



UNIVERSIDADE FEDERAL DO SEMI-ÁRIDO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
DOUTORADO EM CIÊNCIA ANIMAL

CÉLIO SOUZA DA ROCHA

**INVESTIGAÇÃO DA OCORRÊNCIA DE *Perkinsus* sp. EM OSTRAS
NATIVAS *Crassostrea* sp. EM BANCOS NATURAIS DE ESTUÁRIOS DO
RIO GRANDE DO NORTE – BRASIL**

MOSSORÓ – RN
2022

CÉLIO SOUZA DA ROCHA

**INVESTIGAÇÃO DA OCORRÊNCIA DE *Perkinsus* sp. EM OSTRAS
NATIVAS *Crassostrea* sp. EM BANCOS NATURAIS DE ESTUÁRIOS DO
RIO GRANDE DO NORTE – BRASIL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal Rural do Semi-Árido, como exigência final para obtenção do título de Doutor em Ciência Animal.

Linha de Pesquisa: Sanidade animal

Orientador: Prof. Dr. João Marcelo Azevedo de Paula Antunes – UFERSA

Coorientadora: Profa. Dra. Rachel Costa Sabry - IFCE

MOSSORÓ – RN
2022

© Todos os direitos estão reservados a Universidade Federal Rural do Semi-Árido. O conteúdo desta obra é de inteira responsabilidade do (a) autor (a), sendo o mesmo, passível de sanções administrativas ou penais, caso sejam infringidas as leis que regulamentam a Propriedade Intelectual, respectivamente, Patentes: Lei nº 9.279/1996 e Direitos Autorais: Lei nº 9.610/1998. O conteúdo desta obra tomar-se-á de domínio público após a data de defesa e homologação da sua respectiva ata. A mesma poderá servir de base literária para novas pesquisas, desde que a obra e seu (a) respectivo (a) autor (a) sejam devidamente citados e mencionados os seus créditos bibliográficos.

RR672 Rocha, Célio Souza da.
i INVESTIGAÇÃO DA OCORRÊNCIA DE Perkinsus sp. EM
OSTRAS NATIVAS Crassostrea sp. EM BANCOS NATURAIS
DE ESTUÁRIOS DO RIO GRANDE DO NORTE ? BRASIL /
Célio Souza da Rocha. - 2022.
119 f. : il.

Orientador: João Marcelo Azevedo de Paula
Antunes.
Coorientadora: Rachel Costa Sabry.
Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural
do Semi-árido, Programa de Pós-graduação em
Ciência Animal, 2022.

1. P. marinus. 2. P. beihaiensis. 3.
Crassostrea sp.. 4. PCR. 5. qPCR. I. Antunes, João
Marcelo Azevedo de Paula, orient. II. Sabry,
Rachel Costa, co-orient. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada por sistema gerador automático em conformidade
com AACR2 e os dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Biblioteca Campus Mossoró / Setor de Informação e Referência
Bibliotecária: Keina Cristina Santos Sousa e Silva
CRB: 15/120

O serviço de Geração Automática de Ficha Catalográfica para Trabalhos de Conclusão de Curso (TCC's) foi desenvolvido pelo Instituto de Ciências Matemáticas e de Computação da Universidade de São Paulo (USP) e gentilmente cedido para o Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (SiSBI-UFERSA), sendo customizado pela Superintendência de Tecnologia da Informação e Comunicação (SUTIC) sob orientação dos bibliotecários da instituição para ser adaptado às necessidades dos alunos dos Cursos de Graduação e Programas de Pós-Graduação da Universidade.

CÉLIO SOUZA DA ROCHA

**INVESTIGAÇÃO DA OCORRÊNCIA DE *Perkinsus* sp. EM OSTRAS NATIVAS
Crassostrea sp. EM BANCOS NATURAIS DOS ESTUÁRIOS DO RIO GRANDE
DO NORTE – BRASIL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Ciência Animal da Universidade Federal Rural
do Semi-Árido, como exigência final para obten-
ção do título de Doutor em Ciência Animal.
Linha de Pesquisa: Sanidade animal

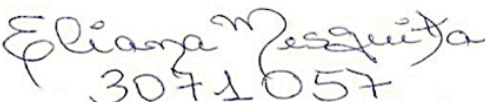
Defendida em: 05/10/2022

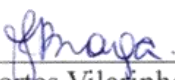
BANCA EXAMINADORA


Prof. Dr. João Marcelo Azevedo de Paula Antunes (UFERSA)
Presidente


Profa. Dra. Cecília Calabuig (UFERSA)
Membro Examinador (Interno)


Profa. Dr. Leonardo Lelis de Macedo Costa (UFERSA)
Membro Examinador (Interno)


Profa. Dra. Eliana de Fátima Marques Mesquita (UFF)
Membro Examinador (Externo)


Prof. Dr. Juliana Fortes Vilarinho Braga (UFERSA)
Membro Examinador (Externo)

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

CÉLIO SOUZA DA ROCHA concluiu a graduação em Medicina Veterinária pela Universidade Estadual do Ceará (UECE) em 2008 onde também concluiu a Especialização em Vigilância Sanitária de Alimentos (UECE) em 2012. Em 2018 concluiu o Mestrado em Ciência Animal pela Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA). É Auditor Fiscal Estadual Agropecuário da Agência de Defesa Agropecuária do Estado do Ceará (ADAGRI) desde 2010 após aprovação em concurso público. Foi Coordenador substituto do Programa Estadual de Erradicação e Prevenção da Febre Aftosa (PEEFA) de 2011 a 2016. Atua como Coordenador substituto do Programa Estadual de Sanidade de Animais Aquáticos (PESAAq) desde 2019 até o presente momento. Componente do Grupo Especial de Atenção a Suspeita de Enfermidades Emergenciais ou Exóticas (GEASE) do Estado do Ceará. Possui experiência profissional na área de Medicina Veterinária, com ênfase em Defesa Sanitária Animal.

*Dedico este título ao meu maior incentivador da vida,
a pessoa que me ensinou o significado do amor, do
afeto e da dedicação. Que me ajudou a construir
quem eu sou hoje, alguém mais justo e consciente.
Que dedicou horas, dias e anos a nos fazer sorrir. Por
ele esse projeto aconteceu e logrou êxito. Meu grande
e eterno avô Cyro Nazaré da Costa Souza.*

AGRADECIMENTOS

Nesses anos de doutoramento, de muito estudo, esforço e empenho, gostaria de agradecer a algumas pessoas que me acompanharam e foram fundamentais para a concretização deste sonho. Por isso, expresso aqui, através de palavras sinceras, um pouquinho da importância que cada um teve nessa jornada.

Agradeço primeiramente a minha grande esposa Mariana Lopes Viana da Rocha por ter sido minha melhor amiga e companheira durante essa longa jornada de desafios e sacrifícios, se não fosse todo o seu suporte eu não conseguiria ter chegado aonde cheguei. Muito obrigado, te amarei para sempre!

Ao meu filho Eduardo Lopes Viana Souza da Rocha por ter me dado só alegrias desde o primeiro segundo de vida e ser quem ele é, do jeito que veio ao mundo, perfeito ao seu modo me fazendo feliz todos os dias. Te amo filho!

Aos meus pais Nilo Moreira da Rochas e Laura Maria Silveira de Souza Moreira da Rocha, por todo o amor e carinho que depositaram em mim. Apesar de todas as dificuldades, nunca deixaram faltar nada e sempre acreditaram no meu potencial. Esse título é de vocês.

Ao meu irmão, eterno parceiro e inspiração, grande exemplo de ser humano e meu grande herói.

Aos meus Avós Cyro Nazaré da Costa Souza (in memoriam) e Terezinha Silveira de Souza por todo amor e carinho e por colaborarem diretamente com esse sonho de forma excepcional sempre me ajudando a ter as condições necessárias para vencer esse desafio.

Ao meu Orientador João Marcelo Azevedo de Paula Antunes a quem eu e toda a minha família seremos eternamente gratos. Um irmão que a vida me deu, que me abriu as portas, aceitou meus desafios e me deu as oportunidades que agarrei com afinco. Espero não ter decepcionado e ter sido um bom aprendiz. Obrigado por tudo, por todos esses 6 anos de parceria, estarei sempre a disposição.

À minha Co-orientadora Rachel Costa Sabry por ter sido fundamental na construção e no sucesso desse projeto, pela amizade e confiança depositadas em mim na condução dos trabalhos

e por todos os ensinamentos repassados que foram fundamentais na minha formação profissional e acadêmica. Sou eternamente grato por tudo que você fez por mim.

Aos meus grandes amigos e parceiros de bancada, presentes que a vida me deu, Aldevan e Renata em nome de todos os alunos e estagiários que passaram pelo Laboratório de Patologia dos Organismos Aquáticos – LABPOA e participaram das atividades desse projeto.

À diretoria do Instituto Federal do Ceará – IFCE, campus Aracati, por autorizar e dar suporte logístico a realização do projeto nas dependências da Instituição.

À diretoria do CEDECAM/LABOMAR/UFC na pessoa do Prof. Dr. Rodrigo Maggioni, pelas contribuições ao trabalho e por ter permitido a realização das análises moleculares.

Ao grande parceiro Dr. Rafael dos Santos Rocha, Engenheiro de Pesca e Técnico de laboratório do CEDECAM/LABOMAR/UFC que aceitou esse desafio, me recebeu de portas abertas e me ensinou com muita dedicação tudo que sei hoje em biologia molecular. Sou muito grato a toda carinho que você depositou nos trabalhos.

Ao amigo Bruno Vinicius Silva de Araújo e ao Prof. Sydnei Sakamoto por permitirem e ajudarem na realização de algumas atividades essenciais no Laboratório Multidisciplinar da UFERSA.

À profa. Juliana Fortes Vilarinho Braga por ter me dado a oportunidade de compartilhar os meus conhecimentos com os seus alunos da Disciplina de Doenças Infecciosas ao longo dos últimos 4 anos.

Aos meus eternos Amigos Diego e Vânia por me darem todo o suporte em Mossoró todas as vezes que eu precisei, sempre muito carinhosos e atenciosos, irmãos que a vida me deu e que levarei comigo eternamente. Minha família será eternamente grata por tudo que vocês fizeram por mim. Essa vitória também é graças a vocês.

À querida amiga e parceira Lúcia e a todos funcionários do laboratório Aquamar por terem aberto suas portas no momento mais difícil da pandemia de covid19 e ter nos autorizado a utilizar suas instalações para conclusão dos trabalhos do doutorado.

Aos Srs. Paulo Henrique “Irmão” e Rodrigo “APROOSTRAS”, pescadores e produtores locais que foram fundamentais e sem eles esse projeto não teria acontecido. Por toda a dedicação e o suporte na coleta das amostras. Sou muito grato ao apoio de vocês.

Aos meus colegas de trabalho Pedro, Francilene e Inácio Jr. pelo apoio dado a minha luta por capacitação profissional e o desafio da dupla jornada extremamente cansativa.

A todos os meus amigos e familiares que compartilharam comigo esse desafio e acompanharam de perto essa batalha sempre me incentivando e me dando suporte para não desistir do meu sonho.

À Universidade Federal Rural do Semi-Árido - UFERSA, por meio do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal - PPGCA, pela formação acadêmica e profissional.

Por fim, agradeço também à Deus e a todas as entidades sagradas e pessoas de bom coração por iluminarem meu caminho e me ajudarem a fazer as melhores escolhas e trilhar o caminho da vitória.

INVESTIGAÇÃO DA OCORRÊNCIA DE *Perkinsus* sp. EM OSTRAS NATIVAS *Crassostrea* sp. EM BANCOS NATURAIS DE ESTUÁRIOS DO RIO GRANDE DO NORTE, BRASIL.

ROCHA, Célio Souza da. Investigação da ocorrência de *Perkinsus* sp. em ostras nativas *Crassostrea* sp. em bancos naturais de estuários do Rio Grande do Norte, Brasil. 111f. Tese de Doutorado em Ciência Animal (linha de pesquisa: Sanidade Animal) do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Mossoró-RN, 2022.

RESUMO: Os protozoários representam o grupo de agentes patogênicos com maior número de espécies de notificação obrigatória declaradas pela Organização Mundial para a Saúde Animal (WOAH) responsáveis por causar eventos de mortalidade em massa em moluscos bivalves de bancos naturais e de cultivo. O avanço da dispersão de protozoários do gênero *Perkinsus* infectando moluscos de importância econômica em todo mundo coloca em alerta as autoridades sanitárias de diversos países pois demonstra a capacidade desse patógeno de se adaptar a condições ambientais diversas e de infectar uma ampla variedade de hospedeiros refletindo assim um risco eminente aos ecossistemas marinhos e cultivos locais. Diante disto, o objetivo dessa pesquisa foi investigar a ocorrência de *Perkinsus* sp. em ostras de mangue *Crassostrea* sp. de bancos naturais nos estuários do Rio Potengi e da Laguna de Guaraíras no Estado do Rio Grande do Norte, Brasil, compreendendo a dinâmica das infecções e os possíveis impactos causados no hospedeiro. Para tanto, a tese foi dividida em três capítulos. O primeiro capítulo traz as considerações gerais sobre a epizootiologia do *Perkinsus* sp. O segundo capítulo traz o artigo intitulado: Primeiro registro de *Perkinsus marinus* infectando *Crassostrea* sp. no Rio Grande do Norte, Brasil, utilizando PCR em tempo real. O terceiro e último capítulo traz o artigo intitulado: Detecção de *Perkinsus* spp. infectando a ostra de mangue *Crassostrea* sp. de bancos naturais em estuários da costa nordeste da América do Sul. As hipóteses levantadas na Tese foram confirmadas através de análises laboratoriais que detectaram a ocorrência do patógeno infectando ostras nativas em ambos os estuários investigados. De um total de 1200 ostras coletadas nos dois estuários foi possível identificar hipnósporos de *Perkinsus* sp. em 308 amostras (25,66%), sendo 106 (17,66%) no Rio Potengi e 202 (33,66%) na Laguna de Guaraíras, através de incubação em meio fluido de tioglicolato de Ray (RFTM) e todos os estágios de vida do protozoário foram identificados por zoosporulação *in vitro* e análise histopatológica. Um ensaio de PCR em tempo real utilizando primers ITS específicos para *P. marinus* e recomendados pela WOAH identificou pela primeira vez a ocorrência de uma espécie de notificação obrigatória infectando ostras de mangue no Rio Grande do Norte, Brasil. Também foram realizados ensaios de PCR gênero-específicos que confirmaram se tratar de *Perkinsus* sp. As amostras apresentaram sequências ITS para *P. marinus* com similaridade de 99,98 a 100% e 97,83 a 100% de identidade com sequências de *P. beihaiensis*. Este também foi o primeiro registro de *P. beihaiensis* no Rio Grande do Norte. Os estuários apresentaram dinâmicas de infecção diferentes e Guaraíras pareceu mais sensível às mudanças sazonais. As análises dos fatores abióticos indicaram que as infecções tiveram uma relação negativa com a salinidade sendo maiores nos pontos de coleta com médias de salinidade mais baixas. Não foram observadas mortalidades que pudessem estar associadas à ocorrência de *P. marinus*. Os resultados apresentados aqui podem fornecer maiores subsídios na compreensão da dinâmica das infecções causadas por *Perkinsus* sp. e contribuem para o monitoramento e a rastreabilidade desse patógeno ao longo da costa brasileira.

Palavras-chave: *P. marinus*, *P. beihaiensis*, *Crassostrea* sp., PCR, qPCR.

INVESTIGATION OF THE OCCURRENCE OF *Perkinsus* sp. IN NATIVE OYSTERS *Crassostrea* sp. IN NATURAL BANKS OF ESTUARIES OF THE RIO GRANDE DO NORTE, BRAZIL.

ROCHA, Célio Souza da. Investigation of the occurrence of *Perkinsus* sp. in native oysters *Crassostrea* sp. in natural banks of estuaries of the Rio Grande do Norte, Brazil. 111f. Doctoral thesis in Animal Science (research line: animal health) of the Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Mossoró-RN, 2022.

ABSTRACT: Protozoa represent the group of pathogens with the highest number of notifiable species declared by the World Organization for Animal Health (WOAH) responsible for causing mass mortality events in bivalve molluscs from natural banks and farmed. The advance of the spread of protozoa of the genus *Perkinsus* infecting molluscs of economic importance worldwide puts the health authorities of several countries on alert, as it demonstrates the ability of this pathogen to adapt to different environmental conditions and to infect a wide variety of hosts, thus reflecting an imminent risk to marine ecosystems and local cultures. Therefore, the objective of this research was to investigate the occurrence of *Perkinsus* sp. in mangrove oysters *Crassostrea* sp. of natural banks in the estuaries of the Rio Potengi and the Laguna de Guaraíras in the State of Rio Grande do Norte, Brazil, understanding the dynamics of infections and the possible impacts caused on the host. Therefore, the thesis was divided into three chapters. The first chapter brings general considerations about the epizootiology of *Perkinsus* sp. The second chapter brings the article entitled: First record of *Perkinsus marinus* infecting *Crassostrea* sp. in Rio Grande do Norte, Brazil, using real-time PCR. The third and final chapter brings the article entitled: Detection of *Perkinsus* spp. infecting the mangrove oyster *Crassostrea* sp. of natural banks in estuaries of the northeast coast of South America. The hypotheses raised in the Thesis were confirmed through laboratory analyzes that detected the occurrence of the pathogen infecting native oysters in both investigated estuaries. From a total of 1200 oysters collected in both estuaries it was possible to identify hypnospores of *Perkinsus* sp. in 308 samples (25.66%), 106 (17.66%) in the Potengi River and 202 (33.66%) in the Laguna de Guaraíras, through incubation in Ray's thioglycollate fluid medium (RFTM) and all life stages of the protozoan were identified by *in vitro* zoosporulation and histopathological analysis. A real-time PCR assay using ITS primers specific for *P. marinus* and recommended by WOAH identified for the first time the occurrence of a notifiable species infecting mangrove oysters in Rio Grande do Norte, Brazil. Genus-specific PCR assays were also performed, which confirmed that it was *Perkinsus* sp. The samples showed ITS sequences for *P. marinus* with 99.98 to 100% similarity and 97.83 to 100% identity with *P. beihaiensis* sequences. This was also the first record of *P. beihaiensis* in the State of Rio Grande do Norte. The estuaries showed different infection dynamics and Guaraíras appeared to be more sensitive to seasonal changes. Analyzes of abiotic factors indicated that infections had a negative relationship with salinity, being higher at collection points with lower salinity averages. The results presented here may provide further support in understanding the dynamics of infections caused by *Perkinsus* sp. and contribute to the monitoring and traceability of this pathogen along the Brazilian coast.

Keywords: *P. marinus*, *P. beihaiensis*, *Crassostrea* sp., PCR, qPCR.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

- Figura 1.** Ciclo de vida do *Perkinsus olseni*. Fonte: Adaptado de Itoiz et al. (2022)..... 30
- Figura 2.** Mecanismos de transmissão e infecção do hospedeiros. (A) Processo de transmissão no meio externo (coluna d'água); (B) Captura do patógeno na cavidade palial ou trato digestivo e transmigração para o interior do hospedeiro. Fonte: Adaptado de Robledo et al. (2011, 2018)..... 32
- Figura 3.** Interação trofozoíto-hemócito e sobrevivência no interior do fagossomo. Fonte: Adaptado de Vasta e Wang (2020)..... 34
- Figura 4.** Perkinsiose em moluscos. (A) Ostra infectada por *P. marinus* com tecido conjuntivo translúcido, glandula difestiva (GD) escurecida e manto retraído (Mr) (Fonte: CÁRCEREZ-MARTÍNEZ et al., 2008); (B) Berbigão altamente infectando por *P. olseni* exibindo nódulos brancos (setas) no manto e parede do corpo mole (Fonte: PRETTO et al., 2018)..... 35

CAPÍTULO 2 – PRIMEIRO REGISTRO DE *Perkinsus marinus* INFECTANDO *Crassostrea* sp. NO RIO GRANDE DO NORTE, BRASIL, UTILIZANDO PCR EM TEMPO REAL.

- Figura 1.** Localização dos estuários amostrados na região litorânea do Rio Grande do Norte, Brasil. (A) Estuário do rio Potengi, Natal; (B) Estuário da Lagoa Guaraíras, Tibau do Sul..... 80
- Figura 2.** (a) *Crassostrea* sp. coletada da raiz de *Rhizophorae mangle*; (b) hipnósporos em tecidos de branquias e reto após incubação por RFTM e corados por lugol (2%) (Bar = 100µm); (c) perfil de amplificação de fragmentos da região ITS de *P. marinus* do controle positivo e amostras testadas (A-H); (d) Curva de melting do controle positivo e das amostras (D-H)..... 81

CAPÍTULO 3 – DETECÇÃO DE *Perkinsus* spp. INFECTANDO A OSTRAS DE MANGUE *Crassostrea* sp. DE BANCOS NATURAIS EM ESTUÁRIOS DA COSTA NORDESTE DA AMÉRICA DO SUL.

- Figura 1.** Localização dos estuários amostrados na costa nordeste da América do Sul. (A) Estuário do rio Potengi, Natal-RN, Brasil; (B) Estuário da laguna de Guaraíras, Tibau do Sul-RN, Brasil..... 104
- Figura 2.** Tecidos de *Crassostrea* sp. incubados em RFTM e coradas com lugol. (A) Hipnósporos de *Perkinsus* sp. em uma ostra altamente infectada; (B) Detalhe de hipnósporos aumentados e esféricos (preto-azulado). (Barra = 100µm)..... 105

- Figura 3.** Cortes histológicos de tecido epitelial de *Crassostrea* sp. infectados por *Perkinsus* sp. (A) Lamela branquial mostrando esquizontes (s); (B) trofozoítos com forma de anel de sinete (t), esquizontes com arranjo de roseta (s) e infiltração de hemócitos (h); (C) Túbulo digestivo evidenciando esquizontes (s) e trofozoítos (t); (D) Hemócito (h) com núcleo periférico (n) fagocitando esquizonte (s). Hematoxilina e Eosina. (Barra = 10µm)..... 106
- Figura 4.** Zoosporulação *in vitro* de *Perkinsus* sp. (A) Prezoosporângio mostrando parede dupla (ponta de seta) e zoosporângio inicial (seta); (B) Zoosporângio com divisões intracelulares de células assimétricas; (C) Zoosporângio com tubo germinativo estendido (ponta de seta) em esporulação e zoósporos livres (seta); (D) Hipnósporo maduro (h) com núcleo periférico e vacúolo central; esquizonte (s) em divisões progressivas; zoosporângio inicial (z) (Barra = 50µm)..... 107
- Figura 5.** Árvore filogenética das amostras de *Perkinsus* spp. isoladas de *Crassostrea* sp. no presente estudo utilizando o teste estatístico Neighbor-joining e método Kimura-2..... 108

LISTA DE TABELAS E GRÁFICOS

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

Tabela 1.	<i>Perkinsus</i> sp. infectando moluscos em todo o mundo e suas respectivas referências.....	22
Tabela 2.	Registros de <i>Perkinsus</i> spp. infectando moluscos na costa brasileira e suas referências.....	26
Tabela 3.	Métodos para vigilância e diagnóstico de <i>P. marinus</i> e <i>P. olseni</i> recomendados pela WOA (2021).....	37

CAPÍTULO 3 – DETECÇÃO DE *Perkinsus* spp. INFECTANDO A OSTRAS DE MANGUE *Crassostrea* sp. DE BANCOS NATURAIS EM ESTUÁRIOS DA COSTA NORDESTE DA AMÉRICA DO SUL.

Tabela 1.	Prevalência e intensidade média ($\pm$ DP) da infecção por <i>Perkinsus</i> sp. na ostra do mangue <i>Crassostrea</i> sp. dos bancos naturais dos estuários do Rio Grande do Norte no período chuvoso e seco de 2019 obtidos por RFTM (n = 150). Altura média das ostras ($\pm$ DP) (n = 30).....	109
Gráfico 1.	Médias de animais infectados nos ensaios de RFTM por estuário e período (A); e por pontos de coleta (B). Médias de salinidade por ponto de coleta (C).....	110

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

APROOSTRAS	Associação dos Produtores de Ostras do Rio Grande do Norte
AQUACEN	Laboratório Oficial Central
BA	Bahia
BLAST	Ferramenta Básica de Pesquisa de Alinhamento Local
CE	Ceará
CEDECAM	Centro de Diagnóstico para Enfermidades de Organismos Aquáticos
CEUA	Comitê de Ética e Uso de Animais
CIDASC	Companhia Integrada de Desenvolvimento Agrícola de Santa Catarina
CRD	Domínios de Reconhecimento de Carboidratos
CvGal1	Galectina de <i>Crassostrea virginica</i> 1
CvGal2	Galectina de <i>Crassostrea virginica</i> 2
DG	Glândula digestiva
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
DP	Desvio Padrão
eDNA	DNA ambiental
EMM	Eventos de Mortalidade em Massa
ERN	Espécies Reativas de Nitrogênio
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
EUA	Estados Unidos das Américas
F	Primer Forward
FAO	Organização das Nações Unidas para Agricultura E Alimentação
FISH	Hibridização por Fluorescência <i>In Situ</i>
FSSW	Água Salgada Esterilizada Filtrada
GENBANK	Banco de Dados Públicos de Sequências de Nucleotídeos
GLZ	Modelos Lineares Generalizados
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ICMBio	Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade
IFCE	Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará
ITS	Espaçador Transcrito Interno
LABOMAR	Instituto de Ciências do Mar
LABPOA	Laboratório de Patologia de Organismos Aquáticos
LSU rRNA	Subunidade grande de rRNA

MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MaGal1	Galectina de <i>Mya arenaria</i>
MMA	Ministério do Meio Ambiente
MPA	Ministério da Pesca e Aquicultura
OIE	Organização Internacional de Epizootia
PB	Paraíba
pb	Pares de bases
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase
PCR-RFLP	PCR por Polimorfismo de Fragmento de Restrição
Perk ITS	Primer da região ITS do rDNA de <i>Perkinsus</i> sp.
PmarITS	Primer da região ITS do rDNA de <i>Perkinsus marinus</i> .
PROPPG	Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
qPCR	PCR em Tempo Real
R	Primer Reverse
RENAQUA	Rede Nacional de Laboratórios Oficiais do MPA
RFTM	Meio Fluido de Tioglicolato de Ray
RM	Manto retraído
RN	Rio Grande do Norte
rRNA	Ácido ribonucleico ribossômico
SC	Santa Catarina
SE	Sergipe
SPX	Protista X de Vieiras
SSU rRNA	Subunidade pequena de rRNA
Taq DNA polimerase	Enzima termoestável, utilizada na amplificação de fragmentos de DNA
UFC	Universidade Federal do Ceará
UFERSA	Universidade Federal Rural do Semi-Árido
WOAH	Organização Mundial para Saúde Animal

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
=	Igual
±	Mais ou menos
<	Menor
™	Marca registrada
×	Multiplicação
μL	Microlitro
μm	Micrômetro
mM	Milimolar
%	Porcentagem
‰	Partes por mil
p/v	Peso-volume
U	Unidade de atividade enzimática
UV	Ultra-violeta
V	Voltagem
v/v	Volume-volume

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

1. INTRODUÇÃO.....	18
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	21
2.1. Espécies de <i>Perkinsus</i> sp. e cronologia dos registros taxonômicos.....	21
2.2. Registros de ocorrências de <i>Perkinsus</i> spp. na costa brasileira.....	25
2.3. Ciclo de vida.....	29
2.4. Mecanismos de Infecção.....	31
2.5. Influência de fatores abióticos na infecção por <i>Perkinsus</i> sp.....	34
2.6. Impactos da infecção por <i>Perkinsus</i> sp.....	35
2.7. Diagnóstico para <i>Perkinsus</i> sp.....	36
3. JUSTIFICATIVAS.....	41
4. HIPÓTESES CIENTÍFICAS.....	42
5. OBJETIVOS.....	43
5.1. Objetivos gerais.....	43
5.2. Objetivos específicos.....	43
6. REFERÊNCIAS.....	44

CAPÍTULO 2 – PRIMEIRO REGISTRO DE *Perkinsus marinus* INFECTANDO *Crassostrea* sp. NO RIO GRANDE DO NORTE, BRASIL, UTILIZANDO PCR EM TEMPO REAL.....

1. INTRODUÇÃO.....	72
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	73
3. RESULTADOS.....	73
4. DISCUSSÃO.....	74
5. REFERÊNCIAS.....	76
6. APÊNDICES.....	80

CAPÍTULO 3 – DETECÇÃO DE *Perkinsus* spp. INFECTANDO A OSTRÁ DE MANGUE *Crassostrea* sp. DE BANCOS NATURAIS EM ESTUÁRIOS DA COSTA NORDESTE DA AMÉRICA DO SUL.....

1. INTRODUÇÃO.....	84
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	85
3. RESULTADOS.....	89
4. DISCUSSÃO.....	92
5. REFERÊNCIAS.....	97
6. APÊNDICES.....	104

CONSIDERAÇÕES FINAIS.....

ANEXO I – CONFIRMAÇÃO DE SUBMISSÃO DE ARTIGO CIENTÍFICO PARA REVISTA JOURNAL OF INVERTEBRATE PATHOLOGY.....	112
ANEXO II – CONFIRMAÇÃO DE SUBMISSÃO DE ARTIGO CIENTÍFICO PARA REVISTA RESEARCH IN VETERINARY SCIENCE.....	114
ANEXO III – AUTORIZAÇÃO PARA ATIVIDADES COM FINALIDADE CIENTÍFICA – ICMBio/MMA.....	116
ANEXO IV – PARECER CEUA/UFERSA.....	119

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

1. INTRODUÇÃO

Os moluscos bivalves são organismos zoobênticos que desempenham um importante papel ecológico nos ecossistemas aquáticos ocupando uma posição importante dentro da cadeia alimentar e participando intensamente da atividade de decomposição da matéria orgânica e da ciclagem de nutrientes no substrato obtendo assim o status de engenheiros do habitat (NYBAKKEN, 2001; COEN; GRIZZLE, 2007; GALLARDI, 2014). Para além disto, a ostra (*Bivalvia*: *Ostreidae*) por exemplo possui uma grande capacidade de conversão da produção primária do mar em proteína animal através do seu mecanismo de alimentação por filtração de uma vasta quantidade de água se tornando fonte de alimento e renda para comunidades ribeirinhas e importante matéria-prima para a indústria da pesca e aquicultura.

Os dados oficiais divulgados pela Organização das Nações Unidas para a Agricultura e a Alimentação - FAO demonstram que o cultivo de moluscos tem tido uma crescente importância no mundo. A produção global de moluscos cultivados alcançou a marca de 17 milhões de toneladas em 2016 que representaram em torno de 29,2 bilhões de dólares. As espécies mais cultivadas no mundo são as ostras do gênero *Crassostrea*, berbigões *Ruditapes philippinarum* e vieiras da família *Pectinidae*. A China se destaca com a maior produção do mundo em torno de 14,2 milhões de toneladas de peso vivo, aproximadamente 83% da produção mundial, e o Chile continua despontando como o maior produtor da América do Sul, 307.4 mil toneladas de peso vivo (FAO, 2018).

O cultivo de moluscos bivalves no Brasil iniciou de maneira experimental com a introdução de espécies exóticas no final dos anos 80, porém hoje a produção em alta escala se destaca principalmente na região Sul do país. A ostreicultura brasileira é dominada pela produção da ostra japonesa *Crassostrea gigas*, seguida por outras espécies, incluindo ostras de mangue *Crassostrea rhizophorae* e *Crassostrea gasar* (EPAGRI, 2015; SUHNEL et al., 2016). A produção de ostras, vieiras e mexilhões em cativeiro foi de, aproximadamente, 11 mil toneladas em 2021 e Santa Catarina foi o principal Estado produtor, sendo responsável por aproximadamente 95,35% da produção (IBGE, 2022). A costa litorânea do Nordeste brasileiro detém condições climáticas favoráveis para o cultivo de espécies nativas *C. rhizophorae* e *C. gasar*, porém a produção ainda é fortemente extrativista e desempenhada pelas populações ribeirinhas. Além dos Estados da Paraíba e Sergipe, o Rio Grande do Norte vem se destacando na produção através da capacitação e formalização de associações de produtores como a

Associação dos Produtores de Ostras do Rio Grande do Norte – APROOSTRAS, e recentemente se tornou o primeiro Estado a reproduzir ostras em escala comercial expandindo o cultivo sem agredir os estoques naturais (MELLO, 2016).

A malacocultura de maneira geral, vide a ampla variedade de espécies de moluscos bivalves encontrados na costa brasileira, é uma fonte nutricional chave, bem como um motor econômico nas zonas costeiras, ao mesmo tempo que fornece importantes serviços ecossistêmicos, como a filtração e tamponamento da água marinha ou estuarina. Entretanto, esses ambientes são frequentemente ameaçados por uma transformação ambiental sem precedentes e a influência dessas mudanças nas epizootias de doenças é agora uma importante questão científica a ser enfrentada. Tais mudanças estão relacionadas a consequências de ações antropogênicas que alteram o equilíbrio dos ecossistemas, principalmente os casos de introdução de espécies patogênicas exóticas em ambientes anteriormente livres podendo levar ao surgimento de novas enfermidades emergentes com, em alguns casos, consequências desastrosas para as populações hospedeiras locais (ITOIZ et al., 2022)

Nos ecossistemas aquáticos, a introdução involuntária de patógenos exóticos aumentou substancialmente com a globalização das economias e a cada dia centenas de espécies são transferidas passivamente pelos oceanos por transporte marítimo (Ex: água de lastro), comércio de ornamentais ou introdução de espécies de cultivo (RUIZ et al., 2000; PATOKA et al., 2018). Um dos exemplos mais famosos de doença emergente é a doença “Dermo” ou Perkinsiose causada pelos protozoários *Perkinsus marinus* e *Perkinsus olseni* (Perkinsea, Alveolata) que detêm alto potencial de virulência e podem causar eventos de mortalidade em massa por isso são consideradas espécies de notificação obrigatória (WOAH, 2022). As infecções por *P. marinus* (MACKIN et al., 1950) foram originalmente localizadas e enzoóticas no sudeste dos Estados Unidos (EUA) e no Golfo do México no final dos anos 1940-1990 (BURRESON et al., 1994; ANDREWS, 1996). É provável que sua subsequente disseminação para o nordeste dos EUA tenha sido devido às influências combinadas da importação de ostras infectadas e mudanças ambientais como resultado das mudanças climáticas (GLEASON et al., 2017). No caso do *Perkinsus olseni* (LESTER; DAVIS, 1981) a dispersão partiu de gastrópodes infectados na Austrália e introduzidos na Europa para estimular o desenvolvimento da aquicultura naquele continente (RUANO et al., 2015).

Como os protozoários causaram a maioria das doenças historicamente significativas em moluscos, esse grupo patogênico é de grande preocupação para a exploração de moluscos (CARNEGIE et al., 2016). Várias espécies de bivalves e gastrópodes de valor econômico foram afetadas pela infecção por *Perkinsus* sp. e causaram grandes prejuízos para a indústria de pesca

e aquicultura. Numerosos casos de mortalidade em massa e declínios populacionais já foram relatados (AZEVEDO et al., 1989; HAMAGUCHI et al., 1998; SAGRISTÀ et al., 1995; ENRÍQUEZ-ESPINOZA et al., 2010; ARZUL et al., 2012; PRETTO et al., 2018).

Até o presente momento, pesquisas sobre a ocorrência de *Perkinsus* sp. e sanidade em moluscos bivalves são escassas no Rio Grande do Norte (RN) mesmo o Estado possuindo tradição extrativista e crescente destaque na cadeia produtiva de ostras do Nordeste. Portanto, considerando a importância desses organismos aquáticos para a manutenção do ecossistema dos manguezais e o potencial papel econômico que a ostreicultura pode prover ao RN, se faz necessário o desenvolvimento de pesquisas que contribuam para a manutenção da sanidade destes moluscos na região e monitorem a introdução de novos patógenos em novas áreas utilizando as metodologias mais avançadas de detecção associadas às técnicas clássicas.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. Espécies de *Perkinsus* sp. reconhecidas e a cronologia dos registros taxonômicos

Os primeiros conhecimentos sobre a epizootiologia de *Perkinsus* sp. infectando moluscos bivalves foram obtidos durante as investigações de eventos de mortalidade em massa (EMM) de estoques de ostras nativas no Estado da Louisiana, Golfo do México, EUA, em meados do século XX. Historicamente, a ostra oriental *Crassostrea virginica*, nativa da costa leste e sudeste dos EUA, é considerada um importante recurso pesqueiro utilizado durante séculos como fonte alimentar pelos indígenas norte-americanos e depois pelos imigrantes europeus, passando a ser cultivada no final do século XIX e a representar uma importante atividade aquícola economicamente lucrativa até os dias atuais (SMOLOWITZ, 2013). Os EMM ocorridos no ano de 1946 tanto em *C. virginica* de bancos naturais quanto de cultivo inicialmente foram relacionados a consequências antropogênicas causadas por vazamento de petróleo perto da costa, porém dois anos depois foi identificado a presença de um organismo esférico nos tecidos de ostras doentes e que estavam ausentes em ostras saudáveis (VILLALBA et al., 2004). Identificado inicialmente como *Dermocystidium marinum* (MACKIN; OWEN; COLLIER, 1950) e afiliado a uma linhagem fúngica, anos depois o agente passou a ser considerado um protista do filo Apicomplexa (Alveolata) devido a suas características morfológicas como a presença de uma membrana subpeliclar, microporos e uma estrutura conóide (estágio de zoósporo) observados sob microscopia eletrônica (PERKINS; MENZEL, 1967; PERKINS, 1976). O então novo gênero *Perkinsus* foi originalmente colocado na Ordem Perkinsidae da Classe Perkinsea dentro do Filo Apicomplexa (LEVINE, 1978) e a espécie passou a ser denominada *Perkinsus marinus*.

Reece et al. (1997) revelaram que as espécies de *Perkinsus* estavam mais intimamente relacionadas com dinoflagelados do que com apicomplexas quando analisadas suas sequências de rRNA e de genes de actina. Por compartilhar características semelhantes com dois filos diferentes (Apicomplexa e Dinoflagelado), o filo Perkinsozoa foi proposto como um novo filo do reino Alveolata (NORÉN; MÖESTRUP; REHNSTAM-HOLM, 1999; ROBLEDO et al., 2011; MANGOT; DEBROAS; DOMAIZON, 2011) e a afiliação do gênero *Perkinsus* nessa linhagem independente foi apoiada anos depois por análises moleculares adicionais (ZHANG et al., 2011). Isso tem implicações importantes para a compreensão do ciclo de vida do organismo e para a identificação de formas observadas nos tecidos das ostras e na coluna d'água (SMOLOWITZ, 2013). Estudos identificaram dez espécies do gênero

Perkinsus com diferentes potenciais de virulência e uma diversa gama de hospedeiros, entretanto atualmente apenas sete espécies são taxonomicamente reconhecidas dentro do gênero e estão distribuídas mundialmente (Tabela 1).

Tabela. 1. *Perkinsus* sp. infectando moluscos em todo o mundo e suas respectivas referências.

Agente	local	Espécie hospedeira	Autor
<i>Perkinsus marinus</i>	EUA	<i>Crassostrea gigas</i> <i>C. virginica</i>	Mackin et al. (1950) Reece et al. (2008) Guévelou et al. (2021)
	México	<i>Crassostrea gigas</i> <i>Saccostrea palmula</i> <i>C. corteziensis</i>	Enríquez-Espinoza et al. (2010) Cáceres-Martínez et al. (2012) Villanueva-Fonseca et al. (2020)
	Panamá	<i>Crassostrea rhizophorae</i> , <i>C. virginica</i> <i>Striostrea prismática</i> e <i>Saccostrea palmula</i>	Pagenkopp Lohan et al. (2016)
<i>P. olsenii</i>	Austrália	<i>Haliotis rubra</i>	Lester e Davis (1981)
		<i>H. rubra</i> e <i>H. laevigata</i>	^a Murrell et al. (2002)
	Nova Zelândia	<i>Austrovenus stutchburyi</i>	Dungan et al. (2007)
	Portugal	<i>Ruditapes decussatus</i>	^a Azevedo (1989)
	França	<i>Ruditapes decussatus</i> e <i>R. philippinarum</i>	Arzul et al. (2012)
	Itália	<i>Ruditapes decussatus</i> , <i>R. philippinarum</i> e <i>Venerupis pullastra</i>	Pretto et al. (2014)
	Espanha	<i>Cerastododerma glaucum</i> , <i>Venus verrucosa</i> <i>Ruditapes decussatus</i> , <i>R. philippinarum</i> <i>Venerupis aurea</i> e <i>V. corrugata</i>	Ramilo et al. (2015 e 2016)
	Tailândia	<i>Paphia undulata</i>	Leethochavalit et al (2004)
	Vietnã	<i>Tridacna crocea</i>	Sheppard e Phillips (2008)
	Índia	<i>Pinctada fucata</i> <i>Paphia malabarica</i>	Sanil et al. (2010) Shamal et al. (2018)
	Japão	<i>Ruditapes philippinaru</i>	Umeda e Yoshinaga (2012)
	China	<i>Soletellina acuta</i> <i>Pinctata martensii</i> , <i>Crassostrea hongkongensis</i> , <i>Haliotis diversicolor</i> e <i>Chlamys nobilis</i>	Cui et al. (2018) Yang et al. (2022)
	Coreia do Sul	<i>Anadara kagoshimensis</i>	Cho et al. (2022)
	Uruguai	<i>Pitar rostrata</i>	Cremonte et al. (2005)
	Panamá	<i>Crassostrea rhizophorae</i> , <i>Dendostrea frons</i> <i>Isognomon</i> sp., <i>I. alatus</i> , <i>Saccostrea</i> sp. e <i>Pinctada imbricata</i>	Pagenkopp Lohan et al. (2016)
<i>P. beihaiensis</i>	Argentina	<i>Mytilus chilensis</i>	Vázquez et al. (2022)
	China	<i>Crassostrea hongkongensis</i> e <i>C. ariakensis</i> <i>Soletellina acuta</i> <i>C. hongkongensis</i> e <i>Haliotis diversicolor</i>	Moss et al. (2008) Cui et al. (2018) Yang et al. (2022)
	Índia	<i>Crassostrea madrasensis</i>	Sanil et al. (2012)
	Panamá	<i>Isognomon</i> sp., <i>I. alatus</i> , <i>Dendostrea frons</i> <i>Crassostrea rhizophorae</i> , <i>C. columbiensis</i> <i>Saccostrea</i> sp., <i>S. palmula</i> e <i>Striostrea prismatica</i>	Pagenkopp Lohan et al. (2016)
	Japão	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Itoh et al. (2019)
<i>P. chesapeaki</i>	EUA	<i>Mya arenaria</i> <i>Macoma balthica</i> <i>M. arenaria</i> <i>Tagelus plebeius</i> <i>Mulinia lateralis</i> <i>Rangia cuneata</i> <i>Cyrtopleura costata</i>	McLaughlin et al. (2000) ^b Coss et al. (2001) ^b Burreson et al. (2005) Reece et al. (2008)
	França	<i>Ruditapes decussatus</i> e <i>R. philippinarum</i>	Arzul et al. (2012)
	Espanha	<i>Cerastoderma edule</i> <i>Ruditapes philippinaru</i>	Carrasco et al. (2014) Ramilo et al. (2016)
	Panamá	<i>Crassostrea columbiensis</i> , <i>Dendostrea frons</i> e <i>Saccostrea</i> sp.	Pagenkopp Lohan et al. (2016)
	Espanha	<i>Ostrea edulis</i> <i>Mimachlamys varia</i>	Casas et al. (2004) Box et al. (2020)
	Itália	<i>Ostrea edulis</i>	Ramilo et al. (2015)
	Japão	<i>Ruditapes philippinarum</i>	Dungan e Reece (2006)
	Coreia do Sul	<i>Ruditapes variegatus</i>	Kang et al. (2016)
	Canadá	<i>Patinopecten yessoensis</i>	Blackbourn et al. (1998)

Espécies sinônimas: ^a = *P. atlanticus*; ^b = *P. Andrewsii*

A partir da identificação do *P. marinus* (MACKIN et al., 1950) como o agente etiológico da Perkinsiose ou “dermo” em ostras *C. virginica*, novos registros de EMM foram notificados nos EUA e demais países. Além da costa norte-americana do Golfo do México, *P. marinus* mostrou um aumento significativo em sua área geográfica nos EUA ao longo da costa leste (ANDREWS, 1988, 1996; BURRESON; RAGONE CALVO 1996). A dispersão deste patógeno pela costa das Américas parece ser permanente e pode estar relacionada com fatores abióticos como temperatura e salinidade (FORD, 1996; FORD; SMOLOWITZ, 2007; BRANDÃO et al., 2013). Em 2007, *P. marinus* foi detectado em cultivos de ostras nativas *Crassostrea corteziensis* do estado de Nayarit, na costa do Pacífico do México e essas infecções foram associadas a introduções descontroladas de *C. virginica* na região (CÁCERES-MARTÍNEZ et al., 2008; CÁCERES-MARTÍNEZ et al., 2010). Posteriormente, Cáceres-Martínez et al. (2012) detectaram *P. marinus* infectando *Saccostrea palmula* de bancos naturais e cultivo no estado de Sinaloa, na costa do Pacífico do México. Enríquez-Espinoza et al. (2010) atribuíram os EMM de *Crassostrea gigas* cultivadas no Golfo da Califórnia (noroeste do México) em julho e agosto de 2006 a infecções por *P. marinus*. Moluscos bivalves coletados na costa do Panamá banhada tanto pelo Mar do Caribe como pelo Oceano Pacífico também foram infectados por *P. marinus*, mas sem registros de EMM (PAGENKOPP LOHAN et al., 2016).

A segunda espécie identificada foi *Perkinsus olseni* (LESTER; DAVIS, 1981) infectando gastrópodes *Halotis ruber* no sul da Austrália causando grandes abscessos musculares que debilitavam o hospedeiro e prejudicava a economia local. *P. olseni* é considerado o patógeno mais cosmopolita dentre os protozoários do gênero *Perkinsus* e infecta uma grande variedade de hospedeiros em todo o mundo. De acordo com Ruano et al. (2015), este agente foi co-introduzido na Europa com o molusco hospedeiro *Ruditapes philippinarum* em 1972 para o desenvolvimento da aquicultura no continente. Inicialmente descrito na Europa como *Perkinsus atlânticus* (AZEVEDO, 1989), o protozoário causou EMM em *Ruditapes decussatus* no sul de Portugal e infectou bivalves de diferentes áreas da costa atlântica e mediterrânea da Espanha (NAVAS et al. 1992; SAGRISTÀ et al., 1996; ORDAS et al., 2001; CASAS et al., 2002a). Com base em análises moleculares, foi possível afirmar que na verdade *P. atlânticus* e *P. olseni* são co-específicos, tratava-se então de uma sinonímia, sendo o último a espécie taxonômica prioritária (MURREL et al., 2002). Atualmente, *P. olseni* está presente na costa atlântica e mediterrânea da Europa ainda causando prejuízos e EMM (ABOLLO et al., 2006; BALSEIRO et al., 2010; ARZUL et al., 2012; PRETTO et al., 2014). Sua ampla dispersão nos oceanos pode ser justificada pela aparente facilidade de adaptação as diferentes condições ambientais e pela

capacidade de infectar inúmeras espécies hospedeiras localizadas também nas regiões costeiras da América Latina, Oceania e Ásia (CREMONTE et al., 2005; DUNGAN et al., 2007; SHAMAL et al., 2018; PAGENKOPP LOHAN et al., 2016; CHO et al., 2022; VÁZQUEZ et al., 2022).

As espécies *P. marinus* e *P. olsenii* apresentam alto potencial de virulência que podem causar graves prejuízos à malacocultura mundial e ao equilíbrio dos ecossistemas costeiros. Hospedeiros podem sofrer degeneração nos tecidos moles tornando-os visivelmente aquosos e finos quando infectados por *P. marinus* (SMOLOWITZ, 2013) e formar abscessos ou nódulos esbranquiçados em brânquias, manto e tecidos do corpo mole quando infectados *P. olsenii* (SHEPPARD; PHILLIPS, 2008; GLEASON et al., 2017). Além disso, a capacidade de promover EMM colocam esses patógenos na lista de doenças de notificação obrigatória da Organização Mundial para Saúde Animal – WOA (Fundada como OIE) (2022).

McGladdery et al. (1991) identificaram um parasita apicomplexa semelhante a *Perkinsus* sp. que formava abscessos teciduais em vieiras *Argopecten irradians* da costa leste do Canadá e o nomearam de *Perkinsus karlssoni*. Diferenças morfológicas nas fases de vida do *P. karlssoni* foram identificadas num estudo subsequente concluindo que o agente não pertencia a uma espécie válida de *Perkinsus* sp. (GOGGIN et al., 1996). Por outro lado, um parasita protista inicialmente chamado de “Protista X de Vieiras” (SPX) que causava alta mortalidade em vieiras japonesas *Patinopecten yessonesis* introduzidas em 1983 na Columbia Britânica, Canadá, demonstrou uma semelhante morfologia dos seus estágios de desenvolvimento e uma multiplicação vegetativa compatível com outros *Perkinsus* spp. mesmo não sendo diagnosticado pela técnica de incubação em Meio Fluido de Tioglicolato de Ray (RFTM) e desenvolvendo zoósporos apenas dentro do hospedeiro, assim ele foi descrito como *Perkinsus qugwadi* (BLACKBOURN et al., 1998), uma espécie enzoótica de vieira exótica no Canadá (BOWER et al., 1998).

Na Baía de Chesapeake no Estado de Maryland, EUA, duas novas espécies foram inicialmente descritas. A primeira espécie identificada foi *Perkinsus chesapeaki* (MCLAUGHLIN et al., 2000) infectando moluscos de concha mole, berbigão *Mya arenaria*, apresentando características morfológicas semelhantes a *Perkinsus* sp. em todas as fases do ciclo de vida que foram apoiadas por ensaios moleculares, além de se desenvolver em temperaturas abaixo de 20° C como o *P. qugwadi* (BLACKBOURN et al., 1998; BOWER et al., 1998). O reconhecimento de uma segunda espécie *Perkinsus andrewsi* (COSS et al., 2001) que infectava o hospedeiro simpátrico *Macoma balthica* foi rapidamente desconsiderado por evidências filogenéticas e ciclos celulares indistinguíveis que o consideravam sinônimo júnior

de *P. chesapeaki* (BURRESON et al., 2005). *P. chesapeaki* parece ter sido acidentalmente introduzido na Europa através de seus vetores *Mya arenaria* ou *Mercenaria mercenaria* dos EUA (ARZUL et al., 2012). A detecção esporádica de *P. chesapeaki* não reflete uma dinâmica de expansão. Até o momento, nenhum evento de mortalidade afiliado a *P. chesapeaki* foi registrado (ITOÏZ et al., 2022).

Investigações de ocorrência de organismos semelhantes a *Perkinsus* sp. infectando moluscos no Mar Mediterrâneo documentadas desde o final da década de setenta não haviam identificado o parasita a nível de espécie e somente no ano de 2003 estudos *in vitro* e moleculares permitiram identificar o *Perkinsus mediterraneus* (CASAS et al., 2004) como o agente infeccioso de ostra europeia *Ostrea edulis* cultivada ao longo da costa das Ilhas Baleares, Espanha. Características morfológicas e genéticas específicas indicaram considerar uma nova espécie no gênero. Da mesma maneira, Dungan e Reece (2006) conseguiram identificar o *Perkinsus honshuensis* como o parasita voraz de moluscos comerciais *Venerupis philippinarum* no Japão. Em ambos os casos o sequenciamento do ácido ribonucleico ribossômico de subunidade pequena (ssu rRNA) confirmaram que os parasitas pertenciam ao gênero *Perkinsus* e as sequências do espaçador transcrito interno (ITS) eram distintas de quaisquer sequências ITS de *Perkinsus* sp. previamente publicadas ou depositadas no GenBank. Posteriormente, análises filogenéticas indicaram uma relação próxima entre *P. mediterraneus* e *P. honshuensis* (CASAS et al., 2008).

O sétimo representante do gênero *Perkinsus* identificado e taxonomicamente reconhecido foi o *Perkinsus beihaiensis* (MOSS et al., 2008) através de uma combinação de resultados histológicos e filogenéticos que suportavam a identificação de uma nova espécie parasita infectando *Crassostrea hongkongensis*, *Crassostrea ariakensis* e outros hospedeiros bivalves das províncias de Fujian a Guangxi, no sul da China. *P. beihaiensis* tem provocado infecções de menor potencial patogênico quando comparado as demais espécies e aparentemente não causam nos hospedeiros quadros clínicos de Perkinsiose (SABRY et al., 2013; CUI et al., 2018; ITOH et al., 2019).

2.2. Registros de espécies de *Perkinsus* sp. identificadas na costa brasileira

No Brasil, Sabry et al. (2009) relataram o primeiro caso de *Perkinsus* sp. infectando a ostra nativa *Crassostrea rhizophorae* do estuário do Rio Pacoti, Ceará (CE). Estudos moleculares detectaram uma relação filogenética próxima com o *P. beihaiensis* que infectava ostras na China (MOSS et al., 2008) e na Índia (SANIL et al., 2012). Este registro foi pioneiro

na costa brasileira e a partir dele novas investigações também detectaram protozoários do gênero *Perkinsus* infectando moluscos em outros Estados através de análises não específicas e diagnósticos moleculares confirmatórios (Tabela 2) (BRANDÃO et al., 2013; QUEIROGA et al., 2013; DANTAS NETO et al., 2015, 2020; LUZ; BOEHS., 2015; DA SILVA et al., 2016; SILVA et al., 2017). Durante um levantamento parasitológico de ostras *C. rhizophorae* do Rio Pacoti, Ceará, análises filogenéticas identificaram *P. beihaiensis* como o agente infeccioso presente nas amostras sendo esta a primeira espécie registrada no país e o primeiro relato caso de *P. beihaiensis* infectando este hospedeiro (SABRY et. al., 2013).

Tabela 2. Registros de *Perkinsus* spp. infectando moluscos na costa brasileira e suas referências.

Agente	Local	Espécie hospedeira	Autores
<i>Perkinsus</i> sp.	Estuário Rio Pacoti - CE	<i>Crassostrea rhizophorae</i>	Sabry et. al. (2009)
	Estuário Rio Marau – BA	<i>C. rhizophorae</i>	Brandão et al. (2013)
	Estuário Rio Graciosa – BA		
	Estuário Rio Mamanguape - PB		Queiroga et al. (2013)
	Estuário Rio Jaguaribe – CE	<i>C. rhizophorae</i>	Dantas Neto et al. (2015)
	Estuário Rio Carnaubeiras – MA		
	Estuário Rio Camurupim – PI		
	Baía de Camamu - BA	<i>C. rhizophorae</i>	Luz e Boehs (2015)
	Fazenda PRIMAR - RN	<i>C. gasar</i>	da Silva et al. (2016)
	Estuário Porto de Mangue – RN	<i>C. rhizophorae</i>	Silva et al. (2017)
	Estuário Rio Jaguaribe - CE	<i>Anomalocardia brasiliana</i> e <i>Mytella falcata</i>	Dantas Neto et al. (2020)
<i>P. marinus</i>	Estuário Rio Paraíba - PB	<i>C. rhizophorae</i>	da Silva et al. (2013)
	Estuário Rio São Francisco - SE	<i>C. gasar</i>	da Silva et al. (2014)
	Estuário Rio Mamanguape - PB	<i>C. gasar</i>	Queiroga et al. (2015)
	Baía de Camamu - BA	<i>C. rhizophorae</i>	Pinto et al. (2017)
	Estuário Rio São Francisco - SE	<i>C. rhizophorae</i> e <i>C. gasar</i>	Scardua et al. (2017)
	São Francisco do Sul - SC	<i>C. gigas</i> e <i>C. gasar</i>	Luz Cunha et al. (2019)
		<i>C. gigas</i>	Leibowitz et al. (2019)
<i>P. olseni</i>	Estuário Rio São Francisco - SE	<i>C. gasar</i>	da Silva et al. (2014)
<i>P. beihaiensis</i>	Estuário Rio Mamanguape - PB	<i>C. gasar</i>	Queiroga et al. (2015)
	Estuário Rio Pacoti - CE	<i>C. rhizophorae</i>	Sabry et. al. (2013)
	Estuário Rio Timonha - CE	<i>A. brasiliana</i>	Pinho Ferreira et al. (2015)
	Estuário Rio Mamanguape - PB	<i>C. gasar</i>	Queiroga et al. (2015)
	Baía de Camamu - BA	<i>C. rhizophorae</i>	Luz e Boehs. (2016)
	Estuário Rio São Francisco - SE	<i>C. rhizophorae</i> e <i>C. gasar</i>	Scardua et al. (2017)
	Baía de Camamu - BA	<i>C. rhizophorae</i> e <i>C. gasar</i>	Luz et al. (2018)
<i>P. chesapeaki</i>	Balneário Barra do Sul - SC	<i>C. gasar</i>	Luz Cunha et al. (2019)
	Estuário Rio Jaguaribe - CE	<i>Crassostea</i> sp.	Dantas Neto et al. (2020)
	Estuário Rio Jaguaribe - CE	<i>C. rhizophorae</i>	Dantas Neto et al. (2016)

No estado da Paraíba, da Silva et al. (2013) conseguiram visualizar através da esporulação *in vitro* algumas fases de vida do patógeno e por ensaios moleculares confirmaram o primeiro caso de *P. marinus* no Brasil, uma espécie de notificação obrigatória à Organização Mundial para Saúde Animal – WOA (fundada como OIE). O agente foi detectado em ostras *C. rhizophorae* no estuário do Rio Paraíba, com valores de prevalência acima de 70% e uma alta intensidade, situação oposta daquela observada por Sabry et. al (2009), onde as amostras apresentaram apenas 10% de prevalência no RFTM. Este também foi o primeiro relato de

ocorrência de *P. marinus* na América do Sul e o primeiro relato de *P. marinus* infectando naturalmente ostras *C. rhizophorae*.

Da Silva et al. (2014) avaliaram a saúde de populações selvagens e cultivadas de ostra de mangue *Crassostrea gasar* do estuário do Rio São Francisco no estado de Sergipe (SE) onde identificaram infecções causadas por *P. marinus* e *P. olseni* com diferentes prevalências nos períodos secos e chuvosos. Este foi o primeiro registro *P. olseni* e *P. marinus* infectando *C. gasar*. Além disso, foi o primeiro estudo a documentar co-infecção por *P. olseni* e *P. marinus* em um único hospedeiro. Embora as infecções por *P. olseni* sejam previamente relatadas entre os moluscos *P. rostrata* da costa do Uruguai (CREMONTE et al., 2005), tais resultados são os primeiros a confirmar *P. olseni* em um molusco do hemisfério ocidental por ensaios de hibridação *in situ* com uma sonda de DNA específica da espécie. Pela primeira vez também um ciclo sazonal anual para *Perkinsus* sp. foi documentado no Brasil, com menores prevalências e intensidades de infecção durante a estação chuvosa de julho, com a temperatura mais baixa da água do mar (em torno de 25°C) e salinidade ($23,8‰ \pm 0,5$). Associação de fatores abióticos (temperatura e salinidade da água) com a dinâmica sazonal de infecções de moluscos marinhos por *Perkinsus* sp. está bem documentada nas regiões de clima temperado no mundo (VILLALBA et al., 2004).

Outros gêneros de moluscos encontrados na costa brasileira também foram investigados quanto a sua susceptibilidade ao *Perkinsus* sp. Berbigões silvestres da espécie *Anomalocardia brasiliiana* foram coletados no Estuário do rio Timonha, CE, e apontavam, após a incubação em RFTM, para a presença de células parasitárias esféricas e enegrecidas após adição do Lugol sugerindo ocorrência de hipnósporos de *Perkinsus* sp. em amostras de brânquias e reto do hospedeiro. A análise filogenética posterior indicou fortemente *P. beihaiensis* como a espécie infectante (PINHO FERREIRA et al., 2015). Este é o primeiro relato de *P. beihaiensis* infectando berbigão *A. brasiliiana*.

Infecções simultâneas em ostras de cultivo também foram registradas na Paraíba (PB) com a confirmação por diagnóstico molecular da presença de *P. marinus*, *P. olseni* e *P. beihaiensis* infectando a ostra *C. gasar* do estuário do rio Mamanguape (QUEIROGA et al., 2015), cerca de 40 km do estuário do Rio Paraíba, onde *P. marinus* foi detectado infectando *C. rhizophorae* (DA SILVA et al., 2013). Este é o primeiro relato de *P. beihaiensis* em ostras *C. gasar*.

Investigando a presença de *Perkinsus* sp. em ostras do estuário do Rio Jaguaribe, CE, Dantas Neto et al. (2016) registraram pela primeira vez a presença de *P. chesapeaki* infectando a ostra *C. rhizophorae*, porém apresentando baixa prevalência (2,6%) em ambas as

estações seca e chuvosa. Esta também foi a primeira detecção desta espécie infectando bivalves na América do Sul.

Um estudo pioneiro realizado no Estado da Bahia (BA) utilizou técnica não convencional de diagnóstico de *Perkinsus* sp. por meio de análise proteômica para detectar *P. marinus* em *C. rhizophorae* de bancos naturais do estuário de Porto do Campo na Baía de Camamu. Os resultados confirmaram a presença de concentrações de beta-tubulina homologa ao *P. marinus* (PINTO et al., 2017). A identificação provavelmente só foi possível porque *pools* de ostras foram usados na análise proteômica aumentando as possibilidades de concentrações proteicas na amostra. Em estudo realizado por Luz e Boehs (2016) nos mesmos locais, *P. marinus* não foi detectado pelas técnicas de diagnóstico oficiais (WOAH, 2021). A detecção de *P. marinus* por proteômica mostrou-se, nesse caso, mais sensível do que as ferramentas moleculares convencionalmente utilizadas, indicando que talvez esse patógeno esteja presente em baixa prevalência ou baixas intensidades. Este é o primeiro registro de *P. marinus* na BA. Outra espécie de *Perkinsus* sp. também foi detectada na Baía de Camamu, desta vez por PCR e sequenciamento de DNA, trata-se do *P. beihaiensis* que infectava ostras *C. rhizophorae* e *C. gasar* com maior prevalência em *C. rhizophorae* que provavelmente foi influenciada pela salinidade, com a qual houve correlação positiva (LUZ et al., 2018).

Com o objetivo de avaliar o impacto da perkinsose nas características produtivas de ostras *Crassostrea* spp. cultivadas no Brasil, bem como a suscetibilidade de duas espécies nativas, Scardua et al. (2017) confirmou a presença de *P. marinus* e identificou também infecção de *C. rhizophorae* e *C. gasar* por *P. beihaiensis* no estuário do Rio São Francisco, SE. A perkinsose não causou mortalidade em nenhum estágio de crescimento das ostras, porém a *C. gasar* teve melhor desempenho sugerindo que, mesmo sob infecção prematura e acometida da enfermidade, a ostreicultura no nordeste do Brasil é viável e pode ser lucrativa com o uso de espécies nativas. Neste estudo também foi possível observar co-infecção por *P. marinus* e *P. beihaiensis* tanto em *C. rhizophore* quanto em *C. gasar*.

Os primeiros relatos da ocorrência de *Perkinsus* sp. na região sul do Brasil surgiram no estado de Santa Catarina a partir de estudos iniciais de avaliação da perkinsose com amostras de ostras adultas coletadas em oito locais no estado de Santa Catarina (SC) entre 2013 e 2014. O sequenciamento de todos os produtos amplificados a partir de amostras de DNA de *Crassostrea gigas* e *C. gasar* de São Francisco do Sul mostraram sequências idênticas (100% de similaridade) quando comparados entre si e com sequências de *P. marinus* encontradas na PB (QUEIROGA et al., 2015) e no México (ESCOBEDO-FREGOSO et al., 2015). Além disso, sequências identificadas como *P. beihaiensis* em *C. gasar* de Balneário Barra do Sul mostrou

100% de semelhança entre si e com sequências depositadas no GenBank (LUZ CUNHA et al., 2019). Este é o primeiro registro de *P. marinus* infectando *C. gigas* na América do Sul. Além disso, este é o primeiro relato de *P. beihaiensis* no Estado de Santa Catarina infectando *C. gasar*.

Ainda em Santa Catarina, notificações de suspeita de mortalidades de aproximadamente 10% em populações de ostras *Crassostrea* sp., selvagens e cultivadas na região das Laranjeiras, São Francisco do Sul, que não apresentavam sinais clínicos evidentes foram feitas a Companhia Integrada de Desenvolvimento Agrícola - CIDASC. Amostras desses indivíduos juntamente com amostras de *C. gigas* jovens e adultas de cultivo foram coletadas entre 2015 e 2016 e enviadas ao AQUACEN, Laboratório Oficial Central da Rede Nacional de Laboratórios Oficiais do Ministério da Agricultura (RENAQUA). Todas as ostras nativas *Crassostrea* sp. e *C. gigas* adultas confirmaram a identidade de *P. marinus* com 99 - 100% de similaridade (LEIBOWITZ et al., 2019). Tal notificação foi o primeiro caso confirmado oficialmente pelo MAPA de um protozoário de notificação obrigatória em ostras no Estado de Santa Catarina.

2.3. Ciclo de vida do *Perkinsus* sp.

Protozoários do gênero *Perkinsus* são parasitas endobióticos, sem hospedeiros intermediários, com ciclo de vida direto (monoxeno) que consiste em quatro estágios diferentes ocorrendo dentro e fora do hospedeiro, com exceção de *P. qugwadi* onde todos os estágios podem ser observados nos tecidos do hospedeiro (BLACKBOURN et al., 1998), e caracterizados por uma etapa móvel de vida livre e uma etapa imóvel vegetativa (JOSEPH et al., 2010; SOUDANT et al., 2013). Os quatro estágios são definidos em trofozoíto, hipnósporo, zoosporângio e zoósporo. Todos os estágios do ciclo de vida são considerados infecciosos e podem induzir novas infecções em hospedeiros saudáveis (ITOIZ et al., 2022; WOAHA, 2022).

O estágio mais abundante em um animal infectado é o trofozoíto que pode circular e proliferar vegetativamente nos tecidos conjuntivo e epitelial, extracelularmente e na superfície de reto, brânquia e manto sendo considerado o principal agente de transmissão da doença (VOLETY; CHU, 1994; CHU; HALE, 1994; PERKINS, 1996; SOUDANT et al., 2013; ROBLEDÓ et al., 2018). O trofozoíto é caracterizado morfológicamente por uma célula de estrutura esférica com um vacúolo ligeiramente excêntrico ocupando a maior parte do volume celular e um núcleo periférico, tendo assim aparência de “anel de sinete” e apresentando tamanhos variados entre as espécies (Figura 1) (VILLALBA et al., 2004).

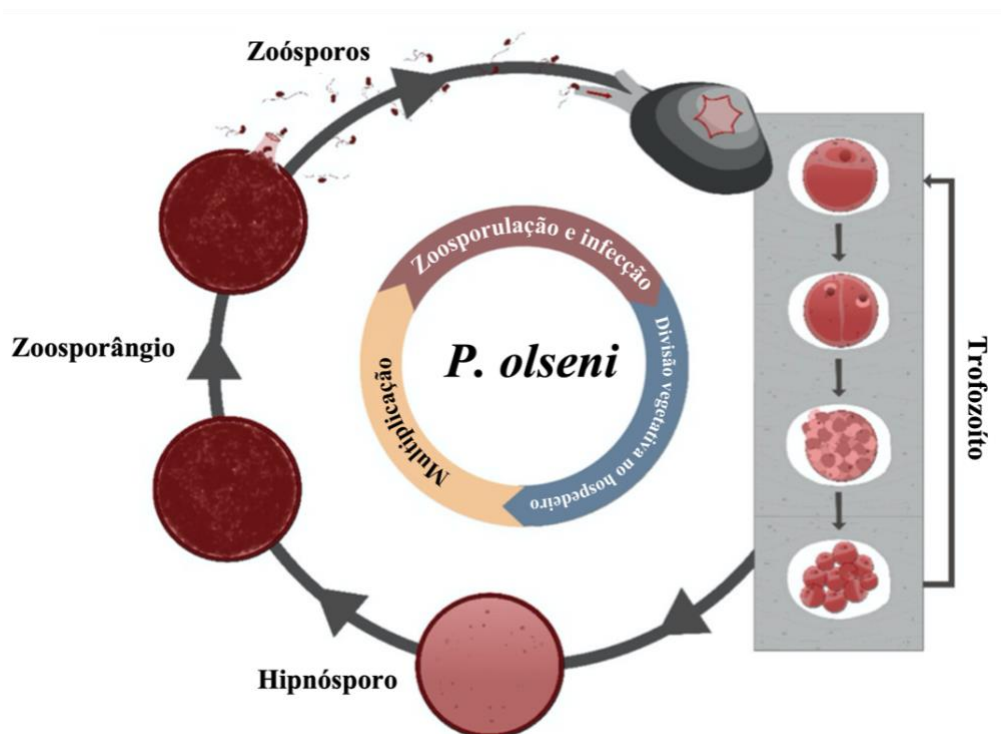


Figura 1. Ciclo de vida do *Perkinsus olseni*. Fonte: Adaptado de Itoiz et al. (2022).

No hospedeiro, o *Perkinsus* sp. permanece viável e prolifera por multiplicação vegetativa passando por sucessivas bipartições num processo de esquizogonia com ciclos de cariocinese seguidos de cintocinese que resultam na produção de várias células filhas permanecendo juntas num arranjo de “forma de roseta” no interior do protozoário (VILLALBA et al., 2004; CHOI; PARK, 2010; GLEASON et al., 2017). Após a produção de células-filhas a parede celular sofre uma ruptura e os trofozoítos imaturos são liberados no interior dos tecidos ou no lúmen do sistema vascular onde crescem gradualmente tornando-se células vegetativas maduras (PERKINS, 1996; BOWER, 2013; ITOIZ et al., 2022). Os trofozoítos são liberados na água pelo hospedeiro vivo após diapedese de fagossomos que migram através dos tecidos ao trato digestivo e se rompem liberando trofozoítos viáveis que em seguida são incorporados às fezes e excretados pelo reto (BUSHEK et al. 1997; SCANLON et al. 1997; BUSHEK et al. 2002). As pseudofezes também são consideradas veículos de transmissão de trofozoítos na coluna d’água por moluscos vivos. Agregados marinhos compostos de materiais rejeitados durante o processo de filtração das brânquias antes de atingir a boca do animal são comumente encontrados nos órgãos paliais (cavidade palial) (RALPH et al., 2008) e na área de descarga de pseudofezes do manto (WINNICKI et al., 2008; ALLAM et al., 2013) podendo conter trofozoítos viáveis que se multiplicam e liberam suas células-filhas no ambiente marinho (BOWER, 2013).

Segundo Villalba et al. (2004), hospedeiros vivos infectados são uma fonte contínua de transmissão de trofozoítos, porém mecanismos de disseminação independentes permitem a continuidade do ciclo de vida do *Perkinsus* sp e sua liberação no ambiente mesmo após a morte do hospedeiro. Quando o hospedeiro se torna moribundo ou morre, o parasita aumenta de tamanho e desenvolve uma parede celular espessa tornando-se hipnósporo (VALIULIS; MACKIN, 1969; PERKINS, 1996), em seguida é liberado na água a partir dos tecidos infectados em decomposição (BUSHEK et al. 2002). Segundo Choi e Park (2010), uma vez colocados em uma condição anaeróbia, hipóxia ou necrose tecidual, o trofozoíto desenvolve a forma de hipnósporo, estágio precursor do zoosporângio também chamado de prezoosporângio (PERKINS, 1996). Essa condição foi observada inicialmente por Ray (1952) ao detectar trofozoítos esféricos aumentados e com paredes espessas durante incubação de tecidos infectados por *P. marinus* em meio fluido de tioglicolato, que se acredita mimetizar as condições de um hospedeiro moribundo (PERKINS, 1976). A obtenção de hipnósporos (prezoosporângios) durante a incubação em RFTM também foi observado em todos os outros *Perkinsus* spp. exceto para *P. qugwadi* (BLACKBOURN et al. 1998).

Após serem liberados em água do mar ou estuarina sob condições favoráveis de temperatura e salinidade (AUZOUX-BORDENAVE et al., 1996), os hipnósporos assumem o estágio de zoosporângio e iniciam bipartições sucessivas de núcleo e citoplasma formando centenas de zoósporos elipsoidais biflagelados no interior do protozoário (CHU; GREENE, 1989). No início da multiplicação vegetativa um dos microporos associados à superfície celular, eventualmente dois, forma um tubo de descarga por onde serão liberados os zoósporos. Os hipnósporos podem sobreviver por muito tempo sob condições ambientais adversas que impedem a zoosporulação, porém quando as condições se tornam favoráveis, esses hipnósporos podem sofrer bipartições e liberar os zoósporos (CHU; GREENE 1989) sugerindo que o hipnósporo pode ser um estágio dormente no ciclo de vida de *Perkinsus* spp., que lhe permite suportar condições desfavoráveis (CASAS et al. 2002a). Após a esporulação inicia-se o único estágio de vida livre e o zoósporo na coluna d'água pode ser ingerido pelo bivalve no processo de filtração alimentar perdendo seus flagelos e se tornando trofozoítos ou pode evoluir para trofozoíto no ambiente e penetrar num novo hospedeiro por ingestão ou por ação dos hemócitos na superfície dos órgãos paliais (GLEASON et al., 2017; ITOIZ et al., 2022).

2.4. Mecanismos de Infecção

O processo de infecção ocorre mediante interações agente-hospedeiro que permitem a entrada do *Perkinsus* sp. a partir da cavidade palial e a sua transmigração no interior dos tecidos. Durante a alimentação por filtração formas infectantes do patógeno presente na coluna d'água são direcionadas junto com o alimento através das brânquias e palpos labiais em direção a boca onde são ingeridas (BOWER, 2013). Outra forma de introdução do agente no hospedeiro pode estar ligada a transmigração de trofozoítos localizados na superfície dos órgãos paliais (Figura 2A). Os moluscos bivalves têm um sistema circulatório aberto e possuem um sistema imunológico inato composto por fatores humorais e mecanismos mediados por células. Os fatores humorais incluem lectinas (aglutininas, opsoninas), enzimas lisossômicas (fosfatase ácida, lisozima e várias enzimas hidrolíticas), peptídeos antimicrobianos e inibidores de protease (CHENG, 1996; CHU, 2000; BACHÈRE, 2003).

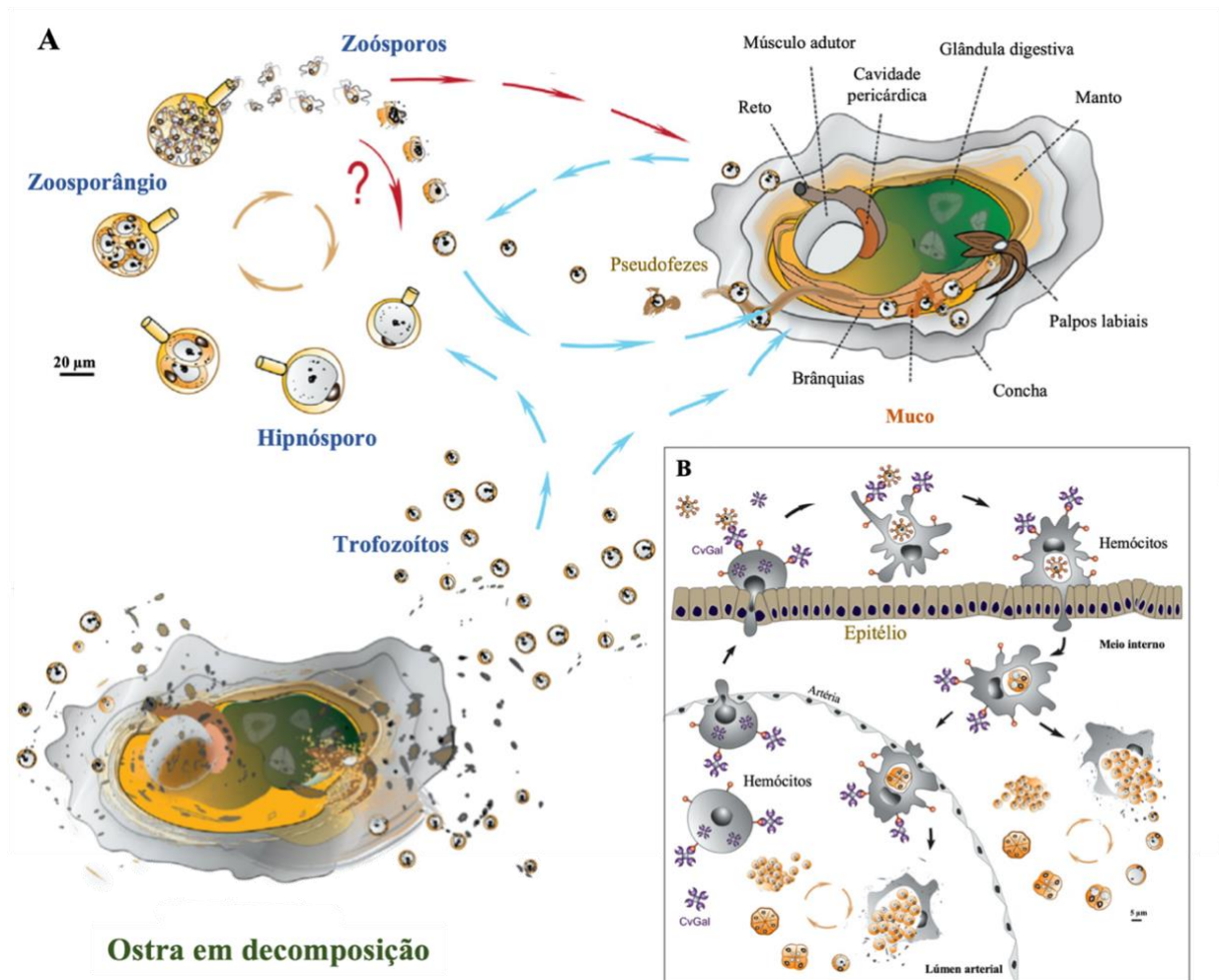


Figura 2. Mecanismos de transmissão e infecção do hospedeiros. (A) Processo de transmissão no meio externo (coluna d'água); (B) Captura do patógeno na cavidade palial ou trato digestivo e transmigração para o interior do hospedeiro. Fonte: Adaptado de Robledo et al. (2011, 2018).

Os mecanismos de defesa mediados por células são realizados principalmente pelos hemócitos, que se movem livremente entre todos os tecidos. Os hemócitos são considerados os efetores celulares primários devido à sua capacidade de ingerir ou encapsular e depois destruir microrganismos (SOUDANT et al., 2013). A fagocitose é a principal resposta de defesa realizada pelos hemócitos, que também representa o melhor parâmetro imunológico para avaliar o estado de saúde dos bivalves (SONG et al. 2010). A presença de hemócitos associados ao muco que reveste o manto, brânquias e parede corporal tem sido implicada na patogênese de *P. marinus* (LAU et al., 2018). Pales Espinosa et al. (2013) sugeriram que o muco do manto de *Crassostrea virginica* aumenta a proliferação e a infectividade deste parasita. Uma vez na cavidade palial ou no trato digestivo, trofozoítos exibindo ligantes de galectinas (lectinas) presentes na superfície dos hemócitos fagocitários são internalizados formando o fagossomo (Figura 2B) (JOSETH et al., 2010). Segundo Pales Espinosa et al. (2014), quando o trofozoíto atinge a cavidade palial ele já expressa ativamente genes de virulência putativos em resposta ao contato com muco. De fato, foi demonstrado que a galectina de *C. virginica* (CvGal1) medeia a entrada nos hemócitos (TASUMI; VASTA, 2007; VASTA et al., 2015). Após ser reconhecido e fagocitado, o *Perkinus* sp. transmigra para o meio interno e para o sistema vascular residindo dentro dos fagossomos onde permanecem viáveis e se multiplicam formando os esquizontes (BOWER, 2013). A translocação por todo o corpo do hospedeiro via sistema circulatório pode ocorrer até 12 dias após a exposição ao patógeno (WANG et al., 2018) e, de acordo com Chu e Lund (2006), *P. marinus* não sobrevive mais de três dias na água fora do hospedeiro.

Vários mecanismos líticos intracelulares são acionados após a internalização do patógeno, incluindo enzimas lisossômicas hidrolíticas, peptídeos antimicrobianos e espécies reativas de oxigênio (ERO) e nitrogênio (ERN) (SONG et al. 2010; FANG, 2004; SCHMITT et al. 2012; QUEIROGA et al. 2013). Entretanto, os trofozoítos de *P. marinus* fagocitados podem escapar da morte oxidativa pela expressão de enzimas antioxidantes e permanecem viáveis anulando a explosão respiratória do hospedeiro (Figura 3) (VOLETY;CHU, 1995; ANDERSON, 1999; VASTA; WANG, 2020). Desta forma, os trofozoítos conseguem promover sua proliferação vegetativa por bipartições sucessivas produzindo células-filhas no interior dos hemócitos circulantes infectados que migram através dos tecidos do hospedeiro, lisam o fagossomo e liberam trofozoítos maduros, levando à infecção sistêmica e, eventualmente, à morte do hospedeiro (JOSETH et al., 2010).

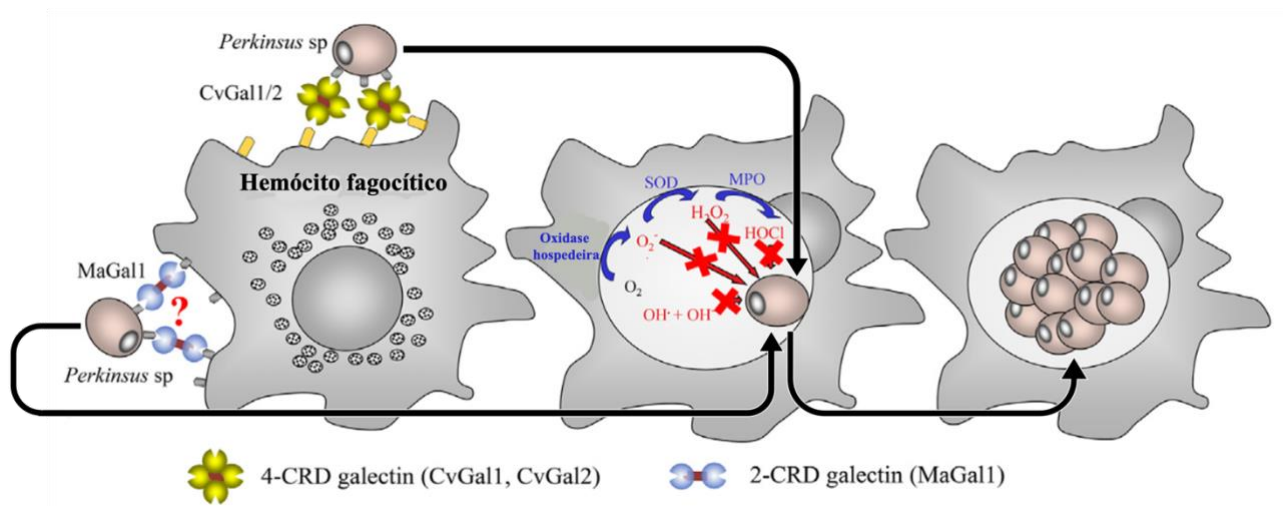


Figura 3. Interação trofozoíto-hemócito e sobrevivência no interior do fagossomo. Fonte: Adaptado de Vasta e Wang (2020).

2.5. Influência de fatores abióticos na infecção por *Perkinsus* sp.

Fatores ambientais como temperatura e salinidade são conhecidos por afetar o estado imunológico dos bivalves e, assim, influenciar a dinâmica das infecções por *Perkinsus* sp. (VILLALBA et al., 2004). Segundo Nam et al. (2018), o estresse fisiológico (térmico) acelera o desenvolvimento de *P. olseni* ao suprimir as respostas imunes em berbigões de Manila, levando à mortalidade. No caso da salinidade, ela tem sido consistentemente identificada como um importante fator de distribuição e dinâmica de *P. marinus* (MACKIN, 1951; RAY, 1954; SONIAT et al., 2005) onde a prevalência e a intensidade de infecções por *P. marinus* no ambiente natural aumentaram com o aumento da salinidade. Porém, em climas tropicais, a interação entre a prevalência de *P. marinus* e a salinidade podem parecer ser diferentes (GULLIAN-KLANIAN et al., 2008). As interações entre um hospedeiro e seus patógenos dependem tanto da eficiência da defesa do hospedeiro (sistema imunológico ou estratégias) quanto dos mecanismos utilizados pelos parasitas para contornar esses sistemas de defesa para estabelecer a infecção (RÅBERG et al., 2014). De fato, estressores ambientais modificam o sistema imunológico do hospedeiro, o que aumenta sua vulnerabilidade ao parasitismo (GOEDKEN et al., 2005; MORLEY, 2010; ITOIZ et al., 2022).

Alguns autores enfatizam que, embora importantes, a temperatura e a salinidade não explicam a maioria dos níveis de infecção observados no campo, sugerindo que a qualidade da água pode também influenciar a prevalência de *P. marinus* (SONIAT 1985, CRAIG et al. 1989). Mudanças sazonais anuais, como os períodos chuvoso e seco, também possuem um

efeito mensurável na prevalência e gravidade da doença em ostras orientais selvagens e cultivadas, aumentando o número de agentes infecciosos e diminuindo a eficácia potencial do sistema imunológico inato da ostra. (FORD; SMOLOWITZ, 2007; SMOLOWITZ, 2013).

2.6. Impactos da infecção por *Perkinsus* sp.

A produção de fatores proteolíticos liberados após a infecção leva a lise tecidual deixando os tecidos “liquefeitos” e bloqueia alguns mecanismos de defesa do hospedeiro. Como consequência observa-se glândula digestiva com “aspecto pálido”, redução do índice corpóreo, severa emaciação, abertura involuntária das valvas (gaping), retração do manto, inibição do desenvolvimento gonádico, crescimento retardado, destruição do epitélio do tubo digestório e mortalidade (Figura 4A) (BOWER et al. 1994, VILLALBA et al. 2004).

De acordo com Smolowitz (2013), hospedeiros altamente infectados por *P. marinus* podem apresentar degenerações como tecidos moles visivelmente aquosos e finos, semelhantes a outras enfermidades, sendo muito difícil diferenciá-los dos animais não infectados, porém outras espécies de *Perkinsus* sp. podem provocar reações de encapsulamento multifocal (semelhante a granuloma) nos tecidos que podem ser identificadas tanto visualmente (nódulos) como microscopicamente (Figura 4).

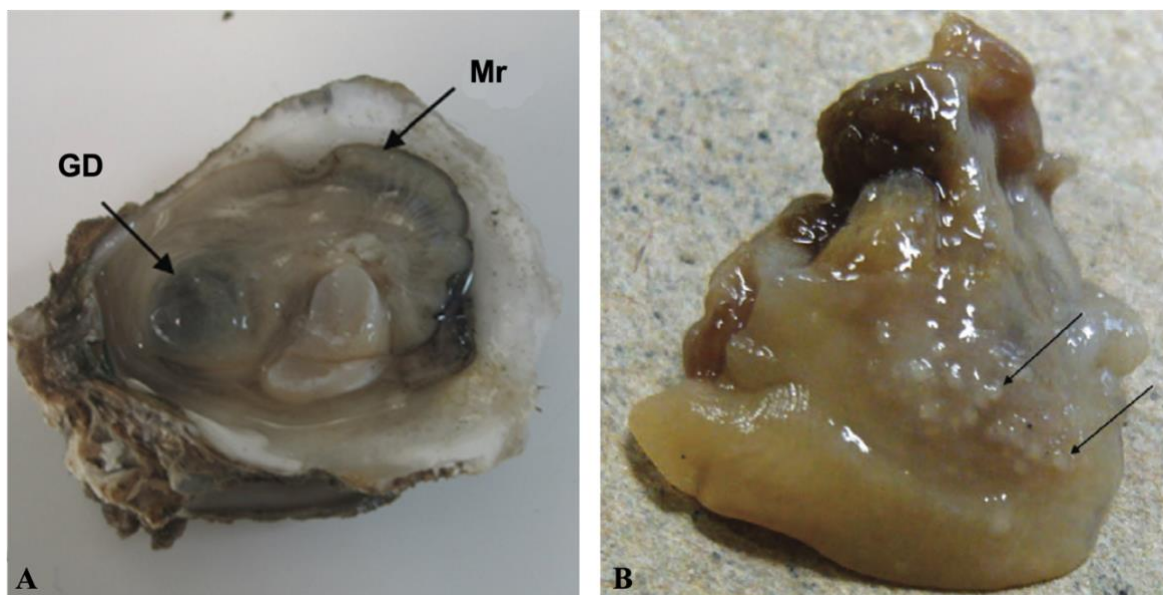


Figura 4. Perkinsiose em moluscos. (A) Ostra infectada por *P. marinus* com tecido conjuntivo translúcido, glândula difestiva (GD) escurecida e manto retraído (Mr) (Fonte: CÁRCEREZ-MARTÍNEZ et al., 2008); (B) Berbigão altamente infectando por *P. olseni* exibindo nódulos brancos (setas) no manto e parede do corpo mole (Fonte: PRETTO et al., 2018).

A encapsulação de células do parasita é frequentemente observada em cortes histológicos de moluscos infectados por *P. olsenii* (Figura 4B) (CHAGOT et al., 1987; NAVAS et al., 1992; MONTES et al., 1995; SAGRISTÁ et al., 1995; MONTES et al., 1996; ORDÁS et al., 2001; PARK; CHOI, 2001; CASAS, 2002; CHOI et al., 2002). Cheng e Rifkin (1970) propuseram que o encapsulamento de hemócitos representa uma tentativa abortada de fagocitose quando o alvo é muito grande para ser fagocitado. De fato, a observação de fagocitose de *P. olsenii* por hemócitos de berbigões em cortes histológicos é muito menos frequente do que na ostra oriental infectada por *P. marinus* (CASAS, 2002).

Estágios avançados de infecção no tecido branquial tendem a reduzir potencialmente a capacidade de filtração e eficiência para a obtenção de nutrientes o que culmina no comprometimento de seu crescimento e sobrevivência (CHOI; PARK, 2010), neste caso, o processo de conversão de energia primária em proteína animal não é satisfatório e causa prejuízos econômicos ao setor produtivo. De modo similar, é observada uma redução significativa no tecido gonadal severamente infectado (DITTMAN et al. 2001), comprometendo, assim, a maturação gonadal do animal e restringindo consistentemente seu desempenho reprodutivo (CHOI et al. 1993). Efeitos negativos na fecundidade do hospedeiro podem resultar em menor recrutamento e escassez de sementes para fins de crescimento. Este conjunto de alterações metabólicas leva ao enfraquecimento da ostra tornando-a um alvo fácil para o estabelecimento de infecções oportunistas, ataque de predadores e dificulta sua capacidade de superar quaisquer outras condições adversas encontradas no ambiente (VILLALBA et al. 2004).

2.7. Diagnóstico para *Perkinsus* sp.

Desde a década de 50 vários métodos de diagnóstico foram desenvolvidos para identificar a ocorrência de *Perkinsus* sp. infectando espécies hospedeiras e a presença de formas infectantes livres no ambiente. O diagnóstico pode ser clínico, laboratorial ou uma combinação de ambos. Alguns ensaios são considerados apenas testes presuntivos e pré-requisitos para aplicação de protocolos de diagnósticos confirmatórios. Para as espécies de notificação obrigatória, protocolos de diagnósticos oficiais são recomendados aos órgãos de Defesa Sanitária Animal para as ações de vigilância epidemiológica e casos de suspeita de emergência sanitária. Esses métodos estão indicados abaixo sob as seguintes classificações: a = Recomendado por conta da disponibilidade, utilidade, especificidade e sensibilidade diagnóstica; b = Padrão, com boa especificidade e sensibilidade; c = Aplicação limitada pelo

custo, precisão ou outro fator; d = Não recomendado para esta finalidade (Tabela 3) (WOAH, 2021).

Tabela 3. Métodos para vigilância e diagnóstico de *P. marinus* e *P. olsenii* recomendados pela WOAH (2021).

Método			Vigilância			Diagnóstico	
			Semente	Juvenil	Adulto	Presuntivo	Confirmatório
Clínico	Macroscópico	Sintomatologia	d	d	d	d	d
Detecção e identificação do agente	Microscópico	Esfregaço de hemolinfa	d	c	c	c	d
		Histopatologia ²	b	b	b	b	d
		RFTM – Tecido*	d	a	a	b	d
		RFTM – Corpo inteiro*	d	c	c	c	d
	Molecular	PCR	a	b	b	a ¹	b ¹
		Hibridização <i>in-situ</i>	d	b	b	b	a
		Sequenciamento	d	d	d	d	b ¹

RFTM = Meio Fluido de tioglicolato de Ray; PCR = Reação em Cadeia de Polimerase.

*Não é espécie-específica, mas pode ser usada de forma confiável em hospedeiros/áreas onde apenas uma espécie de *Perkinsus* sp. está presente ou predominante; ¹Deve ser usado somente em infecções visualizadas por esfregaço, RFTM ou histologia; ²Também considerado método clínico.

A avaliação dos sinais clínicos e das mudanças comportamentais nos hospedeiros podem ser consideradas como métodos de diagnóstico de campo, porém essas alterações não são características exclusivas da Perkinsiose. As infecções por *P. marinus* e *P. olsenii* são diagnosticadas oficialmente através de métodos de detecção direta por microscopia (esfregaço, histologia e incubação em meio de cultura) e isolamento (biologia molecular), porém não é aplicável o diagnóstico indireto via sorologia. Dentre as técnicas microscópicas oficiais, os esfregaços de hemolinfa são recomendados apenas para infecções avançadas e possui especificidade baixa e sensibilidade desconhecida. O diagnóstico histopatológico através da fixação parte do corpo mole do hospedeiro contendo tecidos do manto, brânquias e glândulas digestivas coradas em hematoxilina e eosina (HE) possui mínima especificidade e a sensibilidade varia de acordo com a intensidade da infecção. Um fator importante da histologia é a possibilidade de detectar a presença e o grau de lesões teciduais. Os cortes podem revelar lise de estruturas teciduais, infiltração hemocítica e grandes lesões multifocais no epitélio intestinal ou no tecido conjuntivo de qualquer órgão que contenha células de *P. marinus* (MACKIN, 1951). Em ambas as técnicas é possível identificar trofozoitos com grande vacúolo e núcleo excêntrico ou em sua forma de esquizonte podendo estar livre ou fagocitado.

A incubação de tecidos do hospedeiro em meio fluido de tioglicolato de Ray (RFTM) (RAY, 1954) é o diagnóstico presuntivo considerado padrão ouro dentre os métodos microscópicos de detecção direta, mais sensível que a histologia e o esfregaço, é uma técnica simples e barata, entretanto não permite a discriminação da espécie (WOAH, 2021). Os trofozoitos de *Perkinsus* sp. presente nos tecidos (reto, brânquias e manto) do hospedeiro

aumentam quando cultivados num ambiente escurecido com temperatura ambiente por até 7 dias em RFTM adicionado de antibióticos (penicilina, estreptomicina) e antifúngico (nistatina) entrando na fase de Hipnósporos. Após corados com Lugol 2% é possível visualizar hipnósporos de forma esférica e coloração preto-azulada através de microscopia ótica (VILLALBA et al., 2004).

A técnica microscópica auxiliar de zoosporulação *in vitro* para estudo morfológico, apesar de não ser recomendada oficialmente, foi bastante utilizada para fundamentar a inclusão taxonômica de protozoários dentro do gênero, identificar de novas espécies e continua auxiliando novas pesquisas de detecção desses agentes através da visualização dos estágios de vida do patógeno por microscópio ótico ou eletrônico (CASAS et al., 2002b; DUNGAN; REECE, 2006; SABRY et al., 2009; CHOI; PARK, 2010; DUNGAN; BUSHEK, 2015; SHAMAL et al., 2018; MAEDA et al., 2022)

Todos os ensaios acima descritos possuem níveis de validação adequados para o diagnóstico de triagem de *Perkinsus* sp. pois identificam as características morfológicas comum a todos os exemplares deste gênero, exceto *P. qugwadi* (BLACKBOURN et al., 1998) que não é detectado na incubação em RFTM. Um resultado positivo é evidência presuntiva de infecção por protozoários do gênero *Perkinsus* mas deve ser confirmado por métodos diagnósticos de identificação e isolamento do agente. Ensaios moleculares de reação em cadeia de polimerase (PCR) utilizando DNA do patógeno extraído de fragmentos de manto e brânquias de moluscos são recomendados para confirmar o diagnóstico presuntivo utilizando primers gênero-específicos que visam a região ITS do complexo do gene rRNA e amplificam fragmentos de DNA de *Perkinsus* sp. (CASAS et al., 2002a) que em seguida são sequenciados e alinhados com sequências ITS registradas em banco público de dados genômicos para confirmar a espécie de notificação obrigatória. Ensaios de PCR utilizando primers espécie-específicos para *P. marinus* (AUDEMARD et al., 2004) e *P. olseni* (MOSS et al., 2006) também são considerados diagnósticos oficiais sem a necessidade do sequenciamento (WOAH, 2021). As técnicas de biologia molecular associadas à clonagem e sequenciamento permitem a realização de análises filogenéticas que são uma parte padrão da análise exploratória de sequências de DNA e proteínas, sendo capazes de identificar o parasita e rastrear o caminho evolutivo e epidemiológico de agentes etiológicos da Perkinsiose (DA SILVA et al. 2014; LUZ; BOEHS 2016).

Ensaios de hibridação *in situ* (ISH) para a detecção de *Perkinsus* sp. em cortes histológicos também já foram descritos (MOSS et al., 2008; DA SILVA et al., 2014; RAMILO et al., 2015). Tal procedimento permite que sequências de ácidos nucleicos sejam examinadas

no interior de células oferecendo informações sobre a distribuição espacial dos micro-organismos no tecido ou sua associação com a lesão sem alterar sua morfologia ou a integridade de seus compartimentos. Com isso, há a combinação da precisão da genética molecular com a informação visual do microscópio ótico (MOTER; GOBEL, 2000; AMANN; FUCHS, 2008; NEVES; GUEDES, 2012). Essa técnica é recomendada oficialmente usando sondas de DNA específicas que tem como alvo o gene da subunidade pequena (SSU) do rRNA para o gênero *Perkinsus* (ELSTON et al., 2004) e o gene da subunidade grande (LSU) do rRNA de *P. marinus* e *P. olsenii* (MOSS et al. 2006).

Diversas técnicas de biologia molecular foram empregadas no mundo inteiro durante registros de novos casos de Perkinsiose e na detecção de espécies em hospedeiros ou regiões costeiras sem histórico anterior de ocorrência de *Perkinsus* sp. No Brasil, ensaios de PCR utilizando primers de gene de actina identificaram de *P. marinus* infectando ostras *C. gasar* (DA SILVA et al., 2014). Outra PCR baseada na eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE), foi aplicado pela primeira vez por Ramilo et al. (2016) confirmando a ocorrência de *P. olsenii* em berbigões *Ruditapes decussatus*, *R. philippinarum*, *Venerupis corrugata* e *P. chesapeaki*, o primeiro caso desse protozoário na Galícia, Espanha. A PCR-DGGE é uma técnica molecular usada para separar fragmentos de DNA do mesmo comprimento, mas com sequências de pares de bases diferentes. Possui alta especificidade detectando até variações de uma única base de DNA (FISHER; LERMAN, 1983; LERMAN; BELDJORD, 1999). Uma técnica que foi bastante utilizada em estudos na costa brasileira é a análise de polimorfismo de fragmento de restrição por PCR (PCR-RFLP) detectando a ocorrência de *Perkinsus* sp. (SABRY et al., 2009), *P. marinus* (DA SILVA et al., 2013; DA SILVA et al., 2014; QUEIROGA et al., 2015; SCARDUA et al., 2017) *P. olsenii* (DA SILVA et al., 2014) e *P. beihaiensis* (PINHO FERREIRA et al., 2015; SCARDUA et al., 2017). A PCR-RFPL identifica polimorfismos (diferenças genéticas) intra e interespecies em fragmentos de DNA amplificados pela PCR e digeridos pelas enzimas endonucleases de restrição (PAVAN; MONTEIRO, 2014).

Atualmente, a PCR em tempo real (qPCR) tem se sido uma importante ferramenta para o monitoramento de *Perkinsus* sp. (UMEDA; YOSHINAGA, 2012; CUI et al., 2018) sendo inclusive utilizada para investigações de co-infecção envolvendo outras espécies de notificação obrigatória por meio de qPCR-duplex (ITOÏZ et al., 2021). A qPCR apresenta uma maior sensibilidade para avaliar prevalência e intensidade de infecções, rapidez na realização dos ensaios, capacidade de identificação e distinção das espécies e viabilidade de utilização de amostras previamente armazenadas (GAUTHIER et al., 2006; FAVERI et al., 2009). Segundo

Ríos et al. (2020), a qPCR pode permitir o diagnóstico não invasivo de *Perkinsus* sp. através da hemolinfa sem sacrificar o animal. Audemard et al. (2004) já haviam demonstrado que a qPCR também poderia ser uma ferramenta poderosa para investigar a abundância de estágios livres de *P. marinus* no ambiente permitindo a detecção de células infecciosas e não infecciosas, vivas ou mortas, na coluna de água quando os parâmetros do ensaio são otimizados utilizando kits de extração de DNA para amostras de fezes. Ríos-Castro et al. (2022) também detectaram *P. olseni* em amostras de água e sedimentos utilizando a tecnologia de metabarcoding 18S rRNA que permite o estudo da diversidade protista no ambiente marinho, identificação taxonômica e descoberta de linhagens desconhecidas (AMARAL-ZETTLER et al., 2009; BRÅTE et al., 2010; DE VARGAS et al., 2015) usando DNA ambiental (eDNA) previamente amplificado por PCR e sequenciado em uma plataforma de alto rendimento (DEINER et al., 2017).

Recentemente, um estudo realizado no Brasil trouxe a abordagem proteômica como ferramenta molecular para analisar expressões proteicas de *P. marinus* em diferentes tecidos de ostras nativas *C. rhizophorae* demonstrando uma maior sensibilidade quando comparado a resultados anteriores obtidos com PCR convencional (PINTO et al. 2017).

3. JUSTIFICATIVAS

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 malacocultura, intensa 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. Atualmente, o maior impedimento à criação de ostras é a ocorrência de parasitas e doenças que dificultam o crescimento e a reprodução de organismos cultivados e causam, em alguns casos, eventos de mortalidade. Áreas de cultivo de ostras têm convivido com ciclos de crescimento e perdas causadas por doenças, predadores ou outros riscos naturais.

Ao longo dos anos, o Estado do Rio Grande do Norte vem se destacando na produção de ostras adultas e sementes. Além das comunidades ribeirinhas que promovem um extrativismo de subsistência, associação de produtores e empresários autônomos estão aumentando a produção em cultivo e já comercializam sua matéria-prima para o consumo nos restaurantes locais e fora do Estado. De acordo com a APROOSTRAS, a produção em 2019 ficou entre 70 e 75 mil ostras que foram comercializadas principalmente no Rio Grande do Norte e no Pernambuco.

Diante do exposto, se faz necessário investigar a condição sanitária desses animais, principalmente quanto a ocorrência de protozoários de notificação obrigatória que podem causar riscos de mortalidade em massa e embargos sanitários ao setor produtivo. Estudos nesse sentido trarão subsídios que podem colaborar com o controle sanitário, a manutenção e o crescimento da produção no Estado evitando perdas econômicas ao setor produtivo e as comunidades que dependem do extrativismo para sobrevivência. A identificação de espécies nunca registradas no RN irá colaborar para entender melhor o processo de dispersão desses patógenos ao longo da costa brasileira e no mundo. Compreender a dinâmica e a relação de possíveis fatores abióticos na ocorrência e intensidade das infecções em ostras nativas dos estuários do RN será importante para aprofundar ainda mais os conhecimentos sobre a epizootiologia do *Perkinsus* sp.

4. HIPÓTESES CIENTÍFICAS

4.1 – Protozoários do gênero *Perkinsus* sp. parasitam as ostras nativas *Crassostrea* sp. de bancos naturais nos estuários do Rio Grande do Norte, Brasil;

4.2 – As espécies *P. marinus* e *P. olseni* de notificação obrigatória à WOAHL estão infectando a ostra do mangue *Crassostrea* sp. do estuário potiguar;

4.3 – A enfermidade Perkinsiose não está causando mortalidade nas ostras nativas do estuário potiguar;

4.4 – Ostras de mangue *Crassostrea* sp. atuam como reservatório de agentes patógenos de notificação obrigatória e de importância para a aquicultura no Estado do Rio Grande do Norte.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo geral

Investigar a ocorrência de *Perkinsus* sp. em populações de ostras nativas *Crassostrea* sp. em dois estuários do Estado do Rio Grande do Norte, Brasil.

5.2 Objetivos específicos

5.2.1 – Determinar a prevalência e intensidade da infecção de *Perkinsus* sp. nas ostras dos estuários do Rio Grande do Norte;

5.2.2 – Estudar a dinâmica das infecções e os possíveis impactos causados nas populações nativas da ostra *Crassostrea* sp. nos estuários estudados;

5.2.3 – Avaliar os efeitos da salinidade e temperatura da água sobre a ocorrência de *Perkinsus* sp. nas ostras analisadas.

5.2.4 – Estudar a similaridade dos genes ITS identificados com os demais já registrados no Brasil e no mundo.

6. 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. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2006.04.001>.
- ALLAM, B.; CARDEN, W. E.; WARD, J. E.; RALPH, G.; WINNICKI, S.; ESPINOSA, E. P. Early host-pathogen interactions in marine bivalves: Evidence that the alveolate parasite *Perkinsus marinus* infects through the oyster mantle during rejection of pseudofeces. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 113, p. 26-34, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2012.12.011>.
- AMANN, R.; FUCHS, B. M. Single-cell identification by improved FISH. **Nature Reviews Microbiology**, v. 6, p. 339-348, 2008. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1888>.
- AMARAL-ZETTLER, L. A.; MCCLIMENT, E. A.; DUCKLOW, H. W.; HUSE, S. M. 2009. A method for studying protistan diversity using massively parallel sequencing of V9 hypervariable regions of small-subunit ribosomal RNA genes. **PLoS One**, v. 4, p. e6372, 2009. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006372>.
- ANDERSON, R. S. *Perkinsus marinus* secretory products modulate superoxide anion production by oyster (*Crassostrea virginica*) haemocytes. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 9, p. 51-60, 1999. <https://doi.org/10.1006/fsim.1998.0174>.
- ANDREWS J. D. Epizootiology of the disease caused by the oyster pathogen *Perkinsus marinus* and its effects on the oyster industry. **American Fisheries Society Special Publication Series**, v. 18, p. 47-63, 1988. Disponível em: <https://ir.library.oregonstate.edu/concern/articles/qz20t046m>. Acessado em: 20/04/2022.
- ANDREWS J. D. History of *Perkinsus marinus*, a pathogen of oysters in Chesapeake Bay 1950–1984. **Journal of Shellfish Research**, v. 15, p. 13–16, 1996. Disponível em: <https://scholarworks.wm.edu/vimsarticles/503>. Acessado em: 25/04/2022.

ARZUL, I.; CHOLLET, B.; MICHEL, J.; ROBERT, M.; GARCIA, C.; JOLY, J.-P.; FRANCOIS, C.; MIOSSEC, L. One *Perkinsus* species may hide another: characterization of *Perkinsus* species present in clam production areas of France. **Parasitology**, v. 139, p. 1757–1771, 2012 <https://doi.org/10.1017/s0031182012001047>.

AUDEMARD, C.; REECE, K. S.; BURRESON, E. M. Real-time PCR for detection and quantification of the protistan parasite *Perkinsus marinus* in environmental waters. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, p. 6611-6618, 2004. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.11.6611-6618.2004>.

AUZOUX-BORDENAVE, S.; VIGARIO, A. M.; RUANO, F.; DOMART-COULON, I.; DOUMENC, D. *In vitro* sporulation of the clam pathogen *Perkinsus atlanticus* (Apicomplexa, Perkinsea) under various environmental conditions. **Oceanographic Literature Review**, v. 9, p. 926, 1996.

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. <http://dx.doi.org/10.2307/3282915>.

BALSEIRO, P.; MONTES, J.; CONCHAS, R. F.; NOVOA, B.; FIGUERAS, A. Comparison of diagnostic techniques to detect the clam pathogen *Perkinsus olseni*. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 90, p. 143-151, 2010. <https://doi.org/10.3354/dao02194>.

BACHÈRE, E. Anti-infectious immune effectors in marine invertebrates: potential tools for disease control in larviculture. **Aquaculture**, v. 227, p. 427–438, 2003. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(03\)00521-0](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00521-0).

BIDEGAIN, G.; POWELL, E. N.; KLINCK, J. M.; HOFMANN, E. E.; BEN-HORIN, T.; BUSHEK, D.; FORD, S. E.; MUNROE, D. M.; GUO, X. 2017. Modeling the transmission of *Perkinsus marinus* in the eastern oyster *Crassostrea virginica*. **Fisheries Research**, v. 186, p. 82–93, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.fishres.2016.08.006>.

BLACKBOURN J.; BOWER S. M.; MEYER G. R. *Perkinsus qugwadi* sp. nov. (incertae sedis), a pathogenic protozoan parasite of Japanese scallops, *Patinopecten yessoensis*, cultured in

British Columbia, Canada. **Canadian Journal of Zoology**, v. 76, p. 942-953, 1998. <https://doi.org/10.1139/z98-015>.

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. 10-13, 2014. [https://doi.org/10.1016/0959-8030\(94\)90028-0](https://doi.org/10.1016/0959-8030(94)90028-0).

BOWER, S. M.; BLACKBOURN, J.; MEYER, G. R.; Distribution, prevalence, and pathogenicity of the protozoan *Perkinsus qugwadi* in Japanese scallops, *Patinopecten yessoensis*, cultured in British Columbia, Canada. **Canadian Journal of Zoology**, v. 76, p. 954-959, 1998. <https://doi.org/10.1139/z98-009>.

BOWER, S.M. **Synopsis of infectious diseases and parasites of commercially exploited shellfish: *Perkinsus marinus*** ("dermo" disease) of oysters. Canadá, 2013. Disponível em: <https://www.dfo-mpo.gc.ca/science/aah-saa/diseases-maladies/pmdoy-eng.html>. Acessado em 24/05/2022.

BOX, A.; CAPÓ, X.; TEJADA, S.; SUREDA, A.; MEJÍAS, L.; VALENCIA, J. M. *Perkinsus mediterraneus* infection induces oxidative stress in the mollusc *Mimachlamys varia*. **Journal of Fish Diseases**, v. 43, p. 1–7, 2020. <https://doi.org/10.1111/jfd.13085>.

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

BRÂTE, J.; LOGARES, R.; BERNEY, C.; REE, D. K.; KLAVENESS, D.; JAKOBSEN, K. S.; SHALCHIAN- TABRIZI, K., 2010. Freshwater Perkinsea and marine-freshwater colonizations revealed by pyrosequencing and phylogeny of environmental rDNA. **ISME Journal**, v. 4 , p. 1144–1153, 2010. <https://doi.org/10.1038/ismej.2010.39>.

BURRESON, E.; ALVAREZ, R.; MARTINEZ, V.; MACEDO, L. (1994). *Perkinsus marinus* (Apicomplexa) as a potential source of oyster *Crassostrea virginica* mortality in coastal lagoons

of Tabasco, Mexico. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 20, p. 77–82, 1994. <https://doi.org/10.3354/dao020077>.

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. Disponível em: <https://scholarworks.wm.edu/vimsarticles/504>. Acessado em: 25/04/2022.

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. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2005.05-00035.x>.

BUSHEK, D.; ALLEN, S. K.; ALCOX, K. A.; GUSTAFSON, R.; FORD, S. E. Response of *Crassostrea virginica* to in vitro cultured *Perkinsus marinus*: preliminary comparison of three inoculation methods. **Journal of Shellfish Research**, v. 16, p. 479-485, 1997. Disponível em: [https://www.researchgate.net/publication/285770096_Response_of_Crassostrea_virginica_to_in_vitro_cultured_Perkinsus_marinus_Preliminary_comparisons_of_three_inoculation_metho](https://www.researchgate.net/publication/285770096_Response_of_Crassostrea_virginica_to_in_vitro_cultured_Perkinsus_marinus_Preliminary_comparisons_of_three_inoculation_methods)ds. Acessado em: 19/04/2022.

BUSHEK, D.; FORD, S. E.; CHINTALA, M. M. Comparison of in vitro- cultured and wild-type *Perkinsus marinus*. III. Fecal elimination and its role in transmission. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 51, p. 217-225, 2002. <https://doi.org/10.3354/dao051217>.

CÁCERES-MARTÍNEZ, J.; VÁSQUEZ-YEOMANS, R.; PADILLA-LARDIZÁBAL, G.; DEL RÍO PORTILLA, M. A. *Perkinsus marinus* in pleasure oyster *Crassostrea corteziensis* from Nayarit, Pacific coast of México, **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 99, p. 66-73, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2008.03.005>.

CÁCERES-MARTÍNEZ, J.; VÁSQUEZ-YEOMANS, R.; PADILLA-LARDIZÁBAL, G. Parasites of the pleasure oyster *Crassostrea corteziensis* cultured in Nayarit, Mexico. **Journal of Aquatic Animal Health**, v. 22, p. 141-151, 2010. <https://doi.org/10.1577/H09-052.1>.

CÁCERES-MARTÍNEZ, J.; GARCÍA-ORTEGA, M.; VÁSQUEZ-YEOMANS, R.; PINEDA-GARCÍA, T. J.; STOKES, N. A.; CARNEIGE, R. B. Natural and cultured populations of the mangrove oyster *Saccostrea palmula* from Sinaloa, Mexico, infected by *Perkinsus marinus*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 110, p. 321-325, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2012.03.019>.

CARNEGIE, R. B.; ARZUL, I.; BUSHEK, D. Managing marine mollusc diseases in the context of regional and international commerce: policy issues and emerging concerns. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, v. 371, p. e20150215, 2016. <https://doi.org/10.1098/rstb.2015.0215>.

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. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2014.01.009>.

CASAS, S. M. 2002, **Estudio de la perkinsosis en la almeja fina, *Tapes decussatus* (Linnaeus 1758), de Galicia**. 2002. Tese. Universidade de Santiago de Compostela, Espanha. 2002.

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 etiological agent and in vitro modulation of zoosporulation by temperature and salinity. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 50, p. 51–65, 2002a. <http://dx.doi.org/10.3354/dao050051>.

CASAS, S. M.; LA PEYRE, J. F.; REECE, K. S.; AZEVEDO, C.; VILLALBA, A. Continuous in vitro culture of the carpet shell clam *Tapes decussatus* protozoan parasite *Perkinsus atlanticus*. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 52, p. 217-231, 2002b. <https://doi.org/10.3354/dao052217>.

CASAS, S. M.; GRAU, A.; REECE, K. S.; APAKUPAKUL, K.; AZEVEDO, C.; VILLALBA, A. *Perkinsus mediterraneus* n. sp., a protistan parasite of the European flat oyster *Ostrea edulis* from the Balearic Islands, Mediterranean Sea. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 58, p. 231–244, 2004. <https://doi.org/10.3354/dao058231>.

CASAS, S. M.; REECE, K. S.; LI, Y.; MOSS, J. A.; VILLALBA, A.; LA PEYRE, J. F. Continuous Culture of *Perkinsus mediterraneus*, a Parasite of the European Flat Oyster *Ostrea edulis*, and Characterization of Its Morphology, Propagation, and Extracellular Proteins in Vitro. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 55, p. 34-43, 2008. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2008.00301.x>.

CHAGOT, D.; COMPS, M.; BOULO, V.; RUANO, F.; GRIZEL, H. 1987, Histological study of a cellular reaction in *Ruditapes decussatus* infected by a protozoan. **Aquaculture**, v. 67, p. 260-261, 1987. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(87\)90050-0](https://doi.org/10.1016/0044-8486(87)90050-0).

CHENG, T. C. Hemocytes: Forms and functions. In: KENNEDY, V. S.; NEWELL, R. I. E.; EBLE, A. F. **The Eastern Oyster *Crassostrea virginica***. Maryland Sea Grant Book, College Park, MD, USA, 1996. p. 299-333.

CHENG, T.; RIFKIN, E. Cellular reactions in marine molluscs in response to helminth parasitism. **Special Publications. American Fisheries Society**, v. 5, p. 443-496, 1970. Disponível em: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19720890350>. Acessado em: 09/07/2022.

CHO, Y. -G.; LEE, H. -M.; HWANG, J. Y.; JANG, G. I.; KWON, M. G.; KIM, B. S.; PARK, K. -I.; CHOI, K. -S. Molecular and histological identification of the protozoan parasite *Perkinsus olseni* in the blood cockle *Anadara kagoshimensis* (Tokunaga, 1906) occurring on the south coast of Korea. **Aquaculture**, v. 561, p. e738721, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.738721>.

CHOI, K. -S.; LEWIS, D. H.; POWELL, E. D.; RAY, S. M. 1993. Quantitative measurement of reproductive output in the American oyster, *Crassostrea virginica* (Gmelin), using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Aquaculture Research**, v. 24: p. 299-322, 1993. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.1993.tb00553.x>.

CHOI, K. -S.; PARK, K. I.; LEE, K. W.; MATSUOKA, K. 2002, Infection intensity, prevalence and histopathology of *Perkinsus* sp. in the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*, in Isahaya Bay, Japan. **Journal of Shellfish Research**, v. 21, p. 119-125, 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. **Coastal Environmental and Ecosystem Issues of the East China Sea**. TERRAPUB AND NAGASAKI UNIVERSITY, 2010. p. 269–281.

CHU, F. L. E., 2000. Defense mechanisms of marine bivalves. In: FINGERMAN, M.; NAGABHUSHANAM, R. **Recent Advances in Marine Biotechnology: Immunobiology and Pathology**. Science publishers, Inc., Enfield (NH), USA; Plymouth, UK, 2000. p. 1-42.

CHU, F. L. E.; GREENE, K. H. Effect of temperature and salinity on *in vitro* culture of the oyster pathogen, *Perkinsus marinus* (Apicomplexa - Perkinsea). **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 53, p. 260-268, 1989. [https://doi.org/10.1016/0022-2011\(89\)90016-5](https://doi.org/10.1016/0022-2011(89)90016-5).

CHU, F. L. E.; HALE, R. C. 1994. Relationship between pollution and susceptibility to infectious disease in the eastern oyster, *Crassostrea virginica*. **Marine Environmental Research**, v. 38, p. 243-256, 1994. [https://doi.org/10.1016/0141-1136\(94\)90026-4](https://doi.org/10.1016/0141-1136(94)90026-4).

CHU, F. L.; LUND, E. D. 2006. Viability, infectivity and fatty acid synthetic activity of *Perkinsus marinus* meront cells incubated in estuarine and artificial seawater. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 71, p. 131–139, 1994.

COEN, L.; GRIZZLE, R. The importance of habitat created by molluscan shellfish to managed species along the Atlantic Coast of the United States. **Habitat Management Series**, v. 8, p. 1–108, 2007. Disponível em: <http://www.pinellas.wateratlas.usf.edu/upload/documents/ImportanceHabitatCreatedByMolluscan2007.pdf>. Acessado em: 27/07/2022.

COSS, C. A.; ROBLEDO, J. A. F.; RUIZ, G. M.; VASTA, G. R. Description of *Perkinsus andrewsi* n. sp. isolated from the Baltic clam (*Macoma balthica*) by characterization of the ribosomal RNA locus, and development of a species-specific PCR-based diagnostic assay. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 48, p. 52-61, 2001. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2001.tb00415.x>.

CRAIG, A.; POWELL, E. N.; FAY, R. R.; BROOKS, J. M. Distribution of *Perkinsus marinus* in Gulf Coast oyster populations. **Estuaries**, v. 12, p. 82–91, 1989. <https://doi.org/10.2307/1351499>.

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. <https://doi.org/10.3354/dao064085>.

CUI, Y. -Y.; YE, L. -T.; WU, L.; WANG, J. -Y. Seasonal occurrence of *Perkinsus* spp. and tissue distribution of *P. olseni* in clam (*Soletellina acuta*) from coastal waters of Wuchuan County, southern China. **Aquaculture**, v. 492, p. 300–305, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.04.030>.

DA SILVA, P. M.; VIANNA, R. T.; GUERTLER, R. 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. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2013.02.002>.

DA SILVA, P. M.; SCARDUA, M. P.; VIANNA, R. T.; MENDONÇA, R. C.; VIEIRA, C. B.; DUNGAN, C. F.; SCOTT, G. P.; REECE, K. S. Two *Perkinsus* spp. infect *Crassostrea gasar* oysters from cultured and wild populations of the Rio São Francisco estuary, Sergipe, northeastern Brazil. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 119, p. 62-71, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2014.04.005>.

DA SILVA, P. M.; COSTA, C. P.; ARAUJO, J. P. B.; QUEIROGA, F. R.; WAINBERG, A. A. Epizootiology of *Perkinsus* sp. In *Crassostrea gasar* oysters in polyculture with shrimps in northeastern Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 25, p. 37-45, 2016. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612016011>.

DANTAS NETO, M. P.; SABRY, R. C.; FERREIRA, L. P.; ROMÃO, L. S.; MAGGIONI, R. *Perkinsus* sp. infecting the oyster *Crassostrea rhizophorae* from estuaries of the septentrional

Northeast, Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 75, p. 1030-1034, 2015. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.06314>.

DANTAS NETO, M. P.; GESTEIRA, T. C. V.; SABRY, R. C.; FEIJÓ, R. G.; FORTE, J. M.; BOEHS, G.; MAGGIONI, R. First record of *Perkinsus chesapeaki* infecting *Crassostrea rhizophorae* in South America. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 141, p. 53-56, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2016.10.007>.

DANTAS NETO, M. P.; MAGGIONI, R.; NOGUEIRA, L. F. F.; FORTE, J. M.; FEIJÓ, R. G.; SABRY, R. C. *Perkinsus* sp. infecting three important mollusks from Jaguaribe river estuary, Ceará, Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 57, p. e158316, 2020. <https://doi.org/10.11606/issn.1678-4456.bjvras.2020.158316>.

DE VARGAS, C.; AUDIC, S.; HENRY, N.; DECELLE, J.; MAHÉ, F.; LOGARES, R., et al. Ocean plankton. Eukaryotic plankton diversity in the sunlit ocean. **Science**, v. 348, p. e1261605, 2015. <https://doi.org/10.1126/science.1261605>.

DEINER, K.; BIK, H. M.; MÄCHLER, E.; SEYMOUR, M.; LACOURSIÈRE-ROUSSEL, A.; ALTERMATT, F.; DE-VERE, N.; PFRENDER, M. E.; BERNATCHEZ, L. Environmental DNA metabarcoding: transforming how we survey animal and plant communities. **Molecular Ecology**, v. 26, p. 5872–5895, 2017. <https://doi.org/10.1111/mec.14350>.

DITTMAN, D. E.; FORD, S. E.; PADILLAI, D. K. Effects of *Perkinsus marinus* on reproduction and condition of the eastern oyster, *Crassostrea virginica*, depend on timing. **Journal of Shellfish Research**, v. 20, p. 1025–1034, 2001. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/239558568_Effects_of_Perkinsus_marinus_on_reproduction_and_condition_of_the_eastern_oyster_Crassostrea_virginica_depend_on_timing/link/58c1c097aca272e36dcc8764/download. Acessado em: 18/06/2022.

DUNGAN, C. F.; BUSHEK, B. Development and applications of Ray's fluid thioglycollate media for detection and manipulation of *Perkinsus* spp. pathogens of marine molluscs. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 131, p. 68-82, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2015.05.004>.

DUNGAN, C. F.; REECE, K. S. In vitro propagation of two *Perkinsus* spp. parasites from Japanese Manila clams *Venerupis philippinarum* and description of *Perkinsus honshuensis* n. sp. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 53, p. 316–326, 2006. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2006.00120.x>.

DUNGAN, C. F.; REECE, K. S.; MOSS, J. A.; HAMILTON, R. M.; DIGGLES, B. K. *Perkinsus olsenii* in vitro isolates from the New Zealand clam *Austrovenus stutchburyi*. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 54, p. 263–270, 2007. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2007.00265.x>.

ELSTON, R. A.; DUNGAN, C. F.; MEYERS, T. R.; REECE, K. S. *Perkinsus* sp. infection risk for manila clams, *Venerupis philippinarum* (A. Adams and Reeve, 1850) on the Pacific coast of North and Central America. **Journal of Shellfish Research**, v. 23, p. 101–105, 2004. Disponível em: <https://scholarworks.wm.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=1465&context=vimsarticles>. Acessado em: 15/08/2019.

ENRÍQUEZ-ESPINOZA, T. L.; GRIJALVA-CHON, J. M.; CASTRO-LONGORIA, R.; RAMOS-PAREDES, J. *Perkinsus marinus* in *Crassostrea gigas* in the Gulf of California. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 89, p. 269–273, 2010. <https://doi.org/10.3354/dao02199>.

ESCOBED-FREGOSO, C.; ARZUL, I.; CARRASCO, N.; GUTIÉRREZ-RIVERA, J. N.; LLERA-HERRERA, R.; VÁZQUEZ-JUÁREZ, R. Polymorphism at the ITS and NTS Loci of *Perkinsus marinus* isolated from cultivated oyster *Crassostrea corteziensis* in Nayarit, Mexico, and phylogenetic relationship to *P. marinus* along the Atlantic Coast. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 62, p. 137–147, 2015. <https://doi.org/10.1111/tbed.12090>.

EPAGRI - EMPRESA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA E EXTENSÃO RURAL DE SANTA CATARINA. **Síntese informativa da maricultura 2014**. Florianópolis, 2015. Disponível em: http://docweb.epagri.sc.gov.br/website_epagri/Cedap/Estatistica-Sintese/Sintese-informativa-da-maricultura-2014.pdf. Acessado em: 30/08/2019.

FANG, F. C. Antimicrobial reactive oxygen and nitrogen species: concepts and controversies. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, p. 820–832, 2004. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1004>.

FAO - ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA A ALIMENTAÇÃO E A AGRICULTURA. **The State of World Fisheries and Aquaculture: Meeting the Sustainable Development Goals.** Rome. p.17–29, 2018. Disponível em: <http://www.fao.org/3/I9540EN/i9540en.pdf>. Acessado em: 19/09/2019.

FAVERI, J.; SMOLOWITZ, R. M.; ROBERTS, S. B. Development and validation of a Real-Time Quantitative PCR assay for the detection and quantification of *Perkinsus marinus* in the eastern oyster, *Crassostrea virginica*. **Journal of Shellfish Research**, v. 28, p. 459-464, 2009. <https://doi.org/10.2983/035.028.0306>.

FISHER, S. G.; LERMAN, L. S. DNA fragments differing by single base-pair substitutions are separated in denaturing gradient gels-correspondence with melting theory. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 80, p. 1579–1583, 1983. <https://doi.org/10.1073/pnas.80.6.1579>.

FORD, S. E. 1996, Range extension by the oyster parasite *Perkinsus marinus* into the Northeastern United States: response to climate change? **Journal of Shellfish Research**, v. 15, p. 45-56, 1996.

FORD, S. E.; SMOLOWITZ, R. Infection dynamics of an oyster parasite in its newly expanded range. **Marine Biology**, v. 151, p. 119–133, 2007. <https://doi.org/10.1007/s00227-006-0454-6>.

GALLARDI, D. Effects of bivalve aquaculture on the environment and their possible mitigation: a review. **Fisheries and Aquaculture Journal**, v. 5, p. 106, 2014. <https://doi.org/10.4172/2150-3508.1000105>.

GAUTHIER, J.; MILLER, C.; WILBUR, A. TaqMan® MGB real-time PCR approach to quantification of *Perkinsus marinus* and *Perkinsus* spp. in oysters. **Journal of Shellfish Research**, v. 25, p. 619-624, 2006. [https://doi.org/10.2983/0730-8000\(2006\)25\[619:TMRPAT\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.2983/0730-8000(2006)25[619:TMRPAT]2.0.CO;2).

GLEASON, F. H.; LILJE, O.; DANG, C.; GERACI-YEE, S.; COLLIER, J. L. Possible impacts of zoosporic parasites in diseases of commercially important marine mollusc species: part I.

Perkinsozoa. **Botanica Marina**, v. 60, p. 401-408, 2017. <https://doi.org/10.1515/bot-2016-0132>.

GOEDKEN, M.; MORSEY, B.; SUNILA, I.; DUNGAN, C.; GUISE, S. D. The effects of temperature and salinity on apoptosis of *Crassostrea virginica* hemocytes and *Perkinsus marinus*. **Journal of Shellfish Research**, v. 4, p. 177–183, 2005. [https://doi.org/10.2983/0730-8000\(2005\)24\[177:TEOTAS\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.2983/0730-8000(2005)24[177:TEOTAS]2.0.CO;2).

GOGGIN, C. L.; MCGLADDERY, S. E.; WHYTE, S. K.; CAWTHORN, R. J. An assessment of lesions in bay scallops *Argopecten irradians* attributed to *Perkinsus karlssoni* (Protozoa, Apicomplexa). **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 24, p. 77-80, 1996. <https://doi.org/10.3354/dao024077>.

GUÉVÉLOU, E.; CARNEGIE, R. B.; WHITEFLEET-SMITH, L.; SMALL, J. M.; ALLEN, S. K. Near infrared reflectance spectroscopy to quantify *Perkinsus marinus* infecting *Crassostrea virginica*. **Aquaculture**, v. 533, p. e736063, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.736063>.

GULLIAN-KLANIAN, M.; HERRERA-SILVEIRA, J. A.; RODRÍGUEZ-CANUL, R.; AGUIRRE-MACEDO, L. Factors associated with the prevalence of *Perkinsus marinus* in *Crassostrea virginica* from the southern Gulf of Mexico. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 79, p. 237-247, 2008. <https://doi.org/10.3354/dao01910>.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Pesquisa da Pecuária Municipal 2021**. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/3940#resultado>. Acessado em: 30/08/2022.

ITOH, N.; KOMATSU, Y.; MAEDA, K.; HIRASE, S.; YOSHINAGA, T. First discovery of *Perkinsus beihaiensis* in Mediterranean mussels (*Mytilus galloprovincialis*) in Tokyo Bay, Japan. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 166, p. e107226, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2019.107226>.

ITOÏZ, S.; PERENNOU, M.; MOURONVALLE, C.; DERELLE, E.; LE GOÏC, N.; BIDAULT, A.; DE MONTAUDOUIN, X.; ARZUL, I.; SOUDANT, P.; CHAMBOUVET, A. Development

of duplex TaqMan-based real-time PCR assay for the simultaneous detection of *Perkinsus olseni* and *P. chesapeaki* in host Manila clam tissue samples. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 184, p. e107603, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2021.107603>.

ITOÏZ, S.; METZ, S.; DERELLE, E.; REÑÉ, A.; GARCÉS, E.; BASS, D.; SOUDANT, P.; CHAMBOUVET, A. Emerging Parasitic Protists: The Case of Perkinsea. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. e735815. 2022. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.735815>.

IVERSEN, E. S. **Farming the edge of the sea**. 2nd edition. New York: Fishing News Books, 1976. 436p. Disponível em: <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=XF2015025844>. Acessado em 30/05/2019.

JOSEPH, S. J.; FERNÁNDEZ-ROBLEDO, J. A.; GARDNER, M. J.; EL-SAYED, N. M.; KUO, C. -H.; SCHOTT, E. J.; WANG, H.; KISSINGER, J. C.; VASTA, G. R. The Alveolate *Perkinsus marinus*: Biological Insights from EST Gene Discovery. **BMC Genomics**, v. 11, p. 228, 2010. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-228>

KANG, H. S.; YANG, H. S.; REECE, K. S.; HONG, H. K.; PARK, K. I.; CHOI, K. S. (2016) First report of *Perkinsus honshuensis* in the variegated carpet shell clam *Ruditapes variegatus* in Korea. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 122, p. 35-41, 2016. <https://doi.org/10.3354/dao03063>.

LAU, Y. T.; GAMBINO, L.; SANTOS, B.; ESPINOSA, E. P.; ALLAM, B. Transepithelial migration of mucosal hemocytes in *Crassostrea virginica* and potential role in *Perkinsus marinus* pathogenesis. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 153, p. 122–129, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2018.03.004>.

LEETHOCHAVALIT, S.; CHALERMWAT, K.; UPATHAM, S.; CHOI, K. -S.; SAWANGWONG, P.; KRUATRACHUE, M. Occurrence of *Perkinsus* sp in undulated surf clams *Paphia undulata* from the Gulf of Thailand. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 60, p. 165-71, 2004. <https://doi.org/10.3354/dao060165>.

LEIBOWITZ, M. P.; PEREIRA, F. L.; LEAL, C. A. G.; CUNHA, E. A. P.; AZEVEDO, V. A. C.; FIGUEIREDO, H. C. P. Molecular detection of the pathogenic protist *Perkinsus marinus* in

farmed native and introduced oysters (*Crassostrea* spp.) in southern Brazil. **Genetics and Molecular Research**, v. 18, p. e18015, 2019. <https://doi.org/10.4238/gmr18015>.

LERMAN, L. S.; BELDJORD, C. Comprehensive mutation detection with denaturing gradient gel electrophoresis. In: COTTON, R. G. H.; EDKINS, E.; FORREST, S. (Eds.). **Mutation detection**. Oxford University Press, New York, 1999, p. 36 – 61.

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

LEVINE, N. D. *Perkinsus* gen. n. and other new taxa in the protozoan phylum Apicomplexa. **Journal of Parasitology**, v. 64, p. 549, 1978. <https://doi.org/10.2307/3279807>.

LUZ, M. D.; 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. <https://doi.org/10.5897/JPVB2015.0198>.

LUZ, M. S. A.; BOEHS, G. *Perkinsus beihaiensis* infecting the oyster *Crassostrea rhizophorae* under cultivation and in natural stock in Camamu Bay, Bahia, Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 53, p. 191-198, 2016. <https://doi.org/10.11606/issn.1678-4456.v53i2p191-198>.

LUZ, M. S. A.; CARVALHO, F. S.; OLIVEIRA, H. C.; BOEHS, G. *Perkinsus beihaiensis* (Perkinsozoa) in oysters of Bahia State, Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 78, p. 289-295, 2018. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.07016>.

LUZ CUNHA, A. C.; PONTINHA, V. D. A.; DE CASTRO, M. A. M.; SÜHNEL, S.; MEDEIROS, S. C.; MOURA DA LUZ, Â. M.; HARAKAVA, R.; TACHIBANA, L.; MELLO, D. F.; DANIELLI, N. M.; DAFRE, A. L.; MAGALHÃES, A. R. M.; MOURIÑO, J. L. P. Two epizootic *Perkinsus* spp. events in commercial oyster farms at Santa Catarina, Brazil. **Journal of Fish Diseases**, v. 42, p. 455– 463, 2019. <https://doi.org/10.1111/jfd.12958>.

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. <https://doi.org/10.1126/science.111.2883.328>.

MACKIN, J.G. 1951. Histopathology of infection of *Crassostrea virginica* (Gmelin) by *Dermocystidium marinum* Mackin, Owen and Collier. **Bulletin of Marine Science of the Gulf and Caribbean**, v. 1, p. 72-87, 1951. Disponível em: <https://www.ingentaconnect.com/content/umrsmas/bullmar/1951/00000001/00000001/art00006#>. Acessado em: 27/09/2019.

MAEDA, K.; YOSHINAGA, T.; ITOH, N. Supplementation with lipids enhances zoosporulation of *Perkinsus* species. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 187, p. e107705, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2021.107705>.

MANGOT, J F.; DEBROAS, D.; DOMAIZON, I. Perkinsozoa, a well-known marine protozoan flagellate parasite group, newly identified in lacustrine systems: a review. **Hydrobiologia**, v. 659, p. 37–48, 2011. <https://doi.org/10.1007/s10750-010-0268-x>.

MELLO, C. RN passa a reproduzir ‘ostras nativas’ em laboratório. **Tribuna do Norte**, 2016. Disponível em: <http://www.tribunadonorte.com.br/noticia/rn-passa-a-reproduzir-ostras-nativas-em-laborata-rio/348966> . Acessado em: 20/09/2019.

MCGLADDERY, S. E.; CAWTHORN, R. J.; BRADFORD, B. C. *Perkinsus karlssoni* n. sp. (Apicomplexa) in bay scallops *Argopecten irradians*. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 10, p. 127-137, 1991. <http://doi.org/10.3354/dao010127>.

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 softshell clam *Mya arenaria*. **Parasite**, v. 7, p. 115-122, 2000. <https://doi.org/10.1051/parasite/2000072115>.

MONTES, J. F.; DURFORT, M.; GARCÍA VALERO, J. Characterization and localization of a Mr 225 kDa polypeptide specifically involved in the defence mechanisms of the clam *Tapes semidecussatus*. **Cell and Tissue Research**, v. 280, p. 27-37, 1995. <https://doi.org/10.1007/BF00304508>.

MONTES, J. F.; DURFORT, M.; GARCÍA VALERO, J. When the venerid clam *Tapes decussatus* is parasitized by the protozoan *Perkinsus* sp. it synthesizes a defensive polypeptide that is closely related to p225. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 26, p. 149-157, 1996. <https://doi.org/10.3354/dao026149>.

MORLEY, N. J. Interactive effects of infectious diseases and pollution in aquatic molluscs. **Aquatic Toxicology**, v. 96, p. 27–36, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2009.09.017>.

MOSS, J. A.; BURRESON, E. M.; REECE, K. S. Advanced *Perkinsus marinus* infections in *Crassostrea ariakensis* maintained under laboratory conditions. **Journal of Shellfish Research**, v. 25, p. 65–72, 2006. Disponível em: <https://scholarworks.wm.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=1449&context=vimsarticles>. Acessado em: 15/08/2020.

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. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2008.00314.x>

MOTER, A.; GOBEL, U. B. 2000. Fluorescence in situ hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms. **Journal of Microbiological Methods**, v. 41, p. 85-112, 2000. [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(00\)00152-4](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(00)00152-4).

MURRELL, A.; KLEEMAN, S. N.; BARKER, S. C.; LESTER R. J. G. Synonymy of *Perkinsus olsenii* Lester & Davis, 1981 and *Perkinsus atlanticus* Azevedo, 1989 and an update on the phylogenetic position of the genus *Perkinsus*. **Bulletin of the European Association of Fish Pathologists**, v. 22, p. 258-265, 2002. Disponível em: https://www.eafp.org/download/2002-Volume22/Issue%204/22_258.pdf. Acessado em: 23/04/2022.

NAM, K. -W.; JEUNG, H. -D.; SONG, J. -H.; PARK, K. -H.; CHOI, K. -S.; PARK, K. -I.; 2018. High parasite burden increases the surfacing and mortality of the manila clam (*Ruditapes philippinarum*) in intertidal sandy mudflats on the west coast of Korea during hot summer. **Parasites & Vectors**, v. 11, p. 42, 2018. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2620-3>

NAVAS, J. I.; CASTILLO, M. C.; VERA, P.; RUIZ-RICO, M. Principal parasites observed in clams, *Ruditapes decussatus* (L.), *Ruditapes philippinarum* (Adams et Reeve), *Venerupis pullastra* (Montagu) and *Venerupis aureus* (Gmelin), from the Huelva coast (S.W. Spain). **Aquaculture**, v. 107, p. 193-199, 1992. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(92\)90067-U](https://doi.org/10.1016/0044-8486(92)90067-U).

NEVES, S. M. N.; GUEDES, R. M. C. Hibridização *in situ* fluorescente: princípios básicos e perspectivas para o diagnóstico de doenças infecciosas em medicina veterinária. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 79, p. 627-632, 2012. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/aib/a/rQfs49x8J3zb8NK5M67sbFb/?lang=pt#>. Acessado em 23/08/2019.

NEWTON, A. L.; SMOLOWITZ, R. Chapter 41 – Invertebrates. In: TERIO, K. A.; MCALOOSE, D., LEGER, J. S. **Pathology of Wildlife and Zoo Animals**. ACADEMIC PRESS, 2018. p. 1019-1052. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-805306-5.00041-9>.

NÓREN, F.; MÖESTRUP, O.; REHNSTAM-HOLM, A.S. *Parvilucifera infectans* Nören et Möestrup gen. et sp. nov. (Perkinsozoa phylum nov.): a parasitic flagellate capable of killing toxic microalgae. **European Journal of Protistology**, v. 35, p. 233-254, 1999. [https://doi.org/10.1016/S0932-4739\(99\)80001-7](https://doi.org/10.1016/S0932-4739(99)80001-7).

NYBAKKEN, J.W. **Marine Biology: an Ecological Approach**. 5. ed. São Francisco: BENJAMIN CUNNINGS, 2001, 516p.

ORDÁS, M. C.; GÓMEZ-LEÓN, J.; FIGUERAS, A. Histopathology of the infection by *Perkinsus atlanticus* in three clam species (*Ruditapes decussatus*, *R. philippinarum* and *R. pullastra*) from Galicia (NW Spain). **Journal of Shellfish Research**, v. 20, p. 1019-1024, 2001.

PALES ESPINOSA, E.; WINNICKI, S.; ALLAM, B. Early host–pathogen interactions in a marine bivalve: *Crassostrea virginica* pallial mucus modulates *Perkinsus marinus* growth and virulence. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 104, p. 237-247, 2013. <https://doi.org/10.3354/dao02599>.

PALES ESPINOSA, E.; CORRE, E.; ALLAM, B. Pallial mucus of the oyster *Crassostrea virginica* regulates the expression of putative virulence genes of its pathogen *Perkinsus marinus*.

International Journal for Parasitology, v. 44, p. 305–317, 2014.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2014.01.006>.

PAGENKOPP LOHAN, K.; HILL-SPANIK, K.; TORCHIN, M.; AGUIRRE-MACEDO, L.; FLEISCHER, R.; RUIZ, G. Richness and distribution of tropical oyster parasites in two oceans. **Parasitology**, v. 143, p. 1119-1132, 2016.
<http://dx.doi.org/10.1017/S0031182015001900>.

PARK, K. I.; CHOI, K. S. Spatial distribution of the protozoan parasite *Perkinsus* sp. found in the Manila clams, *Ruditapes philippinarum*, in Korea. **Aquaculture**, v. 203, p. 9-22, 2001.
[https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(01\)00619-6](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00619-6).

PATOKA, J.; MAGALHÃES, A. L. B.; KOUBA, A.; FAULKES, Z.; JERIKHO, R.; VITULE, J. R. S. Invasive aquatic pets: failed policies increase risks of harmful invasions. **Biodiversity and Conservation**, v. 27, p. 3037–3046, 2018. <https://doi.org/10.1007/s10531-018-1581-3>.

PAVAN, M. G.; MONTEIRO, F. A. Técnicas moleculares aplicadas à sistemática e ao controle vetorial. In: GALVÃO, C. (Ed.). **Vetores da doença de chagas no Brasil**. Sociedade Brasileira de Zoologia, Curitiba, 2014, p. 241 – 260. Disponível em: <http://books.scielo.org/id/mw58j/pdf/galvao-9788598203096-13.pdf> Acessado em: 23/09/2019.

PERKINS, F. O. Zoospores of the oyster pathogen, *Dermocystidium marinum*. I. Fine structure of the conoid and other sporozoan-like organelles. **Journal of Parasitology**, v. 62, p. 959–974, 1976. <https://doi.org/10.2307/3279192>.

PERKINS, F. O. The structure of *Perkinsus marinus* (Mackin, Owen & Collier, 1950) Levine, 1978 with comments on taxonomy and phylogeny of *Perkinsus* spp. **Journal of Shellfish Research**, v. 15, p. 67-88, 1996. Disponível em: <https://scholarworks.wm.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=1505&context=vimsarticles>.
 Acessado em: 12/05/2022.

PERKINS, F. O.; MENZEL, R. W. Ultrastructure of sporulation in the oyster pathogen *Dermocystidium marinum*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 9, p. 205-229, 1967. [https://doi.org/10.1016/0022-2011\(67\)90009-2](https://doi.org/10.1016/0022-2011(67)90009-2).

PINHO FERREIRA, L.; 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. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2014.07.012>.

PINTO, T. R.; BOEHS, G.; PESSOA, W. F. B.; LUZ, M. S. A.; COSTA, H. Detection of *Perkinsus marinus* in the oyster *Crassostrea rhizophorae* in southern Bahia by proteomic analysis. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 53, p. 1-4, 2017. <https://doi.org/10.11606/issn.1678-4456.bjvras.2016.104524>.

PRETTO, T.; ZAMBON, M.; CIVETTINI, M.; CABURLOTTO, G.; BOFFO, L.; ROSSETTI, E.; ARCANGELI, G. Massive mortality in Manila clams (*Ruditapes philippinarum*) farmed in the Lagoon of Venice, caused by *Perkinsus olseni*. **Bulletin of the European Association of Fish Pathologists**, v. 34, p. 43-53, 2014. Disponível em: https://eafp.org/download/2014-volume34/issue_2/34-2-043-Pretto.pdf. Acessado em: 23/04/2022.

QUEIROGA, F. R.; MARQUES-SANTOS, L. F.; HÉGARET, H.; SOUDANT, P.; FARIAS, N. D.; SCHLINDWEIN, A. D.; DA SILVA, P. M. Immunological responses of the mangrove oysters *Crassostrea gasar* naturally infected by *Perkinsus* sp. in the Mamanguape Estuary, Paraíba state (Northeastern, Brazil). **Fish and Shellfish Immunology**, v. 35, p. 319-327, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.04.034>.

QUEIROGA, F. R.; VIANNA, R. T.; VIEIRA, C. B.; FARIAS, N. D.; DA SILVA, P. M. Parasites infecting the cultured oyster *Crassostrea gasar* (Adanson, 1757) in Northeast Brazil. **Parasitology**, v. 142, p. 756–766, 2015. <https://doi.org/10.1017/S0031182014001863>.

RÅBERG, L.; ALACID, E.; GARCES, E.; FIGUEROA, R. The potential for arms race and Red Queen coevolution in a protist host-parasite system. **Ecology and Evolution**, v. 4, p. 4775–4785, 2014. <https://doi.org/10.1002/ece3.1314>.

RALPH, G.; WARD, J. E.; WINNICKI, S. M.; CARDEN, W.; ALLAM, B.; HOLOHAN, B. Development of experimental procedures for determining the role of marine aggregates in the transmission of *Perkinsus marinus* in the eastern oyster (*Crassostrea virginica*). **Journal of Shellfish Research**, v. 27, p. 1045. 2008. [https://doi.org/10.2983/0730-8000\(2008\)27\[985:AOTPPA\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.2983/0730-8000(2008)27[985:AOTPPA]2.0.CO;2).

RAMILO, A.; CARRASCO, N.; REECE, K. S.; VALENCIA, J. M.; GRAU, A.; ACEITUNO, P.; ROJAS, M.; GAIRIN, I.; FURONES, M. D.; ABOLLO, E.; VILLALBA, A. Update of information on perkinsosis in NW Mediterranean coast: Identification of *Perkinsus* spp. (Protista) in new locations and hosts. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 125, p. 37–41, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2014.12.008>.

RAMILO, A.; PINTADO, J.; VILLALBA, A.; ABOLLO, E. *Perkinsus olseni* and *P. chesapeakei* detected in a survey of perkinsosis of various clam species in Galicia (NW Spain) using PCR–DGGE as a screening tool. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 133, p. 50–58, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2015.11.012>.

RAY, S. M. **Biological Studies of *Dermocystidium marinum* a Fungus Parasite of Oysters. Rice Institute pamphlet**. 1954, 120f. Tese, Rice Institute, Washington, DC. 1954. Disponível em: <https://scholarship.rice.edu/bitstream/handle/1911/18411/3079846.PDF?sequence=1>. Acessado em: 15/04/2019.

REECE, K. S.; SIDDALL, M.; BURRESON, E.; GRAVES, J. E. Phylogenetic analysis of *Perkinsus* based on actin gene sequences. **Journal of Parasitology**, v. 83, p. 417–423, 1997. <https://doi.org/10.2307/3284403>.

REECE, K. S.; DUNGAN, C. F.; BURRESON, E. M. Molecular epizootiology of *Perkinsus marinus* and *P. chesapeakei* infections among wild oysters and clams in Chesapeake Bay, USA. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 82, p. 237–248, 2008. <https://doi.org/10.3354/dao01997>.

RÍOS, R.; ARANGUREN, R.; GASTALDELLI, M.; ARCANGELI, G.; NOVOA, B., FIGUERAS, A. Development and validation of a specific real-time PCR assay for the detection

of the parasite *Perkinsus olseni*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 169, p. e107301, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2019.107301>.

RÍOS-CASTRO, R.; ARANGUREN, R.; ROMERO, A.; BANCHI, E.; PALLAVICINI, A.; NOVOA, B.; FIGUERAS, A. Assessment of the environmental distribution of the protozoan parasite *Perkinsus olseni* by next-generation sequencing, qPCR and histopathology allows the identification of alternative bivalve hosts. **Aquaculture**, v. 552, p. e737984, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.737984>.

ROBLEDO, J. A. F.; CALER, E.; MATSUZAKI, M.; KEELING, P. J.; SHANMUGAM, D.; ROOS, D. S.; VASTA, G. R. The search for the missing link: a relic plastid in *Perkinsus*? **International Journal for Parasitology**, v. 41, p. 1217-1229, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2011.07.008>.

ROBLEDO, J. A. F.; MARQUIS, N. D.; COUNTWAY, P. D.; RECORD, N. R.; IRISH, E. L.; SCHULDT, M. M.; KINGSTON, S. E.; BISHOP, T. J.; MESSERMAN, N. A.; BOWDEN, T. J. Pathogens of marine bivalves in Maine (USA): A historical perspective. **Aquaculture**, v. 493, p. 9-17, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.04.042>.

RUANO, F.; BATISTA, F. M.; ARCANGELI, G. 2015. Perkinsosis in the clams *Ruditapes decussatus* and *R. philippinarum* in the Northeastern Atlantic and Mediterranean Sea: A review. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 131, p. 58-67, 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2015.07.015>.

RUIZ, G. M.; RAWLINGS, T. K.; DOBBS, F. C.; DRAKE, L. A.; MULLADY, T.; HUQ, A.; COLWELL, R. R. Global spread of microorganisms by ships. **Nature**, v. 408, p. 49–50, 2000. <https://doi.org/10.1038/35040695>.

SABRY, R. C.; ROSA, R. D.; MAGALHÃES, A. R.; BARRACCO, M. A.; GESTEIRA, T. C. V.; DA SILVA, P. M. First report of a *Perkinsus* sp. infecting mangrove oyster *Crassostrea rhizophorae* of the Brazilian coast. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 88, p. 13–23, 2009. <https://doi.org/10.3354/dao02136>.

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 of Invertebrate Pathology**, v. 112, p. 24–32, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2012.10.004>.

SAGRISTÀ, E.; DURFORT, M.; AZEVEDO, C. *Perkinsus* sp. (Phylum Apicomplexa) in Mediteranean clam *Ruditapes semidecussatus*: ultrastructural observations of the cellular response of the host. **Aquaculture**, v. 132, p. 153-160, 1995. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(94\)00391-Z](https://doi.org/10.1016/0044-8486(94)00391-Z).

SAGRISTÀ, E.; DURFORT, M.; AZEVEDO, C. Ultrastructural study of the parasite, *Perkinsus atlanticus* (Apicomplexa), on the clam *Ruditapes philippinarum*, in the Mediterranean. **Scientia Marina**, v. 60, p. 283-288, 1996. Disponível em: <http://diposit.ub.edu/dspace/handle/2445/32402>. Acessado em: 29/04/2022.

SANIL, N. K.; VIJAYAN, K. K.; KRIPA, V.; MOHAMED K. S. Occurrence of the protozoan parasite, *Perkinsus olseni* in the wild and farmed Pearl Oyster, *Pinctada fucata* (Gould) from the Southern coast of India. **Aquaculture**, v. 299, p. 8–14, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.12.007>

SANIL, N. K.; SUJA, G.; LIJO, J.; VIJAYAN, K. K. First report of *Perkinsus beihaiensis* in *Crassostrea madrasensis* from the Indian subcontinent. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 98, p. 209-20, 2012. <https://doi.org/10.3354/dao02440>. PMID: 22535871.

SCANLON, C. H.; RAGONE CALVO, L. M.; BURRESON, E. M. The potential for transmission of *Perkinsus marinus* by faecal matter from the Eastern oyster, *Crassostrea virginica*. **Journal of Shellfish Research**, v. 16, p. 332, 1997. Disponível em: <https://scholarworks.wm.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=2855&context=etd>. Acessado em: 06/06/2022.

SCARDUA, M. P.; VIANNA, R. T.; DUARTE, S. S.; FARIAS, N. D.; CORREIA, M. L. D.; SANTOS, H. T. A. D.; DA SILVA P. M. Growth, mortality and susceptibility of oyster *Crassostrea* spp. to *Perkinsus* spp. infection during on growing in northeast Brazil. **Revista**

Brasileira de Parasitologia Veterinária, v. 26, p. 401-410, 2017.
<https://doi.org/10.1590/S1984-29612017061>.

SCHMITT, P.; DUPERTHUY, M.; MONTAGNANI, C.; BACHÈRE, E.; DESTOUMIEUX-GARZÓN, D. Immune responses in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* an overview with focus on summer mortalities. In: QIN, J. G. **Oysters physiology, ecological distribution and mortality**. Nova Science Publishers Inc, New York, 2012. p. 1-47.

SHAMAL, P.; ZACHARIA, P. U.; BINESH, C. P.; PRANAV, P.; SUJA, G.; ASOKAN, P. K.; PRADEEP, M. A.; RITHESH, R.; VIJAYAN, K. K.; SANIL, N. K. *Perkinsus olseni* in the short neck yellow clam, *Paphia malabarica* (Chemnitz, 1782) from the southwest coast of India. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 159, p. 113-120, 2018.
<https://doi.org/10.1016/j.jip.2018.10.001>.

SHEPPARD, B. J.; PHILLIPS, A. C. *Perkinsus olseni* detected in Vietnamese aquacultured reef clams *Tridacna crocea* imported to the USA, following a mortality event. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 79, p. 229–235, 2008. <https://doi.org/10.3354/dao01888>.

SILVA, C. G. D.; FIGUEIREDO, N. C. D.; MARTINS, I. X.; LIMA, J. T. A. X. Protozoan parasite *Perkinsus* sp. infecting *Crassostrea rhizophorae* from the Coast of Rio Grande do Norte (Northeast of Brazil). **Journal of Aquaculture & Marine Biology**, v. 6, p. 11–12, 2017.
<https://doi.org/10.15406/jamb.2017.06.00166>.

SINDERMANN, C. J. **Principal diseases of marine fish and shell- fish**. 2nd edition. New York and London: Academic Press, 1990. v. 2, 521p.

SMOLOWITZ, R. A review of current state of knowledge concerning *Perkinsus marinus* effects on *Crassostrea virginica* (Gmelin) (the eastern oyster). **Veterinary Pathology**, v. 50, p. 404-411, 2013. <https://doi.org/10.1177/0300985813480806>.

SONG, L.; WANG, L.; QIU, L.; ZHANG, H. Bivalve immunity. In: SÖDERHÄLL, K. **Invertebrate immunity**. Springer Science & Business Media, LLC and Landes Bioscience, New York, 2010. p. 44-65.

SONIAT, T. M. Changes in levels of infection of oysters infected by *Perkinsus marinus*, with special reference to the interaction of temperature and salinity upon parasitism. **Northeast Gulf Science**, 7:171–174, 1985. <https://doi.org/10.18785/negs.0702.08>.

SOUDANT, P.; CHU, F. -L. E.; VOLETY, A. Host–parasite interactions: Marine bivalve molluscs and protozoan parasites, *Perkinsus* species, **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 114, p. 196-216, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2013.06.001>.

SUHNEL, S.; JOHNSON, S. C.; GURNEY-SMITH, H. J.; IVACHUK, C. D. S.; SCHAEFER, A. L. C.; THOMSON, C. A.; MACIEL, M. L. T.; MARTINS, M. L.; ARANGUREN, R.; FIGUERAS, A.; MAGALHÃES, A. R. M. A status assessment of perkinsiosis, bonamiosis, and mateiliosis in commercial marine bivalves from southern Brazil. **Journal of Shellfish Research**, v. 35, p. 143-156, 2016. <http://dx.doi.org/10.2983/035.035.0116>.

TASUMI, S.; VASTA, G. R. A galectin of unique domain organization from hemocytes of the eastern oyster (*Crassostrea virginica*) is a receptor for the protistan parasite *Perkinsus marinus*. **Journal of Immunology**, v.179, p. 3086-3098, 2007. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.5.3086>.

UMEDA, K.; YOSHINAGA, T. Development of real-time PCR assays for discrimination and quantification of two *Perkinsus* spp. in the Manila clam *Ruditapes philippinarum*. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 99, p. 215–225, 2012. <https://doi.org/10.3354/dao02476>.

VALIULIS, G. A.; MACKIN, J. G. Formation of sporangia and zoospores by *Labyrinthomyxa* sp. parasitic in the clam *Macoma balthica*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 14, p. 268-270, 1969. [https://doi.org/10.1016/0022-2011\(69\)90115-3](https://doi.org/10.1016/0022-2011(69)90115-3).

VASTA, G. R.; FENG, C.; BIANCHET, M. A.; BACHVAROFF, T. R.; TASUMI, S. 2015. Structural, functional, and evolutionary aspects of galectins in aquatic mollusks: from a sweet tooth to the Trojan Horse. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 46, p. 94–106, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.05.012>.

VASTA, G. R.; WANG, J. -X. Galectin-mediated immune recognition: Opsonic roles with contrasting outcomes in selected shrimp and bivalve mollusk species. **Developmental &**

Comparative Immunology, v. 110, p. e103721, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2020.103721>.

VÁZQUEZ, N.; ITOH, N.; CREMONTE, F. First record of *Perkinsus olseni* in cultured mussels (*Mytilus chilensis*) in the Beagle Channel, Southwestern Atlantic Ocean. **Aquaculture**, v. 550, p. e737893, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.737893>.

VILLANUEVA-FONSECA, L.; GARCÍA-ULLOA, M.; LÓPEZ-MEYER, M.; VILLANUEVA-FONSECA, B.; HERNÁNDEZ-SEPÚLVEDA, J.; MUÑOZ-SEVILLA, N.; GÓNGORA-GÓMEZ, A. *Perkinsus marinus* in the pleasure oyster *Crassostrea corteziensis* cultivated on the northeast coast of the Gulf of California, Mexico. **Latin American Journal of Aquatic Research**, v. 48, p. 529-537, 2020. <https://doi.org/10.3856/vol48-issue4-fulltext-2463>.

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

VOLETY, A. K., CHU, F. L. E. Comparison of infectivity and pathogenicity of meront (trophozoite) and prezoosporangia stages of the oyster pathogen *Perkinsus marinus* in eastern oysters, *Crassostrea virginica* (Gmelin, 1791). **Journal of Shellfish Research**, v. 13, p. 521-527, 1994. Disponível em: <https://scholarworks.wm.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=1511&context=vimsarticles>. Acessado em: 07.07.2022.

VOLETY, A. K.; CHU, F. L. E. 1995, Suppression of chemiluminescence of eastern oyster (*Crassostrea virginica*) haemocytes by the protozoan parasite *Perkinsus marinus*. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 19, p. 135-142, 1995. [https://doi.org/10.1016/0145-305X\(94\)00059-O](https://doi.org/10.1016/0145-305X(94)00059-O).

WANG, Y.; YOSHINAGA, T.; ITOH, N. New insights into the entrance of *Perkinsus olseni* in the Manila clam, (*Ruditapes philippinarum*). **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 153, p. 117-121, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2018.03.005>.

WINNICKI, S. M.; CARDEN, W.; HOLOHAN, B.; RALPH, G.; WARD, E.; ALLAM, B.; Establishment of *Perkinsus marinus* infection in *Crassostrea virginica*: insights into the portal of entry and the potential role of marine aggregates. **Journal of Shellfish Research**, v. 27, p. 1064, 2008. [https://doi.org/10.2983/0730-8000\(2008\)27\[985:AOTPPA\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.2983/0730-8000(2008)27[985:AOTPPA]2.0.CO;2).

WOAH - WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH. **Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals**: Infection with *Perkinsus marinus*, c. 2.4.5, p. 461-472, 2021. Disponível em:

https://www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Health_standards/aahm/current/2.4.05_P_MARINUS.pdf. Acessado em 10/08/2022.

WOAH - WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH. **Aquatic Animal Health Code**: Infection with *Perkinsus marinus*, c. 11.5, p. 1-6, 2022. Disponível em: https://www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Health_standards/aahc/current/chapitre_perkinsus_marinus.pdf. Acessado em 10/08/2022.

YANG, X.; YE, L.; LU, J.; YAO, T.; WANG, J.; FU, Y.; ZHANG, Q. Epidemiology investigation of *Perkinsus* spp. in shellfish along coastal area of Guangdong Province. **South China Fisheries Science**, v. 18, p. 128-134, 2022. <https://doi.org/10.12131/20210183>.

ZHANG, H.; CAMPBELL, D. A.; STURM, N. R.; DUNGAN, C. F.; LIN, S. Spliced leader RNAs, mitochondrial gene frameshifts and multi-protein phylogeny expand support for the genus *Perkinsus* as a unique group of alveolates. **Plos One**, v. 6, p. e19933, 2011. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019933>.

**CAPÍTULO 2 – PRIMEIRO REGISTRO DE *Perkinsus marinus* INFECTANDO *Crassostrea*
sp. NO RIO GRANDE DO NORTE, BRASIL, UTILIZANDO PCR EM TEMPO REAL**

(Short communication)

ARTIGO SUBMETIDO NO PERÍODICO
JOURNAL OF INVERTEBRATE PATHOLOGY

QUALIS: Quadriênio 2013-2016: A2
FATOR DE IMPACTO (2022): 2.795

Primeiro registro de *Perkinsus marinus* infectando *Crassostrea* sp. no Rio Grande do Norte, Brasil, utilizando PCR em tempo real

Célio Souza da Rocha^a; Rachel Costa Sabry^b; Rafael dos Santos Rocha^c; Rodrigo Maggioni^c; Bruno Vinicius Silva de Araújo^a; Renata Julia dos Santos Silva^b; João Marcelo Azevedo de Paula Antunes^{a*}

^a Universidade Federal Rural do Semi-Árido – Av. Francisco Mota, 572 - Costa e Silva, Mossoró - RN, CEP: 59625-900, Brasil.

^b Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia do Ceará, Campus Aracati, Rodovia CE-040 km 139, CEP 62800-000 Aracati, CE, Brazil

^c Instituto de Ciências do Mar, Universidade Federal do Ceará, Av. da Abolição, 3207 – Meireles, CEP: 60165-081 Fortaleza, CE, Brazil

* Autor para correspondência: joao.antunes@ufersa.edu.br

celiorocha.vet@hotmail.com

rachelsabry@ifce.edu.br

rafaelsanro@ufc.br

maggioni@ufc.br

brunovinicios.araujo@hotmail.com

renatajulia709@gmail.com

Resumo

Patógeno com tendência cosmopolita e alto poder de virulência em algumas espécies hospedeiras, *Perkinsus marinus* continua sendo um desafio para a segurança dos ecossistemas marinhos e a sanidade dos moluscos bivalves. Este trabalho investigou a ocorrência de *P. marinus* em *Crassostrea* sp. dos estuários do rio Potengi e da laguna de Guaraíras no Rio Grande do Norte, Brasil. De 1200 ostras coletadas, um total de 203 amostras de ostras positivas para *Perkinsus* sp. em meio fluido de tioglicolato de Ray (RFTM) foram submetidas à qPCR espécie-específica PmarITS70/600 onde 61 animais (30,05%) apresentaram gráficos de amplificação com temperatura de melting de $80,1 \pm 0,6^{\circ}\text{C}$ correspondentes ao controle positivo. Este foi o primeiro registro de *P. marinus* em ostras nesses estuários utilizando a qPCR como ferramenta diagnóstica.

Palavras-chaves: *Perkinus marinus*, *Crassotrea* sp., qPCR.

1. Introdução

A introdução de agentes patogênicos em áreas livres de doenças ou regiões sanitariamente controladas é uma das principais ameaças à manutenção dos ecossistemas costeiros e à sanidade dos recursos pesqueiros de importância comercial. Os moluscos bivalves são um dos organismos aquáticos mais acometidos por enfermidades causadas por microorganismos, principalmente protozoários do gênero *Perkinsus* que provocam eventos graves com alta mortalidade e perdas econômicas significativas associadas à infecção (Villalba et al., 2004). Quando não causam a morte, estes protozoários podem prejudicar o desempenho reprodutivo e reduzir a saúde do hospedeiro, diminuindo o ganho de massa corpórea e a imunidade, o que favorece infecções secundárias oportunistas (Montes et al., 2001; Lee et al., 2001; Itoiz et al., 2021). A espécie *P. marinus* detém um alto potencial de virulência e por isso é considerada de notificação obrigatória (WOAH, 2022) tendo sido responsável por mortalidades em massa de populações de ostras *Crassostrea virginica* desde a década de 1950 nos Estados Unidos (EUA) (Mackin et al., 1950). Essa espécie vem se disseminando pela costa norte-americana (Ford e Chintala, 2006; Ford e Smolowitz, 2007) e pelo México com infecções em *C. corteziensis* (Escobedo-Fregoso et al., 2015; Villanueva-Fonseca et al., 2020) e mortalidades massivas de *C. gigas* cultivadas (Enriquez-Espinoza et al., 2010).

No Brasil, o primeiro registro de *Perkinsus* sp. infectando ostras nativas *C. rhizophorae* foi no estuário do rio Pacoti, Ceará (Sabry et al., 2009) porém sem identificação da espécie. A partir desse registro novas pesquisas foram realizadas e as técnicas de diagnóstico foram aprimoradas no intuito de identificar as espécies detectadas no Brasil. Da Silva et al. (2013), identificaram pela primeira vez na costa brasileira *P. marinus* em *C. rhizophorae* no estuário do Rio Paraíba, Paraíba. Este protozoário também foi detectado em *C. rhizophorae* de bancos naturais na Baía de Camamu, Bahia (Pinto et al., 2017); em *C. gasar* no estuário do rio São Francisco, Sergipe (da Silva et al., 2014; Scardua et al., 2017), no estuário do rio Mamanguape, Paraíba (Queiroga et al., 2015) e infectando ostras *C. gigas* e *C. gasar* em Santa Catarina (Luz Cunha et al., 2019; Leibowitz et al., 2019).

A técnica de Reação em Cadeia de Polimerase em tempo real (qPCR) vem sendo desenvolvida ao longo dos anos como uma alternativa rápida e segura para identificar e quantificar *P. marinus* em tecidos do hospedeiro ou no ambiente (Audemard et al., 2004; Gauthier et al., 2006; Faveri et al., 2009; Marquis et al., 2020). Neste estudo, a técnica de PCR em tempo real foi usada como ferramenta de diagnóstico com o objetivo de detectar *P. marinus*

infectando ostras *Crassostrea* sp. de estuários do Rio Grande do Norte, Brasil.

2. Materiais e métodos

Ostras do gênero *Crassostrea* (n = 1200) foram coletadas nos estuários do rio Potengi (S05°45'51,48", W035°12'42,16") e da laguna de Guaraíras (S06°12'38,62", W035°08'08,27") no Estado do Rio Grande do Norte (Fig. 1). As coletas foram realizadas nos meses de março, abril, setembro e outubro de 2019. As variáveis temperatura e salinidade da água foram mensuradas durante as amostragens. As ostras foram coletadas manualmente em bancos naturais a partir das raízes de *Rhizophora mangle* e posteriormente foram transportadas ao laboratório. Tecidos de reto e brânquias de cada animal foram incubados em meio fluido de tioglicolato de Ray (RFTM) na presença de antibiótico e antifúngico (penicilina/estreptomicina e nistatina) por 7 dias no escuro em temperatura ambiente. Simultaneamente, amostras de tecido de brânquias foram conservados em álcool 95% e armazenados a -20° C para extração de DNA e diagnóstico molecular confirmatório. Em seguida os fragmentos foram processados, corados em lugol 2% e observados em microscopia óptica para verificar a presença ou ausência de *Perkinsus* sp. (Ray, 1954).

As amostras positivas no método de RFTM foram submetidas à técnica de extração do DNA genômico total do protozoário, seguindo o protocolo proposto por Dantas Neto (2020) utilizando kit DNAzol™ (Invitrogen, USA) de acordo com as instruções do fabricante. Para o diagnóstico confirmatório de *P. marinus*, foram utilizados os primers propostos por Audemard et al. (2004), com reações em volume total de 10 µL dos quais: de 5 µL de Platinum™ SYBR™ Green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen, USA), 0,3 µL do primer F PmarITS-70F (5'CTTTTGYTWGAGWGTTGCGAGATG3'), 0,3 µL do primer R PmarITS-600R (5'CGAGTTTGCAGTACCTCKAGAG3'), 0,1 µL de corante de referência ROX, 1 µL de DNA da amostra e 3,3 µL de água ultrapura (Invitrogen, USA). As reações de qPCR foram realizadas utilizando a plataforma ABI 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems, USA). As condições de termociclagem utilizadas foram 50 °C por 2 minutos, 95°C por 2 minutos, seguidas de 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos e 60 °C por 30 segundos de acordo com Livak e Schmittgen (2001). Após o ciclo de qPCR as amostras foram submetidas ao ciclo de melting. Os resultados foram obtidos usando o software 7500 System SDS (Applied Biosystems, USA).

3. Resultados

O tamanho médio das ostras foi de $52,94 \pm 8,65$ mm e $64,45 \pm 8,28$ mm nos estuários do rio Potengi e da laguna de Guaraíras, respectivamente. A temperatura e a salinidade da água variaram de 25 a 26°C e 8 a 34‰ no rio Potengi e de 26 a 27°C e 1 a 36‰ na laguna de Guaraíras. Os ensaios de RFTM mostraram a presença de *Perkinsus* sp. infectando tecidos das ostras *Crassostrea* sp. em ambos os estuários investigados.

As amostras positivas em RFTM ($n = 88$, rio Potengi; $n = 115$, laguna de Guaraíras) foram submetidas à técnica de PCR em tempo real para identificação de *P. marinus*. Os resultados evidenciaram 61 amostras positivas (27 = rio Potengi; 34 = laguna de Guaraíras) por qPCR espécie-específico PmarITS70/600 produzindo fragmentos amplificados de tamanho esperado com curva de dissociação correspondente ao controle positivo e temperatura de melting observada de $80,1 \pm 0,6^\circ\text{C}$ (Fig. 2). As prevalências de animais infectados por *P. marinus* foram de 30,68% (27/88) e 29,56% (34/115) para os estuários do rio Potengi e da laguna de Guaraíras, respectivamente.

4. Discussão

Este é o primeiro registro de ocorrência de *Perkinsus marinus* em ostras nativas do gênero *Crassostrea* nos estuários da costa do Rio Grande do Norte, Brasil, utilizando ensaios de qPCR como diagnóstico confirmatório. Nesse estudo, a biometria das ostras teve como objetivo apenas verificar o tamanho dos animais que seriam submetidos às análises sem relacionar o tamanho com a presença ou ausência do patógeno. Os fatores abióticos possivelmente não influenciaram na ocorrência do protozoário tendo em vista que o mesmo foi detectado em diferentes condições ambientais.

Atualmente, a PCR em tempo real tem se sido uma importante ferramenta para o monitoramento de *Perkinsus* sp. (Umeda e Yoshinaga, 2012; Cui et al., 2018) sendo inclusive utilizada para investigações de co-infecção envolvendo outras espécies de notificação obrigatória por meio de qPCR-duplex (Itoiz et al., 2021). A qPCR apresenta uma maior sensibilidade para avaliar prevalência e intensidade de infecções, rapidez na realização dos ensaios, capacidade de identificação e distinção das espécies e viabilidade de utilização de amostras previamente armazenadas (Gauthier et al., 2006; Faveri et al., 2009). Segundo Ríos et al. (2020), a qPCR pode permitir o diagnóstico não invasivo de *Perkinsus* sp. através da hemolinfa sem sacrificar o animal. Audemard et al. (2004) já haviam demonstrado que a qPCR também poderia ser uma ferramenta poderosa para investigar a abundância de estágios livres

de *P. marinus* no ambiente permitindo a detecção de células infecciosas e não infecciosas, vivas ou mortas, na coluna de água quando os parâmetros do ensaio são otimizados utilizando kits de extração de DNA para amostras de fezes.

Nesta pesquisa os valores das prevalências (30,68% e 29,56%) foram calculados com base nos resultados do diagnóstico molecular. No Brasil, da Silva et al. (2013) registraram 83,33% de prevalência nos ensaios de PCR para o gênero *Perkinsus* e identificaram padrões de restrição correspondentes a *P. marinus* na análise de polimorfismo de fragmento de restrição (PCR-RFLP) em todas as amostras analisadas. Infecções por *P. marinus* em ostras nativas de estuários da Paraíba e de Sergipe apresentaram prevalências de 48% e 64% na PCR-RFLP, respectivamente (Queiroga et al., 2015; Scardua et al., 2017). Da Silva et al. (2014) registraram uma prevalência de 66,66% de *P. marinus* em amostras de ostras *C. gasar* utilizando primers ITS espécie específicos. Em ostras *C. gigas* e *C. gasar* de Santa Catarina foram registradas prevalências de *Perkinsus* sp. de 7 a 100% e 55 a 100%, respectivamente, nos ensaios de PCR e posteriormente identificaram de *P. marinus* por sequenciamento de Sanger (Luz Cunha et al., 2019; Leibowitz et al. 2019). As prevalências de *P. marinus* observados nesse estudo foram menores quando comparadas a maior prevalência (68%) encontrada na ostra *C. virginica* na região costeira do Estado do Maine, EUA, utilizando a qPCR (Marquis et al., 2020). Apesar de ter sido registrado prevalências de até 30,68% em um dos estuários estudados, não foi observado mortalidades que pudessem estar associadas a ocorrência de *P. marinus* durante o período avaliado. Os trabalhos realizados com moluscos da costa brasileira também não evidenciaram mortalidades em populações infectadas (da Silva et al., 2013; da Silva et al., 2014; Queiroga et al., 2015; Scardua et al., 2017; Luz Cunha et al., 2019; Leibowitz et al. 2019).

Nos últimos anos, os registros de *P. marinus* em moluscos bivalves no Brasil se basearam em diagnósticos moleculares através da PCR convencional e PCR-RFLP, com exceção dos trabalhos de Pinto et al. (2017) que utilizaram proteômica como ferramenta diagnóstica e de da Silva et al. (2014) que realizaram a hibridização por fluorescência *in situ* (FISH) como técnica complementar à PCR. Ensaios de qPCR quantitativos são desenvolvidos para detectar e quantificar células de *P. marinus* no tecido de ostras pois apresentam maior sensibilidade ao detectar ostras infectadas diagnosticadas como não infectadas pelo RFTM (Gauthier et al., 2006; Faveri et al., 2009). Nesse estudo, detectamos pela primeira vez *P. marinus* infectando *Crassostrea* sp. dos estuários do Rio Grande do Norte, Brasil, através de ensaios de PCR em tempo real que se mostraram eficientes utilizando primers ITS recomendados para o diagnóstico oficial por PCR convencional (WOAH, 2021). A utilização dessa técnica para o diagnóstico de patógenos de notificação obrigatória é importante pois

contribui para acelerar a tomada de decisões frente a eventos de mortalidade em populações de bivalves cultivados e de bancos naturais.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Centro de Diagnóstico de Enfermidades de Organismos Aquáticos – CEDECAM/LABOMAR/UFC, ao Laboratório de Patologia de Organismos Aquáticos – LABPOA/IFCE, Campus Aracati, e a Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação – PROPPG da Universidade Federal Rural do Semi-Árido - UFERSA pelo apoio para realização deste trabalho.

Referências bibliográficas

- Audemard, C., Reece, K.S., Bureson, E.M. 2004. Real-time PCR for detection and quantification of the protistan parasite *Perkinsus marinus* in environmental waters. Appl Environ Microbiol. 70, 6611-6618. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.11.6611-6618.2004>.
- Cui, Y.-Y., Ye, L.-T., Wu, L. e Wang, J.-Y., 2018. Seasonal occurrence of *Perkinsus* spp. and tissue distribution of *P. olsenii* in clam (*Soletellina acuta*) from coastal waters of Wuchuan County, southern China. Aquaculture. 492, 300–305. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.04.030>.
- da Silva, P.M., Vianna, R.T., Guertler, R.C., Ferreira, L.P., Santana, L.N., Fernández-Boo, S., Ramilo, A., Cao, A., Villalba, A. 2013. First report of the protozoan parasite *Perkinsus marinus* in South America, infecting mangrove oysters *Crassostrea rhizophorae* from the Paraíba river (NE, Brazil), J. Invertebr. Pathol. 113, 96-103. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2013.02.002>.
- da Silva, P.M., Scardua, M.P., Vianna, R.T., Mendonça, R.C., Vieira, C.B., Dungan, C.F., Scott, G.P., Reece, K.S. 2014. Two *Perkinsus* spp. infect *Crassostrea gasar* oysters from cultured and wild populations of the Rio São Francisco estuary, Sergipe, northeastern Brazil, J. Invertebr. Pathol. 119, 62-71. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2014.04.005>.
- Dantas Neto, M.P., Maggioni, R., Nogueira, L.F.F., Forte, J.M., Feijó, R.G., Sabry, R.C. 2020. *Perkinsus* sp. infecting three important mollusks from Jaguaribe river estuary, Ceará, Brazil. Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci. 57, e158316. <https://doi.org/10.11606/issn.1678-4456.bjvras.2020.158316>.
- Enríquez-Espinoza, T.L., Grijalva-Chon, J.M., Castro-Longoria, R., Ramos-Paredes, J. 2010. *Perkinsus marinus* in *Crassostrea gigas* in the Gulf of California. Dis. Aquat. Org. 89, 269-273. <https://doi.org/10.3354/dao02199>.

- Escobedo-Fregoso, C., Arzul, I., Carrasco, N., Gutiérrez-Rivera, J.N., Llera-Herrera, R., Vázquez-Juárez, R. 2015. Polymorphism at the ITS and NTS loci of *Perkinsus marinus* isolated from cultivated oyster *Crassostrea corteziensis* in Nayarit, Mexico and phylogenetic relationship to *P. marinus* along the atlantic coast. *Transbound. Emerg. Dis.* 62, 137-147. <https://doi.org/10.1111/tbed.12090>.
- Faveri, J., Smolowitz, R.M., Roberts, S.B. 2009. Development and validation of a Real-Time Quantitative PCR assay for the detection and quantification of *Perkinsus marinus* in the eastern oyster, *Crassostrea virginica*. *J. Shellfish Res.* 28, 459-464. <https://doi.org/10.2983/035.028.0306>.
- Ford, S.E., Chintala, M.M. 2006. Northward expansion of a marine parasite: Testing the role of temperature adaptation. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 339, 226-235, <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2006.08.004>.
- Ford, S.E., Smolowitz, R. 2007. Infection dynamics of an oyster parasite in its newly expanded range. *Mar. Biol.* 151, 119–133. <https://doi.org/10.1007/s00227-006-0454-6>.
- Gauthier, J., Miller, C., Wilbur, A. 2006. TaqMan® MGB real-time PCR approach to quantification of *Perkinsus marinus* and *Perkinsus* spp. in oysters. *J. Shellfish Res.* 25, 619-624. [https://doi.org/10.2983/0730-8000\(2006\)25\[619:TMRPAT\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.2983/0730-8000(2006)25[619:TMRPAT]2.0.CO;2).
- Itoiz, S., Perennou, M., Mouronvalle, C., Derelle, E., Le Goïc, N., Bidault, A., De Montaudouin, X., Arzul, I., Soudant, P., Chambouvet, A. 2021. Development of duplex TaqMan-based real-time PCR assay for the simultaneous detection of *Perkinsus olseni* and *P. chesapeakei* in host Manila clam tissue samples. *J. Invertebr. Pathol.* 184, 107603. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2021.107603>.
- Lee, M.K., Cho, B.Y., Lee, S.J., Kang, J.Y., Jeong, H.D., Huh, S.H., Huh, M.D. 2001. Histopathological lesions of Manila clam, *Tapes philippinarum*, from Hadong and Namhae coastal areas of Korea. *Aquaculture.* 201, 199–209. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(01\)00648-2](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00648-2).
- Leibowitz M.P., Pereira F.L., Leal C.A.G., Cunha E.A.P., Azevedo V.A.C., Figueiredo H.C.P. 2019. Molecular detection of the pathogenic protist *Perkinsus marinus* in farmed native and introduced oysters (*Crassostrea* spp.) in southern Brazil. *Genet. Mol. Res.* 18, 18015. <https://doi.org/10.4238/gmr18015>.
- Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ Method. *Methods.* 25, 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>.

- Luz Cunha, A.C., Pontinha, V.D.A., De Castro, M.A.M., Sühnel, S., Medeiros, S.C., Moura da Luz, Â.M., Harakava, R., Tachibana, L., Mello, D.F., Danielli, N.M., Dafre, A.L., Magalhães, A.R.M., Mouriño, J.L.P. 2019. Two epizootic *Perkinsus* spp. events in commercial oyster farms at Santa Catarina, Brazil. J. Fish. Dis. 42, 455–463. <https://doi.org/10.1111/jfd.12958>.
- Mackin, J.G., Owen, H.M., Collier, A. 1950. Preliminary note on the occurrence of a new protistan parasite, *Dermocystidium marinum* n. sp. in *Crassostrea virginica* (Gmelin). Science. 111, 328. <https://doi.org/10.1126/science.111.2883.328>.
- Marquis, N.D., Bishop, T.J., Record, N.R., Countway, P.D., Fernández Robledo, J.A. 2020. A qPCR-Based survey of *Haplosporidium nelsoni* and *Perkinsus* spp. in the eastern oyster, *Crassostrea virginica* in Maine, USA. Pathogens. 9, 256. <https://doi.org/10.3390/pathogens9040256>.
- Montes, J., Durfort, M., García-Valero, J. 2001. Parasitism by the protozoan *Perkinsus atlanticus* favours the development of opportunistic infections. Dis. Aquat. Org. 46, 57–66. <https://doi.org/10.3354/dao046057>.
- Pinto, T.R., Boehs, G., Pessoa, W.F.B., Luz, M.S.A., Costa, H. 2017. Detection of *Perkinsus marinus* in the oyster *Crassostrea rhizophorae* in southern Bahia by proteomic analysis. Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci. 53, 1-4. <https://doi.org/10.11606/issn.1678-4456.bjvras.2016.104524>.
- Queiroga, F.R., Vianna, R.T., Vieira, C.B., Farias, N.D., da Silva, P.M. 2015. Parasites infecting the cultured oyster *Crassostrea gasar* (Adanson, 1757) in Northeast Brazil. Parasitology. 142, 756–766. <https://doi.org/10.1017/S0031182014001863>.
- Ray, S.M., 1954. Biological Studies of *Dermocystidium marinum* a Fungus Parasite of Oysters. Rice Institute pamphlet. (Monogr. Biol. Spec. Ser. Iss.), Rice Institute, Washington, DC. <https://scholarship.rice.edu/bitstream/handle/1911/18411/3079846.PDF?sequence=1> (accessed 15 april 2022).
- Ríos, R., Aranguren, R., Gastaldelli, M., Arcangeli, G., Novoa, B., Figueras, A. 2020. Development and validation of a specific real-time PCR assay for the detection of the parasite *Perkinsus olseni*. J. Invertebr. Pathol. 169, 107301. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2019.107301>.
- Sabry, R.C., Rosa, R.D., Magalhães, A.R., Barracco, M.A., Gesteira, T.C.V., da Silva, P.M. 2009. First report of a *Perkinsus* sp. infecting mangrove oysters *Crassostrea rhizophorae* of the Brazilian coast. Dis. Aquat. Org. 88, 13–23. <https://doi.org/10.3354/dao02136>.
- Scardua, M.P., Vianna, R.T., Duarte, S.S., Farias, N.D., Correia, M.L.D., Santos, H.T.A.D., da Silva P.M. 2017. Growth, mortality and susceptibility of oyster *Crassostrea* spp. to *Perkinsus* spp. infection during on growing in northeast Brazil. Rev. Bras. Parasitol. Vet. 26, 401-410. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612017061>.

- Umeda, K. e Yoshinaga, T. 2012. Development of real-time PCR assays for discrimination and quantification of two *Perkinsus* spp. in the Manila clam *Ruditapes philippinarum*. Dis. Aquat. Org. 99, 215–225. <https://doi.org/10.3354/dao02476>.
- Villalba, A., Reece, K.S., Camino Ordás, M., Casas, S.M., Figueras, A., 2004. Perkinsosis in molluscs: A review. Aquat. Living Resour. 17, 411–432. <https://doi.org/10.1051/alr:2004050>.
- Villanueva-Fonseca, L., García-Ulloa, M., López-Meyer, M., Villanueva-Fonseca, B., Hernández-Sepúlveda, J., Muñoz-Sevilla, N., Góngora-Gómez, A. 2020. *Perkinsus marinus* in the pleasure oyster *Crassostrea corteziensis* cultivated on the northeast coast of the Gulf of California, Mexico. Lat. Am. J. Aquat. Res. 48, 529-537. <https://doi.org/10.3856/vol48-issue4-fulltext-2463>.
- WOAH. 2021. Infection with *Perkinsus marinus*. Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals. 2.4.5, 461-472. https://www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Health_standards/aahm/current/2.4.05_P_MARI_NUS.pdf (accessed 15 feb 2022).
- WOAH. 2022. Infection with *Perkinsus marinus*. Aquatic animal health code. 11.5, 1-6. https://www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Health_standards/aahc/current/chapitre_perkinsus_marinus.pdf (accessed 10 aug 2022).

6. Apêndices

A.

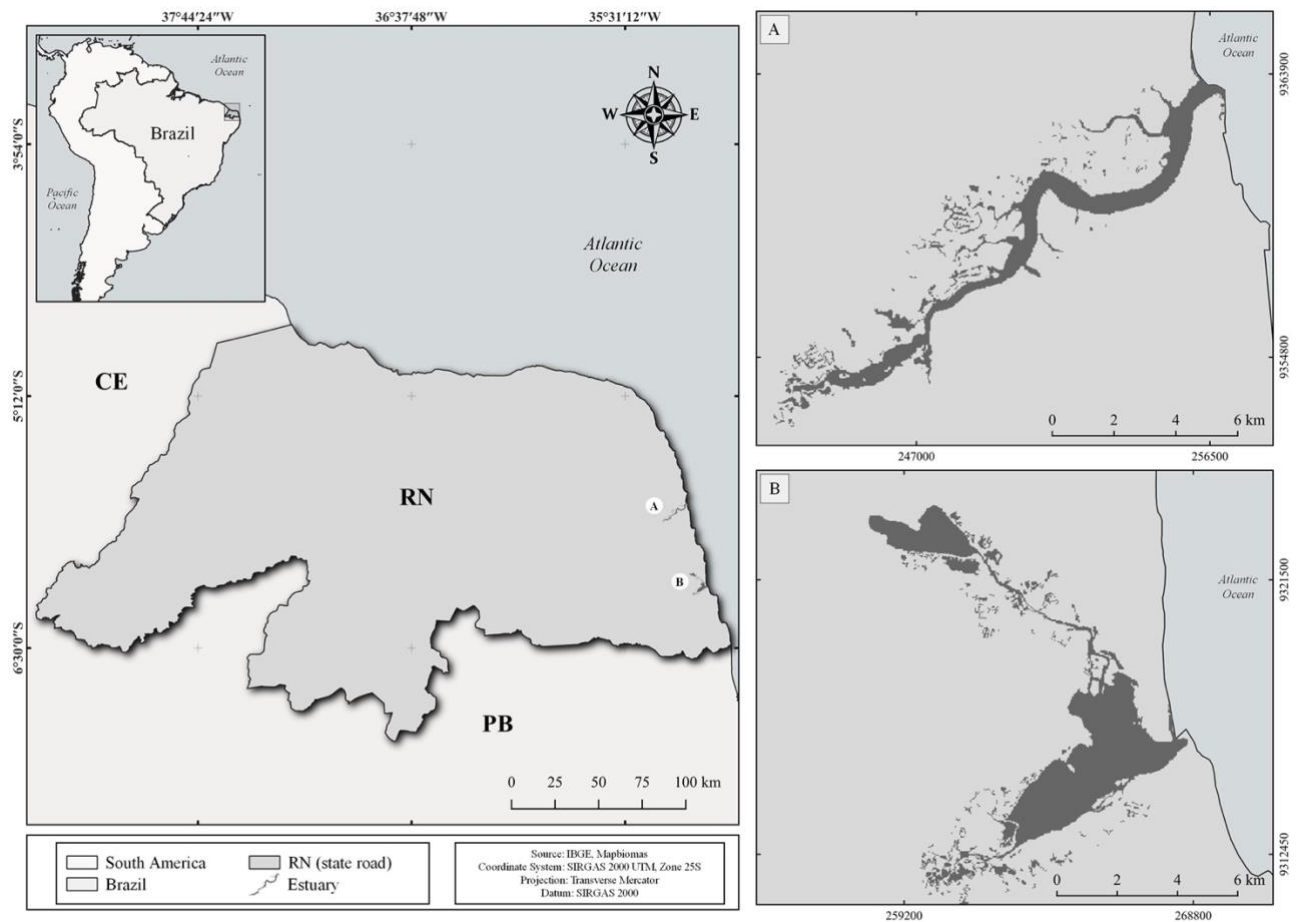


Fig. 1. Localização dos estuários amostrados na região litorânea do Rio Grande do Norte, Brasil.

(A) Estuário do rio Potengi, Natal; (B) Estuário da Lagoa Guaraíras, Tibau do Sul.

B.

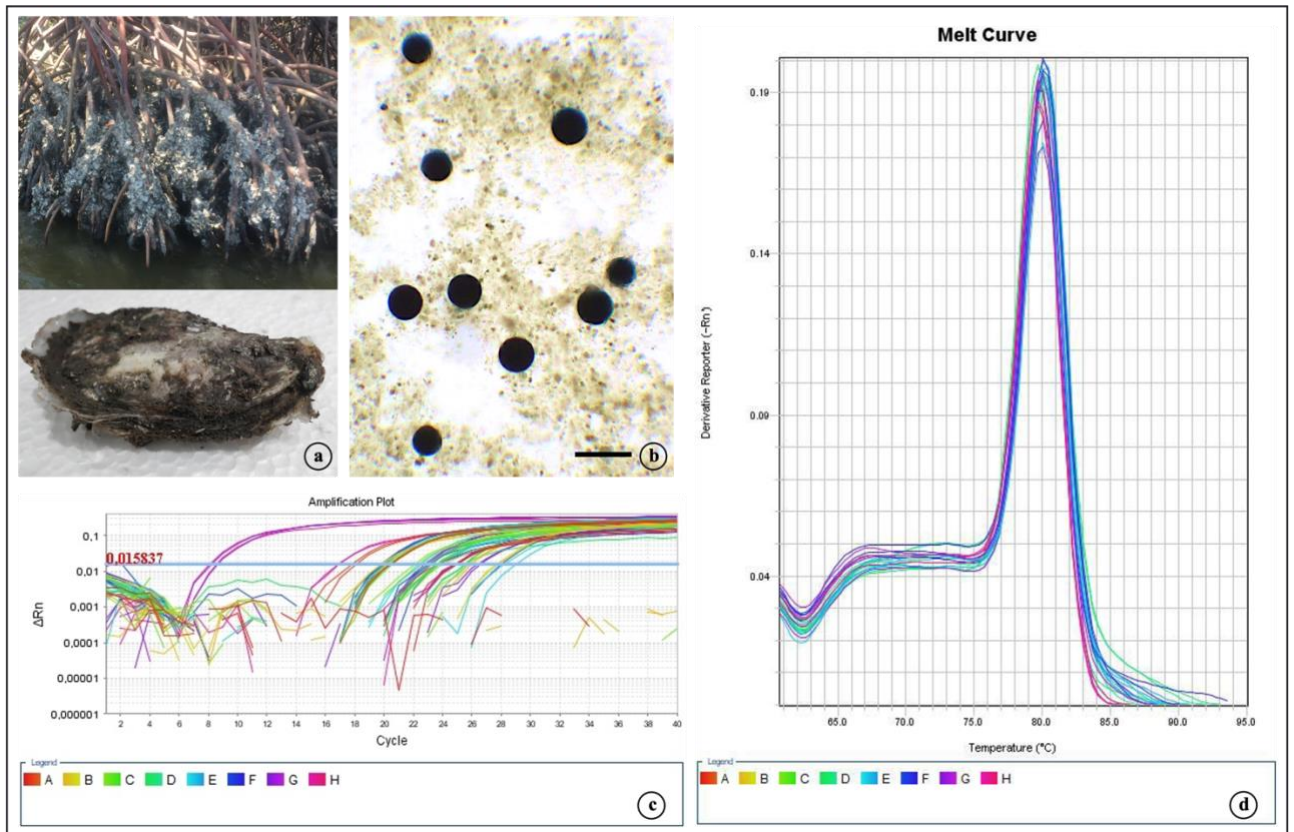


Fig. 2. (a) *Crassostrea* sp. coletada da raiz de *Rhizophorae mangle*; (b) hipnósporos em tecidos de brânquias e reto após incubação por RFTM e corados por lugol (2%) (Bar = 100µm); (c) perfil de amplificação de fragmentos da região ITS de *P. marinus* do controle positivo e amostras testadas (A-H); (d) Curva de melting do controle positivo e das amostras (D-H).

CAPÍTULO 3 – DETECÇÃO DE *Perkinsus* spp. INFECTANDO A OSTRÁ DE MANGUE *Crassostrea* sp. DE BANCOS NATURAIS EM ESTUÁRIOS DA COSTA NORDESTE DA AMÉRICA DO SUL

(Original research paper)

ARTIGO SUBMETIDO NO PERÍODICO
RESEARCH IN VETERINARY SCIENCE

QUALIS: Quadriênio 2013-2016: A2
FATOR DE IMPACTO (2022): 2.554

Detecção de *Perkinsus* spp. infectando a ostra de mangue *Crassostrea* sp. de bancos naturais em estuários da costa nordeste da América do Sul

Célio Souza da Rocha^a; Rachel Costa Sabry^b; Rodrigo Maggioni^c; Rafael dos Santos Rocha^c; Cecilia Calabuig^a; Aldevan de Lima Silva^b; João Marcelo Azevedo de Paula Antunes^{a,*}

^a Universidade Federal Rural do Semi-Árido – Av. Francisco Mota, 572 - Costa e Silva, Mossoró - RN, CEP: 59625-900, Brasil.

^b Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia do Ceará, Campus Aracati, Rodovia CE-040 km 139, CEP 62800-000 Aracati, CE, Brazil

^c Instituto de Ciências do Mar, Universidade Federal do Ceará, Av. da Abolição, 3207 – Meireles, CEP: 60165-081 Fortaleza, CE, Brazil

* Autor para correspondência: joao.antunes@ufersa.edu.br

celiorocha.vet@hotmail.com

rachelsabry@ifce.edu.br

rafaelsanro@ufc.br

maggioni@ufc.br

cecicalabuig@ufersa.edu.br

audevanlima94@gmail.com

Resumo

O avanço da dispersão de *Perkinsus* sp. em moluscos bivalves da costa atlântica da América do Sul mostra a capacidade desse protozoário de se adaptar a condições ambientais diversas e de infectar uma ampla variedade de espécies de moluscos refletindo assim um risco eminente aos ecossistemas e cultivos locais. Esse estudo avaliou a ocorrência de *Perkinsus* sp. infectando ostras de mangue *Crassostrea* sp. nos estuários do Rio Potengi e da Laguna de Guaraíras no Estado do Rio Grande do Norte, Brasil. O diagnóstico foi feito através de incubação em meio fluido de tioglicolato de Ray (RFTM), zoosporulação, histologia, PCR e sequenciamento. Os estuários apresentaram dinâmicas de infecção diferentes e Guaraíras pareceu mais sensível às mudanças sazonais. As análises dos fatores abióticos indicaram que as infecções tiveram uma relação negativa com a salinidade sendo maiores nos pontos de coleta com médias de salinidade mais baixas. As análises histológicas e os ensaios de zoosporulação detectaram a presença de diferentes estágios de vida de *Perkinsus* sp. De 1200 ostras coletadas, 308 foram positivas no RFTM e, das 203 ostras selecionadas para o diagnóstico molecular, 38 foram positivas nos

ensaios de PCR gênero-específicos. As sequências ITS identificadas apresentaram similaridades de 99,98 a 100% para *P. marinus* e 97,83 a 100% para *P. beihaiensis* e as análises de Neighbor-Joining indicaram uma maior proximidade filogenética com as sequências ITS de *P. marinus* do México e de *P. beihaiensis* do Panamá e do Brasil. Os resultados confirmaram a presença do protozoário de notificação obrigatória *P. marinus* infectando *Crassostrea* sp. nesses estuários e registraram a primeira ocorrência de infecções por *P. beihaiensis* na costa do Rio Grande do Norte, Brasil.

Palavras-chaves: *Perkinsus marinus*, *P. beihaiensis*, *Crassostrea* sp.

1. Introdução

A crescente disseminação de patógenos no ambiente marinho tem sido bastante evidenciada nas últimas décadas. A cada dia são registradas novas ocorrências de espécies parasitas infectando populações livres de doenças e trazendo um alerta ao mundo pois algumas delas representam grandes ameaças ecológicas e econômicas devido à sua capacidade de invasão geográfica e patogenicidade. Os protozoários do gênero *Perkinsus* são exemplos de patógenos cosmopolitas com extensa gama de hospedeiros infectados e alta capacidade de se tornarem espécies invasoras bem-sucedidas pois podem causar novas patologias com impactos negativos para as populações de moluscos locais (Itoiz et al., 2022). Desde o primeiro caso descrito de mortalidade em massa de ostras do Golfo do México, EUA, infectadas por *Perkinsus marinus* (Mackin et al., 1950), novas espécies e novos surtos graves foram registrados em várias partes do mundo (Lester e Davis, 1981; Blackbourn et al., 1998; McLaughlin et al., 2000; Casas et al., 2004; Dungan e Reece, 2006; Moss et al., 2008; Choi e Park, 2010; Feng et al., 2013; Itoh et al., 2019; Villanueva-Fonseca et al., 2020; Cho et al., 2022).

A investigação sobre a ocorrência de *Perkinsus* sp. em moluscos é uma importante ferramenta para monitorar a dispersão e compreender a dinâmica das populações afetadas frente às ameaças impostas pela ação desses patógenos, principalmente *P. marinus* e *P. olseni*, duas espécies altamente virulentas e de notificação obrigatória segundo a Organização Mundial para Saúde Animal – WOAHA (fundado como OIE) (2022). Dentre as sete espécies reconhecidas de *Perkinsus* sp. (Gleason et al., 2017), quatro já foram identificadas infectando moluscos bivalves na costa atlântica da América do Sul: *P. olseni*, *P. marinus*, *P. beihaiensis* e *P. chesapeaki*.

O primeiro registro sul-americano de *P. olseni* ocorreu na costa sudoeste do Atlântico infectando populações naturais do bivalve *Pitar rostrata* (Veneridae) do Uruguai (Cremonte et al., 2005). Na costa tropical brasileira, populações de ostras *Crassostrea gasar* de

bancos naturais e de cultivo foram infectadas por *P. olseni* no estuário do Rio São Francisco, Sergipe (SE) (da Silva et al., 2014) e do Rio Mamanguape, Paraíba (PB) (Queiroga et al., 2015). Recentemente, *P. olseni* foi detectado infectando mexilhões *Mytilus chilensis* cultivados na Bahia Brown do Canal de Beagle, Argentina, costa sudoeste do Atlântico, a faixa de distribuição mais ao sul onde este patógeno já foi encontrado (Vázquez et al., 2022). Os registros de *P. marinus* na América do Sul estão concentrados principalmente na região nordeste do Brasil infectando ostras nativas *Crassostrea rhizophorae* e *Crassostrea gasar* (da Silva et al., 2013 e 2014; Queiroga et al., 2015; Pinto et al., 2017; Scardua et al., 2017) e região Sul no Estado de Santa Catarina (SC) (Luz Cunha et al., 2019; Leibowitz et al. 2019), onde ostras *Crassostrea gigas* cultivadas também foram infectadas. Ao longo da costa brasileira, além das espécies de notificação obrigatória, *P. beihaiensis* foi a primeira espécie identificada no país infectando predominantemente ostras *C. rhizophorae* e *C. gasar* (Sabry et al., 2009 e 2013; Queiroga et al., 2015; Luz et al., 2018; Dantas Neto et al., 2016 e 2020), ostras *C. gigas* (Luz Cunha et al., 2019) e o berbigão *Anomalocardia brasiliiana* (Pinho Ferreira et al., 2015). Vale ressaltar ainda que o único registro de infecções por *P. chesapeaki* na América do Sul ocorreu no Brasil em ostras *C. rhizophorae* de bancos naturais no estuário do Rio Jaguaribe, Ceará (CE) (Dantas Neto et al., 2016). É importante destacar que os únicos casos de co-infecção registrados na América do Sul foram entre *P. marinus* e *P. olseni* infectando *C. gasar* (da Silva et al., 2014) e entre *P. marinus* e *P. beihaiensis* infectando *C. gasar* e *C. rhizophorae* (Scardua et al., 2017), ambos no Brasil.

Na região costeira do Estado do Rio Grande do Norte (RN), conhecida como “esquina da América do Sul” e localizada no limite nordeste da costa sul-americana, região do continente mais próxima da Europa e da África, a ocorrência de *Perkinsus* sp. em moluscos bivalves de bancos naturais ou de cultivo ainda é pouco estudada. Silva et al. (2017) relataram a ocorrência de hipnósporos semelhantes a *Perkinsus* sp. infectando *C. rhizophorae* em Porto do Mangue, RN, e estudos moleculares confirmaram a presença de protozoários do gênero *Perkinsus* em ostras *C. gasar* produzidas em laboratório e cultivadas em tanques escavados abastecidos por águas estuarinas (da Silva et al., 2016), porém a espécie não foi identificada. O objetivo dessa pesquisa foi investigar a ocorrência de *Perkinsus* sp. em ostras de mangue *Crassostrea* sp. nos estuários do Rio Potengi e da Laguna de Guaraíras no Estado do Rio Grande do Norte, Brasil.

2. Materiais e métodos

2.1. Amostragens dos animais

Amostras de ostras de mangue *Crassostrea* sp. de bancos naturais foram coletadas em dois estuários da costa litorânea do Rio Grande do Norte, estuário do Rio Potengi na cidade de Natal e estuário da Laguna de Guaraíras, parte do complexo lagunar Nísia Floresta – Papeba – Guaraíras em Tibau do Sul (Fig. 1). As coletas ocorreram durante as marés baixas no período chuvoso (março e abril) e seco (setembro e outubro) do ano de 2019. Foram estabelecidos dois pontos de coleta (p) para cada estuário: Rio Potengi p1 (S05°45'25,80", W035°12'47,24") e p2 (S05°46'02,56", W035°13'00,39"); Laguna de Guaraíras p3 (S06°12'12,13", W035°07'09,88") e p4 (S06°12'56,99", W035°09'24,77"). O número amostral foi composto de 150 indivíduos adultos de diferentes tamanhos, selecionados de maneira aleatória em cada ponto de coleta. As ostras foram coletadas manualmente das raízes de *Rhizophorae mangle* e enviadas ao laboratório, perfazendo 300 animais/estuário/período totalizando 1.200 animais investigados. A salinidade e a temperatura foram mensuradas de maneira pontual no mesmo dia da coleta em cada ponto selecionado utilizando refratômetro para leitura da concentração em partes por mil (‰) de sal dissolvido e termômetro flutuante para medição de temperatura de superfície da água estuarina e assim avaliar uma possível influência desses fatores sobre a prevalência das infecções.

Após as amostragens os animais foram submetidos as técnicas de diagnóstico oficiais preconizados para a detecção de *Perkinsus* sp. (WOAH, 2021). Inicialmente as ostras foram limpas, mensuradas suas alturas de concha segundo Galtsoff (1964), examinadas externamente e em seguida abertas para análises macroscópicas e registro de parasitas e alterações patológicas nos tecidos moles. Todos os animais tiveram tecidos incubados em meio fluido de tioglicolato de Ray (RFTM) para detecção de *Perkinsus* sp., 30 ostras de cada ponto de coleta tiveram tecidos fixados para análise histológica e amostras positivas foram submetidas a zoosporulação *in vitro* e ensaios moleculares.

A coleta das ostras e os procedimentos experimentais foram realizados sob autorização número 64278-4, concedida pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade – ICMBio/MMA e o estudo aprovado no Comitê de Ética e Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal Rural do Semi-Árido – UFERSA, sob o parecer número 34/2022.

2.2. Incubação dos tecidos em meio fluido de tioglicolato de Ray (RFTM)

Amostras de tecido de reto e brânquias de cada animal foram seccionadas, armazenadas em microtubos de ensaio e incubadas em 1 ml de meio de cultura (RFTM)

suplementado com 1 µl de antibióticos (penicilina e estreptomicina) e 1 µl de antifúngico (nistatina) por um período de sete dias em local escuro e temperatura ambiente (Ray, 1954). Após esse período os fragmentos de tecidos foram colocados em lâmina de vidro, macerados, adicionado uma gota de solução de Lugol (2%), cobertos por uma lamínula e mantidos em repouso por 10 minutos (min). A preparação foi examinada por microscopia óptica para avaliação da presença ou ausência de hipnósporos de *Perkinsus* sp. os quais são caracterizados pelo aspecto morfológico circular e coloração escurecida preto-azulado. A prevalência, definida como a relação entre o total de indivíduos parasitados e o total coletado, foi calculada conforme Bush et al. (1997). A intensidade da infecção com base na escala semiquantitativa de Mackin modificada (Sabry et al., 2009) foi estimada usando valores numéricos de grau de infecção de 0 a 4 (0 = negativo, 1 = muito leve, 2 = leve, 3 = moderada e 4 = alta) onde os indivíduos foram considerados positivos quando a intensidade da infecção foi ≥ 1 . As médias das intensidades de infecção foram calculadas considerando o desvio padrão ($\pm$ DP).

2.3. Análises estatísticas

Foram realizadas análises não paramétricas para verificar se houve diferença significativa na ocorrência de *Perkinsus* sp. no RFTM entre estuários, estações e pontos de coleta através de modelos lineares generalizados (GLZ) de comparação de médias para variável dependente com distribuição binomial e função logit. As diferenças de salinidade entre os pontos de coleta foram avaliadas por GLZ de comparação de médias. A relação entre a ocorrência do protozoário e as salinidades mensurados foi avaliada por GLZ de regressões com distribuição binomial e função logit. Todas as análises estatísticas foram realizadas usando Statistica™ versão 18 (Statsoft, EUA). Foram considerados significativos os resultados com 95% de confiança.

2.4. Análises histológicas

Em cada ponto dos estuários 30 ostras das 150 coletadas por período foram submetidas a um corte transversal para extração de parte do corpo mole do animal contendo parte da gônada, glândula digestiva, brânquias e manto. Em seguida os tecidos foram fixados em solução de Davidson (Shaw e Battle, 1957) por 24 horas (h), transferidos para álcool 70%, desidratados em uma série gradativa de álcool até 100%, diafanizados em xilol e impregnados em parafina histológica a 60°C. Cortes de 5 µm de espessura foram feitos em micrótomo manual e em seguida corados com hematoxilina e eosina modificada de Harris (Howard et al.,

2004). Os cortes foram analisados em microscópio óptico e fotomicrografados com câmera Moticam 1080 (Motic, China).

2.5. Zoosporulação de *Perkinsus* sp.

Para os ensaios de zoosporulação foram selecionados seis animais severamente infectados na técnica de incubação em RFTM para indução da propagação *in vitro* de *Perkinsus* sp. e monitoramento de células em proliferação. Os tecidos foram transferidos assepticamente dos tubos eppendorfs com RFTM para placas de Petri contendo 2 ml de água do mar esterilizada filtrada (FSSW), macerados suavemente para liberação de hipnósporos no meio, os fragmentos mais espessos foram removidos e as placas incubadas por 48 a 96 h em temperatura ambiente. A cada 24 horas era retirada uma amostra usando pipeta pasteur estéril, colocada em lâmina, examinada por microscopia de luz e fotomicrografada.

2.6. Extração de DNA e Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Para o diagnóstico molecular de *Perkinsus* sp. foram selecionadas aleatoriamente amostras positivas no RFTM com diferentes intensidades de infecção em todos os pontos de coleta. As amostras de tecido de brânquias foram previamente extraídas e congeladas a uma temperatura de -20°C e conservadas em solução de álcool etílico 95% (v/v). O protocolo de extração do DNA genômico foi realizado de acordo com Dantas Neto (2020) utilizando kit DNAzol™ (Invitrogen, USA) seguindo as instruções do fabricante. Logo em seguida foi realizada a quantificação e análise de pureza do DNA por espectrofotometria através de aparelho NanoDrop Lite Spectrophotometer (Thermo Fischer Scientific, USA) em 260nm.

Para PCR, os primers utilizados na reação (PerkITS 85/750) foram sintetizados a partir da região do espaço transcrito interno (ITS) da unidade gênica de RNA ribossômico (rRNA) conservada em todas as espécies de *Perkinsus*, exceto *P. qugwadi*, e diferente de sequências ITS de outros organismos (Casas et al., 2002). As reações de PCR foram realizadas, utilizando-se 1× de tampão 10×, 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de primer forward (F) PerkITS-85 (5'CCGCTTTGTTTGGATCCC3') e 0,2 mM de primer reverse (R) PerkITS-750 (5'ACATCAGGCCTTCTAATGATG3'), 0,2 mM de dNTP, 1U de enzima Taq DNA polimerase para um volume final de 12,5 µL. Foi utilizada a plataforma Veriti™ 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems, USA) e as condições de termociclagem seguiram os padrões oficiais da WOA (2021) iniciando por uma desnaturação inicial a 95°C por 4 min, em seguida por 40 ciclos de amplificação a 95°C por 1 min, 55°C por 1 min, 72°C por 1 min com uma extensão final a 72°C por 10 min produzindo fragmentos amplificados de

aproximadamente 703 pares de base (pb). Após a amplificação as amostras foram submetidas a eletroforese em gel de agarose 1,5% (p/v) por 60 min a 120V. O gel foi fotodocumentado por luz ultravioleta (UV) em transluminador Kodak™ modelo EDAS 290 (Kodak, USA).

2.7. Sequenciamento e análises filogenéticas

Os fragmentos amplificados por PCR do gene ITS de cada amostra positiva foram purificados usando ExoSAP-IT™ PCR product Cleanup. Para a reação de sequenciamento, foi utilizado BigDye Terminator v3.1 cycle sequencing Kit (Thermo Fischer Scientific, USA). O programa de termociclagem consistiu em desnaturação inicial a 95°C por 1 min, seguida de 25 ciclos de amplificação a 95°C por 5 segundos (s), 50°C por 30 s e 60°C por 4 min. A reação de sequenciamento foi realizada em sequenciador automático capilar 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA). Ao final os resultados eletroferograma das amostras foram salvos na extensão .ab1.

Múltiplos alinhamentos baseados na região ITS de *Perkinsus* sp. foram realizados usando sequências obtidas neste estudo a fim de se verificar o nível de similaridade entre elas e entre as sequências ITS depositados no GenBank através da ferramenta básica de busca de alinhamento local (BLAST) (Altschul et al. 1990). Para a avaliação da proximidade taxonômica uma árvore filogenética foi construída através de teste estatístico Neighbor-Joining (Saitou e Nei, 1987), usando o modelo de distância Kimura 2 - parâmetros (Kimura et al., 1980), com bootstrap de 1000 repetições (Felsenstein, 1985) no software MEGA versão X (Kumar et al., 2018). Na análise, foram usadas as sequências públicas de *P. marinus* (KJ608232, KP160930, EU919508 e GQ861511), *P. beihaiensis* (KP160919, JX502840, LC437317 e KU172668) *P. olsenii* (AY820757 e LC656362), *P. chesapeakei* (AY876306 e KF314812), *P. mediterraneus* (AY487842 e DQ370491), *P. honshuensis* (DQ516700) e *P. qugwadi* (AF151528) que atuou como grupo externo.

3. Resultados

3.1. Fatores abióticos, biometria e análises macroscópicas

As temperaturas da água nos pontos de coleta nos dois estuários variaram de 25,5 a 26,5°C no período chuvoso e de 25 a 27°C no período seco. A salinidade no estuário do Rio Potengi no período chuvoso foi de 8 e 28‰ enquanto no período seco foi de 10 e 34‰ em p1 e p2, respectivamente. No estuário da Laguna de Guaraíras as salinidades em p3 e p4 foram de 25 e 1‰ e 36 e 22‰ nos períodos chuvoso e seco, respectivamente. A altura média da concha

($\pm$ DP) das ostras variou de $48,87 \pm 8,87$ a $60,09 \pm 7,87$ mm no Rio Potengi e de $60,87 \pm 5,91$ a $68,25 \pm 9,58$ mm na Laguna de Guaraíras (Tab. 1).

As análises macroscópicas das ostras evidenciaram a ocorrência de *fouling* na parte externa das conchas provocados por organismos epibiontes principalmente pequenos crustáceos *Balanus* sp., perfurações na parte externa e tubos escurecidos na parte interna da concha evidenciando infestações por poliquetas *Polydora* sp., presença de planária *Stylochoplana* sp. no interior de algumas ostras e crustáceo endossimbionte *Zaops streus* em situação de comensalismo. Em alguns animais também foram observados retração tecidual, palidez e edema de manto.

3.2. Detecção de *Perkinsus* sp. por RFTM

Estruturas esféricas coradas em preto-azulado semelhantes a hipnósporos aumentados característicos de *Perkinsus* sp. (Fig. 2A e 2B) com tamanhos variando entre 11,65 e 82,30 μ m de diâmetro foram observadas nos fragmentos de tecidos. No Rio Potengi a prevalência foi de 14,66% no período chuvoso e 20,66% no período seco. Na Laguna de Guaraíras as prevalências foram de 49% e 18,33% nos períodos chuvoso e seco, respectivamente. Com relação aos pontos de coleta, as prevalências de *Perkinsus* sp. no Rio Potengi foram de 16% (p1) e 13,33% (p2) e de 33,33% (p1) e 8% (p2) nos períodos chuvoso e seco, respectivamente. Em Guaraíras, no período chuvoso a prevalência foi de 30,66% e 67,33% e no período seco foi de 11,33% e 25,33% para os pontos p3 e p4, respectivamente. As intensidades de infecção no período chuvoso variaram de leve a moderado (2-3) em p1, leve a alta em p2 (2-4), muito leve a leve (1-2) em p3 e muito leve a alta (1-4) em p4. No período seco, as intensidades variaram de leve a alta em p1 (2-4), muito leve a leve (1-2) em p2, muito leve a alta em p3 (1-4) e leve a alta em p4 (2-4).

3.3. Estatística

Somente houve diferença significativa na ocorrência de *Perkinsus* sp. pelo RFTM entre os estuários durante o período chuvoso onde a prevalência na Laguna de Guaraíras foi maior (Wald $X^2(1) = 3.6822$; $p = 0.05500$) (Graf. 1A). O único estuário que apresentou diferença significativa na ocorrência de *Perkinsus* sp. pelo RFTM entre as estações também foi o Guaraíras, sendo maior no período chuvoso (Wald $X^2(1) = 59.377$; $p = 0.00000$). Entre os pontos de coleta, a ocorrência de *Perkinsus* sp. foi significativamente maior em p1 no Rio Potengi e em p4 na Laguna de Guaraíras (Wald $X^2(3) = 96.122$; $p = 0.0000$) (Graf. 1B). As médias de salinidade foram estatisticamente diferentes entre p1 e p2 e entre p3 e p4 (Wald

$X^2(3)=5584.3$, $p<0.001$) (Graf. 1C). Foi observada uma relação negativa da maior ocorrência de *Perkinsus* sp. com a menor média de salinidade em p1 e p4 (Wald $X^2(1) = 107,2$; $p < 0.001$).

3.4. Histologia

As análises histológicas detectaram a presença de células de *Perkinsus* sp. em tecidos de brânquias e no túbulo digestivo de *Crassostrea* sp. (Fig. 3A e 3C). Presença de trofozoítos com forma de “anel de sinete” com núcleo excêntrico e grande vacúolo medindo de 2,35 a 3,25 μm além de esquizontes exibindo arranjos típicos de roseta com 4 a 6 células medindo aproximadamente de 6 a 10 μm (Fig. 3B) também foram observados nos filamentos branquiais. O tecido epitelial do túbulo digestivo repleto de esquizontes fagocitados e infiltração hemocítica foi acompanhado pela perda das estruturas teciduais subjacentes (Fig. 3C). Foi possível observar claramente a ocorrência de fagossomo bem característico com núcleo marginalizado de um hemócito fagocitando um esquizonte (Fig. 3D). As prevalências de p1 e p2 (Potengi) no período chuvoso foram de 10% em ambos os pontos enquanto p3 e p4 (Guaraíras) foram de 10% e 70%, respectivamente. Durante o período seco as prevalências no Potengi foram de 26,66% em p1 e 13,33% em p2 enquanto Guaraíras obteve 10% em p3 e 33,33% em p4.

3.5. Zoosporulação

Os ensaios de zoosporulação *in vitro* mostraram a presença de diferentes estágios de vida de *Perkinsus* sp. nas primeiras 48 h após a incubação em FSSW, com maior frequência de prezoosporângios (Fig. 4A) e zoosporângios com divisão celular interna (Fig. 4B). Após 96 h foram observados zoosporângios apresentando tubo de descarga e liberando zoósporos livres (Fig. 4C) e vista geral evidenciando intensa atividade de divisão celular proliferativa com esquizontes de 4 ou mais células, hipnósporos com núcleo excêntrico e zoosporângios maduros (Fig. 4D).

3.6. Análises moleculares

Do total de 308 animais positivos no RFTM foram selecionadas 203 amostras (88 no Potengi e 115 em Guaraíras) das quais 38 foram positivas para *Perkinsus* sp. nos ensaios de PCR, sendo no estuário do Potengi 5 animais no período chuvoso e 4 no seco, enquanto em Guaraíras um total de 26 e 3 no período chuvoso e seco, respectivamente.

As amostras selecionadas para o sequenciamento apresentaram sequências ITS para *P. marinus* com similaridade de 99,98 a 100% e 97,83 a 100% de identidade com sequências

de *P. beihaiensis*. As sequências ITS identificadas neste estudo estão em processo de registro no banco de dados GenBank para obtenção dos números de acesso. A árvore filogenética construída pelo método estatístico Neighbor-Joining e modelo de Kimura 2-parâmetros revelou uma proximidade genética dos isolados às sequências depositadas no banco genômico público do GenBank. Foi possível observar que as espécies agruparam entre si em clados distintos, revelando um bom uso da região ITS como marcador genético para diferenciação (Fig. 5).

4. Discussão

Este estudo registrou a ocorrência de duas espécies de *Perkinsus* spp. infectando ostras nativas *Crassostrea* sp. nos estuários do Rio Grande do Norte, Brasil. A espécie de notificação obrigatória *P. marinus* foi identificada tanto no estuário do Rio Potengi quanto no estuário da Laguna de Guaraíras, enquanto *P. beihaiensis* foi detectado somente em Guaraíras. Desde 2005, na América do Sul, pesquisas reportam a presença de protozoários do gênero *Perkinsus* infectando moluscos bivalves de bancos naturais e de cultivo em diferentes condições ambientais. As temperaturas da superfície da água entre os pontos de coleta diferiram $\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ no período chuvoso e $\pm 1^{\circ}\text{C}$ no período seco em ambos os estuários e a variação nos pontos chegou a $\pm 1^{\circ}\text{C}$ entre as estações com máxima de 27°C e mínima de 25°C ao longo do ano, dentro do esperado para o Atlântico tropical (Lins et al., 2013). As salinidades nos pontos de coleta considerando os dois estuários variou de 1‰ a 28‰ no período chuvoso e 10‰ a 36‰ no período seco. Esta variação foi devido à quadra chuvosa na região onde estes estuários receberam um grande aporte de água fluvial. Curiosamente este padrão de comportamento pode ter influenciado na prevalência de *Perkinsus* sp. como será discutido em seguida.

A presença de pequenos crustáceos comensais na parte externa e interna das ostras evidenciou o importante papel desses bivalves no ecossistema. O parasitismo causado por *Polydora* sp. foi predominante dentre todos os parasitas e comensais encontrados durante as análises macroscópicas. A poliqueta causou perfurações externas na concha, galerias e bolhas de lodo nas valvas internas além de danos teciduais, fatores que podem afetar a sobrevivência e depreciar o valor de mercado desse molusco (Wargo e Ford, 1993; Read, 2010).

De maneira geral a aparência física dos tecidos moles não apresentou alterações aparentes que pudessem estar associadas à infecção por *Perkinsus* sp. Vale ressaltar que ainda durante as análises macroscópicas poucos animais apresentaram condições patológicas caracterizadas por palidez e retração tecidual. De acordo com Smolowitz (2013), hospedeiros

altamente infectados por *P. marinus* podem apresentar degenerações como tecidos moles visivelmente aquosos e finos, semelhantes a outras enfermidades, sendo muito difícil diferenciá-los dos animais não infectados. A ocorrência de edema de manto em algumas ostras pode estar associada a uma disfunção osmótica a qual foram submetidas devido as reduzidas taxas de salinidade da água ou variações abruptas entre as estações. A maioria dos invertebrados marinhos são osmoconformadores e regulam a osmolaridade do líquido extracelular de acordo com o ambiente. Hosoi et al. (2003), relataram um aumento acentuado do teor de exsudado do manto de *C. gigas* quando expostas a condições de hipo-osmolaridade seguido de uma redução gradual quando retornadas à condição de salinidade inicial. No habitat natural esse estresse osmótico pode ser observado principalmente em organismos intertidais de ambientes estuarinos que enfrentam flutuações de salinidade influenciadas pela variação das marés, volume de água doce dos rios e precipitações prolongadas.

Os resultados dos ensaios do cultivo em RFTM mostraram hipnósporos de *Perkinsus* sp. infectando os tecidos das ostras analisadas em diferentes prevalências e intensidades de infecção. No Rio Potengi a prevalência foi maior durante o período seco (20,66%), porém sem diferença significativa quando comparada ao período chuvoso (14,66%). Na Laguna de Guaraíras a prevalência foi significativamente maior no período chuvoso (49%) do que no seco (18,33%). Não houve diferença significativa entre as prevalências de *Perkinsus* sp. entre os estuários durante o período seco, porém no chuvoso a prevalência foi significativamente maior em Guaraíras. Isso demonstra que os estuários apresentaram dinâmicas de infecção diferentes entre os períodos e entre si onde as infecções no estuário da Laguna de Guaraíras se mostraram mais sensíveis às mudanças sazonais quando comparadas ao Rio Potengi. Os dois estuários avaliados apresentam características distintas com relação a pressão antrópica exercida sobre eles. O estuário do Rio Potengi localizado na capital do Estado não possui atividade de cultivo de ostras e é margeado pela cidade recebendo descargas de efluentes das residências, propriedades de carcinicultura e apresenta um porto com fluxo internacional de navios. O estuário da Laguna de Guaraíras está localizado numa área de proteção ambiental cercada por vegetação nativa e algumas propriedades de carcinicultura, porém apresenta áreas de cultivo dentro do estuário que recebem o aporte de sementes de outros estuários ou laboratórios de forma jovem e essas características podem colaborar para uma ocorrência significativamente maior de *Perkinsus* sp. nesse estuário quando comparado ao Rio Potengi. Os pontos de coleta com médias de salinidades mais baixas (p1 e p4) curiosamente apresentaram maiores médias de prevalência e intensidades de infecção. Foi observada uma relação negativa com a salinidade um contraponto aos resultados encontrados por Luz et al.

(2018) que demonstraram uma correlação positiva da salinidade com a prevalência e a intensidade da infecção em *Crassostrea* sp. da Baía de Camamu, Bahia (BA).

A salinidade e a temperatura por muito tempo foram identificadas como importantes fatores de distribuição e dinâmica de *P. marinus* nas regiões temperadas dos EUA e México sendo associada ao aumento na intensidade e prevalência da infecção quando apresentavam valores elevados (Villalba et. al, 2004; Audermard et al., 2006; Bower, 2013). No Brasil ainda não está claro a importância desses fatores abióticos sobre as infecções por *Perkinsus* sp. Da Silva et al. (2014) registraram baixas prevalências de *Perkinsus* sp. no RFTM em ostras *Crassostrea gasar* selvagens (7%) e cultivadas (9%) no estuário do Rio São Francisco, SE, dentro da estação chuvosa, sugerindo uma relação direta com a menor salinidade e a ocorrência de chuvas na região. Prevalências menores no RFTM também foram observadas em *Crassostrea* sp. no estuário do Rio Jaguaribe, CE, no período chuvoso de 2015 (3,3%) e 2017 (2,66%) (Dantas Neto et al., 2016 e 2020). Maiores prevalências e intensidades de infecção por *Perkinsus* sp. no RFTM foram encontrados em *C. rhizophorae* no estuário do Rio Graciosa, BA, em pontos de maior salinidade sugerindo uma associação positiva entre Perkinsiose e salinidade (Brandão et al. (2013). Neste trabalho os maiores valores de prevalências encontrados no estuário da Laguna de Guaraíras, durante o período chuvoso, possivelmente podem estar associados a um efeito cumulativo de células do patógeno durante o período seco quando os valores de salinidades foram elevados. O mesmo padrão de comportamento foi observado por Queiroga et al. (2015) quando relataram elevadas prevalências de *Perkinsus* sp. em *Crassostra gasar* (65%) no Rio Mamanguape, PB, durante o período chuvoso e concluíram que o resultado também poderia estar associado a maiores valores de temperatura e salinidade no período anterior (estação seca). Outros trabalhos realizados com moluscos de diferentes países não evidenciaram um impacto direto da salinidade sobre a prevalência de *Perkinsus* sp. (Marquis et al., 2020; Villanueva-Fonseca et al., 2020).

As análises histológicas mostraram trofozoítos com a aparência típica de “anel de sinete” e esquizontes em desenvolvimento no tecido epitelial das brânquias e, principalmente, túbulos digestivos, demonstrando alterações na estrutura tecidual. A morfologia dos trofozoítos e esquizontes observados no presente estudo foi semelhante às já reportadas em outros trabalhos (Villalba et al., 2005; Cárceres-martinez et al., 2008; Sabry et al., 2009; da Silva et al., 2014; Shamal et al., 2018). Estudos recentes relatam que um novo fenótipo de *P. marinus* hipervirulento ascendeu ao longo da costa meso-atlântica dos EUA em meados da década de 80 e a partir daí se dispersou suplantando uma forma que antes era amplamente distribuída nos estuários atlânticos. Segundo Carnigie et al. (2021), um fenótipo original, caracterizado por

células maiores foi suprimido por um fenótipo contemporâneo, caracterizado por células menores que infectam principalmente os epitélios digestivos, e atualmente representam o quadro das infecções por *P. marinus*. Esse último aspecto fenotípico descrito acima é muito semelhante ao registrado neste trabalho.

Relatos de danos teciduais mínimos foram evidenciados em *C. rhizophorae* com alta intensidade de infecção por *Perkinsus* sp. (Brandão et al., 2013). Em *C. gigas* infectada por *P. marinus*, Enríquez-Espinoza et al. (2010) observaram a ocorrência de necroses teciduais e esquizontes multinucleados evidenciando que as infecções nesse caso parecem ter sido mais graves do que as registradas no presente estudo. Os registros de esquizontes fagocitados por hemócitos circulantes no tecido epitelial demonstraram uma resposta de defesa do hospedeiro. No caso de infecções por *P. marinus*, essa importante interação patógeno-hospedeiro pode não ser eficiente e ainda favorecer a proliferação do protozoário pois mesmo após ser fagocitado o patógeno permanece viável internamente levando a uma infecção sistêmica e, eventualmente, a morte do hospedeiro (Bower, 2013). Os trofozoítos de *P. marinus* fagocitados podem escapar da morte oxidativa pela expressão de enzimas antioxidantes e permanecem viáveis anulando a explosão respiratória do hospedeiro (Volety e Chu, 1995; Anderson, 1999; Vasta e Wang, 2020).

Neste estudo os padrões morfológicos de *Perkinsus* sp. observados durante a zoosporulação *in vitro* (prézoosporângios, esquizontes em subdivisões e zoosporângio maduro com tubo de descarga contendo inúmeros zoósporos) foram semelhantes aos reportados em trabalhos anteriores (Casas et al., 2002; Dungan e Reece, 2006; Sabry et al., 2009; Choi e Park, 2010; Dungan e Bushek, 2015; Maeda et al., 2022) mostrando portanto a viabilidade desse patógeno de se proliferar quando em contato com a água do mar.

Um total de 38 amostras amplificaram fragmentos de aproximadamente 703 pb confirmando a presença do gênero *Perkinsus* em ambos os estuários. Nos ensaios de PCR a prevalência de infecções por *Perkinsus* sp. no rio Potengi foi de 10,22% (9/88), na Laguna de Guaraíras foi de 25,21% (29/115). Neste estudo os resultados de prevalência foram diferentes para cada técnica de diagnóstico empregada o que pode estar relacionado ao número diferente de amostras analisadas entre as técnicas, o nível de sensibilidade e especificidade de cada ensaio e pelo fato de utilizarmos fragmentos de tecidos diferentes para cada diagnóstico onde a concentração de células do patógeno pode se apresentar maior ou menor dependendo do local do corte. Entretanto, durante o ano de 2019 a prevalência de *Perkinsus* sp. foi predominantemente maior no estuário da Laguna de Guaraíras em todos os ensaios.

As análises das sequências ITS isoladas demonstraram 99,98 a 100% de identidade com *P. marinus* e 97,83 a 100% de identidade com *P. beihaiensis*. Em ambos os estuários foram identificadas amostras infectadas por *P. marinus* durante os dois períodos, exceto no ponto p4 em Guaraíras no período chuvoso que também foi o único local e período em que *P. beihaiensis* foi encontrado.

O agrupamento das sequências ITS do presente estudo com as demais sequências de *P. marinus* e *P. beihaiensis* já registradas comprovam que estes fazem parte dos mesmos grupos taxonômicos e são distintas dos demais *Perkinsus* spp. Os isolados de *P. marinus* tiveram uma maior proximidade taxonômica com *P. marinus* que infectavam ostras do Pacífico *C. gigas* cultivadas no Golfo da Califórnia, México (Enríquez-Espinoza et al., 2010), causando uma severa mortalidade naquela região, diferente do que aconteceu nos dois estuários avaliados quando nenhum evento de mortalidade foi observado. Por outro lado, isolados *P. beihaiensis* expressaram afinidades taxonômicas mais próximas com *P. beihaiensis* que infectavam ostras *C. gasar* cultivadas no estuário do Rio Mamanguape, PB, Brasil (Queiroga et al., 2015), distante aproximadamente 65 km do estuário da Laguna de Guaraíras, e com sequências ITS de *P. beihaiensis* que infectavam uma ampla variedade de hospedeiros tanto no oceano Pacífico como no mar do Caribe no Panamá (Pangenkopp Lohan et al., 2016). Ambos os locais compartilham das mesmas características tropicais dos dois estuários avaliados neste estudo e não apresentaram mortalidades associadas às infecções.

O presente trabalho detectou a ocorrência de protozoários do gênero *Perkinsus* infectando as ostras do mangue dos estuários avaliados. Foi possível identificar 2 espécies predominantes, *P. beihaiensis* e *P. marinus*. Os registros desse estudo ampliam o conhecimento sobre a dispersão desses protozoários ao longo da costa sul-americana e sua distribuição mundial. As prevalências de infecção por *P. marinus* e *P. beihaiensis* nas ostras desses estuários mostraram uma forte relação com salinidades baixas, porém mais estudos são necessários para que se possa compreender a relação dos fatores abióticos com a prevalência e a intensidade de infecção desse patógeno. Vale ressaltar que este é o primeiro registro de *P. beihaiensis* em *Crassostrea* sp. do Estado do Rio Grande do Norte e apesar de não ter sido observado mortalidade que pudesse estar associada à ocorrência de *P. marinus* (espécie de notificação obrigatória à WOA), faz-se necessário um monitoramento constante desses ambientes, tendo em vista o risco potencial que estes patógenos representam para as populações de moluscos.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Centro de Diagnóstico de Enfermidades de Organismos Aquáticos – CEDECAM/LABOMAR/UFC, ao Laboratório de Patologia de Organismos Aquáticos – LABPOA/IFCE, Campus Aracati, e a Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação – PROPPG/UFERSA pelo apoio para realização deste trabalho.

Referências

- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Meyers, E.W., Lipman, D.J., 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403–410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2).
- Anderson, R.S., 1999. *Perkinsus marinus* secretory products modulate superoxide anion production by oyster (*Crassostrea virginica*) haemocytes. *Fish Shellfish Immunol.* 9, 51-60. <https://doi.org/10.1006/fsim.1998.0174>.
- Audemard, C., Ragone Calvo, L.M., Paynter, K.T., Reece, K.S., Bureson, E.M., 2006. Real-time PCR investigation of parasite ecology: *in situ* determination of oyster parasite *Perkinsus marinus* transmission dynamics in lower Chesapeake Bay. *Parasitology.* 132, 827-842. <https://doi.org/10.1017/S0031182006009851>.
- Blackbourn, J., Bower, S.M., Meyer, G.R., 1998. *Perkinsus qugwadi* sp. nov. (incertae sedis), a pathogenic protozoan parasite of Japanese scallops, *Patinopecten yessoensis*, cultured in British Columbia. Canada. *Can. J. Zool.* 76, 942–953. <https://doi.org/10.1139/z98-015>.
- Bower, S.M., 2013. Synopsis of infectious diseases and parasites of commercially exploited shellfish: *Perkinsus marinus* ("dermo" disease) of oysters. <https://www.dfo-mpo.gc.ca/science/aah-saa/diseases-maladies/pmdoy-eng.html> (accessed 24 may 2022).
- Brandão, R.P., Boehs, G., Sabry, R.C., Ceuta, L.O., dos Luz, M.S.A., Queiroga, F.R., da Silva, P.M., 2013. *Perkinsus* sp. infecting oyster *Crassostrea rhizophorae* (Guilding, 1828) on the coast of Bahia. Brazil. *J. Invertebr. Pathol.* 112, 138–141. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2012.11.003>.
- Bush, A.O., Lafferty, A.D., Lotz, J.M., Shostak, A.W., 1997. Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis et al. revisited. *J. Parasitol.* 83, 575–583. <https://doi.org/10.2307/3284227>.
- Cáceres-Martínez, J., Vásquez-Yeomans, R., Padilla-Lardizábal, G., del Río Portilla, M.A., 2008. *Perkinsus marinus* in pleasure oyster *Crassostrea corteziensis* from Nayarit, Pacific coast of México, *J. Invertebr. Pathol.* 99, 66-73. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2008.03.005>.
- Carnegie, R.B., Ford, S.E., Crockett, R.K., Kingsley-Smith, P.R., Bienlien, L.M., Safi, L.S.L., Whitefleet-Smith, L.A., Bureson, E.M., 2021. A rapid phenotype change in the pathogen *Perkinsus marinus* was associated with a historically significant marine disease

emergence in the eastern oyster. *Sci Rep* 11, 12872. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-92379-6>.

Casas, S.M., Villalba, A., Reece, K.S., 2002. Study of perkinsosis in the carpet shell clam *Tapes decussatus* in Galicia (NW Spain). I. Identification of the etiological agent and in vitro modulation of zoosporulation by temperature and salinity. *Dis. Aquat. Org.* 50, 51–65. <http://dx.doi.org/10.3354/dao050051>. PMID:12152905.

Casas, S.M., Grau, A., Reece, K.S., Apakupakul, K., Azevedo, C., Villalba, A., 2004. *Perkinsus mediterraneus* n. sp., a protistan parasite of the European flat oyster *Ostrea edulis* from the Balearic Islands, Mediterranean Sea. *Dis. Aquat. Org.* 58, 231–244. <https://doi.org/10.3354/dao058231>.

Cho, Y.-G., Lee, H.-M., Hwang, J.Y., Jang, G.I., Kwon, M.G., Kim, B.S., Park, K.-I., Choi, K.-S., 2022. Molecular and histological identification of the protozoan parasite *Perkinsus olseni* in the blood cockle *Anadara kagoshimensis* (Tokunaga, 1906) occurring on the south coast of Korea. *Aquaculture*. 561, 738721. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.738721>.

Choi, K.-S., Park, K.-I., 2010. Review on the protozoan parasite *Perkinsus olseni* (Lester and Davis 1981) infection in Asian waters. In: Ishimatsu, A., Lie, H.-J. (Eds.), Coastal Environmental and Ecosystem Issues of the East China Sea. TERRAPUB and Nagasaki University, p. 269–281.

Cremonte, F., Balseiro, P., Figueras, A., 2005. Occurrence of *Perkinsus olseni* (Protozoa: Apicomplexa) and other parasites in the venerid commercial clam *Pitar rostrata* from Uruguay, southwestern Atlantic coast. *Dis. Aquat. Org.* 64, 85–90. <https://doi.org/10.3354/dao064085>.

da Silva, P.M., Vianna, R.T., Guertler, R.C., Ferreira, L.P., Santana, L.N., Fernández-Boo, S., Ramilo, A., Cao, A., Villalba, A., 2013. First report of the protozoan parasite *Perkinsus marinus* in South America, infecting mangrove oysters *Crassostrea rhizophorae* from the Paraíba river (NE, Brazil). *J. Invertebr. Pathol.* 113, 96–103. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2013.02.002>.

da Silva, P.M., Scardua, M.P., Vianna, R.T., Mendonça, R.C., Vieira, C.B., Dungan, C.F., Scott, G.P., Reece, K.S., 2014. Two *Perkinsus* spp. infect *Crassostrea gasar* oysters from cultured and wild populations of the Rio São Francisco estuary, Sergipe, northeastern Brazil. *J. Invertebr. Pathol.* 119, 62–71. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2014.04.005>.

da Silva, P.M., Costa, C.P., Araujo, J.P.B., Queiroga, F.R., Wainberg, A.A., 2016. Epizootiology of *Perkinsus* sp. In *Crassostrea gasar* oysters in polyculture with shrimps in northeastern Brazil. *Rev. Bras. de Parasitol.* 25, 37–45. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612016011>.

- Dantas Neto, M.P., Gesteira, T.C.V., Sabry, R.C., Feijó, R.G., Forte, J.M., Boehs, G. Maggioni, R., 2016. First record of *Perkinsus chesapeaki* infecting *Crassostrea rhizophorae* in South America, J. Invertebr. Pathol. 141, 53-56, <https://doi.org/10.1016/j.jip.2016.10.007>.
- Dantas Neto, M.P., Maggioni, R., Nogueira, L.F.F., Forte, J.M., Feijó, R.G., Sabry, R.C., 2020. *Perkinsus* sp. infecting three important mollusks from Jaguaribe river estuary, Ceará, Brazil. Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci. 57, e158316. <https://doi.org/10.11606/issn.1678-4456.bjvras.2020.158316>.
- Dungan, C.F., Reece, K.S., 2006. *In vitro* propagation of two *Perkinsus* spp. parasites from Japanese Manila clams *Venerupis philippinarum* and description of *Perkinsus honshuensis* n. sp. J. Eukaryot. Microbiol. 53, 316–326. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2006.00120.x>.
- Dungan, C.F., Bushek, B., 2015. Development and applications of Ray's fluid thioglycollate media for detection and manipulation of *Perkinsus* spp. pathogens of marine molluscs. J. Invertebr. Pathol. 131, 68-82. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2015.05.004>.
- Enríquez-Espinoza, T.L., Grijalva-Chon, J.M., Castro-Longoria, R., Ramos-Paredes, J., 2010. *Perkinsus marinus* in *Crassostrea gigas* in the Gulf of California. Dis. Aquat. Org. 89, 269-273. <https://doi.org/10.3354/dao02199>.
- Felsenstein, J., 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. Evolution 39, 783–791. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1985.tb00420.x>.
- Feng, C.Y., Wang, C.X., Lin, X.M., Zhang, Y.N., Lv, J.Z., Deng, J.H., Yuan, X.F., Mei, L., Wu, S.Q., 2013. Development of a loop-mediated isothermal amplification method for detection of *Perkinsus* spp. in mollusks. Dis. Aquat. Org. 104, 141–148. <https://doi.org/10.3354/dao02591>.
- Galtsoff, P.S., 1964. The American Oyster *Crassostrea virginica* Gmelin. Fishery Bulletin, vol. 64. United States Government Printing Office, Washington, DC. iii + 480 p.
- Gleason, F.H., Lilje, O., Dang, C., Geraci-Yee, S., Collier, J.L., 2017. Possible impacts of zoosporic parasites in diseases of commercially important marine mollusc species: part I. Perkinsozoa. Botanica Marina. 60, 401-408. <https://doi.org/10.1515/bot-2016-0132>.
- Hosoi, M., Kubota, S., Toyohara, M., Toyohara, H., Hayashi, I., 2003. Effect of salinity change on free amino acid content in Pacific oyster. Fisheries Science, 69: 395-400. <https://doi.org/10.1046/j.1444-2906.2003.00634.x>.
- Howard, D.W., Lewis, E.J., Keller, B.J., Smith, C.S., 2004. Histological techniques for marine bivalve mollusks and crustaceans. In: NOAA Technical memorandum NOS NCCOS, Oxford. 5, 1–218. <https://repository.library.noaa.gov/view/noaa/1790> (accessed 16 mar 2019).

- Itoh, N., Komatsu, Y., Maeda, K., Hirase, S., Yoshinaga, T., 2019. First discovery of *Perkinsus beihaiensis* in Mediterranean mussels (*Mytilus galloprovincialis*) in Tokyo Bay, Japan. *J. Invertebr. Pathol.* 166, 107226. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2019.107226>.
- Itoiz, S., Metz, S., Derelle, E., Reñé, A., Garcés, E., Bass, D., Soudant, P., Chambouvet, A., 2022. Emerging Parasitic Protists: The Case of Perkinsea. *Front. Microbiol.* 12, 735815. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.735815>.
- Kimura, M., 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* 16, 111–120. <https://doi.org/10.1007/bf01731581>.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., Tamura, K., 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Mol. Biol. Evol.* 35, 1547–1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>.
- Leibowitz M.P., Pereira F.L., Leal C.A.G., Cunha E.A.P., Azevedo V.A.C., Figueiredo H.C.P., 2019. Molecular detection of the pathogenic protist *Perkinsus marinus* in farmed native and introduced oysters (*Crassostrea* spp.) in southern Brazil. *Genet. Mol. Res.* 18, 18015. <https://doi.org/10.4238/gmr18015>.
- Lester, R.J.G., Davis, G.H.G., 1981. A new *Perkinsus* species (Apicomplexa, Perkinsea) from the abalone *Haliotis ruber*. *J. Invertebr. Pathol.* 37, 181–187. [https://doi.org/10.1016/0022-2011\(81\)90073-2](https://doi.org/10.1016/0022-2011(81)90073-2).
- Lins, I.D., Araujo, M., Moura, M.C., Silva, A.M., Droguett, E.L., 2013. Prediction of sea surface temperature in the tropical Atlantic by support vector machines. *Comput. Stat. Data. Anal.* 61, 187–198. <https://doi.org/10.1016/j.csda.2012.12.003>.
- Luz, M.S.A., Carvalho, F.S., Oliveira, H.C. Boehs, G., 2018. *Perkinsus beihaiensis* (Perkinsozoa) in oysters of Bahia State, Brazil. *Braz. J. Biol.* 78, 289–295. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.07016>.
- Luz Cunha, A.C., Pontinha, V.D.A., De Castro, M.A.M., Sühnel, S., Medeiros, S.C., Moura da Luz, Â.M., Harakava, R., Tachibana, L., Mello, D.F., Danielli, N.M., Dafre, A.L., Magalhães, A.R.M., Mouriño, J.L.P., 2019. Two epizootic *Perkinsus* spp. events in commercial oyster farms at Santa Catarina, Brazil. *J. Fish. Dis.* 42, 455–463. <https://doi.org/10.1111/jfd.12958>.
- Mackin, J. G., Owen, H. M., Collier, A., 1950. Preliminary note on the occurrence of a new protistan parasite, *Dermocystidium marinum* n. sp. in *Crassostrea virginica* (Gmelin). *Science*. 111, 328–329. <https://doi.org/10.1126/science.111.2883.328>.

- Maeda, K., Yoshinaga, T., Itoh, N., 2022. Supplementation with lipids enhances zoosporulation of *Perkinsus* species, J. Invertebr. Pathol. 187, 107705. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2021.107705>.
- Marquis, N.D., Bishop, T.J., Record, N.R., Countway, P.D., Fernández Robledo, J.A., 2020. A qPCR-Based survey of *Haplosporidium nelsoni* and *Perkinsus* spp. in the eastern oyster, *Crassostrea virginica* in Maine, USA. *Pathogens*. 9, 256. <https://doi.org/10.3390/pathogens9040256>.
- McLaughlin, S.M., Tall, B.D., Shaheen, A., Elsayed, E.E., Faisal, M., 2000. Zoosporulation of a new *Perkinsus* species isolated from the gills of the softshell clam *Mya arenaria*. *Parasite*. 7, 115–122. <https://doi.org/10.1051/parasite/2000072115>.
- Moss, J.A., Xiao, J., Dungan, C.F., Reece, K.S., 2008. Description of *Perkinsus beihaiensis* n. sp., a new *Perkinsus* sp. parasite in oysters of Southern China. *J. Eukaryot. Microbiol.* 55, 117–130. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2008.00314.x>.
- Pagenkopp Lohan, K., Hill-Spanik, K., Torchin, M., Aguirre-Macedo, L., Fleischer, R., & Ruiz, G., 2016. Richness and distribution of tropical oyster parasites in two oceans. *Parasitology*, 143, 1119–1132. <http://dx.doi.org/10.1017/S0031182015001900>.
- Pinho Ferreira, L., 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., 2015. First report of *Perkinsus beihaiensis* in wild clams *Anomalocardia brasiliana* (Bivalvia: Veneridae) in Brazil. *Exp. Parasitol.* 150, 67–70. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2014.07.012>.
- Pinto, T.R., Boehs, G., Pessoa, W.F.B., Luz, M.S.A., Costa, H., 2017. Detection of *Perkinsus marinus* in the oyster *Crassostrea rhizophorae* in southern Bahia by proteomic analysis. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.* 53, 1–4. <https://doi.org/10.11606/issn.1678-4456.bjvras.2016.104524>.
- Queiroga, F.R., Vianna, R.T., Vieira, C.B., Farias, N.D., da Silva, P.M., 2015. Parasites infecting the cultured oyster *Crassostrea gasar* (Adanson, 1757) in Northeast Brazil. *Parasitology*. 142, 756–766. <https://doi.org/10.1017/S0031182014001863>.
- Ray, S.M., 1954. Biological Studies of *Dermocystidium marinum* a Fungus Parasite of Oysters. Rice Institute pamphlet. (Monogr. Biol. Spec. Ser. Iss.), Rice Institute, Washington, DC. <https://scholarship.rice.edu/bitstream/handle/1911/18411/3079846.PDF?sequence=1> (accessed 15 april 2019).
- Read, G.B., 2010. Comparison and history of *Polydora websteri* and *P. haswelli* (Polychaeta: Spionidae) as mud-blister worms in New Zealand shellfish. *New zeal. J. Mar. Fresh.* 44, 83–100. <http://dx.doi.org/10.1080/00288330.2010.482969>.

- Sabry, R.C., Rosa, R.D., Magalhães, A.R., Barracco, M.A., Gesteira, T.C.V., da Silva, P.M., 2009. First report of a *Perkinsus* sp. infecting mangrove oyster *Crassostrea rhizophorae* of the Brazilian coast. *Dis. Aquat. Org.* 88, 13–23. <https://doi.org/10.3354/dao02136>.
- 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., 2013. Parasitological survey of mangrove oyster, *Crassostrea rhizophorae*, in the Pacoti River Estuary, Ceará State. *J. Invertebr. Pathol.* 112, 24–32. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2012.10.004>.
- Saitou, N., Nei, M., 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4, 406–425. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454>.
- Scardua, M.P., Vianna, R.T., Duarte, S.S., Farias, N.D., Correia, M.L.D., Santos, H.T.A.D., da Silva P.M., 2017. Growth, mortality and susceptibility of oyster *Crassostrea* spp. to *Perkinsus* spp. infection during on growing in northeast Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 26, 401–410. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612017061>.
- Shamal, P., Zacharia, P.U., Binesh, C.P., Pranav, P., Gangadharan Suja, Asokan, P.K., Pradeep, M.A., Ranjan Rithesh, Vijayan, K.K., Sanil, N.K., 2018. *Perkinsus olseni* in the short neck yellow clam, *Paphia malabarica* (Chemnitz, 1782) from the southwest coast of India. *J. Invertebr. Pathol.* 159, 113–120. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2018.10.001>.
- Shaw, B.L., Battle, H.L., 1957. The gross and microscopic anatomy of the digestive tract of the oyster *Crassostrea virginica* (Gmelin). *Can. J. of Zool.* 35, 325–347. <https://doi.org/10.1139/z57-026>.
- Silva, C.G.D., Figueiredo, N.C.D., Martins, I.X., Lima, J.T.A.X., 2017. Protozoan parasite *Perkinsus* sp. infecting *Crassostrea rhizophorae* from the Coast of Rio Grande do Norte (Northeast of Brazil). *J. Aquac Mar Biol.* 6, 11–12. <https://doi.org/10.15406/jamb.2017.06.00166>.
- Smolowitz R., 2013. A review of current state of knowledge concerning *Perkinsus marinus* effects on *Crassostrea virginica* (Gmelin) (the eastern oyster). *Vet. Pathol.* 50, 404–411. <https://doi.org/10.1177/0300985813480806>.
- Vasta, G.R., Wang, J-X., 2020. Galectin-mediated immune recognition: Opsonic roles with contrasting outcomes in selected shrimp and bivalve mollusk species. *Dev. Comp. Immunol.* 110, 103721. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2020.103721>.
- Vázquez, N., Itoh, N., Cremonte, F., 2022. First record of *Perkinsus olseni* in cultured mussels (*Mytilus chilensis*) in the Beagle Channel, Southwestern Atlantic Ocean. *Aquaculture.* 550, 737893, <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.737893>.

- Villalba, A., Reece, K.S., Camino Ordás, M., Casas, S.M., Figueras, A., 2004. Perkinsosis in molluscs: A review. *Aquat. Living Resour.* 17, 411–432. <https://doi.org/10.1051/alr:2004050>.
- Villalba, A., Casas, S.M., López, M.C., Carballal, M.J., 2005. Study of the perkinsosis of the carpet shell clam *Tapes decussatus* in Galicia (NW Spain). II. Temporal pattern of disease dynamics and association with clam mortality. *Dis. Aquat. Org.* 65, 257–267. <https://doi.org/10.3354/dao065257>.
- Villanueva-Fonseca, L., García-Ulloa, M., López-Meyer, M., Villanueva-Fonseca, B., Hernández-Sepúlveda, J., Muñoz-Sevilla, N., Góngora-Gómez, A., 2020. *Perkinsus marinus* in the pleasure oyster *Crassostrea corteziensis* cultivated on the northeast coast of the Gulf of California, Mexico. *Lat. Am. J. Aquat. Res.* 48, 529–537. <https://doi.org/10.3856/vol48-issue4-fulltext-2463>.
- Volety, A.K., Chu, F.L., 1995. Suppression of chemiluminescence of eastern oyster (*Crassostrea virginica*) hemocytes by the protozoan parasite *Perkinsus marinus*. *Dev. Comp. Immunol.* 19, 135–142. [https://doi.org/10.1016/0145-305X\(94\)00059-O](https://doi.org/10.1016/0145-305X(94)00059-O).
- Wargo, R.N., Ford, S. E., 1993. The Effect of Shell Infestation by *Polydora* sp. and Infection by *Haplosporidium nelsoni* (MSX) on the Tissue Condition of Oysters, *Crassostrea virginica*. *Estuaries*. 16, 229–234. <https://doi.org/10.2307/1352494>.
- WOAH, 2021. Infection with *Perkinsus marinus*. Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals. 2.4.5, 461–472. https://www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Health_standards/aahm/current/2.4.05_P_MARI_NUS.pdf (accessed 15 feb 2022).
- WOAH, 2022. Infection with *Perkinsus marinus*. Aquatic animal health code. 11.5, 1–6. https://www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Health_standards/aahc/current/chapitre_perkinsus_marinus.pdf (accessed 10 aug 2022).

Apêndice

A.

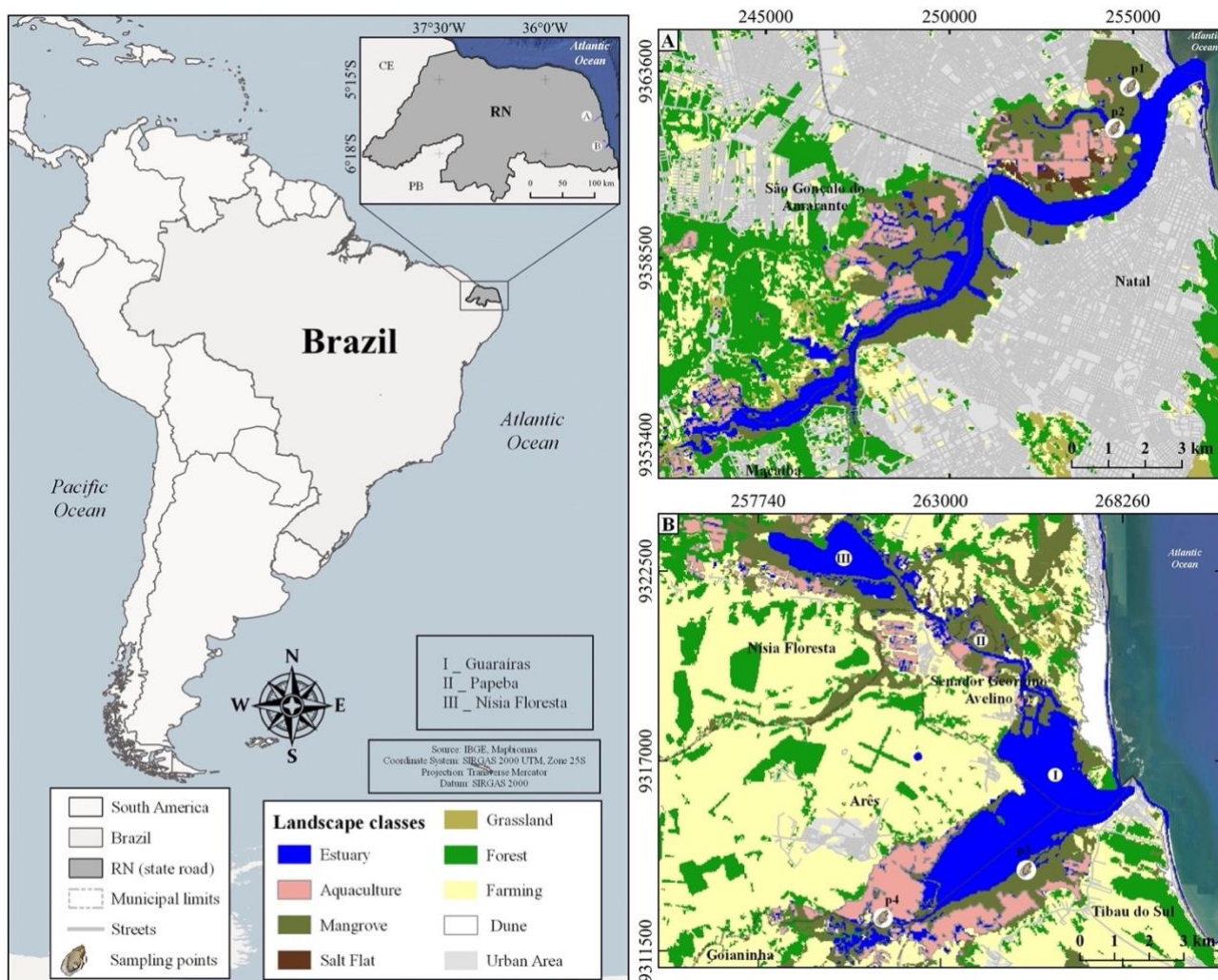


Fig. 1. Localização dos estuários amostrados na costa nordeste da América do Sul. (A) Estuário do rio Potengi, Natal-RN, Brasil; (B) Estuário da laguna de Guarairas, Tibau do Sul-RN, Brasil.

B.

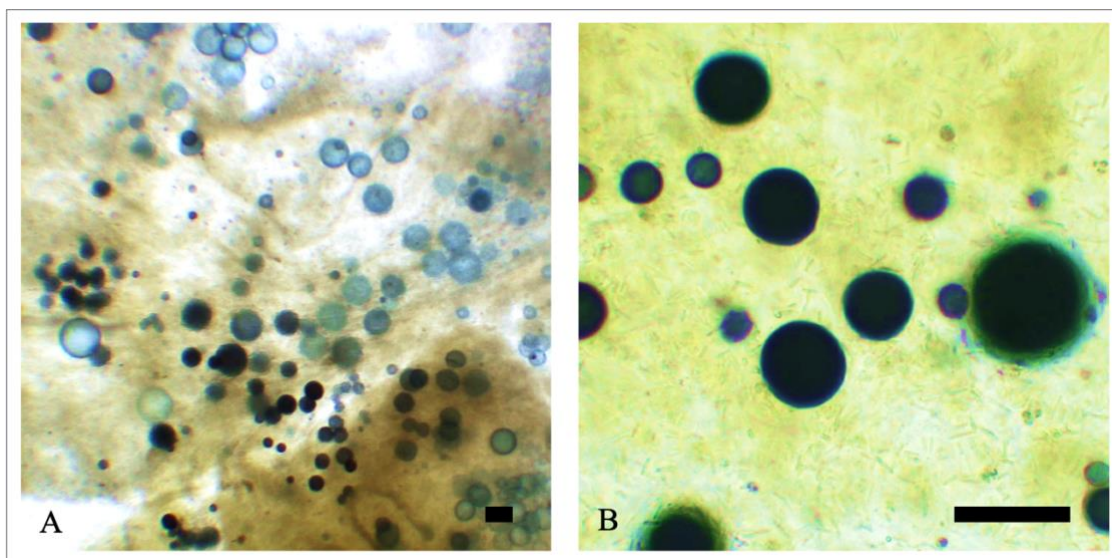


Fig. 2. Tecidos de *Crassostrea* sp. incubados em RFTM e coradas com lugol. (A) Hipnósporos de *Perkinsus* sp. em uma ostra altamente infectada; (B) Detalhe de hipnósporos aumentados e esféricos (preto-azulado). (Barra = 100µm).

C.

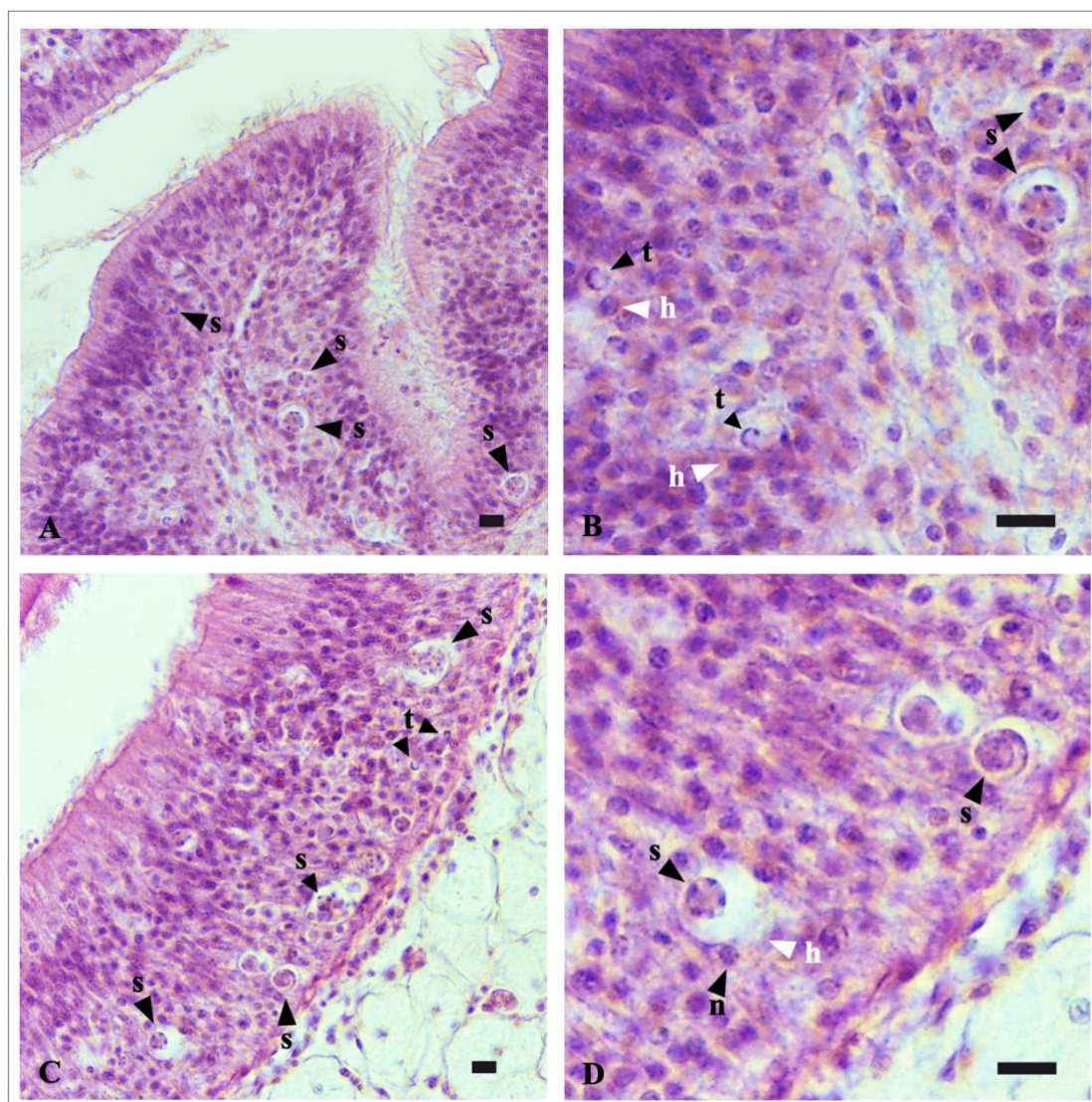


Fig. 3. Cortes histológicos de tecido epitelial de *Crassostrea* sp. infectados por *Perkinsus* sp. (A) Lamela branquial mostrando esquizontes (s); (B) trofozoítos com forma de anel de sinete (t), esquizontes com arranjo de roseta (s) e infiltração de hemócitos (h); (C) Túbulo digestivo evidenciando esquizontes (s) e trofozoítos (t); (D) Hemócito (h) com núcleo periférico (n) fagocitando esquizonte (s). Hematoxilina e Eosina. (Barra = 10μm).

D.

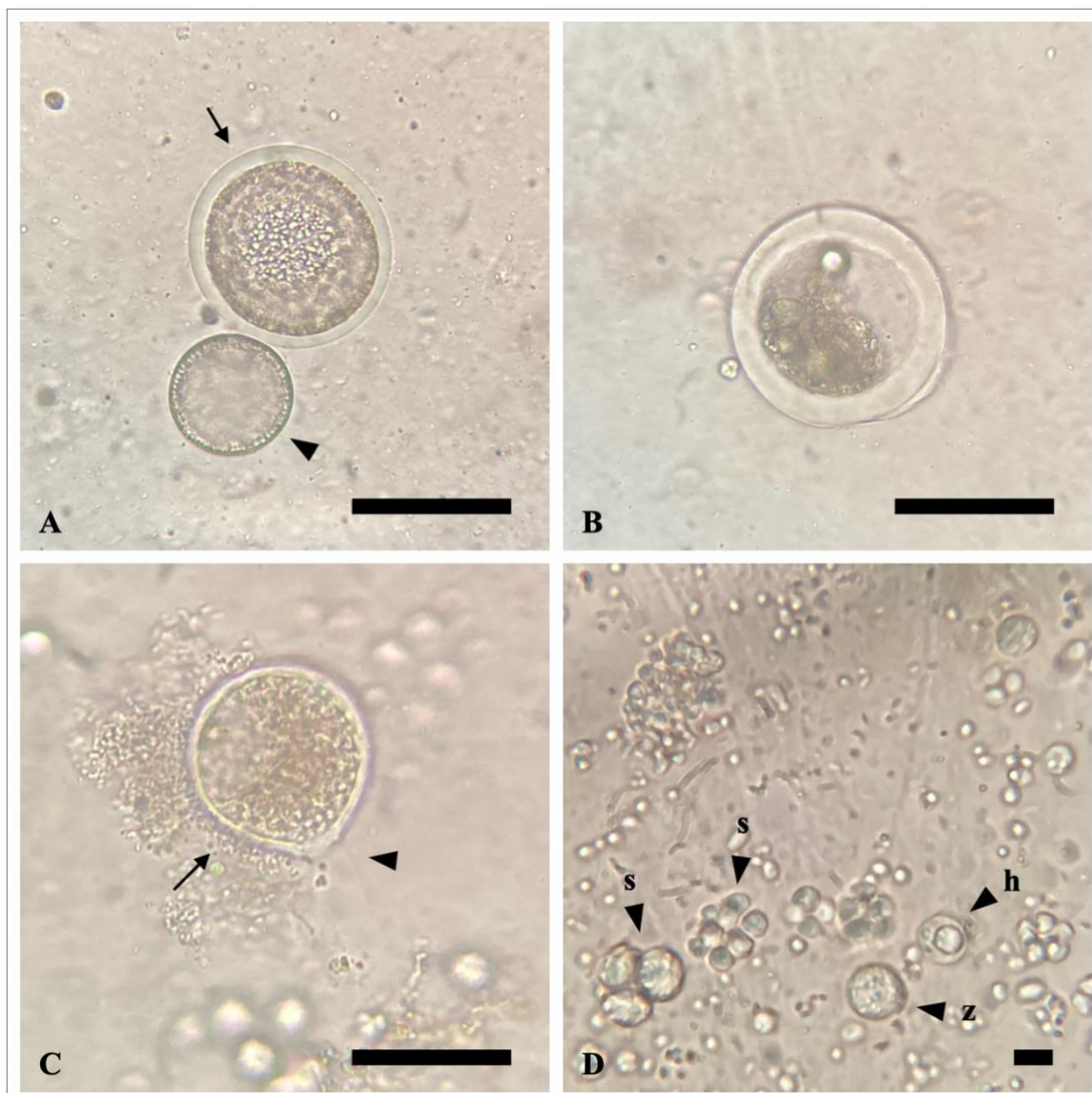


Fig. 4. Zoosporulação *in vitro* de *Perkinsus* sp. (A) Prezoosporângio mostrando parede dupla (ponta de seta) e zoosporângio inicial (seta); (B) Zoosporângio com divisões intracelulares de células assimétricas; (C) Zoosporângio com tubo germinativo estendido (ponta de seta) em esporulação e zoósporos livres (seta); (D) Hipnósporo maduro (h) com núcleo periférico e vacúolo central; esquizonte (s) em divisões progressivas; zoosporângio inicial (z) (Barra = 50µm).

F.

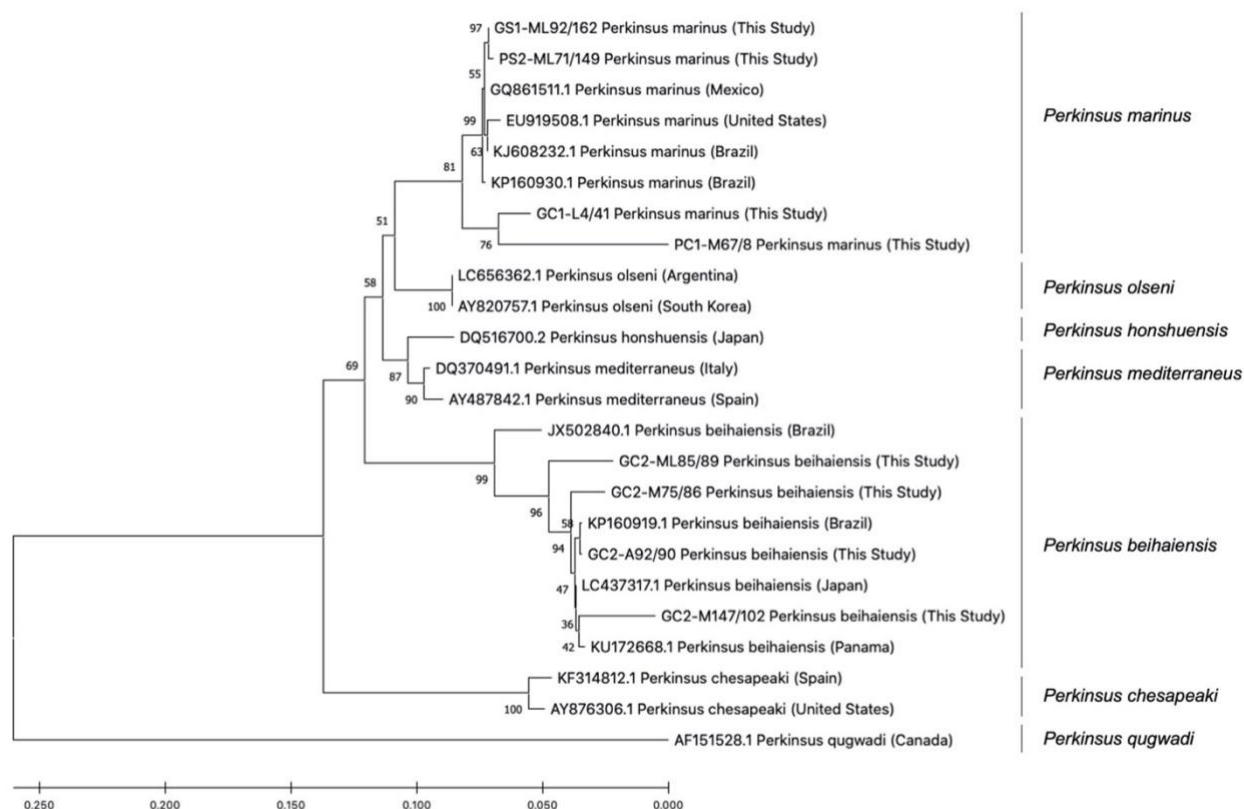


Fig. 5. Árvore filogenética das amostras de *Perkinsus* spp. isoladas de *Crassostrea* sp. no presente estudo utilizando o teste estatístico Neighbor-joining e método Kimura-2.

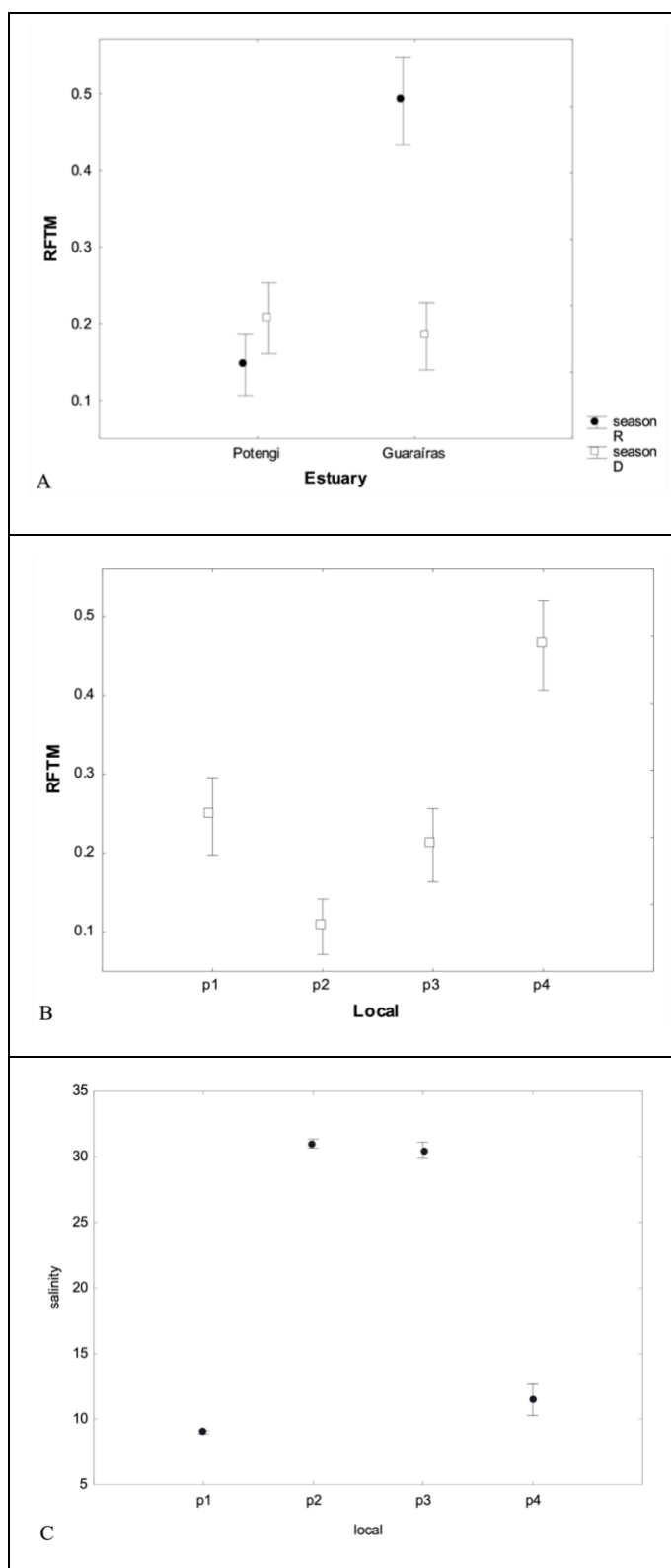
G. Tabela. 1. Prevalência e intensidade média ($\pm$ DP) da infecção por *Perkinsus* sp. na ostra do mangue *Crassostrea* sp. dos bancos naturais dos estuários do Rio Grande do Norte no período chuvoso e seco de 2019 obtidos por RFTM (n = 150). Altura média das ostras ($\pm$ DP) (n = 30).

Período	Chuvoso				Seco			
	Estuário do Rio Potengi		Estuário da Laguna de Guaraíras		Estuário do Rio Potengi		Estuário da Laguna de Guaraíras	
Localização das amostras	p1	p2	p3	p4	p1	p2	p3	p4
Altura média (mm)	48,87 $\pm$ 8,87	51,61 $\pm$ 6,24	68,25 $\pm$ 9,58	60,87 $\pm$ 5,91	60,09 $\pm$ 7,87	51,18 $\pm$ 7,23	65,93 $\pm$ 8,45	62,89 $\pm$ 7,16
T (°C)	26	25,5	26,5	26	26	25	26	27
S (‰)	8	28	25	1	10	34	36	22
Prevalência (%)	16	13,33	30,66	67,33	33,33	8	11,33	25,33
Intensidade (1-4)	2,29 $\pm$ 0,69	2,55 $\pm$ 0,88	1,93 $\pm$ 0,71	2,28 $\pm$ 1,10	2,94 $\pm$ 1,11	1,66 $\pm$ 1,15	2,05 $\pm$ 1,08	2,76 $\pm$ 1,02

DP: Desvio padrão

n: número de ostras

F. Gráfico 1. Médias de animais infectados nos ensaios de RFTM nos estuários do Potengi e de Guaraíras durante o período chuvoso (R) e seco (D) (A); e nos pontos de coleta (B). Médias de salinidade por ponto de coleta (C).



CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados desse estudo ampliam o conhecimento sobre a dispersão do *Perkinsus* sp. ao longo da costa brasileira e sua distribuição mundial. O presente trabalho registrou pela primeira vez a ocorrência de *Perkinsus beihaiensis* e *Perkinsus marinus* infectando ostras de mangue *Crassostrea* sp. de bancos naturais em Estuários do Rio Grande do Norte, Brasil. A espécie de notificação obrigatória *P. marinus* foi detectada nos estuários do Rio Potengi, Natal, e da Laguna de Guaraíras, Tibau do Sul, enquanto *P. beihaiensis* foi detectado apenas em Guaraíras. As prevalências de infecção por *P. marinus* e *P. beihaiensis* nas ostras desses estuários mostraram uma forte relação com salinidades baixas, porém mais estudos são necessários para que se possa compreender a relação dos fatores abióticos com a prevalência e a intensidade de infecção desse patógeno.

A utilização de várias técnicas de diagnóstico permitiu a produção de resultados robustos que identificaram todos os estágios de vida do *Perkinsus* sp., dentro do hospedeiro e *in vitro*, demonstraram alterações teciduais em ostras infectadas e confirmam através de dois ensaios moleculares, PCR convencional e PCR em tempo real, a suspeita de que o *P. marinus* já havia sido introduzido e estava infectando ostras da costa potiguar.

As sequências ITS isoladas neste estudo demonstraram similaridades com sequências ITS de *P. marinus* e *P. beihaiensis* de locais que compartilham de condições climáticas semelhantes, desde a Paraíba até o México, e supostamente podem ser considerados vínculos epidemiológicos das ocorrências aqui investigadas. A introdução desses patógenos nos estuários do Rio Grande do Norte pode estar associada a utilização de sementes coletadas em estuários do Estado da Paraíba e cultivadas por produtores na Laguna de Guaraíras. Outra suspeita seria introdução via tráfego marítimo de formas infectantes presentes em moluscos incrustantes ou via água de lastro de embarcações que percorrem estuários dos dois estados ou de grandes embarcações que atracam no Porto de Natal oriundas da Europa, EUA e Ásia.

A presença de uma espécie de notificação obrigatória coloca em alerta produtores e autoridades sanitárias do Estado. Apesar de não ter sido observado mortalidade que pudesse estar associada à ocorrência de *P. marinus* durante os quatro anos de estudo, os autores promoveram a notificação da ocorrência ao Instituto de Defesa e Inspeção Agropecuária do Rio Grande do Norte – IDIARN baseada em resultados moleculares confirmatórios e agora coletas oficiais serão realizadas para confirmação. Será necessário a implementação de monitoramentos permanentes desses ambientes, tendo em vista o risco potencial que estes patógenos representam para as populações de moluscos e os cultivos locais.

ANEXO I – CONFIRMAÇÃO DE SUBMISSÃO DE ARTIGO CIENTÍFICO PARA REVISTA JOURNAL OF INVERTEBRATE PATHOLOGY

09/09/2022 19:19

Fwd: JIPA-D-22-00178 - Confirming your submission to Journal of Invertebrate Pathology

João Marcelo Azevedo de Paula Antunes <joao.antunes@ufersa.edu.br>

Sex, 09/09/2022 08:21

Para: Célio Rocha <celiorocha.vet@hotmail.com>

1 anexos (1 MB)

JIPA-D-22-00178.pdf;

----- Forwarded message -----

De: **Journal of Invertebrate Pathology** <em@editorialmanager.com>

Date: sex., 9 de set. de 2022 às 07:18

Subject: JIPA-D-22-00178 - Confirming your submission to Journal of Invertebrate Pathology

To: João Azevedo de Paula Antunes Antunes <joao.antunes@ufersa.edu.br>

This is an automated message.

First record of *Perkinsus marinus* infecting *Crassostrea* sp. in Rio Grande do Norte, Brazil, using real-time PCR.

Dear João antunes Antunes,

We have received the above referenced manuscript you submitted to Journal of Invertebrate Pathology. It has been assigned the following manuscript number: JIPA-D-22-00178.

To track the status of your manuscript, please log in as an author at <https://www.editorialmanager.com/jipa/>, and navigate to the "Submissions Being Processed" folder.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,
Journal of Invertebrate Pathology

More information and support

You will find information relevant for you as an author on Elsevier's Author Hub: <https://www.elsevier.com/authors>

FAQ: How can I reset a forgotten password?
https://service.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/28452/supporthub/publishing/

For further assistance, please visit our customer service site:

<https://service.elsevier.com/app/home/supporthub/publishing/>

Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked

09/09/2022 19:19

questions, and learn more about Editorial Manager via interactive tutorials. You can also talk 24/7 to our customer support team by phone and 24/7 by live chat and email

This journal uses the Elsevier Article Transfer Service. This means that if an editor feels your manuscript is more suitable for an alternative journal, then you might be asked to consider transferring the manuscript to such a journal. The recommendation might be provided by a Journal Editor, a dedicated Scientific Managing Editor, a tool assisted recommendation, or a combination. For more details see the journal guide for authors.

#AU_JIPA#

To ensure this email reaches the intended recipient, please do not delete the above code

In compliance with data protection regulations, you may request that we remove your personal registration details at any time. (Use the following URL: <https://www.editorialmanager.com/jipa/login.asp?a=r>). Please contact the publication office if you have any questions.

--

D.Sc. M.V. João Marcelo Azevedo de Paula Antunes

Médico Veterinário do Hospital Veterinário Jerônimo Dix-Huit Rosado Maia da Universidade Federal Rural do Semi-Árido - UFRSA

Endereço (Address): Av. Francisco Mota, 572, Bairro Costa e Silva, Mossoró-RN, CEP: 59625-900

Tel: +(55) 084 3317 8310 Cel: +(55) 084 98602 7545

Currículo Lattes: <http://lattes.cnpq.br/4718683077685105>

DVM Ph.D. João Marcelo Azevedo de Paula Antunes
Veterinarian at the Veterinary Hospital of UFRSA, Brazil

ANEXO II – CONFIRMAÇÃO DE SUBMISSÃO DE ARTIGO CIENTÍFICO PARA REVISTA RESEARCH IN VETERINARY SCIENCE

23/09/2022 16:02

Fwd: Submission to Research in Veterinary Science - manuscript number

João Marcelo Azevedo de Paula Antunes <joao.antunes@ufersa.edu.br>

Sex, 23/09/2022 17:00

Para: Célio Rocha <celiorocha.vet@hotmail.com>

----- Forwarded message -----

De: **Research in Veterinary Science** <em@editorialmanager.com>

Date: sex., 23 de set. de 2022 às 03:08

Subject: Submission to Research in Veterinary Science - manuscript number

To: João Marcelo Azevedo de Paula Antunes <joao.antunes@ufersa.edu.br>

This is an automated message.

Manuscript Number: RVSC-D-22-00866

Detection of Perkinsus spp. infecting the mangrove oyster Crassostrea sp. of natural banks in estuaries of the northeastern coast of South America.

Dear Dr. Antunes,

Your above referenced submission has been assigned a manuscript number: RVSC-D-22-00866.

To track the status of your manuscript, please log in as an author at <https://www.editorialmanager.com/rvsc/>, and navigate to the "Submissions Being Processed" folder.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,
Research in Veterinary Science

More information and support

You will find information relevant for you as an author on Elsevier's Author Hub: <https://www.elsevier.com/authors>

FAQ: How can I reset a forgotten password?

https://service.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/28452/supporthub/publishing/

For further assistance, please visit our customer service site:

<https://service.elsevier.com/app/home/supporthub/publishing/>

Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions, and learn more about Editorial Manager via interactive tutorials. You can also talk 24/7 to our customer support team by phone and 24/7 by live chat and email

#AU_RVSC#

23/09/2022 16:02

To ensure this email reaches the intended recipient, please do not delete the above code

In compliance with data protection regulations, you may request that we remove your personal registration details at any time. (Use the following URL: <https://www.editorialmanager.com/rvsc/login.asp?a=r>). Please contact the publication office if you have any questions.

--

D.Sc. M.V. João Marcelo Azevedo de Paula Antunes

Médico Veterinário do Hospital Veterinário Jerônimo Dix-Huit Rosado Maia da Universidade Federal Rural do Semi-Árido - UFRSA

Endereço (Address): Av. Francisco Mota, 572, Bairro Costa e Silva, Mossoró-RN, CEP: 59625-900

Tel: +(55) 084 3317 8310 Cel: +(55) 084 98602 7545

Currículo Lattes: <http://lattes.cnpq.br/4718683077685105>

DVM Ph.D. João Marcelo Azevedo de Paula Antunes

Veterinarian at the Veterinary Hospital of UFRSA, Brazil

ANEXO III – AUTORIZAÇÃO PARA ATIVIDADES COM FINALIDADE CIENTÍFICA – ICMBio/MMA



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 64278-1	Data da Emissão: 23/07/2018 07:23	Data para Revalidação*: 22/08/2019
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 64278-2	Data da Emissão: 03/12/2019 15:08:38	Data da Revalidação*: 01/06/2020
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 64278-4	Data da Emissão: 08/09/2020 12:31:41	Data da Revalidação*: 01/06/2021
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: CELIO SOUZA DA ROCHA	CPF: 966.052.943-00
Título do Projeto: INVESTIGAÇÃO DA OCORRÊNCIA DE <i>Perkinsus</i> sp. EM OSTRAS NATIVAS <i>Crassostrea</i> sp. EM BANCOS NATURAIS DOS ESTUÁRIOS DO RIO GRANDE DO NORTE ? BRASIL.	
Nome da Instituição: UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO	CNPJ: 24.529.265/0001-40

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	coleta e análises de amostras biológicas	08/2020	02/2022
2	Coleta e transporte de moluscos bivalves <i>Crassostrea</i> sp. em estuários do Rio Grande do Norte	08/2018	02/2022

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Nacionalidade
1	João Marcelo Azevedo de Paula Antunes	Orientador do doutorado	087.118.887-25	Brasileira
2	Rachel Costa Sabry	Co-orientadora do Doutorado	511.379.173-34	Brasileira

Observações e ressalvas

1	O pesquisador somente poderá realizar atividade de campo após o término do estado de emergência devido à COVID-19, assim declarado por ato da autoridade competente.
2	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infraestrutura da unidade.
3	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio, nos termos da legislação brasileira em vigor.
4	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa ICMBio nº 03/2014 ou na Instrução Normativa ICMBio nº 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
5	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
6	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
7	Esta autorização NÃO exige o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
8	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/cgen .

Este documento foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 0642780420200908

Página 1/3



Ministério do Meio Ambiente - MMA
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 64278-4	Data da Emissão: 08/09/2020 12:31:41	Data da Revalidação*: 01/06/2021
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: CELIO SOUZA DA ROCHA	CPF: 966.052.943-00
Título do Projeto: INVESTIGAÇÃO DA OCORRÊNCIA DE Perkinsus sp. EM OSTRAS NATIVAS Crassostrea sp. EM BANCOS NATURAIS DOS ESTUÁRIOS DO RIO GRANDE DO NORTE ? BRASIL.	
Nome da Instituição: UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO	CNPJ: 24.529.265/0001-40

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Descrição do local	Município-UF	Bioma	Caverna?	Tipo
1	Estuário de Guaraíra-Papeba-Nísia floresta	RN	Marinho	Não	Fora de UC Federal
2	Estuário do rio potengi	RN	Marinho	Não	Fora de UC Federal

Atividades

#	Atividade	Grupo de Atividade
1	Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ	Fora de UC Federal
2	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Atividades ex-situ (fora da natureza)

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxon	Qtde.
1	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Crassostrea	-
2	Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ	Crassostrea	900
3	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Perkinsus	-
4	Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ	Perkinsus	9000

A quantidade prevista só é obrigatória para atividades do tipo "Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ". Essa quantidade abrange uma porção territorial mínima, que pode ser uma Unidade de Conservação Federal ou um Município.

Materiais e Métodos

#	Tipo de Método (Grupo taxonômico)	Materiais
1	Amostras biológicas (Invertebrados Aquáticos)	Outras amostras biológicas (Brânquias, reto, manto, Sistema digestivo e reprodutor)
2	Método de captura/coleta (Invertebrados Aquáticos)	Coleta manual

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo destino
1	Universidade Federal do Ceará	Laboratório
2	Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará	Laboratório
3	UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO	Laboratório

Este documento foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 0642780420200908

Página 2/3

ANEXO IV – PARECER CEUA/UFERSA



**FEDERAL UNIVERSITY OF SEMI ARID REGION
COMMITTEE OF ETHICS ON ANIMAL USE**

Mossoró-RN, august 9th 2022.

DECLARATION

To whom it may concern, we declare, for its own purposes, that the project "Investigation of the occurrence of *Perkinsus* sp. in native *Crassostrea* sp. in oysters banks of estuaries from Rio Grande do Norte, Brazil" is exempt from the Committee of Ethics on Animal Use scrutiny for using invertebrate animals as an experimental model, in accordance with national regulations.

Sidnei Miyoshi Sakamoto
Sidnei Miyoshi Sakamoto

Committee of Ethics on Animal Use

**SIDNEI MIYOSHI
SAKAMOTO:112
03780877**

SAKAMOTO:11203780877
SAKAMOTO:11203780877, CNU-UFERSA
Universidade Federal Rural do Rio Grande do Norte
CNPq/UFERSA, CNU
Papel: Ex-empto approval with documents
Localização:
Data: 2022/08/09 10:46:58-02:00
Post: PDF Reader Versão: 1.0.0.1