



Uema
UNIVERSIDADE ESTADUAL
DO MARANHÃO



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL**

Anna Letícia Pinto Silva

**PESQUISA DE AGENTES DE NOTIFICAÇÃO COMPULSÓRIA EM
MOLUSCOS BIVALVES DE AMBIENTE NATURAL NA ILHA DO
MARANHÃO, BRASIL**

São Luís – MA

2023

Anna Leticia Pinto Silva

**PESQUISA DE AGENTES DE NOTIFICAÇÃO COMPULSÓRIA EM
MOLUSCOS BIVALVES DE AMBIENTE NATURAL NA ILHA DO
MARANHÃO, BRASIL**

Documento de Qualificação apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal – Curso de Mestrado da Universidade Estadual do Maranhão (PPGCA/UEMA) como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientadora: Profa. Dra. Alcina Vieira de Carvalho Neta
Coorientadora: Profa. Dra. Nancyleni Pinto Chaves Bezerra

São Luís – MA

2023

FICHA CATALOGRÁFICA

Silva, Anna Letícia Pinto.

Pesquisa de agentes de notificação obrigatória em moluscos bivalves de ambiente natural na ilha do Maranhão, Brasil / Anna Letícia Pinto Silva. – São Luís, 2023.

..54.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual do Maranhão, 2023.

Orientadora: Profa. Dra. Alcina Vieira de Carvalho Neta.

1. Detecção molecular. 2. *Bonamia* spp. 3. *Perkinsus* spp. I. Título.

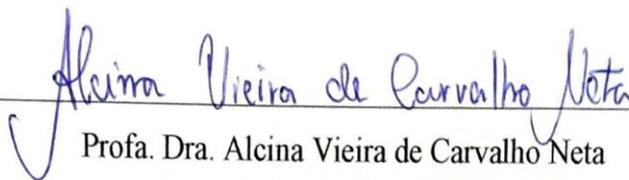
CDU: 594(812.1)

Elaborado por Francisca Elany Régia Sousa Lopes - CRB 13/754

Anna Leticia Pinto Silva

PESQUISA DE AGENTES DE NOTIFICAÇÃO COMPULSÓRIA EM MOLUSCOS
BIVALVES DE AMBIENTE NATURAL NA ILHA DO MARANHÃO, BRASIL

BANCA EXAMINADORA



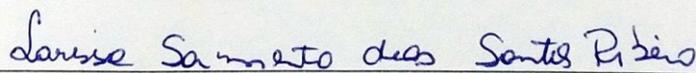
Profª. Dra. Alcina Vieira de Carvalho Neta

Universidade Estadual do Maranhão

Orientadora

Profª. Dra. Nancyleni Pinto Chaves Bezerra
Universidade Estadual do Maranhão

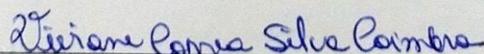
Coorientadora



Profª. Dra. Larissa Sarmiento dos Santos Ribeiro

Universidade Estadual do Maranhão

Membro interno



Profª. Dra. Viviane C. Silva Coimbra

Universidade Estadual do Maranhão

EPÍGRAFE

‘Alegrai-vos na esperança, sede pacientes na tribulação, perseverai na oração.’
Romanos 12,12.

AGRADECIMENTOS

Escrevo esses agradecimentos com lágrimas nos olhos porque só eu sei o que eu passei para chegar até aqui e encerrar mais um ciclo. Agradeço primeiramente a Deus, a Nossa Senhora e a Jesus Cristo que sempre foram o centro da minha vida, minha base e a minha sustentação. Obrigada Senhor pelo discernimento, pela perseverança e paciência, os obstáculos foram vencidos e sigo firmes na fé. O sentimento que transborda em meu peito é de gratidão. Este trabalho de dissertação é o resultado conjunto de um trabalho em equipe, que vem provar que toda ajuda é bem-vinda, sempre precisamos do outro, ninguém faz pesquisa sozinho e a humildade de reconhecer isso é essencial para o sucesso de todos.

Aos meus pais Cleia Bacelar Pinto e Cledecilvo Ribeiro Silva por estarem ao meu lado durante este período, acreditando no meu sucesso e sem duvidar da minha capacidade. Nunca mediram esforços perante a minha educação, eu dedico esse título a vocês e tudo que fizeram por mim. Amo vocês.

Ao meu marido, Erivaldo Junior, que sempre me incentivou e me apoiou nas minhas decisões, obrigada por ser tão compreensivo e companheiro. Ao seu lado quero compartilhar essa e inúmeras outras vitórias que virão ao longo das nossas vidas. Eu te amo.

Pelo nosso herdeiro, nosso lutador, nosso anjo, Davi. Meu doce filho, que me acompanhou durante esse trabalho, obrigada por ter sido a minha melhor companhia, obrigada por ter feito aflorar dentro do meu ser a minha melhor versão, a versão mamãe. Não tem palavra no mundo que eu consiga descrever o que eu sinto por você. A mamãe te cuida e te materna com um céu de distância! Eu e seu papai seguimos firmes aqui com a certeza de que nos encontraremos na eternidade (se comporta que quando eu chegar não quero reclamações suas kkk) . Saudades, meu menino. Nós te amamos.

Agradeço a todos, em especial: à minha orientadora, Prof. Dra. Alcina Vieira de Carvalho Neta, por ter me acolhido no mestrado, pelo apoio, empatia e disponibilidade. Desejo tudo de melhor em sua vida. Deus abençoe sua caminhada! Felicidades.

A Profa. Dra Nancyleni, por toda ajuda e apoio ao longo desses anos, sempre me acalmando e dizendo que vai ficar tudo bem. Por ter aceitado a missão de ser minha coorientadora e estar presente em mais um momento tão especial na minha vida acadêmica. Minha mãe científica na iniciação científica, graduação e, agora, no mestrado. Que honra e privilégio eu tenho de ter a senhora acompanhando toda a minha caminhada acadêmica de perto. Deus abençoe sua vida e sua família!

A Ellainy Maria, que foi a minha pessoa, a minha metade, o meu 'marido' no meu casamento acadêmico. Obrigada minha amiga por me ensinar do básico até as situações mais

complexas. Queria ter palavras suficientes para agradecer por tudo que fez por mim, obrigada pelo apoio, pela dedicação, pelo ombro amigo, por secar cada lagrima, por simplesmente estar comigo. Ajudou-me de forma única, mostrando que a positividade e a realidade andam juntas, mas que a fé faz toda a diferença. Que Deus te abençoe sempre e te guarde, que Nossa Senhora te cubra com o manto sagrado da proteção, que nada e nem ninguém tire de você o seu senso de bondade, justiça e empatia. **TODO MUNDO MERECE UMA ELLAINY IGUAL EU TENHO VOCÊ!** Você é o orgulho do Laboratório de Patologia Molecular (LPMol) e o orgulho da nossa querida dona Kátia. Estamos torcendo por você! Todo sucesso do mundo ainda é pouco perto do que desejo para você.

A Natália Lustosa, que sempre esteve presente apesar do cansaço: você é a prova de que podemos dar conta de qualquer coisa, mesmo com noites sem dormir, crises de enxaqueca e muito trabalho, você é uma guerreira. Obrigada por tudo! Agradecimento especial para as bolsistas de iniciação científica do laboratório, Carla Maria e Lorena Cristina: obrigada por cada gel que vocês fizeram, por cada coleta, por ficarem até tarde ajudando no trabalho sem reclamar de nada. Vocês serão profissionais maravilhosas!

A Ingrid Marques, que foi essencial na minha escrita do trabalho, nas correções, foi maleável com os prazos e sempre me ajudou de forma pessoal. A Isabella Negreiro, a minha parceira do laboratório, minha companheira das 08:00 às 18:00, quem tanto me ajudou a pesar, extrair, realizar PCR, quantificar, tudo, tudo mesmo, espero ter você como M1, será um prazer trabalhar com você novamente. Vocês foram essenciais!

Agradeço também a Universidade Estadual do Maranhão, ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal por me proporcionar essa oportunidade de evolução pessoal e profissional, por ceder o espaço para realização do projeto e por toda a receptividade que obtive desde que ingressei no programa. A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, e a bolsa concedida pela Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão, FAPEMA, que tanto me ajudou nesse período, e por fim, a todos aqueles que acreditaram em mim e torceram, mesmo distantes.

PESQUISA DE AGENTES DE NOTIFICAÇÃO COMPULSÓRIA EM MOLUSCOS BIVALVES DE AMBIENTE NATURAL NA ILHA DO MARANHÃO, BRASIL

RESUMO

Os moluscos bivalves estão presentes em toda costa litorânea maranhense e representam além de alimento, fonte de renda. Devido sua fisiologia filtradora atuam como bioindicadores do ambiente em que estão inseridos, assim como podem ser acometidos por protozoários como *Bonamia* spp. e *Perkinsus* spp. que são agentes responsáveis por enfermidades que geram redução populacional e impacto econômico. Nesse contexto, objetivou-se pesquisar agentes de notificação compulsória em moluscos bivalves de ambiente natural na Ilha do Maranhão, Brasil. Para isso, foram coletados de bancos naturais, no período chuvoso, entre os meses de janeiro a maior de 2022, 90 espécimes de *Mytella* spp. (sururu), 90 espécimes de *Anomalocardia* spp. (sarnambi) e 63 espécimes de *Crassostrea* spp. (ostras). Após a coleta, os exemplares foram armazenados dentro de caixas térmicas e transportados ao laboratório, para serem processados no mesmo dia. Foram limpos com água do mar e separados por tamanhos similares. Foi realizado a abertura das válvulas dos animais com o auxílio de bisturis e retirado o tecido brânquia. Os animais foram separados em *pools*, onde cada pool continha 3 animais, totalizando assim 30 *pools* de *Mytella* spp. (sururu), 30 *pools* de *Anomalocardia* spp. (sarnambi) e 21 *pools* de *Crassostrea* spp. (ostras) para a extração de DNA. Em seguida foram submetidas a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) utilizando três genes específicos, 18SrDNA, SSUrDNA e o ITSrRNA. Análises moleculares foram realizadas e não foi possível detectar a presença dos protozoários *Bonamia* spp. e *Perkinsus* spp. em moluscos bivalves nas amostras avaliadas na Ilha do Maranhão. Ainda que não tenha relato de amostras positivas e nenhuma mortalidade tenha sido notada, a presente pesquisa evidencia informações importantes sobre a ausência de circulação de agentes de notificação compulsória, *Bonamia* spp. e *Perkinsus* spp. na área estudada e sinaliza para a necessidade de vigilância ativa e implementação de políticas públicas voltadas para a sanidade de animais aquáticos.

Palavras-chave: Detecção molecular, *Bonamia* spp., *Perkinsus* spp.

ABSTRACT

Bivalve molluscs are present throughout the coast of Maranhão and represent, in addition to food, a source of income. Due to their filtering physiology, they act as bioindicators of the environment in which they are inserted, as well as being affected by protozoa such as *Bonamia* spp. and *Perkinsus* spp. that are agents responsible for diseases that generate population reduction and economic impact. In this context, the objective was to investigate compulsory notification agents in bivalve molluscs from the natural environment on the Island of Maranhão, Brazil. For this, 90 specimens of *Mytella* spp. (mussel), 90 specimens of *Anomalocardia* spp. (clam) and 63 specimens of *Crassostrea* spp. (oysters). After collection, the specimens were stored in thermal boxes and transported to the laboratory to be processed on the same day. They were cleaned with sea water and separated by similar sizes. The animals' valves were opened with the aid of scalpels and the gill tissue was removed. The animals were separated into pools, where each pool contained 3 animals, thus totaling 30 pools of *Mytella* spp. (mussel), 30 pools of *Anomalocardia* spp. (clam) and 21 pools of *Crassostrea* spp. (oysters) for DNA extraction. They were then submitted to the Polymerase Chain Reaction (PCR) technique using three specific genes, 18SrDNA, SSURDNA and ITSrRNA. Molecular analyzes were performed and it was not possible to detect the presence of the protozoa *Bonamia* spp. and *Perkinsus* spp. in bivalve molluscs in the samples evaluated in Maranhão Island. Although there are no reports of positive samples and no mortality has been noted, the present study provides important information about the lack of circulation of compulsory notifiable agents, *Bonamia* spp. and *Perkinsus* spp. in the studied area and points to the need for active surveillance and the implementation of public policies aimed at the health of aquatic animals.

Keywords: Molecular detection, *Bonamia* spp., *Perkinsus* spp

LISTA DE ABREVIATURAS

BMLP	Programa Brasileiro de Intercambio em Maricultura
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
cPCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
EPAGRI	Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina
FAO	Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IFMA	Instituto Federal do Maranhão
IHS	Hibridização <i>in Situ</i>
INFOAGRO/SC	Sistema Integrado de Informações Agropecuárias do estado de Santa Catarina
IPMA	Instituto Português do Mar e da Atmosfera
ITS	<i>Internal Transcribed Spacer</i>
Mapa	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
NTS	<i>Non Transcribed Spacer</i>
OIE	Organização Mundial de Saúde Animal
PDI	Desenvolvimento e Inovação
PNCMB	Programa Nacional de Controle Higiênico Sanitário de Moluscos Bivalves
POLOMAR	Polo de Maricultura do Maranhão
PSU	<i>Practical Salinity Unit</i>
qPCR	<i>Real Time Quantitative Polymerase Chain Reaction</i>
RFTM	<i>Ray's Fluid Thioglycolate Medium</i>
SEBRAE	Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas
SSU	<i>Small Subunit Ribosomal</i>
TEM	<i>Transmission Electronic Microscopy</i>
UEMA	Universidade Estadual do Maranhão

UFMA Universidade Federal do Maranhão

UFPA Universidade Federal do Pará

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 Quantidade de moluscos bivalves e número de pools formados para a pesquisa de protozoários de notificação compulsória.	35
TABELA 2 Descrição das sequências de oligonucleotídeos utilizadas nos ensaios de PCR convencional para <i>Bonamia</i> spp. e <i>Perkinsus</i> spp.	37

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Mapa da Ilha do Maranhão. 34

FIGURA 2. Fotografia de eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com Sybr Safe. Os amplicómeros mostrados na foto são relativos à cPCR para gene 18S rRNA. Caneleta PM: marcador de peso molecular em escala de 100 pares de bases; canaleta CP: controle positivo. Caneleta de 01 a 05 com amostras e canaleta 10 com CN: controle negativo..... 38

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1 Caracterização da malacocultura	18
2.2 Malacocultura no Maranhão	20
2.3 Moluscos bivalves: aspectos anatômicos e fisiológicos	21
2.4 Principais moluscos no Maranhão	23
2.5 <i>Mytella</i> spp. (sururu)	23
2.6 <i>Anomalocardia</i> spp. (sarnambi)	24
2.7 <i>Crassostrea</i> spp. (ostra)	25
2.8 Doenças de notificação obrigatória causadas por protozoários	25
2.8.1 Infecção por <i>Bonamia</i> spp.....	26
2.8.1 Etiopatogenia, transmissão e sinais clínicos	26
2.8.2 Epidemiologia molecular de bonamiose em moluscos bivalves	27
2.9 Infecção por <i>Perkinsus</i> spp.....	28
2.9.1 Etiopatogenia, transmissão e sinais clínicos	28
2.9.2 Epidemiologia molecular de perkinsiose em moluscos bivalves	30
3 OBJETIVOS	33
3.1 Objetivo geral	33
3.2 Objetivos específicos	33
4 MATERIAL E MÉTODOS	33
4.1 Local de Estudo, Animais e Coleta de Amostras.....	33
4.2 Extração de DNA.....	35
4.3 Detecção do gene endógeno 18S rRNA para DNA de eucarioto	35
4.4 Detecção de <i>B. ostreae</i> e <i>B. exitiosa</i> por meio da PCR convencional com base no gene 18S rDNA	35

4.5 Detecção de <i>Bonamia</i> spp., por meio da PCR convencional com base no gene SSU rDNA	36
4.6 Detecção de <i>Perkinsus</i> spp., por meio da PCR convencional com base no gene ITS rRNA	36
4.7 Eletroforese em gel de agarose	37
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
6. CONCLUSÃO	41
7. CONSIDERAÇÕES FUTURAS	41
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42

1 INTRODUÇÃO

A aquicultura, atividade voltada para a produção de peixes e outros animais aquáticos, está em constante crescimento no mundo, o que reflete diretamente no consumo pela população e economia. A Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO, 2018), estimou que, entre os anos de 2016 e 2018, a produção global de pescado passou de 171 para 179 milhões de toneladas.

Os moluscos bivalves integram animais aquáticos e pertencem a uma classe de organismos invertebrados que são distribuídos geograficamente de forma ampla e comercializados mundialmente (MAGALHÃES&FERREIRA, 2006). Apresentam fisiologia filtradora de partículas, se alimentam de algas microscópicas e material em suspensão que existe na água onde são cultivados e, por isso, podem atuar como bioindicadores das condições do ambiente onde vivem (ROBERTSON, 2007).

Os moluscos bivalves da costa brasileira que apresentam maior interesse econômico são representados pelas espécies: *Crassostrea rhizophorae* (GUILDING, 1828) e *Crassostrea gigas* (THUNBERG, 1793) pertencentes à família Ostreidae; *Perna perna* (LINNAEUS, 1758), *Mytella guyanensis* (LAMARCK, 1819) e *Mytella falcata* (ORBIGNY, 1846), que compõem a família Mytilidae; *Lucina pectinata* (GMELIN, 1791), da família Lucinidae; *Tagelus plebeius* (LIGHTFOOT, 1786), que constitui a família Psammobiidae; *Anomalocardia brasiliana* (GMELIN, 1791), Veneridae e *Nodipecten nodosus* (LINNAEUS, 1758), que integram a família Pectinidae.

As espécies que ocorrem em abundância na região Nordeste brasileira são *C. rhizophorae*, *M. guyanensis*, *L. pectinata* (COVA et al., 2015; PINTO et al., 2008; RONDINELLI, 2009), *M. falcata* (FRANCA et al., 2013), *T. plebeius* e *A. brasiliana* (DE OLIVEIRA et al., 2014; PINTO, 2012), que são consumidas e comercializadas pelas comunidades ao longo dos estuários. Estes indivíduos apresentam considerável importância tanto alimentar quanto comercial, sobretudo para as populações situadas às margens de rios e estuários, porém, com o crescimento e desenvolvimento da aquicultura e o uso indiscriminado dos recursos naturais, algumas doenças foram inseridas nestes ambientes e acarretam relevantes perdas econômicas nos cultivos, refletindo de forma negativa na produção e produtividade (MAGALHÃES&FERREIRA, 2006).

Dentre as doenças que acometem os moluscos bivalves, a Organização Mundial de Saúde Animal (*World Organization for Animal Health*), que manteve sua sigla histórica (OIE), apresenta no Código de Saúde para Animais Aquáticos, a lista das doenças de

notificação obrigatória, na qual estão inseridos os protozoários *Bonamia* spp. e *Perkinsus* spp., que são responsáveis por elevadas taxas de mortalidade na produção desses organismos em todo o mundo (OIE, 2012).

A bonamiose é uma doença que apresenta como agente etiológico o protozoário do gênero *Bonamia* spp., as espécies que apresentam maiores impactos econômicos são *Bonamia ostreae* e *Bonamia exitiosa* que apresentam a capacidade de infectar hemócitos de várias espécies de moluscos desencadeando distúrbios fisiológicos e eventualmente a morte desses animais (CRANFIELD et al., 2005). Já a infecção causada pelo protozoário *Perkinsus* spp. gera grandes perdas econômicas devido à sua alta taxa de mortalidade. Dentre as espécies de maiores impactos, tem-se *Perkinsus marinus* e *Perkinsus olseni* (AZEVEDO C. 1989; PARK&CHOI, 2001).

Com relação aos métodos de diagnóstico para *Bonamia* spp. e *Perkinsus* spp., podem ser realizados a Reação em Cadeia da Polimerase Convencional (cPCR) e/ou Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa em Tempo Real (qPCR), que apresentam sensibilidade e especificidade elevadas, além de estudos de sequenciamento e diversidade genética (CARNEGIE&COCHENEC-LAUREAU, 2004; DIGGLES et al., 2003; GAUTHIER et al., 1998; HINE et al., 2001).

De acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2021), o Brasil apresenta em dimensões continentais uma extensa costa marítima. O estado do Maranhão é privilegiado por apresentar o segundo maior litoral brasileiro, sendo precedido apenas pelo estado da Bahia. Com essa particularidade, a costa litorânea maranhense tornou-se um importante local para a realização de atividades econômicas como a pesca e o extrativismo de moluscos bivalves, tais como *Mytella* spp. (sururu), *Anomalocardia* spp. (sarnambi) e *Crassostrea* spp. (ostras).

As atividades de extração de moluscos bivalves representam não só um complemento na renda, mas, para muitas famílias, são a única fonte e de grande importância, tanto do ponto de vista comercial quanto alimentar. Contudo, devido à sua fisiologia filtradora, estes animais podem ser acometidos por vários agentes patogênicos, os quais podem ocasionar importantes prejuízos econômicos, refletindo de forma efetiva na produção e produtividade desses moluscos.

Apesar da importância socioeconômica e ambiental da malacocultura no Brasil e, mais especificamente, na Ilha do Maranhão, até o presente momento, não existem estudos

publicados sobre a ocorrência de agentes patogênicos de notificação compulsória no território maranhense. Desse modo, tendo como vista à prevenção e a busca de informações sobre a presença desses organismos, assim como o monitoramento desses patógenos que impactam a produção que se realizou a presente pesquisa.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Caracterização da malacocultura

A aquicultura ¹é uma atividade promissora no cenário mundial em que se constata desenvolvimento significativo nos últimos anos, além de ser uma importante fonte de proteína de alto valor biológico voltada para a alimentação humana (FAO, 2020). Em nível mundial, a produção de pescado passou de 171 milhões de toneladas no ano de 2016 para 179 milhões de toneladas em 2018 e, em termos produtivos, os moluscos ocuparam a segunda posição mundial, com aproximadamente 17,5 milhões de toneladas, representando 21,3% do total da aquicultura e 56,3% da maricultura em 2018 (FAO, 2020).

De acordo com os dados da FAO (2018), a produção mundial de moluscos em 2016 foi de aproximadamente 17,139 milhões de toneladas, deste valor, o continente asiático contribuiu com 15,835 milhões de toneladas, seguido pelo europeu (613 mil ton) e, o americano (574 mil ton). A malacocultura² é a segunda atividade produtiva que mais contribuiu para a aquicultura mundial, representando 21,42% da produção. Dos moluscos cultivados, organismos do gênero *Crassostrea* foram os mais expressivos, com 28% da produção total.

A procura por moluscos bivalves aumentou de forma bastante expressiva ao longo do tempo, o que reflete diretamente no aumento da renda em todo o mundo, mas também como consequência do impacto ambiental positivo como bioindicadores no ambiente que estão inseridos refletindo no sistema de produção, dos benefícios nutricionais significativos para o consumidor, especialmente em termos de fornecimento de vitaminas do complexo B e E, minerais como cálcio, ferro, fósforo, magnésio, potássio e zinco (FAO, 2016). Além do tradicional cultivo de ostras ao redor do mundo, outras espécies de bivalves, como os mexilhões, são muito comercializadas. O cultivo desses animais é realizado de forma ampla na Europa, América do Norte, no continente Asiático em países como China, Japão, Índia e Filipinas (CEBU, 2016).

¹ Aquicultura ou aquicultura é o ramo da Zootecnia que estuda a produção racional de organismos aquáticos, como peixes, moluscos, crustáceos, anfíbios, répteis e plantas aquáticas para uso do homem

² A malacocultura pode ser definida como a criação de moluscos.

No Brasil, a malacocultura vem se tornando um importante segmento da indústria aquícola, sendo compreendida como uma atividade ambientalmente responsável que proporciona melhoria das condições de vida das comunidades costeiras (FERREIRA&OLIVEIRA NETO, 2007). Contudo, as estatísticas de produção nacional são inferiores à de alguns países que apresentam notoriedade na atividade.

O Brasil detém aproximadamente 8 mil km de costa, porém apesar da potencialidade para o cultivo de organismos marinhos, a malacocultura é pouco explorada. Dados referentes ao ano de 2019, a maricultura correspondeu apenas a 13,3% do pescado cultivado no país. No que diz respeito ao cultivo de moluscos (mexilhões, ostras e vieiras), o Brasil é o segundo produtor latino-americano, precedido pelo Chile (FAO, 2020).

De acordo com Sistema Integrado de Informações Agropecuárias do Estado de Santa Catarina (INFOAGRO/SC, 2022), o estado que detém a maior produção brasileira de moluscos se concentra em Santa Catarina, que em 2016, produziu 97,9% do total nacional, tendo a capital Florianópolis como responsável por 90,8% do total de sementes de moluscos produzidas (IBGE, 2017). O estado catarinense, por apresentar condições oceanográficas propícias ao cultivo de moluscos, aloca o país entre os maiores produtores da América Latina, representada principalmente pela atividade produtiva mitilicultura³ e ostreicultura.⁴

Com base em dados da Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (EPAGRI, 2016), a produção de moluscos bivalves (ostras, mexilhões e vieiras) em Santa Catarina, no ano de 2015, gerou uma movimentação financeira de R\$ 78.895.697,64, com envolvimento direto de 2.315 pessoas e a produção de 20.438 toneladas de moluscos bivalves, o que denota todo o potencial econômico da atividade produtiva que representa 95% do total da produção nacional tendo ainda outros estados com destaque na atividade como, Paraná, Rio de Janeiro, São Paulo e Pará (IBGE, 2019).

Dos obstáculos para o crescimento e desenvolvimento integral da malacocultura, cita-se a poluição das águas e a floração de algas nocivas. Desde o ano de 2006, um programa de monitoramento de algas nocivas e ficotoxinas está em funcionamento em Santa Catarina e permanece atualmente. Em 2012, tanto o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) quanto o Programa Nacional de Controle Higiênico-Sanitário de Moluscos Bivalves (PNCMB), definiram os limites de concentração de microrganismos

³ Mitilicultura ou miticultura é o cultivo industrial do mexilhão, usualmente com recurso a viveiros flutuantes ancorados em águas costeiras

⁴ Ostreicultura é a criação de ostras é uma prática de aquacultura na qual as ostras são criadas e criadas principalmente por suas pérolas, conchas e tecidos de órgãos internos, que são consumidos.

contaminantes (bactérias) e biotoxinas, entre outros elementos, em áreas primárias de produção de ostras, mexilhões, vieiras e berbigões, com o objetivo de assegurar a saúde pública (VALENTI et al., 2021).

Outras dificuldades encontradas para o desenvolvimento da atividade são:(i) necessidade de legalização e/ou regularização de áreas específicas para tal cultura; (ii) competição com produtores ilegais, que comercializam moluscos mais baratos e de qualidade duvidosa; (iii) e, a falta de um sistema eficiente de fiscalização e sanidade (VALENTI et al., 2021).

2.2 Malacocultura no Maranhão

A zona costeira maranhense dispõe de 640 km de extensão, composta por um aglomerado de ecossistemas de alta relevância ambiental com mangues, restingas, campos inundáveis, dunas, estuários, recifes de coral e outros ambientes importantes do ponto de vista ecológico (FRANÇA et al., 2013). As áreas estuarinas do Maranhão detêm fatores positivos à atividade da malacocultura, com papel fundamental na complementação da renda familiar de marisqueiros (FURTADO, 2001).

Com relação ao cultivo de ostras no Maranhão, o primeiro relato data de 1999, com os recursos do Estado por meio do projeto Polo de Maricultura do Maranhão (POLOMAR). Em 2000, o Programa Brasileiro de Intercâmbio em Maricultura (BMLP) constatou que os municípios de Paço do Lumiar e Alcântara tinham potencial para a atividade, apesar dos entraves, no cultivo de ostras (*C. rhizophorae*) e sururu (*M. falcata*). No Plano de Locais de Desenvolvimento da Maricultura (PLDM), consta que os municípios de Icatu, Primeira Cruz e Humberto de Campo têm alta potencialidade para o desenvolvimento da malacocultura. Entre 2018 e 2019, alguns pesquisadores do Laboratório de Fisiocologia, Reprodução e Cultivo de Organismos Marinhos da Universidade Estadual do Maranhão (FISIOMAR/UEMA), realizaram a implantação de uma unidade demonstrativa de autogestão de cultivo de ostra nativa *Crassostrea gasar* no povoado de Areinhas, no município de Primeira Cruz e puderam concluir que o ambiente é bom e favorável para o crescimento das ostras, beneficiando a população e gerando renda.

A contribuição de órgãos financiadores de pesquisa, juntamente com instituições de ensino como, a Universidade Federal do Maranhão (UFMA), Universidade Estadual do Maranhão (UEMA) e Instituto Federal do Maranhão (IFMA), tem aumentado as pesquisas que envolvem moluscos bivalves oriundos da costa maranhense com estudos sobre genética,

cultivo e biologia reprodutiva (FRANÇA et al., 2013; LOPES, 2018; SOUSA, 2015), voltados ao desenvolvimento da malacocultura no estado.

Apesar do elevado potencial do estado do Maranhão, a atividade ainda é desenvolvida de forma artesanal, a execução desta prática extrativista envolve a catação de sarnambi, sururu (unha de velho), ostra e outros tipos de pescado de importância comercial e alimentícia para as famílias (CASTRO et al., 2014).

Segundo o autor Silva (2011), grande parte da extração desses moluscos são destinada ao consumo familiar, garantindo a alimentação e o excedente é entregue aos atravessadores. Devido à escassez de materiais para armazenamento, é necessário que a venda seja feita de forma imediata. A comercialização é feita de forma instantânea aos atravessadores, que impulsionam o mercado interno e externo, além da venda tem-se a modalidade de doação, troca e/ou escambo com a vizinhança, e alguns comerciantes locais (SILVA, 2011).

Na Ilha do Maranhão, mais de 50.000 pessoas vivem apenas da coleta desses moluscos (CASTRO et al., 2014), os de maiores destaques nessa área são ostra (*Crassostrea* spp.), sururu (*M. falcata*) e sarnambi (*A. brasiliiana*).

De acordo com Pereira et al. (2017), as famílias que trabalham diretamente com o extrativismo de moluscos apresentam renda abaixo de um salário-mínimo, o que gera a busca complementar na renda com auxílios do governo como Bolsa Família, Seguro Defeso e Aposentaria, a procura por esses auxílios estão relacionados a fatores como aumento da poluição das águas e a períodos de interrupção à pesca predatória (DALTO, 2013). Além disso, o lixo, desmatamento, lançamento de esgoto tanto doméstico quanto industrial nos manguezais, contaminam as zonas costeiras afetando, assim, a quantidade e qualidade dos moluscos da região, refletindo nas vendas, consumo, renda das famílias, causando desequilíbrio em toda a cadeia produtiva (RODRIGUES, 2016).

2.3 Moluscos bivalves: aspectos anatômicos e fisiológicos

Os moluscos bivalves são animais que integram o filo Mollusca e a classe Bivalvia, essa última representa aproximadamente 27% dos organismos integrantes do filo Mollusca, sendo considerada como a mais utilizada no âmbito de produção alimentar (AMARAL&JABLONSKI, 2005). No mundo, há cerca de 20.000 espécies de moluscos bivalves conhecidas e, no Brasil, tem-se aproximadamente 410 espécies (AMARAL&JABLONSKI, 2005). Destas, são utilizados para consumo humano, principalmente, os mariscos e as ostras em diferentes formas: vivas, cruas e cozidas

(ESMERINI et al., 2010). De acordo com o Instituto Português do Mar e da Atmosfera (IPMA, 2020), esses indivíduos vivem exclusivamente em ambientes aquáticos, conseguem se adaptar a diferentes meios e com distintas alterações de salinidade, como água salgada, doce ou salobra, e podem viver tanto enterrados na areia quanto fixados em alguns substratos ou livres.

No que diz respeito às características anatômicas, apresentam o pé comprimido lateralmente, a cabeça pouco desenvolvida e a cavidade do manto é a mais espaçosa quando comparada a qualquer classe de moluscos (SILVA&BATISTA, 2008) o corpo é mole, compreendido por um exoesqueleto de consistência rígida em forma de concha, que tem como objetivo assegurar a proteção contra predadores e tolerar a pressão hídrica que são submetidos no meio que habitam. As conchas que envolvem os moluscos são constituídas pela deposição contínua do nácar pelo próprio organismo a partir da superfície interna da concha onde se desenvolve, proporcionando um mecanismo de defesa contra microrganismos. A concha é formada por duas valvas, o fechamento das mesmas ocorre por meio da retração dos músculos adutores, que ficam localizados em cada uma das extremidades do animal (IPMA, 2020).

As brânquias comumente são grandes e apresentam como função principal a coleta de alimentos, além de realizarem a troca gasosa (RUPPERT&BARNES, 1996). São formadas por dois pares de lâminas de cada lado, possuem pequenos filamentos, designados como cílios, que têm como função conduzir a corrente de água para a cavidade do manto (IPMA, 2020). As partículas são direcionadas até à boca por um muco viscoso e é feita a digestão ao longo do trato digestivo; aquilo que não é digerido é eliminado sob forma de fezes ou pseudo-fezes (IPMA, 2020). Dessa forma, captam a água, que passa pelas brânquias, as quais atuam como um filtro, retendo partículas em suspensão: o fitoplâncton, detritos orgânicos, inorgânicos e microrganismos (HUNER&BROWN, 1985). Assim, cada animal é uma pequena unidade filtradora de água e, dependendo da espécie e idade, um único animal adulto pode filtrar, por hora, até 20 litros de água (BARROS et al., 2005).

Os moluscos bivalves são seres vivos bem adaptados ao seu ambiente e desenvolveram a habilidade de se disfarçar em meio aos sedimentos, evitando assim a predação, aumentando as chances de sobrevivência. Porém, alguns fatores ambientais, como temperatura, luz, salinidade, quantidade de oxigênio dissolvido na água, natureza e movimento das águas, podem influenciar os processos fisiológicos e a sua atividade. A respeito da temperatura, quanto mais alta, maior o metabolismo, com isso, aumenta o

movimento ciliar e, conseqüentemente, a quantidade de água bombeada e o ritmo respiratório (IPMA, 2020).

2.4 Principais moluscos no Maranhão

No Nordeste do Brasil, as espécies de moluscos bivalves que ocorrem em maior quantidade são *C. rhizophorae* (ostra-do-mangue), *M. guyanensis* (sururu), *L. pectinata* (sarnambi) (COVA et al., 2015; PINTO et al., 2008; RONDINELLI, 2009), *M. falcata* (sururu) (FRANCA et al., 2013), *T. plebeius* (unha-de-velho, canivete, unha-de-urubu) e *A. brasiliiana* (berbigão, sarnambi de lama) (DE OLIVEIRA et al., 2014; PINTO, 2012), onde são consumidas e comercializadas pelas comunidades ao longo dos estuários. A oferta desses moluscos é perene durante todo ano, porém o melhor período para mariscagem dos sururus é no período seco, já as ostras e os sarnambis qualquer período (LIMA, 2017).

Com relação aos principais moluscos presentes em Paço do Lumiar, São José de Ribamar e Raposa, situados na Ilha do Maranhão, encontram-se o sarnambi de lama (*A. brasiliiana*), sururu de pasta (*M. falcata*), sururu a punho (*M. guyanensis*), tarioba (*Iphigenia brasiliensis*), ostras (*C. rhizophorae*) e unha-de-velho (*Tagelus plebeius*) (PEREIRA et al., 2017).

2.5 *Mytella* spp. (sururu)

Pertencentes à família Mytilidae, os animais incluídos nesse gênero são popularmente conhecidos por “sururu”, “bico-de-ouro” ou “marisco-do-mangue”. Sua distribuição geográfica se estende do México ao Peru, no Oceano Pacífico, e da Venezuela à Santa Catarina, no Atlântico (RIOS, 2009). Habita estuários e manguezais, onde vive enterrada, principalmente, no substrato lodoso na região entremarés e entre as raízes respiratórias de *Avicennia* sp., (mangue preto) preferindo ambientes com altas taxas de sedimentação e elevado índice de partículas em suspensão (COIMBRA, 2003).

É uma espécie dioica cujo dimorfismo sexual se dá pela coloração das gônadas, que nas fêmeas são de alaranjado a vermelho-pardo, e nos machos são de branco-leitoso a marrom claro (CHRISTO&ABSHER, 2001). Seu ciclo reprodutivo é do tipo contínuo (CHRISTO et al., 2016), sendo janeiro e junho os períodos mais elevados de desova, apresenta tamanho variando entre 65 mm a 80 mm de comprimento (BOFFI, 1979; PEREIRA et al., 2003). É altamente tolerante a variações de salinidade, podendo ser encontrada em ambientes com condições de salinidade entre 5% e 35%, porém, não tolera esses extremos por longo período (YUAN et al., 2010).

Esses indivíduos têm preferência por ambientes com valores intermediários de salinidade, entre 16% e 26% (PEREIRA et al., 2007), podem se enterrar até 20 cm abaixo da superfície, variando conforme as condições de sedimento de cada região, que facilita ou dificulta a penetração no sedimento, além disso foi constatado que a temperatura de 33°C é letal para *M. guyanensis* (ONODERA, 2012).

2.6 *Anomalocardia* spp. (sarnambi)

O bivalve *Anomalocardia* spp. é representante da família Veneridae (RAFINISQUE, 1815) e possui distribuição geográfica ao longo das regiões costeiras do Caribe, do Suriname, do Brasil e do Uruguai (RIOS, 1994). No Brasil, é popularmente conhecido por “berbigão”, “vôngole”, “maçunim” e “chumbinho”. É encontrado em locais de águas calmas na zona entremarés de baías e enseadas abrigadas, onde vive enterrado em sedimento arenoso e areno-lodoso a uma profundidade de 5 cm no substrato. Pode ser encontrado tanto no infralitoral raso quanto nas regiões entremarés, incluindo as marismas e os baixios não vegetados, sendo pouco frequente nos manguezais (MONTI et al., 1991; MOUËZA et al., 1999; NARCHI, 1974; SCHAEFFER-NOVELLY, 1976; SCHAEFFER-NOVELLI, 1980; RIOS, 1994).

É uma espécie dioica, sem dimorfismo macroscópico das gônadas. Seu ciclo reprodutivo é do tipo contínuo (BOEHS, 2000), esses indivíduos se tornam férteis quando atingem, aproximadamente, 30 mm de comprimento (MOUËZA et al., 1999). Sua distribuição espacial no sedimento é predominantemente do tipo agregada, principalmente nos sedimentos com alto teor de matéria orgânica (SCHAEFFER-NOVELLY, 1976), pode ser numericamente dominante sobre outras espécies bentônicas (BOEHS&MAGALHÃES, 2004; SCHAEFFER-NOVELLI, 1980;).

Essa espécie é bastante resistente quanto à falta de oxigênio, ficando até 24h em anóxia (HIROKI, 1977). Além disso, *A. brasiliiana* é uma espécie eurihalina, tolerando a entrada da água marinha nas marés altas, mas não se desenvolve em ambientes de baixa salinidade, não sendo encontrada em ambientes com salinidade abaixo de 17% (BOEHS et al., 2008; MONTI et al., 1991).

De acordo com suas características anatômicas, essa espécie habita locais com pouco material em suspensão, o que impede a presença de *A. brasiliiana* em locais com ressuspensão frequente de sedimento, assim como em regiões de turbulência e de alta energia ambiental, como as praias expostas e as áreas estuarinas com fortes correntes (BOEHS&MAGALHÃES, 2004).

2.7 *Crassostrea* spp. (ostra)

As ostras são moluscos bivalves invertebrados, pertencente família Ostreidae. As principais espécies encontradas no Brasil são *C. rhizophorae* (GUILDING, 1828) e *C. gigas* (THUNBERG, 1793). A primeira é conhecida como ostra nativa e ostra-do-mangue, ocorre desde o sul do Caribe até a costa do Uruguai e está presente em toda a costa brasileira (RIOS, 2009). Essa espécie fixa-se sobre substratos consolidados, incluindo rochas, mas seu hábitat preferencial é sobre as raízes do mangue vermelho *Rhizophora mangle* L. (NASCIMENTO, 1983), comumente vive em manguezais ou regiões estuarinas. A ostra *C. gigas*, é proveniente de águas do Pacífico, e extremamente adaptada às condições climáticas do litoral de Santa Catarina, onde as águas são mais frias (BMLP, 2003).

As ostras *Crassostrea* spp., são consideradas euritérmicas suportando variações de temperatura entre 5 a 30°C, mas com faixa ótima de temperatura entre 21 a 28°C (NEHRING, 2006) e eurialinas, possibilitando assim sua presença em vários locais (ANGELL, 1986). São dioicas, apresentam ausência de dimorfismo sexual, a reprodução é sexuada com fecundação externa. Para as ostras *C. rhizophorae*, a faixa de salinidade pode variar de 7 a 28 (FERNANDES&DE LIMA, 1976), as sementes da espécie sobrevivem em salinidade entre 15% a 25% (GUIMARÃES et al., 2008). Já para a *C. gigas*, o fator salinidade ,que pode variar entre 2% a 41% (ANGELL, 1986), tem melhor desenvolvimento em valores de salinidade compreendidos entre 20% a 25% (FAO, 2012).

A temperatura é outro fator importante para as ostras *C. rhizophorae*. Apresenta faixa de temperatura ótima acima de 20°C (AKABOSHI&PEREIRA, 1981). *C. gigas* pode desenvolver-se entre 1,8°C a 35°C, porém entre 11°C a 25°C encontram-se as temperaturas ideais para o seu desenvolvimento (ANGELL, 1986; FAO, 2012) .

2.8 Doenças de notificação obrigatória causadas por protozoários

No mundo existem várias doenças que podem ser tanto zoonoses, quanto doenças que geram prejuízos econômicos na produção e na produtividade, visando a prevenção, o controle e as medidas que devem ser tomadas, a notificação se faz necessária em casos de suspeitas e/ou confirmação (BRASIL, 2013). A nível mundial, a lista estabelecida pela Organização Mundial de Saúde Animal (*World Organisation for Animal Health – WOA*H), fundada como OIE (Escritório Internacional de Epizootias), lista doenças notificáveis que podem ter impactos na saúde animal e humana, e podem afetar adversamente a conservação da vida selvagem (WOAH, 2022).

No Brasil há listas de doenças de notificação obrigatória (DNC) que são vinculadas principalmente ao Ministério da Saúde (MS) e Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). As listas de doenças, agravos e eventos em saúde pública de notificação compulsória em todo o território nacional estão reunidos na Portaria nº 1.271 (BRASIL, 2014), do MS. Cada país, conhecendo suas necessidades, deve elaborar suas listas e seus programas de controle, medidas de prevenção, medidas corretivas e erradicação de enfermidades, baseado no Regulamento Sanitário Internacional (RSI) (BRASIL, 2013).

Tendo em vista os impactos que algumas doenças podem acarretar nessas populações de bivalves, no ano de 2012 foi criado o Plano Nacional de Controle Higiênico Sanitário de Moluscos Bivalves (PNCMB), (Instrução Normativa nº 7, de 8 de maio de 2012), que regula a produção de bivalves que são cultivados no território nacional, programa de vigilância ativa de contaminantes em áreas primárias de produção de ostras, mexilhões, vieiras e berbigões, ou outros moluscos bivalves se houver, com o objetivo de assegurar a saúde pública (VALENTI et al., 2021). A Portaria nº 19, de 4 de fevereiro de 2015, definiu a lista de doenças de notificação obrigatória de animais aquáticos ao Serviço Veterinário Oficial (SVO).

Em relação aos moluscos bivalves, os agentes protistas responsáveis por elevadas taxas de mortalidade e altas taxas de prejuízos econômicos são *Bonamia exitiosa*, *Perkinsus marinus*, *Haplosporidium nelsoni* e *Mikrocytos mackini*, e o agente viral herpesvirus da ostra do tipo I (OSHV-1), que parasita diferentes espécies de moluscos bivalves (MPA, 2015).

2.8.1 Infecção por *Bonamia* spp.

2.8.1 Etiopatogenia, transmissão e sinais clínicos

A bonamiose é uma doença de distribuição cosmopolita causada por indivíduos da classe Ascetosporea, ordem Haplosporida e gênero *Bonamia* spp., protozoário intrahemocítico que acarreta infecção letal nos hemócitos (CARNEGIE&COCHENNEC-LAUREAU, 2004). As espécies que apresentam maiores impactos econômicos para os moluscos bivalves são *Bonamia ostreae* e *Bonamia exitiosa*, que desenvolvem distúrbios fisiológicos e eventualmente a morte dos animais afetados (CRANFIELD et al., 2005).

Morfológicamente, ambas as espécies de *Bonamia* spp. podem ser visualizadas como pequenos organismos esféricos ou ovoides (2-5 µm de largura) no interior dos hemócitos, porém, também podem estar presentes no ambiente extracelular. Esses parasitas apresentam

citoplasma basofílico e um núcleo eosinofílico em colorações feitas por eosina. Em avaliações realizadas em tecidos de ostras da espécie *Ostrea edulis* infectadas por *Bonamia* spp., foi detectada a existência de inúmeras microcélulas, levando a inferir que os protozoários infectam os hemócitos e neles se dividem, onde formas binucleadas também podem ser observadas (BALSEIRO et al., 2006).

Com relação à patogenicidade, dentro dos hemócitos ocorre a multiplicação exacerbada das microcélulas, que acarreta ruptura da célula infectada e o parasita consegue alcançar os tecidos. Quando isso ocorre, os protozoários são fagocitados por outros hemócitos, repetindo o dano celular. O parasita é transferido para todos os órgãos através da hemolinfa, que carrega continuamente hemócitos infectados, a infecção evolui de maneira rápida, tornando-se sistêmica com danos aos tecidos (HINE, 1991, 1997).

O ciclo de vida do parasita fora do hospedeiro ainda é desconhecido, contudo, o mecanismo de transmissão ocorre diretamente entre os hospedeiros afetando as formas larvais, juvenis e adultas, não havendo hospedeiros intermediários, ocorrendo por meio das correntes de água (CRANFIELD et al., 2005). Os sinais clínicos observados nos moluscos são atrofia, má condição geral, musculatura aquosa, lábios de concha cobertos de algas, deformidades das margens branquiais, abscessos e pústulas, lesões no tecido conjuntivo das brânquias e manto, emagrecimento, inibição do desenvolvimento das gônadas, comprometimento do sistema imunológico e destruição do epitélio do tubo digestório, com mortalidade elevada (HINE, 1991).

2.8.2 Epidemiologia molecular de bonamiose em moluscos bivalves

Um estudo realizado por Carnegie et al. (2008) nos Estados Unidos da América (EUA) avaliou-se a sazonalidade da infecção por *Bonamia* spp. em ostras *Crassostrea ariakensis*, por meio de testes histológicos e PCR, com o objetivo de compreender melhor como esse parasita se comporta, sua biologia e as técnicas de manejo. Os autores observaram que, em temperatura menor que 20°C, *Bonamia* spp. não apresenta atividade infectante; já em temperaturas acima dessa faixa, a infecção se torna latente. Em temperaturas mais altas, a mortalidade chegou a 100% e, nas mais amenas, a mortalidade ficou entre 17% a 82%, o que evidencia que a sazonalidade e a temperatura influenciam de forma efetiva no comportamento do parasita.

Em relação à ocorrência do parasita, o primeiro relato de *B. ostreae* ocorreu em 1979, quando se pesquisou as causas da mortalidade em massa da ostra da espécie *O. edulis* em Île Tudy, França (PICHOT et al., 1980). No Canadá, foi confirmada a presença de *B. ostreae*

em três de 37 ostras da espécie *O. edulis* por meio de histologia e técnicas moleculares (MARTY, 2006); no Golfo da Manfredonia, no Mar Adriático, Itália, de 750 ostras *O. edulis*, duas foram positivas nos testes moleculares (NARCISI et al., 2010).

No ano de 2016, na Nova Zelândia (LANE et al., 2016), foi relatado pela primeira vez a presença de *B. ostreae* infectando ostras planas (*Ostrea chilensis*), em que do quantitativo de 149 ostras, 119 foram identificadas por meio da histologia com microcélulas de *Bonamia*. Já nos testes de PCR, apresentaram 100% de correspondência com *Bonamia* sp., sendo 27% positivas para *B. exitiosa* e 40,3% para *B. ostrea* e infecções paralelas foram identificadas em 53,7% dos animais amostrados.

No que se refere a espécie *B. exitiosa*, o primeiro relato ocorreu em 1986, após mortalidade em massa das ostras (*O. chilensis* de Foveaux) na Nova Zelândia. Estudos mais recentes revelaram a presença de *B. exitiosa* em várias espécies de ostras e localidades do mundo (ABOLLO et al., 2008; ARZUL&CARNEGIE, 2015; ENGELSMA et al., 2014; HILL-SPANIK et al., 2014). Em um trabalho realizado por Abollo (2008), foi detectado *B. exitiosa* infectando as ostras planas europeias (*O. edulis*) no Noroeste da Espanha, sendo este o primeiro relato deste parasita em águas europeias.

No ano de 2010, na Tunísia, foi conduzido um estudo com 85 ostras (*Ostrea stentina*) para detecção de *Bonamia* sp. por meio de PCR. Do total avaliado, nove foram positivas para o protozoário e, no sequenciamento, apresentaram semelhança de 99,1%-99,7% com *B. exitiosa* (HILL et al., 2010,2014).

Na Flórida, foi possível detectar a presença da *B. exitiosa* em ostras (*C. ariakensis* e *C. virginica*) por meio de técnicas histológicas e por meio da PCR (DUNGAN et al., 2012). Um estudo realizado na Patagônia, Argentina, com o objetivo de avaliar se a infecção por *B. exitiosa* havia persistido após 14 anos nos leitos naturais de ostras da espécie *Ostrea puelchana*, foi constatado que o protozoário ainda está presente e parece controlar a estrutura populacional local (KISSNER et al., 2014; HILL et al., 2014). Até o presente momento não há relatos de bonamiose no Brasil.

2.9 Infecção por *Perkinsus* spp.

2.9.1 Etiopatogenia, transmissão e sinais clínicos

A perkinsiose é uma doença causada pelo protozoário pertencente ao filo Perkinsozoa, ordem Perkinsida, família Perkinsidae e gênero *Perkinsus* sp. (LEVINE, 1978). De acordo com Perkins (1976) e Levine (1978), *Perkinsus* spp. foram classificadas como integrantes do grupo Apicomplexa. Entretanto, análises filogenéticas e moleculares

realizadas por Reece et al. (1997) e Siddall et al. (2001) colocaram estes parasitas como inerentes à Dinoflagellata. Posteriormente, foram incluídos no filo Perkinsozoa (VILLALBA et al., 2004).

Este protozoário gera grandes perdas econômicas devido à alta taxa de mortalidade que ocasiona (VILLALBA et al., 2004), dentre as espécies de maiores impactos, tem-se *Perkinsus marinus* e *Perkinsus olseni*, que são de notificação obrigatória, segundo a Organização Mundial de Saúde Animal (OIE, 2012).

O ciclo de vida do protozoário *Perkinsus* ocorre comumente dentro de fagócitos. A temperatura é um fator de maior impacto no aumento da proliferação do agente, em que ocorre elevação da patogenicidade e mortalidade. Em termos de ciclo biológico existe o estágio em forma de trofozoítos que quando se encontram maduros medem de 3 a 10 µm de diâmetro, eles se deslocam para as extremidades da célula e adentram no interior das células do tecido conjuntivo e epitelial, onde começa o estágio denominado de roseta, que é o processo de sucessivas multiplicações. Os esporângios têm variação de tamanho de 4 a 15 µm de diâmetro e pode conter entre 2, 4, 8, 16 ou 32 trofozoítos em desenvolvimento. Na finalização desse processo de 8 a 32 trofozoítos imaturos são liberados. Os hospedeiros são infectados através de zoósporos biflagelados (VILLALBA et al., 2004, 2011).

Quando os hospedeiros apresentam tecidos infectado por *Perkinsus* e são incubados em meio líquido de tioglicolato (RFTM) sob condições anaeróbias e na ausência de luz, os trofozoítos aumentam diversas vezes o seu tamanho e a sua parede celular apresenta-se compacta, transformando-se no estágio denominado de hipnósporo. Os hipnósporos apresentam particularidades como de sobrevivência durante longos períodos, em condições desfavoráveis, sendo consideradas formas de resistência (CASAS et al., 2002). Porém, eles conservam a capacidade de transformarem-se em zoosporângio, ao encontrar condições propícias. Este fato foi confirmado quando os hipnósporos foram incubados em água do mar e observou-se a zoosporulação, culminando com a formação e a liberação de zoósporos biflagelados (CHOI&PARK, 2010).

O mecanismo de transmissão da perkinsiose é horizontal, isto é, ocorre diretamente entre indivíduos e todos os estágios do ciclo de vida podem causar infecção (VILLALBA et al., 2004, 2011). Dentre os sinais clínicos, estão abscessos, pústulas, ruptura do tecido conjuntivo, cistos macroscópicos nas brânquias, emagrecimento, inibição do desenvolvimento das gônadas, comprometimento do sistema imunológico e destruição do epitélio do tubo digestório (AZEVEDO, 1989; PARK&CHOI, 2001).

Perkinsus marinus multiplica-se e causa condensação dos tecidos infectados. As quebras de tecidos e o bloqueio de algumas defesas dos moluscos podem ocorrer devido à produção de fatores proteolíticos, liberados extracelularmente, observados por Castillo (1998), em estudo *in vitro*. Ostras infectadas com *P. marinus* apresentaram como sinais clínicos glândula digestiva com “aspecto pálido”, redução do índice de condição corporal, severa emaciação, abertura da concha (*gaping*), retração do manto, inibição do desenvolvimento gonádico, crescimento retardado, abscessos e lesões, com registros de até 95% de mortalidade nas mesmas (BOWER et al., 1994; OIE, 2016).

2.9.2 Epidemiologia molecular de perkinsiose em moluscos bivalves

O primeiro relato de identificação de *Perkinsus* spp. ocorreu em populações de ostras da espécie *C. virginica* na Louisiana, costa atlântica dos EUA em 1940 (MACKIN et al., 1950). O estudo realizado por Power (2006) teve como objetivo avaliar nos recifes de ostras (*C. virginica*) a presença de *P. marinus* em que se detectou prevalência de 100% em alguns locais nas águas costeiras da Georgia (EUA), porém, com intensidade considerada baixa, variando de 0 a 1,83. Contudo é importante a realização de monitoramento temporal do local, já que o protozoário acarreta problemas econômicos na produção.

Na costa do Pacífico, México, a cultura da ostra da espécie *Crassostrea corteziensis* tem se tornado cada vez mais comum pois *C. gigas* tem sofrido episódios de mortalidade. No estudo realizado por Cáceres-Martínez et al. (2008) nessa região foi detectado, por meio de análises histopatológicas, alterações teciduais nas ostras compatíveis com lesões ocasionadas por *Perkinsus* sp., sendo confirmada a infecção por meio de testes moleculares específicos e sequenciamento, que mostrou 100% de cobertura e 98% de identidade para *P. marinus*. Este é considerado como o primeiro registro de *P. marinus* em ostras *C. gigas*, na América do Norte e primeiro registro em ostras *C. corteziensis*.

Um grupo com 30 moluscos (*Tridacna crocea*) foram importados para a Florida, EUA, para a realização de pesquisas, em que foi detectado, por meio da histologia e testes moleculares, a presença de *P. olseni*, o que confirma que a importação de amêijoas ornamentais não testadas e não estando em quarentena, possivelmente permitiu a introdução *P. olseni* nos EUA (SHEPPARD et al., 2008). No Uruguai, foi detectado *P. olseni* em uma espécie de sarnambi, *Pitar rostrata* que na histologia pode-se observar grave infiltração dos tecidos, com a confirmação do patógeno por PCR e sequenciamento (CREMONTE et al., 2005).

Um estudo realizado em Galiza, Noroeste da Espanha, com amêijoas da espécie *Ruditapes decussatus* coletadas durante um ano, avaliou-se por meio de técnicas histológicas como *P. olseni* poderia influenciar na reprodução desses moluscos, sendo constatado que apesar da infecção eles conseguiram produzir gametas e desovar sem ter consequências na eficiência da fecundidade e desova (CASAS, 2012).

Uma pesquisa realizada na França em 2012, com o objetivo de caracterizar protozoários circulantes em amêijoas das espécies *Ruditapes philippinarum* e *R. decussatus*, coletados de áreas distintas de produção por meio da técnica de PCR e sequenciamento, foi possível detectar *P. olseni* (ARZUL et al., 2012).

Em Tibau do Sul, no Rio Grande do Norte, uma investigação realizada utilizou o policultivo como alternativa na redução das consequências no meio ambiente e progresso na produção de ostras. Análises feitas detectaram a ocorrência de *Perkinsus* spp. em ostras *C. gasar* por meio das técnicas de RFTM e PCR. Foi observado que os reprodutores foram infectados por *Perkinsus* spp. As sementes adquiriram a infecção por *Perkinsus* quando transferidas para os viveiros. Assim constatou-se ser possível produzir sementes de ostras *C. gasar* livres de *Perkinsus* a partir de reprodutores infectados, e seu cultivo em viveiros de camarão é viável (SILVA et al., 2016).

Outro estudo realizado no Brasil, com *C. gigas* e *C. rhizophorae*, teve o objetivo de avaliar como parâmetros de temperatura e salinidade influenciam no aumento da proliferação do protozoário *P. marinus*, os resultados permitiram concluir que, quanto maior a temperatura e a salinidade, maiores serão os danos ao protozoário, o que pode estar relacionado a estresse oxidativo (QUEIROGA et al., 2016).

Em Santa Catarina, estado com a maior produção de ostras do Brasil, tendo em conta a patogenicidade da perkinsiose, foi realizada uma pesquisa nas duas espécies de ostras presentes no cultivo, *C. gasar* e *C. gigas*. O estudo envolveu oito locais de coleta ao longo da costa do litoral; para a detecção, foram utilizadas as técnicas RFTM, histologia, PCR e sequenciamento, havendo positividade para *P. marinus* em *C. gasar* e *C. gigas*, sendo este o primeiro relato de *P. marinus* em *C. gigas* na América do Sul (LUZ et al., 2019). Até o presente momento não há relatos de perkinsiose na Ilha do Maranhão.

2.10 Diagnóstico

Os métodos de diagnóstico para *Bonamia* spp. e *Perkinsus* spp. podem ser realizados por meio de técnicas histológicas com cortes de seções transversais do tecido que incluem brânquias, glândulas digestivas, manto e gônadas, corado com hematoxilina e eosina

(MOORE, 2006), no caso de *Perkinsus*, os trofozoítos podem ser facilmente visualizados e geralmente estão associados à infiltração de um grande número de hemócitos nos tecidos (SAGRISTA et al., 1995), porém apresenta baixa sensibilidade quando comparada a técnicas mais atuais como Reação em Cadeia da Polimerase Convencional (cPCR) e Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa em Tempo Real (qPCR) que apresentam sensibilidade e especificidade maiores (CARNEGIE&COCHENNEC-LAUREAU, 2004; DIGGLES et al., 2003; HINE et al., 2001).

Ensaio de PCR para *Bonamia* spp. possibilitam o diagnóstico do agente envolvido e o principal gene utilizado tem sido o SSU (*Small Subunit Ribosomal*) ou 18S (RAMILO et al., 2008) com isso, o uso desta técnica tem permitido análises da ocorrência desse parasito em determinados locais, diferentes hospedeiros além de estudos de diversidade genética.

De acordo com as recomendações da OIE (2012), o diagnóstico presuntivo da infecção por *Perkinsus* spp. podem ser com a PCR, onde a técnica molecular foi desenvolvida a partir da amplificação de uma parte da região não espaçador transcrito (*Non Transcribed Spacer*, NTS) do rRNA (GAUTHIER et al., 1998; PENNA et al., 2001). Para as duas espécies, foi feito um conjunto de *primers* a partir da sequência espaçadora interna (*Internal Transcribed Spacer*, ITS) (AUDEMARD et al., 2004), que serve tanto como diagnóstico confirmatório por meio de PCR, sequenciamento e microscopia eletrônica de transmissão (*Transmission Electronic Microscopy*, TEM) (SAGRISTA et al., 1995).

Segundo as recomendações da OIE relacionadas as técnicas para vigilância, podem ser usadas impressões teciduais, histopatologia e PCR, para um diagnóstico presuntivo e variações da PCR, sequenciamento e microscopia eletrônica de transmissão para um estudo confirmatório. Além das técnicas mencionadas anteriormente, tem-se por meio da técnica de cultura *Ray's Fluid Thioglycolate Medium* (Meio Fluido de Tioglicolato de Ray, RFTM), onde o tecido do hospedeiro que é utilizado geralmente é a brânquia, porém a maior limitação da utilização desta técnica é o tempo necessários para a obtenção dos hispnósporos, que podem ser visualizados de 5 a 7 dias após a coloração com iodo lugol (RAY, 1954). A técnica hibridização *in situ* (IHS) (MOSS&REECE, 2006), que pode ajudar a detecção de infecção precoce e microscopia eletrônica de transmissão (TEM) porém é demorada e não pode ser aplicada na rotina (SAGRISTA et al., 1995). O sequenciamento é recomendado na etapa final para fechar o diagnóstico de forma confirmatória. As regiões alvo são SSU rDNA e ITS1. As sequências obtidas devem ser comparadas com as disponíveis em bancos de genes e o sequenciamento para confirmação de espécies (OIE, 2019).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Pesquisar protozoários de notificação compulsória em populações naturais de moluscos bivalves na Ilha do Maranhão, Brasil.

3.2 Objetivos específicos

- Detectar o DNA de protozoários de notificação compulsória *Bonamia* spp. e *Perkinsus* spp., em amostras teciduais de *Mytella* spp., *Anomalocardia* spp. e *Crassostrea* spp., por meio de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) convencional;
- Avaliar o DNA das amostras positivas a fim de identificar as espécies de *Bonamia* spp. e *Perkinsus* spp. encontradas.

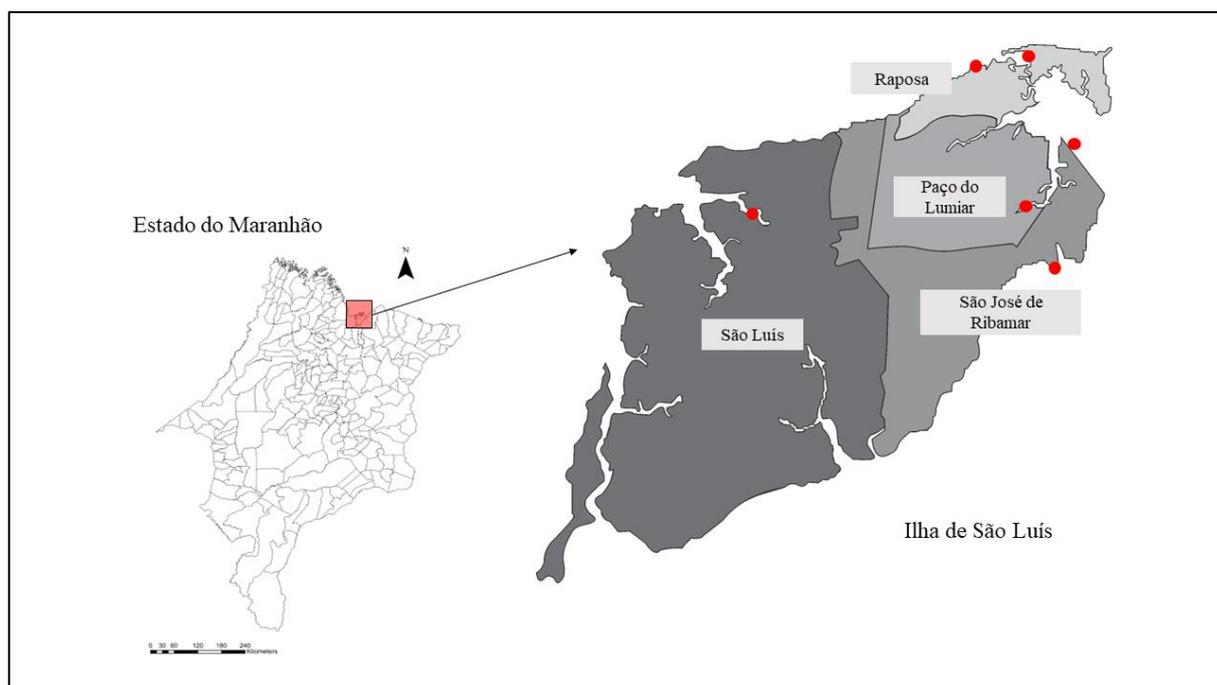
4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local de Estudo, Animais e Coleta de Amostras

O estudo foi conduzido nos municípios São Luís, Paço do Lumiar e Raposa, que integram a Ilha do Maranhão. Esses municípios apresentam clima tropical úmido, temperaturas elevadas superiores a 26°C durante o período seco, nos meses com temperaturas mais amenas, no período de maior pluviosidade, chega a 23°C (NuGeo UEMA, 2016).

A área estudada apresenta duas estações bem definidas ao longo do ano, uma chuvosa nos meses de janeiro a junho, e a outra seca, de julho a dezembro. As médias pluviométricas totais anuais variam entre 1.800mm e 2.000mm. O mês que concentra as maiores precipitações é o mês de abril, e o que apresenta menor índice pluviométrico é o mês de outubro (NuGeo UEMA, 2016).

FIGURA 1. Mapa da Ilha do Maranhã



Fonte: autor.

No presente estudo, foram utilizados 90 espécimes de sururu (*Mytella* spp.), (SOOT, 1955), 90 sarnambis (*Anomalocardia* spp.) (SCHUMACHER, 1817) e 63 ostras (*Crassostrea* spp.) (SACCO, 1897), provenientes de bancos naturais dos municípios da Ilha do Maranhão, coletados de forma manual. As coletas foram realizadas entre os meses de janeiro a maio de 2022, que corresponde ao período chuvoso da área amostrada. Após coletados, os moluscos foram transportados em caixas térmicas, em temperatura ambiente, para o Laboratório de Patologia Molecular da Universidade Estadual do Maranhão (LPMol/UEMA), mantidos em recipientes contendo água do mar para serem processados no mesmo dia.

Foram formados três grandes grupos de moluscos por espécie amostrada, os quais foram constituídos por *pools*, cada *pool* continha três animais de cada espécie que apresentaram características morfométricas semelhantes como por exemplo altura. No processamento, os animais foram limpos com a água do mar, retirado de suas conchas materiais incrustantes e abertos com o auxílio de lâminas de bisturis. Após a abertura, foi realizado a separação das brânquias do restante da musculatura do molusco em que se obtiveram os *pools*, totalizando 81 *pools* (TABELA 1), sendo esta uma adaptação ao protocolo proposto por Esmerini et al. (2010). Após o processo de separação, os *pools* foram

acondicionados em microtubos estéreis de 1,5 mL livres de nucleases e armazenados em freezer a -20°C no LPMol/UEMA para a realização das análises propostas.

TABELA 1 Quantidade de moluscos bivalves e número de *pools* formados para a pesquisa de protozoários de notificação compulsória.

Espécie de bivalve	Nº de animais	Nº de animais em cada <i>pool</i>	Nº de <i>pools</i>
<i>Mytella</i> spp.	90	03	30
<i>Anomalocardia</i> spp.	90	03	30
<i>Crassostrea</i> spp.	63	03	21

4.2 Extração de DNA

Para a extração e purificação de DNA dos *pools* das brânquias foi utilizado o protocolo de extração de fenol-clorofórmio, de acordo com a metodologia padronizada por Cochenec et al. (2000), em que os tecidos passaram por digestão com proteínase K, overnight a 50 °C. A concentração e qualidade do DNA extraído foi determinada espectrofotômetro (através das taxas 260/230 e 260/280).

4.3 Detecção do gene endógeno 18S rRNA para DNA de eucarioto

Com o intuito de verificar a qualidade da extração, a integridade do DNA obtido e/ou a presença de inibidores da reação, todas as amostras extraídas dos moluscos bivalves foram submetidas à PCR para confirmação da presença do gene conservado 18S previamente descritos por Farjado et al. (2008), que produz um fragmento de 140 pares de base (Tabela 1). Cada reação apresentou um volume total de 12,5 µL, sendo: 6,25µL de PCR Master mix Promega® (Taqpolymerase, dNTPs, MgCl₂, buffer); 0,5 µL de cada primer (18SEUDIR /18SEUINV) (10pmol); 4,25 µL de água DNase e RNase free; e 1 µL de amostra de DNA extraído (100ng/reação). O protocolo de amplificação seguiu uma etapa de desnaturação inicial de 50°C por 2 minutos, seguido de 95°C por 10 minutos, 40 ciclos de amplificação de 95°C por 15 segundos, 60°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto e extensão final a 72°C por 5 minutos.

4.4 Detecção de *B. ostreae* e *B. exitiosa* por meio da PCR convencional com base no gene 18S rDNA

Os ensaios de PCR foram realizados de acordo com o protocolo proposto por Ramilo et al. (2008) utilizando um volume total de 25 µL contendo 12,5µL de PCR Master Mix Promega® (Taq polymeras, dNTPs, MgCl₂ e buffer); 1µL cada primer específico para *B*

ostreae (BOSTRE-F/R) ou *B. exitiosa* (BEXITF/R) (a 2,5 pmol); 8,5µL de água livre de DNase e RNase (Promega®) e 2µL do DNA extraído (a 250 ng). Os ensaios de PCR foram realizados em um termociclador sob os seguintes parâmetros de reação: 94°C por 2 min, 35 ciclos a uma temperatura de fusão de 94°C por 30 s, temperatura de anelamento de 55°C por *B. ostreae* e 58°C para *B. exitiosa* por 45 s, temperatura de extensão de 72°C por 1 min, seguido por um período de extensão final de 72°C por 1 min. (TABELA 2).

4.5 Detecção de *Bonamia* spp., por meio da PCR convencional com base no gene SSU rDNA

Os ensaios de PCR foram realizados de acordo com o protocolo proposto por Cochenec et al. (2000) utilizando um volume total de 25 µL contendo 12,5µL de PCR Master Mix Promega® (Taq polymeras, dNTPs, MgCl₂ e buffer); 1µL cada primer específico CR /CF (a 2,5 pmol); 8,5µL de água livre de DNase e RNase (Promega®) e 2µL do DNA extraído (a 250 ng). Os ensaios de PCR foram realizados em um termociclador sob os seguintes parâmetros de reação DNA molde por 5 min a 94 °C, seguido de 30 ciclos de 94 °C por 1 min/55 °C por 1 min/72 °C por 1 min, e finalmente seguido por uma extensão final por 10 min a 72°C. (TABELA 2).

4.6 Detecção de *Perkinsus* spp., por meio da PCR convencional com base no gene ITS rRNA

Para a realização dos ensaios de PCR foi utilizada a metodologia e oligonucleotídeos padronizados por Audemard et al. (2004) utilizando um volume total de 25 µL contendo 12,5µL de PCR Master Mix Promega® (Taq polymeras, dNTPs, MgCl₂ e buffer); 1µL cada primer específico PerkITS-85/PerkITS-750 (a 2,5 pmol); 8,5µL de água livre de DNase e RNase (Promega®) e 2µL do DNA extraído (a 250 ng). Os ensaios de PCR foram realizados em um termociclador sob os seguintes parâmetros de reação DNA molde com desnaturação inicial a 95°C para 4 minutos seguidos de 40 ciclos de 95°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto, com alongamento final a 72°C por 10 minutos. (TABELA 2).

TABELA 2 Descrição das sequências de oligonucleotídeos utilizadas nos ensaios de PCR convencional para *Bonamia* spp. e *Perkinsus* spp.

Gene	Agentes/alvo	Sequência de Oligonucleotídeos (5'-3')	Referências
(18SrDNA): 140pb	--	18SEUDIR TCTGCCCTATCAACTTTCGATGG 18SEUINV TAATTTGCGCGCCTGCTG BOSTRE-F TTACGTCCCTGCCCTTTGTA (AF262995)	Farjado et al. (2008)
(18SrDNA): 208pb	<i>Bonamia ostreae</i>	BOSTRE-R TCGCGGTTGAATTTTATCGT (AF262995) BEXIT-F (GCGCGTTCTTAGAAGCTTTG (DQ312295)	Ramilo et al. (2008)
(18SrDNA): 246pb	<i>Bonamia exitiosa</i>	BEXIT-R (AAGATTGATGTCGGCATGTCT) (DQ312295)	Ramilo et al. (2008)
(SSUrDNA)760pb	<i>Bonamia</i> spp.	Cf5' CGGGGGCATAATTCAGGAAC3' Cr5' CCATCTGCTGGAGACACAG3	Cochennec et al. (2000)
(ITSrRNA): 703pb	<i>Perkinsus</i> spp,	PerkITS85, 5' CCG-CTT-TGT-TTG-GAT-CCC-3 Perk ITS-750 5'-ACA-TCA-GGC-CTT-CTA-ATG-ATG-3	Audemard et al. (2004)

4.7 Eletroforese em gel de agarose

Os produtos amplificados foram avaliados em gel de agarose a 1,5%, e a programação na cuba de eletroforese de 100V, 100 mA, 100W e 45 minutos de corrida. Para a determinação dos produtos amplificados, utilizou-se um marcador de peso molecular de 100 pb (DNA ladder Promega®). Os resultados foram visibilizados e analisados por meio de um transiluminador de luz ultravioleta acoplado a um programa computacional de análise de dados (Compact Gel Documentation Syst, L-PIX EX, loccus®).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das amostras testadas de sururus, sarnambis e ostras para o gene endógeno que apresentaram positivities comprovando a integridade do material extraído.



FIGURA 2. Fotografia de eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com Sybr Safe. Os amplímeros mostrados na foto são relativos à cPCR para gene 18S rRNA. Canaleta PM: marcador de peso molecular em escala de 100 pares de bases; canaleta CP: controle positivo. Canaleta de 01 a 05 com amostras e canaleta 10 com CN: controle negativo.

Foram analisadas as amostras de DNA dos *pools* de sururus, *pools* sarnambi e *pools* de ostras conforme descrito no item Material e Métodos (Tabela 1) contudo não houve anelamento e amplificação de DNA para detecção de *Bonamia* spp. com base nos genes 18SrDNA e SSUrDNA. Da mesma forma a PCR não detectou amplificação de DNA de *Perkinsus* spp., com base no gene ITS rRNA, entre os animais testados. Este resultado observado na Ilha do Maranhão, embora negativo, não é incomum ao diagnóstico de *Bonamia* spp. em sururus (*Mytella* spp.), sarnambi (*Anomalocardia* spp.) e ostras (*Crassostrea* spp.). Resultados semelhantes em que não foi evidenciada detecção molecular do agente já foram relatados em outras pesquisas realizadas na Paraíba, Santa Catarina e sudeste do Brasil, conforme descrito por Da Silva et al. (2014); Sabry et al. (2011) e Sühnel et al. (2016) respectivamente.

Na América do Sul *Bonamia* spp foi identificada no Chile (LOHRMANN et al., 2009) e Argentina (KROECK et al., 2008). Na Argentina, foram analisadas 1.198 ostras da espécie *O. puelchana*, das quais 252 foram positivas para *Bonamia* spp. (KROECK et al., 2008) por meio de análises histológicas. Em outros países, especialmente no continente europeu, este parasita tem sido responsável por causar elevadas taxas de mortalidade nos cultivos (MONTES, 1991; NARCISI et al., 2010; PICHOT et al., 1980). Na Galícia (Espanha), foi realizado um estudo por Abollo et al. (2008) com 188 ostras de cultivo da espécie *O. edulis*, as quais foram positivas na PCR para *Bonamia* spp., após análises de

sequenciamento, os autores identificaram que 55 (43,3%) foram *B. ostrea*, 51 (40,2%) *B. exitiosa* e 21 (16,5%) apresentaram coinfeção por *B. ostrea* e *B. exitiosa*.

No Brasil, ainda são pontuais os locais de claro diagnóstico de *Bonamia* spp., sendo assim um dos motivos de realização dessa pesquisa, introduzir o diagnóstico de agentes potencialmente presentes nos cultivos domésticos/artesanais do MA. Para o melhor entendimento dos fatores que podem ter influenciado os resultados encontrados na presente pesquisa, é importante destacar que a Ilha do Maranhão apresenta variações de temperatura e salinidade no período chuvoso e no período de estiagem, devido à dinâmica de marés, a pluviosidade, bancos de areia e topografia.

De acordo com Do Nascimento et al. (2020), com base nas variações pluviométricas, a salinidade apresenta mudanças com valores médios que variam de 25,3 e 36,7 para chuva e estiagem, respectivamente. Queiroga et al. (2016), descreve ainda que a salinidade é um importante fator para a proliferação de protozoários do gênero *Bonamia* spp., a salinidade de 20 psu (unidade prática de salinidade, *Practical Salinity Unit*) demonstrou-se adequada para proliferação do patógeno. Salinidades acima de 35psu reduzem a taxa de proliferação, que ocorre de forma mais lenta. Outro fator que deve ser levado em consideração diz respeito ao fluxo de marés oriundos das baías, além da conexão com manguezais e dunas, que fazem com que este estuário esteja sujeito a dissipação de sedimentos, assim como de parasitos.

Kroeck et al. (2008) realizaram o monitoramento com o objetivo de analisar a ocorrência de *Bonamia* spp. em cinco bancos naturais e destacaram que fatores semelhantes aos descritos em nosso local de estudo, como o alto fluxo de maré, que baixa duas vezes ao dia, fazem com que a carga parasitária se disperse, reduzindo assim a infecção nos moluscos da região.

Com relação a temperatura do mar, Narcisi et al. (2010), em pesquisa de *Bonamia* spp. no Mar Adriático (Itália), observaram que a detecção molecular era baixa devido a temperatura do mar acima de 25 °C. Embora as localizações geográficas e climáticas sejam distintas entre essa região e a do presente estudo, a temperatura média da água do mar na Ilha do Maranhão oscila de 28,2°C a 34°C ao longo do ano, o que poderia ser um dos fatores que contribuiu para a não detecção de *Bonamia* spp nesta pesquisa.

Com relação os hospedeiros suscetíveis ao protozoário *Bonamia* spp. temos as ostras da espécie *Ostrea chilensis* (DINAMANI et al., 1987), *O. angasi* (CORBEIL et al., 2006) *O. edulis* (ABOLLO et al., 2008; NARCISI et al., 2010) e *O. stentina* (HILL et al., 2010), porém no local de estudo as ostras presentes são da espécie *C. rhizophorae* outro fator que pode ter corroborado para a não detecção do agente.

No presente trabalho, não foi possível detectar o DNA de *Perkinsus* spp. em nenhuma das espécies de moluscos bivalves testados. Contudo diferentemente de *Bonamia* spp, o agente *Perkinsus* spp já foi relatado em outras pesquisas realizadas em diferentes estados do Nordeste brasileiro. No Ceará, por exemplo, foi possível identificar pela técnica RFTM, o crescimento do parasito em meio de cultura infectando tecido da brânquia e reto com moderada prevalência de 36% em sururus da espécie *M. falcata* (PRAXEDES, 2010). Nesse mesmo Estado, Sabry et al. (2009), analisaram 450 ostras *C. rhizophorae*, das quais 21 (4,6%) foram positivas para *Perkinsus* spp. por meio da técnica de PCR.

No estado da Paraíba, 140 ostras de cultivo da espécie *C. gasar* foram analisadas e apresentaram modificações histopatológicas sugestivas para a presença do parasita *Perkinsus* spp. Tais análises foram realizadas por meio da técnica de PCR e sequenciamento e detectaram a presença da espécie *P. beihaiensis* em oito ostras, *P. olsenii* em uma ostra e *P. marinus* em seis ostras conforme Queiroga et al., (2013) e Queiroga et al. (2015). No estado da Bahia, foi realizado um estudo em ostras da espécie *C. rhizophorae* oriundas de estoque natural e de cultivo do tipo sistema espinhel, por meio de técnicas laboratoriais e sequenciamento, culminando com a identificação de *P. beihaiensis*, sendo o primeiro relato desta espécie realizado por Luz&Boehs (2016) no estado da Bahia e o segundo no Brasil e na América do Sul.

Um estudo realizado por Dantas Neto et al. (2015) no estuário do Nordeste setentrional, que inclui o estuário do Rio Jaguaribe, localizado no litoral leste do estado do Ceará, o estuário do Rio Camurupim, situado ao norte do estado do Piauí e no estuário do Rio Carnaubeiras, localizado na porção extremo-leste do estado do Maranhão, demonstrou cerca de 50 amostras de ostras da espécie *C. rhizophorae* houve o crescimento do parasito *Perkinsus* spp. por meio da técnica RFTM. Ao utilizar a técnica de PCR, foi confirmada a ocorrência de *Perkinsus* spp. em uma ostra no Maranhão, duas no Piauí e em três no Ceará e foi até o presente momento o único relato de ocorrência de *Perkinsus* spp. no estado do Maranhão. Embora os animais tenham sido amostrados de uma área distinta do presente estudo, é um resultado muito próximo do que encontramos nessa pesquisa.

Um estudo comparativo entre o período de menor e maior índice de chuvas, realizado no estado de Sergipe, demonstrou que, no período seco as taxas de positividade de *Perkinsus* foram maiores que no período chuvoso com queda de 80% para 9%, respectivamente (DA SILVA, 2014). A exemplo de outros estudos já citados anteriormente, fatores como temperatura, salinidade e índices pluviométricos podem influenciar a proliferação e sobrevivência dos patógenos *Bonamia* spp. e *Perkinsus* spp.. Nesse sentido, considerando

que as coletas deste trabalho foram realizadas no período chuvoso, sugere-se que um ou mais fatores ambientais ocorridos na área amostrada podem ter atuado nos resultados desta pesquisa durante o seu desenvolvimento.

Bonamia spp. e *Perkinsus* spp. estão incluídos na lista de doenças de notificação obrigatória da OIE (2012) e, embora não sejam zoonoses, estas doenças causam alterações importantes nos moluscos bivalves, como a redução no crescimento, emagrecimento, válvulas abertas, ruptura no tecido conjuntivo das brânquias e do manto, cistos macroscópicos nas brânquias, presença de abscessos e pústulas, desenvolvimento reduzido das gônadas, comprometimento do sistema imunológico e destruição do epitélio digestivo, acarretando prejuízos econômicos em áreas endêmicas. Apesar de estarem distribuídos em diversas partes do mundo, incluindo o Brasil (gênero *Perkinsus*), a identificação destes agentes etiológicos em moluscos bivalves é de suma importância para o conhecimento de sua ocorrência e implementação de medidas gerais de biossegurança.

Deve-se ressaltar, ainda, que há uma cadeia produtiva caracterizada pela prática artesanal, na qual as atividades de extração desses organismos representam um complemento na renda de muitas famílias e apresenta relevância tanto do ponto de vista comercial quanto da segurança alimentar. Dessa forma, ainda que existam poucos relatos sobre a ocorrência desses agentes em águas maranhenses, tendo em vista a importância já citada, os trabalhos que visam realizar o diagnóstico desses patógenos são válidos e devem ocorrer com periodicidade para que seja feito o monitoramento desses cultivos tão importantes para o Estado.

6. CONCLUSÃO

Não foi detectado DNA de protozoários *Bonamia* spp. e *Perkinsus* spp. no período chuvoso em populações naturais de *Mytella* spp., *Anomalocardia* spp. e *Crassostrea* spp., nos estuários que integram a Ilha do Maranhão.

7. CONSIDERAÇÕES FUTURAS

Embora a frequência de casos positivos tenha sido ausente e nenhuma mortalidade relacionada a estes parasitas tenha sido relatada na região, a vigilância e monitoramento das populações de moluscos bivalves é necessária para a garantia da sanidade animal e da fonte de alimentação para muitas famílias maranhenses.

Os resultados obtidos nesta pesquisa são importantes para auxiliar no direcionamento de medidas sanitárias, alertar as autoridades sanitárias, orientar a sociedade e, futuramente, contribuir para estruturação de uma cadeia produtiva de moluscos bivalves tecnificada,

visando à prevenção e a indispensabilidade do conhecimento da presença e monitoramento desses patógenos que podem afetar de forma negativa a produção desses mariscos e impactos econômicos.

Contudo a ausência destes agentes infecciosos contribui para estimular a estruturação de uma cadeia produtiva de moluscos bivalves tecnificada já que tem-se fatores ambientais favoráveis. A metodologia aplicada neste trabalho para o diagnóstico dos protozoários *Bonamia* spp., e *Perkinsus* spp., é eficaz e pode ser adotada para o monitoramento sanitário pelo serviço oficial.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOLLO, E.; RAMILO, A.; CASAS, S. M.; COMESAÑA, P.; CAO, A.; CARBALLAL, M.; VILLALBA, A. First detection of the protozoan parasite *Bonamia exitiosa* (Haplosporidia) infecting flat oyster *Ostrea edulis* grown in European waters. **Aquaculture**, v. 274, n. 2-4, p. 201–207, 2008. Disponível em: < <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.11.037>>.

AKABOSHI, S.; PERREIRA O. M. Ostricultura na região lagunar-estuarina de Cananéia, São Paulo, Brasil. I. Captação de larvas de ostras, *Crassostrea brasiliiana* (Lamarck, 1819), em ambiente natural. **B. Inst. de Pesca.** (único), p. 87-104, 1981.

AMARAL, A.C.Z. & JABLONSKI, S. Conservação da biodiversidade marinha e costeira no Brasil. **Megadiversidade**. V.1, p.43–51, 2005.

ANGELL, C. L. The biology and culture of Tropical oysters. **WorldFish**, v.13, 1986.

ARZUL, I.; CHOLLET, B.; MICHEL, J.; ROB, M.; GARCIA, C.; JOLY, J. P.; MIOSSEC, L. One *Perkinsus* species may hide another: characterization of *Perkinsus* species present in clam production areas of France. **Parasitology**, v. 139, n. 13, p. 1757-1771, 2012. Disponível em: < <https://doi.org/10.1017/S0031182012001047>>.

ARZUL, I.; CARNEGIE, R. B. New perspective on the haplosporidian parasites of molluscs. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 131, p. 32–42, 2015. Disponível em : < <https://doi.org/10.1016/j.jip.2015.07.014>>.

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, n. 11, p. 6611-6618, 2004. Disponível em: < <https://doi.org/10.1128/AEM.70.11.6611-6618.2004>>.

AZEVEDO, C. Fine Structure of *Perkinsus atlanticus* n. sp. (Apicomplexa, Perkinsea) Parasite of the Clam *Ruditapes decussatus* from Portugal. **The Journal of Parasitology**, v. 75, n. 4, p. 627, 1989. Disponível em: < <https://doi.org/10.2307/3282915>>.

BALSEIRO, P. CONCHAS, R. F.; MONTES, J.; LEÓN, J. G.; NOVOA B.; FIGUERAS, A. Comparison of diagnosis techniques for the protozoan parasite *Bonamia ostreae* in flat

oyster *Ostrea edulis*. **Aquaculture**, v. 261, n. 4, p. 1135-1143, 2006. Disponível em : < <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.05.014>>.

BARROS, L.M.O.; THEOPHILO, G.N.D.; COSTA, R.G.; RODRIGUES, D.P.; VIEIRA, R.H.S.F. Contaminante fecal da ostra *Crassostrea rhizophorae* comercializada na Praia do Futuro, Fortaleza-Ceará. **Revista Ciências Agronômica, Fortaleza**, v.36, n.3, p.285289, 2005.

BMLP. Manuais de maricultura: cultivo de mexilhões. **Série Maricultura**, v.3, 2003.

BOEHS, G. Ecologia populacional, reprodução e contribuição em biomassa de *Anomalocardia brasiliiana* (Gmelin, 1791) (Bivalvia: Veneridae) na Baía de Paranaguá, Paraná, Brasil. Tese (Doutorado em Zoologia). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2000.

BOEHS, G.; MAGALHÃES, A.R.M. Simbiontes associados com *Anomalocardia brasiliiana* (Gmelin) (Mollusca, Bivalvia, Veneridae) na Ilha de Santa Catarina e região continental adjacente, Santa Catarina, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 21, p. 865-869, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0101-81752004000400021>>.

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

BOFFI, A. V. **Moluscos Brasileiros de Interesse Médico e Econômico**. Fundação de Amparo do Estado do São Paulo Pesquisa. 1979.

BOWER, SUSAN M.; MCGLADDERY, SHARON E.; PRICE, IOLA M. Synopsis of infectious diseases and parasites of commercially exploited shellfish. **Annual Review of Fish Diseases**, v. 4, p. 1-199, 1994. Disponível em: < [https://doi.org/10.1016/0959-8030\(94\)90028-0](https://doi.org/10.1016/0959-8030(94)90028-0)>.

BRANDÃO, R. P.; BOEHS, G.; SABRY, R. C.; CEUTA, L. O.; LUZ, M. S. A.; QUEIROGA, F. R.; SILVA, P. M. *Perkinsus* sp. infecting oyster *Crassostrea rhizophorae* (Guilding, 1828) on the coast of Bahia, Brazil. **Journal of invertebrate pathology**, v. 112(2), p. 138-141, 2013. Disponível em: < <https://doi.org/10.1016/j.jip.2012.11.003>>.

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 Mexico. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 99, n. 1, p. 66-73, 2008. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jip.2008.03.005>>.

CARNEGIE, R. B.; COCHENNEC-LAUREAU, N. Microcell parasites of oysters: recent insights and future trends. **Aquatic Living Resources**, v. 17, n. 4, p. 519-528, 2004. Disponível em: < <https://doi.org/10.1051/alr:2004055>>.

CARNEGIE, R. B.; STOKES, N. A.; AUDEMARD, C.; BISHOP, M. J.; WILBUR, A. E.; ALPHIN, T. D.; BURRESON, E. M. STRONG seasonality of *Bonamia* sp. infection and induced *Crassostrea ariakensis* mortality in Bogue and Masonboro Sounds, North Carolina,

USA. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 98, n. 3, p. 335-343, 2008. Disponível em: < <https://doi.org/10.1016/j.jip.2008.03.009>>.

CASAS, S.; VILLALBA, A.; REECE, K. Study of perkinsosis in the carpet shell clam *Tapes decussatus* in Galicia (NW Spain). I. Identification of the aetiological agent and in vitro modulation of zoosporulation by temperature and salinity. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 50, p. 51–65, 2002. Disponível em: < ISSN: 1616-1580>.

CASAS, SANDRA M.; VILLALBA, A. Study of perkinsosis in the grooved carpet shell clam *Ruditapes decussatus* in Galicia (NW Spain). III. The effects of *Perkinsus olseni* infection on clam reproduction. **Aquaculture**, v. 356, p. 40-47, 2012. Disponível em: < <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.05.038>>.

CASTILLO, J. A. Enfermedades de Declaración Obligatoria em Moluscos. Perkinsosis (*Perkinsus marinus* y *Perkinsus olseni*) **AquaTIC**, n. 4. 1998.

CASTRO, A. C. L. Manual de Cultivo de Ostra. São Luís: Departamento de Oceanografia e Limnologia. **Fundação de Amparo à Pesquisa de Estado do Maranhão - FAPEMA**, 2014.

CEBU, E. H. Módulo de Bandejas de Bambu Mexilhão. **Journal of Academic Research**, v. 1, n. 4, p. 22-39, 2016.

CHOI, K. S.; PARK, K. I. Review on the protozoan parasite *Perkinsus olseni* (Lester and Davis 1981) infection in Asian waters. **Coastal environmental and ecosystem issues of the East China Sea**, p. 269-281, 2010.

CHRISTO, S. W.; ABSHER, T. M. Ciclo reprodutivo de *Mytella guyanensis* e *Mytella charruana* (Bivalvia: Mitilidae), na Baía de Paranaguá, Paraná. In: Congresso Latinoamericano sobre Ciencias Del Mar, 4, Septiembre, Colombia. **Resumo ampliado**. Colombia: San Andrés Isla, p. 29, 2001.

CHRISTO, S. W.; FERREIRA, A. L.; ABSHER, T. M. Aspecto reprodutivo de mexilhões (Bivalvia, Mollusca) no Complexo Estuarino de Paranaguá, Paraná, Brasil. **Boletim do Instituto da Pesca**. São Paulo, v. 42, n. 4, p. 924-936, 2016.

COCHENNEC, N.; ROUX, L. F.; BERTHE, F.; GERARD, A. Detection of *Bonamia ostreae* based on small subunit ribosomal probe. **Journal of Invertebrate pathology**, v. 76, n. 1, p. 26-32, 2000. Disponível em: < <https://doi.org/10.1006/jipa.2000.4939>>.

COIMBRA, A. G. Distribuição de metais pesados em moluscos e sedimentos nos manguezais de Coroa Grande e da Enseada das Graças, Baía de Sepetiba, RJ. 72 f. Dissertação (Mestrado em Geoquímica Ambiental) – Pós-graduação em Geociências, Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2003.

CORBEIL S., ARZUL I., ROBERT M., BERTHE F.C.J., BESNARD-COCHENNEC N. & CRANE M.S.J. Molecular characterization of an Australian isolate of *Bonamia exitiosa*. **Diseases of Aquatic Organisms**, v.71, n. 1, p. 81–85, 2006. Disponível em: < <https://doi.org/10.3354/dao071081>>.

COVA, A.W.; SERAFIM JÚNIOR, M.; BOEHS, G.; SOUZA, J.M. Parasites in the mangrove oyster *Crassostrea rhizophorae* cultivated in the estuary of the Graciosa River in Taperoá, Bahia. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v. 24, p. 21-27, 2015. Disponível em: < <https://doi.org/10.1590/S1984-29612015012>>.

CRANFIELD, H. J.; DUNN, A.; DOONAN, I. J.; MICHAEL, K. P. *Bonamia exitiosa* epizootic in *Ostrea chilensis* from Foveaux Strait, southern New Zealand between 1986 and 1992. **ICES Journal of Marine Science**. v. 62, p. 3-13, 2005. Disponível em: < <https://doi.org/10.1016/j.icesjms.2004.06.021>>.

CREMONTE, F.; FIGUERAS, A.; BURRESON, E. M. A histopathological survey of some commercially exploited bivalve molluscs in northern Patagonia, Argentina. **Aquaculture**, v. 249, n. 1-4, p. 23-33, 2005. Disponível em: < <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.01.024>>.

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. Disponível em: < <https://doi.org/10.1590/1519-6984.06314>>.

DA SILVA, PM.; VIANNA, RT.; GUERTLER, C.; FERREIRA, LP.; SANTANA, LN.; 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. Disponível em: < <https://doi.org/10.1016/j.jip.2013.02.002>>.

DA SILVA, P. M.; SCARDUA M. P.; VIANNA, R. T.; MENDONÇA, R. C.; VIERA, 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. Disponível em: < <https://doi.org/10.1016/j.jip.2014.04.005>>.

DALTRO, A.C.S. Aspectos socioeconômicos e qualidade dos moluscos bivalves através do monitoramento microbiológico e genético. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Salvador, 2013.

DE OLIVEIRA, I. B.; DA SILVA NETO, S. R.; LIMA FILHO, J. V.; PEIXOTO, S. R.; GÁLVEZ, A. O. Efeito do período chuvoso na extração do molusco bivalve *Anomalocardia brasiliana* (Gmelin, 1791). **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 9, n. 1, p. 139-145, 2014. Disponível em: < DOI:10.5039/agraria.v9i1a2947>.

DINAMANI P.; HINE P.M.; JONES J.B. Occurrence and characteristics of the haemocyte parasite *Bonamia* sp. in the New Zealand dredge oyster *Tiostrea lutaria* **Diseases of Aquatic Organisms**, v.3, p. 37-44, 1987. Disponível em: < <https://doi.org/10.3354/dao003037>>.

DIGGLES, B. K.; COCHENNEC-LAUREAU, N.; HINE, P. M. Comparison of diagnostic techniques for *Bonamia exitiosus* from flat oysters *Ostrea chilensis* in New

Zealand. **Aquaculture**, v. 220, n. 1-4, p. 145-156, 2003. Disponível em: < [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(02\)00635-X](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(02)00635-X)>.

DO NASICMENTO, J. E. F.; PIRRES, T. M. L.; SILVEIRA, P. C. A.; FARIAS, C. M. N.; ESCHRIQUE, S. A. Variação sazonal de parâmetros físico-químicos na porção estuarina do município de Raposa–MA. **Interfaces Científicas-Saúde e Ambiente**, v. 8, n. 2, p. 257-271, 2020. Disponível em: < <https://doi.org/10.17564/2316-3798.2020v8n2p257-271>>.

DUNGAN, C. F.; CARNEGIE, R. B.; HILL, K. M.; MCCOLLOUGH, C. B.; LARAMORE, S. E.; KELLY, C. J.; SCARPA, J. Diseases of oysters *Crassostrea ariakensis* and *C. virginica* reared in ambient waters from the Choptank River, Maryland and the Indian River Lagoon, Florida. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 101, n. 3, p. 173-183, 2012. Disponível em: < <https://doi.org/10.3354/dao02531>>.

ENGELSMA, M. Y.; CULLOTY, S. C.; LYNCH, S. A.; ARZUL, I.; CARNEGIE, R. B. *Bonamia* parasites: a rapidly changing perspective on a genus of important mollusc pathogens. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 110, n. 1-2, p. 5–23, 2014. Disponível em: < <https://doi.org/10.3354/dao02741>>.

EPAGRI Síntese Informativa da Maricultura 2015. Florianópolis: 2016.

ESMERINI, P. O.; GENNARI, S. M.; PENA, H. F. J. Analysis of marine bivalve shellfish from the fish market in Santos city, São Paulo state, Brazil, for *Toxoplasma gondii*. **Veterinary Parasitology**, v. 170, n. 1-2, p. 8-13, 2010. Disponível em: < <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.01.036>>.

FAJARDO, V.; GONZALEZ, I.; MARTIN, I.; ROJAS, M.; HERNADEZ, E. P.; GARCIA, T.; MARTIN R. Real-time PCR for detection and quantification of red deer (*Cervus elaphus*), fallow deer (*Dama dama*), and roe deer (*Capreolus capreolus*) in meat mixtures. **Meat science**, v. 79, n. 2, p. 289-298, 2008. Disponível em: < <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2007.09.013>>.

FERNANDES, L. M. B.; DE LIMA, A. M. Possibilities for cultivating mangle oysters, *Crassostrea rhizophorae* (Guilding 1828) in Pernambuco Brazil. **Serie Estudos de Pesca-Superintendencia do Desenvolvimento do Nordeste (Brazil)**, 1976.

FERREIRA, J. F.; OLIVEIRA NETO, F. M. de. Cultivo de moluscos em Santa Catarina. Sistemas de cultivos aquícolas na zona costeira do Brasil: recursos, tecnologias, aspectos ambientais e sócioeconômicos. Rio de Janeiro: **Museu Nacional**, p. 87-95. 2007.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS – FAO. *Crassostrea gigas*. 2012.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO). The State of World Fisheries and Aquaculture FAO **Fisheries and Aquaculture** Department, Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2016

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO). FAO. The state of world fisheries and aquaculture 2018: meeting the sustainable development goals. Rome, Italy: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 227f. 2018.

FOOD AND AGRICULTURAL ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. The State of World Fisheries and Aquaculture 2020. Sustainability in action. Rome. Disponível em: The State of World Fisheries and Aquaculture (SOFIA), 2020.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO). The State of World Fisheries and Aquaculture. **FAO Fisheries and Aquaculture** Department, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome. 2020.

FRANÇA, V.; MONTELES, J. S.; FUNO, I. C. S. A.; DE CASTRO, A. C. L. Seleção de áreas potenciais para o cultivo de ostra nativa, *Crassostrea* spp. e Sururu, *Mytella falcata*, em Raposa, Maranhão. **Arquivos de Ciências do Mar**, v. 46, n. 62-75, 2013. Disponível em: < <http://www.repositorio.ufc.br/handle/riufc/8545>>.

FURTADO, J.G.C. Caracterização hidroquímica de uma região estuarina com potencial à maricultura no povoado de Anajatiua/Quebra Pote (Baía do Arraial, São Luís-MA). Monografia de Graduação, Curso de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Maranhão, 60 p., São Luís, 2001.

GAUTHIER, J. D. Development and utilization of an in vitro culture system for the characterization of gene expression in the oyster parasite *Perkinsus marinus*. **University of Maryland, College Park**, 1998.

GMELIN, J. F. Vermes. In: Gmelin J.F. (Ed.) Caroli a Linnaei Systema Naturae per Regna Tria Naturae, 1791.

GUILDING, I. Observations on the zoology of the Caribbean Islands. **The Zoological**. 1828.

GUIMARÃES, I. M.; OLIVERA, A. Influência da salinidade sobre a sobrevivência da ostra-do-mangue, *Crassostrea rhizophorae*. 2008.

HILL, K. M.; CARNEGIE, R. B.; ALOUI-BEJAOU, N.; GHARSALLI, R.; WHITE, D.; STOKES, N.; BURRESON, E. Observation of a *Bonamia* sp. infecting the oyster *Ostrea stentina* in Tunisia, and a consideration of its phylogenetic affinities. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 103, n. 3, p. 179–185, 2010. Disponível em: < <http://www.repositorio.ufc.br/handle/riufc/53771>>.

HILL, K. M.; STOKES, N. A.; WEBB, S. C.; HINE, P. M.; KROECK, M. A.; MOORE, J. D.; CARNEGIE, R. B. Phylogenetics of *Bonamia* parasites based on small subunit and internal transcribed spacer region ribosomal DNA sequence data. **Diseases of aquatic organisms**, v. 110, n. 1-2, p. 33-54, 2014. Disponível em: < <https://doi.org/10.3354/dao02738>>.

HILL-SPANIK, K.; MCDOWELL, J.; STOKES, N.; REECE, K.; BURRESON, E.; CARNEGIE, R. Phylogeographic perspective on the distribution and dispersal of a marine pathogen, the oyster parasite *Bonamia exitiosa*. **Marine Ecology Progress Series**, v. 536, p. 65–76, 2015. Disponível em: < <https://doi.org/10.3354/meps11425>>.

HINE, P. M. The annual pattern of infection by *Bonamia* sp. in New Zealand flat oysters, *Tiostrea chilensis*. **Aquaculture**, v. 93, n. 3, p. 241–251, 1991. Disponível em: < [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(91\)90236-Z](https://doi.org/10.1016/0044-8486(91)90236-Z)>.

HINE, P. M.; WESNEY, B. Interrelationships of cytoplasmic structures in *Bonamia* sp. (Haplosporidia) infecting oysters *Tiostrea chilensis*: an interpretation. **Diseases of aquatic organisms**, v. 14, p. 59-59, 1992.

HINE, P. M. Health status of commercially important molluscs in New Zealand. **Surveillance**, v. 24, n. 1, p. 25–28, 1997.

HINE, P. M.; COCHENNEC-LAUREAU, N.; BERTHE, amp; FCJ. *Bonamia exitiosus* n. sp.(Haplosporidia) infecting flat oysters *Ostrea chilensis* in New Zealand. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 47, n. 1, p. 63-72, 2001. Disponível em: < <https://doi.org/10.3354/dao047063>>.

HIROKI, K. On the resistance of isolated bivalve gill pieces to oxygen deficiency and hydrogen sulphide. **Boletim Fisiologia Animal**, São Paulo, v. 1, p. 9 – 20, 1977.

HUNER JV, BROWN EE Crustacean and mollusk aquaculture in the United States. **AVI Publishing, Westport, CT** (1985).

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Pesquisa pecuária municipal**. Rio de Janeiro: IBGE, 2016.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Pesquisa pecuária municipal**. Rio de Janeiro: IBGE, 2017.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Pesquisa pecuária municipal**. 2019.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Pesquisa pecuária municipal**. Rio de Janeiro: IBGE, 2021.

INFOAGRO/SC. Sistema Integrado de Informações Agropecuárias da Secretaria de Estado da Agricultura e da Pesca de Santa Catarina - InfoAgro/SC, 2022.

IPMA -Instituto Português do Mar e da Atmosfera. Guia de consumo de moluscos bivalves, equinodermes, tunicados e gastrópodes marinhos provenientes de zonas de produção de Portugal Continental. 2020.

KISSNER, E. M. O.; DOLDAN, M. S.; Z Aidman, P.C.; MORSAN, E.M.; KROECK, M.A. Bonamiosis status in natural *Ostrea puelchana* beds in San Matías Gulf (Patagonia, Argentina), 14 years after an epizootic. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 110, n. 1-2, p. 135-142, 2014. Disponível em: < <https://doi.org/10.3354/dao02707>>.

KROECK, M. A.; MONTES, J. Occurrence of the haemocyte parasite *Bonamia* sp. in flat oysters *Ostrea puelchana* farmed in San Antonio Bay (Argentina). **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 63, n. 2-3, p. 231-235, 2005. Disponível em:< <https://doi.org/10.3354/dao063231>>.

KROECK, M. A.; SEMENAS, L.; MORSAN, E. M. Epidemiological study of *Bonamia* sp. in the native flat oyster, *Ostrea puelchana* from San Matías Gulf (NW Patagonia, Argentina). **Aquaculture**, v. 276, n. 1-4, p. 5-13, 2008. Disponível em : < <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.02.013>>.

LAMARCK J.B. M. Histoire naturelle des animaux sans vertèbres. 1819.

LANE, H. S.; WEBB, S. C.; DUNCAN, J. *Bonamia ostreae* in the New Zealand oyster *Ostrea chilensis*: a new host and geographic record for this haplosporidian parasite. **Diseases of aquatic organisms**, v. 118, n. 1, p. 55-63, 2016. Disponível em: < <https://doi.org/10.3354/dao02960>>.

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

LIGHTFOOT, J. A Catalogue of the Portland Museum, lately the property of the Dutchess Dowager of Portland, deceased; which will be sold by auction by Mr. 1786.

LIMA, T. Desenvolvimento da atividade de Ostreicultura no povoado de Areinhas, município de Primeira Cruz – MA. 51p. Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Engenharia da Pesca, Universidade Estadual do Maranhão, São Luís. 2017.

LINNAEUS, C. *Systema Naturae per regna tria naturae, secundum classes, ordines, genera, species, cum characteribus, differentiis, synonymis, locis. Editio decima, reformata [10th revised edition], vol. 1*, p. 824, 1758.

LOPES, R. G. S.; GOMES, A. I.; TCHAIKA, L.; BARROS, M. C.; FRAGA, E. Molecular identification of native oysters on the coast of Maranhão, Brazil. **Boletim Instituto Pesca**, p. e377-e377, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.20950/1678-2305.2018.44.4.377>>.

LOHRMANN, K. B.; HINE, P. M.; CAMPALANS, M. Ultrastructure of *Bonamia* sp. in *Ostrea chilensis* in Chile. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 85, n. 3, p. 199-208, 2009.

LUZ, M.S.A; BOEHS, G. *Perkinsus beihaiensis* infectando a ostra *Crassostrea rhizophorae* em cultivo e em estoque natural na Baía de Camamu, Bahia, Brasil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 53, n. 2, p. 191-198, 2016. Disponível em: < <https://doi.org/10.11606/issn.1678-4456.v53i2p191-198>>.

LUZ CUNHA, A. C.; PONTINHA, V. D. A.; DE CASTRO, M. A. M.; SÜHNEL, S.; MEDEIROS, S. C.; MOURA DA LUZ, Â. M.; P. MOURIÑO, J. L. Two epizootic *Perkinsus* spp. events in commercial oyster farms at Santa Catarina, Brazil. **Journal of fish diseases**, v. 42, n. 3, p. 455-463, 2019. Disponível em: < <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, n. 2883, p. 328–329, 1950.

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

MARTY G., BOWER S., CLARKE K., MEYER G., LOWE G., OSBORN A., CHOW E., HANNAH H., BYRNE S., SOJONKY K. & ROBINSON J. Histopathology and a real-time PCR assay for detection of *Bonamia ostreae* in *Ostrea edulis* cultured in western Canada. **Aquaculture**, v. 261, p. 33–42, 2006. Disponível em: < <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.07.024>>.

MERBOLD, A., CRUZ, C., FERNANDES, K. Classe Bivalvia. Slideshare. 2007.

MONTES, J. Lag time for the infestation of flat oyster (*Ostrea edulis* L.) by *Bonamia ostreae* in estuaries of Galicia (NW Spain). **Aquaculture**, v. 93, n. 3, p. 235-239, 1991.

MONTI, D.; FRENKIEL, L.; MOUËZA, M. Demography and growth of *Anomalocardia brasiliiana* (Gmelin, 1791) (Bivalvia, Veneridae) in a mangrove, in Guadeloupe (French West Indies). **Journal of Molluscan Studies**, v. 57, p. 249-257, 1991. Disponível em: < <https://doi.org/10.1093/mollus/57.2.249>>.

MOORE, J. D. 5.2. 7 Bonamiasis of Oysters. 2006.

MOSS J.A., BURRESON E.M. & REECE K.S. Advanced *Perkinsus marinus* infections in *Crassostrea ariakensis* maintained under laboratory conditions. **J. Shellfish Res.**, v. 25, p. 65–72, 2006.

MOUËZA, M.; GROS, O.; FRENKIEL, L. Embryonic, larval and postlarval development of the tropical clam, *Anomalocardia brasiliiana* (Bivalvia, Veneridae). **Journal of Molluscan Studies**, v. 65, p. 73-88, 1999. Disponível em: < <https://doi.org/10.1093/mollus/65.1.73>>.

NARCHI, W. Aspectos ecológicos e adaptativos de alguns bivalves do litoral paulista. **Papéis Avulsos de Zoologia**, São Paulo, v. 27, p. 235-262, 1974.

NARCISI, V.; ARZUL, I.; CARGINI, D.; MOSCA, F.; CALZETTA, A.; TRAVERSA, D.; TISCAR, P. G. Detection of *Bonamia ostreae* and *B. exitiosa* (Haplosporidia) in *Ostrea edulis* from the Adriatic Sea (Italy). **Diseases of aquatic organisms**, v. 89, n. 1, p. 79-85, 2010. Disponível em: < <https://doi.org/10.3354/dao02167>>.

NASCIMENTO, I.A. Cultivo de ostras no Brasil: problemas e perspectivas. *Ciência e Cultura*, São Paulo, v. 35, p. 871-876, 1983.

NEHRING, S.N. Invasive Alien Species Fact Sheet *Crassostrea gigas*. Koblenz, Germany, 2006.

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

NUGEO, Núcleo Geoambiental da Universidade Estadual do Maranhão, Laboratório de Meteorologia.

OIE, Código Sanitário para los Animales Acuáticos 2012.

OIE, Manual de las pruebas diagnóstico para los animales acuáticos. *Perkinsus olseni*. 2016.

ONODERA, F. K. Mortalidade dos bivalves estuarinos, *Mytella falcata* e *Mytella guyanensis*, expostos a diferentes salinidades e temperaturas. 55 f. Dissertação (Mestrado em Aquicultura e Pesca) – Instituto Pesca – APTA-SAA, São Paulo, 2012.

ORBIGNY, A. D. D'. Voyage dans l'Amérique méridionale (le Brésil, la république orientale de l'Uruguay, la République argentine, la Patagonie, la république du Chili, la république de Bolivie, la république du Pérou. 1846.

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, n. 1-2, p. 9–22, 2001. Disponível em: < [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(01\)00619-6](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00619-6)>.

PENNA, M. S.; KHAN, M.; FRENCH, R. A. Development of a multiplex PCR for the detection of *Haplosporidium nelsoni*, *Haplosporidium costale* and *Perkinsus marinus* in the eastern oyster (*Crassostrea virginica*, Gmelin, 1971). **Molecular and Cellular Probes**, v. 15, n. 6, p. 385-390, 2001. Disponível em: < <https://doi.org/10.1006/mcpr.2001.0386>>.

PEREIRA, N.C. Diagnóstico ambiental da Lagoa da Conceição utilizando o berbigão *Anomalocardia brasiliana* (Gmelin, 1791) como bioindicador de poluição aquática. 2003.

PEREIRA, O. M., GALVÃO, M. S. N.; PIMENTEL, C. M.; HENRIQUES, M. B., MACHADO, I. C. Distribuição dos bancos naturais e estimativa de estoque do gênero *Mytella* no estuário de Cananéia, SP, Brasil. **Brazilian Journal of Aquatic Science and Technology**, v. 11, n. 1, p. 21 - 29, 2007. Disponível em: < <https://doi.org/10.14210/bjast.v11n1.p21-29>>.

PEREIRA, T.J.F. et al. Extrativismo de mariscos na ilha do Maranhão (MA): implicações ecológicas e socioeconômicas. **Revista de Políticas Públicas**, v. 21, n. 2, p. 831-853, 2017.

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

PICHOT Y., COMPS M., TIGE G., GRIZEL H. & RABOUIN M.A. Recherches sur *Bonamia ostreae* gen. n., sp. n., parasite nouveau de l'huitre plate *Ostrea edulis* L. **Rev. Trav. Inst. Pêches Marit.**, v.43, p.131–140, 1980.

PINTO, T. R.; BOEHS, G. Nematopsis sp.(Apicomplexa: Eugregarinida) em *Mytella guyanensis* (Lamarck, 1819)(Bivalvia: Mytilidae) da Região Estuarina do Rio Cachoeira, Ilhéus, Bahia, Brasil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 45, n. 2, p. 95-100, 2008. Disponível em: < <https://doi.org/10.11606/issn.1678-4456.bjvras.2008.26705>>.

PINTO, S. L. Os moluscos *Anomalocardia brasiliana* (Gmelin, 1791) e *Tagelus plebeius* (Lightfoot, 1786) como bioindicadores de poluição orgânica no estuário da baía do Pina, Recife-PE, Brasil. 2012.

POWER, A.; MCCRICKARD, B.; MITCHELL, M.; COVINGTON, E.; SWEENEY-REEVES, M.; PAYNE, K.; WALKER, R. *Perkinsus marinus* in coastal Georgia, USA, following a prolonged drought. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 73, n. 2, p. 151-158, 2006. Disponível em: < <https://doi.org/10.3354/dao073151>>.

PRAXEDES, G.F. Patógenos no sururu *Mytella falcata* (Orbigny, 1846) do estuário do rio Jaguaribe-CE, com especial enfoque para o protozoário de declaração obrigatória Perkinsus. 2010. Disponível em: < <http://www.repositorio.ufc.br/handle/riufc/47080>>.

QUEIROGA, F. R.; MARQUES-SANTOS, L. F.; DE MEDEIROS, I. A.; & DA SILVA, P. M. Immunological responses of the mangrove oysters *Crassostrea gasar* naturally infected by *Perkinsus* sp. in the Mamanguape Estuary, Paraíba state (Northeastern, Brazil). **Fish & shellfish immunology**, v. 35, n. 2, p. 319-327, 2013. Disponível em: < <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.04.034>>.

QUEIROGA, F.R.; SANTOS, L. F. M.; HEGARET, H.; SOUDANT P.; FARIAS, N. D.; SCHLINDWEIN, A. D.; SILVA, P. M. Parasites infecting the cultured oyster *Crassostrea gasar* (Adanson, 1757) in Northeast Brazil. **Parasitology**, v. 142, n. 6, p. 756-766, 2015.

QUEIROGA, F. R.; MARQUES-SANTOS, L. F.; DE MEDEIROS, I. A.; & DA SILVA, P. M. Effects of salinity and temperature on in vitro cell cycle and proliferation of *Perkinsus marinus* from Brazil. **Parasitology**, v. 143, n. 4, p. 475-487, 2016. Disponível em: < <https://doi.org/10.1017/S0031182015001602>>.

RAMILO, A.; NAVAS, I.; VILLALBA, A.; ABOLLO, E. Species-specific diagnostic assays for *Bonamia ostreae* and *B. exitiosa* in European flat oyster *Ostrea edulis*: conventional, real-time and multiplex PCR. **Diseases of aquatic organisms**, v. 104, n. 2, p. 149-161, 2013. Disponível em: < <https://doi.org/10.3354/dao02597>>.

RAFINESQUE. Veneroidea Accessed through: World Register of Marine Species at: <https://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=14638> on 2023-04-28. 1815.

RAMILO, A.; GONZALEZ, M.; CARBALLAL, M. J.; DARRIBA, S.; ABOLLO, E.; VILLALBA, A. Oyster parasites *Bonamia ostreae* and *B. exitiosa* co-occur in Galicia (NW Spain): spatial distribution and infection dynamics. **Diseases of aquatic organisms**, v. 110, n. 1-2, p. 123-133, 2014. Disponível em: < <https://doi.org/10.3354/dao02673>>.

RAY, S.M. Biological Studies of Dermocystidium marinum, A Fungus Parasite of Oysters. Rice Institute Pamphlet (Monogr Biol Spec Ser Iss), Rice Institute, Washington, DC. 1954.

REECE, K. S.; SIDDALL, M. E.; BURRESON E. M.; GRAVES, J. E. Phylogenetic analysis of *Perkinsus* based on actin gene sequences. **The Journal of parasitology**, v. 83, n. 3, p. 417-423, 1997. Disponível em: < <https://doi.org/10.2307/3284403>>.

RIOS, E. C. Seashells of Brazil. Rio Grande, Porto Alegre, p. 492 1994

RIOS, E. C. Compedium of Brazilian Sea Shells. Rio Grande, Porto Alegre, p. 668 2009.

ROBERTSON, L. J. The potential for marine bivalve shellfish to act as transmission vehicles for outbreaks of protozoan infections in humans: A review. **International Journal of Food**

Microbiology, v.120, p.201-216, 2007. Disponível em: < <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.07.058>>.

RODRIGUES, C. A. L.; RIBEIRO, R. P.; SANTOS, N. B.; ALMEIDA, Z. S. Patterns of mollusc distribution in mangroves from the São Marcos Bay, coast of Maranhão State, Brazil. **Acta Amazonica, Manaus**, v. 46, n. 4, p. 391-400, out./dez. 2016. Disponível em: < <https://doi.org/10.1590/1809-4392201600493>>.

RONDINELLI, S. F. A exploração da lambreta, *Lucina pectinata* (Bivalvia, Mollusca), nos manguezais de Garapuá–Baixo Sul da Bahia, Brasil. 2009. Disponível em: < <https://repositorio.ufba.br/handle/ri/12657>>.

RUPPERT, E. & BARNES, R.D. Zoologia dos Invertebrados. **6ª ed., Roca Ed., São Paulo**. 1996.

SABRY, R. C.; ROSA, R. D.; MAGALHÃES, A. R. M.; BARRACCO, M. A.; GESTEIRA, T. C. V.; SILVA, P. M. First report of *Perkinsus* sp. infecting mangrove oysters *Crassostrea rhizophorae* from the Brazilian coast. **Diseases of aquatic organisms**, v. 88, n. 1, p. 13-23, 2009. Disponível em: < <https://doi.org/10.3354/dao02136>>.

SABRY, R. C.; SILVA, P. M.; GESTEIRA, T. C. V.; PONTINHA, V. A.; MAGALHÃES, A. R. M. Pathological study of oysters *Crassostrea gigas* from culture and *C. rhizophorae* from natural stock of Santa Catarina Island, SC, Brazil. **Aquaculture**, v. 320, n. 1-2, p. 43-50, 2011. Disponível em: < <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.08.006>>.

SACCO F. I Molluschi dei terreni terziarii del Piemonte e della Liguria, Parte 23 (Ostreidae, Anomiidae, Dimyidae). Bollettino dei Musei di Zoologia ed Anatomia Comparata della R. Università di Torino. 1897. Disponível em: < <https://biodiversitylibrary.org/page/11810051>>.

SAGRISTÀ, E.; DURFORT, M.; AZEVEDO, C. *Perkinsus* sp. (Phylum Apicomplexa) in Mediterranean clam *Ruditapes semidecussatus*: ultrastructural observations of the cellular response of the host. **Aquaculture**, v. 132, n. 1-2, p. 153-160, 1995. Disponível em: < [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(94\)00391-Z](https://doi.org/10.1016/0044-8486(94)00391-Z)>.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the national academy of sciences**, v. 74, n. 12, p. 5463-5467, 1977. Disponível em: < <https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463>>.

SCHAEFFER-NOVELLI, Y. Alguns aspectos ecológicos e análise populacional de *Anomalocardia brasiliiana* (Gmelin, 1791) (Mollusca: Bivalvia), na praia do Saco da Ribeira, Ubatuba, Estado de São Paulo. 110 f. Tese (Doutorado em Zoologia), Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1976.

SCHAEFFER-NOVELLI, Y. Análise populacional de *Anomalocardia brasiliiana* (Gmelin, 1791), na Praia do Saco da Ribeira, Ubatuba, Estado de São Paulo. **Boletim do Instituto Oceanográfico**, São Paulo, v. 29, n. 2, p. 351–355, 1980.

SCHUMACHER, C. F. Essai d'un nouveau système des habitations des vers testacés. 1817. Disponível em: < <http://www.biodiversitylibrary.org/item/81329>>.

SHEPPARD, B. J.; PHILLIPS, A. C. *Perkinsus olseni* detected in Vietnamese aquacultured reef clams *Tridacna crocea* imported to the USA, following a mortality event. **Diseases of aquatic organisms**, v. 79, n. 3, p. 229-235, 2008. Disponível em: < <https://doi.org/10.3354/dao01888>>.

SIDDALL, M.E.; REECE, K.S.; NERAD, T.A.; BURRESON, E.M. Molecular determination of the phylogenetic position of a species in the genus *Colpodella* (Alveolata). **American Museum Novitates**, v. 3314, p. 1-10, 2001. Disponível em: < [https://doi.org/10.1206/0003-0082\(2001\)314%3C0001:MDOTPP%3E2.0.CO;2](https://doi.org/10.1206/0003-0082(2001)314%3C0001:MDOTPP%3E2.0.CO;2)>.

SILVA, H. A., BATISTA, I. Produção, salubridade e comercialização dos moluscos bivalves em Portugal. IPIMAR, v. 20, 171 p., 2008. Disponível em: < <http://hdl.handle.net/10400.26/33917>>.

SILVA, P. B. Os significados sócio-culturais do corpo obeso em marisqueiras. Salvador: UFBA, 2011.

SILVA, P. M. D.; COSTA, C. P.; ARAÚJO, J. P. B. D.; 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. Disponível em: < <https://doi.org/10.1590/S1984-29612016011>>.

SOOT-RYEN T. A report on the family Mytilidae. Allan Hancock Pacific Expeditions. 1955. Disponível em: < <https://www.biodiversitylibrary.org/page/27912345>>.

SOUSA, A. K. R. Biologia de ostras nativas *Crassostrea rhizophorae* na ilha do maranhão-Ma. Monografia (graduação), 2015.

SÜHNEL, S.; STEWART C. J.; GURNEY-SMITH, H. J.; IVACHUK, C. 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, n. 1, p. 143-156, 2016. Disponível em: < <https://doi.org/10.2983/035.035.0116>>.

THUNBERG, C.P. Tekning och Beskrifning på en stor Ostronsort ifrån Japan. **Kongliga Vetenskaps Academiens Nya Handlingar**. 1793.

VALENTI, W; BARROS, H; MORAES-VALENTI, P; BUENO, G; CAVALLI, R. Aquaculture in Brazil: past, present and future. **Aquaculture Reports**, v. 30, n. 182, p. 100611, 2021.

VILLALBA, A.; REECE, K. S.; CAMINO ORDÁS, M.; CASAS, S. M.; FIGUERAS, A. Perkinsiosis in molluscs: A review. **Aquatic Living Resources**, v. 17, n. 4, p. 411–432, 2004. Disponível em: < <https://doi.org/10.1051/alr:2004050>>.

VILLALBA, A.; GESTAL, C.; CASAS, S. M.; FIGUERAS, H. A. Perkinsosis en moluscos. Enfermedades de Moluscos Bivalvos de Interés em Acuicultura. **Fundación Observatorio Español de Acuicultura, Madrid**. p. 181– 242. 2011. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/10261/303598>>.

YUAN, W.; WALTERS, L. J.; SCHNEIDER, K. R.; HOFFMAN, E. Exploring the survival threshold: a study of salinity tolerance of the nonnative mussel *Mytella charruana*. **Journal of Shellfish Research** v29, n. 2, p. 415–422, 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.2983/035.029.0218>>.



Uema
UNIVERSIDADE ESTADUAL
DO MARANHÃO



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL

Anna Letícia Pinto Silva

**PESQUISA DE AGENTES DE NOTIFICAÇÃO COMPULSÓRIA EM
MOLUSCOS BIVALVES DE AMBIENTE NATURAL NA ILHA DO
MARANHÃO, BRASIL**

São Luís – MA

2023

Anna Leticia Pinto Silva

**PESQUISA DE AGENTES DE NOTIFICAÇÃO COMPULSÓRIA EM
MOLUSCOS BIVALVES DE AMBIENTE NATURAL NA ILHA DO
MARANHÃO, BRASIL**

Documento de Qualificação apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal – Curso de Mestrado da Universidade Estadual do Maranhão (PPGCA/UEMA) como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientadora: Profa. Dra. Alcina Vieira de Carvalho Neta
Coorientadora: Profa. Dra. Nancyleni Pinto Chaves Bezerra

São Luís – MA

2023

FICHA CATALOGRÁFICA

Silva, Anna Letícia Pinto.

Pesquisa de agentes de notificação obrigatória em moluscos bivalves de ambiente natural na ilha do Maranhão, Brasil / Anna Letícia Pinto Silva. – São Luís, 2023.

..54.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual do Maranhão, 2023.

Orientadora: Profa. Dra. Alcina Vieira de Carvalho Neta.

1. Detecção molecular. 2. *Bonamia* spp. 3. *Perkinsus* spp. I. Título.

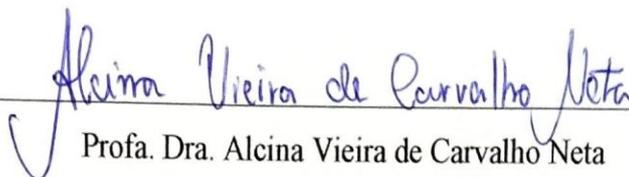
CDU: 594(812.1)

Elaborado por Francisca Elany Régia Sousa Lopes - CRB 13/754

Anna Leticia Pinto Silva

**PESQUISA DE AGENTES DE NOTIFICAÇÃO COMPULSÓRIA EM MOLUSCOS
BIVALVES DE AMBIENTE NATURAL NA ILHA DO MARANHÃO, BRASIL**

BANCA EXAMINADORA



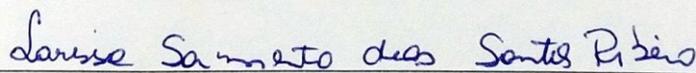
Profª. Dra. Alcina Vieira de Carvalho Neta

Universidade Estadual do Maranhão

Orientadora

Profª. Dra. Nancyleni Pinto Chaves Bezerra
Universidade Estadual do Maranhão

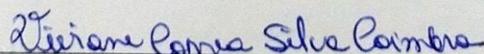
Coorientadora



Profª. Dra. Larissa Sarmiento dos Santos Ribeiro

Universidade Estadual do Maranhão

Membro interno



Profª. Dra. Viviane C. Silva Coimbra

Universidade Estadual do Maranhão

EPÍGRAFE

‘Alegrai-vos na esperança, sede pacientes na tribulação, perseverai na oração.’
Romanos 12,12.

AGRADECIMENTOS

Escrevo esses agradecimentos com lágrimas nos olhos porque só eu sei o que eu passei para chegar até aqui e encerrar mais um ciclo. Agradeço primeiramente a Deus, a Nossa Senhora e a Jesus Cristo que sempre foram o centro da minha vida, minha base e a minha sustentação. Obrigada Senhor pelo discernimento, pela perseverança e paciência, os obstáculos foram vencidos e sigo firmes na fé. O sentimento que transborda em meu peito é de gratidão. Este trabalho de dissertação é o resultado conjunto de um trabalho em equipe, que vem provar que toda ajuda é bem-vinda, sempre precisamos do outro, ninguém faz pesquisa sozinho e a humildade de reconhecer isso é essencial para o sucesso de todos.

Aos meus pais Cleia Bacelar Pinto e Cledecilvo Ribeiro Silva por estarem ao meu lado durante este período, acreditando no meu sucesso e sem duvidar da minha capacidade. Nunca mediram esforços perante a minha educação, eu dedico esse título a vocês e tudo que fizeram por mim. Amo vocês.

Ao meu marido, Erivaldo Junior, que sempre me incentivou e me apoiou nas minhas decisões, obrigada por ser tão compreensivo e companheiro. Ao seu lado quero compartilhar essa e inúmeras outras vitórias que virão ao longo das nossas vidas. Eu te amo.

Pelo nosso herdeiro, nosso lutador, nosso anjo, Davi. Meu doce filho, que me acompanhou durante esse trabalho, obrigada por ter sido a minha melhor companhia, obrigada por ter feito aflorar dentro do meu ser a minha melhor versão, a versão mamãe. Não tem palavra no mundo que eu consiga descrever o que eu sinto por você. A mamãe te cuida e te materna com um céu de distância! Eu e seu papai seguimos firmes aqui com a certeza de que nos encontraremos na eternidade (se comporta que quando eu chegar não quero reclamações suas kkk) . Saudades, meu menino. Nós te amamos.

Agradeço a todos, em especial: à minha orientadora, Prof. Dra. Alcina Vieira de Carvalho Neta, por ter me acolhido no mestrado, pelo apoio, empatia e disponibilidade. Desejo tudo de melhor em sua vida. Deus abençoe sua caminhada! Felicidades.

A Profa. Dra Nancyleni, por toda ajuda e apoio ao longo desses anos, sempre me acalmando e dizendo que vai ficar tudo bem. Por ter aceitado a missão de ser minha coorientadora e estar presente em mais um momento tão especial na minha vida acadêmica. Minha mãe científica na iniciação científica, graduação e, agora, no mestrado. Que honra e privilégio eu tenho de ter a senhora acompanhando toda a minha caminhada acadêmica de perto. Deus abençoe sua vida e sua família!

A Ellainy Maria, que foi a minha pessoa, a minha metade, o meu 'marido' no meu casamento acadêmico. Obrigada minha amiga por me ensinar do básico até as situações mais

complexas. Queria ter palavras suficientes para agradecer por tudo que fez por mim, obrigada pelo apoio, pela dedicação, pelo ombro amigo, por secar cada lagrima, por simplesmente estar comigo. Ajudou-me de forma única, mostrando que a positividade e a realidade andam juntas, mas que a fé faz toda a diferença. Que Deus te abençoe sempre e te guarde, que Nossa Senhora te cubra com o manto sagrado da proteção, que nada e nem ninguém tire de você o seu senso de bondade, justiça e empatia. **TODO MUNDO MERECE UMA ELLAINY IGUAL EU TENHO VOCÊ!** Você é o orgulho do Laboratório de Patologia Molecular (LPMol) e o orgulho da nossa querida dona Kátia. Estamos torcendo por você! Todo sucesso do mundo ainda é pouco perto do que desejo para você.

A Natália Lustosa, que sempre esteve presente apesar do cansaço: você é a prova de que podemos dar conta de qualquer coisa, mesmo com noites sem dormir, crises de enxaqueca e muito trabalho, você é uma guerreira. Obrigada por tudo! Agradecimento especial para as bolsistas de iniciação científica do laboratório, Carla Maria e Lorena Cristina: obrigada por cada gel que vocês fizeram, por cada coleta, por ficarem até tarde ajudando no trabalho sem reclamar de nada. Vocês serão profissionais maravilhosas!

A Ingrid Marques, que foi essencial na minha escrita do trabalho, nas correções, foi maleável com os prazos e sempre me ajudou de forma pessoal. A Isabella Negreiro, a minha parceira do laboratório, minha companheira das 08:00 às 18:00, quem tanto me ajudou a pesar, extrair, realizar PCR, quantificar, tudo, tudo mesmo, espero ter você como M1, será um prazer trabalhar com você novamente. Vocês foram essenciais!

Agradeço também a Universidade Estadual do Maranhão, ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal por me proporcionar essa oportunidade de evolução pessoal e profissional, por ceder o espaço para realização do projeto e por toda a receptividade que obtive desde que ingressei no programa. A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, e a bolsa concedida pela Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão, FAPEMA, que tanto me ajudou nesse período, e por fim, a todos aqueles que acreditaram em mim e torceram, mesmo distantes.

PESQUISA DE AGENTES DE NOTIFICAÇÃO COMPULSÓRIA EM MOLUSCOS BIVALVES DE AMBIENTE NATURAL NA ILHA DO MARANHÃO, BRASIL

RESUMO

Os moluscos bivalves estão presentes em toda costa litorânea maranhense e representam além de alimento, fonte de renda. Devido sua fisiologia filtradora atuam como bioindicadores do ambiente em que estão inseridos, assim como podem ser acometidos por protozoários como *Bonamia* spp. e *Perkinsus* spp. que são agentes responsáveis por enfermidades que geram redução populacional e impacto econômico. Nesse contexto, objetivou-se pesquisar agentes de notificação compulsória em moluscos bivalves de ambiente natural na Ilha do Maranhão, Brasil. Para isso, foram coletados de bancos naturais, no período chuvoso, entre os meses de janeiro a maior de 2022, 90 espécimes de *Mytella* spp. (sururu), 90 espécimes de *Anomalocardia* spp. (sarnambi) e 63 espécimes de *Crassostrea* spp. (ostras). Após a coleta, os exemplares foram armazenados dentro de caixas térmicas e transportados ao laboratório, para serem processados no mesmo dia. Foram limpos com água do mar e separados por tamanhos similares. Foi realizado a abertura das válvulas dos animais com o auxílio de bisturis e retirado o tecido brânquia. Os animais foram separados em *pools*, onde cada pool continha 3 animais, totalizando assim 30 *pools* de *Mytella* spp. (sururu), 30 *pools* de *Anomalocardia* spp. (sarnambi) e 21 *pools* de *Crassostrea* spp. (ostras) para a extração de DNA. Em seguida foram submetidas a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) utilizando três genes específicos, 18SrDNA, SSUrDNA e o ITSrRNA. Análises moleculares foram realizadas e não foi possível detectar a presença dos protozoários *Bonamia* spp. e *Perkinsus* spp. em moluscos bivalves nas amostras avaliadas na Ilha do Maranhão. Ainda que não tenha relato de amostras positivas e nenhuma mortalidade tenha sido notada, a presente pesquisa evidencia informações importantes sobre a ausência de circulação de agentes de notificação compulsória, *Bonamia* spp. e *Perkinsus* spp. na área estudada e sinaliza para a necessidade de vigilância ativa e implementação de políticas públicas voltadas para a sanidade de animais aquáticos.

Palavras-chave: Detecção molecular, *Bonamia* spp., *Perkinsus* spp.

ABSTRACT

Bivalve molluscs are present throughout the coast of Maranhão and represent, in addition to food, a source of income. Due to their filtering physiology, they act as bioindicators of the environment in which they are inserted, as well as being affected by protozoa such as *Bonamia* spp. and *Perkinsus* spp. that are agents responsible for diseases that generate population reduction and economic impact. In this context, the objective was to investigate compulsory notification agents in bivalve molluscs from the natural environment on the Island of Maranhão, Brazil. For this, 90 specimens of *Mytella* spp. (mussel), 90 specimens of *Anomalocardia* spp. (clam) and 63 specimens of *Crassostrea* spp. (oysters). After collection, the specimens were stored in thermal boxes and transported to the laboratory to be processed on the same day. They were cleaned with sea water and separated by similar sizes. The animals' valves were opened with the aid of scalpels and the gill tissue was removed. The animals were separated into pools, where each pool contained 3 animals, thus totaling 30 pools of *Mytella* spp. (mussel), 30 pools of *Anomalocardia* spp. (clam) and 21 pools of *Crassostrea* spp. (oysters) for DNA extraction. They were then submitted to the Polymerase Chain Reaction (PCR) technique using three specific genes, 18SrDNA, SSURDNA and ITSrRNA. Molecular analyzes were performed and it was not possible to detect the presence of the protozoa *Bonamia* spp. and *Perkinsus* spp. in bivalve molluscs in the samples evaluated in Maranhão Island. Although there are no reports of positive samples and no mortality has been noted, the present study provides important information about the lack of circulation of compulsory notifiable agents, *Bonamia* spp. and *Perkinsus* spp. in the studied area and points to the need for active surveillance and the implementation of public policies aimed at the health of aquatic animals.

Keywords: Molecular detection, *Bonamia* spp., *Perkinsus* spp

LISTA DE ABREVIATURAS

BMLP	Programa Brasileiro de Intercambio em Maricultura
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
cPCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
EPAGRI	Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina
FAO	Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IFMA	Instituto Federal do Maranhão
IHS	Hibridização <i>in Situ</i>
INFOAGRO/SC	Sistema Integrado de Informações Agropecuárias do estado de Santa Catarina
IPMA	Instituto Português do Mar e da Atmosfera
ITS	<i>Internal Transcribed Spacer</i>
Mapa	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
NTS	<i>Non Transcribed Spacer</i>
OIE	Organização Mundial de Saúde Animal
PDI	Desenvolvimento e Inovação
PNCMB	Programa Nacional de Controle Higiênico Sanitário de Moluscos Bivalves
POLOMAR	Polo de Maricultura do Maranhão
PSU	<i>Practical Salinity Unit</i>
qPCR	<i>Real Time Quantitative Polymerase Chain Reaction</i>
RFTM	<i>Ray's Fluid Thioglycolate Medium</i>
SEBRAE	Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas
SSU	<i>Small Subunit Ribosomal</i>
TEM	<i>Transmission Electronic Microscopy</i>
UEMA	Universidade Estadual do Maranhão

UFMA Universidade Federal do Maranhão

UFPA Universidade Federal do Pará

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 Quantidade de moluscos bivalves e número de pools formados para a pesquisa de protozoários de notificação compulsória.	35
TABELA 2 Descrição das sequências de oligonucleotídeos utilizadas nos ensaios de PCR convencional para <i>Bonamia</i> spp. e <i>Perkinsus</i> spp.	37

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1. Mapa da Ilha do Maranhão. 34
- FIGURA 2. Fotografia de eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com Sybr Safe. Os amplicómeros mostrados na foto são relativos à cPCR para gene 18S rRNA. Caneleta PM: marcador de peso molecular em escala de 100 pares de bases; canaleta CP: controle positivo. Caneleta de 01 a 05 com amostras e canaleta 10 com CN: controle negativo..... 38

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1 Caracterização da malacocultura	18
2.2 Malacocultura no Maranhão	20
2.3 Moluscos bivalves: aspectos anatômicos e fisiológicos	21
2.4 Principais moluscos no Maranhão	23
2.5 <i>Mytella</i> spp. (sururu)	23
2.6 <i>Anomalocardia</i> spp. (sarnambi)	24
2.7 <i>Crassostrea</i> spp. (ostra)	25
2.8 Doenças de notificação obrigatória causadas por protozoários	25
2.8.1 Infecção por <i>Bonamia</i> spp.....	26
2.8.1 Etiopatogenia, transmissão e sinais clínicos	26
2.8.2 Epidemiologia molecular de bonamiose em moluscos bivalves	27
2.9 Infecção por <i>Perkinsus</i> spp.....	28
2.9.1 Etiopatogenia, transmissão e sinais clínicos	28
2.9.2 Epidemiologia molecular de perkinsiose em moluscos bivalves	30
3 OBJETIVOS	33
3.1 Objetivo geral	33
3.2 Objetivos específicos	33
4 MATERIAL E MÉTODOS	33
4.1 Local de Estudo, Animais e Coleta de Amostras.....	33
4.2 Extração de DNA.....	35
4.3 Detecção do gene endógeno 18S rRNA para DNA de eucarioto	35
4.4 Detecção de <i>B. ostreae</i> e <i>B. exitiosa</i> por meio da PCR convencional com base no gene 18S rDNA	35

4.5 Detecção de <i>Bonamia</i> spp., por meio da PCR convencional com base no gene SSU rDNA	36
4.6 Detecção de <i>Perkinsus</i> spp., por meio da PCR convencional com base no gene ITS rRNA	36
4.7 Eletroforese em gel de agarose	37
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
6. CONCLUSÃO	41
7. CONSIDERAÇÕES FUTURAS	41
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42

1 INTRODUÇÃO

A aquicultura, atividade voltada para a produção de peixes e outros animais aquáticos, está em constante crescimento no mundo, o que reflete diretamente no consumo pela população e economia. A Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO, 2018), estimou que, entre os anos de 2016 e 2018, a produção global de pescado passou de 171 para 179 milhões de toneladas.

Os moluscos bivalves integram animais aquáticos e pertencem a uma classe de organismos invertebrados que são distribuídos geograficamente de forma ampla e comercializados mundialmente (MAGALHÃES&FERREIRA, 2006). Apresentam fisiologia filtradora de partículas, se alimentam de algas microscópicas e material em suspensão que existe na água onde são cultivados e, por isso, podem atuar como bioindicadores das condições do ambiente onde vivem (ROBERTSON, 2007).

Os moluscos bivalves da costa brasileira que apresentam maior interesse econômico são representados pelas espécies: *Crassostrea rhizophorae* (GUILDING, 1828) e *Crassostrea gigas* (THUNBERG, 1793) pertencentes à família Ostreidae; *Perna perna* (LINNAEUS, 1758), *Mytella guyanensis* (LAMARCK, 1819) e *Mytella falcata* (ORBIGNY, 1846), que compõem a família Mytilidae; *Lucina pectinata* (GMELIN, 1791), da família Lucinidae; *Tagelus plebeius* (LIGHTFOOT, 1786), que constitui a família Psammobiidae; *Anomalocardia brasiliana* (GMELIN, 1791), Veneridae e *Nodipecten nodosus* (LINNAEUS, 1758), que integram a família Pectinidae.

As espécies que ocorrem em abundância na região Nordeste brasileira são *C. rhizophorae*, *M. guyanensis*, *L. pectinata* (COVA et al., 2015; PINTO et al., 2008; RONDINELLI, 2009), *M. falcata* (FRANCA et al., 2013), *T. plebeius* e *A. brasiliana* (DE OLIVEIRA et al., 2014; PINTO, 2012), que são consumidas e comercializadas pelas comunidades ao longo dos estuários. Estes indivíduos apresentam considerável importância tanto alimentar quanto comercial, sobretudo para as populações situadas às margens de rios e estuários, porém, com o crescimento e desenvolvimento da aquicultura e o uso indiscriminado dos recursos naturais, algumas doenças foram inseridas nestes ambientes e acarretam relevantes perdas econômicas nos cultivos, refletindo de forma negativa na produção e produtividade (MAGALHÃES&FERREIRA, 2006).

Dentre as doenças que acometem os moluscos bivalves, a Organização Mundial de Saúde Animal (*World Organization for Animal Health*), que manteve sua sigla histórica (OIE), apresenta no Código de Saúde para Animais Aquáticos, a lista das doenças de

notificação obrigatória, na qual estão inseridos os protozoários *Bonamia* spp. e *Perkinsus* spp., que são responsáveis por elevadas taxas de mortalidade na produção desses organismos em todo o mundo (OIE, 2012).

A bonamiose é uma doença que apresenta como agente etiológico o protozoário do gênero *Bonamia* spp., as espécies que apresentam maiores impactos econômicos são *Bonamia ostreae* e *Bonamia exitiosa* que apresentam a capacidade de infectar hemócitos de várias espécies de moluscos desencadeando distúrbios fisiológicos e eventualmente a morte desses animais (CRANFIELD et al., 2005). Já a infecção causada pelo protozoário *Perkinsus* spp. gera grandes perdas econômicas devido à sua alta taxa de mortalidade. Dentre as espécies de maiores impactos, tem-se *Perkinsus marinus* e *Perkinsus olseni* (AZEVEDO C. 1989; PARK&CHOI, 2001).

Com relação aos métodos de diagnóstico para *Bonamia* spp. e *Perkinsus* spp., podem ser realizados a Reação em Cadeia da Polimerase Convencional (cPCR) e/ou Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa em Tempo Real (qPCR), que apresentam sensibilidade e especificidade elevadas, além de estudos de sequenciamento e diversidade genética (CARNEGIE&COCHENEC-LAUREAU, 2004; DIGGLES et al., 2003; GAUTHIER et al., 1998; HINE et al., 2001).

De acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2021), o Brasil apresenta em dimensões continentais uma extensa costa marítima. O estado do Maranhão é privilegiado por apresentar o segundo maior litoral brasileiro, sendo precedido apenas pelo estado da Bahia. Com essa particularidade, a costa litorânea maranhense tornou-se um importante local para a realização de atividades econômicas como a pesca e o extrativismo de moluscos bivalves, tais como *Mytella* spp. (sururu), *Anomalocardia* spp. (sarnambi) e *Crassostrea* spp. (ostras).

As atividades de extração de moluscos bivalves representam não só um complemento na renda, mas, para muitas famílias, são a única fonte e de grande importância, tanto do ponto de vista comercial quanto alimentar. Contudo, devido à sua fisiologia filtradora, estes animais podem ser acometidos por vários agentes patogênicos, os quais podem ocasionar importantes prejuízos econômicos, refletindo de forma efetiva na produção e produtividade desses moluscos.

Apesar da importância socioeconômica e ambiental da malacocultura no Brasil e, mais especificamente, na Ilha do Maranhão, até o presente momento, não existem estudos

publicados sobre a ocorrência de agentes patogênicos de notificação compulsória no território maranhense. Desse modo, tendo como vista à prevenção e a busca de informações sobre a presença desses organismos, assim como o monitoramento desses patógenos que impactam a produção que se realizou a presente pesquisa.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Caracterização da malacocultura

A aquicultura ¹é uma atividade promissora no cenário mundial em que se constata desenvolvimento significativo nos últimos anos, além de ser uma importante fonte de proteína de alto valor biológico voltada para a alimentação humana (FAO, 2020). Em nível mundial, a produção de pescado passou de 171 milhões de toneladas no ano de 2016 para 179 milhões de toneladas em 2018 e, em termos produtivos, os moluscos ocuparam a segunda posição mundial, com aproximadamente 17,5 milhões de toneladas, representando 21,3% do total da aquicultura e 56,3% da maricultura em 2018 (FAO, 2020).

De acordo com os dados da FAO (2018), a produção mundial de moluscos em 2016 foi de aproximadamente 17,139 milhões de toneladas, deste valor, o continente asiático contribuiu com 15,835 milhões de toneladas, seguido pelo europeu (613 mil ton) e, o americano (574 mil ton). A malacocultura² é a segunda atividade produtiva que mais contribuiu para a aquicultura mundial, representando 21,42% da produção. Dos moluscos cultivados, organismos do gênero *Crassostrea* foram os mais expressivos, com 28% da produção total.

A procura por moluscos bivalves aumentou de forma bastante expressiva ao longo do tempo, o que reflete diretamente no aumento da renda em todo o mundo, mas também como consequência do impacto ambiental positivo como bioindicadores no ambiente que estão inseridos refletindo no sistema de produção, dos benefícios nutricionais significativos para o consumidor, especialmente em termos de fornecimento de vitaminas do complexo B e E, minerais como cálcio, ferro, fósforo, magnésio, potássio e zinco (FAO, 2016). Além do tradicional cultivo de ostras ao redor do mundo, outras espécies de bivalves, como os mexilhões, são muito comercializadas. O cultivo desses animais é realizado de forma ampla na Europa, América do Norte, no continente Asiático em países como China, Japão, Índia e Filipinas (CEBU, 2016).

¹ Aquicultura ou aquicultura é o ramo da Zootecnia que estuda a produção racional de organismos aquáticos, como peixes, moluscos, crustáceos, anfíbios, répteis e plantas aquáticas para uso do homem

² A malacocultura pode ser definida como a criação de moluscos.

No Brasil, a malacocultura vem se tornando um importante segmento da indústria aquícola, sendo compreendida como uma atividade ambientalmente responsável que proporciona melhoria das condições de vida das comunidades costeiras (FERREIRA&OLIVEIRA NETO, 2007). Contudo, as estatísticas de produção nacional são inferiores à de alguns países que apresentam notoriedade na atividade.

O Brasil detém aproximadamente 8 mil km de costa, porém apesar da potencialidade para o cultivo de organismos marinhos, a malacocultura é pouco explorada. Dados referentes ao ano de 2019, a maricultura correspondeu apenas a 13,3% do pescado cultivado no país. No que diz respeito ao cultivo de moluscos (mexilhões, ostras e vieiras), o Brasil é o segundo produtor latino-americano, precedido pelo Chile (FAO, 2020).

De acordo com Sistema Integrado de Informações Agropecuárias do Estado de Santa Catarina (INFOAGRO/SC, 2022), o estado que detém a maior produção brasileira de moluscos se concentra em Santa Catarina, que em 2016, produziu 97,9% do total nacional, tendo a capital Florianópolis como responsável por 90,8% do total de sementes de moluscos produzidas (IBGE, 2017). O estado catarinense, por apresentar condições oceanográficas propícias ao cultivo de moluscos, aloca o país entre os maiores produtores da América Latina, representada principalmente pela atividade produtiva mitilicultura³ e ostreicultura.⁴

Com base em dados da Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (EPAGRI, 2016), a produção de moluscos bivalves (ostras, mexilhões e vieiras) em Santa Catarina, no ano de 2015, gerou uma movimentação financeira de R\$ 78.895.697,64, com envolvimento direto de 2.315 pessoas e a produção de 20.438 toneladas de moluscos bivalves, o que denota todo o potencial econômico da atividade produtiva que representa 95% do total da produção nacional tendo ainda outros estados com destaque na atividade como, Paraná, Rio de Janeiro, São Paulo e Pará (IBGE, 2019).

Dos obstáculos para o crescimento e desenvolvimento integral da malacocultura, cita-se a poluição das águas e a floração de algas nocivas. Desde o ano de 2006, um programa de monitoramento de algas nocivas e ficotoxinas está em funcionamento em Santa Catarina e permanece atualmente. Em 2012, tanto o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) quanto o Programa Nacional de Controle Higiênico-Sanitário de Moluscos Bivalves (PNCMB), definiram os limites de concentração de microrganismos

³ Mitilicultura ou miticultura é o cultivo industrial do mexilhão, usualmente com recurso a viveiros flutuantes ancorados em águas costeiras

⁴ Ostreicultura é a criação de ostras é uma prática de aquacultura na qual as ostras são criadas e criadas principalmente por suas pérolas, conchas e tecidos de órgãos internos, que são consumidos.

contaminantes (bactérias) e biotoxinas, entre outros elementos, em áreas primárias de produção de ostras, mexilhões, vieiras e berbigões, com o objetivo de assegurar a saúde pública (VALENTI et al., 2021).

Outras dificuldades encontradas para o desenvolvimento da atividade são:(i) necessidade de legalização e/ou regularização de áreas específicas para tal cultura; (ii) competição com produtores ilegais, que comercializam moluscos mais baratos e de qualidade duvidosa; (iii) e, a falta de um sistema eficiente de fiscalização e sanidade (VALENTI et al., 2021).

2.2 Malacocultura no Maranhão

A zona costeira maranhense dispõe de 640 km de extensão, composta por um aglomerado de ecossistemas de alta relevância ambiental com mangues, restingas, campos inundáveis, dunas, estuários, recifes de coral e outros ambientes importantes do ponto de vista ecológico (FRANÇA et al., 2013). As áreas estuarinas do Maranhão detêm fatores positivos à atividade da malacocultura, com papel fundamental na complementação da renda familiar de marisqueiros (FURTADO, 2001).

Com relação ao cultivo de ostras no Maranhão, o primeiro relato data de 1999, com os recursos do Estado por meio do projeto Polo de Maricultura do Maranhão (POLOMAR). Em 2000, o Programa Brasileiro de Intercâmbio em Maricultura (BMLP) constatou que os municípios de Paço do Lumiar e Alcântara tinham potencial para a atividade, apesar dos entraves, no cultivo de ostras (*C. rhizophorae*) e sururu (*M. falcata*). No Plano de Locais de Desenvolvimento da Maricultura (PLDM), consta que os municípios de Icatu, Primeira Cruz e Humberto de Campo têm alta potencialidade para o desenvolvimento da malacocultura. Entre 2018 e 2019, alguns pesquisadores do Laboratório de Fisiocologia, Reprodução e Cultivo de Organismos Marinhos da Universidade Estadual do Maranhão (FISIOMAR/UEMA), realizaram a implantação de uma unidade demonstrativa de autogestão de cultivo de ostra nativa *Crassostrea gasar* no povoado de Areinhas, no município de Primeira Cruz e puderam concluir que o ambiente é bom e favorável para o crescimento das ostras, beneficiando a população e gerando renda.

A contribuição de órgãos financiadores de pesquisa, juntamente com instituições de ensino como, a Universidade Federal do Maranhão (UFMA), Universidade Estadual do Maranhão (UEMA) e Instituto Federal do Maranhão (IFMA), tem aumentado as pesquisas que envolvem moluscos bivalves oriundos da costa maranhense com estudos sobre genética,

cultivo e biologia reprodutiva (FRANÇA et al., 2013; LOPES, 2018; SOUSA, 2015), voltados ao desenvolvimento da malacocultura no estado.

Apesar do elevado potencial do estado do Maranhão, a atividade ainda é desenvolvida de forma artesanal, a execução desta prática extrativista envolve a catação de sarnambi, sururu (unha de velho), ostra e outros tipos de pescado de importância comercial e alimentícia para as famílias (CASTRO et al., 2014).

Segundo o autor Silva (2011), grande parte da extração desses moluscos são destinada ao consumo familiar, garantindo a alimentação e o excedente é entregue aos atravessadores. Devido à escassez de materiais para armazenamento, é necessário que a venda seja feita de forma imediata. A comercialização é feita de forma instantânea aos atravessadores, que impulsionam o mercado interno e externo, além da venda tem-se a modalidade de doação, troca e/ou escambo com a vizinhança, e alguns comerciantes locais (SILVA, 2011).

Na Ilha do Maranhão, mais de 50.000 pessoas vivem apenas da coleta desses moluscos (CASTRO et al., 2014), os de maiores destaques nessa área são ostra (*Crassostrea* spp.), sururu (*M. falcata*) e sarnambi (*A. brasiliiana*).

De acordo com Pereira et al. (2017), as famílias que trabalham diretamente com o extrativismo de moluscos apresentam renda abaixo de um salário-mínimo, o que gera a busca complementar na renda com auxílios do governo como Bolsa Família, Seguro Defeso e Aposentaria, a procura por esses auxílios estão relacionados a fatores como aumento da poluição das águas e a períodos de interrupção à pesca predatória (DALTO, 2013). Além disso, o lixo, desmatamento, lançamento de esgoto tanto doméstico quanto industrial nos manguezais, contaminam as zonas costeiras afetando, assim, a quantidade e qualidade dos moluscos da região, refletindo nas vendas, consumo, renda das famílias, causando desequilíbrio em toda a cadeia produtiva (RODRIGUES, 2016).

2.3 Moluscos bivalves: aspectos anatômicos e fisiológicos

Os moluscos bivalves são animais que integram o filo Mollusca e a classe Bivalvia, essa última representa aproximadamente 27% dos organismos integrantes do filo Mollusca, sendo considerada como a mais utilizada no âmbito de produção alimentar (AMARAL&JABLONSKI, 2005). No mundo, há cerca de 20.000 espécies de moluscos bivalves conhecidas e, no Brasil, tem-se aproximadamente 410 espécies (AMARAL&JABLONSKI, 2005). Destas, são utilizados para consumo humano, principalmente, os mariscos e as ostras em diferentes formas: vivas, cruas e cozidas

(ESMERINI et al., 2010). De acordo com o Instituto Português do Mar e da Atmosfera (IPMA, 2020), esses indivíduos vivem exclusivamente em ambientes aquáticos, conseguem se adaptar a diferentes meios e com distintas alterações de salinidade, como água salgada, doce ou salobra, e podem viver tanto enterrados na areia quanto fixados em alguns substratos ou livres.

No que diz respeito às características anatômicas, apresentam o pé comprimido lateralmente, a cabeça pouco desenvolvida e a cavidade do manto é a mais espaçosa quando comparada a qualquer classe de moluscos (SILVA&BATISTA, 2008) o corpo é mole, compreendido por um exoesqueleto de consistência rígida em forma de concha, que tem como objetivo assegurar a proteção contra predadores e tolerar a pressão hídrica que são submetidos no meio que habitam. As conchas que envolvem os moluscos são constituídas pela deposição contínua do nácar pelo próprio organismo a partir da superfície interna da concha onde se desenvolve, proporcionando um mecanismo de defesa contra microrganismos. A concha é formada por duas valvas, o fechamento das mesmas ocorre por meio da retração dos músculos adutores, que ficam localizados em cada uma das extremidades do animal (IPMA, 2020).

As brânquias comumente são grandes e apresentam como função principal a coleta de alimentos, além de realizarem a troca gasosa (RUPPERT&BARNES, 1996). São formadas por dois pares de lâminas de cada lado, possuem pequenos filamentos, designados como cílios, que têm como função conduzir a corrente de água para a cavidade do manto (IPMA, 2020). As partículas são direcionadas até à boca por um muco viscoso e é feita a digestão ao longo do trato digestivo; aquilo que não é digerido é eliminado sob forma de fezes ou pseudo-fezes (IPMA, 2020). Dessa forma, captam a água, que passa pelas brânquias, as quais atuam como um filtro, retendo partículas em suspensão: o fitoplâncton, detritos orgânicos, inorgânicos e microrganismos (HUNER&BROWN, 1985). Assim, cada animal é uma pequena unidade filtradora de água e, dependendo da espécie e idade, um único animal adulto pode filtrar, por hora, até 20 litros de água (BARROS et al., 2005).

Os moluscos bivalves são seres vivos bem adaptados ao seu ambiente e desenvolveram a habilidade de se disfarçar em meio aos sedimentos, evitando assim a predação, aumentando as chances de sobrevivência. Porém, alguns fatores ambientais, como temperatura, luz, salinidade, quantidade de oxigênio dissolvido na água, natureza e movimento das águas, podem influenciar os processos fisiológicos e a sua atividade. A respeito da temperatura, quanto mais alta, maior o metabolismo, com isso, aumenta o

movimento ciliar e, conseqüentemente, a quantidade de água bombeada e o ritmo respiratório (IPMA, 2020).

2.4 Principais moluscos no Maranhão

No Nordeste do Brasil, as espécies de moluscos bivalves que ocorrem em maior quantidade são *C. rhizophorae* (ostra-do-mangue), *M. guyanensis* (sururu), *L. pectinata* (sarnambi) (COVA et al., 2015; PINTO et al., 2008; RONDINELLI, 2009), *M. falcata* (sururu) (FRANCA et al., 2013), *T. plebeius* (unha-de-velho, canivete, unha-de-urubu) e *A. brasiliiana* (berbigão, sarnambi de lama) (DE OLIVEIRA et al., 2014; PINTO, 2012), onde são consumidas e comercializadas pelas comunidades ao longo dos estuários. A oferta desses moluscos é perene durante todo ano, porém o melhor período para mariscagem dos sururus é no período seco, já as ostras e os sarnambis qualquer período (LIMA, 2017).

Com relação aos principais moluscos presentes em Paço do Lumiar, São José de Ribamar e Raposa, situados na Ilha do Maranhão, encontram-se o sarnambi de lama (*A. brasiliiana*), sururu de pasta (*M. falcata*), sururu a punho (*M. guyanensis*), tarioba (*Iphigenia brasiliensis*), ostras (*C. rhizophorae*) e unha-de-velho (*Tagelus plebeius*) (PEREIRA et al., 2017).

2.5 *Mytella* spp. (sururu)

Pertencentes à família Mytilidae, os animais incluídos nesse gênero são popularmente conhecidos por “sururu”, “bico-de-ouro” ou “marisco-do-mangue”. Sua distribuição geográfica se estende do México ao Peru, no Oceano Pacífico, e da Venezuela à Santa Catarina, no Atlântico (RIOS, 2009). Habita estuários e manguezais, onde vive enterrada, principalmente, no substrato lodoso na região entremarés e entre as raízes respiratórias de *Avicennia* sp., (mangue preto) preferindo ambientes com altas taxas de sedimentação e elevado índice de partículas em suspensão (COIMBRA, 2003).

É uma espécie dioica cujo dimorfismo sexual se dá pela coloração das gônadas, que nas fêmeas são de alaranjado a vermelho-pardo, e nos machos são de branco-leitoso a marrom claro (CHRISTO&ABSHER, 2001). Seu ciclo reprodutivo é do tipo contínuo (CHRISTO et al., 2016), sendo janeiro e junho os períodos mais elevados de desova, apresenta tamanho variando entre 65 mm a 80 mm de comprimento (BOFFI, 1979; PEREIRA et al., 2003). É altamente tolerante a variações de salinidade, podendo ser encontrada em ambientes com condições de salinidade entre 5% e 35%, porém, não tolera esses extremos por longo período (YUAN et al., 2010).

Esses indivíduos têm preferência por ambientes com valores intermediários de salinidade, entre 16% e 26% (PEREIRA et al., 2007), podem se enterrar até 20 cm abaixo da superfície, variando conforme as condições de sedimento de cada região, que facilita ou dificulta a penetração no sedimento, além disso foi constatado que a temperatura de 33°C é letal para *M. guyanensis* (ONODERA, 2012).

2.6 *Anomalocardia* spp. (sarnambi)

O bivalve *Anomalocardia* spp. é representante da família Veneridae (RAFINISQUE, 1815) e possui distribuição geográfica ao longo das regiões costeiras do Caribe, do Suriname, do Brasil e do Uruguai (RIOS, 1994). No Brasil, é popularmente conhecido por “berbigão”, “vôngole”, “maçunim” e “chumbinho”. É encontrado em locais de águas calmas na zona entremarés de baías e enseadas abrigadas, onde vive enterrado em sedimento arenoso e areno-lodoso a uma profundidade de 5 cm no substrato. Pode ser encontrado tanto no infralitoral raso quanto nas regiões entremarés, incluindo as marismas e os baixios não vegetados, sendo pouco frequente nos manguezais (MONTI et al., 1991; MOUËZA et al., 1999; NARCHI, 1974; SCHAEFFER-NOVELLY, 1976; SCHAEFFER-NOVELLI, 1980; RIOS, 1994).

É uma espécie dioica, sem dimorfismo macroscópico das gônadas. Seu ciclo reprodutivo é do tipo contínuo (BOEHS, 2000), esses indivíduos se tornam férteis quando atingem, aproximadamente, 30 mm de comprimento (MOUËZA et al., 1999). Sua distribuição espacial no sedimento é predominantemente do tipo agregada, principalmente nos sedimentos com alto teor de matéria orgânica (SCHAEFFER-NOVELLY, 1976), pode ser numericamente dominante sobre outras espécies bentônicas (BOEHS&MAGALHÃES, 2004; SCHAEFFER-NOVELLI, 1980;).

Essa espécie é bastante resistente quanto à falta de oxigênio, ficando até 24h em anóxia (HIROKI, 1977). Além disso, *A. brasiliiana* é uma espécie eurihalina, tolerando a entrada da água marinha nas marés altas, mas não se desenvolve em ambientes de baixa salinidade, não sendo encontrada em ambientes com salinidade abaixo de 17% (BOEHS et al., 2008; MONTI et al., 1991).

De acordo com suas características anatômicas, essa espécie habita locais com pouco material em suspensão, o que impede a presença de *A. brasiliiana* em locais com ressuspensão frequente de sedimento, assim como em regiões de turbulência e de alta energia ambiental, como as praias expostas e as áreas estuarinas com fortes correntes (BOEHS&MAGALHÃES, 2004).

2.7 *Crassostrea* spp. (ostra)

As ostras são moluscos bivalves invertebrados, pertencente família Ostreidae. As principais espécies encontradas no Brasil são *C. rhizophorae* (GUILDING, 1828) e *C. gigas* (THUNBERG, 1793). A primeira é conhecida como ostra nativa e ostra-do-mangue, ocorre desde o sul do Caribe até a costa do Uruguai e está presente em toda a costa brasileira (RIOS, 2009). Essa espécie fixa-se sobre substratos consolidados, incluindo rochas, mas seu hábitat preferencial é sobre as raízes do mangue vermelho *Rhizophora mangle* L. (NASCIMENTO, 1983), comumente vive em manguezais ou regiões estuarinas. A ostra *C. gigas*, é proveniente de águas do Pacífico, e extremamente adaptada às condições climáticas do litoral de Santa Catarina, onde as águas são mais frias (BMLP, 2003).

As ostras *Crassostrea* spp., são consideradas euritérmicas suportando variações de temperatura entre 5 a 30°C, mas com faixa ótima de temperatura entre 21 a 28°C (NEHRING, 2006) e eurialinas, possibilitando assim sua presença em vários locais (ANGELL, 1986). São dioicas, apresentam ausência de dimorfismo sexual, a reprodução é sexuada com fecundação externa. Para as ostras *C. rhizophorae*, a faixa de salinidade pode variar de 7 a 28 (FERNANDES&DE LIMA, 1976), as sementes da espécie sobrevivem em salinidade entre 15% a 25% (GUIMARÃES et al., 2008). Já para a *C. gigas*, o fator salinidade ,que pode variar entre 2% a 41% (ANGELL, 1986), tem melhor desenvolvimento em valores de salinidade compreendidos entre 20% a 25% (FAO, 2012).

A temperatura é outro fator importante para as ostras *C. rhizophorae*. Apresenta faixa de temperatura ótima acima de 20°C (AKABOSHI&PEREIRA, 1981). *C. gigas* pode desenvolver-se entre 1,8°C a 35°C, porém entre 11°C a 25°C encontram-se as temperaturas ideais para o seu desenvolvimento (ANGELL, 1986; FAO, 2012) .

2.8 Doenças de notificação obrigatória causadas por protozoários

No mundo existem várias doenças que podem ser tanto zoonoses, quanto doenças que geram prejuízos econômicos na produção e na produtividade, visando a prevenção, o controle e as medidas que devem ser tomadas, a notificação se faz necessária em casos de suspeitas e/ou confirmação (BRASIL, 2013). A nível mundial, a lista estabelecida pela Organização Mundial de Saúde Animal (*World Organisation for Animal Health – WOA*H), fundada como OIE (Escritório Internacional de Epizootias), lista doenças notificáveis que podem ter impactos na saúde animal e humana, e podem afetar adversamente a conservação da vida selvagem (WOAH, 2022).

No Brasil há listas de doenças de notificação obrigatória (DNC) que são vinculadas principalmente ao Ministério da Saúde (MS) e Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). As listas de doenças, agravos e eventos em saúde pública de notificação compulsória em todo o território nacional estão reunidos na Portaria nº 1.271 (BRASIL, 2014), do MS. Cada país, conhecendo suas necessidades, deve elaborar suas listas e seus programas de controle, medidas de prevenção, medidas corretivas e erradicação de enfermidades, baseado no Regulamento Sanitário Internacional (RSI) (BRASIL, 2013).

Tendo em vista os impactos que algumas doenças podem acarretar nessas populações de bivalves, no ano de 2012 foi criado o Plano Nacional de Controle Higiênico Sanitário de Moluscos Bivalves (PNCMB), (Instrução Normativa nº 7, de 8 de maio de 2012), que regula a produção de bivalves que são cultivados no território nacional, programa de vigilância ativa de contaminantes em áreas primárias de produção de ostras, mexilhões, vieiras e berbigões, ou outros moluscos bivalves se houver, com o objetivo de assegurar a saúde pública (VALENTI et al., 2021). A Portaria nº 19, de 4 de fevereiro de 2015, definiu a lista de doenças de notificação obrigatória de animais aquáticos ao Serviço Veterinário Oficial (SVO).

Em relação aos moluscos bivalves, os agentes protistas responsáveis por elevadas taxas de mortalidade e altas taxas de prejuízos econômicos são *Bonamia exitiosa*, *Perkinsus marinus*, *Haplosporidium nelsoni* e *Mikrocytos mackini*, e o agente viral herpesvirus da ostra do tipo I (OSHV-1), que parasita diferentes espécies de moluscos bivalves (MPA, 2015).

2.8.1 Infecção por *Bonamia* spp.

2.8.1 Etiopatogenia, transmissão e sinais clínicos

A bonamiose é uma doença de distribuição cosmopolita causada por indivíduos da classe Ascetosporea, ordem Haplosporida e gênero *Bonamia* spp., protozoário intrahemocítico que acarreta infecção letal nos hemócitos (CARNEGIE&COCHENNEC-LAUREAU, 2004). As espécies que apresentam maiores impactos econômicos para os moluscos bivalves são *Bonamia ostreae* e *Bonamia exitiosa*, que desenvolvem distúrbios fisiológicos e eventualmente a morte dos animais afetados (CRANFIELD et al., 2005).

Morfológicamente, ambas as espécies de *Bonamia* spp. podem ser visualizadas como pequenos organismos esféricos ou ovoides (2-5 µm de largura) no interior dos hemócitos, porém, também podem estar presentes no ambiente extracelular. Esses parasitas apresentam

citoplasma basofílico e um núcleo eosinofílico em colorações feitas por eosina. Em avaliações realizadas em tecidos de ostras da espécie *Ostrea edulis* infectadas por *Bonamia* spp., foi detectada a existência de inúmeras microcélulas, levando a inferir que os protozoários infectam os hemócitos e neles se dividem, onde formas binucleadas também podem ser observadas (BALSEIRO et al., 2006).

Com relação à patogenicidade, dentro dos hemócitos ocorre a multiplicação exacerbada das microcélulas, que acarreta ruptura da célula infectada e o parasita consegue alcançar os tecidos. Quando isso ocorre, os protozoários são fagocitados por outros hemócitos, repetindo o dano celular. O parasita é transferido para todos os órgãos através da hemolinfa, que carrega continuamente hemócitos infectados, a infecção evolui de maneira rápida, tornando-se sistêmica com danos aos tecidos (HINE, 1991, 1997).

O ciclo de vida do parasita fora do hospedeiro ainda é desconhecido, contudo, o mecanismo de transmissão ocorre diretamente entre os hospedeiros afetando as formas larvais, juvenis e adultas, não havendo hospedeiros intermediários, ocorrendo por meio das correntes de água (CRANFIELD et al., 2005). Os sinais clínicos observados nos moluscos são atrofia, má condição geral, musculatura aquosa, lábios de concha cobertos de algas, deformidades das margens branquiais, abscessos e pústulas, lesões no tecido conjuntivo das brânquias e manto, emagrecimento, inibição do desenvolvimento das gônadas, comprometimento do sistema imunológico e destruição do epitélio do tubo digestório, com mortalidade elevada (HINE, 1991).

2.8.2 Epidemiologia molecular de bonamiose em moluscos bivalves

Um estudo realizado por Carnegie et al. (2008) nos Estados Unidos da América (EUA) avaliou-se a sazonalidade da infecção por *Bonamia* spp. em ostras *Crassostrea ariakensis*, por meio de testes histológicos e PCR, com o objetivo de compreender melhor como esse parasita se comporta, sua biologia e as técnicas de manejo. Os autores observaram que, em temperatura menor que 20°C, *Bonamia* spp. não apresenta atividade infectante; já em temperaturas acima dessa faixa, a infecção se torna latente. Em temperaturas mais altas, a mortalidade chegou a 100% e, nas mais amenas, a mortalidade ficou entre 17% a 82%, o que evidencia que a sazonalidade e a temperatura influenciam de forma efetiva no comportamento do parasita.

Em relação à ocorrência do parasita, o primeiro relato de *B. ostreae* ocorreu em 1979, quando se pesquisou as causas da mortalidade em massa da ostra da espécie *O. edulis* em Île Tudy, França (PICHOT et al., 1980). No Canadá, foi confirmada a presença de *B. ostreae*

em três de 37 ostras da espécie *O. edulis* por meio de histologia e técnicas moleculares (MARTY, 2006); no Golfo da Manfredonia, no Mar Adriático, Itália, de 750 ostras *O. edulis*, duas foram positivas nos testes moleculares (NARCISI et al., 2010).

No ano de 2016, na Nova Zelândia (LANE et al., 2016), foi relatado pela primeira vez a presença de *B. ostreae* infectando ostras planas (*Ostrea chilensis*), em que do quantitativo de 149 ostras, 119 foram identificadas por meio da histologia com microcélulas de *Bonamia*. Já nos testes de PCR, apresentaram 100% de correspondência com *Bonamia* sp., sendo 27% positivas para *B. exitiosa* e 40,3% para *B. ostrea* e infecções paralelas foram identificadas em 53,7% dos animais amostrados.

No que se refere a espécie *B. exitiosa*, o primeiro relato ocorreu em 1986, após mortalidade em massa das ostras (*O. chilensis* de Foveaux) na Nova Zelândia. Estudos mais recentes revelaram a presença de *B. exitiosa* em várias espécies de ostras e localidades do mundo (ABOLLO et al., 2008; ARZUL&CARNEGIE, 2015; ENGELSMA et al., 2014; HILL-SPANIK et al., 2014). Em um trabalho realizado por Abollo (2008), foi detectado *B. exitiosa* infectando as ostras planas europeias (*O. edulis*) no Noroeste da Espanha, sendo este o primeiro relato deste parasita em águas europeias.

No ano de 2010, na Tunísia, foi conduzido um estudo com 85 ostras (*Ostrea stentina*) para detecção de *Bonamia* sp. por meio de PCR. Do total avaliado, nove foram positivas para o protozoário e, no sequenciamento, apresentaram semelhança de 99,1%-99,7% com *B. exitiosa* (HILL et al., 2010,2014).

Na Flórida, foi possível detectar a presença da *B. exitiosa* em ostras (*C. ariakensis* e *C. virginica*) por meio de técnicas histológicas e por meio da PCR (DUNGAN et al., 2012). Um estudo realizado na Patagônia, Argentina, com o objetivo de avaliar se a infecção por *B. exitiosa* havia persistido após 14 anos nos leitos naturais de ostras da espécie *Ostrea puelchana*, foi constatado que o protozoário ainda está presente e parece controlar a estrutura populacional local (KISSNER et al., 2014; HILL et al., 2014). Até o presente momento não há relatos de bonamiose no Brasil.

2.9 Infecção por *Perkinsus* spp.

2.9.1 Etiopatogenia, transmissão e sinais clínicos

A perkinsiose é uma doença causada pelo protozoário pertencente ao filo Perkinsozoa, ordem Perkinsida, família Perkinsidae e gênero *Perkinsus* sp. (LEVINE, 1978). De acordo com Perkins (1976) e Levine (1978), *Perkinsus* spp. foram classificadas como integrantes do grupo Apicomplexa. Entretanto, análises filogenéticas e moleculares

realizadas por Reece et al. (1997) e Siddall et al. (2001) colocaram estes parasitas como inerentes à Dinoflagellata. Posteriormente, foram incluídos no filo Perkinsozoa (VILLALBA et al., 2004).

Este protozoário gera grandes perdas econômicas devido à alta taxa de mortalidade que ocasiona (VILLALBA et al., 2004), dentre as espécies de maiores impactos, tem-se *Perkinsus marinus* e *Perkinsus olseni*, que são de notificação obrigatória, segundo a Organização Mundial de Saúde Animal (OIE, 2012).

O ciclo de vida do protozoário *Perkinsus* ocorre comumente dentro de fagócitos. A temperatura é um fator de maior impacto no aumento da proliferação do agente, em que ocorre elevação da patogenicidade e mortalidade. Em termos de ciclo biológico existe o estágio em forma de trofozoítos que quando se encontram maduros medem de 3 a 10 µm de diâmetro, eles se deslocam para as extremidades da célula e adentram no interior das células do tecido conjuntivo e epitelial, onde começa o estágio denominado de roseta, que é o processo de sucessivas multiplicações. Os esporângios têm variação de tamanho de 4 a 15 µm de diâmetro e pode conter entre 2, 4, 8, 16 ou 32 trofozoítos em desenvolvimento. Na finalização desse processo de 8 a 32 trofozoítos imaturos são liberados. Os hospedeiros são infectados através de zoósporos biflagelados (VILLALBA et al., 2004, 2011).

Quando os hospedeiros apresentam tecidos infectado por *Perkinsus* e são incubados em meio líquido de tioglicolato (RFTM) sob condições anaeróbias e na ausência de luz, os trofozoítos aumentam diversas vezes o seu tamanho e a sua parede celular apresenta-se compacta, transformando-se no estágio denominado de hipnósporo. Os hipnósporos apresentam particularidades como de sobrevivência durante longos períodos, em condições desfavoráveis, sendo consideradas formas de resistência (CASAS et al., 2002). Porém, eles conservam a capacidade de transformarem-se em zoosporângio, ao encontrar condições propícias. Este fato foi confirmado quando os hipnósporos foram incubados em água do mar e observou-se a zoosporulação, culminando com a formação e a liberação de zoósporos biflagelados (CHOI&PARK, 2010).

O mecanismo de transmissão da perkinsiose é horizontal, isto é, ocorre diretamente entre indivíduos e todos os estágios do ciclo de vida podem causar infecção (VILLALBA et al., 2004, 2011). Dentre os sinais clínicos, estão abscessos, pústulas, ruptura do tecido conjuntivo, cistos macroscópicos nas brânquias, emagrecimento, inibição do desenvolvimento das gônadas, comprometimento do sistema imunológico e destruição do epitélio do tubo digestório (AZEVEDO, 1989; PARK&CHOI, 2001).

Perkinsus marinus multiplica-se e causa condensação dos tecidos infectados. As quebras de tecidos e o bloqueio de algumas defesas dos moluscos podem ocorrer devido à produção de fatores proteolíticos, liberados extracelularmente, observados por Castillo (1998), em estudo *in vitro*. Ostras infectadas com *P. marinus* apresentaram como sinais clínicos glândula digestiva com “aspecto pálido”, redução do índice de condição corporal, severa emaciação, abertura da concha (*gaping*), retração do manto, inibição do desenvolvimento gonádico, crescimento retardado, abscessos e lesões, com registros de até 95% de mortalidade nas mesmas (BOWER et al., 1994; OIE, 2016).

2.9.2 Epidemiologia molecular de perkinsiose em moluscos bivalves

O primeiro relato de identificação de *Perkinsus* spp. ocorreu em populações de ostras da espécie *C. virginica* na Louisiana, costa atlântica dos EUA em 1940 (MACKIN et al., 1950). O estudo realizado por Power (2006) teve como objetivo avaliar nos recifes de ostras (*C. virginica*) a presença de *P. marinus* em que se detectou prevalência de 100% em alguns locais nas águas costeiras da Georgia (EUA), porém, com intensidade considerada baixa, variando de 0 a 1,83. Contudo é importante a realização de monitoramento temporal do local, já que o protozoário acarreta problemas econômicos na produção.

Na costa do Pacífico, México, a cultura da ostra da espécie *Crassostrea corteziensis* tem se tornado cada vez mais comum pois *C. gigas* tem sofrido episódios de mortalidade. No estudo realizado por Cáceres-Martínez et al. (2008) nessa região foi detectado, por meio de análises histopatológicas, alterações teciduais nas ostras compatíveis com lesões ocasionadas por *Perkinsus* sp., sendo confirmada a infecção por meio de testes moleculares específicos e sequenciamento, que mostrou 100% de cobertura e 98% de identidade para *P. marinus*. Este é considerado como o primeiro registro de *P. marinus* em ostras *C. gigas*, na América do Norte e primeiro registro em ostras *C. corteziensis*.

Um grupo com 30 moluscos (*Tridacna crocea*) foram importados para a Florida, EUA, para a realização de pesquisas, em que foi detectado, por meio da histologia e testes moleculares, a presença de *P. olseni*, o que confirma que a importação de amêijoas ornamentais não testadas e não estando em quarentena, possivelmente permitiu a introdução *P. olseni* nos EUA (SHEPPARD et al., 2008). No Uruguai, foi detectado *P. olseni* em uma espécie de sarnambi, *Pitar rostrata* que na histologia pode-se observar grave infiltração dos tecidos, com a confirmação do patógeno por PCR e sequenciamento (CREMONTE et al., 2005).

Um estudo realizado em Galiza, Noroeste da Espanha, com amêijoas da espécie *Ruditapes decussatus* coletadas durante um ano, avaliou-se por meio de técnicas histológicas como *P. olseni* poderia influenciar na reprodução desses moluscos, sendo constatado que apesar da infecção eles conseguiram produzir gametas e desovar sem ter consequências na eficiência da fecundidade e desova (CASAS, 2012).

Uma pesquisa realizada na França em 2012, com o objetivo de caracterizar protozoários circulantes em amêijoas das espécies *Ruditapes philippinarum* e *R. decussatus*, coletados de áreas distintas de produção por meio da técnica de PCR e sequenciamento, foi possível detectar *P. olseni* (ARZUL et al., 2012).

Em Tibau do Sul, no Rio Grande do Norte, uma investigação realizada utilizou o policultivo como alternativa na redução das consequências no meio ambiente e progresso na produção de ostras. Análises feitas detectaram a ocorrência de *Perkinsus* spp. em ostras *C. gasar* por meio das técnicas de RFTM e PCR. Foi observado que os reprodutores foram infectados por *Perkinsus* spp. As sementes adquiriram a infecção por *Perkinsus* quando transferidas para os viveiros. Assim constatou-se ser possível produzir sementes de ostras *C. gasar* livres de *Perkinsus* a partir de reprodutores infectados, e seu cultivo em viveiros de camarão é viável (SILVA et al., 2016).

Outro estudo realizado no Brasil, com *C. gigas* e *C. rhizophorae*, teve o objetivo de avaliar como parâmetros de temperatura e salinidade influenciam no aumento da proliferação do protozoário *P. marinus*, os resultados permitiram concluir que, quanto maior a temperatura e a salinidade, maiores serão os danos ao protozoário, o que pode estar relacionado a estresse oxidativo (QUEIROGA et al., 2016).

Em Santa Catarina, estado com a maior produção de ostras do Brasil, tendo em conta a patogenicidade da perkinsiose, foi realizada uma pesquisa nas duas espécies de ostras presentes no cultivo, *C. gasar* e *C. gigas*. O estudo envolveu oito locais de coleta ao longo da costa do litoral; para a detecção, foram utilizadas as técnicas RFTM, histologia, PCR e sequenciamento, havendo positividade para *P. marinus* em *C. gasar* e *C. gigas*, sendo este o primeiro relato de *P. marinus* em *C. gigas* na América do Sul (LUZ et al., 2019). Até o presente momento não há relatos de perkinsiose na Ilha do Maranhão.

2.10 Diagnóstico

Os métodos de diagnóstico para *Bonamia* spp. e *Perkinsus* spp. podem ser realizados por meio de técnicas histológicas com cortes de seções transversais do tecido que incluem brânquias, glândulas digestivas, manto e gônadas, corado com hematoxilina e eosina

(MOORE, 2006), no caso de *Perkinsus*, os trofozoítos podem ser facilmente visualizados e geralmente estão associados à infiltração de um grande número de hemócitos nos tecidos (SAGRISTA et al., 1995), porém apresenta baixa sensibilidade quando comparada a técnicas mais atuais como Reação em Cadeia da Polimerase Convencional (cPCR) e Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa em Tempo Real (qPCR) que apresentam sensibilidade e especificidade maiores (CARNEGIE&COCHENNEC-LAUREAU, 2004; DIGGLES et al., 2003; HINE et al., 2001).

Ensaio de PCR para *Bonamia* spp. possibilitam o diagnóstico do agente envolvido e o principal gene utilizado tem sido o SSU (*Small Subunit Ribosomal*) ou 18S (RAMILO et al., 2008) com isso, o uso desta técnica tem permitido análises da ocorrência desse parasito em determinados locais, diferentes hospedeiros além de estudos de diversidade genética.

De acordo com as recomendações da OIE (2012), o diagnóstico presuntivo da infecção por *Perkinsus* spp. podem ser com a PCR, onde a técnica molecular foi desenvolvida a partir da amplificação de uma parte da região não espaçador transcrito (*Non Transcribed Spacer*, NTS) do rRNA (GAUTHIER et al., 1998; PENNA et al., 2001). Para as duas espécies, foi feito um conjunto de *primers* a partir da sequência espaçadora interna (*Internal Transcribed Spacer*, ITS) (AUDEMARD et al., 2004), que serve tanto como diagnóstico confirmatório por meio de PCR, sequenciamento e microscopia eletrônica de transmissão (*Transmission Electronic Microscopy*, TEM) (SAGRISTA et al., 1995).

Segundo as recomendações da OIE relacionadas as técnicas para vigilância, podem ser usadas impressões teciduais, histopatologia e PCR, para um diagnóstico presuntivo e variações da PCR, sequenciamento e microscopia eletrônica de transmissão para um estudo confirmatório. Além das técnicas mencionadas anteriormente, tem-se por meio da técnica de cultura *Ray's Fluid Thioglycolate Medium* (Meio Fluido de Tioglicolato de Ray, RFTM), onde o tecido do hospedeiro que é utilizado geralmente é a brânquia, porém a maior limitação da utilização desta técnica é o tempo necessários para a obtenção dos hispnósporos, que podem ser visualizados de 5 a 7 dias após a coloração com iodo lugol (RAY, 1954). A técnica hibridização *in situ* (IHS) (MOSS&REECE, 2006), que pode ajudar a detecção de infecção precoce e microscopia eletrônica de transmissão (TEM) porém é demorada e não pode ser aplicada na rotina (SAGRISTA et al., 1995). O sequenciamento é recomendado na etapa final para fechar o diagnóstico de forma confirmatória. As regiões alvo são SSU rDNA e ITS1. As sequências obtidas devem ser comparadas com as disponíveis em bancos de genes e o sequenciamento para confirmação de espécies (OIE, 2019).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Pesquisar protozoários de notificação compulsória em populações naturais de moluscos bivalves na Ilha do Maranhão, Brasil.

3.2 Objetivos específicos

- Detectar o DNA de protozoários de notificação compulsória *Bonamia* spp. e *Perkinsus* spp., em amostras teciduais de *Mytella* spp., *Anomalocardia* spp. e *Crassostrea* spp., por meio de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) convencional;
- Avaliar o DNA das amostras positivas a fim de identificar as espécies de *Bonamia* spp. e *Perkinsus* spp. encontradas.

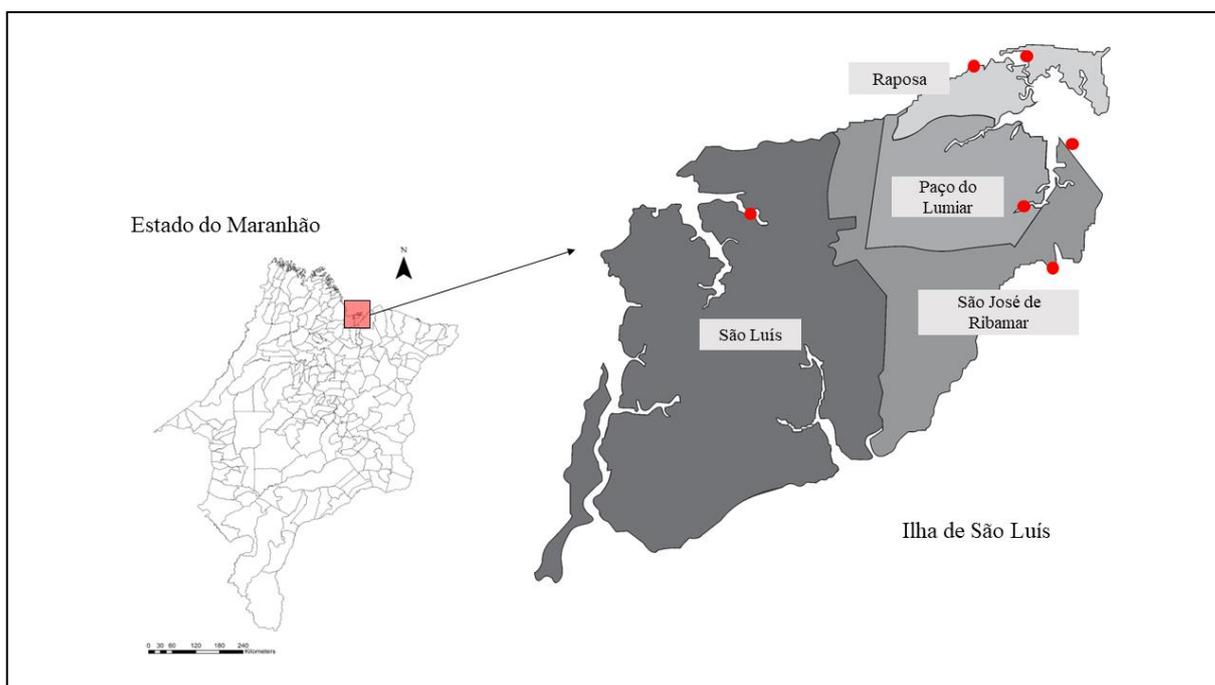
4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local de Estudo, Animais e Coleta de Amostras

O estudo foi conduzido nos municípios São Luís, Paço do Lumiar e Raposa, que integram a Ilha do Maranhão. Esses municípios apresentam clima tropical úmido, temperaturas elevadas superiores a 26°C durante o período seco, nos meses com temperaturas mais amenas, no período de maior pluviosidade, chega a 23°C (NuGeo UEMA, 2016).

A área estudada apresenta duas estações bem definidas ao longo do ano, uma chuvosa nos meses de janeiro a junho, e a outra seca, de julho a dezembro. As médias pluviométricas totais anuais variam entre 1.800mm e 2.000mm. O mês que concentra as maiores precipitações é o mês de abril, e o que apresenta menor índice pluviométrico é o mês de outubro (NuGeo UEMA, 2016).

FIGURA 1. Mapa da Ilha do Maranhã



Fonte: autor.

No presente estudo, foram utilizados 90 espécimes de sururu (*Mytella* spp.), (SOOT, 1955), 90 sarnambis (*Anomalocardia* spp.) (SCHUMACHER, 1817) e 63 ostras (*Crassostrea* spp.) (SACCO, 1897), provenientes de bancos naturais dos municípios da Ilha do Maranhão, coletados de forma manual. As coletas foram realizadas entre os meses de janeiro a maio de 2022, que corresponde ao período chuvoso da área amostrada. Após coletados, os moluscos foram transportados em caixas térmicas, em temperatura ambiente, para o Laboratório de Patologia Molecular da Universidade Estadual do Maranhão (LPMol/UEMA), mantidos em recipientes contendo água do mar para serem processados no mesmo dia.

Foram formados três grandes grupos de moluscos por espécie amostrada, os quais foram constituídos por *pools*, cada *pool* continha três animais de cada espécie que apresentaram características morfométricas semelhantes como por exemplo altura. No processamento, os animais foram limpos com a água do mar, retirado de suas conchas materiais incrustantes e abertos com o auxílio de lâminas de bisturis. Após a abertura, foi realizado a separação das brânquias do restante da musculatura do molusco em que se obtiveram os *pools*, totalizando 81 *pools* (TABELA 1), sendo esta uma adaptação ao protocolo proposto por Esmerini et al. (2010). Após o processo de separação, os *pools* foram

acondicionados em microtubos estéreis de 1,5 mL livres de nucleases e armazenados em freezer a -20°C no LPMol/UEMA para a realização das análises propostas.

TABELA 1 Quantidade de moluscos bivalves e número de *pools* formados para a pesquisa de protozoários de notificação compulsória.

Espécie de bivalve	Nº de animais	Nº de animais em cada <i>pool</i>	Nº de <i>pools</i>
<i>Mytella</i> spp.	90	03	30
<i>Anomalocardia</i> spp.	90	03	30
<i>Crassostrea</i> spp.	63	03	21

4.2 Extração de DNA

Para a extração e purificação de DNA dos *pools* das brânquias foi utilizado o protocolo de extração de fenol-clorofórmio, de acordo com a metodologia padronizada por Cochenec et al. (2000), em que os tecidos passaram por digestão com proteínase K, overnight a 50 °C. A concentração e qualidade do DNA extraído foi determinada espectrofotômetro (através das taxas 260/230 e 260/280).

4.3 Detecção do gene endógeno 18S rRNA para DNA de eucarioto

Com o intuito de verificar a qualidade da extração, a integridade do DNA obtido e/ou a presença de inibidores da reação, todas as amostras extraídas dos moluscos bivalves foram submetidas à PCR para confirmação da presença do gene conservado 18S previamente descritos por Farjado et al. (2008), que produz um fragmento de 140 pares de base (Tabela 1). Cada reação apresentou um volume total de 12,5 µL, sendo: 6,25µL de PCR Master mix Promega® (Taqpolymerase, dNTPs, MgCl₂, buffer); 0,5 µL de cada primer (18SEUDIR /18SEUINV) (10pmol); 4,25 µL de água DNase e RNase free; e 1 µL de amostra de DNA extraído (100ng/reação). O protocolo de amplificação seguiu uma etapa de desnaturação inicial de 50°C por 2 minutos, seguido de 95°C por 10 minutos, 40 ciclos de amplificação de 95°C por 15 segundos, 60°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto e extensão final a 72°C por 5 minutos.

4.4 Detecção de *B. ostreae* e *B. exitiosa* por meio da PCR convencional com base no gene 18S rDNA

Os ensaios de PCR foram realizados de acordo com o protocolo proposto por Ramilo et al. (2008) utilizando um volume total de 25 µL contendo 12,5µL de PCR Master Mix Promega® (Taq polymeras, dNTPs, MgCl₂ e buffer); 1µL cada primer específico para *B*

ostreae (BOSTRE-F/R) ou *B. exitiosa* (BEXITF/R) (a 2,5 pmol); 8,5µL de água livre de DNase e RNase (Promega®) e 2µL do DNA extraído (a 250 ng). Os ensaios de PCR foram realizados em um termociclador sob os seguintes parâmetros de reação: 94°C por 2 min, 35 ciclos a uma temperatura de fusão de 94°C por 30 s, temperatura de anelamento de 55°C por *B. ostreae* e 58°C para *B. exitiosa* por 45 s, temperatura de extensão de 72°C por 1 min, seguido por um período de extensão final de 72°C por 1 min. (TABELA 2).

4.5 Detecção de *Bonamia* spp., por meio da PCR convencional com base no gene SSU rDNA

Os ensaios de PCR foram realizados de acordo com o protocolo proposto por Cochenec et al. (2000) utilizando um volume total de 25 µL contendo 12,5µL de PCR Master Mix Promega® (Taq polymeras, dNTPs, MgCl₂ e buffer); 1µL cada primer específico CR /CF (a 2,5 pmol); 8,5µL de água livre de DNase e RNase (Promega®) e 2µL do DNA extraído (a 250 ng). Os ensaios de PCR foram realizados em um termociclador sob os seguintes parâmetros de reação DNA molde por 5 min a 94 °C, seguido de 30 ciclos de 94 °C por 1 min/55 °C por 1 min/72 °C por 1 min, e finalmente seguido por uma extensão final por 10 min a 72°C. (TABELA 2).

4.6 Detecção de *Perkinsus* spp., por meio da PCR convencional com base no gene ITS rRNA

Para a realização dos ensaios de PCR foi utilizada a metodologia e oligonucleotídeos padronizados por Audemard et al. (2004) utilizando um volume total de 25 µL contendo 12,5µL de PCR Master Mix Promega® (Taq polymeras, dNTPs, MgCl₂ e buffer); 1µL cada primer específico PerkITS-85/PerkITS-750 (a 2,5 pmol); 8,5µL de água livre de DNase e RNase (Promega®) e 2µL do DNA extraído (a 250 ng). Os ensaios de PCR foram realizados em um termociclador sob os seguintes parâmetros de reação DNA molde com desnaturação inicial a 95°C para 4 minutos seguidos de 40 ciclos de 95°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto, com alongamento final a 72°C por 10 minutos. (TABELA 2).

TABELA 2 Descrição das sequências de oligonucleotídeos utilizadas nos ensaios de PCR convencional para *Bonamia* spp. e *Perkinsus* spp.

Gene	Agentes/alvo	Sequência de Oligonucleotídeos (5'-3')	Referências
(18SrDNA): 140pb	--	18SEUDIR TCTGCCCTATCAACTTTCGATGG 18SEUINV TAATTTGCGCGCCTGCTG BOSTRE-F TTACGTCCCTGCCCTTTGTA (AF262995)	Farjado et al. (2008)
(18SrDNA): 208pb	<i>Bonamia ostreae</i>	BOSTRE-R TCGCGGTTGAATTTTATCGT (AF262995) BEXIT-F (GCGCGTTCTTAGAAGCTTTG (DQ312295)	Ramilo et al. (2008)
(18SrDNA): 246pb	<i>Bonamia exitiosa</i>	BEXIT-R (AAGATTGATGTCGGCATGTCT) (DQ312295)	Ramilo et al. (2008)
(SSUrDNA)760pb	<i>Bonamia</i> spp.	Cf5' CGGGGGCATAATTCAGGAAC3' Cr5' CCATCTGCTGGAGACACAG3	Cochennec et al. (2000)
(ITSrRNA): 703pb	<i>Perkinsus</i> spp,	PerkITS85, 5' CCG-CTT-TGT-TTG- GAT-CCC-3 Perk ITS-750 5'-ACA-TCA-GGC- CTT-CTA-ATG-ATG-3	Audemard et al. (2004)

4.7 Eletroforese em gel de agarose

Os produtos amplificados foram avaliados em gel de agarose a 1,5%, e a programação na cuba de eletroforese de 100V, 100 mA, 100W e 45 minutos de corrida. Para a determinação dos produtos amplificados, utilizou-se um marcador de peso molecular de 100 pb (DNA ladder Promega®). Os resultados foram visibilizados e analisados por meio de um transiluminador de luz ultravioleta acoplado a um programa computacional de análise de dados (Compact Gel Documentation Syst, L-PIX EX, loccus®).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das amostras testadas de sururus, sarnambis e ostras para o gene endógeno que apresentaram positividade comprovando a integridade do material extraído.



FIGURA 2. Fotografia de eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com Sybr Safe. Os amplímeros mostrados na foto são relativos à cPCR para gene 18S rRNA. Canaleta PM: marcador de peso molecular em escala de 100 pares de bases; canaleta CP: controle positivo. Canaleta de 01 a 05 com amostras e canaleta 10 com CN: controle negativo.

Foram analisadas as amostras de DNA dos *pools* de sururus, *pools* sarnambi e *pools* de ostras conforme descrito no item Material e Métodos (Tabela 1) contudo não houve anelamento e amplificação de DNA para detecção de *Bonamia* spp. com base nos genes 18SrDNA e SSUrDNA. Da mesma forma a PCR não detectou amplificação de DNA de *Perkinsus* spp., com base no gene ITS rRNA, entre os animais testados. Este resultado observado na Ilha do Maranhão, embora negativo, não é incomum ao diagnóstico de *Bonamia* spp. em sururus (*Mytella* spp.), sarnambi (*Anomalocardia* spp.) e ostras (*Crassostrea* spp.). Resultados semelhantes em que não foi evidenciada detecção molecular do agente já foram relatados em outras pesquisas realizadas na Paraíba, Santa Catarina e sudeste do Brasil, conforme descrito por Da Silva et al. (2014); Sabry et al. (2011) e Sühnel et al. (2016) respectivamente.

Na América do Sul *Bonamia* spp foi identificada no Chile (LOHRMANN et al., 2009) e Argentina (KROECK et al., 2008). Na Argentina, foram analisadas 1.198 ostras da espécie *O. puelchana*, das quais 252 foram positivas para *Bonamia* spp. (KROECK et al., 2008) por meio de análises histológicas. Em outros países, especialmente no continente europeu, este parasita tem sido responsável por causar elevadas taxas de mortalidade nos cultivos (MONTES, 1991; NARCISI et al., 2010; PICHOT et al., 1980). Na Galícia (Espanha), foi realizado um estudo por Abollo et al. (2008) com 188 ostras de cultivo da espécie *O. edulis*, as quais foram positivas na PCR para *Bonamia* spp., após análises de

sequenciamento, os autores identificaram que 55 (43,3%) foram *B. ostrea*, 51 (40,2%) *B. exitiosa* e 21 (16,5%) apresentaram coinfeção por *B. ostrea* e *B. exitiosa*.

No Brasil, ainda são pontuais os locais de claro diagnóstico de *Bonamia* spp., sendo assim um dos motivos de realização dessa pesquisa, introduzir o diagnóstico de agentes potencialmente presentes nos cultivos domésticos/artesanais do MA. Para o melhor entendimento dos fatores que podem ter influenciado os resultados encontrados na presente pesquisa, é importante destacar que a Ilha do Maranhão apresenta variações de temperatura e salinidade no período chuvoso e no período de estiagem, devido à dinâmica de marés, a pluviosidade, bancos de areia e topografia.

De acordo com Do Nascimento et al. (2020), com base nas variações pluviométricas, a salinidade apresenta mudanças com valores médios que variam de 25,3 e 36,7 para chuva e estiagem, respectivamente. Queiroga et al. (2016), descreve ainda que a salinidade é um importante fator para a proliferação de protozoários do gênero *Bonamia* spp., a salinidade de 20 psu (unidade prática de salinidade, *Practical Salinity Unit*) demonstrou-se adequada para proliferação do patógeno. Salinidades acima de 35psu reduzem a taxa de proliferação, que ocorre de forma mais lenta. Outro fator que deve ser levado em consideração diz respeito ao fluxo de marés oriundos das baías, além da conexão com manguezais e dunas, que fazem com que este estuário esteja sujeito a dissipação de sedimentos, assim como de parasitos.

Kroeck et al. (2008) realizaram o monitoramento com o objetivo de analisar a ocorrência de *Bonamia* spp. em cinco bancos naturais e destacaram que fatores semelhantes aos descritos em nosso local de estudo, como o alto fluxo de maré, que baixa duas vezes ao dia, fazem com que a carga parasitária se disperse, reduzindo assim a infecção nos moluscos da região.

Com relação a temperatura do mar, Narcisi et al. (2010), em pesquisa de *Bonamia* spp. no Mar Adriático (Itália), observaram que a detecção molecular era baixa devido a temperatura do mar acima de 25 °C. Embora as localizações geográficas e climáticas sejam distintas entre essa região e a do presente estudo, a temperatura média da água do mar na Ilha do Maranhão oscila de 28,2°C a 34°C ao longo do ano, o que poderia ser um dos fatores que contribuiu para a não detecção de *Bonamia* spp nesta pesquisa.

Com relação os hospedeiros suscetíveis ao protozoário *Bonamia* spp. temos as ostras da espécie *Ostrea chilensis* (DINAMANI et al., 1987), *O. angasi* (CORBEIL et al., 2006) *O. edulis* (ABOLLO et al., 2008; NARCISI et al., 2010) e *O. stentina* (HILL et al., 2010), porém no local de estudo as ostras presentes são da espécie *C. rhizophorae* outro fator que pode ter corroborado para a não detecção do agente.

No presente trabalho, não foi possível detectar o DNA de *Perkinsus* spp. em nenhuma das espécies de moluscos bivalves testados. Contudo diferentemente de *Bonamia* spp, o agente *Perkinsus* spp já foi relatado em outras pesquisas realizadas em diferentes estados do Nordeste brasileiro. No Ceará, por exemplo, foi possível identificar pela técnica RFTM, o crescimento do parasito em meio de cultura infectando tecido da brânquia e reto com moderada prevalência de 36% em sururus da espécie *M. falcata* (PRAXEDES, 2010). Nesse mesmo Estado, Sabry et al. (2009), analisaram 450 ostras *C. rhizophorae*, das quais 21 (4,6%) foram positivas para *Perkinsus* spp. por meio da técnica de PCR.

No estado da Paraíba, 140 ostras de cultivo da espécie *C. gasar* foram analisadas e apresentaram modificações histopatológicas sugestivas para a presença do parasita *Perkinsus* spp. Tais análises foram realizadas por meio da técnica de PCR e sequenciamento e detectaram a presença da espécie *P. beihaiensis* em oito ostras, *P. olsenii* em uma ostra e *P. marinus* em seis ostras conforme Queiroga et al., (2013) e Queiroga et al. (2015). No estado da Bahia, foi realizado um estudo em ostras da espécie *C. rhizophorae* oriundas de estoque natural e de cultivo do tipo sistema espinhel, por meio de técnicas laboratoriais e sequenciamento, culminando com a identificação de *P. beihaiensis*, sendo o primeiro relato desta espécie realizado por Luz&Boehs (2016) no estado da Bahia e o segundo no Brasil e na América do Sul.

Um estudo realizado por Dantas Neto et al. (2015) no estuário do Nordeste setentrional, que inclui o estuário do Rio Jaguaribe, localizado no litoral leste do estado do Ceará, o estuário do Rio Camurupim, situado ao norte do estado do Piauí e no estuário do Rio Carnaubeiras, localizado na porção extremo-leste do estado do Maranhão, demonstrou cerca de 50 amostras de ostras da espécie *C. rhizophorae* houve o crescimento do parasito *Perkinsus* spp. por meio da técnica RFTM. Ao utilizar a técnica de PCR, foi confirmada a ocorrência de *Perkinsus* spp. em uma ostra no Maranhão, duas no Piauí e em três no Ceará e foi até o presente momento o único relato de ocorrência de *Perkinsus* spp. no estado do Maranhão. Embora os animais tenham sido amostrados de uma área distinta do presente estudo, é um resultado muito próximo do que encontramos nessa pesquisa.

Um estudo comparativo entre o período de menor e maior índice de chuvas, realizado no estado de Sergipe, demonstrou que, no período seco as taxas de positividade de *Perkinsus* foram maiores que no período chuvoso com queda de 80% para 9%, respectivamente (DA SILVA, 2014). A exemplo de outros estudos já citados anteriormente, fatores como temperatura, salinidade e índices pluviométricos podem influenciar a proliferação e sobrevivência dos patógenos *Bonamia* spp. e *Perkinsus* spp.. Nesse sentido, considerando

que as coletas deste trabalho foram realizadas no período chuvoso, sugere-se que um ou mais fatores ambientais ocorridos na área amostrada podem ter atuado nos resultados desta pesquisa durante o seu desenvolvimento.

Bonamia spp. e *Perkinsus* spp. estão incluídos na lista de doenças de notificação obrigatória da OIE (2012) e, embora não sejam zoonoses, estas doenças causam alterações importantes nos moluscos bivalves, como a redução no crescimento, emagrecimento, válvulas abertas, ruptura no tecido conjuntivo das brânquias e do manto, cistos macroscópicos nas brânquias, presença de abscessos e pústulas, desenvolvimento reduzido das gônadas, comprometimento do sistema imunológico e destruição do epitélio digestivo, acarretando prejuízos econômicos em áreas endêmicas. Apesar de estarem distribuídos em diversas partes do mundo, incluindo o Brasil (gênero *Perkinsus*), a identificação destes agentes etiológicos em moluscos bivalves é de suma importância para o conhecimento de sua ocorrência e implementação de medidas gerais de biossegurança.

Deve-se ressaltar, ainda, que há uma cadeia produtiva caracterizada pela prática artesanal, na qual as atividades de extração desses organismos representam um complemento na renda de muitas famílias e apresenta relevância tanto do ponto de vista comercial quanto da segurança alimentar. Dessa forma, ainda que existam poucos relatos sobre a ocorrência desses agentes em águas maranhenses, tendo em vista a importância já citada, os trabalhos que visam realizar o diagnóstico desses patógenos são válidos e devem ocorrer com periodicidade para que seja feito o monitoramento desses cultivos tão importantes para o Estado.

6. CONCLUSÃO

Não foi detectado DNA de protozoários *Bonamia* spp. e *Perkinsus* spp. no período chuvoso em populações naturais de *Mytella* spp., *Anomalocardia* spp. e *Crassostrea* spp., nos estuários que integram a Ilha do Maranhão.

7. CONSIDERAÇÕES FUTURAS

Embora a frequência de casos positivos tenha sido ausente e nenhuma mortalidade relacionada a estes parasitas tenha sido relatada na região, a vigilância e monitoramento das populações de moluscos bivalves é necessária para a garantia da sanidade animal e da fonte de alimentação para muitas famílias maranhenses.

Os resultados obtidos nesta pesquisa são importantes para auxiliar no direcionamento de medidas sanitárias, alertar as autoridades sanitárias, orientar a sociedade e, futuramente, contribuir para estruturação de uma cadeia produtiva de moluscos bivalves tecnificada,

visando à prevenção e a indispensabilidade do conhecimento da presença e monitoramento desses patógenos que podem afetar de forma negativa a produção desses mariscos e impactos econômicos.

Contudo a ausência destes agentes infecciosos contribui para estimular a estruturação de uma cadeia produtiva de moluscos bivalves tecnificada já que tem-se fatores ambientais favoráveis. A metodologia aplicada neste trabalho para o diagnóstico dos protozoários *Bonamia* spp., e *Perkinsus* spp., é eficaz e pode ser adotada para o monitoramento sanitário pelo serviço oficial.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOLLO, E.; RAMILO, A.; CASAS, S. M.; COMESAÑA, P.; CAO, A.; CARBALLAL, M.; VILLALBA, A. First detection of the protozoan parasite *Bonamia exitiosa* (Haplosporidia) infecting flat oyster *Ostrea edulis* grown in European waters. **Aquaculture**, v. 274, n. 2-4, p. 201–207, 2008. Disponível em: < <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.11.037>>.

AKABOSHI, S.; PERREIRA O. M. Ostricultura na região lagunar-estuarina de Cananéia, São Paulo, Brasil. I. Captação de larvas de ostras, *Crassostrea brasiliiana* (Lamarck, 1819), em ambiente natural. **B. Inst. de Pesca.** (único), p. 87-104, 1981.

AMARAL, A.C.Z. & JABLONSKI, S. Conservação da biodiversidade marinha e costeira no Brasil. **Megadiversidade**. V.1, p.43–51, 2005.

ANGELL, C. L. The biology and culture of Tropical oysters. **WorldFish**, v.13, 1986.

ARZUL, I.; CHOLLET, B.; MICHEL, J.; ROB, M.; GARCIA, C.; JOLY, J. P.; MIOSSEC, L. One *Perkinsus* species may hide another: characterization of *Perkinsus* species present in clam production areas of France. **Parasitology**, v. 139, n. 13, p. 1757-1771, 2012. Disponível em: < <https://doi.org/10.1017/S0031182012001047>>.

ARZUL, I.; CARNEGIE, R. B. New perspective on the haplosporidian parasites of molluscs. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 131, p. 32–42, 2015. Disponível em : < <https://doi.org/10.1016/j.jip.2015.07.014>>.

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, n. 11, p. 6611-6618, 2004. Disponível em: < <https://doi.org/10.1128/AEM.70.11.6611-6618.2004>>.

AZEVEDO, C. Fine Structure of *Perkinsus atlanticus* n. sp. (Apicomplexa, Perkinsea) Parasite of the Clam *Ruditapes decussatus* from Portugal. **The Journal of Parasitology**, v. 75, n. 4, p. 627, 1989. Disponível em: < <https://doi.org/10.2307/3282915>>.

BALSEIRO, P. CONCHAS, R. F.; MONTES, J.; LEÓN, J. G.; NOVOA B.; FIGUERAS, A. Comparison of diagnosis techniques for the protozoan parasite *Bonamia ostreae* in flat

oyster *Ostrea edulis*. **Aquaculture**, v. 261, n. 4, p. 1135-1143, 2006. Disponível em : < <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.05.014>>.

BARROS, L.M.O.; THEOPHILO, G.N.D.; COSTA, R.G.; RODRIGUES, D.P.; VIEIRA, R.H.S.F. Contaminante fecal da ostra *Crassostrea rhizophorae* comercializada na Praia do Futuro, Fortaleza-Ceará. **Revista Ciências Agronômica, Fortaleza**, v.36, n.3, p.285289, 2005.

BMLP. Manuais de maricultura: cultivo de mexilhões. **Série Maricultura**, v.3, 2003.

BOEHS, G. Ecologia populacional, reprodução e contribuição em biomassa de *Anomalocardia brasiliiana* (Gmelin, 1791) (Bivalvia: Veneridae) na Baía de Paranaguá, Paraná, Brasil. Tese (Doutorado em Zoologia). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2000.

BOEHS, G.; MAGALHÃES, A.R.M. Simbiontes associados com *Anomalocardia brasiliiana* (Gmelin) (Mollusca, Bivalvia, Veneridae) na Ilha de Santa Catarina e região continental adjacente, Santa Catarina, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 21, p. 865-869, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0101-81752004000400021>>.

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

BOFFI, A. V. **Moluscos Brasileiros de Interesse Médico e Econômico**. Fundação de Amparo do Estado do São Paulo Pesquisa. 1979.

BOWER, SUSAN M.; MCGLADDERY, SHARON E.; PRICE, IOLA M. Synopsis of infectious diseases and parasites of commercially exploited shellfish. **Annual Review of Fish Diseases**, v. 4, p. 1-199, 1994. Disponível em: < [https://doi.org/10.1016/0959-8030\(94\)90028-0](https://doi.org/10.1016/0959-8030(94)90028-0)>.

BRANDÃO, R. P.; BOEHS, G.; SABRY, R. C.; CEUTA, L. O.; LUZ, M. S. A.; QUEIROGA, F. R.; SILVA, P. M. *Perkinsus* sp. infecting oyster *Crassostrea rhizophorae* (Guilding, 1828) on the coast of Bahia, Brazil. **Journal of invertebrate pathology**, v. 112(2), p. 138-141, 2013. Disponível em: < <https://doi.org/10.1016/j.jip.2012.11.003>>.

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 Mexico. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 99, n. 1, p. 66-73, 2008. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jip.2008.03.005>>.

CARNEGIE, R. B.; COCHENNEC-LAUREAU, N. Microcell parasites of oysters: recent insights and future trends. **Aquatic Living Resources**, v. 17, n. 4, p. 519-528, 2004. Disponível em: < <https://doi.org/10.1051/alr:2004055>>.

CARNEGIE, R. B.; STOKES, N. A.; AUDEMARD, C.; BISHOP, M. J.; WILBUR, A. E.; ALPHIN, T. D.; BURRESON, E. M. STRONG seasonality of *Bonamia* sp. infection and induced *Crassostrea ariakensis* mortality in Bogue and Masonboro Sounds, North Carolina,

USA. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 98, n. 3, p. 335-343, 2008. Disponível em: < <https://doi.org/10.1016/j.jip.2008.03.009>>.

CASAS, S.; VILLALBA, A.; REECE, K. Study of perkinsosis in the carpet shell clam *Tapes decussatus* in Galicia (NW Spain). I. Identification of the aetiological agent and in vitro modulation of zoosporulation by temperature and salinity. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 50, p. 51–65, 2002. Disponível em: < ISSN: 1616-1580>.

CASAS, SANDRA M.; VILLALBA, A. Study of perkinsosis in the grooved carpet shell clam *Ruditapes decussatus* in Galicia (NW Spain). III. The effects of *Perkinsus olseni* infection on clam reproduction. **Aquaculture**, v. 356, p. 40-47, 2012. Disponível em: < <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.05.038>>.

CASTILLO, J. A. Enfermedades de Declaración Obligatoria em Moluscos. Perkinsosis (*Perkinsus marinus* y *Perkinsus olseni*) **AquaTIC**, n. 4. 1998.

CASTRO, A. C. L. Manual de Cultivo de Ostra. São Luís: Departamento de Oceanografia e Limnologia. **Fundação de Amparo à Pesquisa de Estado do Maranhão - FAPEMA**, 2014.

CEBU, E. H. Módulo de Bandejas de Bambu Mexilhão. **Journal of Academic Research**, v. 1, n. 4, p. 22-39, 2016.

CHOI, K. S.; PARK, K. I. Review on the protozoan parasite *Perkinsus olseni* (Lester and Davis 1981) infection in Asian waters. **Coastal environmental and ecosystem issues of the East China Sea**, p. 269-281, 2010.

CHRISTO, S. W.; ABSHER, T. M. Ciclo reprodutivo de *Mytella guyanensis* e *Mytella charruana* (Bivalvia: Mitilidae), na Baía de Paranaguá, Paraná. In: Congresso Latinoamericano sobre Ciencias Del Mar, 4, Septiembre, Colombia. **Resumo ampliado**. Colombia: San Andrés Isla, p. 29, 2001.

CHRISTO, S. W.; FERREIRA, A. L.; ABSHER, T. M. Aspecto reprodutivo de mexilhões (Bivalvia, Mollusca) no Complexo Estuarino de Paranaguá, Paraná, Brasil. **Boletim do Instituto da Pesca**. São Paulo, v. 42, n. 4, p. 924-936, 2016.

COCHENNEC, N.; ROUX, L. F.; BERTHE, F.; GERARD, A. Detection of *Bonamia ostreae* based on small subunit ribosomal probe. **Journal of Invertebrate pathology**, v. 76, n. 1, p. 26-32, 2000. Disponível em: < <https://doi.org/10.1006/jipa.2000.4939>>.

COIMBRA, A. G. Distribuição de metais pesados em moluscos e sedimentos nos manguezais de Coroa Grande e da Enseada das Graças, Baía de Sepetiba, RJ. 72 f. Dissertação (Mestrado em Geoquímica Ambiental) – Pós-graduação em Geociências, Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2003.

CORBEIL S., ARZUL I., ROBERT M., BERTHE F.C.J., BESNARD-COCHENNEC N. & CRANE M.S.J. Molecular characterization of an Australian isolate of *Bonamia exitiosa*. **Diseases of Aquatic Organisms**, v.71, n. 1, p. 81–85, 2006. Disponível em: < <https://doi.org/10.3354/dao071081>>.

COVA, A.W.; SERAFIM JÚNIOR, M.; BOEHS, G.; SOUZA, J.M. Parasites in the mangrove oyster *Crassostrea rhizophorae* cultivated in the estuary of the Graciosa River in Taperoá, Bahia. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v. 24, p. 21-27, 2015. Disponível em: < <https://doi.org/10.1590/S1984-29612015012>>.

CRANFIELD, H. J.; DUNN, A.; DOONAN, I. J.; MICHAEL, K. P. *Bonamia exitiosa* epizootic in *Ostrea chilensis* from Foveaux Strait, southern New Zealand between 1986 and 1992. **ICES Journal of Marine Science**. v. 62, p. 3-13, 2005. Disponível em: < <https://doi.org/10.1016/j.icesjms.2004.06.021>>.

CREMONTE, F.; FIGUERAS, A.; BURRESON, E. M. A histopathological survey of some commercially exploited bivalve molluscs in northern Patagonia, Argentina. **Aquaculture**, v. 249, n. 1-4, p. 23-33, 2005. Disponível em: < <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.01.024>>.

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. Disponível em: < <https://doi.org/10.1590/1519-6984.06314>>.

DA SILVA, PM.; VIANNA, RT.; GUERTLER, C.; FERREIRA, LP.; SANTANA, LN.; 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. Disponível em: < <https://doi.org/10.1016/j.jip.2013.02.002>>.

DA SILVA, P. M.; SCARDUA M. P.; VIANNA, R. T.; MENDONÇA, R. C.; VIERA, 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. Disponível em: < <https://doi.org/10.1016/j.jip.2014.04.005>>.

DALTRO, A.C.S. Aspectos socioeconômicos e qualidade dos moluscos bivalves através do monitoramento microbiológico e genético. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Salvador, 2013.

DE OLIVEIRA, I. B.; DA SILVA NETO, S. R.; LIMA FILHO, J. V.; PEIXOTO, S. R.; GÁLVEZ, A. O. Efeito do período chuvoso na extração do molusco bivalve *Anomalocardia brasiliiana* (Gmelin, 1791). **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 9, n. 1, p. 139-145, 2014. Disponível em: < DOI:10.5039/agraria.v9i1a2947>.

DINAMANI P.; HINE P.M.; JONES J.B. Occurrence and characteristics of the haemocyte parasite *Bonamia* sp. in the New Zealand dredge oyster *Tiostrea lutaria* **Diseases of Aquatic Organisms**, v.3, p. 37-44, 1987. Disponível em: < <https://doi.org/10.3354/dao003037>>.

DIGGLES, B. K.; COCHENNEC-LAUREAU, N.; HINE, P. M. Comparison of diagnostic techniques for *Bonamia exitiosus* from flat oysters *Ostrea chilensis* in New

Zealand. **Aquaculture**, v. 220, n. 1-4, p. 145-156, 2003. Disponível em: < [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(02\)00635-X](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(02)00635-X)>.

DO NASICMENTO, J. E. F.; PIRRES, T. M. L.; SILVEIRA, P. C. A.; FARIAS, C. M. N.; ESCHRIQUE, S. A. Variação sazonal de parâmetros físico-químicos na porção estuarina do município de Raposa–MA. **Interfaces Científicas-Saúde e Ambiente**, v. 8, n. 2, p. 257-271, 2020. Disponível em: < <https://doi.org/10.17564/2316-3798.2020v8n2p257-271>>.

DUNGAN, C. F.; CARNEGIE, R. B.; HILL, K. M.; MCCOLLOUGH, C. B.; LARAMORE, S. E.; KELLY, C. J.; SCARPA, J. Diseases of oysters *Crassostrea ariakensis* and *C. virginica* reared in ambient waters from the Choptank River, Maryland and the Indian River Lagoon, Florida. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 101, n. 3, p. 173-183, 2012. Disponível em: < <https://doi.org/10.3354/dao02531>>.

ENGELSMA, M. Y.; CULLOTY, S. C.; LYNCH, S. A.; ARZUL, I.; CARNEGIE, R. B. *Bonamia* parasites: a rapidly changing perspective on a genus of important mollusc pathogens. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 110, n. 1-2, p. 5–23, 2014. Disponível em: < <https://doi.org/10.3354/dao02741>>.

EPAGRI Síntese Informativa da Maricultura 2015. Florianópolis: 2016.

ESMERINI, P. O.; GENNARI, S. M.; PENA, H. F. J. Analysis of marine bivalve shellfish from the fish market in Santos city, São Paulo state, Brazil, for *Toxoplasma gondii*. **Veterinary Parasitology**, v. 170, n. 1-2, p. 8-13, 2010. Disponível em: < <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.01.036>>.

FAJARDO, V.; GONZALEZ, I.; MARTIN, I.; ROJAS, M.; HERNADEZ, E. P.; GARCIA, T.; MARTIN R. Real-time PCR for detection and quantification of red deer (*Cervus elaphus*), fallow deer (*Dama dama*), and roe deer (*Capreolus capreolus*) in meat mixtures. **Meat science**, v. 79, n. 2, p. 289-298, 2008. Disponível em: < <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2007.09.013>>.

FERNANDES, L. M. B.; DE LIMA, A. M. Possibilities for cultivating mangle oysters, *Crassostrea rhizophorae* (Guilding 1828) in Pernambuco Brazil. **Serie Estudos de Pesca-Superintendencia do Desenvolvimento do Nordeste (Brazil)**, 1976.

FERREIRA, J. F.; OLIVEIRA NETO, F. M. de. Cultivo de moluscos em Santa Catarina. Sistemas de cultivos aquícolas na zona costeira do Brasil: recursos, tecnologias, aspectos ambientais e sócioeconômicos. Rio de Janeiro: **Museu Nacional**, p. 87-95. 2007.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS – FAO. *Crassostrea gigas*. 2012.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO). The State of World Fisheries and Aquaculture FAO **Fisheries and Aquaculture** Department, Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2016

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO). FAO. The state of world fisheries and aquaculture 2018: meeting the sustainable development goals. Rome, Italy: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 227f. 2018.

FOOD AND AGRICULTURAL ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. The State of World Fisheries and Aquaculture 2020. Sustainability in action. Rome. Disponível em: The State of World Fisheries and Aquaculture (SOFIA), 2020.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO). The State of World Fisheries and Aquaculture. FAO **Fisheries and Aquaculture** Department, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome. 2020.

FRANÇA, V.; MONTELES, J. S.; FUNO, I. C. S. A.; DE CASTRO, A. C. L. Seleção de áreas potenciais para o cultivo de ostra nativa, *Crassostrea* spp. e Sururu, *Mytella falcata*, em Raposa, Maranhão. **Arquivos de Ciências do Mar**, v. 46, n. 62-75, 2013. Disponível em: < <http://www.repositorio.ufc.br/handle/riufc/8545>>.

FURTADO, J.G.C. Caracterização hidroquímica de uma região estuarina com potencial à maricultura no povoado de Anajatiua/Quebra Pote (Baía do Arraial, São Luís-MA). Monografia de Graduação, Curso de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Maranhão, 60 p., São Luís, 2001.

GAUTHIER, J. D. Development and utilization of an in vitro culture system for the characterization of gene expression in the oyster parasite *Perkinsus marinus*. **University of Maryland, College Park**, 1998.

GMELIN, J. F. Vermes. In: Gmelin J.F. (Ed.) Caroli a Linnaei Systema Naturae per Regna Tria Naturae, 1791.

GUILDING, I. Observations on the zoology of the Caribbean Islands. **The Zoological**. 1828.

GUIMARÃES, I. M.; OLIVERA, A. Influência da salinidade sobre a sobrevivência da ostra-do-mangue, *Crassostrea rhizophorae*. 2008.

HILL, K. M.; CARNEGIE, R. B.; ALOUI-BEJAOU, N.; GHARSALLI, R.; WHITE, D.; STOKES, N.; BURRESON, E. Observation of a *Bonamia* sp. infecting the oyster *Ostrea stentina* in Tunisia, and a consideration of its phylogenetic affinities. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 103, n. 3, p. 179–185, 2010. Disponível em: < <http://www.repositorio.ufc.br/handle/riufc/53771>>.

HILL, K. M.; STOKES, N. A.; WEBB, S. C.; HINE, P. M.; KROECK, M. A.; MOORE, J. D.; CARNEGIE, R. B. Phylogenetics of *Bonamia* parasites based on small subunit and internal transcribed spacer region ribosomal DNA sequence data. **Diseases of aquatic organisms**, v. 110, n. 1-2, p. 33-54, 2014. Disponível em: < <https://doi.org/10.3354/dao02738>>.

HILL-SPANIK, K.; MCDOWELL, J.; STOKES, N.; REECE, K.; BURRESON, E.; CARNEGIE, R. Phylogeographic perspective on the distribution and dispersal of a marine pathogen, the oyster parasite *Bonamia exitiosa*. **Marine Ecology Progress Series**, v. 536, p. 65–76, 2015. Disponível em: < <https://doi.org/10.3354/meps11425>>.

HINE, P. M. The annual pattern of infection by *Bonamia* sp. in New Zealand flat oysters, *Tiostrea chilensis*. **Aquaculture**, v. 93, n. 3, p. 241–251, 1991. Disponível em: < [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(91\)90236-Z](https://doi.org/10.1016/0044-8486(91)90236-Z)>.

HINE, P. M.; WESNEY, B. Interrelationships of cytoplasmic structures in *Bonamia* sp. (Haplosporidia) infecting oysters *Tiostrea chilensis*: an interpretation. **Diseases of aquatic organisms**, v. 14, p. 59-59, 1992.

HINE, P. M. Health status of commercially important molluscs in New Zealand. **Surveillance**, v. 24, n. 1, p. 25–28, 1997.

HINE, P. M.; COCHENNEC-LAUREAU, N.; BERTHE, amp; FCJ. *Bonamia exitiosus* n. sp.(Haplosporidia) infecting flat oysters *Ostrea chilensis* in New Zealand. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 47, n. 1, p. 63-72, 2001. Disponível em: < <https://doi.org/10.3354/dao047063>>.

HIROKI, K. On the resistance of isolated bivalve gill pieces to oxygen deficiency and hydrogen sulphide. **Boletim Fisiologia Animal**, São Paulo, v. 1, p. 9 – 20, 1977.

HUNER JV, BROWN EE Crustacean and mollusk aquaculture in the United States. **AVI Publishing, Westport, CT** (1985).

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Pesquisa pecuária municipal**. Rio de Janeiro: IBGE, 2016.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Pesquisa pecuária municipal**. Rio de Janeiro: IBGE, 2017.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Pesquisa pecuária municipal**. 2019.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Pesquisa pecuária municipal**. Rio de Janeiro: IBGE, 2021.

INFOAGRO/SC. Sistema Integrado de Informações Agropecuárias da Secretaria de Estado da Agricultura e da Pesca de Santa Catarina - InfoAgro/SC, 2022.

IPMA -Instituto Português do Mar e da Atmosfera. Guia de consumo de moluscos bivalves, equinodermes, tunicados e gastrópodes marinhos provenientes de zonas de produção de Portugal Continental. 2020.

KISSNER, E. M. O.; DOLDAN, M. S.; ZAIMAN, P.C.; MORSAN, E.M.; KROECK, M.A. Bonamiosis status in natural *Ostrea puelchana* beds in San Matías Gulf (Patagonia, Argentina), 14 years after an epizootic. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 110, n. 1-2, p. 135-142, 2014. Disponível em: < <https://doi.org/10.3354/dao02707>>.

KROECK, M. A.; MONTES, J. Occurrence of the haemocyte parasite *Bonamia* sp. in flat oysters *Ostrea puelchana* farmed in San Antonio Bay (Argentina). **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 63, n. 2-3, p. 231-235, 2005. Disponível em:< <https://doi.org/10.3354/dao063231>>.

KROECK, M. A.; SEMENAS, L.; MORSAN, E. M. Epidemiological study of *Bonamia* sp. in the native flat oyster, *Ostrea puelchana* from San Matías Gulf (NW Patagonia, Argentina). **Aquaculture**, v. 276, n. 1-4, p. 5-13, 2008. Disponível em : < <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.02.013>>.

LAMARCK J.B. M. Histoire naturelle des animaux sans vertèbres. 1819.

LANE, H. S.; WEBB, S. C.; DUNCAN, J. *Bonamia ostreae* in the New Zealand oyster *Ostrea chilensis*: a new host and geographic record for this haplosporidian parasite. **Diseases of aquatic organisms**, v. 118, n. 1, p. 55-63, 2016. Disponível em: < <https://doi.org/10.3354/dao02960>>.

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

LIGHTFOOT, J. A Catalogue of the Portland Museum, lately the property of the Dutchess Dowager of Portland, deceased; which will be sold by auction by Mr. 1786.

LIMA, T. Desenvolvimento da atividade de Ostreicultura no povoado de Areinhas, município de Primeira Cruz – MA. 51p. Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Engenharia da Pesca, Universidade Estadual do Maranhão, São Luís. 2017.

LINNAEUS, C. *Systema Naturae per regna tria naturae, secundum classes, ordines, genera, species, cum characteribus, differentiis, synonymis, locis. Editio decima, reformata [10th revised edition], vol. 1*, p. 824, 1758.

LOPES, R. G. S.; GOMES, A. I.; TCHAIKA, L.; BARROS, M. C.; FRAGA, E. Molecular identification of native oysters on the coast of Maranhão, Brazil. **Boletim Instituto Pesca**, p. e377-e377, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.20950/1678-2305.2018.44.4.377>>.

LOHRMANN, K. B.; HINE, P. M.; CAMPALANS, M. Ultrastructure of *Bonamia* sp. in *Ostrea chilensis* in Chile. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 85, n. 3, p. 199-208, 2009.

LUZ, M.S.A; BOEHS, G. *Perkinsus beihaiensis* infectando a ostra *Crassostrea rhizophorae* em cultivo e em estoque natural na Baía de Camamu, Bahia, Brasil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 53, n. 2, p. 191-198, 2016. Disponível em: < <https://doi.org/10.11606/issn.1678-4456.v53i2p191-198>>.

LUZ CUNHA, A. C.; PONTINHA, V. D. A.; DE CASTRO, M. A. M.; SÜHNEL, S.; MEDEIROS, S. C.; MOURA DA LUZ, Â. M.; P. MOURIÑO, J. L. Two epizootic *Perkinsus spp.* events in commercial oyster farms at Santa Catarina, Brazil. **Journal of fish diseases**, v. 42, n. 3, p. 455-463, 2019. Disponível em: < <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, n. 2883, p. 328–329, 1950.

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

MARTY G., BOWER S., CLARKE K., MEYER G., LOWE G., OSBORN A., CHOW E., HANNAH H., BYRNE S., SOJONKY K. & ROBINSON J. Histopathology and a real-time PCR assay for detection of *Bonamia ostreae* in *Ostrea edulis* cultured in western Canada. **Aquaculture**, v. 261, p. 33–42, 2006. Disponível em: < <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.07.024>>.

MERBOLD, A., CRUZ, C., FERNANDES, K. Classe Bivalvia. Slideshare. 2007.

MONTES, J. Lag time for the infestation of flat oyster (*Ostrea edulis* L.) by *Bonamia ostreae* in estuaries of Galicia (NW Spain). **Aquaculture**, v. 93, n. 3, p. 235-239, 1991.

MONTI, D.; FRENKIEL, L.; MOUËZA, M. Demography and growth of *Anomalocardia brasiliiana* (Gmelin, 1791) (Bivalvia, Veneridae) in a mangrove, in Guadeloupe (French West Indies). **Journal of Molluscan Studies**, v. 57, p. 249-257, 1991. Disponível em: < <https://doi.org/10.1093/mollus/57.2.249>>.

MOORE, J. D. 5.2. 7 Bonamiasis of Oysters. 2006.

MOSS J.A., BURRESON E.M. & REECE K.S. Advanced *Perkinsus marinus* infections in *Crassostrea ariakensis* maintained under laboratory conditions. **J. Shellfish Res.**, v. 25, p. 65–72, 2006.

MOUËZA, M.; GROS, O.; FRENKIEL, L. Embryonic, larval and postlarval development of the tropical clam, *Anomalocardia brasiliiana* (Bivalvia, Veneridae). **Journal of Molluscan Studies**, v. 65, p. 73-88, 1999. Disponível em: < <https://doi.org/10.1093/mollus/65.1.73>>.

NARCHI, W. Aspectos ecológicos e adaptativos de alguns bivalves do litoral paulista. **Papéis Avulsos de Zoologia**, São Paulo, v. 27, p. 235-262, 1974.

NARCISI, V.; ARZUL, I.; CARGINI, D.; MOSCA, F.; CALZETTA, A.; TRAVERSA, D.; TISCAR, P. G. Detection of *Bonamia ostreae* and *B. exitiosa* (Haplosporidia) in *Ostrea edulis* from the Adriatic Sea (Italy). **Diseases of aquatic organisms**, v. 89, n. 1, p. 79-85, 2010. Disponível em: < <https://doi.org/10.3354/dao02167>>.

NASCIMENTO, I.A. Cultivo de ostras no Brasil: problemas e perspectivas. *Ciência e Cultura*, São Paulo, v. 35, p. 871-876, 1983.

NEHRING, S.N. Invasive Alien Species Fact Sheet *Crassostrea gigas*. Koblenz, Germany, 2006.

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

NUGEO, Núcleo Geoambiental da Universidade Estadual do Maranhão, Laboratório de Meteorologia.

OIE, Código Sanitário para los Animales Acuáticos 2012.

OIE, Manual de las pruebas diagnóstico para los animales acuáticos. *Perkinsus olseni*. 2016.

ONODERA, F. K. Mortalidade dos bivalves estuarinos, *Mytella falcata* e *Mytella guyanensis*, expostos a deferentes salinidades e temperaturas. 55 f. Dissertação (Mestrado em Aquicultura e Pesca) – Instituto Pesca – APTA-SAA, São Paulo, 2012.

ORBIGNY, A. D. D'. Voyage dans l'Amérique méridionale (le Brésil, la république orientale de l'Uruguay, la République argentine, la Patagonie, la république du Chili, la république de Bolivie, la république du Pérou. 1846.

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, n. 1-2, p. 9–22, 2001. Disponível em: < [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(01\)00619-6](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00619-6)>.

PENNA, M. S.; KHAN, M.; FRENCH, R. A. Development of a multiplex PCR for the detection of *Haplosporidium nelsoni*, *Haplosporidium costale* and *Perkinsus marinus* in the eastern oyster (*Crassostrea virginica*, Gmelin, 1971). **Molecular and Cellular Probes**, v. 15, n. 6, p. 385-390, 2001. Disponível em: < <https://doi.org/10.1006/mcpr.2001.0386>>.

PEREIRA, N.C. Diagnóstico ambiental da Lagoa da Conceição utilizando o berbigão *Anomalocardia brasiliensis* (Gmelin, 1791) como bioindicador de poluição aquática. 2003.

PEREIRA, O. M., GALVÃO, M. S. N.; PIMENTEL, C. M.; HENRIQUES, M. B., MACHADO, I. C. Distribuição dos bancos naturais e estimativa de estoque do gênero *Mytella* no estuário de Cananéia, SP, Brasil. **Brazilian Journal of Aquatic Science and Technology**, v. 11, n. 1, p. 21 - 29, 2007. Disponível em: < <https://doi.org/10.14210/bjast.v11n1.p21-29>>.

PEREIRA, T.J.F. et al. Extrativismo de mariscos na ilha do Maranhão (MA): implicações ecológicas e socioeconômicas. **Revista de Políticas Públicas**, v. 21, n. 2, p. 831-853, 2017.

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

PICHOT Y., COMPS M., TIGE G., GRIZEL H. & RABOUIN M.A. Recherches sur *Bonamia ostreae* gen. n., sp. n., parasite nouveau de l'huitre plate *Ostrea edulis* L. **Rev. Trav. Inst. Pêches Marit.**, v.43, p.131–140, 1980.

PINTO, T. R.; BOEHS, G. Nematopsis sp.(Apicomplexa: Eugregarinida) em *Mytella guyanensis* (Lamarck, 1819)(Bivalvia: Mytilidae) da Região Estuarina do Rio Cachoeira, Ilhéus, Bahia, Brasil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 45, n. 2, p. 95-100, 2008. Disponível em: < <https://doi.org/10.11606/issn.1678-4456.bjvras.2008.26705>>.

PINTO, S. L. Os moluscos *Anomalocardia brasiliensis* (Gmelin, 1791) e *Tagelus plebeius* (Lightfoot, 1786) como bioindicadores de poluição orgânica no estuário da baía do Pina, Recife-PE, Brasil. 2012.

POWER, A.; MCCRICKARD, B.; MITCHELL, M.; COVINGTON, E.; SWEENEY-REEVES, M.; PAYNE, K.; WALKER, R. *Perkinsus marinus* in coastal Georgia, USA, following a prolonged drought. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 73, n. 2, p. 151-158, 2006. Disponível em: < <https://doi.org/10.3354/dao073151>>.

PRAXEDES, G.F. Patógenos no sururu *Mytella falcata* (Orbigny, 1846) do estuário do rio Jaguaribe-CE, com especial enfoque para o protozoário de declaração obrigatória Perkinsus. 2010. Disponível em: < <http://www.repositorio.ufc.br/handle/riufc/47080>>.

QUEIROGA, F. R.; MARQUES-SANTOS, L. F.; DE MEDEIROS, I. A.; & DA SILVA, P. M Immunological responses of the mangrove oysters *Crassostrea gasar* naturally infected by *Perkinsus* sp. in the Mamanguape Estuary, Paraíba state (Northeastern, Brazil). **Fish & shellfish immunology**, v. 35, n. 2, p. 319-327, 2013. Disponível em: < <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.04.034>>.

QUEIROGA, F.R.; SANTOS, L. F. M.; HEGARET, H.; SOUDANT P.; FARIAS,N. D.; SCHLINDWEIN, A. D.; SILVA, P. M. Parasites infecting the cultured oyster *Crassostrea gasar* (Adanson, 1757) in Northeast Brazil. **Parasitology**, v. 142, n. 6, p. 756-766, 2015.

QUEIROGA, F. R.; MARQUES-SANTOS, L. F.; DE MEDEIROS, I. A.; & DA SILVA, P. M. Effects of salinity and temperature on in vitro cell cycle and proliferation of *Perkinsus marinus* from Brazil. **Parasitology**, v. 143, n. 4, p. 475-487, 2016. Disponível em: < <https://doi.org/10.1017/S0031182015001602>>.

RAMILO, A.; NAVAS, I.; VILLALBA, A.; ABOLLO, E. Species-specific diagnostic assays for *Bonamia ostreae* and *B. exitiosa* in European flat oyster *Ostrea edulis*: conventional, real-time and multiplex PCR. **Diseases of aquatic organisms**, v. 104, n. 2, p. 149-161, 2013. Disponível em: < <https://doi.org/10.3354/dao02597>>.

RAFINESQUE. Veneroidea Accessed through: World Register of Marine Species at: <https://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=14638> on 2023-04-28. 1815.

RAMILO, A.; GONZALEZ, M.; CARBALLAL, M. J.; DARRIBA, S.; ABOLLO, E.; VILLALBA, A. Oyster parasites *Bonamia ostreae* and *B. exitiosa* co-occur in Galicia (NW Spain): spatial distribution and infection dynamics. **Diseases of aquatic organisms**, v. 110, n. 1-2, p. 123-133, 2014. Disponível em: < <https://doi.org/10.3354/dao02673>>.

RAY, S.M. Biological Studies of Dermocystidium marinum, A Fungus Parasite of Oysters. Rice Institute Pamphlet (Monogr Biol Spec Ser Iss), Rice Institute, Washington, DC. 1954.

REECE, K. S.; SIDDALL, M. E.; BURRESON E. M.; GRAVES, J. E. Phylogenetic analysis of *Perkinsus* based on actin gene sequences. **The Journal of parasitology**, v. 83, n. 3, p. 417-423, 1997. Disponível em: < <https://doi.org/10.2307/3284403>>.

RIOS, E. C. Seashells of Brazil. Rio Grande, Porto Alegre, p. 492 1994

RIOS, E. C. Compedium of Brazilian Sea Shells. Rio Grande, Porto Alegre, p. 668 2009.

ROBERTSON, L. J. The potential for marine bivalve shellfish to act as transmission vehicles for outbreaks of protozoan infections in humans: A review. **International Journal of Food**

Microbiology, v.120, p.201-216, 2007. Disponível em: < <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.07.058>>.

RODRIGUES, C. A. L.; RIBEIRO, R. P.; SANTOS, N. B.; ALMEIDA, Z. S. Patterns of mollusc distribution in mangroves from the São Marcos Bay, coast of Maranhão State, Brazil. **Acta Amazonica, Manaus**, v. 46, n. 4, p. 391-400, out./dez. 2016. Disponível em: < <https://doi.org/10.1590/1809-4392201600493>>.

RONDINELLI, S. F. A exploração da lambreta, *Lucina pectinata* (Bivalvia, Mollusca), nos manguezais de Garapuá–Baixo Sul da Bahia, Brasil. 2009. Disponível em: < <https://repositorio.ufba.br/handle/ri/12657>>.

RUPPERT, E. & BARNES, R.D. Zoologia dos Invertebrados. **6ª ed., Roca Ed., São Paulo**. 1996.

SABRY, R. C.; ROSA, R. D.; MAGALHÃES, A. R. M.; BARRACCO, M. A.; GESTEIRA, T. C. V.; SILVA, P. M. First report of *Perkinsus* sp. infecting mangrove oysters *Crassostrea rhizophorae* from the Brazilian coast. **Diseases of aquatic organisms**, v. 88, n. 1, p. 13-23, 2009. Disponível em: < <https://doi.org/10.3354/dao02136>>.

SABRY, R. C.; SILVA, P. M.; GESTEIRA, T. C. V.; PONTINHA, V. A.; MAGALHÃES, A. R. M. Pathological study of oysters *Crassostrea gigas* from culture and *C. rhizophorae* from natural stock of Santa Catarina Island, SC, Brazil. **Aquaculture**, v. 320, n. 1-2, p. 43-50, 2011. Disponível em: < <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.08.006>>.

SACCO F. I Molluschi dei terreni terziarii del Piemonte e della Liguria, Parte 23 (Ostreidae, Anomiidae, Dimyidae). Bollettino dei Musei di Zoologia ed Anatomia Comparata della R. Università di Torino. 1897. Disponível em: < <https://biodiversitylibrary.org/page/11810051>>.

SAGRISTÀ, E.; DURFORT, M.; AZEVEDO, C. *Perkinsus* sp. (Phylum Apicomplexa) in Mediterranean clam *Ruditapes semidecussatus*: ultrastructural observations of the cellular response of the host. **Aquaculture**, v. 132, n. 1-2, p. 153-160, 1995. Disponível em: < [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(94\)00391-Z](https://doi.org/10.1016/0044-8486(94)00391-Z)>.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the national academy of sciences**, v. 74, n. 12, p. 5463-5467, 1977. Disponível em: < <https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463>>.

SCHAEFFER-NOVELLI, Y. Alguns aspectos ecológicos e análise populacional de *Anomalocardia brasiliiana* (Gmelin, 1791) (Mollusca: Bivalvia), na praia do Saco da Ribeira, Ubatuba, Estado de São Paulo. 110 f. Tese (Doutorado em Zoologia), Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1976.

SCHAEFFER-NOVELLI, Y. Análise populacional de *Anomalocardia brasiliiana* (Gmelin, 1791), na Praia do Saco da Ribeira, Ubatuba, Estado de São Paulo. **Boletim do Instituto Oceanográfico**, São Paulo, v. 29, n. 2, p. 351–355, 1980.

SCHUMACHER, C. F. Essai d'un nouveau système des habitations des vers testacés. 1817. Disponível em: < <http://www.biodiversitylibrary.org/item/81329>>.

SHEPPARD, B. J.; PHILLIPS, A. C. *Perkinsus olseni* detected in Vietnamese aquacultured reef clams *Tridacna crocea* imported to the USA, following a mortality event. **Diseases of aquatic organisms**, v. 79, n. 3, p. 229-235, 2008. Disponível em: < <https://doi.org/10.3354/dao01888>>.

SIDDALL, M.E.; REECE, K.S.; NERAD, T.A.; BURRESON, E.M. Molecular determination of the phylogenetic position of a species in the genus *Colpodella* (Alveolata). **American Museum Novitates**, v. 3314, p. 1-10, 2001. Disponível em: < [https://doi.org/10.1206/0003-0082\(2001\)314%3C0001:MDOTPP%3E2.0.CO;2](https://doi.org/10.1206/0003-0082(2001)314%3C0001:MDOTPP%3E2.0.CO;2)>.

SILVA, H. A., BATISTA, I. Produção, salubridade e comercialização dos moluscos bivalves em Portugal. IPIMAR, v. 20, 171 p., 2008. Disponível em: < <http://hdl.handle.net/10400.26/33917>>.

SILVA, P. B. Os significados sócio-culturais do corpo obeso em marisqueiras. Salvador: UFBA, 2011.

SILVA, P. M. D.; COSTA, C. P.; ARAÚJO, J. P. B. D.; 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. Disponível em: < <https://doi.org/10.1590/S1984-29612016011>>.

SOOT-RYEN T. A report on the family Mytilidae. Allan Hancock Pacific Expeditions. 1955. Disponível em: < <https://www.biodiversitylibrary.org/page/27912345>>.

SOUSA, A. K. R. Biologia de ostras nativas *Crassostrea rhizophorae* na ilha do maranhão-Ma. Monografia (graduação), 2015.

SÜHNEL, S.; STEWART C. J.; GURNEY-SMITH, H. J.; IVACHUK, C. 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, n. 1, p. 143-156, 2016. Disponível em: < <https://doi.org/10.2983/035.035.0116>>.

THUNBERG, C.P. Tekning och Beskrifning på en stor Ostronsort ifrån Japan. **Kongliga Vetenskaps Academiens Nya Handlingar**. 1793.

VALENTI, W; BARROS, H; MORAES-VALENTI, P; BUENO, G; CAVALLI, R. Aquaculture in Brazil: past, present and future. **Aquaculture Reports**, v. 30, n. 182, p. 100611, 2021.

VILLALBA, A.; REECE, K. S.; CAMINO ORDÁS, M.; CASAS, S. M.; FIGUERAS, A. Perkinsiosis in molluscs: A review. **Aquatic Living Resources**, v. 17, n. 4, p. 411–432, 2004. Disponível em: < <https://doi.org/10.1051/alr:2004050>>.

VILLALBA, A.; GESTAL, C.; CASAS, S. M.; FIGUERAS, H. A. Perkinsosis en moluscos. Enfermedades de Moluscos Bivalvos de Interés em Acuicultura. **Fundación Observatorio Español de Acuicultura, Madrid**. p. 181– 242. 2011. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/10261/303598>>.

YUAN, W.; WALTERS, L. J.; SCHNEIDER, K. R.; HOFFMAN, E. Exploring the survival threshold: a study of salinity tolerance of the nonnative mussel *Mytella charruana*. **Journal of Shellfish Research** v29, n. 2, p. 415–422, 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.2983/035.029.0218>>.