparecimento de bolhas no *velum* e perda de cílios nas células, tornando-os incapazes de se moverem normalmente.

2.1.2. Herpesvírus

Diversos autores têm relatado infecções em bivalves causadas por herpesvírus em diversas partes do mundo. Mortalidades em larvas de *Crassostrea gigas* na França e na Nova Zelândia foram associadas a este tipo de vírus (NICOLAS; COMPS; COCHENNEC, 1992; HINE; WESNEY; HAY, 1992). Infecções também foram relatadas em sementes dessa mesma espécie na Califórnia (ICES, 2004), em *Ostrea angasi* na Austrália (HINE; THORNE, 1997), em larvas de *Tiostrea chilensis* da Nova Zelândia (HINE; WESNEY; BESANT, 1998), em larvas da ostra plana europeia *O. edulis* na França (COMPS; COCHENNEC, 1993) e em larvas de *C. gigas* e *Ruditapes philippinarum* na França (RENAULT; LIPART; ARZUL, 2001b). A sintomatologia inclui redução na alimentação e na natação das larvas, lesões no manto, mortalidades de sementes e lesões no tecido conjuntivo de larvas infectadas.

2.1.3. Hipertrofia Gametocítica Viral (VGH)

O primeiro relato de Hipertrofia Gametocítica Viral (VGH) foi feito em *C. virginica* nos EUA (FARLEY, 1976), sendo a mesma descrita por Bower *et al.* (1994). Essa enfermidade já foi documentada em *C. gigas* na Coreia (CHOI *et al.*, 2004), na França (GARCIA *et al.*, 2006) e Alemanha (WATERMANN *et al.*, 2008) e em *C. hongkongensis* na China (MOSS *et al.*, 2007). No Brasil, a VGH foi detectada em *C. gigas* de cultivo (PONTINHA, 2009; SABRY *et al.*, 2011) e em *C. rhizophorae* de ambiente natural (SABRY *et al.*, 2011) na região de Florianópolis, Santa Catarina.

2.2. Doenças causadas por bactérias

As doenças bacterianas que acometem bivalves são mais frequentemente descritas em estágios larvais e estão associadas a altas taxas de mortalidade em larviculturas (PAILLARD; LE ROUX; BORREGO, 2004). A identificação de bactérias patogênicas é dificultada nestes organismos devido ao fato destes serem filtradores e, assim, acumular em seus tecidos uma rica microbiota comensal composta de várias espécies de microorganismos (PAILLARD; LE ROUX; BORREGO, 2004).

Em indivíduos adultos de *Ruditapes philippinarum*, foram relatados casos da doença do anel marrom (BRD) (PAILLARD; MAES, 1990), nocardiose em *Crassostrea gigas* (FRIEDMAN *et al.*, 1991a; FRIEDMAN, HEDRICK, 1991b; LACOSTE *et al.*, 2001) e a doença da ostra juvenil (JOD) na ostra americana *C. virginica* (BRICELJ *et al.*, 1992). Além das doenças já citadas, há relatos de erosões no ligamento das valvas em *C. gigas* causadas por bactérias citófagas (DUNGAN; ELSTON 1989) e da síndrome do abscesso crônico (CAS) em *C. gigas* (ELSTON; FRELIER; CHENEY, 1999). Outros autores atribuem mortalidades de bivalves à presença de bactérias inespecíficas (TUBIASH; OTTO; HUGH, 1973; PASS; DYBDAHL; MANNION, 1987). Estas doenças bacterianas se manifestam como lesões no manto, nas brânquias e no ligamento, bem como em depósitos de conchiolina no interior das valvas.

No Brasil, bactérias do tipo *Rickettsia* foram observadas em *Anomalocardia brasiliiana* no Ceará (FERREIRA *et al.*, 2008), em *Mytella guyanensis* na Bahia (BOEHS *et al.*, 2010) e em *Crassostrea gigas* em Santa Catarina (PONTINHA, 2009), entretanto, nenhum destes autores relatou danos graves ao hospedeiro.

Uma bactéria do tipo *Rickettsia* de declaração obrigatória à OIE, *Xenohaliotis californiensis*, causa infecção no epitélio gastrointestinal em *Haliotis* spp. (FRIEDMAN *et al.*, 2000).

2.3. Doenças causadas por fungos

Fungos são organismos que podem biodegradar a matriz calcárea das conchas de bivalves e causar infecções em larvas e indivíduos adultos (KINNE, 1983). O fungo *Ostracoblabe implexa* provoca a doença conhecida como enfermidade do pé, da concha ou da charneira. Figueiras e Villalba (1988) relataram grandes mortalidades provocadas por este organismo em *Ostrea edulis* na Inglaterra, França e Holanda. Inicialmente a doença se manifesta como manchas brancas na camada sub-nacarada, dando um aspecto áspero à mesma (KINNE, 1983). À medida que os fungos se desenvolvem, a doença atinge o manto, cujas células epiteliais secretam material protéico originando depósitos de conchiolina na região interna das valvas (BOEHS *et al.*, 2012), podendo prejudicar o fechamento das mesmas.

Há registro da ocorrência desse tipo de micose no Brasil em ostras *Crassostrea gigas* no Estado de Santa Catarina (SILVEIRA JR; MAGALHÃES; 2000) e em *C. rhizophorae* (SABRY; MAGALHÃES, 2005). Entretanto, nestes casos, não houve identificação do agente etiológico.

2.4. Doenças causadas por protozoários

Devido à sua patogenicidade e relação com altas mortalidades e prejuízos econômicos, os protozoários são um dos mais importantes grupos causadores de enfermidades em moluscos marinhos (LAUCKNER, 1983). Uma descrição dos principais gêneros que provocam doenças em bivalves marinhos é dada a seguir.

2.4.1. *Steinhausia* sp. (Microspora)

Steinhausia sp. é um parasita intracelular que infecta o citoplasma de oócitos de moluscos, desencadeando uma resposta de defesa do hospedeiro através da infiltração de hemócitos (BOWER; MCGLADDERY; PRICE, 1994). Têm-se registros de *Steinhausia mytilovum* no bivalve *Cerastoderma edule* na Espanha (CARBALLAL *et al.*, 2001) e em *Mytella guyanensis* no estuário do Rio Amazonas (MATOS; MATOS; AZEVEDO, 2005). Em Florianópolis, SC, Pontinha *et al.* (2010) relataram protozoários do tipo *Steinhausia* parasitando oócitos de *Brachidontes solisianus* e Sabry *et al.* (2011) detectaram a ocorrência desse patógeno no citoplasma de oócitos em *Crassostrea gigas* e *C. rhizophorae*. Apesar de infectarem os tecidos gonadais, parece não haver danos à gametogênese dos indivíduos infectados, talvez devido à baixa prevalência e poucos parasitas/célula germinativa (LAUCKNER, 1983).

2.4.2. *Trichodina*, *Ancistrocoma* e *Sphenophrya* (Ciliophora)

Os ciliados dos gêneros *Trichodina*, *Ancistrocoma* e *Sphenophrya* ocorrem em uma grande variedade de moluscos bivalves. A ocorrência de *Trichodina* pode causar lesões nos tecidos branquiais de moluscos e trazer prejuízos ao seu funcionamento. (LAUCKNER, 1983; FIGUERAS; VILLALBA, 1988). *Trichodina* sp. foi detectado em ostras *Crassostrea*

gigas de cultivo em Santa Catarina (SABRY; MAGALHÃES, 2005; PONTINHA, 2009; DA SILVA *et al.*, 2010) e em *Crassostrea rhizophorae* de estoque natural da Baía de Camamu, Bahia (BOEHS; LENZ; VILLALBA., 2008). Em venerídeos, *Trichodina* sp. foi observado em *Anomalocardia brasiliiana* de estoques naturais (BOEHS; MAGALHÃES, 2004; DA SILVA *et al.*, 2010). Em todos os casos, a intensidade de infecção foi relatada como sendo baixa e sem causar danos aparentes aos hospedeiros.

No Brasil, ciliados do gênero *Ancistrocoma* foram detectados em *Crassostrea rhizophorae* da Bahia (NASCIMENTO *et al.*, 1986; BRANDÃO, BOEHS, DA SILVA, 2013; COVA *et al.*, 2015), em *C. gigas* de cultivo (PONTINHA, 2009; SABRY *et al.*, 2011), em *C. rhizophorae* de bancos naturais em Florianópolis, SC (SABRY *et al.*, 2011) e em *C. rhizophorae* do Rio Pacoti, CE (SABRY *et al.*, 2013) sem causar danos.

Protozoários do gênero *Sphenophrya* podem ocorrer em várias espécies de bivalves marinhos, não estando relacionados à mortalidade (LAUCKNER, 1983; BOWER; MCGLADDERY; PRICE, 1994), porém quando em alta intensidade pode causar hipertrofia da célula e de seu núcleo (xenoma). A formação de xenomas foi observada na ostra *Crassostrea virginica* na Flórida e em New Hampshire, EUA (WINSTEAD, 2004; McGURK, 2013). No Brasil, *Sphenophrya* foi registrado em *C. gigas* e *C. rhizophorae* de Florianópolis (SABRY *et al.*, 2011) e em *C. rhizophorae* do estuário do Rio Pacoti (SABRY *et al.*, 2013), sem contudo causar danos aparentes aos hospedeiros. Entretanto, este ciliado causou a formação de xenomas no epitélio das brânquias de *C. rhizophorae* na Bahia, devido à sua ação de hipertrofiar as células infectadas (BOEHS; LENZ; VILLALBA, 2009a; BRANDÃO, BOEHS, DA SILVA, 2013; LUZ, BOEHS, 2015).

2.4.3. Nematopsis (Apicomplexa)

Nematopsis spp. são parasitas intrahemocíticos cujos sítios preferenciais de infecção são as brânquias e o manto, mas podem também ser encontrados na glândula digestiva, palpos labiais e pé de bivalves (BOEHS *et al.*, 2012). Há registros de *Nematopsis* infectando *Crassostrea rhizophorae* na Bahia (BOEHS *et al.*, 2008), no Ceará (SABRY; GESTEIRA; BOEHS, 2007) e em Santa Catarina (da SILVA *et al.*, 2010).

Ocorrências de *Nematopsis* também foram registradas em *Perna perna* no Rio de Janeiro (LIMA, ABREU; MESQUITA, 2001) e em *Tagelus plebeius* na Bahia (SANTOS;

BOEHS; CEUTA, 2007). Vale salientar a observação feita por Boehs *et al.* (2009b), que a frequência de ocorrência desses parasitas nos moluscos tem ligação com a presença de crustáceos compartilhando o mesmo ambiente.

2.5. Doenças causadas por metazoários

2.5.1. Trematódeos Digenéticos (Digenea)

Trematódeos digenéticos são parasitas frequentes de bivalves marinhos, podendo, entre outros danos, causar castração parasitária (BOEHS *et al.*, 2012). Entre estes, os bucefalídeos utilizam moluscos como hospedeiros intermediários e peixes carnívoros como hospedeiros definitivos (CHENG, 1978). Diversos autores relataram a ocorrência de bucefalídeos no Brasil parasitando *Crassostrea rhizophorae* (NASCIMENTO *et al.*, 1986; ROMÃO *et al.*, 2010; BRANDÃO; BOEHS; DA SILVA, 2013; ROMÃO *et al.*, 2014; LUZ; BOEHS, 2015), *Perna perna* (UMIJI; LUNETTA; LEONEL, 1976; DA SILVA; MAGALHÃES; BARRACCO, 2012), *Mytella guyanensis* (BOEHS *et al.*, 2009b; CEUTA; BOEHS, 2012), *Lucina pectinata* (OLIVEIRA, 2008) e *Anomalocardia brasiliana* (ARAÚJO; ROCHA-BARREIRA, 2004; DA SILVA; MAGALHÃES; BARRACCO, 2012).

A bucefalose (também conhecida como doença laranja em mitilídeos) pode, por vezes, ser diagnosticada macroscopicamente pela coloração alaranjada do manto, daí seu nome. Ocorre em gônadas, glândula digestiva e brânquias e em alguns casos pode causar reação do hospedeiro por infiltração hemocitária focal, como descrito em *P. perna* (DA SILVA, MAGALHÃES; BARRACCO, 2002) e em *Mytella guyanensis* e *Anomalocardia brasiliana* (BOEHS *et al.*, 2009b).

2.5.2. *Tylocephalum* sp. (Cestoda)

Tylocephalum sp. parasita bivalves marinhos em todo o mundo (LAUCKNER, 1983). Na costa brasileira, *Tylocephalum* foi registrado em ostras de cultivo *Crassostrea gigas* e *C. rhizophorae* (SABRY; MAGALHÃES, 2005), em *Anomalocardia brasiliana* (BOEHS; MAGALHÃES, 2004), em *Mytella guyanensis* (CEUTA, 2010) e em *Perna perna* (da SILVA *et al.*, 2010). A infestação desses cestóides, geralmente na glândula digestiva

(BOEHS *et al.*, 2012), provoca infiltração hemocitária e encapsulamento do parasita (SINDERMANN, 1970).

2.5.3. *Polydora* sp. (Polychaeta)

Poliquetas do gênero *Polydora*, são anelídeos que escavam túneis ou galerias na concha de bivalves e estes, quando alcançam o manto, provocam a reação do animal pela deposição de conchiolina, a qual é preenchida com lodo pelo poliqueta causando um aspecto antiestético ao molusco e comprometendo sua comercialização (FIGUERAS; VILLALBA, 1988; BOEHS *et al.*, 2012).

Altas prevalências de *P. websteri* foram registradas em *Crassostrea gigas* e em *C. rhizophorae* (SABRY; MAGALHÃES, 2005), bem como em *A. brasiliana* (BOEHS; MAGALHÃES, 2004) e em *Perna perna* (COSTA, 2007).

2.5.4. *Urastoma* sp. (Turbellaria)

Metazoários do gênero *Urastoma* habitam o manto, brânquias e trato digestório de bivalves marinhos. Uma espécie não identificada de *Urastoma* foi detectada nas brânquias de *Crassostrea rhizophorae* (BOEHS; LENZ; VILLALBA, 2008) sem causar danos ao hospedeiro, enquanto *U. cyprinae* foi registrado causando alterações nas brânquias em *Mytillus edulis* (dos SANTOS; COIMBRA, 1995) e em *Mytillus galloprovincialis* (MURINA; SOLONCHENKO, 1991; ROBLEDO *et al.*, 1994). Este gênero foi relatado por Lauckner (1983) em ostras, mitilídeos e outros bivalves, mas provavelmente como comensais.

2.6. Patógenos de declaração obrigatória à Organização Mundial para a Saúde Animal - OIE

A necessidade de combater as doenças em animais levou à criação, em 1924, do Escritório Internacional de Epizootias (*Office International des Epizooties*). Em 2003, esta entidade se tornou a Organização Mundial para a Saúde Animal (*World Organization for Animal Health*), mas manteve sua sigla histórica (OIE).

A OIE, em seu código de saúde para animais aquáticos, lista as doenças de declaração obrigatória para moluscos, causadas pelos seguintes agentes etiológicos: vírus tipo herpes que infecta abalones, herpesvirus ostreideo microvariante 1, que infecta a ostra do pacífico *Crassostrea gigas* e a ostra portuguesa *Crassostrea angulata*, *Bonamia ostrea* e *B. exitiosa* (Filo Haplosporidia); *Marteilia refringens* (Filo Paramyxia); *Perkinsus marinus* e *P. olseni* (Filo Perkinsozoa) e infecções causadas pela bactéria *Xenohaliotis californiensis* (OIE, 2012).

2.6.1. *Bonamia exitiosa* e *B. ostrea*

Segundo Cranfield *et al.* (2005), *Bonamia exitiosa* é um protozoário haplosporídeo que infecta hemócitos de algumas espécies de ostras e induz desordens fisiológicas e eventualmente morte nos animais infectados. Infecções por *B. exitiosa* foram registradas em *Tiostrea lutaria* na Nova Zelândia (DINAMANI, HINE; JONES, 1987), em *Ostrea edulis* na Galícia (Espanha) (ABOLLO *et al.*, 2008) e na Itália (NARCISI *et al.*, 2010) e ainda em *Ostrea stentina* na Tunísia (HILL *et al.*, 2010).

Bonamia ostrea é um protozoário parasita que tem sido registrado infectando hemócitos da ostra plana *O. edulis* na França (GRIZEL, 1985). Carnegie; Cochenec-Laureau (2004) registraram infecções causadas por *B. ostrea* na Europa e América do Norte. Desde sua observação por Katkansky *et al.* (1969), este protozoário é um agente etiológico que parasita *O. edulis* no Maine e Califórnia (EUA) (BARBER; DAVIS, 1994; FRIEDMAN *et al.*, 1989). Embora ostras infectadas por *B. ostrea* possam apresentar aparência normal, sinais patológicos incluem descoloração, lesões e úlceras nos tecidos conjuntivos das brânquias, glândula digestiva e manto (COMPS; TIGÉ; GRIZEL, 1980). Técnicas moleculares para isolamento e identificação de *Bonamia exitiosa* e *B. ostrea* incluem a reação em cadeia da polimerase (PCR), hibridização *in situ* (ISH) e sequenciamento (OIE, 2015).

2.6.2. *Marteilia refringens*

Marteilia refringens é um protozoário que infecta o sistema digestivo de alguns bivalves, causando danos fisiológicos e eventualmente morte (ALDERMAN, 1979). A ocorrência de *M. refringens* foi relatada em *Solen marginatus* (LÓPEZ-FLORES *et al.*,

2008a) e em *Chamelea gallina* (LÓPEZ-FLORES *et al.*, 2008b). Outros autores têm observado a presença de *Marteilia* spp. em outras espécies de bivalves: *Ostrea angasi* (BOUQUIER *et al.*, 1986), *Ostrea edulis* (GRIZEL *et al.*, 1974) e *Mytillus galloprovincialis* (VILLALBA *et al.*, 1993a). Cahour (1979) observou células de *M. refringens* na ostra do Pacífico *Crassostrea gigas* e Renault, Cochenec e Chollet (1995), relataram marteiliose na ostra americana *C. virginica* cultivada na França.

Indivíduos com marteiliose apresentam valvas abertas (*gaping*), massa visceral aquosa, retração do manto e crescimento reduzido, embora estes sintomas não sejam específicos para infecção por *M. refringens*, como visto anteriormente. Villalba *et al.* (1993a) observaram sinais patológicos similares, além da inibição de desenvolvimento das gônadas em *M. galloprovincialis*. Histologia, microscopia eletrônica de transmissão (TEM), PCR, ISH e sequenciamento são alguns dos métodos de detecção e identificação deste patógeno (OIE, 2015).

2.6.3. *Perkinsus marinus* e *P. olseni*

Infecções por protozoários são de grande interesse para a sanidade de populações de moluscos bivalves marinhos, cultivados ou não, pois causam perdas econômicas na produção comercial. O protozoário *Perkinsus* sp. causa a doença conhecida por Perkinsiose nestes bivalves (ANDREWS, 1988) e algumas espécies têm sido associadas a severas mortalidades nestes moluscos (VILLALBA *et al.*, 2004). A Perkinsiose foi identificada pela primeira vez em populações de ostras *Crassostrea virginica* na Louisiana, Estados Unidos, em 1940. Inicialmente, foi denominada de *Dermocystidium marinum*, por isso essa doença é também conhecida como Dermo (MACKIN; OWEN; COLLIER, 1950).

Entre estas espécies, *P. olseni* e *P. marinus* estão incluídas na lista de patógenos de declaração obrigatória a OIE (OIE, 2012), tendo sua ocorrência implicações na movimentação e distribuição de moluscos bivalves em todo o mundo. De acordo com Perkins (1976) e Levine (1978), *Perkinsus* spp. foram classificadas como pertencentes ao grupo Apicomplexa. Entretanto, análises filogenéticas moleculares realizadas por Reece *et al.* (1997) e Siddall *et al.* (2001), colocaram estes parasitas como pertencentes à Dinoflagellata. Posteriormente, esses protozoários foram incluídos no Filo Perkinsozoa (VILLALBA *et al.*, 2004).

Procedimentos para detecção e identificação destes parasitas são baseados na caracterização molecular, além de histologia e cultivo em meio fluido de tioglicolato de Ray (RFTM). Técnicas moleculares como PCR e sequenciamento têm sido desenvolvidas ao longo dos últimos anos e se apresentam como métodos alternativos para diagnóstico (PENNA; KHAN; FRENCH, 2001). Estudos moleculares recentes têm reconhecido 7 espécies do gênero *Perkinsus*: *P. marinus*, *P. olseni*, *P. mediterraneus*, *P. qugwadi*, *P. honshuensis*, *P. beihaiensis* e *P. chesapeaki*. Atualmente, *P. olseni*/*P. atlanticus* e *P. cheapeaki*/*P. andrewsi* são consideradas coespecíficas, com os nomes *P. olseni* e *P. chesapeaki* citados prioritariamente de acordo com o Código Internacional de Regras para a Nomenclatura Zoológica (BURRESON; REECE; DUNGAN, 2005).

Alguns sinais clínicos de infecção por *Perkinsus marinus* são: aparência pálida da glândula digestiva, retração do manto, além do retardo no desenvolvimento das gônadas, abertura da concha (*gaping*) e redução do índice de condição (BOWER; MCGLADDERY; PRICE, 1994).

Perkinsus olseni causou lesões nas brânquias de *Ruditapes decussatus* e *R. philippinarum* (AZEVEDO, 1989). Bower, Mcgladdery e Price (1994) relataram lesões em *Haliotis rubra* e em *H. laevigata*, com consequente redução no seu valor de mercado. *Perkinsus olseni* causou nestes últimos a destruição do tecido conjuntivo e das células epiteliais dos túbulos digestivos.

No Brasil, o primeiro registro de *Perkinsus* sp. foi feito em *Crassostrea rhizophorae* do estuário do Rio Pacoti, Ceará, por Sabry *et al.* (2009), sendo posteriormente confirmado através de análises moleculares que tratava-se de *Perkinsus beihaiensis* (SABRY *et al.*, 2013). Dantas Neto *et al.* (*in press*) ampliaram os relatos publicados por Sabry *et al.* (2009), da Silva *et al.* (2013) e Brandão *et al.* (2013) sobre a ocorrência desse patógeno para a região setentrional do nordeste brasileiro.

Embora alguns trabalhos já tenham investigado o estado de saúde desses organismos na costa brasileira (SABRY; GESTEIRA; BOEHS, 2007; BOEHS, LENZ, VILLALBA, 2008; FERREIRA *et al.*, 2008; BRANDÃO *et al.*, 2013), faz-se necessário um constante monitoramento dessas populações de bivalves.

2.7. Outras espécies de *Perkinsus*

2.7.1. *Perkinsus beihaiensis*

Perkinsus beihaiensis já foi detectada em *Crassostrea hongkongensis* e em *C. ariakensis* da China (MOSS *et al.*, 2008) e em *C. madrasensis* na Índia (SANIL *et al.*, 2012). No Brasil, *P. beihaiensis* foi detectado na ostra *C. rhizophorae* do estuário do Rio Pacoti, Ceará (SABRY *et al.*, 2013), assim como na Baía de Camamu, Bahia (LUZ; BOEHS, 2015) e no berbigão *Anomalocardia brasiliana* do estuário do Rio Timonha (FERREIRA *et al.*, 2015).

2.7.2. *Perkinsus chesapeaki*

Perkinsus chesapeaki foi registrado em *Mya arenaria* (MCLAUGHLIN *et al.*, 2000) e em *Crassostrea virginica* dos EUA (BURRESON; REECE; DUNGAN, 2005) e da Itália (ABOLLO *et al.*, 2006). Posteriormente este protozoário foi observado também em *C. virginica* nos Estados Unidos (IFREMER, 2009) e mais recentemente foi observado no bivalve *Cerastoderma edule* na costa Mediterrânea da Espanha (CARRASCO *et al.*, 2014).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Investigar a ocorrência de patógenos em populações nativas da ostra do mangue *Crassostrea rhizophorae* em estuários dos estados do Ceará, Piauí e Maranhão, visando avaliar o estado de saúde desse bivalve.

3.2. Objetivos específicos

- 1) Determinar quais os parasitas que afetam a ostra do mangue *C. rhizophorae* em diferentes regiões estuarinas da costa nordeste setentrional brasileira;
- 2) Comparar as prevalências e intensidades de infecção e/ou infestação dos patógenos encontrados nos estuários investigados;
- 3) Determinar a dinâmica de distribuição dos patógenos no período chuvoso e seco para as diferentes regiões estudadas;
- 4) Verificar a ocorrência de *Perkinsus* nas populações de ostras estudadas;
- 5) Aplicar os protocolos de diagnóstico de enfermidades em moluscos recomendadas pela Organização Mundial para Saúde Animal em *Crassostrea rhizophorae*.

CAPÍTULO II

***Perkinsus* sp. infectando a ostra *Crassostrea rhizophorae* de estuários do nordeste setentrional, Brasil.**

Artigo aceito para publicação no *Brazilian Journal of Biology* em 09/07/2014.

RESUMO

A ostra-do-mangue *Crassostrea rhizophorae* é um recurso estuarino explorado por comunidades ribeirinhas do Nordeste do Brasil. Apesar de sua importância socioeconômica, estudos sobre o estado de saúde deste bivalve são escassos na região. O objetivo deste estudo foi investigar a presença do protozoário *Perkinsus* sp. em *C. rhizophorae* coletada em agosto e setembro de 2011, em três estuários da região setentrional do nordeste brasileiro: Jaguaribe (Ceará), Camurupim (Piauí) e Carnaubeiras (Maranhão) (n= 150 espécimes/local). As amostras foram submetidas ao meio líquido de tioglicolato de Ray (RFTM), PCR e procedimentos histológicos. A análise em RFTM revelou hipnósporos esféricos azuis ou preto-azulados do gênero *Perkinsus* em 50 espécimes (Jaguaribe= 17,3%, Camurupim= 5,3%, Carnaubeiras= 10,6%). A intensidade de infecção variou de muito leve (1-10 células por lâmina) a severa (mais de 40 células em cada um dos 10 campos da lâmina) para o Rio Jaguaribe; muito leve para o Rio Camurupim e muito leve a moderada (pelo menos 40 células observadas, em cada um dos 10 campos da lâmina) para o Rio Carnaubeiras. Quando submetidos à análise confirmatória por PCR, foram confirmados 6 casos (Jaguaribe= 3, Camurupim= 1, Carnaubeiras= 2). A histologia confirmou 21 casos de infecção nos animais dos três estuários. Embora os coletores locais não tenham relatado nenhuma mortalidade em populações de ostras que pudesse ser atribuída à infecção por *Perkinsus*, é aconselhável um monitoramento sobre o estado de saúde de populações de ostras da região.

Palavras-chave: *Perkinsus*, *Crassostrea rhizophorae*, RFTM, PCR.

ABSTRACT

The mangrove oyster *Crassostrea rhizophorae* is an estuarine resource exploited by riverside communities in Northeast Brazil. Despite its socioeconomic importance, studies on the health status of this bivalve are scanty in this region. The purpose of the present study was to investigate the presence of the protozoan *Perkinsus* sp. in *C. rhizophorae* collected in August and September 2011 in three estuaries of the septentrional Northeast Brazil: Jaguaribe (Ceará), Camurupim (Piauí) and Carnaubeiras (Maranhão) (n= 150 specimens/site). The samples were submitted to Ray's fluid thioglycollate medium (RFTM), PCR and histology assays. The RFTM assay revealed spherical, blue or bluish-black hyphospores of the genus *Perkinsus* in 50 specimens (Jaguaribe= 17.3%, Camurupim= 5.3%, Carnaubeiras= 10.6%). The intensity of the infection ranged from very light (1-10 cells per slide) to severe (more than 40 cells in each of 10 fields of the slide) for Jaguaribe; very light for Camurupim and very light to moderate (at least 40 cells observed in each of 10 fields of the slide) for Carnaubeiras. When submitted to confirmatory PCR analysis, 6 cases were confirmed (Jaguaribe=3, Camurupim=1, Carnaubeiras=2). The histology confirmed 21 cases of infection in the animals from the three estuaries. Although local collectors have reported no mortality in oyster populations that might be attributed to infection by *Perkinsus*, health surveillance of oyster populations in the septentrional region of Northeast Brazil is advisable.

Keywords: *Perkinsus*, *Crassostrea rhizophorae*, RFTM, PCR.

1. INTRODUÇÃO

O protozoário *Perkinsus* sp. pertence a um grupo de protozoários parasitas que infectam moluscos em todo o mundo, em particular os bivalves. Desde o primeiro relato de *Perkinsus marinus* infectando a ostra americana *Crassostrea virginica* (Gmelin, 1791) no Golfo do México (MACKIN; OWEN; COLLIER, 1950), outras espécies do gênero *Perkinsus* foram relatadas infectando várias espécies de moluscos marinhos ao redor do mundo (LESTER; DAVIS, 1981; AZEVEDO, 1989; BLACKBOURN; BOWER; MEYER, 1998; VILLALBA *et al.*, 2004; CHOI; PARK, 2010). No Brasil, Sabry *et al.* (2009) registraram a primeira ocorrência de *Perkinsus* sp. infectando populações naturais da ostra *Crassostrea rhizophorae* (Guilding, 1828) no estuário do Rio Pacoti (Ceará, Brasil).

De acordo com a Organização Mundial para a Saúde Animal (OIE), duas espécies do filo Perkinsozoa, *Perkinsus marinus* e *Perkinsus olseni*, são de declaração obrigatória (OIE, 2012) devido às significativas taxas de mortalidade e perdas econômicas com as quais estão associados ao redor do mundo (VILLALBA *et al.*, 2004; CHOI; PARK, 2010). Desta forma, *P. marinus* foi responsável por perdas substanciais em populações da ostra americana *C. virginica* ao longo da costa atlântica dos EUA e do Golfo do México (BURRESON; RAGONE, 1996), enquanto *P. olseni* é conhecida por ter dizimado populações do abalone *Haliotis rubra* na Austrália (LESTER; DAVIS, 1981) e do marisco *Ruditapes decussatus* em Portugal (AZEVEDO, 1989).

Tradicionalmente, as infecções por *Perkinsus* são diagnosticadas através do Meio Fluido de Tioglicolato de Ray (RFTM). No entanto, a técnica não discrimina entre diferentes espécies de *Perkinsus* e pode levar à identificação equivocada de *Perkinsus* spp. e algumas espécies de dinoflagelados (ALMEIDA *et al.*, 1999). A reação em cadeia da polimerase (PCR) tem sido utilizada rotineiramente para ajudar na confirmação e descrição de diferentes espécies de *Perkinsus* infectando moluscos (PENNA; KHAN; FRENCH, 2001). Assim, a PCR foi utilizada para identificar *P. olseni* infectando *R. decussatus* na costa da Espanha e no Mar Mediterrâneo (ELANDALOUSSI *et al.*, 2009) e *Tridacna crocea* no Vietnã (SHEPPARD; PHILLIPS, 2008). Estudos moleculares têm reconhecido sete espécies do gênero *Perkinsus*: *P. marinus*, *P. olseni* (= *P. atlanticus*), *P. mediterraneus*, *P. qugwadi*, *P. honshuensis*, *P. beihaiensis* e *P. chesapeaki* (= *P. andrewsi*) (BURRESON; REECE; DUNGAN, 2005).

Considerando a importância socioeconômica de *C. rhizophorae* para populações ribeirinhas ao longo dos estuários da região nordeste do Brasil, o objetivo deste estudo foi avaliar as populações de ostras *Crassostrea rhizophorae* de três estuários da região setentrional do nordeste brasileiro quanto à presença de protozoários do gênero *Perkinsus*, utilizando as técnicas RFTM, histologia e PCR. Esta pesquisa complementa registros publicados por Sabry *et al.* (2009), da Silva *et al.* (2013) e Brandão *et al.* (2013) sobre a ocorrência desse patógeno nos estados do Ceará, Paraíba e Bahia, respectivamente. Além disso, o estudo faz uma contribuição significativa para o conhecimento atual sobre a distribuição de *Perkinsus* ao longo da costa brasileira e fornece subsídios para o desenvolvimento de medidas sanitárias para evitar a contaminação de áreas livres destes protozoários.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Amostragem das ostras

Em agosto e setembro de 2011, 450 exemplares de *Crassostrea rhizophorae* foram coletados a partir das raízes do mangue vermelho (*Rhizophora mangle*) de três estuários da região nordeste do Brasil: Rio Jaguaribe (04 ° 27'39,21 "S, 37 ° 47'31, 68 "W), no Ceará (n = 150), Rio Camurupim (02°54'51" S, 041°24'58,2 "W), no Piauí (n = 150), e Rio Carnaubeiras (02 ° 50'0, 08 "S, 041 ° 57'36,5" W), no Maranhão (n = 150). A altura da concha das ostras foi medida no seu maior eixo.

Os tecidos de cada espécime foram incubados em RFTM, enquanto as brânquias foram fixadas em álcool 95% para confirmação da presença do patógeno em análise de PCR. Trinta ostras em cada coleta de 150 foram submetidas a análises histológicas.

Utilizando um termômetro e um refratômetro, a temperatura e a salinidade da água foram medidos no momento da amostragem para o Rio Jaguaribe (30°C; 30‰), Rio Camurupim (27°C; 45‰) e Rio Carnaubeiras (30°C; 18‰). A altura média das conchas das ostras dos estuários dos rios Jaguaribe, Cumurupim e Carnaubeiras foi de 58±8,4mm, 50±5,4mm e 50 ±5,2mm, respectivamente.

2.2. Incubação de tecidos em RFTM

Duas lamelas branquiais e o reto de cada ostra foram incubadas em RFTM (RAY, 1966) no escuro durante 7 dias à temperatura ambiente. Posteriormente, fragmentos desses tecidos foram macerados sobre uma lâmina e coradas com uma solução de Lugol 3%. A preparação foi observada sob microscópio de luz quanto à presença de hipnósporos esféricos, azuis ou preto-azulados do gênero *Perkinsus*.

A prevalência de infecção por *Perkinsus* foi definida como o número total de animais infectados, dividido pelo número total de ostras coletadas em cada estuário (BUSH *et al.*, 1997). A intensidade da infecção foi estimada de acordo com a escala de Mackin (RAY, 1954).

2.3. Detecção de *Perkinsus* por reação em cadeia da polimerase (PCR)

Amostras de ostras com teste positivo para *Perkinsus* no ensaio RFTM foram preservadas em álcool a 95% para a análise de PCR. A extração de DNA foi realizada com um kit DNazol® (Invitrogen) seguindo as instruções do fabricante, enquanto a PCR foi realizada com o conjunto de iniciadores 85/750 Perk ITS (CASAS, VILLALBA, REECE, 2002) os quais hibridizam especificamente com regiões conservadas dos espaçadores internos transcritos (ITS) a partir do complexo de genes de rRNA, únicas para membros do gênero *Perkinsus* (exceto para *Perkinsus qugwadi incertae sedis*). O DNA extraído a partir de células de *Perkinsus beihaiensis* foi utilizado como controle positivo. Para o controle negativo, o DNA foi substituído por água isenta de nuclease.

Cada reação de 25µL continha 50-100ng de DNA molde, 1x tampão de PCR, 1.5mM MgCl₂, 0,2mM de cada dNTP, 0,8mM de cada primer e 1 unidade de Taq DNA polimerase (Invitrogen). O protocolo incluiu uma desnaturação de DNA a 94°C durante 10 min, e 35 ciclos de amplificação a 94°C (1 min), 55°C (1 min) e 72°C (1 min), seguido por uma extensão final a 72°C durante 10 min. Os produtos de PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose TAE 1,5% e corados com brometo de etídio.

2.4. Seções histológicas

As brânquias, gônadas e glândula digestiva de 30 espécimes de cada coleta de ostras (n = 150) foram excisadas e fixadas em solução de Davidson (SHAW; BATTLE, 1957) por 24 horas. Seguindo inclusão em parafina histológica a 60°C, seções de 5µm foram preparadas e coradas com hematoxilina de Harris e eosina (H/E) (HOWARD *et al.*, 2004) e analisadas ao microscópio de luz. A prevalência observada de *Perkinsus* foi definida como o número de animais infectados dividido pelo número total de ostras analisadas (BUSH *et al.*, 1997).

3. RESULTADOS

3.1. Detecção de *Perkinsus* sp. por análise RFTM

Cinquenta ostras das três coletas apresentaram teste positivo para *Perkinsus* em RFTM (50/450). As células alargadas e esféricas do agente patogênico (5-55µm de diâmetro) coraram em preto pelo Lugol (Fig. 1A). A prevalência de ostras infectadas foi de 17,3% (Jaguaribe), 5,3% (Camurupim) e 10,6% (Carnaubeiras) (Tabela 1). A intensidade de infecção apresentou-se muito leve a severa (Jaguaribe), muito leve (Camurupim) e muito leve a moderada (Carnaubeiras).

3.2. Detecção de *Perkinsus* sp. por PCR

As 50 amostras com teste positivo para *Perkinsus* sp. no ensaio RFTM foram submetidas à análise de PCR para confirmação. Seis casos foram confirmados (Jaguaribe n = 3, n = 1 Camurupim, Carnaubeiras n = 2) (Tabela 1 e Fig. 2). O par de iniciadores Perk ITS produziu fragmentos amplificados de tamanho esperado (850bp) em todas as amostras, confirmando a presença de *Perkinsus* sp. (Fig. 2).

3.3. Análises histopatológicas

A análise histológica confirmou 21 dos 50 casos detectados pelo método RFTM (Tabela 1). Trofozoítos de *Perkinsus* foram detectados nas brânquias e tecido conjuntivo em torno da glândula digestiva das ostras. Os trofozoítos eram esféricos e apresentaram um vacúolo ocupando a maior parte do citoplasma (Fig. 1B). Nenhum dano ou infiltração hemocitária foi detectada nos tecidos infectados pelo patógeno.

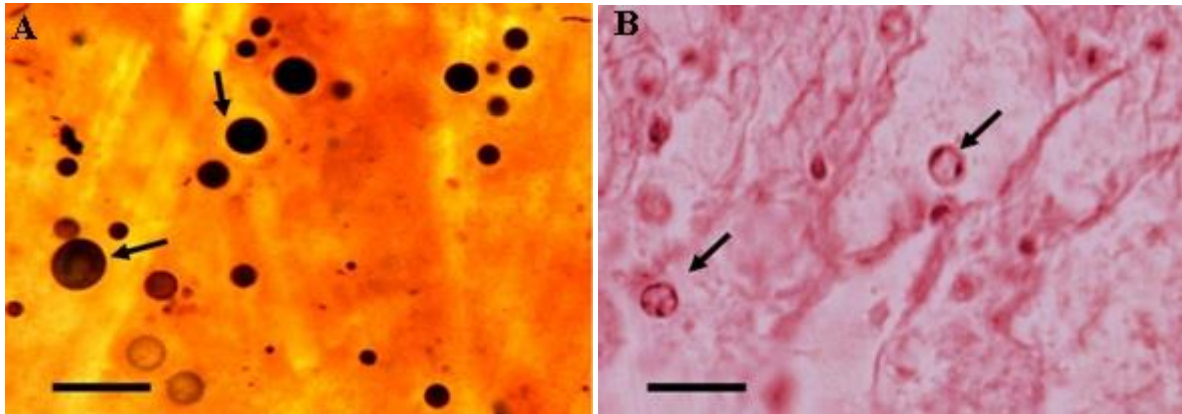


Figura 1. Seções histológicas mostrando células de *Perkinsus* sp. infectando a ostra *Crassostrea rhizophorae*. (A) Hipnósporos de *Perkinsus* sp. em tecidos de brânquias de *C. rhizophorae* após incubação em RFTM e corados com solução de lugol. Barra de escala = 50 μ m. (B) Trofozoítio de *Perkinsus* sp. (seta) no tecido conjuntivo próximo a glândula digestiva. Barra de escala = 20 μ m.

Tabela 1. Prevalência (%) de infecção por *Perkinsus* sp., em 450 espécimes da ostra *Crassostrea rhizophorae* coletada em três estuários no Nordeste do Brasil: Jaguaribe (Ceará), Camurupim (Piauí) e Carnaubeiras (Maranhão). O número de ostras positivas para *Perkinsus* é mostrado em parêntesis para cada técnica de diagnóstico.

Estuário	RFTM (%)	Histologia (%)	PCR (%)
Jaguaribe	17,3 (26/150)	33,3 (10/30)	11,5 (3/26)
Camurupim	5,3 (8/150)	20 (6/30)	25,0 (2/8)
Carnaubeiras	10,6 (16/150)	16,6 (5/30)	6,2 (1/16)

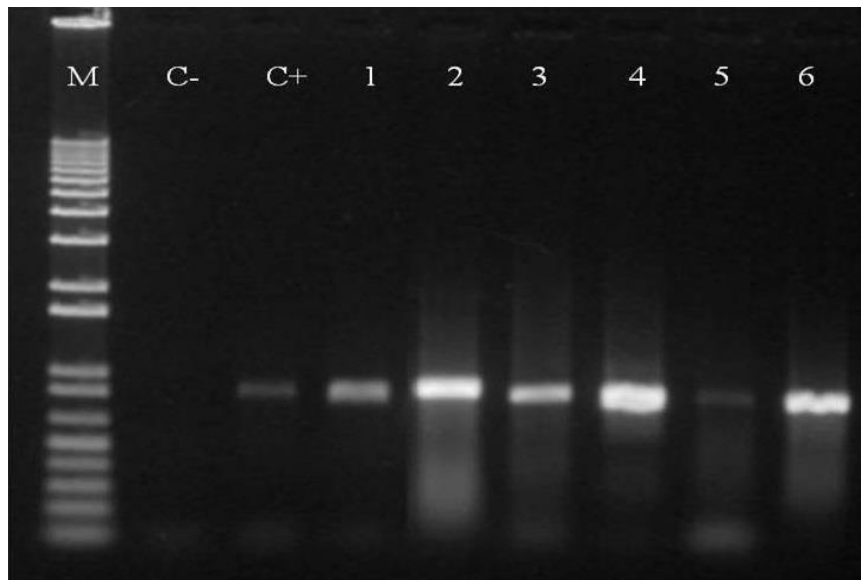


Figura 2. Diagnóstico molecular de *Perkinsus* sp. em gel de agarose 1,5%. Detecção da região ITS do rDNA de *Perkinsus* sp. por PCR. M: marcador molecular (1 Kb Plus, Invitrogen), C-: controle negativo (água ultra pura); C+: controle positivo; linhas 1 (CE); 2 (CE), 3 (PI); 4 (MA); 5 (PI) e 6 (CE): amostras positivas.

4. DISCUSSÃO

Neste estudo, relatamos a ocorrência do protozoário *Perkinsus* sp. infectando a ostra *Crassostrea rhizophorae* em três estuários dos estados do Ceará, Piauí e Maranhão, nordeste do Brasil. *Perkinsus* sp. foi detectado por ensaio RFTM, uma técnica de diagnóstico sensível e confiável e posteriormente submetido ao diagnóstico molecular de confirmação e histologia.

A prevalência média de *Perkinsus* sp. infectando as ostras coletadas para este estudo foi relativamente baixa (até 17,3% em RFTM). Isto é consistente com a ausência de registros de mortalidade entre estas populações de ostras que podem ser associados com o parasita. No entanto, os valores encontrados foram maiores do que a prevalência de 6,7% registrada por Sabry *et al.* (2009) em ostras do Rio Pacoti, outro estuário do Ceará. Por outro lado, apesar desta diferença, Brandão *et al.* (2013) relataram uma prevalência média de 63% para *Perkinsus* sp. em populações de *C. rhizophorae* da Bahia e da Silva *et al.* (2013) uma prevalência de 92% para *Perkinsus* sp. e até 100% para *Perkinsus marinus* na mesma espécie na Paraíba, dois outros estados do nordeste do Brasil.

Apenas 6 dos 50 casos detectados por análises RFTM foram confirmados por PCR, provavelmente porque a maioria das infecções foi muito leve e/ou porque a quantidade de tecido branquial recuperados de cada amostra para a extração do DNA não era suficiente para assegurar a detecção do agente patogênico. Em uma discussão sobre a ocorrência de resultados falso-negativos de PCR na detecção de parasitas em bivalves, Burreson (2008) chegou à mesma conclusão. Outros autores relataram discrepâncias entre RFTM e resultados de PCR (REECE; DUNGAN; BURRESON, 2008; SABRY *et al.*, 2009), e outras causas de erros de amostragem podem comprometer a precisão dos ensaios de PCR, incluindo os efeitos de lesões focais ou localizadas (BURRESON, 2008).

Os cortes histológicos de tecidos das ostras infectadas continham células de *Perkinsus* sp. com um vacúolo ocupando a maior parte do volume interno do citoplasma, um núcleo excêntrico e nucléolos proeminentes, tal como descrito por Sabry *et al.* (2009; 2013) e Brandão *et al.* (2013). Estes autores detectaram mudanças nos tecidos das ostras e órgãos infectados por *Perkinsus* sp., além de trofozoítos fagocitados. Neste estudo, não foram observadas tais mudanças, possivelmente devido aos baixos níveis de infecção, mas são necessários mais estudos para compreender melhor os efeitos deste patógeno no hospedeiro.

Os resultados dos três métodos de detecção utilizados no presente estudo (ensaio RFTM, histologia e PCR) confirmam inequivocamente a ocorrência de *Perkinsus* infectando populações nativas de *C. rhizophorae*, em três estuários no nordeste do Brasil. Este é o primeiro registro de *Perkinsus* nas regiões costeiras do norte da América do Sul. Embora nenhuma mortalidade relacionada com *Perkinsus* tenha sido reportada para esta região, a vigilância da saúde das populações de ostras no nordeste do Brasil é aconselhável, especialmente enquanto a identidade das espécies desse patógeno permanece incerta.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, MF.; BERTHE, F.; THEBAULT, A.; DINIS, MT. Whole clam culture as a quantitative diagnostic procedure of *Perkinsus atlanticus* (Apicomplexa, Perkinsea) in clams *Ruditapes decussatus*. **Aquaculture**, v. 177, p. 325–332, 1999.
- AZEVEDO, C. Fine structure of *Perkinsus atlanticus* n. sp. (Apicomplexa, Perkinsea) parasite of the clam *Ruditapes decussatus* from Portugal. **Journal of Parasitology**, v. 75, p. 627–635, 1989.
- BLACKBOURN, J.; BOWER, SM.; MEYER, GR. *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.
- BRANDÃO, R.P.; BOEHS, G.; SABRY, R.C.; CEUTA, L.O.; LUZ, M.S.A.; QUEIROGA, F.R.; DA SILVA, P.M. *Perkinsus* sp. infecting oyster *Crassostrea rhizophorae* on the coast of Bahia, Brazil. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 112, p. 138–141, 2013.
- BURRESON, E.M.; RAGONE CALVO, L.M. Epizootiology of *Perkinsus marinus* disease of oysters in Chesapeake Bay, with emphasis on data since 1985. **Journal of Shellfish Research**, v. 15, p. 17–34, 1996.

BURRESON, E.M.; REECE, K.S.; DUNGAN, C.F. Molecular, morphological, and experimental evidence support the synonymy of *Perkinsus chesapeaki* and *Perkinsus andrewsi*. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 52, p. 258–270, 2005.

BURRESON, E.M. Misuse of PCR assay for diagnosis of mollusk protistan infections. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 80, p. 81–83, 2008.

BUSH, A.O.; LAFFERTY, A.D.; LOTZ, J.M.; SHOSTAK, A.W. Parasitology meets ecology on its own terms: Margoli et al. revisited. **Journal of Parasitology**, v. p. 575–583, 1997.

CASAS, S.M.; VILLALBA, A.; REECE, K.S. Study of perkinsosis in the carpet shell clam *Tapes decussatus* in Galicia (NW Spain). I. Identification of the aetiological agent and in vitro modulation of zoosporulation by temperature and salinity. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. p. 50, 51–65, 2002.

CHOI, K.S.; PARK, K.I. Review on the protozoan parasite *Perkinsus olseni* (Lester and Davis 1981) infection in Asian waters. In Ishimatsu, A., Lie, H-J. (Eds). *Coast. Environ. Ecos. Issues of the East China Sea*. TERRAPUB and Nagasaki University, pp. 269–281, 2010.

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.

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.

HOWARD, D.W.; LEWIS, E.J.; KELLER, B.J.; SMITH, C.S. Histological Techniques for Marine Bivalve Mollusks and Crustaceans. NOAA Technical Memorandum. NOSNCCOS5, Oxford, MD. 2004, 218p.

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, 181–187, 1981.

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.

OIE (Office International des Épizooties/World Animal Health Organization). (2012). Manual of diagnostic test for aquatic animals, OIE, Paris.

PENNA, M.S.; KHAN, M.; FRENCH, R.A. Development of a multiplex PCR for the detection of *Haplosporidium nelsoni*, *Haplosporidium costale* and *Perkinsus marinus* in the eastern oyster *Crassostrea virginica*, Gmelin, 1971. **Molecular and Cellular Probes**, vol. 15, 385–390, 2001.

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

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

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

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

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.

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.

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

CAPÍTULO III

Parasitas na ostra do mangue *Crassostrea rhizophorae* de regiões estuarinas do nordeste setentrional brasileiro.

RESUMO

A ostra nativa *Crassostrea rhizophorae* (Bivalvia: Ostreidae) é um importante recurso estuarino explorado pelas comunidades ribeirinhas do nordeste brasileiro. Este estudo teve como objetivo investigar a presença de parasitas na ostra *C. rhizophorae* de bancos naturais nos estuários dos Rios Jaguaribe (CE), Camurupim (PI) e Carnaubeiras (MA). Para isto, exemplares de *C. rhizophorae* (N= 1800) foram coletados nos meses de agosto e setembro (2011), março, abril, outubro e novembro (2012) e maio e junho (2013). A temperatura da água dos estuários variou de 28 a 31°C e a salinidade de 5 a 45 PSU. As ostras foram medidas no seu maior eixo e abertas, amostrando-se brânquias, gônada e glândula digestiva. Os tecidos foram fixados em solução de Davidson por 24 h e em seguida submetidos à técnica de histologia. Cortes de 5 µm foram corados com hematoxilina de Harris e eosina. As análises histológicas evidenciaram a presença de patógenos e alterações nos tecidos e órgãos das ostras, entre estes hipertrofia dos gametas masculinos, bactérias do tipo *Rickettsia*, protozoários dos gêneros *Sphenophrya*, *Ancistrocoma*, *Steinhausia* e *Nematopsis* e metazoários dos gêneros *Urastoma*, *Tylocephalum* e *Bucephalus*, além de um metazoário não identificado. A hipertrofia dos gametas ocorreu apenas em uma ostra (3,3%), no período seco, enquanto as bactérias estiveram presentes nos três estuários, no período chuvoso e seco, com prevalências variando de 30 a 80%. Entre os protozoários, *Nematopsis* sp. apresentou as maiores prevalências (até 100%). Os metazoários foram observados sempre em baixa prevalência (3,3 a 10%). As intensidades de infecção também foram baixas. Duas ostras apresentaram hipertrofia celular (xenoma) causada por *Sphenophrya* sp. Em geral, as ostras apresentaram-se saudáveis, porém torna-se importante o monitoramento constante do estado de saúde desse molusco na região.

Keywords: *Crassostrea rhizophorae*, histopatologia, monitoramento, parasita, sanidade.

ABSTRACT

The native oyster *Crassostrea rhizophorae* (Bivalvia: Ostreidae) is an important estuarine resource exploited by coastal communities in Northeastern Brazil. This study aimed to investigate the presence of parasites in the oyster *C. rhizophorae* from natural stocks in the estuaries of the rivers Jaguaribe (CE), Camurupim (PI) and Carnaubeiras (MA). For this purpose, *C. rhizophorae* specimens (N = 1800) were collected in August and September (2011), March, April, October and November (2012) and May and June (2013). The water temperature of the estuaries ranged from 28 to 31°C and salinity from 5 to 45 PSU. The oysters were measured in its longest axis and opened, with sampling of gills, gonads and digestive gland. Tissues were fixed in Davidson solution for 24 h and then submitted to histological technique. Sections of 5 µm were stained with Harris hematoxylin and eosin. Histological analyzes revealed the presence of pathogens and changes in tissues and organs of the oysters, among them hypertrophy of male gametes, *Rickettsia*-type bacteria, protozoa of genera *Sphenophrya*, *Ancistrocoma*, *Steinhausia* and *Nematopsis* and metazoa of genera *Urastoma*, *Tylocephalum* and *Bucephalus*, and one unidentified metazoan. Hypertrophy of gametes occurred only in an oyster (3.3%) in the dry season, while bacteria were present in the three estuaries (rainy and dry season) with prevalence rates ranging from 30 to 80%. Among protozoa, *Nematopsis* sp. had the highest prevalence (up 100%). The metazoa were always observed at low prevalence (3.3 to 10%). Infection intensities were also low. Two oysters showed cellular hypertrophy (xenoma) caused by *Sphenophrya* sp. In general, the oysters were healthy, but it becomes important to monitor continuously the health *status* of this mollusk in the region.

Keywords: *Crassostrea rhizophorae*, histopathology, monitoring, parasite, sanity.

1. INTRODUÇÃO

A região nordeste do Brasil apresenta diversos estuários ricos em moluscos bivalves de interesse comercial, entre estes a ostra nativa *Crassostrea rhizophorae* (Bivalvia: Ostreidae), importante recurso estuarino explorado pelas comunidades ribeirinhas. Fazendo parte desses ecossistemas, encontram-se os estuários dos Rios Carnaubearas (porção leste do Estado do Maranhão) e Camurupim e Jaguaribe, situados ao norte e leste dos estados do Piauí e Ceará, respectivamente.

A investigação patológica de moluscos bivalves tem importância significativa, porque algumas doenças podem causar mortalidades massivas em estoques naturais e cultivados (SABRY *et al.*, 2013). Nesse contexto, investigações histopatológicas nesses organismos têm sido motivadas para se ampliar o conhecimento dessas patologias, suas regiões geográficas de ocorrência, as reações do hospedeiro frente ao agente patológico e as alterações causadas pelos patógenos nos organismos infectados/infestados.

A ocorrência de patógenos em moluscos tem registro em várias partes do mundo (LAUCKNER, 1983; BOWER; MCGLADDERY; PRICE, 1994). No Brasil, Narchi (1966) fez o primeiro relato de parasitismo no bivalve *Anomalocardia brasiliana* pelo bucefalídeo *Bucephalopsis haimeana* (Digenea). Desde então, outros autores têm relatado parasitismo em diversas espécies de bivalves da costa brasileira, (SABRY *et al.*, 2011; BOEHS *et al.*, 2012; DA SILVA, MAGALHÃES, BARRACCO, 2012; BRANDÃO, BOEHS, DA SILVA, 2013; ROMÃO *et al.*, 2014; LUZ, BOEHS, 2015; COVA *et al.*, 2015). Apesar destes relatos, episódios de mortalidades em bivalves no Brasil não têm sido registrados, exceto em *Tagelus plebeius* de bancos naturais (da SILVA, *et al.*, 2009) e no mexilhão *Perna perna* de cultivo (SUÁREZ-MORALES *et al.*, 2010), ambos no Estado de Santa Catarina (região Sul do Brasil).

Em moluscos bivalves do Estado do Ceará, o metazoário do gênero *Bucephalus* (Bucephalidae) foi detectado em *A. brasiliana* no estuário do Rio Jaguaribe (ARAÚJO; ROCHA-BARREIRA, 2004). *Nematopsis* sp. (Apicomplexa: Porosporidae) e o metazoário *Tylocephalum* sp. (Lecanicephalidae) foram registrados em *C. rhizophorae* (SABRY; GESTEIRA; BOEHS, 2007). Em *A. brasiliana* do estuário do Rio Pacoti foram detectados bactérias do tipo *Rickettsia*, *Bucephalus* sp. e *Tylocephalum* sp. (FERREIRA *et al.*, 2008).

Em 2009 foi feito o primeiro registro de um protozoário do gênero *Perkinsus* infectando *C. rhizophorae* do Estuário do Rio Pacoti, Ceará (SABRY *et al.*, 2009). Posteriormente, Dantas Neto *et al.* (2012) relataram a ocorrência de *Perkinsus* sp. em *C. rhizophorae* de regiões estuarinas nos Estados do Maranhão, Piauí e Ceará, ampliando as pesquisas sobre a perkinsiose no Brasil. Nessa mesma espécie de ostra do Rio Pacoti, Sabry *et al.* (2013) detectaram ciliados dos gêneros *Trichodina* (Trichodinidae) e *Ancistrocoma* (Ancistrocomidae) nas brânquias e túbulos digestivos e *Sphenophrya* (Sphenophryidae) nas brânquias; *Steinhausia* sp. (Chytridiopsidae) parasitando o citoplasma dos oócitos das ostras; *Nematopsis* sp. infectando o tecido conjuntivo de vários órgãos e o protozoário *Perkinsus beihaiensis* infectando o tecido conjuntivo e epitélio dos túbulos digestivos das ostras. Ainda nesse estudo foram observados os metazoários dos gêneros *Urastoma* (Urastomidae) e *Tylocephalum* (Tetragonocephalidae). Recentemente, Romão *et al.* (2014) observaram também a ocorrência de bactérias, protozoários e metazoários infectando *C. rhizophorae* e *A. brasiliana* do Rio Pacoti.

Nos estuários dos Estados do Maranhão e Piauí ainda são escassas as pesquisas na área de parasitologia de moluscos. Um trabalho realizado por Dantas Neto *et al.* (2012) registrou pela primeira vez a ocorrência de *Perkinsus* sp. infectando *C. rhizophorae* dos estuários dos Rios Carnaubeiras (Maranhão) e Camurupim (Piauí) e Ferreira *et al.* (2015) relataram a primeira ocorrência de *P. beihaiensis* infectando *A. brasiliana* do estuário do Rio Timonha, na divisa dos estados do Ceará e Piauí.

Este estudo teve como objetivo investigar a presença de parasitas na ostra *C. rhizophorae* de bancos naturais dos estuários dos rios Jaguaribe (CE), Camurupim (PI) e Carnaubeiras (MA).

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Área de estudo

Foram feitas coletas de ostras em três estuários da região nordeste do Brasil, localizados nos estados do Ceará (CE), Piauí (PI) e Maranhão (MA). No Ceará as ostras foram coletadas no estuário do Rio Jaguaribe, localizado no litoral leste do Estado ($04^{\circ}27'39,21''\text{S}$, $37^{\circ}47'31,68''\text{W}$), no Piauí, no estuário do Rio Camurupim (Figura 1) situado ao norte do Estado ($02^{\circ}54'51''\text{S}$, $41^{\circ}24'58,2''\text{W}$) e no Maranhão, no estuário do Rio Carnaubeiras localizado na porção extremo-leste do estado ($02^{\circ}50'0,08''\text{S}$, $041^{\circ}57'36,5''\text{W}$).



Figura 1 - Coleta de ostras *Crassostrea rhizophorae* no estuário do Rio Camurupim, no Estado do Piauí.

2.2. Amostragem das ostras

As coletas de ostras *C. rhizophorae* em cada estuário foram realizadas nos meses de agosto e setembro de 2011 (período seco; N=450); março, abril (período chuvoso; N=450), outubro e novembro (período seco; N=450) de 2012 e maio e junho (período chuvoso; N=450) de 2013, totalizando 1.800 exemplares. As ostras foram coletadas manualmente das raízes de *Rhizophorae mangle* na maré baixa (Figura 1). A temperatura e salinidade foram

aferidas durante as coletas. As ostras foram transportadas em caixas isotérmicas para o Centro de Diagnóstico de Organismos Aquáticos – CEDECAM do Instituto de Ciências do Mar – LABOMAR/UFC.

No laboratório, as ostras foram medidas com um paquímetro quanto à altura (eixo dorso-ventral) segundo Galtsoff (1964), abertas com uma cunha e seus tecidos submetidos à técnica de histologia. De cada coleta/estuário, 150 ostras foram processadas para detecção de *Perkinsus* sp. (vide capítulo IV), enquanto 30 exemplares foram submetidos à técnica de histologia para a investigação de *Perkinsus* sp. e de outros parasitas.

2.3. Procedimentos histológicos

Em cada um dos exemplares foi feito um corte transversal, amostrando-se brânquias, gônada e glândula digestiva. Os fragmentos de órgãos foram fixados em Davidson (SHAW; BATTLE, 1957) por 24h e em seguida lavados em água corrente para a retirada do excesso do fixador. Posteriormente, os tecidos foram desidratados em álcool até 100%, diafanizados em xilol e impregnados em parafina histológica a 60°C. Ao micrótomo, foram feitas seções de 5µm, que foram coradas com hematoxilina de Harris e eosina (HOWARD *et al.*, 2004). As análises histopatológicas foram realizadas em microscópio de luz e fotomicrografadas. A prevalência dos parasitas foi calculada levando em consideração o número total de exemplares parasitados sobre o número de exemplares coletados (BUSH *et al.*, 1997).

3. RESULTADOS

Os resultados de temperatura e salinidade, assim como os da biometria das ostras encontram-se na tabela 1.

As análises histológicas mostraram a presença de patógenos e alterações nos tecidos das ostras, entre estes: hipertrofia dos gametas masculinos, bactérias do tipo *Rickettsia*, protozoários dos gêneros *Sphenophrya*, *Ancistrocoma*, *Steinhausia* e *Nematopsis* e metazoários dos gêneros *Urastoma*, *Tylocephalum*, *Bucephalus*, além de um metazoário não identificado (Tabela 1).

3.1. Hipertrofia gametocítica viral

A hipertrofia do gameta causada por vírus foi observada em apenas um gameta masculino de uma ostra (prevalência = 3,3%) (Tabela 1) coletada no estuário de Carnaubeiras, no período seco. O gameta hipertrofiado apresentou tamanho de 19,2 μm , com região periférica basofílica (Figura 2).

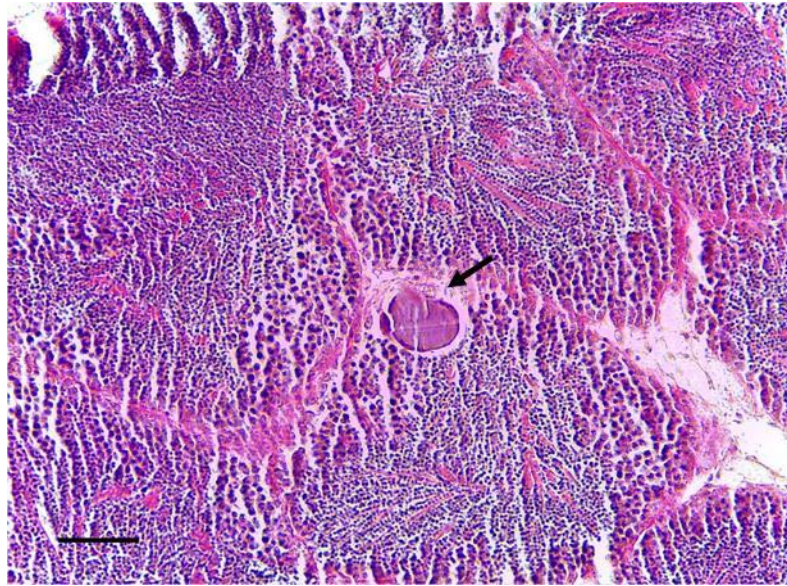


Figura 2 – Célula hipertrofiada (seta) no folículo masculino de *Crassostrea rhizophorae*. Barra de escala= 20 μm . Coloração: HE.

3.2. Bactérias do tipo *Rickettsia*

Bactérias do tipo *Rickettsia* foram detectadas infectando a ostra *C. rhizophorae* de todos os estuários nos dois períodos (seco e chuvoso). Em todas as amostragens, as colônias bacterianas foram detectadas nos túbulos digestivos, com tamanho variando de 6,88 a 20,36 μm ($11,80 \pm 4,14$; $n=10$) e apresentando caráter basófilo (Figura 3). As maiores prevalências de bactérias foram observadas em 2012, no estuário do Rio Jaguaribe (80%) (período seco) e em Carnaubeiras (73,3%) (período chuvoso) (Tabela 1). A intensidade de infecção variou de 1 a 10 colônias/corte/histológico. Em alguns exemplares, houve hipertrofia epitelial.

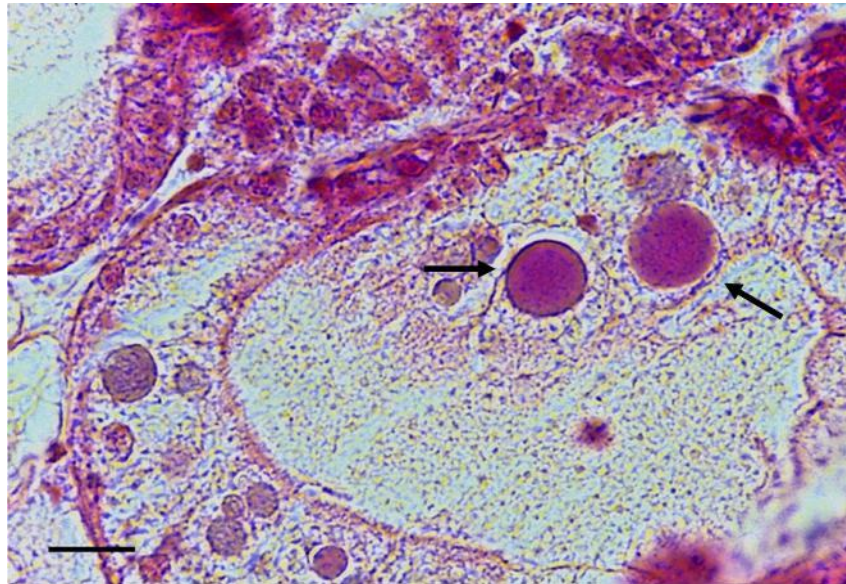


Figura 3 – Colônias de bactérias do tipo *Rickettsia* detectadas em *Crassostrea rhizophorae*. Barra de escala = 20 μ m. Coloração: HE

3.3. Protozoários

Ciliados do gênero *Sphenophrya* (Ciliophora: Sphenophryidae) foram detectados nas brânquias das ostras. Estes protozoários, medindo até 8,19 μ m, apresentaram-se ovais com núcleos basófilos e citoplasma eosinófilo (Figura 4A). A maior prevalência de *Sphenophrya* foi observada no período seco, no estuário do Rio Camurupim (40,0%) em 2012 e as menores prevalências foram de 3,3%. (Tabela 1). A intensidade de infecção foi, em geral, baixa, variando de 1 até 4 ciliados/corte histológico. No entanto, em duas ostras do estuário do Rio Camurupim, *Sphenophrya* sp., causou a formação de xenomas no epitélio das brânquias. Os xenomas foram observados nos estágios iniciais (Figura 4B) e avançados (Figura 4C), com tamanhos que variaram de 291 μ m a 1 mm, respectivamente. A prevalência de *Sphenophrya* sp., formando xenomas foi de 6,7% (2/30). A intensidade de infecção foi de até 17 xenomas/corte histológico.

Outro ciliado, *Ancistrocoma* sp., foi observado nos túbulos digestivos, com tamanho de até 36,29 μ m. Este ciliado apresentou forma ovalada, núcleo basofílico e citoplasma eosinofílico (Figura 4D). A maior prevalência foi observada nas ostras coletadas no estuário do Rio Carnaubeiras (16,7%) em 2011, no período seco. A intensidade de infecção foi baixa, com o máximo de 2 ciliados/corte histológico.

O protozoário *Steinhausia* sp. foi detectado infectando o citoplasma dos oócitos de uma ostra coletada no estuário do Rio Camurupim em 2012, no período seco (Figura 4E). Na maioria dos oócitos os vacúolos parasitológicos (contendo os esporos do parasita) ocupavam geralmente uma pequena porção do citoplasma. A prevalência foi de 3,3%, tendo sido observados 5 oócitos infectados/corte histológico. Foi evidenciada resposta de defesa pelo hospedeiro, caracterizada pela infiltração de hemócitos.

Protozoários do gênero *Nematopsis* foram observados infectando o tecido conjuntivo em várias regiões da ostra, como brânquias, em torno da glândula digestiva e no manto. Os oocistos apresentaram tamanhos variando de 13 a 19 μm ($15,75 \pm 1,77$; $n=10$) e com parede hialina (Figura 4F). A prevalência de *Nematopsis* sp. foi geralmente elevada, chegando a 100% e a intensidade de infecção foi de 1 a 4 oocisto/fagócito. De um modo geral, havia até 5 fagócitos/corte histológico, com exceção de uma ostra em que a brânquia apresentou uma maior intensidade.

Tabela 1 – Prevalência (%) de parasitas detectados na ostra *Crassostrea rhizophorae* nos estuários dos Rios Jaguaribe (JAG), Camurupim (CAM) e Carnaubearas (CAR) em 2011, 2012 e 2013. PS= Período Seco, PC= Período Chuvoso. Corte histológico (N=30).

Prevalência (%)												
Estuários	2011			2012						2013		
	JAG	CAM	CAR	JAG		CAM		CAR		JAG	CAM	CAR
	Períodos	PS	PS	PS	PC	PS	PC	PS	PC	PS	PC	PC
A (mm)	58,0± 8,4	50,0 ±5,4	50,0 ±5,2	56,5±12,0	60,1±6,1	51,5 ±6,2	47,2 ±6,9	55,1 ±10,7	55,5 ±8,2	65,4 ±8,1	61,0 ±8,9	61,4 ±9,0
T °C	38	27	30	28	30	31	28	28	30	28	30	31
S ‰	30	45	18	23	35	40	45	5	29	25	42	11
Bactérias <i>Rickettsia</i>	33,3	43,3	63,3	30,0	80,0	66,7	53,3	73,3	50,0	63,3	33,3	30,0
Protozoários												
<i>Sphenophrya</i> sp.*							6,7					
<i>Sphenophrya</i> sp.	3,3	3,3	23,3	6,7	10,0	16,7	40,0	10,0	3,3	6,7	-	3,3
<i>Ancistrocoma</i> sp.	6,7	6,7	16,7	3,3	10,0	10,0	3,3	-	3,3	-	6,7	-
<i>Steinhausia</i> sp.	-	-	-	-	-	-	3,3	-	-	-	-	-
<i>Nematopsis</i> sp.	26,7	96,7	80,0	86,7	100	100	96,7	66,7	56,7	93,3	100	50,0
Metazoários												
<i>Urastoma</i> sp.	-	-	-	-	3,3	-	-	6,7	3,3	-	-	-
<i>Bucephalus</i> sp.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6,7	-	-
<i>Tylocephalum</i> sp.	-	-	-	6,7	-	-	-	10,0	3,3	-	-	3,3
Metazoário não identificado				3,3								

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

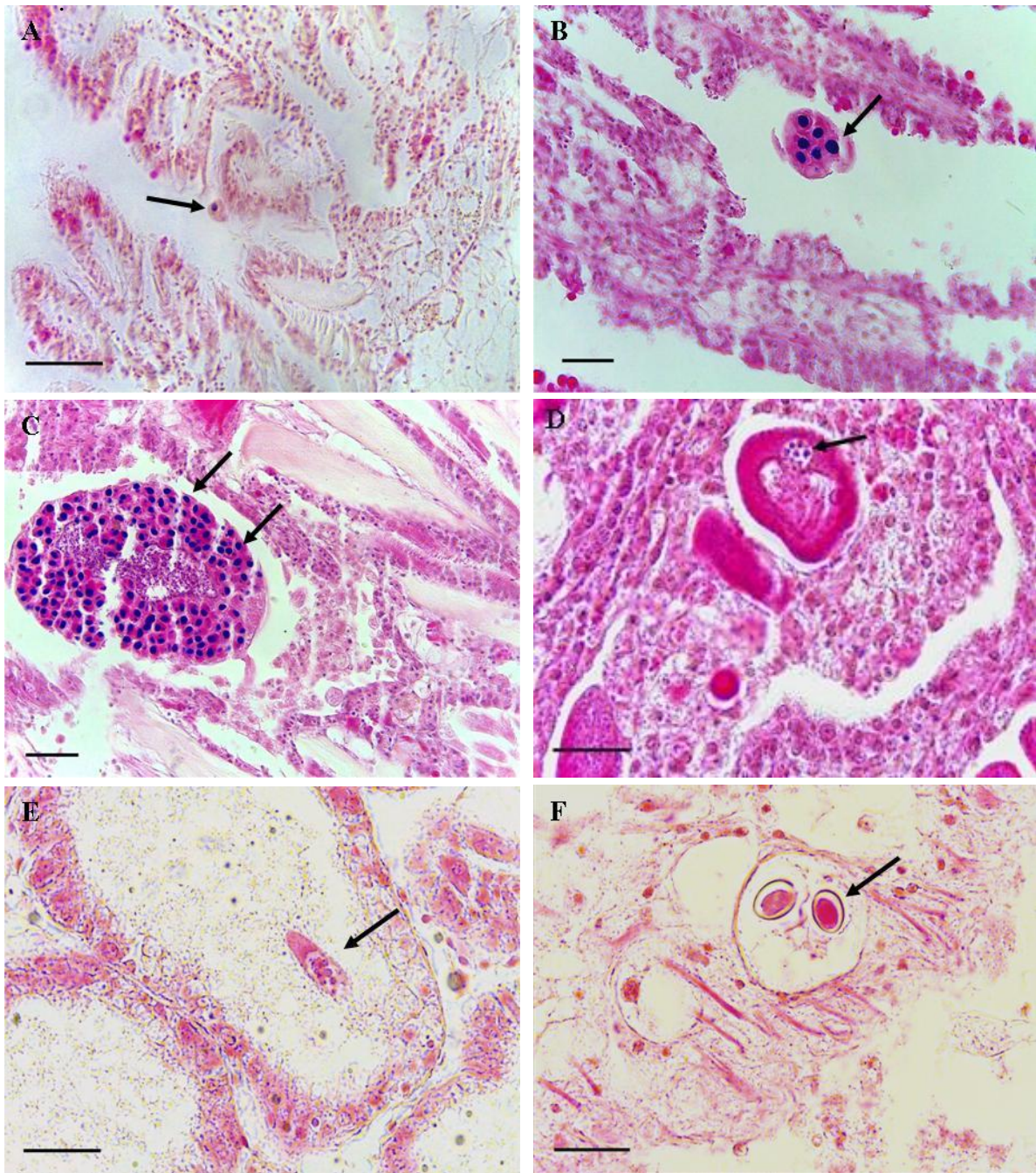


Figura 4- Protozoários observados em tecidos de *Crassostrea rhizophorae* dos estuários dos rios Jaguaribe (CE), Camurupim (PI) e Carnaubeiras (MA) em 2011, 2012 e 2013. **(A)** *Sphenophrya* sp. nas brânquias (seta). *Sphenophrya* sp. causando xenoma nos filamentos branquiais: estágio inicial **(B)** e em estágio avançado **(C)**. **(D)** Oócito mostrando vacúolo parasitário, com esporos de *Steinhausia* sp. (seta) no citoplasma. **(E)** *Ancistrocoma* sp. (seta) em um túbulo digestivo. **(F)** Oocistos de *Nematopsis* sp. (seta) no tecido conjuntivo. Barras de escala: Figs. A, D, E e F = 20 μ m; Figs. B e C = 200 μ m. Coloração: HE.

3.4. Metazoários

Entre os metazoários, *Urastoma* sp. foi observado nos filamentos branquiais das ostras coletadas em 2012, nos estuários dos Rios Jaguaribe, no período seco e de Carnaubeiras, período seco e chuvoso. Este parasita apresentou tamanho variando de 801,63 μm a 1,38 mm ($1,03 \text{ mm} \pm 255 \mu\text{m}$; $n = 4$) (Figura 5A). As prevalências foram baixas (até 6,7%) (Tabela 1). A intensidade de infestação também foi baixa, com 1 parasita/corte histológico. Aparentemente, *Urastoma* sp. não causou dano às brânquias das ostras.

Bucephalus sp. foi detectado em duas ostras coletadas no Rio Jaguaribe em 2013, período chuvoso. Os esporocistos com as massas germinativas e cercárias desse trematódeo estiveram presentes nas brânquias, manto, glândula digestiva e na gônada (Figura 5B). O tamanho das cercárias variou de 83,15 a 142,59 μm ($99,34 \pm 37,17$; $n = 10$). A prevalência observada foi de 6,7% (2/30). A intensidade de infecção foi elevada, pois as larvas dos metazoários ocupavam todos os tecidos no corte histológico. Na gônada, *Bucephalus* sp., causou a castração parasitária destruindo as células da linhagem germinativa.

Um cestóide do gênero *Tylocephalum* foi detectado apenas nas ostras dos estuários do Rio Jaguaribe e Carnaubeiras em 2012 e 2013. O parasita encontrava-se encapsulado no tecido conjuntivo em torno da glândula digestiva (Figura 5C). A maior prevalência foi de 10% (3/30) e foi registrada no período chuvoso nas ostras de Carnaubeiras (Tabela 1). O encapsulamento foi à única reação do hospedeiro observada.

Outro metazoário não identificado foi observado em uma ostra coletada no Rio Jaguaribe em 2012 (período chuvoso). O metazoário foi detectado encistado nos filamentos branquiais e mediu 1,65mm de tamanho em seu maior eixo (Figura 5D). A intensidade de infecção foi baixa, com apenas 1 parasita/corte histológico.

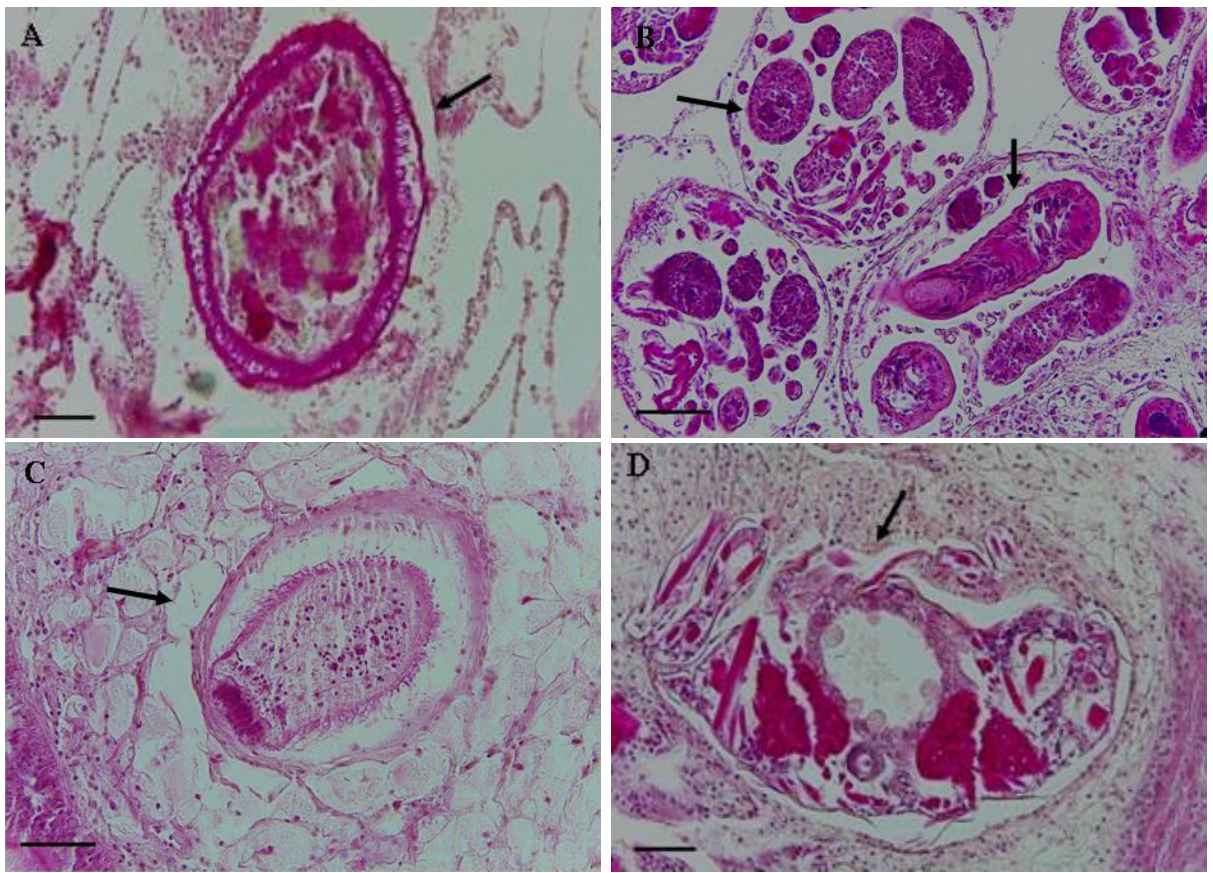


Figura 5 - Metazoários observados na ostra *Crassostrea rhizophorae* dos estuários dos rios Jaguaribe, Camurupim e Carnaubeiras em 2011, 2012 e 2013. **(A)** *Urastoma* sp. entre os filamentos branquiais. **(B)** Esporocistos de *Bucephalus* sp. **(C)** *Tylocephalum* sp. (seta) no tecido conjuntivo em torno da glândula digestiva. **(D)** Metazoário não identificado encistado no tecido conjuntivo das brânquias (seta). Barras de escala: Figs. A e D= 200 µm; Figs. B e C= 50 µm. Coloração: HE.

4. DISCUSSÃO

Este trabalho registrou parasitas na ostra nativa *Crassostrea rhizophorae* coletada em três estuários (Jaguaribe – CE, Camurupim – PI e Carnaubeiras – MA) nos períodos chuvoso e seco, nos anos de 2011, 2012 e 2013. Os parasitas encontrados foram: bactérias do tipo *Rickettsia*, protozoários e metazoários, com diferentes prevalências nos estuários. Também foi observada hipertrofia dos gametas, possivelmente causada por vírus.

A hipertrofia dos gametas foi observada apenas no período seco (3,3%) no estuário de Carnaubeiras. O primeiro relato de hipertrofia gametocítica viral foi feito em *Crassostrea virginica* dos EUA (FARLEY, 1976). As características observadas (núcleo

hipertrofiado com grânulos basofílicos na periferia das células) foram semelhantes à Hipertrofia Gametocítica Viral (VGH) descrita por Bower *et al.* (1994) e também ao que foi registrado em *C. gigas* da Ilha de Santa Catarina, na região Sul do Brasil (da SILVA; MAGALHÃES; BARRACCO, 2012). Nesse estudo, apenas os indivíduos machos foram infectados, semelhante ao que foi observado por Sabry *et al.* (2011), em *C. rhizophorae* de ambiente natural e *Crassostrea gigas* de cultivo, ambas da região de Florianópolis, Santa Catarina. Essa enfermidade já foi documentada em *C. gigas* na Coreia (CHOI *et al.*, 2004), na França (GARCIA *et al.*, 2006) e na Alemanha (WATERMANN *et al.*, 2008) e em *C. hongkongensis* da China (MOSS *et al.*, 2007).

As colônias bacterianas, observadas nas células epiteliais e no lúmen dos túbulos digestivos das ostras, apresentaram, algumas vezes, prevalências elevadas (até 80%) e apesar de estarem em baixas intensidades de infecção, causaram hipertrofia das células do epitélio. Em *Mytella guyanensis* do estuário do Rio Cachoeira – Bahia, a presença de bactérias do tipo *Rickettsia* também causaram hipertrofia das células do mesmo tecido (BOEHS *et al.*, 2010). Em ostras *C. brasiliana* e *Crassostrea gigas* de ambientes naturais e de cultivo em Santa Catarina, *Rickettsia* causou danos leves (da SILVA, MAGALHÃES; BARRACCO, 2012). Ainda, infecções por bactérias causaram alterações no citoplasma das células epiteliais de ostras *C. rhizophorae* nativas da Ilha de Santa Catarina, Santa Catarina (SABRY *et al.*, 2011). Em *C. rhizophorae* da Baía de Camamu, Bahia, as bactérias tiveram prevalência de 13,7% causando hipertrofia nas células epiteliais, e segundo os autores, lise parcial (BRANDÃO; BOEHS; da SILVA, 2013). Bactérias do tipo *Rickettsia* já foram associadas a lesões e alterações nas brânquias, glândula digestiva e manto de ostras do gênero *Crassostrea* em outras regiões do mundo (RENAULT; COCHENNEC, 1994; SUN; WU, 2004). No presente estudo não foi observado resposta de defesa pelo hospedeiro, nem tampouco mortalidade nos bancos naturais investigados que pudessem estar relacionados à ocorrência desse patógeno. Porém, episódios de mortalidade em populações de moluscos bivalves já foram associados à presença de bactérias do tipo *Rickettsia* (ELSTON, 1986; VILLALBA *et al.*, 1999).

Os ciliados dos gêneros *Sphenophrya* sp. e *Ancistrocoma* sp. foram frequentes nas ostras dos três estuários. As intensidades de infecção dos dois parasitas foram baixas, com exceção de dois exemplares em que o acúmulo de *Sphenophrya* sp. causou hipertrofia das células do epitélio branquial (xenoma), como foi observado por Bower *et al.* (1994) quando relataram que ciliados podem causar hipertrofia da célula e de seu núcleo. A prevalência

(6,7%), assim como a quantidade de xenomas (17/corte histológico) observados nas ostras desse estudo foram maiores que os valores registrados em *C. rhizophorae* da Baía de Camamu, Bahia (2,53% e de 1 a 2 xenomas/corte histológico) (BOEHS, LENZ; VILLALBA, 2009a), porém iguais aos registrados nessa mesma espécie também da costa da Bahia (BRANDÃO; BOEHS; da SILVA, 2013). Recentemente, *Sphenophrya* sp. causou xenomas, com ocorrência de 1-3 tumores/corte histológico em *C. rhizophorae* da Baía de Camamu e, segundo os autores, as lesões ocorreram apenas nas células parasitadas e não foi observada resposta hemocítica (LUZ; BOEHS, 2015). Nesse estudo, os tumores foram observados apenas nas ostras coletadas no Rio Camurupim e, considerando os três estuários estudados, essa é a primeira vez que se relata a ocorrência desses tumores em *C. rhizophorae* dessa região. A formação de xenoma também foi observada na ostra *C. virginica* na Flórida e em New Hampshire, EUA (WINSTEAD *et al.*, 2004; McGURK, 2013).

Steinhausia sp. infectou os oócitos de apenas uma ostra também coletada no Rio Camurupim no período seco. Foi observada resposta de defesa evidenciada pela infiltração de hemócitos. A resposta de defesa do hospedeiro é evidente em infecções causadas por *Steinhausia* (BOWER; MCGLADDERY; PRICE, 1994; GREEN *et al.*, 2008). Nesse estudo, a prevalência desse protozoário foi menor (3,3%) que a observada no berbigão *Anomalocardia brasiliiana* (7,5%) de um banco natural na Ilha de Santa Catarina (da SILVA; MAGALHÃES; BARRACCO, 2012). Na costa brasileira, *Steinhausia* sp. já foi registrado em ostras (PONTINHA, 2009), mexilhões (MATOS; MATOS; AZEVEDO, 2005; PONTINHA, V.A., 2010) e berbigões (da SILVA *et al.*, 2010), quase sempre em baixas prevalências e sem causar danos à gametogênese. Por outro lado, em ostras *C. rhizophorae* nativas de Santa Catarina, Sabry *et al.* (2011) registraram prevalências de até 33%, porém sem respostas imunológicas do hospedeiro. Em moluscos de outras regiões do mundo infectados por *Steinhausia* sp., foram observadas de leves a elevadas reações hemocíticas associadas à presença desse protozoário (CARBALLAL *et al.*, 2001, GREEN *et al.*, 2008). No berbigão *Cerastoderma edule* e em *Mytilus* sp. da França, *Steinhausia* sp. não causou infiltração de hemócitos associados à infecção (COMTET *et al.*, 2003; 2004).

Protozoários do gênero *Nematopsis* foram observados com diferentes prevalências nas ostras dos três estuários, chegando a alcançar 100%. Mesmo na ostra com intensidade moderada de oocistos não foi evidenciada uma resposta do hospedeiro. Esse resultado foi semelhante ao observado por Cremonte *et al.* (2005), que relataram que mesmo quando

Nematopsis sp. esteve em elevados níveis de infecção nos tecidos de *Pitar rostrata*, aquele não induziu reações de defesa no hospedeiro. Por outro lado, em *C. rhizophorae* do estuário do Rio Jaguaribe (CE), *Nematopsis* sp. causou reação de defesa evidenciada por infiltração hemocítica (SABRY *et al.*, 2007). Em *A. brasiliana*, baixas intensidades de infecções por *Nematopsis* sp. não causaram lesões ou reação do hospedeiro (BOEHS *et al.*, 2010). Já em *Mytella guyanensis*, elevadas intensidades desse protozoário causaram alteração na morfologia do manto (BOEHS *et al.*, 2010). Em *C. rhizophorae* da Ilha de Santa Catarina, baixas intensidades de infecção desse protozoário não causaram reação ou danos nos hospedeiros (da SILVA, MAGALHÃES; BARRACCO, 2012). Em contrapartida, elevadas intensidades de infecção por *Nematopsis* sp. causaram destruição no tecido conjuntivo do mexilhão *M. guyanensis* (CEUTA; BOEHS, 2012) e de *C. rhizophorae* da costa da Bahia (BRANDÃO; BOEHS; da SILVA, 2013). As reações de defesa ou danos causados pela infecção por *Nematopsis* parecem diferir entre os moluscos, uma vez que este protozoário já foi associado a relatos de mortalidades no berbigão *Cerastoderma edule* de Portugal (AZEVEDO; CACHOLA, 1992).

Metazoários dos gêneros *Urastoma*, *Bucephalus* e *Tylocephalum* foram identificados sempre em baixas prevalências (3,3% a 10%). *Urastoma* sp. foi observado entre os filamentos das brânquias e não causou danos ao hospedeiro, sendo sua ocorrência comum em bivalves (BOWER; MCGLADDERY; PRICE, 1994). Em moluscos do Brasil, a ocorrência de *Urastoma* em bivalves tem sido recorrente e sempre relacionado a baixas intensidades de infecção, sem causar danos aos hospedeiros (COVA *et al.*, 2015; LUZ; BOEHS, 2015; ROMÃO *et al.*, 2014; SABRY *et al.*, 2011; SABRY *et al.*, 2013). O trematódeo bucefalídeo observado apenas em duas ostras provocou a completa destruição dos folículos gonádicos, causando a castração parasitária dos animais infectados, pois embora a prevalência tenha sido baixa, a intensidade de infestação foi elevada. *Bucephalus* sp. tem sido observado em moluscos de estuários da costa brasileira com diferentes prevalências, no entanto sempre causando danos ao hospedeiro devido a elevada intensidade de infecção nos tecidos dos animais. Em *Anomalocardia brasiliana* do estuário do Rio Pacoti, Ceará, as prevalências de bucefalídeos foram elevadas (66,7%), enquanto em ostras *C. rhizophorae* foi de 3,3% (ROMÃO *et al.*, 2014). Em *C. rhizophorae* do estuário da Baía de Camamu, Bahia, a prevalência desse parasita foi baixa (2%) e também houve destruição dos folículos e gametas (LUZ; BOEHS, 2015).

No caso da infestação por *Tylocephalum*, foi observada uma reação do hospedeiro, a qual foi evidenciada pelo encapsulamento do parasita. Este metazoário tem sido relatado parasitando moluscos bivalves marinhos em várias regiões do mundo (LAUCKNER, 1983) e com resposta de defesa evidenciada pela infiltração de hemócitos (SINDERMANN, 1970; LAUCKNER, 1983). A resposta de defesa evidenciada pelo encapsulamento já foi registrada em outros trabalhos (BOEHS; MAGALHÃES, 2004; BOEHS *et al.*, 2010; SABRY *et al.*, 2011; da SILVA; MAGALHÃES; BARRACCO, 2012). Nesse estudo, os metacestóides foram encontrados em torno da glândula digestiva. No entanto, estes têm sido observados próximos à gônada (BOEHS *et al.*, 2010) e também nas brânquias e manto (LAUCKNER, 1983, WINSTEAD *et al.*, 2004).

Um metazoário não identificado foi observado nas brânquias de uma ostra no estuário do Rio Jaguaribe (período chuvoso, 2012). Este parasita assemelha-se a um copépode, no entanto, maiores investigações precisam ser feitas para a confirmação taxonômica desse metazoário.

Concluindo, os resultados desse estudo mostraram que em geral as bactérias e protozoários foram mais comuns nas ostras quando comparadas às baixas prevalências de metazoários nestes bivalves, podendo este fato estar relacionado à interação hospedeiro/parasita. A infestação por trematódeos bucefalídeos teve baixa prevalência nas populações de *C. rhizophorae* estudadas, mas possivelmente inviabilizaria a gametogênese nos indivíduos onde foram encontrados. Portanto, é recomendável o contínuo monitoramento das populações de moluscos bivalves nesses estuários.

REFERÊNCIAS

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

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

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

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, 2009a.

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 AT, Lizama MLA, Takemoto R. (org.). Patologia e Sanidade de Organismos Aquáticos, Maringá: Massoni pp. 165-193. 2012.

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

BOEHS, G.; VILLALBA, A.; CEUTA, L.O.; LUZ, J.R. Parasites of three commercially exploited bivalve mollusc species of the estuarine region of the Cachoeira River (Ilhéus, Bahia, Brazil). **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 103, p. 43-47, 2009b.

BOEHS, G.; VILLALBA, A.; CEUTA, L.O.; LUZ, J.R. Parasites of three commercially exploited bivalve mollusc species of the estuarine region of the Cachoeira River (Ilhéus, Bahia, Brazil). **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 103, p. 43–47, 2010.

BOWER, S.M.; MCGLADDERY, S.E.; PRICE, I.M. Synopsis of infectious diseases and parasites of commercially exploited shellfish. **Annual Review of Fish Diseases**, v. 4, p. 1-199, 1994.

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

BUSH, A.O.; LAFFERTY, A.D.; LOTZ, J.M.; SHOSTAK, A.W. Parasitology meets ecology on its own terms: Margoli et al. revisited. **Journal of Parasitology**, v. 83, p. 575–583, 1997.

CARBALLAL, M.J.; IGLESIAS, D.; SANTAMARINA, J.; FERRO-SOTO, B.; VILLALBA, A. Parasites and pathologic conditions of the cockle *Cerastoderma edule* populations of the coast of Galicia (NW Spain). **Journal of Invertebrate Pathology**. v. 78, p. 87–97, 2001.

CEUTA, L.O.; BOEHS, G. Parasites of the mangrove mussel *Mytella guyanensis* (Bivalvia: Mytilidae) in Camamu Bay, Bahia, Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 72, p. 421-427, 2012.

CHOI, D.L.; LEE, N.S.; CHOI, H.J.; PARK, M.A.; MCGLADDERY, S.E.; PARK, M.S. Viral gametocytic hypertrophy caused by a papova-like virus infection in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* in Korea. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 59, p. 205–209, 2004.

COMTET, T.; GARCIA, C.; LE COGUIC, Y.; JOLY, J. First record of the microsporidian parasite *Steinhausia mytilovum* in *Mytilus* sp. (Bivalvia: Mytilidae) from France. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 58, p. 261–264, 2004.

COMTET, T.; GARCIA, C.; LE COGUIC, Y.; JOLY, J. Infection of the cockle *Cerastoderma edule* in the Baie des Veys (France) by the microsporidian parasite *Steinhausia* sp. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 57(1-2):135-9, 2003.

COVA, A.W.; SERAFIM JÚNIOR, M.; BOEHS G.; SOUZA, J.M. Parasites in the mangrove oyster *Crassostrea rhizophorae* cultivated in the estuary of the Graciosa River in Taperoá, Bahia. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v. 24, p. 21-27, 2015.

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

DA SILVA, P.M.; CREMONTE, F.; SABRY, R.C.; ROSA, R.D.; CANTELLI, L.; BARRACCO, M.A. Presence and histopathological effects of the *Parvatrema* sp. (Digenea, Gymnophallidae) in the stout razor clam *Tagelus plebeius* (Bivalvia, Psammobiidae). **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 102, p. 14–20, 2009.

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

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

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

DANTAS NETO M.P.; SABRY R.C.; DA SILVA P.M.; FERREIRA L.P.; RODRIGUES C.C.J.; MAGGIONI, R. Ocorrência de *Perkinsus* sp. na ostra do mangue *Crassostrea rhizophorae* (Bivalvia: Ostreidae) em regiões estuarinas do Nordeste do Brasil. pp.136 -, in **Anais do XII Encontro Brasileiro de Patologistas de Organismos Aquáticos**, 407p., Bonito – MT, 2012.

ELSTON, RA. An Intranuclear pathogen [nuclear inclusion X (NIX)] associated with massive mortalities of the Pacific razor clam, *Siliqua patula*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 47, p. 93-104, 1986.

FARLEY, C.A. Ultrastructural observations on epizootic neoplasia and lytic virus infection in bivalve mollusks. **Progress in Experimental Tumor Research**, v. 20, p. 283–294, 1976.

FERREIRA, L.P.; SABRY, R.C.; DA SILVA, P.M.; GESTEIRA, T.C.V.; ROMÃO, L.S.; PAZ, M.P.; FEIJÓ R.G.; DANTAS NETO, M.P.; MAGGIONI R. First report of *Perkinsus beihaiensis* in wild clams *Anomalocardia brasiliana* (Bivalvia: Veneridae) in Brazil. **Experimental Parasitology**, v.150, p. 67-70, 2015.

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

GALTSOFF, P.S. The American Oyster *Crassostrea virginica* Gmelin. **Fishery Bulletin**, v. 64. United States Government Printing Office, Washington, D. C. iii + 480 p, 1964.

GALVÃO, M S.N.; HENRIQUES, M.B.; PEREIRA, O.M.; MARQUES, H.L. A. Ciclo reprodutivo e infestação parasitária de mexilhões *Perna perna* (Linnaeus, 1758). **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 32, p. 59-71, 2006

GARCIA, C.; ROBERT, M.; ARZUL, I.; CHOLLET, B.; JOLY, JEAN-PIERRE.; MIOSSEC, L.; COMTET T.; BERTHE, F. Viral gametocytic hypertrophy of *Crassostrea gigas* in France: from occasional records to disease emergence. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 70, p. 193–199, 2006.

GREEN, T.J.; JONES, B.J.; ADLARD, R.D.; BARNES, A.C. Parasites, pathological conditions and mortality in QX-resistant and wild-caught Sydney rock oysters, *Saccostrea glomerata*. **Aquaculture**, v. 280, p. 35-38, 2008.

HOWARD, D.W.; LEWIS, E.J.; KELLER, B.J.; SMITH, C.S.; Histological Techniques for Marine Bivalve Mollusks and Crustaceans. NOAA Technical Memorandum. 218pp. 2004.

LAUCKNER, G. Diseases of Mollusca: Bivalvia. In: KINNE, O. (ed.) **Diseases of marine animals**. Hamburg, Biologische Anstalt Helgoland. p. 478-961, 1983.

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.

LUZ, M.S.A.; BOEHS, G. Parasites in the oyster *Crassostrea rhizophorae* from farmed and natural stocks in the Bay of Camamu, Bahia, northeastern Brazil. **Journal of Parasitology and Vector Biology**, v. 7, p. 120-128, 2015.

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

McGURK, E.S. **Ciliate xenomas in *Crassostrea virginica* from great Bay, New Hampshire**. 2013. 53f. Master of Science Graduate Program in Biology. University of New Jersey, 2013.

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. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 77, p. 207–223, 2007.

NARCHI, W. Encontro de *Bucephalopsis haimeana* (Lacaze-Duthiers) no Brasil. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v.18, p.22-24, 1966.

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

PAILLARD, C. A short-review of brown ring disease, a vibriosis affecting clams, *Ruditapes philipinarum* and *Ruditapes decussatus*. **Aquatic Living Resources**, v.17, p. 397–409, 2004.

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 and Animal Science**. v. 45, p. 95-100, 2008.

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

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

RENAULT, T.; COCHENNEC, N. *Rickettsia*-like organisms in the cytoplasm of gill epithelial cells of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 61, p. 160–162, 1994.

RENAULT, T.; NOVOA, B. Viruses infecting bivalve molluscs. **Aquatic Living Resources**, v. 17, p. 467–475, 2004.

ROMÃO, L.S.; FERREIRA, L.P.; MAGGIONI, R.; ARAÚJO, R.L.; GESTEIRA T.C.V.; DA SILVA, P.M.; SABRY, R.C. Patógenos em duas espécies de bivalves comercialmente importantes do estuário do Rio Pacoti, Estado do Ceará, Brasil. **Arquivos de Ciências do Mar**, v. 47, p. 57–63, 2014.

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

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

SABRY, R.C.; MAGALHAES, A.R.M. Parasitas em ostras de cultivo (*Crassostrea rhizophorae* e *Crassostrea gigas*) da Ponta do Sambaqui, Florianópolis, SC. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 27, p. 194-202, 2005.

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.

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

SUÁREZ–MORALES, SCARDUA, M.P., DA SILVA, P.M. Occurrence and histopathological effects of *Monstrilla* sp. (Copepoda: Monstrilloida) and other parasites in the brown mussel *Perna perna* from Brazil. **Journal of the Marine Biological Association**. U.K. v. 90, p. 953-958, 2010.

SUN, J.; WU, X. Histology, ultrastructure, and morphogenesis of a Rickettsia-like organism causing disease in the oyster, *Crassostrea ariakensis* Gould. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 86, p. 77-86, 2004.

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

VILLALBA, A.; CARBALLAL, M.J.; LÓPEZ, C.; CABADA, A.; CORRAL, L.; AZEVEDO, C. Branchial *Rickettsia*-like infection associated with clam *Venerupis rhomboides* mortality. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 36, p. 53-60, 1999.

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

WATERMANN, B.T.; HERLYN M.; DAEHNE, B.; BERGMANN, S.; MEEM- KEMN, M.; KOLODZEY, H. Pathology and mass mortality of Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg), in 2005 at the East Frisian coast, Germany. **Journal of Fish Diseases**, v. 31, p. 621-630, 2008.

CAPÍTULO IV

**Primeiro registro de *Perkinsus chesapeaki* infectando a ostra
Crassostrea rhizophorae na América do Sul.**

RESUMO

O presente estudo investigou a presença de protozoários do gênero *Perkinsus* infectando a ostra *Crassostrea rhizophorae*, importante recurso pesqueiro dos estuários do nordeste brasileiro. *Perkinsus* spp. são responsáveis pela enfermidade perkinsiose, a qual tem sido associada a grandes mortalidades de moluscos no mundo inteiro. O objetivo do presente trabalho foi investigar a presença de *Perkinsus* spp. em *C. rhizophorae* de bancos naturais dos estuários dos rios Carnaubeiras (MA), Camurupim (PI) e Jaguaribe (CE). Desta forma, exemplares de *C. rhizophorae* (n=1350) foram coletados no período chuvoso e seco de 2012 e chuvoso de 2013. Os fragmentos de órgãos das ostras foram excisados e incubados em meio fluido de tioglicolato de Ray (RFTM) por 7 dias no escuro, à temperatura ambiente. Ensaio de PCR foram realizados nos animais positivos e suspeitos em RFTM e amostras com melhores amplificações da região ITS de *Perkinsus* foram sequenciadas. De cada coleta, 30 exemplares foram submetidos à técnica clássica de histologia. As análises em RFTM confirmaram a presença de hipnósporos de *Perkinsus* spp., os quais se apresentaram esféricos, com coloração escura e tamanhos variando entre 4,11 e 45,31 µm. A maior prevalência observada em RFTM foi de 34% no estuário do Rio Carnaubeiras, durante o período chuvoso de 2013. Os ensaios por PCR confirmaram 29,89% (87/291) dos resultados positivos em RFTM. O sequenciamento dos fragmentos amplificados da região ITS de *Perkinsus* confirmou a presença de três espécies do patógeno infectando *C. rhizophorae*: *P. beihaiensis*, *P. marinus* e *P. chesapeakei*. As análises filogenéticas, realizadas através de *Neighbor-Joining*, colocaram *P. chesapeakei* identificada neste estudo em um grupamento bem definido com outros isolados dos EUA e do Mediterrâneo, resultando no primeiro registro de *P. chesapeakei* infectando *C. rhizophorae* na América do Sul e de *Perkinsus marinus*, parasita de declaração obrigatória a OIE, em ostras do Estado do Ceará.

Palavras-chave: *Perkinsus chesapeakei*, *Perkinsus marinus*, *Perkinsus beihaiensis*, bivalves, sanidade.

ABSTRACT

This study investigated the presence of protozoa of genus *Perkinsus* infecting the oyster *Crassostrea rhizophorae*, important fishing resource of the Brazilian Northeastern estuaries. *Perkinsus* spp. are responsible for the disease perkinsiosis, which has been associated to great mollusks mortalities worldwide. This study aimed to investigate the presence of *Perkinsus* spp. in *C. rhizophorae* from estuaries of the rivers Carnaubeiras (MA), Camurupim (PI) and Jaguaribe (CE). Thus, *C. rhizophorae* specimens (n= 1350) were collected in the rainy and dry season of 2012 and rainy season of 2013. The oysters organs fragments were excised and incubated in Ray's Fluid Thioglycollate Medium (RFTM) for 7 days at dark and at room temperature. PCR assays were performed on the positive and suspect animals in RFTM and samples with the best amplifications of the ITS region of *Perkinsus* were sequenced. From each sample, 30 individuals were submitted to classical histology technique. RFTM assays confirmed the presence of hypnospores of *Perkinsus* spp., which presented spherical, bluish-dark or black colored with sizes ranging from 4.11 to 45.31 μm . The highest prevalence observed in RFTM was 34% in the estuary of Carnaubeiras River during the rainy season of 2013. PCR analyses confirmed 29.89% (87/291) of the positive results in RFTM. The sequencing of the amplified fragments from the ITS region of *Perkinsus* confirmed the presence of three species of the pathogen infecting *C. rhizophorae*: *P. beihaiensis*, *P. marinus* and *P. chesapeaki*. Phylogenetic analysis using *Neighbor-Joining* algorithm places *P. chesapeaki* species identified in this study in a well-defined grouping with other isolates from the USA and the Mediterranean. This is the first record of *P. chesapeaki* infecting *C. rhizophorae* in South America, and of *Perkinsus marinus*, notifiable parasite to OIE, in oysters from Ceará State.

Keywords: *Perkinsus chesapeaki*, *Perkinsus marinus*, *Perkinsus beihaiensis*, bivalves, sanity.

1. INTRODUÇÃO

Os moluscos bivalves, incluindo as ostras do gênero *Crassostrea* (Bivalvia: Ostreidae) são recursos estuarinos bastante explorados no ecossistema manguezal. Os rios Carnaubeiras (Estado do Maranhão), Camurupim (Piauí) e Jaguaribe (Ceará) possuem importantes estuários na região nordeste do Brasil, tanto do ponto de vista ecológico, como de suporte para comunidades, servindo como locais de coleta de moluscos para consumo e comercialização. Estes estuários apresentam potencial para o cultivo desses bivalves, no entanto, a atividade ainda não é desenvolvida nessas regiões.

Os moluscos de ambientes naturais e também de cultivo, podem ser afetados por patógenos de diferentes grupos, entre eles os protozoários pertencentes ao gênero *Perkinsus*, o qual possui sete espécies: *P. beihaiensis*, *P. chesapeaki* (= *P. andrewsi*), *P. honshuensis*, *P. marinus*, *P. mediterraneus*, *P. qugwadi* e *P. olseni* (= *P. atlanticus*) (VILLALBA *et al.*, 2004; CHOI; PARK, 2010). Duas destas espécies (*Perkinsus marinus* e *P. olseni*) são de declaração obrigatória à Organização Mundial para Saúde Animal pelo risco que representam para populações de moluscos, pois causam altas mortalidades (VILLALBA *et al.*, 2004). Protozoários do gênero *Perkinsus* são relatados infectando moluscos marinhos em várias regiões do mundo.

No Brasil, somente nos últimos anos os estudos sobre a perkinsiose têm chamado a atenção, o que se iniciou com o primeiro registro de *Perkinsus* sp. na ostra *Crassostrea rhizophorae* do estuário do Rio Jaguaribe, Ceará (SABRY *et al.*, 2009). A partir daí, os estudos foram intensificados em diversas regiões da costa brasileira. Registros de *Perkinsus* sp. foram documentados em *C. rhizophorae* de regiões estuarinas nos estados do Maranhão, Piauí e Ceará por Dantas Neto *et al.* (2012). Posteriormente, Sabry *et al.* (2013) confirmaram que a espécie de *Perkinsus* que afetava as ostras no Ceará tratava-se de *Perkinsus beihaiensis*. Nesse mesmo ano foi feito o primeiro registro, na América do Sul, de *P. marinus* infectando *C. rhizophorae* no estuário do Rio Paraíba (nordeste do Brasil) (da SILVA *et al.*, 2013) e de *Perkinsus* sp. nessa mesma espécie de ostra da costa da Bahia (BRANDÃO *et al.*, 2013). Posteriormente foi registrado *Perkinsus* sp. e *P. marinus* em *Crassostrea gasar* da Paraíba (QUEIROGA *et al.*, 2013; QUEIROGA *et al.*, 2015, *in press*). Similarmente, em *C. gasar* do estuário do Rio São Francisco, Sergipe (nordeste do Brasil), foram identificados *P. marinus* e *P. olseni* (da SILVA *et al.*, 2014). *Perkinsus beihaiensis* também foi registrado em

Anomalocardia brasiliiana do estuário do Rio Timonha, Ceará (FERREIRA *et al.*, 2015). Todos esses registros ampliaram os conhecimentos sobre a perkinsiose em moluscos da costa brasileira. O objetivo desse trabalho foi investigar a presença de *Perkinsus* spp. em *Crassostrea rhizophorae* de bancos naturais dos estuários dos Rios Jaguaribe (CE), Camurupim (PI) e Carnaubeiras (MA).

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Área de estudo

As ostras foram coletadas no estuário do Rio Jaguaribe, localizado no litoral leste do Estado do Ceará ($04^{\circ}27'39,21''\text{S}$, $37^{\circ}47'31,68''\text{W}$), no estuário do Rio Camurupim, situado ao norte do Estado do Piauí ($02^{\circ}54'51''\text{S}$, $41^{\circ}24'58,2''\text{W}$) e no estuário do Rio Carnaubeiras, localizado na porção extremo-leste do Estado do Maranhão ($02^{\circ}50'0,08''\text{S}$, $041^{\circ}57'36,5''\text{W}$) (Figura 1).

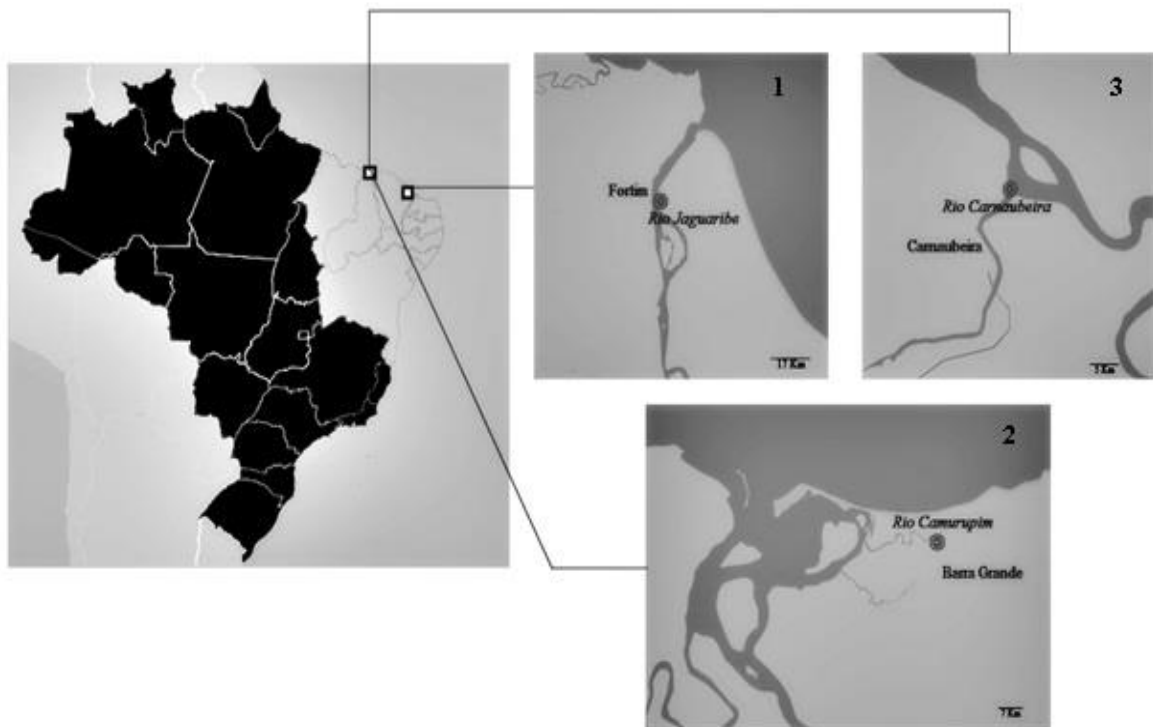


Figura 1 – Mapa indicando os estuários nos estados do Ceará, Piauí e Maranhão, onde foram realizadas as coletas da ostra *Crassostrea rhizophorae*. (1) Rio Jaguaribe; (2) Rio Camurupim e (3) Rio Carnaubeiras. Área mais clara do mapa do Brasil indica a região Nordeste.

2.2. Amostragem das ostras

As ostras foram coletadas manualmente das raízes de *Rhizophorae mangle*, na maré baixa nos estuários do Rio Jaguaribe (CE), Camurupim (PI) e Carnaubeiras (MA). As coletas foram realizadas em março de 2012 no Ceará e em abril no Piauí e Maranhão, período considerado chuvoso na região e neste mesmo ano, houve repetição de coletas no período seco, em outubro no Ceará e Piauí e em novembro no Maranhão. Em 2013, coletas foram feitas apenas no período chuvoso, sendo em maio no Maranhão e em junho no Ceará e Piauí. Em cada estuário foram coletados 150 espécimes/coleta, totalizando 450 animais em cada um dos três estuários e 1.350 ostras no total.

Os dados de temperatura e salinidade foram aferidos a cada amostragem. As ostras foram transportadas em caixas isotérmicas para o Centro de Diagnóstico de Organismos Aquáticos – CEDECAM do Instituto de Ciências do Mar – LABOMAR/UFC. No laboratório, os animais foram medidos quanto à altura da concha, segundo Galtsoff (1964), abertos e seus tecidos submetidos às técnicas de incubação de tecidos em meio líquido de tioglicolato de Ray (RFTM), reação em cadeia da polimerase (PCR), sequenciamento e histologia, para se investigar a presença e/ou ausência de *Perkinsus* spp.

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

Todos os animais coletados ($N= 1.350$) foram submetidos à técnica de incubação dos tecidos em RFTM. Para isso, duas demibrânquias e o reto de cada ostra foram incubados em tioglicolato na presença antibióticos e antifúngicos (Penicilina/Estreptomicina e Nistatina) por 7 dias no escuro à temperatura ambiente. Decorrido esse período, os fragmentos de órgãos foram coletados com auxílio de uma pinça, macerados em lâmina e corados com lugol a 3% (OIE, 2012), de acordo com Ray (1954). O material foi analisado ao microscópio de luz para verificar a presença e/ou ausência de células de *Perkinsus*, as quais apresentaram-se esféricas e com coloração azul ou negra azulada. A prevalência de *Perkinsus* foi calculada de acordo com Bush *et al.* (1997) e a intensidade de infecção seguiu a escala de Mackin (RAY, 1954), modificada por Sabry *et al.* (2009).

2.4. Extração de DNA total

A extração de DNA genômico total foi realizada em animais positivos e suspeitos ($N= 309$) na técnica de RFTM de acordo com o protocolo descrito por Sambrook *et al.* (1989). O material genético foi extraído de aproximadamente 50mg de tecido branquial e do reto dos animais, conservados previamente em álcool 95% (MERCK®).

Para a extração, o material biológico foi lavado com uma solução de Tris-HCl (10mM, pH 7,0) e colocado em microtubos do tipo Eppendorf de 1,5ml contendo 500 μ L de tampão de extração (Tris-HCl 100 mM, SDS 1%). Em seguida, adicionou-se 30 μ L de proteinase K (10mg/ml) e misturou-se bem por inversão. As amostras foram incubadas a 65°C por 3 horas até o tecido estar completamente digerido, misturando-se ocasionalmente por inversão.

Após a digestão do tecido, foi adicionado 500 μ L de fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1) (INVITROGEN®) misturando-se por inversão durante 5 min. Para a separação das fases, as amostras foram centrifugadas a 10.300g/5 min. Uma alíquota de 500 μ L da fase aquosa superior foi transferida para outro microtubo tomando-se o cuidado essencial para não perturbar a interface. Na etapa posterior de purificação, 500 μ L de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) foram novamente adicionados à amostra e misturou-se por inversão durante 5 min. As amostras foram novamente centrifugadas a 10.300g/5 min. e 450 μ L da fase aquosa superior foi transferida para outro microtubo de 1,5mL. Para precipitação do DNA, foi adicionado 1,0mL de etanol absoluto e 50 μ L de acetato de sódio 3M às amostras, incubando-as a 20°C/15 min. Após esta etapa, as amostras foram centrifugadas a 10.300g/15 min. O sobrenadante foi removido cuidadosamente por inversão. As amostras foram então lavadas com 500 μ L de etanol 70%, invertendo-se algumas vezes para posteriormente serem centrifugadas novamente a 10.300g/5 min. O etanol foi descartado cuidadosamente e os microtubos invertidos sobre um papel toalha a fim de maximizar o processo de secagem à temperatura ambiente por 10 minutos. O DNA das amostras foi ressuspendido em 50 μ L de TE (Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM) e conservado a -20°C.

Antes da utilização do DNA total extraído, sua integridade foi avaliada por corrida eletroforética em gel de agarose a 1%, preparado em 150mL de TAE (1X) (0,04M Tris Base; 0,04M acetato e 0,001M EDTA). O gel foi preparado em uma cuba *Electrophoresis Systems FB-SB-1316* (FISHERBIOTECH®) contendo o tampão TAE (1X). Para a aplicação

no gel, 5,0µL de cada amostra de DNA foi misturada a 3µL do corante *Blue juice*TM 10X (INVITROGEN®) contendo 1µL de Gel Red 20X. A corrida eletroforética foi realizada com a potência de 0,58 volts/cm² de corrente contínua durante 60 minutos. O gel foi visualizado em um transiluminador ultravioleta *Select*TM*Series* (ESPECTROLINE®) e fotodocumentado através do sistema de análise e fotodocumentação de eletroforese (*Electrophoresis Documentation and Analysis System 290*, EDAS 290) (KODAK®) o qual utiliza o programa *KODAK 1D Image Analysis Software* para a visualização das imagens (PIZZONIA, 2001).

O DNA total de cada amostra foi então quantificado em um aparelho espectrofotômetro NANODROP 2000C (THERMO SCIENTIFIC®), utilizando-se a absorvância na faixa de 260 nm. A relação de absorvância (260A/280A) também foi analisada para a certificação do grau de pureza do DNA total extraído.

2.5. Clonagem e produção de controles positivos para detecção de *Perkinsus* spp.

Para a produção de controle positivo, fragmentos referentes ao gene ITS de *Perkinsus behaiensis* foram excisados e recuperados do gel de agarose, utilizando o *kit PureLink*TM Quick Gel Extraction (INVITROGEN®), de acordo com as recomendações do fabricante.

A clonagem destes fragmentos foi realizada seguindo-se as recomendações do fabricante do *kit pGEM*[®]-T *Easy Vector Systems* (PROMEGA®). A ligação dos fragmentos ao plasmídeo pGEM-T (razão molar 3:1) procedeu a 4°C/18 horas. Bactérias *E. coli* TOP10F' foram transformadas com o produto da ligação por choque térmico (gelo/20 min: 42°C/50s: gelo/2 min). Após o choque térmico foi adicionado 250µl de meio SOC (triptona 2%; extrato de levedura 0,5%; NaCl 10mM; KCl 2,5mM; MgCl₂ 10mM; Glucose 20mM; pH 7,0) pré-aquecido a 37°C. As bactérias transformadas foram incubadas em *shaker* por 2 horas/37°C/150rpm. Com o auxílio de uma alça de Drigalsky, plaqueou-se 100µL da solução contendo as células transformadas com os produtos de ligação em meio contendo LB Agar (ampicilina 100µg/mL, IPTG 0,5mM e Xgal 80µg/mL). Após incubação a 37°C/16h observou-se o crescimento de colônias brancas e azuis. Para a extração dos plasmídeos, apenas as colônias brancas foram selecionadas. A partir da colônia selecionada foi feito, com o auxílio de uma ponteira, um inóculo em 1,5mL de meio LB caldo contendo ampicilina (100µg/mL). Os inóculos foram incubados a 37°C/16 horas. Os plasmídeos foram extraídos de

acordo com as instruções contidas no *kit* PureLink™ Quick Plasmid Miniprep (INVITROGEN™). A confirmação da transformação dos clones se deu a partir da amplificação por PCR dos fragmentos-alvo utilizando os primers ITS-Forward e ITS-Reverse.

2.6. Detecção de *Perkinsus* por reação em cadeia da polimerase (PCR)

O DNA de 309 ostras foi analisado para *Perkinsus* sp. através de PCR, incluindo 291 animais positivos e suspeitos nos ensaios de RFTM e ainda 18 animais selecionados aleatoriamente, entre as ostras que foram RFTM-negativas.

A análise por PCR foi realizada com o conjunto de iniciadores 85/750 Perk ITS (CASAS *et al.*, 2002) os quais hibridizam especificamente com regiões conservadas dos espaçadores internos transcritos (ITS) a partir do complexo de genes de rRNA, específicas para membros do gênero *Perkinsus*. O DNA extraído a partir de células de *Perkinsus beihaiensis* foi utilizado como controle positivo. Para o controle negativo, o DNA foi substituído por água isenta de nuclease. Cada reação de 25µL continha 50-100ng de DNA molde, 1x tampão de PCR, 1.5mM MgCl₂, 0.2mM de cada dNTP, 0.8mM de cada primer e 1 unidade de Taq DNA polimerase (Invitrogen). O protocolo incluiu uma desnaturação de DNA a 94°C durante 10 min, e 35 ciclos de amplificação a 94°C (1 min), 55°C (1 min) e 72°C (1 min), seguido por uma extensão final a 72°C durante 10 min. Os produtos de PCR foram corados com *Blue juice*™ e separados por eletroforese em gel de agarose TAE 1,5%.

2.7. Sequenciamento do DNA

O sequenciamento direto para produtos de PCR foi feito para 37 amostras positivas. As reações foram realizadas através do *kit* de sequenciamento *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing* (Applied Biosystems). Para cada reação de sequenciamento foram utilizados 2µL de *BigDye*; 1µL de tampão proprietário 5x, 0,5 a 2,5µL do DNA purificado, 0,32µL de primer (3,2 pmol) e água suficiente para um volume total de reação de 10µL. Todas as amostras foram sequenciadas nas direções *forward* e *reverse*.

A reação de sequenciamento foi realizada em termociclador Techne (Flexigene®) nas seguintes condições de termociclagem: desnaturação inicial de 96°C por 4 min, seguida de 25 ciclos (96°C por 10 seg, 50°C por 5 seg, 60°C por 4 min). A purificação dos produtos da

reação de sequenciamento foi feita adicionando-se 40µL de isopropanol (65%) por reação. Em seguida, a placa contendo as reações foi envolvida em papel alumínio e mantida em temperatura ambiente por 20 minutos. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 4.000 rpm por 30 minutos a 22°C. Subsequentemente, por inversão da placa, foi feito o descarte do isopropanol. Em seguida, foram adicionados 150µL de etanol (60%), onde foram novamente centrifugadas a 4.000 rpm/10 min/22°C, com descarte do etanol pela inversão da placa. O produto foi seco através da inversão da placa em centrifuga através de um *spin* de 1000 rpm. Finalmente, as amostras foram ressuspensas em formamida, desnaturadas a 95°C por 5 min e lidas em sequenciador automático capilar ABI 3500 (Applied Biosystems).

2.8. *Elaboração da árvore filogenética*

Para a elaboração da árvore filogenética, todos os ferogramas foram checados manualmente e as sequências consenso para cada amostra foram obtidas através do *software* MEGA 6.0 (TAMURA *et al.*, 2013). Também foram adicionadas ao conjunto de dados sequências disponíveis no GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov). Buscou-se contemplar a diversidade geográfica para fins de análise da distância genética entre as espécies. Uma árvore filogenética foi produzida através do algoritmo *Neighbor-Joining* (SAITOU; NEI, 1987), usando a distância de Kimura 2 parâmetros (KIMURA, 1980), deleção em pares e 10.000 réplicas de *bootstrap* (FELSENSTEIN, 1985).

2.9. *Procedimentos histológicos*

De cada coleta/estuário, 30 ostras foram submetidas a procedimentos histológicos, totalizando 270 animais analisados por esta técnica. Para este fim, um corte transversal foi feito em cada massa visceral dos animais, visando amostrar brânquias, gônada e glândula digestiva. Os tecidos foram fixados em solução de Davidson (SHAW; BATTLE, 1957) por 24h e em seguida lavados em água corrente para retirada do excesso do fixador. Posteriormente, os tecidos foram desidratados em álcool até 100%, diafanizados em xilol e impregnados em parafina histológica a 60°C. Após o emblocamento, o material biológico foi seccionado a 5 µm em micrótomo, tendo sido os tecidos montados sobre lâminas e a seguir corados com hematoxilina de Harris e eosina (HOWARD *et al.*, 2004).

As análises histopatológicas foram realizadas em microscópio de luz e as sessões histológicas foram fotomicrografadas. A prevalência de *Perkinsus* sp. foi calculada levando em consideração o número total de animais infectados sobre o número de ostras coletadas em cada coleta, de acordo com Bush *et al.* (1997).

3. RESULTADOS

A temperatura e a salinidade da água dos estuários no dia das coletas e as alturas médias das ostras (n=30) (média \pm DP), coletadas em 2012 e 2013, encontram-se na tabela 1.

3.1. Ensaio de RFTM

Os ensaios com RFTM evidenciaram a presença de *Perkinsus* spp. nos três estuários. As células apresentaram-se esféricas com tamanhos variando de 4,11 a 45,31 μ m de diâmetro e com coloração azulada ou preta escuro, resultante da ação do lugol (Figura 2). A prevalência de ostras infectadas variou de 0,67 a 34%, considerando os três estuários (Tabela 1). A intensidade de infecção variou de muito leve (1 a 10 células em toda a lâmina) a intensa (mais de 100 células em cada um dos campos observados). A intensidade média de infecção (1 - 4) pode ser evidenciada na tabela 1.

Tabela 1 – Prevalência (%) e intensidade média de infecção (1–4) de *Perkinsus* sp., infectando a ostra *Crassostrea rhizophorae* coletadas nos estuários dos rios Carnaubearas (CAR), Camurupim (CAM) e Jaguaribe (JAG) e através do cultivo em RFTM. *n*= número de ostras analisadas; A: altura ostras em mm (*n*=30) (média ± DP). PC (Período chuvoso) e PS (período seco). T° C = temperatura da água; S (PSU) = salinidade da água.

Ano	2012						2013		
	CAR (<i>n</i> = 150)		CAM (<i>n</i> = 150)		JAG (<i>n</i> = 150)		CAR (<i>n</i> =150)	CAM (<i>n</i> =150)	JAG (<i>n</i> =150)
Estuários									
Períodos	PC	PS	PC	PS	PC	PS	PC	PC	PC
A (mm)	55,1 ±10,7	55,5 ±8,2	51,5 ±6,2	47,2 ±6,9	56,5±12,0	60,1±6,1	61,4 ±9,0	61,0 ±8,9	65,4 ±8,1
T °C	28	30	31	28	28	30	31	30	28
PSU	5	29	40	45	23	35	11	42	25
<i>Perkinsus</i> sp.(%)	25,33	32,67	6,67	15,33	4,66	16,0	34	9,33	0,67
Intensidade de infecção (1-4)	2,0±0,77	1,77 ±0,98	1,40±0,52	1,0±0,0	1,14±0,38	1,87±0,89	1,66±0,93	1,92±0,92	1,0±0,0

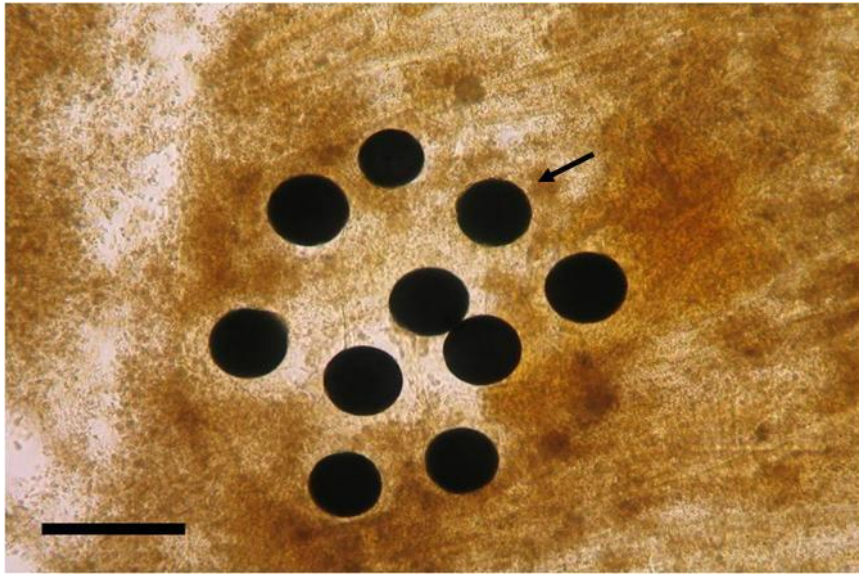


Figura 2 – Hipnósporos de *Perkinsus* sp. (seta) infectando as brânquias da ostra *Crassostrea rhizophorae* após incubação em meio líquido de tioglicolato de Ray. Barra de escala = 50 µm.

3.2. Detecção de *Perkinsus* por reação em cadeia da polimerase (PCR)

As análises dos fragmentos da região ITS de *Perkinsus* amplificados por PCR, resultaram em *amplicons* com aproximadamente 700pb. Das 291 amostras positivas e suspeitas em RFTM, a PCR confirmou 29,89% (87/291) e dos 18 animais RFTM negativos 1 foi confirmado.

3.3. Sequenciamento do DNA

O sequenciamento foi positivo em 26 amostras, confirmando a ocorrência de *Perkinsus beihaiensis* infectando 16 ostras no Maranhão, 4 no Piauí e apenas um animal no Ceará. Ainda no Ceará foram confirmados 4 ostras positivas para *Perkinsus chesapeaki* e 1 para *Perkinsus marinus* (Figura 3).

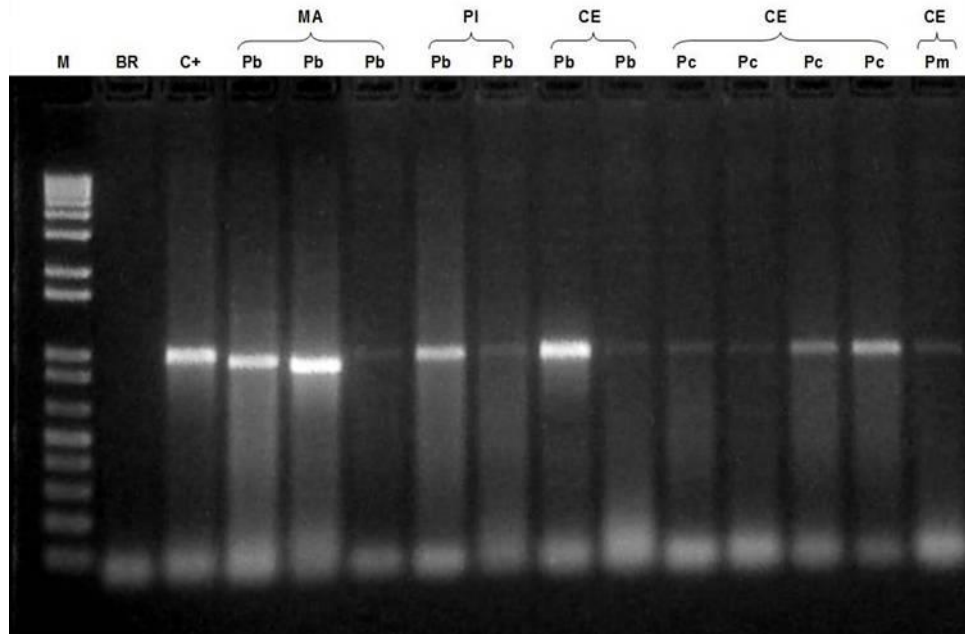


Figura 3 – Diagnóstico molecular da região ITS do DNA ribossômico de espécies do gênero *Perkinsus* em *Crassostrea rhizophorae*. Eletroforese em gel de agarose 1,5%. M: marcador molecular; BR: branco; C+: controle positivo; MA: Maranhão; PI: Piauí; CE: Ceará; Pb: *Perkinsus beihaiensis*. Pc: *Perkinsus chesapeaki*; Pm: *Perkinsus marinus*.

As sequências alinhadas em MEGA e analisadas por *Neighbor-Joining* produziram a árvore apresentada na figura 4. As sequências da região ITS obtidas de *P. beihaiensis*, *P. marinus* e *P. chesapeaki* foram agrupadas em clados monofiléticos distintos.

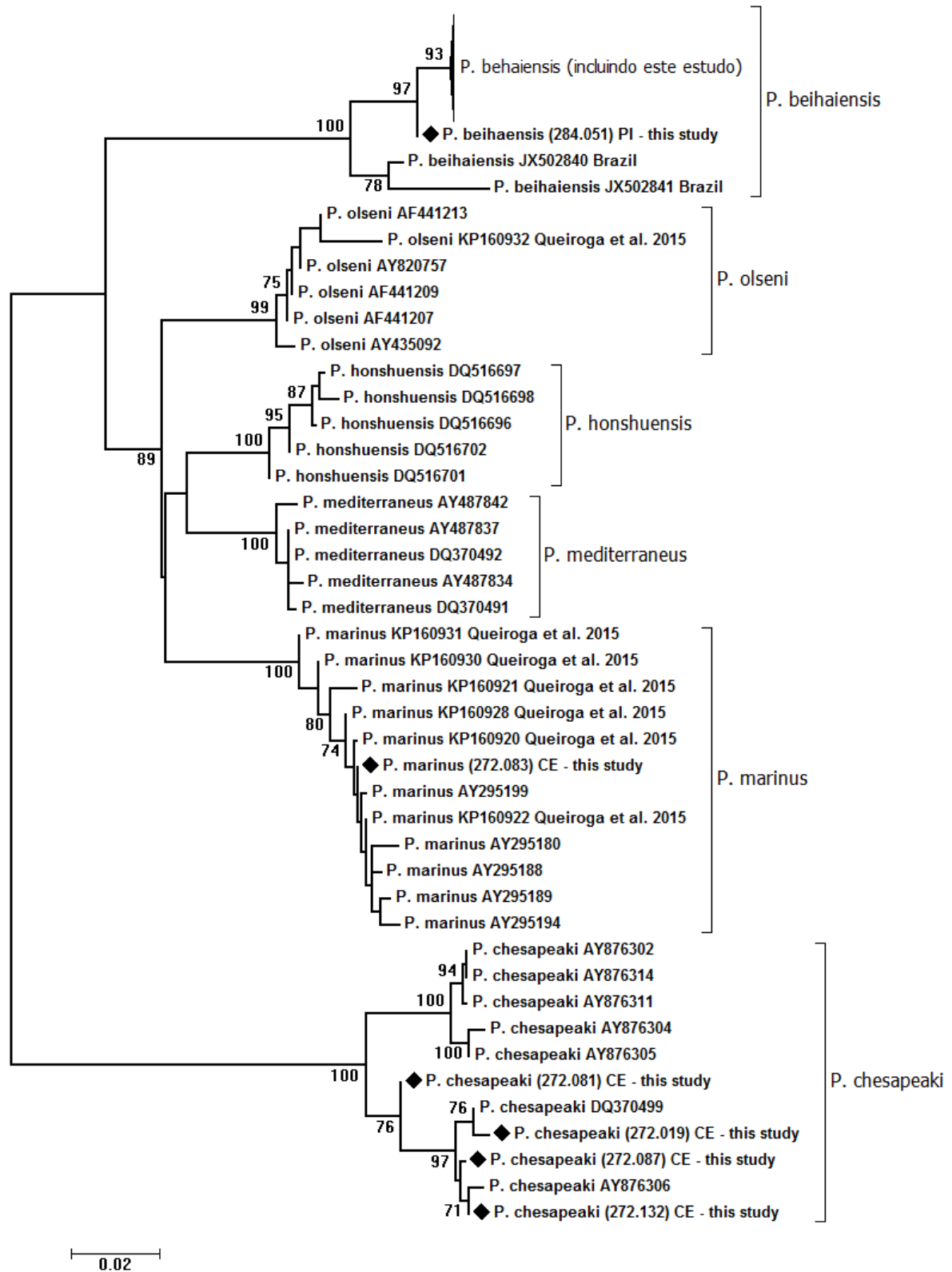


Figura 4 – Árvore gerada a partir da análise de *Neighbor-Joining* baseada nas seqüências obtidas nesse trabalho e as demais acessadas no GenBank. As amostras sequenciadas neste estudo estão em destaque. Valores de *bootstrap* (10.000 réplicas) estão indicados nos nós.

3.4. Análises histológicas

As análises histológicas confirmaram a presença de células de *Perkinsus* em todos os animais positivos nos ensaios de RFTM. O protozoário foi detectado nas ostras coletadas nos três estuários em 2012 e 2013, nos períodos chuvoso e seco. Apenas um animal positivo para *P. chesapeaki* estava entre os 30 animais selecionados para histologia. Os trofozoítos foram observados infectando o tecido conjuntivo em torno da glândula digestiva, no epitélio dos túbulos digestivos e brânquia das ostras. De um modo geral, foram observadas poucas células do patógeno e sem nenhuma reação do hospedeiro, com exceção de poucos animais que apresentaram uma leve infiltração de hemócitos. As células do patógeno apresentaram-se arredondadas com um vacúolo ocupando uma grande porção do volume da célula, com o núcleo excêntrico apresentando um nucléolo proeminente (Figura 5A e B). O tamanho das células do protozoário variou de 2,76 a 6,16 μm ($4,48 \pm 0,95$; $n=10$). A maior prevalência de *Perkinsus* observada pela histologia foi de 40% no estuário do Rio Carnaubeiras em 2013 (período chuvoso).

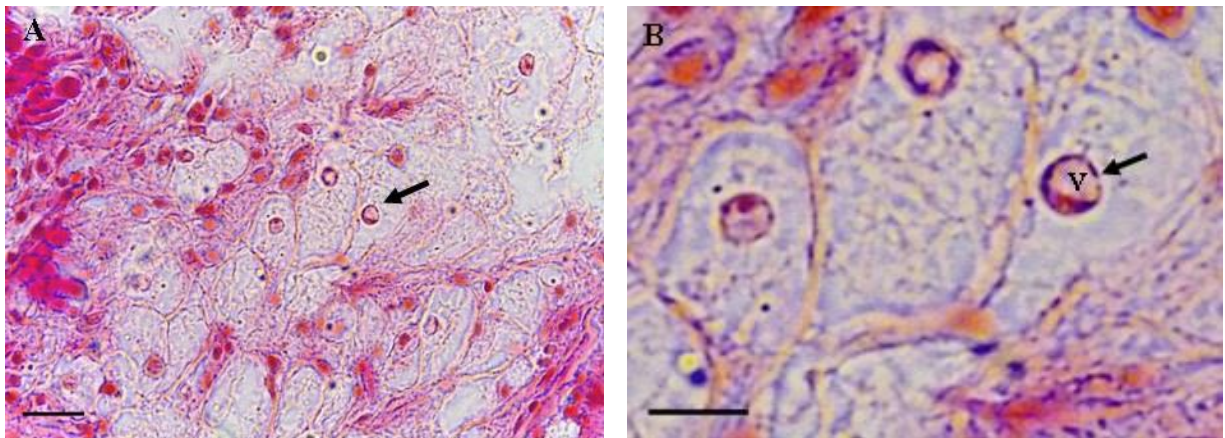


Figura 5 – *Perkinsus beihaiensis* (seta) infectando o tecido conjuntivo da ostra *Crassostrea rhizophorae*. (A) Trofozoíto mostrando uma forma anelada. (B) Detalhe do vacúolo (v) ocupando um grande volume da célula. Barras de escala= 10 μm . Coloração: HE.

4. DISCUSSÃO

Esse trabalho faz o relato de protozoários do gênero *Perkinsus* infectando a ostra *Crassostrea rhizophorae* de três importantes estuários da costa nordeste do Brasil e registra, pela primeira vez, a ocorrência de *Perkinsus chesapeaki* e *P. marinus* no estuário do Rio

Jaguaribe, Ceará. Vale ressaltar que este é o primeiro registro de *P. chesapeaki* infectando bivalves na América do Sul. As espécies de *Perkinsus* foram detectadas através de cultivo em meio de tioglicolato (RFTM) e análises de PCR, seguidos de clonagem, sequenciamento e histologia.

Os ensaios de RFTM revelaram a presença de hipnósporos de *Perkinsus* spp. infectando os tecidos de *C. rhizophorae*. As células do patógeno se apresentaram alargadas após incubação em RFTM, de acordo a descrição feita por Choi e Park (2010) e similares às observadas em outros estudos com moluscos da costa brasileira (SABRY *et al.*, 2009; BRANDÃO *et al.*, 2013; da SILVA *et al.*, 2013).

No período chuvoso, as prevalências médias de *Perkinsus* spp. nas ostras coletadas no estuário de Carnaubeiras (MA) foram maiores (até 34%) que as observadas no Rio Camurupim (até 9, 33%) e Jaguaribe (até 4,7%). As prevalências de *Perkinsus* nas ostras do Rio Jaguaribe foram menores que a registrada por Sabry *et al.* (2009) nessa mesma espécie de ostra da região (5,78%). No período seco em 2012, as prevalências médias de *Perkinsus* spp. foram maiores quando comparadas ao período chuvoso, nos três estuários (tabela 1). Nesse mesmo período, também foram observados os maiores valores de salinidade, no entanto não podemos relacionar o aumento da prevalência com esta variável, pois em Carnaubeiras, no período chuvoso, nos dois anos de coleta foram registradas prevalências de 25,33% e 34% em salinidade de 5 e 11‰, respectivamente. Por outro lado, prevalências baixas de *Perkinsus* (0,67 e 9,33%), em ostras do mesmo estuário foram associadas a valores relativamente altos de salinidade (25 e 42 ‰) (Tabela 1). Ao contrário, Brandão *et al.* (2013) registraram as menores prevalências de *Perkinsus* sp. (21%) em salinidade de 0‰. Segundo a OIE, a prevalência e a intensidade de infecção por *P. marinus* são maiores em salinidades acima de 12 PSU. A transmissão pode ocorrer entre 9 e 12, mas a infecção permanece baixa em intensidade (OIE, 2012). Portanto, são necessários mais estudos para melhor compreensão da dinâmica ecológica desse patógeno.

A maior prevalência registrada nesse estudo (34%) foi menor que a maioria dos valores registrados em *C. rhizophorae* infectada por *Perkinsus* sp. na Bahia (até 92%) (Brandão *et al.* 2013); por *P. marinus* (100%) na Paraíba (da SILVA *et al.*, 2013) e em *C. gasar* da Paraíba infectada por *Perkinsus* sp. (93,3%) (QUEIROGA *et al.*, 2013). No entanto, as prevalências observadas aqui foram maiores que as registradas em ostras do estuário do Rio Pacoti, Ceará em 2009 (7,3%) e 2010 (4%) (SABRY *et al.*, 2013) e em *Anomalocardia brasiliiana* (14,7%)

do estuário do Rio Timonha, Ceará (FERREIRA *et al.*, 2015). A intensidade média de infecção pelo RFTM na maioria dos animais foi muito leve (nível 1), com apenas alguns animais em nível severo de infecção (nível 4). Resultado similar foi registrado por Sabry *et al.* (2009) quando relataram níveis de infecção variando de muito leve a avançado, enquanto Brandão *et al.* (2013) relatam elevadas intensidade de infecção por *Perkinsus* sp. em *C. rhizophore* da Bahia. O fato de poucos animais terem apresentado infecção avançada sugere a ausência de mortalidades nas populações de ostras nesses bancos naturais. Estudos realizados em moluscos de estuários do nordeste brasileiro têm documentado a ausência de mortalidade nas ostras, mesmo quando são observadas elevadas prevalências de *Perkinsus* sp. As intensidades de infecção por *Perkinsus* observada nesse estudo foram diferentes das observadas em *C. rhizophorae* (nulo a muito leve) (SABRY *et al.*, 2013) e em *A. brasiliana* (muito leve a leve) (FERREIRA *et al.*, 2015).

As análises dos fragmentos da região ITS de *Perkinsus* amplificados por PCR, resultaram em *amplicons* com aproximadamente 700pb, confirmando 29,89% (87/291) dos animais positivos e suspeitos em RFTM. Os resultados negativos na PCR podem sugerir a baixa intensidade de células de *Perkinsus* nos tecidos infectados ou ainda os mesmos não continham células do patógeno. Diferenças entre as técnicas empregadas também já foram relatadas e associadas a pouca quantidade de tecidos e à baixa intensidade de infecção (SABRY *et al.*, 2009 e 2013; BRANDÃO *et al.* 2013). Diferenças de resultados entre diferentes técnicas de diagnósticos já foram relatadas por outros autores (BURRESON, 2008; REECE *et al.*, 2008).

A árvore produzida pelo método de *Neighbor- Joining* agrupou as sequências da região ITS obtidas de *P. beihaiensis*, *P. marinus* e *P. chesapeaki* em clados monofiléticos distintos, sugerindo fortemente uma diferenciação entre os grupos. Pesquisas realizadas com a ferramenta BLAST indicaram que as sequências obtidas da região ITS de *Perkinsus beihaiensis* de todos os estuários apresentaram maiores identidades (99%) com a mesma espécie de *Perkinsus* investigada no Brasil por Queiroga *et al.* (2015) e por Ferreira *et al.* (2015). *Perkinsus marinus* encontrado no Ceará evidenciou as maiores similaridades (98%) com *P. marinus* da Paraíba (da SILVA *et al.*, 2013; QUEIROGA *et al.*, 2015) e *P. marinus* dos EUA (BROWN *et al.*, 2004), enquanto *P. chesapeaki* compartilhou identidades altas (98%) com *P. chesapeaki* dos EUA (BURRESON; REECE; DUNGAN, 2005) e da Itália (ABOLLO *et al.*, 2006).

As análises histológicas mostraram trofozoítos com morfologia anelada semelhante às caracterizações realizadas em estudos anteriores (SABRY *et al.*, 2009; CREMONTE, BALSEIRO; FIGUERAS, 2005; BRANDÃO *et al.*, 2013). De um modo geral foram visualizadas poucas células do parasita nos tecidos e apenas em poucas ostras *P. beihaiensis* causou danos muito leves no epitélio do trato digestivo, acompanhada de uma leve infiltração de hemócitos, porém não foram observados trofozoítos fagocitados. A baixa intensidade de células nos tecidos também pode sugerir a ausência de mortalidade nas ostras desses bancos naturais, pois segundo Choi e Park (2010), elevadas infecções por *Perkinsus* comumente causam inflamações nos tecidos e também mortalidades. Sabry *et al.* (2013) não observaram qualquer alteração nos tecidos de *C. rhizophorae* infectadas. Por outro lado, Cremonte, Balseiro e Figueras (2005) relataram fortes reações hemocitárias decorrentes da infecção por *P. marinus* e Brandão *et al.* (2013) observaram moderada infiltração de hemócitos e trofozoítos de *Perkinsus* fagocitados em tecidos de *C. rhizophorae*. Em ostras *Crassostrea corteziensis* do México infectadas por *P. marinus*, infecções severas causaram infiltrações de hemócitos e destruição dos tecidos (CÁCERES-MARTÍNEZ, 2010). Respostas de defesa também já foram detectadas em ostras infectadas por *P. marinus* (VILLALBA *et al.*, 2004); por *P. beihaiensis* (MOSS *et al.*, 2008) e por *Perkinsus* spp. em *Crassostrea ariakensis* nos EUA (MOSS *et al.*, 2007), porém acredita-se que as reações do hospedeiro precisam ser melhor compreendidas.

Concluindo, os resultados do presente estudo representam um avanço nas pesquisas, sobre a perkinsiose no Brasil, pois ampliam a área de distribuição desse protozoário na costa brasileira e relatam, pela primeira vez, a ocorrência de *P. chesapeaki* e *P. marinus* infectando a ostra *C. rhizophorae* no estuário do Rio Jaguaribe, no litoral leste do Estado do Ceará, sendo esta a primeira detecção de *P. chesapeaki* infectando bivalves na América do Sul.

REFERÊNCIAS

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.

BRANDÃO, R.P.; BOEHS, G.; SABRY, R.C.; CEUTA, L.O.; LUZ, M.S.A.; QUEIROGA, FR.; DA SILVA, PM. *Perkinsus* sp. infecting oyster *Crassostrea rhizophorae* on the coast of Bahia, Brazil. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 112, p. 138–141, 2013.

BROWN, G.D.; HUDSON, K.L.; AND REECE, K.S. Multiple polymorphic sites at the ITS and ATAN loci in cultured isolates of *Perkinsus marinus* **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 51, 312-320, 2004.

BURRESON, E.M. Misuse of PCR assay for diagnosis of mollusk protistan infections. **Disease of Aquatic Organisms**, v. 80, p. 81–83, 2008.

BURRESON, E.M.; REECE, K.S.; DUNGAN, C.F. Molecular, morphological, and experimental evidence support the synonymy of *Perkinsus chesapeaki* and *Perkinsus andrewsi*. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 52, p. 258–270, 2005.

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, p. 575–583, 1997.

CÁCERES-MARTÍNEZ J. Parasites of the Pleasure Oyster *Crassostrea corteziensis* Cultured in Nayarit, Mexico. **Journal of Aquatic Animal Health**, v. 22, p. 141–151, 2010.

CASAS, S.M.; VILLALBA, A.; REECE, K.S. Study of perkinsosis in the carpet shell clam *Tapes decussatus* in Galicia (NW Spain). I. Identification of the aetiological agent and in vitro modulation of zoosporulation by temperature and salinity. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 50, p. 51–65, 2002.

CHOI, K.; PARK, K. Review on the protozoan parasite *Perkinsus olseni* (Lester and Davis, 1981) infection in Asian waters. **Coastal Environmental and Ecosystem, Issues East China Sea**, p. 269–281, 2010.

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.

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

da SILVA, PM.; 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.

DANTAS NETO M.P.; SABRY R.C.; DA SILVA P.M.; FERREIRA L.P.; RODRIGUES C.C.J.; MAGGIONI, R. Ocorrência de *Perkinsus* sp. na ostra do mangue *Crassostrea rhizophorae* (Bivalvia: Ostreidae) em regiões estuarinas do Nordeste do Brasil. pp.136 -, in Anais do XII Encontro Brasileiro de Patologistas de Organismos Aquáticos, 407p., Bonito – MT, 2012.

FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. **Evolution**, v.39, p. 783-91, 1985.

FERREIRA, L.P.; SABRY, R.C.; DA SILVA, P.M.; GESTEIRA, T.C.V.; ROMÃO, L.S.; PAZ, M.P.; FEIJÓ R.G.; DANTAS NETO, M.P.; MAGGIONI R. First report of *Perkinsus beihaiensis* in wild clams *Anomalocardia brasiliana* (Bivalvia: Veneridae) in Brazil. **Experimental Parasitology**, v.150, p. 67-70, 2015.

GALTSOFF, P.S. The American Oyster *Crassostrea virginica* Gmelin. Fishery Bulletin, v. 64. United States Government Printing Office, Washington, D. C. iii + 480 p. 1964.

HOWARD, D.W.; LEWIS, E.J.; KELLER, B.J.; SMITH, C.S. **Histological techniques for marine bivalve mollusks and crustaceans**, 2nd edn. NOAA Technical Memorandum NOS NCCOS 5. 2004.

KIMURA, M. An simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution**, v. 16, p. 111–120, 1980.

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

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, p. 117–130, 2008.

OIE World Organization for Animal Health. Manual of diagnostic test for aquatic animals 2012. Disponível: < http://www.oie.int/eng/en_index.htm>. Acesso em 22 de março de 2015.

PIZZONIA, J. Electrophoresis gel image processing and analysis using the KODAK 1D software. **Biotechniques**, v. 30, p. 1316-1320, 2001.

QUEIROGA FR.; VIANNA RT.; VIEIRA CB.; FARIAS ND.; DA SILVA PM. Parasites infecting the cultured oyster *Crassostrea gasar* (Adanson, 1757) in Northeast Brazil. **Parasitology**, v. 142, 142(6):756-66, 2015.

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

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

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

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, **Journal Invertebrate Pathology**, v. 112, p. 24–32, 2013.

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

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, v. 4, p. 406–425, 1987.

SAMBROOK, J.F.E.; MANIATIS, T. Molecular cloning: A laboratory manual, 2nd ed. **Cold Spring Harbor Lab. Press**, New York, 1989.

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.

TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, p. 2725–2729, 2013.

VILLALBA, A.; REECE, K.S.; ORDA, S.M.C.; CASAS, S.M.; FIGUERAS, A. Perkinsosis in molluscs: A review. **Aquatic of Living Resources**, v. 17, p. 411–32, 2004.

4. CONCLUSÕES GERAIS

1) Os resultados de RFTM confirmaram a ocorrência de *Perkinsus* sp. infectando populações nativas de *Crassostrea rhizophorae* em três estuários no nordeste setentrional do Brasil, com prevalências variando de baixas a moderadas (0,67 a 34%).

2) Em geral, as bactérias do tipo *Rickettsia* e protozoários foram mais comuns nas ostras quando comparadas às baixas prevalências de metazoários nestes bivalves;

3) Apesar da infecção por trematódeos bucefalídeos ter possivelmente inviabilizado a gametogênese, isto não foi significativo, devido à baixa prevalência observada nas populações de *C. rhizophorae* onde os mesmos foram identificados;

4) Os resultados do presente estudo representam um avanço nas pesquisas, pois ampliam a área de distribuição desses patógenos na costa brasileira e o estudo relata, pela primeira vez, a ocorrência de *P. chesapeaki* e *P. marinus* infectando a ostra *C. rhizophorae* no estuário do Rio Jaguaribe, litoral leste do Estado do Ceará.

5) O presente estudo documenta pela primeira vez o registro de *P. chesapeaki* infectando bivalves na América do Sul.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O Brasil avançou significativamente no conhecimento de patologias que afetam os bivalves nos últimos anos. Isto se deve, principalmente, ao aumento dos cultivos, possibilidade de comércio entre regiões produtoras e incremento de pesquisas nos cursos de pós-graduação relacionados ao tema. Ainda assim, temos um grande horizonte investigativo pra descobrir ao longo dos próximos anos: uma infinidade de patógenos, suas dinâmicas de infecção, ciclos de vida, sua distribuição, impactos no hospedeiro e a reação do mesmo frente ao agente infectante.

O conhecimento das enfermidades que acometem estes organismos é de fundamental importância para se evitar perdas econômicas e impactos deletérios nas comunidades alicerçadas no cultivo ou extrativismo desses animais. Isso por si só já justificaria a premente intensificação de pesquisas em patologia de bivalves. Além disso, pesquisas com foco em patógenos de declaração obrigatória para a Organização Mundial para a Saúde Animal – OIE colocam o país como protagonista no conhecimento e identificação desses parasitas perante a comunidade científica internacional.

O presente trabalho registrou a ocorrência de parasitas na ostra *C. rhizophorae* de alguns estuários da região nordeste do Brasil. Embora as intensidades de infecção/infestação, tenham sido geralmente baixas, as alterações nos tecidos ou órgãos observados no presente estudo podem ter implicações futuras na dinâmica dessas populações da região. A nova ocorrência de *P. marinus* no Ceará, que estende a área de abrangência já conhecida desta espécie no Brasil, e a identificação de *P. chesapeaki*, uma espécie até então não registrada para a América do Sul, corrobora a necessidade de mais estudos ao longo dos anos em outras espécies de bivalves ao longo da costa brasileira.

6. REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO

ABOLLO E.; RAMILO A.; CASAS, S.M.; COMESAÑA P.; CAO, A., CARBALLAL, M.J.; VILLALBA, A. First detection of the protozoan parasite *Bonamia exitiosa* (Haplosporidia) infecting flat oyster *Ostrea edulis* grown in European waters. **Aquaculture**, v. 274, p. 201–207, 2008.

ALDERMAN, D.J. Epizootiology of *Marteilia refringens* in Europe. **Marine Fisheries Review**, v. 41, p. 67–69, 1979.

ANDREWS, J.D. Epizootiology of the disease caused by the oyster pathogen *Perkinsus marinus* and its effects on the oyster industry. In: W. S. Fisher, editor. Disease Processes in marine bivalve mollusks. **American Fisheries Society**, Special Publication. pp. 257-264, 1988.

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

BARBER, B.J.; DAVIS C. Prevalence of *Bonamia ostreae* in *Ostrea edulis* populations in Maine. **Journal of Shellfish Research**, 13, 298, 1994.

BOEHS, G., MAGALHÃES, A.R.M., SABRY, R.C., CEUTA, L.O. **Parasitas e patologias de bivalves marinhos de importância econômica da costa brasileira**. In: SILVA-SOUZA, A. T. (Org.) Patologia e sanidade de organismos aquáticos. Associação Brasileira de Patologistas de Organismos Aquáticos. Maringá. P. 165-194, 2012.

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

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

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

BOEHS, G.; VILLALBA, A.; CEUTA, L.O.; LUZ, J.R. Parasites of three commercially exploited bivalve mollusc species of the estuarine region of the Cachoeira River (Ilhéus, Bahia, Brazil). **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 103, p. 43-47, 2009b.

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.

BOUGRIER S.; TIGÉ G.; BACHÈRE E.; GRIZEL H. *Ostrea angasi* acclimatization to French coasts. **Aquaculture**, v. 58, p. 151-154, 1986.

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.

BRANDÃO, R.P., BOEHS, G.; SABRY, R.C.; CEUTA, L.O.; LUZ, M.S.A.; QUEIROGA, FR., da SILVA, PM. *Perkinsus* sp. infecting oyster *Crassostrea rhizophorae* on the coast of Bahia, Brazil. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 112, p. 138-141, 2013.

BRANDÃO, R.P.; BOEHS, G.; da SILVA, P.M. Health assessment of the oyster *Crassostrea rhizophorae* on the southern coast of Bahia, northeastern Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia e Veterinária**, v. 22, n. 1, p. 84-91, 2013.

BRICELJ, V.M.; FORD, S.E.; BORRERO, F.J.; PERKINS F.O.; RIVARA, G.; HILLMAN, R.E., ELSTON, R.A.; CHANG, J. 1992. Unexplained mortalities of hatchery-reared, juvenile oysters, *Crassostrea virginica* (Gmelin). **Journal of Shellfish Research**, v. 11, p. 331-347, 1992.

BURRESON, E.M.; REECE, K.S.; DUNGAN, C.F. Molecular, morphological, and experimental evidence support the synonymy of *Perkinsus chesapeaki* and *Perkinsus andrewsi*. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 52, p. 258–70, 2005.

CAHOUR, A. *Marteilia refringens* and *Crassostrea gigas*. **Marine Fisheries Review**, v. 41, p. 19-20, 1979.

CARBALLAL, M.J.; IGLESIAS, D.; SANTAMARINA, J.; FERRO-SOTO, B.; VILLALBA, A. Parasites and pathologic conditions of the cockle *Cerastoderma edule* populations of the Coast of Galicia (NW Spain). **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 78, p. 87-97, 2001.

CARNEGIE R.B.; COCHENNEC-LAUREAU, N. Microcell parasites of oysters: Recent insights and future trends. **Aquatic Living Resources**, v. 17, p. 519–528, 2004.

CARRASCO, N.; ROJAS, M.; ACEITUNO, P.; ANDREE, K.B.; LACUESTA, B.; FURONES, M.D. *Perkinsus chesapeaki* observed in a new host, the European common edible cockle *Cerastoderma edule*, in the Spanish Mediterranean coast. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 117, p. 56-60, 2014.

CEUTA, L.O. **Parasitos e histopatologia do marisco-do-mangue, *Mytella guyanensis* (Lamarck, 1819) (Bivalvia: Mytilidae), da Baía de Camamu (Bahia)**. 2010. 43. f. Dissertação (Mestrado em Sistemas Aquáticos Tropicais – Ecologia) – Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, 2010.

CHENG, T.C. **Parasitologia General**. 2. ed. Madrid: Editorial AC. 965 p, 1978.

COMPS M., COCHENNEC N. A herpes-like virus from the European oyster *Ostrea edulis* L. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 62, p. 201-203, 1993.

COMPS M., TIGÉ G.; GRIZEL H. Etude ultrastructurale d'un protiste parasite de l'huître *Ostrea edulis* L. *L.C.R., L'Académie des Sciences. Paris*, Sér. D, 290, 383–385, 1980.

COMPS, M., DUTHOIT, J.L. Infections virales chez les huîtres *Crassostrea angulata* (Lmk) et *C. gigas* (Th.). **Haliotis** 8 (1977), p. 301-308, 1979.

COMPS, M.; BONAMI J.R.; VAGO, C.; CAMPILLO, A. Une virose de l'huître portugaise (*Crassostrea angulata* Lmk). **Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de La'Académie des Sciences**, v. 282, p. 1991-1993, 1976.

COMPS, M.; BONAMI, J.R. Infection virale associée à des mortalités chez l'huître *Crassostrea angulata* Th. **Comptes Rendus Académie Sciences Paris**, v. 285, p.1139-1140, 1977.

COSTA, R.L. **Prevalência de enfermidades e histopatologia de *Perna perna* (Mollusca) em Florianópolis/SC, Brasil**. Florianópolis, SC. 31p. (Dissertação de Mestrado. Departamento de Aquicultura, UFSC). 2007.

CRANFIELD, H.J.; DUNN, A.; DOONAN, I.J.; MICHAEL, K.P. *Bonamia exitiosa* epizootic in *Ostrea chilensis* from Foveaux Strait, southern New Zealand between 1986 and 1992. **ICES. Journal of Marine Science**, v. 62, p. 3–13, 2005.

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

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

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.

DINAMANI, P.; HINE, P.M.; JONES, J.B. Occurrence and characteristics of the haemocyte parasite *Bonamia* sp. in the New Zealand dredge oyster *Tiostrea lutaria*. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 3, p. 37–44, 1987.

dos SANTOS, A.M.T; COIMBRA, J. Growth and production of raft-cultured *Mytilus edulis* L., in Ria de Aveiro: gonad symbiotic infestation. **Aquaculture**, v. 132 p. 195-211, 1995.

DUNGAN, C.F.; ELSTON, R.A.; SCHIEWE, M.H. Evidence and colonization and destruction of hinge ligaments in cultured juvenile oysters (*Crassostrea gigas*) by cytophaga-like bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 55, p. 1128-1135, 1989.

ELSTON, R., WILKINSON, M.T. Pathology, management and diagnosis of oyster velar virus disease (OVVD). **Aquaculture**, v. 48, p. 189-210, 1985.

ELSTON, R.A. Virus-like particles associated with lesions in larval Pacific oysters (*C. gigas*). **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 33, p. 71-74, 1979.

ELSTON, R.A.; FRELIER, P.; CHENEY, D. Extrapallial abscesses associated with chronic bacterial infections in the intensively cultured juvenile Pacific oyster *Crassostrea gigas*. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 37, p. 115-120, 1999.

FERREIRA, L.P.; SABRY, R.C.; DA SILVA, P.M.; GESTEIRA, T.C.V.; ROMÃO, L.S.; PAZ, M.P.; FEIJÓ R.G.; DANTAS NETO, M.P.; MAGGIONI R. First report of *Perkinsus beihaiensis* in wild clams *Anomalocardia brasiliiana* (Bivalvia: Veneridae) in Brazil. **Experimental Parasitology**, v.150, p. 67-70, 2015.

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

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

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO). The State of World Fisheries and Aquaculture 2014. FAO **Fisheries and Aquaculture** Department, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, 243p.

FRIEDMAN, C.S.; ANDREE, K.B.; BEAUCHAMP, K.A.; MOORE, J.D.; ROBBINS, T.T.; SHIELDS, J.D.; HEDRICK, R.P. “*Candidatus Xenohaliotis californiensis*” a newly described pathogen of abalone, *Haliotis* spp., along the west coast of North America. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 50, p. 847–855, 2000.

FRIEDMAN, C.S.; BEATTIE, J.H.; ELSTON, R.A.; HEDRICK, R.P. Investigation of the relationship between the presence of a Grampositive bacterial infection and summer mortality of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* Thunberg. **Aquaculture**, v. 94, p. 1-15, 1991a.

FRIEDMAN, C.S.; HEDRICK, R.P. Pacific oyster nocardiosis: isolation of the bacterium and induction of laboratory infections. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 57, p. 109-120, 1991b.

FRIEDMAN, C.S.; MCDOWELL, T.; GROFF, J.M.; HOLLIBAUGH, J.T.; MANZER, D.; HEDRICK, R.P. Presence of *Bonamia ostreae* among populations of the European flat oyster, *Ostrea edulis*, in California, USA. **Journal of Shellfish Research**, v. 8, p. 133-137, 1989.

GRIZEL, H. **Etudes des récentes épizooties de l’huître plate *Ostrea edulis* L. et de leur impact sur l’ostréiculture bretonne**. Thèse de doctorat, Université des Sciences et Techniques de Languedoc, Montpellier, France. 1985.

GRIZEL, H.; COMPS M.; BONAMI, J.R.; COUSSERANS, F.; DUTHOIT, J.L.; LE PENNEC, M.A. Recherche sur l'agent de la maladie de la glande digestive de *Ostrea edulis* Linné. **Bull Inst Pêches Marit**, v. 240, p. 7-29, 1974.

HILL, K.M.; CARNEGIE R.,B.; ALOUI-BEJAOU, N.; EL GHARSALLI, R.; WHITE, D.M.; STOKES, N.A.; BURRESON, G.M. Observation of a *Bonamia* sp. infecting the oyster *Ostrea stentina* in Tunisia, and a consideration of its phylogenetic affinities. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 103, p. 179–185, 2010.

HINE P.M.; WESNEY B.; BESANT, P. Replication of herpes-like viruses in larvae of the flat oyster *Tiostrea chilensis* at ambient temperatures. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 32, p. 161-171, 1998.

HINE, P.M.; THORNE, T. Replication of herpes-like viruses in haemocytes of adult flat oysters *Ostrea angasi* (Sowerby 1871): an ultrastructural study. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 29, p. 197-204, 1997.

HINE, P.M.; WESNEY, B.; HAY, B.E. Herpesvirus associated with mortalities among hatchery-reared larval Pacific oysters *Crassostrea gigas*. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 12, p. 135-142, 1992.

HUTCHINGS, P.A.; KINE, W.E.; CUNNINGHAM, R.B.; DONNELLY, C. Spatial and temporal patterns of non-colonial boring organisms (polychaetes, sipunculans and bivalves mollusks) in *Porites* at Lizard Island, Great Barrier Reef. **Coral Reefs**, v. 11, p. 23-31, 1992.

ICES. 2004. Report of the Working Group on Pathology and Diseases of Marine Organisms. ICES Mariculture Committee, ICES CM 2004/F:01, Ref.: ACME, E, 1.

KATKANSKY, S.C.; DAHLSTROM, W.A.; WARNER, R.W. Observations on survival and growth of the European flat oyster, *Ostrea edulis*, in California. **California Department of Fish and Wildlife**, v. 55, p. 69-74, 1969.

KINNE, O. **Diseases of marine animals**. Hamburg, Biologische Anstalt Helgoland. p. 467-475, 1983.

LACOSTE, A.; JALABERT, F.; MALHAM, S.; CUEFF, A.; GÉLÉBART, F.; CORDEVANT, C.; LANGE, M.; POULET, S.A. A vibrio splendidus strain is associated with summer mortality of juvenile oysters *Crassostrea gigas* in the bay of Morlaix (North Brittany, France). **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 46, p. 139-145, 2001.

LAUCKNER, G. Diseases of Mollusca: Bivalvia. In: KINNE, O. (ed.) **Diseases of marine animals**. Hamburg, Biologische Anstalt Helgoland. p. 478-961, 1983.

LEVINE, N.D. *Perkinsus* gen. n. and other new taxa in the protozoan phylum Apicomplexa. **Journal of Parasitology**, v. 64, p. 549, 1978.

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.

LÓPEZ-FLORES, I.; GARRIDO-RAMOS, M.A.; DE LA HERRAN, R.; RUIZ-REJÓN, C.; RUIZ-REJÓN, M.; NAVAS, J.I. Identification of *Marteilia refringens* infecting the razor clam *Solen marginatus* by PCR and *in situ* hybridization. **Molecular and Cellular Probes**, v. 22, p. 151–155, 2008a.

LÓPEZ-FLORES, I.; ROBLES, F.; VALENCIA, J.M.; GRAU, A.; VILLALBA, A.; DE LA HERRÁN R.; GARRIDO-RAMOS, M.A.; RUIZREJÓN, C.; RUIZ-REJÓN, M.; NAVAS, J.I. Detection of *Marteilia refringens* using nested PCR and *in situ* hybridisation in *Chamelea gallina* from the Balearic Islands (Spain). **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 82, p. 79–87, 2008b.

LUZ, M.S.A.; BOEHS, G. Parasites in the oyster *Crassostrea rhizophorae* from farmed and natural stocks in the Bay of Camamu, Bahia, northeastern Brazil. **Journal of Parasitology and Vector Biology**, v. 7, p. 120-128, 2015.

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

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

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

Ministério da Pesca e Aquicultura – MPA. **Produção de pescado**. 2014. Disponível: <<http://www.mpa.gov.br/aquicultura/producao>. Acesso em 19 de julho de 2015.

Ministério da Pesca e Aquicultura – MPA. **Boletim estatístico da pesca e aquicultura**. Brasília. 60p. 2011.

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, p. 117–130, 2008.

MURINA, G.V.; SOLONCHENKO, A.I. Commensals of *Mytilus galloprovincialis* in the Black Sea: *Urastoma cyprinae* turbellaria and *Polydora ciliata* Polychaeta. **Hydrobiologia**, v. 227, p. 385–387, 1991.

NARCISI, V.; ARZUL, I.; CARGINI, D.; MOSCA, F.; CALZETTA, A.; TRAVERSA, D., ROBERT M.; JOLY, J.P.; CHOLLET, B.; RENAULT, T.; TISCAR, P.G. Detection of *Bonamia ostreae* and *Bonamia exitiosa* (*Haplosporidia*) in *Ostrea edulis* from the Adriatic Sea (Italy). **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 89, 79–85, 2010.

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

NICOLAS, J.L.; COMPS, M.; COCHENNEC, N. Herpes-like virus infecting Pacific oyster larvae, *C. gigas*. **Bulletin of the European Association of Fish Pathologists.**, v. 12, p. 11-13, 1992.

OIE World Organization for Animal Health. Manual of diagnostic test for aquatic animals 2012. Disponível: < http://www.oie.int/eng/en_index.htm>. Acesso em 22 de março de 2015.

OLIVEIRA, J.B. **Parasitas associados com a lambreta *Lucina pectinata* (Gmelin, 1791) (Mollusca: Bivalvia) na região estuarina do Rio Cachoeira (Ilhéus, Bahia)**. Ilhéus, BA. 34p. (Trabalho de Conclusão de Curso. Departamento de Ciências Biológicas, UESC). 2008.

PAILLARD, C. A short-review of brown ring disease, a vibriosis affecting clams, *Ruditapes philippinarum* and *Ruditapes decussatus*. **Aquatic Living Resources**, v. 17, p. 467–475, 2004b.

PAILLARD, C.; LE ROUX, F.; BORREGO, J. Bacterial disease in marine bivalves, a review of recent studies: Trends and evolution. **Aquatic Living Resources**, v. 17, p. 477–498, 2004.

PAILLARD, C.; MAES, P. Étiologie de la maladie de l’anneau brun chez *Tapes philippinarum*: pathogenicit  d’un *Vibrio* sp. **Comptes Rendus de L’Academia des Sciences**, Paris, Serie III.v. 310, p. 15-20, 1990.

PASS D.; DYBDAHL, R.; MANNION, M.M. Investigations into the causes of mortality of the pearl oyster, *Pinctada maxima* (Jamson), in Western Australia. **Aquaculture**, v. 65, p. 149-169, 1987.

PENNA, M.S.; KHAN, M.; FRENCH, R.A. Development of a multiplex PCR for the detection of *Haplosporidium nelsoni*, *Haplosporidium costale* and *Perkinsus marinus* in the eastern oyster *Crassostrea virginica*, Gmelin, 1971. **Molecular and Cellular Probes**, v. 15, p. 385-390, 2001.

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

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

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

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

RENAULT, T.; COCHENNEC, N.; CHOLLET, B. Marteiliosis in American oysters *Crassostrea virginica* reared in France. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 23, p. 161-164, 1995.

RENAULT, T.; LIPART, C.; ARZUL, I. A herpes-like virus infecting *Crassostrea gigas* and *Ruditapes philippinarum* larvae in France **Journal of Fish Diseases**, v. 24, p. 369-376, 2001b.

RENAULT, T.; NOVOA, B. Viruses infecting bivalve mollusks. **Aquatic Living Resources**, v. 17, p. 397-409, 2004.

ROBLEDO, J.A.F.; CÁCERES-MARTINEZ, 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.

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

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

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

SABRY, R.C.; MAGALHAES, A.R.M. Parasitas em ostras de cultivo (*Crassostrea rhizophorae* e *Crassostrea gigas*) da Ponta do Sambaqui, Florianópolis, SC. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 27, p. 194-202, 2005.

SABRY, RC.; ROSA, RD.; MAGALHÃES, A.R.; BARRACCO, AM.; GESTEIRA, TCV.; da SILVA, PM. First report of *Perkinsus* sp. infecting mangrove oysters *Crassostrea rhizophorae* from the Brazilian coast. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 88, p. 13–23, 2009.

SANIL N. K. *et al.* First report of *Perkinsus beihaiensis* in *Crassostrea madrasensis* from the Indian subcontinent. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 98 p.209-220. 2012.

SANTOS, A.A.; COSTA, S.W. **Síntese Informativa da Maricultura 2013**. 7p. 2014.

SANTOS, J.J.B.; BOEHS, G.; CEUTA, L.O. 2007. Ocorrência de *Nematopsis* sp. (Apicomplexa: Eugregarinida) no molusco *Tagelus plebeius* (Bivalvia: Psammobiidae) da região estuarina do Rio Cachoeira, Ilhéus (BA). In; ENCONTRO DE ECOLOGIA DO BRASIL, 8, 23-28 de setembro, Caxambu, MG. **Resumos**. Sociedade de Ecologia do Brasil. p. 128.

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

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

SINDERMANN, C.J. Case histories of effects of transfers and introductions on marine resources: Introduction. **Journal du Conseil/Conseil Permanent International pour l'Exploration de la Mer**, v. 47, p. 377-378, 1991.

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

TUBIASH, H.S.; OTTO, S.V.; HUGH, R. Cardiac edema associated with *Vibrio anguillarum* in the American oyster. **Proceedings of the National Shellfisheries Association**, v. 63, p. 39-42, 1973.

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

VILLALBA, A.; MOURELLE, S.G.; LOPEZ, M.C.; CARBALLAL, M.J.; AZEVEDO, C. Marteiliasis affecting cultured mussels *Mytilus galloprovincialis* of Galicia (NW. Spain). I. Etiology, phases of the infection, and temporal and spatial variability in prevalence. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 16, p. 61-72, 1993a.

VILLALBA, A.; REECE K. S.; ORDA'S, M.C.; CASAS, S.M.; FIGUERAS, A. Perkinsosis in molluscs: A review. **Aquatic Living Resources**, v. 17, p. 411-32, 2004.