



UNIVERSIDADE DO ALGARVE

Unidade de Ciências e Tecnologias dos Recursos Aquáticos

Avaliação das técnicas de diagnóstico de  
*Perkinsus atlanticus* (Apicomplexa, Perkinsea)  
e estudo da reacção da ameijoia-boa  
*Ruditapes decussatus* exposta artificialmente a diferentes  
concentrações deste agente patogénico

Dissertação apresentada para a obtenção do  
grau de mestre em Aquacultura, pela Universidade do Algarve

**MARIA MANUELA MIRANDA CRAVO ROXO ALMEIDA**

Faro, 1998

UNIVERSIDADE DO ALGARVE  
SERVIÇO DE DOCUMENTAÇÃO

2302

125	26412
839-37-C	
ALM - Av4	

1

---

O conteúdo da presente dissertação é de exclusiva  
responsabilidade da autora.

Manuela CR Almeida

(Maria Manuela Miranda Cravo Roxo Almeida)

---

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar o meu reconhecimento a todos os que contribuíram para a realização deste trabalho, tornando-o possível e bastante gratificante.

À Prof<sup>a</sup> Doutora Maria Teresa Dinis, pela coordenação do Mestrado em Aquacultura, pelo incentivo, orientação global e acompanhamento no decorrer das várias etapas deste trabalho.

Ao Dr. Francisco Ruano, pelo estabelecimento de contactos com o IFREMER (França), de modo a permitir a realização de parte significativa deste trabalho, pelo acolhimento no laboratório de Patologia do IPIMAR (Lisboa), durante a preparação da primeira fase experimental, assim como pela disponibilidade e pelo apoio sempre demonstrados.

Ao Dr. Jean Pierre Flassch e ao Dr. André Gérard, pelo acolhimento no Laboratoire de Génétique, Aquaculture et Pathologie do IFREMER (La Tremblade) durante 8 meses.

Ao Dr. Franck Berthe, pela orientação, acompanhamento e discussão de todas as fases deste trabalho, e também pelos seus conselhos e amabilidade, que em muito contribuíram para o bom desenrolar do trabalho.

A todos os elementos do laboratório GAP, em especial, Philippe Haffner, Anne Thébaud, Nathalie Cochennec, Bruno Cholet, Tristan Renault, Cécile Lipart e Qinggang Xue, que, cada um na sua área, me ajudaram para uma progressão mais eficaz deste trabalho.

À Dr<sup>a</sup>. Viviane Boulo, pelo acolhimento no laboratório DRIM (Montpellier) e pelos preciosos ensinamentos sobre cultura celular e Imunologia.

À Dr<sup>a</sup> Louise Goggin, pelo esclarecimento de alguns protocolos de Biologia Molecular e ao Dr. José António Robledo, pela cedência de primers.

À Dr<sup>a</sup> Dominique Fouché, pela cedência de dados da composição de uma amostra de fitoplâncton.

À Dr<sup>a</sup> Marie-Aude Danguy e ao Sr. Gabriel Matias, pela disponibilização de algumas das ameijoas utilizadas durante as experiências.

---

À Florbela Soares, Teresa Baptista e Janina Costa, pelo incentivo, dedicação, ajuda e boa disposição, sempre presente no laboratório de Patologia da Universidade do Algarve.

À Sílvia Socorro, pela amizade, dedicação e paciência na leitura crítica do relatório.

Ao Artur Albuquerque, pelo auxílio prestado na fase experimental decorrida no PRODEP, pelo apoio fotográfico e como “consultor” de informática, assim como pelo interesse e amizade demonstrados.

Ao Fabien Corbier, pela sua presença amigável, apesar de virtual, e pela grande ajuda na correcção da versão em francês deste relatório.

À Marina Baptista pelo carinho e companheirismo, especialmente durante a minha estada em La Tremblade.

Aos outros colegas do Mestrado em Aquacultura: Adelaide, Gonçalo, João, Carolina e Lurdes.

Mais descontraidamente, não poderei esquecer todos aqueles que me acompanharam e encorajaram durante estes dois anos e que permitiram, também, que este trabalho decorresse de uma forma agradável, dos quais guardarei gratas lembranças: Angélique (“Bug”, Rumikub), Arnaud (“Nono”), Bérenice e Patrick (e o gato Aster), Bertrand e Catherine (e Mr. Bean), Christophe (que bolos!), David (Île d’Oléron), Guida (Bowling), Laura (e “filhota”), Michaël (Mike Mobile), Nicolas (Pictionary), Paula (actualização das notícias), Paulo (“espaço de manobra”), Tita (e seus desenhos) e Tony (primo quase sempre virtual).

A meus Pais, pelo carinho, confiança e apoio.

Este trabalho, parte integrante do Mestrado em Aquacultura, da Universidade do Algarve, foi financiado pela bolsa de estudo BM/7075/95 no âmbito do Programa PRAXIS XXI.

---

## RESUMO

O protozoário parasita *Perkinsus atlanticus* (Azevedo, 1989) tem causado mortalidades elevadas em viveiros de ameijoas, *Ruditapes decussatus* (Linnaeus, 1758).

Neste estudo estabeleceram-se dois objectivos distintos: o primeiro consistiu no desenvolvimento de um método de diagnóstico quantitativo, de modo a otimizar a avaliação da intensidade de infecção e detectar infecções ligeiras ou iniciais das ameijoas por *P. atlanticus*. Esta técnica é baseada na cultura de todos os tecidos da ameijoas em meio tioglicolato (FTM), lise dos tecidos com hidróxido de sódio, coloração dos parasitas com solução de Lugol e sua quantificação sobre um filtro de celulose. Este parasita é, por rotina, diagnosticado através de histologia e incubação das brânquias em FTM. Contudo, sabe-se que pode ocorrer em vários tecidos (brânquias, manto, rim, pé, gónadas e tracto digestivo). Os diferentes métodos de diagnóstico disponíveis foram então comparados, quanto à sua sensibilidade e especificidade. Os resultados sugerem que o método de cultura total permite resultados mais fiáveis para a quantificação da intensidade de infecção (número de parasitas por grama de tecido húmido de ameijoas), e pode ser usado como rotina, pois é de fácil exequibilidade, rápido e os custos são reduzidos. Contudo, esta técnica pode ser ainda aperfeiçoada, com a aplicação, conjuntamente, de sondas específicas para detectar as células parasitárias, por exemplo, quando se pretende detectar o parasita na água ou no sedimento.

A doença originada por este agente é infecciosa e pode ser transmitida directamente de ameijoas para ameijoas. Provavelmente, é o estado de zoosporo (célula livre biflagelada) o mais infeccioso e que poderá constituir a principal via de disseminação da doença. Assim, o segundo objectivo deste estudo foi testar a resposta de ameijoas a diferentes doses de zoosporos de *P. atlanticus*. Estas células infecciosas foram obtidas após isolamento, purificação e cultura de trofozoítos extraídos de ameijoas intensamente infectadas. Inocularam-se, por injeção na cavidade intervalvar, ameijoas comprovadamente livres deste parasita. As concentrações utilizadas foram: 0,  $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $2 \times 10^6$  e  $3 \times 10^6$  zoosporos por ameijoas. Estas foram mantidas a  $22 \pm 2^\circ\text{C}$  e  $31 \pm 1\%$  durante 2 meses. A intensidade de infecção foi quantificada pelo método de cultura total em FTM. Observou-se uma relação directa positiva, bastante significativa, entre a prevalência do parasita e a quantidade de células inoculadas ( $r^2=0.95$ ); o mesmo se verificou com a variação da intensidade de infecção registada em função da concentração de zoosporos inoculados ( $r^2=0.99$ ).

---

## ABSTRACT

The protozoan parasite *Perkinsus atlanticus* (Azevedo, 1989) causes severe losses among cultured clams, *Ruditapes decussatus* (Linnaeus, 1758).

This study includes two distinct goals: the first was to develop a quantitative diagnostic procedure to optimise the evaluation of infection intensity and detect low levels or early infection of clams by *P. atlanticus*. This technique is based on the culture of all clam tissues in fluid thioglycollate medium (FTM), sodium hydroxide lysis, iodine staining of the parasites, and their quantification on cellulose filters. The parasite is routinely diagnosed by means of histology or incubation of gills in FTM. However, this parasite is known to occur in several tissues (gill, mantle, kidney, muscular foot, gonads, gut and digestive gland). The different available diagnostic methods were then compared in terms of sensibility and specificity. Results suggest that the whole-clam culture technique provides reliable value for quantification of infection intensity (number of parasites per gramme wet weight tissue), and could be used as a routine method, because it is a easy, rapid and not expensive method. However, this method could be improved by the use of specific probes to detect parasite cells in conjunction with the whole-clam culture technique, if ones want to detect the parasite in water or in sediment.

The disease caused by this agent is infectious and can be transmitted directly from a clam to another. The stage of zoospore (biflagellate free cell) is, probably, the most effective and the principal stage for the dissemination of the disease. So, the second goal of this study was to test the response of clams to different doses of zoospores of *P. atlanticus*. These infective cells were obtained after isolation, purification and culture of trophozoites from heavily infected clams. Free-diseased clams were inoculated by injection into the shell cavity with 0,  $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $2 \times 10^6$  and  $3 \times 10^6$  zoospores per clam and maintained at  $22 \pm 2^\circ\text{C}$  and  $31 \pm 1\text{‰}$  for 2 months. Infection intensity was measured by whole clam culture method in FTM. A significant direct positive relation was observed between infective cell dose and both prevalence ( $r^2=0.95$ ) and infection intensity ( $r^2=0.99$ ).

---

## ÍNDICE

	Pág.
<b>Capítulo I - INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>Capítulo II - PATOLOGIA DE MOLUSCOS BIVALVES</b> .....	4
<b>1. PATOLOGIAS EM GERAL</b> .....	5
1.1. Principais epizootias .....	5
1.2. Doenças de declaração obrigatória à OIE .....	9
1.3. Características gerais dos parasitas .....	10
1.4. Estratégias empregues pelos parasitas para a produção de doença....	10
1.4.1. Tipos de parasitas, seus estados infecciosos e características adaptativas .....	11
1.4.2. Fases do parasitismo .....	16
1.5. Factores que influenciam a susceptibilidade à doença .....	18
1.6. Efeitos fisiológicos do parasitismo sobre os bivalves .....	20
1.7. Mecanismos de defesa dos invertebrados face ao parasitismo .....	21
1.8. Medidas de controlo das doenças .....	24
<b>2. PERKINSIOSE</b> .....	25
2.1. Enquadramento histórico .....	25
2.2. Ocorrência de <i>Perkinsus</i> em diferentes espécies e sua distribuição geográfica .....	25
2.3. Posição taxonómica e Filogenia do género <i>Perkinsus</i> .....	27
2.4. Ciclo de vida e ultraestrutura de <i>Perkinsus atlanticus</i> .....	28
2.5. Sintomatologia e lesões .....	30
2.6. Técnicas de diagnóstico da perkinsiose .....	32
2.6.1. Esfregaços por aposição .....	32
2.6.2. Histologia .....	33
2.6.3. Incubação em FTM (Fluid Thioglycollate Medium) .....	33
2.6.4. Métodos Imunológicos .....	35
2.6.5. Métodos de Biologia Molecular .....	36

2.7. Influência de diferentes factores ambientais no desenvolvimento desta epizootia .....	37
2.8. Investigações laboratoriais de patogenicidade, susceptibilidade e transmissão de <i>Perkinsus</i> .....	39
2.9. Efeitos fisiológicos sub-letais da perkinsiose .....	40
2.10. Reacção de defesa à infecção por <i>Perkinsus</i> .....	41
<b>Capítulo III - MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>44</b>
<b>1. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO DA PERKINSIOSE</b> .....	<b>45</b>
1.1. Descrição dos métodos.....	46
1.1.1. Esfregaços por aposição .....	46
1.1.2. Histologia .....	46
1.1.3. Incubação em FTM (Fluid Thioglycollate Medium) .....	46
1.1.4. Métodos Imunológicos .....	48
1.1.4.1. Preparação de macrófagos e descongelação dos hibridomas .....	48
1.1.4.2. Recuperação dos anticorpos .....	49
1.1.4.3. Congelação dos hibridomas .....	49
1.1.4.4. Imunofluorescência indirecta .....	50
1.1.4.5. Imunoperoxidase .....	50
1.1.5. Métodos de Biologia Molecular .....	51
1.1.5.1. Extracção de ADN .....	51
1.1.5.2. PCR ("Polymerase Chain Reaction") .....	52
1.1.5.3. Clonagem de ADN de <i>P. marinus</i> amplificado por PCR. ....	53
1.2. Comparação dos métodos histologia e incubação em FTM .....	54
1.2.1. Ensaio I .....	54
1.2.2. Ensaio II .....	54
1.2.3. Ensaio III .....	54
1.2.4. Ensaio IV .....	55
1.2.5. Ensaio V .....	55
1.2.6. Ensaio VI .....	55

---

<b>2. INDUÇÃO ARTIFICIAL DA PERKINSIOSE EM <i>Ruditapes decussatus</i></b> .....	56
2.1. Design experimental .....	56
2.2. Purificação de zoosporos de <i>Perkinsus atlanticus</i> .....	57
2.3. Indução da infecção das ameijoas .....	58
<b>Capítulo IV - RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	60
<b>1. AVALIAÇÃO DAS TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO</b> .....	61
1.1. Apreciação geral dos métodos .....	61
1.2. Comparação dos métodos histologia e incubação em FTM .....	64
1.2.1. Ensaio I .....	64
1.2.2. Ensaio II .....	65
1.2.3. Ensaio III .....	65
1.2.4. Ensaio IV .....	67
1.2.5. Ensaio V .....	68
1.2.6. Ensaio VI .....	68
<b>2. INDUÇÃO ARTIFICIAL DA PERKINSIOSE EM <i>Ruditapes decussatus</i></b> .....	70
2.1. Mortalidade vs. Intensidade de Infecção .....	70
2.2. Índice de condição .....	72
2.3. Prevalência do parasita .....	73
2.4. Intensidade de Infecção .....	74
<b>Capítulo V - CONCLUSÕES</b> .....	76
<b>Capítulo VI - CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	80
<b>Capítulo VII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	83

## ANEXOS



**Capítulo I**

**INTRODUÇÃO**



O cultivo de moluscos bivalves é uma actividade da Aquacultura marinha considerada bem desenvolvida em vários países do hemisfério norte, nomeadamente, EUA, Canada, Japão, Coreia, França e Holanda. Assim, um rendimento de milhões de dólares é gerado pelo cultivo e comercialização de ostras, mexilhões, vieiras, berbigões e várias espécies de ameijoas em todo o mundo (Renault, 1996).

No caso particular de Portugal, a moluscicultura representa também uma parte significativa dos cultivos marinhos. É a cultura da amejoa-boia, nos dois sistemas lagunares mais importantes da costa sul (Ria Formosa e na Ria de Alvor), que constitui o segmento mais valioso deste sector aquícola, correspondendo a praticamente 100% do total da produção nacional. Relativamente aos valores das estatísticas da produção anual há que colocar algumas reservas, pois nem toda a produção é declarada. Assim, a DGPA aponta para uma produção anual de 2000 toneladas e cálculos efectuados por contactos mais directos com os viveiristas, sugerem valores mais elevados, da ordem das 3000 a 3500 toneladas (Ruano, com. pess.).

Passos importantes têm sido dados para a implementação e concepção de áreas de cultivo mais eficientes e economicamente rentáveis, assim como para as técnicas utilizadas. Deste modo, o impacto económico da Aquacultura será, certamente, traduzido por um aumento nos próximos anos (Renault, 1996).

Contudo, durante o desenvolvimento desta actividade, e com a intensificação da produção, numerosos países têm sido confrontados com o aparecimento de doenças infecciosas, com severidade e duração variáveis. Por esta razão, a investigação nesta área tem sido prioritariamente dirigida para a determinação da etiologia, epidemiologia e medidas de controlo destas epizootias.

No caso das doenças infecciosas, um facto que deve também ser ponderado é a introdução frequente de espécies economicamente importantes originárias de outras áreas geográficas - com o objectivo do estabelecimento de novos produtos - que tem resultado na introdução de agentes patogénicos devastadores, responsáveis por mortalidades massivas dos "stocks" nativos.

Ao longo de vários anos, a investigação em patologia de invertebrados marinhos foi essencialmente descritiva, visando a morfologia do agente patogénico, a anatomopatologia e a epidemiologia.

Mais recentemente, têm sido feitos progressos no campo da patologia experimental, com o desenvolvimento de protocolos de purificação de diversos agentes patogénicos (Mialhe *et al.*, 1985, 1988; La Gall e Mialhe, 1992) e sistemas de cultura *in vitro* de células parasitárias (Kleinschuster e Swink, 1993; La Peyre *et al.*, 1993).

A possibilidade de purificar os agentes patogénicos tem permitido o desenvolvimento, *in vivo* e *in vitro*, de modelos representantes da interacção hospedeiro-parasita (com ênfase para os processos de defesa). Além deste benefício, a área da imunologia tem permitido ainda o estabelecimento e aperfeiçoamento das técnicas de diagnóstico das doenças (Bachère *et al.*, 1995).

Deste modo, foram estabelecidos dois objectivos distintos para a realização deste trabalho.

Uma primeira fase consistiu em (1) comparar as diferentes técnicas de diagnóstico utilizadas na detecção de *Perkinsus*, quanto à sua sensibilidade e especificidade, e (2) desenvolver um protocolo de diagnóstico quantitativo de *P. atlanticus*, adaptado a partir da técnica descrita para a avaliação da perkinsiose na ostra americana.

Na segunda fase, pretendeu-se reproduzir artificialmente a doença originada por *Perkinsus atlanticus* em *Ruditapes decussatus*, de modo a verificar quais as concentrações que, eventualmente, desencadeariam a doença e qual seria a dose letal de células parasitárias.

---

---

**Capítulo II**



**PATOLOGIA  
DE  
MOLUSCOS BIVALVES**

---

---

## 1. PATOLOGIAS EM GERAL

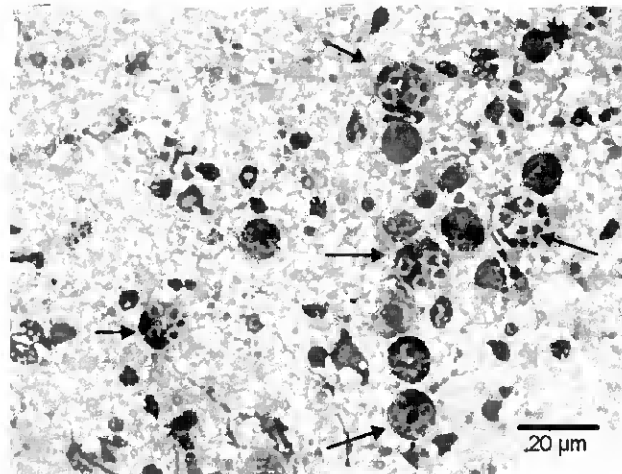
Os parasitas influenciam todos os aspectos das populações dos hospedeiros, incluindo tamanho, estrutura, dinâmica temporal e espacial, coexistência e competição (Figueras e Fisher, 1988), pelo que conhecer a relação entre o parasita e o bivalve hospedeiro é crucial na compreensão das epizootias. Este conhecimento é também essencial para a administração da pesca e dos recursos de bivalves, pois a ocorrência de doenças epizoóticas tem tido o maior impacto económico na produção destas espécies em diversas partes do mundo.

### 1.1. Principais epizootias

As doenças infecciosas constituem a principal barreira ao desenvolvimento e continuação do cultivo de moluscos, sendo, cada espécie cultivada, sensível a variados tipos de agentes patogénicos (Bachère *et al.*, 1995).

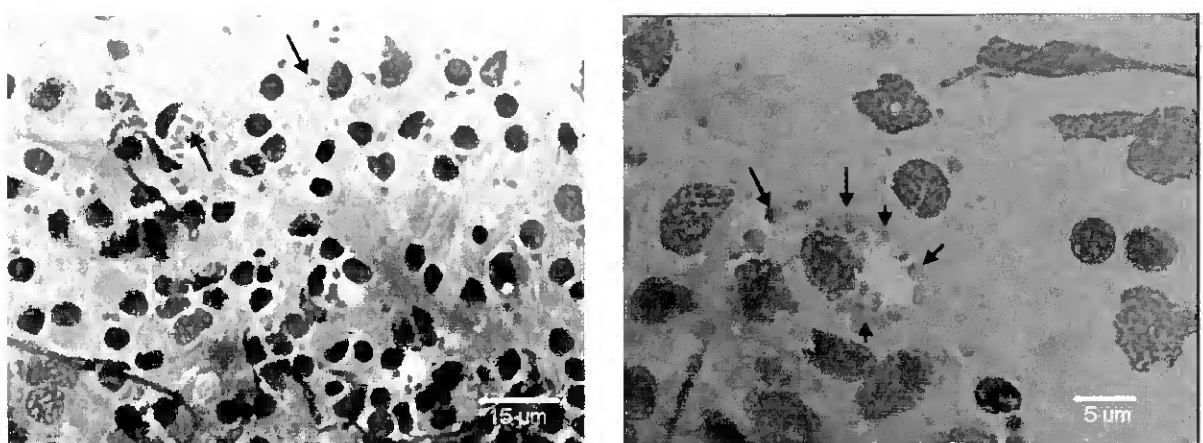
Em moluscos bivalves, os protozoários do filo Ascetospora (*Marteilia*, *Bonamia*, *Haplosporidium*) são particularmente importantes, pois são responsáveis por quebras de produção e perdas económicas notáveis, verificadas em determinadas áreas. Espécies do género *Perkinsus* (Apicomplexa) também têm sido reconhecidas pelo seu envolvimento em mortalidades massivas de bivalves (Sindermann, 1990).

Desde 1968, têm sido registadas mortalidades elevadas nas populações de ostra plana, *Ostrea edulis*, de França, particularmente na região de Marennes e na Bretanha; esta doença tornou-se conhecida como “maladie des Arbers” (nome da localidade onde se registaram pela primeira vez mortalidades anormais) e, mais tarde, foi denominada “doença da glândula digestiva”, pois este órgão é o principal local de infecção na ostra. O agente causal foi descrito por Comps (1970), e, em 1974, Grizel *et al.* estudaram-no em detalhe e identificaram-no como *Marteilia refringens* (Fig. 1).



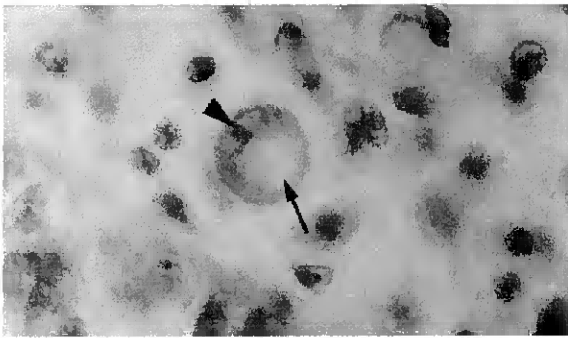
**Figura 1.** *M. refringens* na glândula digestiva de ostra; esfregaço por aposição - coloração Hemacolor (Lâmina da colecção do laboratório comunitário de referência para as doenças de moluscos bivalves, La Tremblade).

Após ter sofrido o impacto da primeira parasitose devido a *M. refringens*, esta actividade ostreícola foi consideravelmente reduzida em França, em 1979, por uma outra protozoose, a bonamiose ou “doença hemocitária”, provocada por *Bonamia ostreae* (Fig. 2) (Pichot *et al.*, 1980; Tige *et al.*, 1980; Comps, 1982; Grizel e Tige, 1982). Esta parasitose estendeu-se depois a todas as principais bacias ostreícolas europeias: Espanha, Holanda, Inglaterra e Irlanda (Bannister e Key, 1982; Banning, 1982, 1991; Bucke *et al.*, 1984; Polanco *et al.*, 1984; Montes *et al.*, 1997; Beare *et al.*, 1998). Foi igualmente observada nos Estados Unidos (Elston *et al.*, 1986) e na Nova Zelândia (Hine e Jones, 1994).

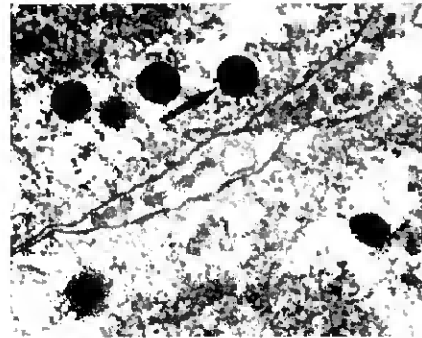


**Figura 2.** *B. ostreae* em tecido cardíaco de ostra plana; esfregaços por aposição - coloração Hemacolor. (Lâminas da colecção do laboratório de Patologia do IPIMAR, Lisboa).

A ostra americana, *Crassostrea virginica*, também tem sofrido graves problemas no seu cultivo, desde a década de 50, cujos responsáveis são os protozoários parasitas *Perkinsus marinus* (Fig. 3) e *Haplosporidium nelsoni* (Fig. 4) (Burreson e Ragone Calvo, 1996; Ray, 1996; Chu, 1997).



**Figura 3.** Trofozoítos de *P. marinus* na ostra *C. virginica* (in Perkins, 1996)



**Figura 4.** *Haplosporidium* sp. (in Hine e Thorne, 1998)

Em Portugal, surgiram mortalidades anormais em cultivos de ameijoia-boia *Ruditapes decussatus*, desde 1983 (Ruano, 1986, 1988, 1989; Ruano e Cachola, 1986; Azevedo *et al.*, 1988; GEA, 1988), cujo agente etiológico, pertencente também ao género *Perkinsus*, foi identificado por Azevedo (1989b) como *Perkinsus atlanticus*.

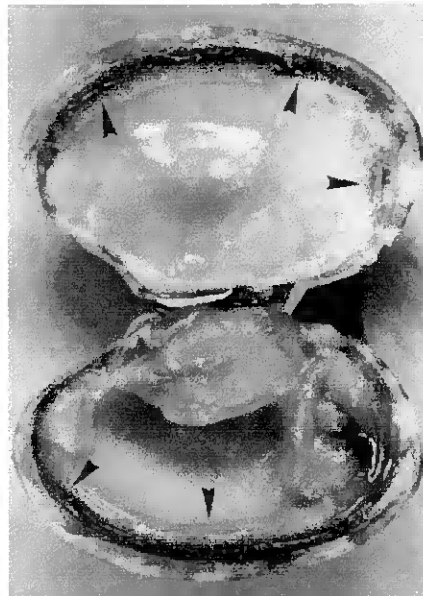
A "doença das brânquias" (Fig. 5) foi identificada como a causa de mortalidades massivas da ostra portuguesa *Crassostrea angulata*, em França, desde 1966 e também em Portugal. Durante alguns anos, esta doença, originada por um iridovírus, afectou mais de 70% da população. Uma vasta mortalidade quase exterminou totalmente esta espécie de ostras cultivada na costa atlântica francesa em 1973 (Comps e Bonami, 1977).



**Figura 5.** "Doença das brânquias" (in Matias, 1997).

A baixa prevalência de lesões em *Crassostrea gigas* levou a sugerir a existência de uma resistência parcial a este vírus (Comps, 1972). Por esta razão, começou a introdução descontrolada desta espécie de ostras, o que pode também ter conduzido à importação de novas espécies exóticas de vírus (Comps, 1980).

Outro agente patogénico, desta vez de origem bacteriana, também não deve ser menosprezado, pelas mortalidades massivas que originou em ameijoas *Ruditapes philippinarum* em França (Paillard *et al.*, 1989) e Espanha (Figueras *et al.*, 1996). Inicialmente conhecido por *Vibrio* P1, *Vibrio tapetis* (Fig. 6) é o agente etiológico da chamada "doença do anel castanho", denominação relacionada com o desenvolvimento anormal de depósitos de matéria orgânica de coloração castanha-negra ao longo do bordo paleal da parte interna da concha (Paillard *et al.*, 1997).



**Figura 6.** Aspecto da face interna das valvas de ameijoas infectada por *V. tapetis*.  
(in Paillard *et al.*, 1994).

## 1.2. Doenças de declaração obrigatória à OIE

As doenças de declaração obrigatória à OIE (Office International des Épizooties) constam do código sanitário internacional para os animais aquáticos (Code OIE, 1995), e são as enumeradas na tabela seguinte (Tab. I):

Tabela I. Doenças de declaração obrigatória, seus agentes patogênicos e hospedeiros sensíveis

DOENÇA	AGENTE PATOGENICO	HOSPEDEIRO SENSIVEL
Bonamiose	<i>Bonamia ostreae</i>	<i>Ostrea conchaphila</i> <i>Ostrea edulis</i> <i>Ostrea angasi</i> <i>Ostrea puelchana</i> <i>Ostrea denselamellosa</i> <i>Tiostrea chilensis</i>
	<i>Bonamia</i> spp.	<i>Tiostrea chilensis</i>
Haplosporidiose	<i>Haplosporidium nelsoni</i>	<i>Crassostrea virginica</i>
Marteiliose	<i>Marteilia refringens</i>	<i>Ostrea edulis</i> <i>Ostrea angasi</i> <i>Ostrea puelchana</i> <i>Ostrea denselamellosa</i> <i>Tiostrea chilensis</i>
	<i>Marteilia sydneyi</i>	<i>Saccostrea commercialis</i>
Microcistose	<i>Mykrocystos mackini</i>	<i>Crassostrea gigas</i> <i>Ostrea edulis</i> <i>Ostrea conchaphila</i> <i>Crassostrea virginica</i>
	<i>Mykrocystos roughleyi</i>	<i>Saccostrea commercialis</i>
Perkinsiose	<i>Perkinsus marinus</i>	<i>Crassostrea virginica</i>
	<i>Perkinsus atlanticus</i>	<i>Ruditapes decussatus</i> <i>Ruditapes philippinarum</i>
	<i>Perkinsus olseni</i>	<i>Haliotis rubra</i> <i>Haliotis laevigata</i>
Iridovirose	Iridovirus	<i>Crassostrea angulata</i> <i>Crassostrea gigas</i>

### **1.3. Características gerais dos parasitas**

As características gerais da vida dos parasitas foram sumarizadas por Price (1980) do seguinte modo:

- 1) Os parasitas exploram ambientes reduzidos e descontínuos. Existem em pequenas populações homogêneas, sem grande variabilidade genética, mas desenvolvem-se no sentido de assegurar a sua reprodução e dispersão. A dispersão ao longo do tempo é, frequentemente, conseguida através da longevidade dos estados resistentes;
- 2) Os parasitas são um exemplo de rigor na exploração de fontes específicas. Os predadores e detritívoros podem usar 10 ou mais espécies como fontes de alimento, mas é raro encontrar parasitas que utilizem mais do que duas;
- 3) Os parasitas existem em condições de desequilíbrio. O seu mundo é uma pequena porção de recursos, onde a probabilidade de colonização é baixa; estes recursos podem ser temporários, e são aproveitados enquanto estão disponíveis. Espécies alternativas e outras condições ambientais devem sobrepor-se no tempo e no espaço, antes de novos recursos estarem disponíveis.

### **1.4. Estratégias empregues pelos parasitas para a produção de doença**

Existe uma quantidade considerável de informação disponível sobre o modo de actuação e capacidade de sobrevivência dos parasitas de humanos, mas o mesmo não acontece para os bivalves marinhos.

Este aspecto da parasitologia é parte integral do processo de produção de doença, e a elucidação dos mecanismos envolvidos deverá contribuir para a compreensão da patogénese, permitindo, assim, o início do controlo da doença (Cheng, 1988).

Os parasitas, como organismos vivos, são geneticamente dotados para a sobrevivência. De um modo geral, o potencial biótico dos parasitas é maior do que o dos organismos hospedeiros, isto é, os parasitas produzem mais zigotos que podem atingir o estado reprodutivo; são, portanto, estrategistas-*r* (Cheng, 1986). Esta característica aumenta a sobrevivência das espécies, pois a maioria dos parasitas tem ciclos de vida complexos, geralmente envolvendo dois ou mais hospedeiros. Além disso, muitas espécies parasitárias incluem um ou mais estados de vida livre nos seus ciclos de vida, e estes estão sujeitos a valores extremos de factores ambientais como salinidade, temperatura, pH, pressão parcial de gases, etc. Esta combinação de alternância de hospedeiros (que, frequentemente, também envolve mudança de habitat) e os riscos ambientais poderão conduzir a elevada mortalidade dos parasitas. Contudo, espécies ditas “bem sucedidas” têm-se adaptado a uma variedade de estratégias de sobrevivência estruturais, etológicas, fisiológicas e bioquímicas, incluindo o aumento dos potenciais bióticos.

Muito pouco é ainda conhecido acerca das estratégias empregues pelos parasitas de bivalves marinhos para incrementar o seu estabelecimento nos hospedeiros. Estudos para elucidar tais estratégias, assim como os seus mecanismos de base, ajudarão a explicar os factos ainda obscuros do parasitismo no ambiente marinho, além do seu valor prático. Deste modo, as estratégias adaptativas poderiam ser interrompidas mecânica, física, química ou geneticamente para reduzir ou eliminar o parasitismo, que origina morbidade e mortalidade em espécies de bivalves marinhos economicamente importantes.

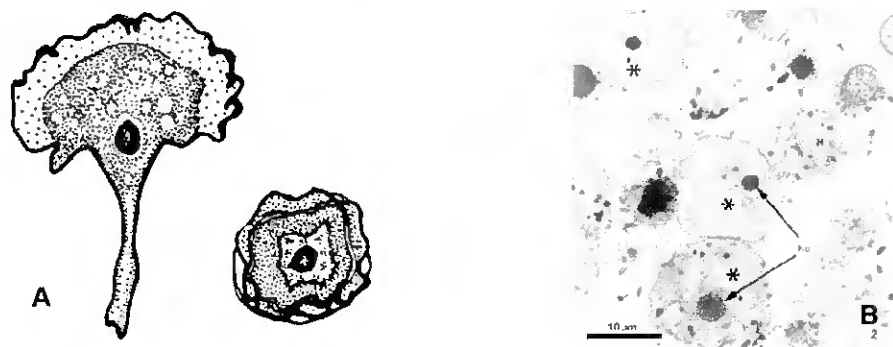
#### **1.4.1. Tipos de parasitas, seus estados infecciosos e características adaptativas**

Os parasitas de bivalves marinhos pertencem a variados *phyla* e *subtaxa* (Cheng, 1967):

##### **→ PROTOZOÁRIOS**

São conhecidos 6 grupos de protozoários que parasitam os lamelibrânquios marinhos: amebas, flagelados, ciliados, apicomplexas, ascetosporídeos e microsporídeos.

i) **Amebas** (Fig. 7): apesar da maioria das amebas parasitas produzirem cistos, e estes normalmente representarem o estado infeccioso, o ciclo de vida destes organismos é essencialmente desconhecido nos bivalves marinhos. *Hartmannella tahitiensis*, parasita amebóide facultativo da ostra *Crassostrea commercialis* do Tahiti encontra-se em quase todos os tecidos do hospedeiro, invadindo a superfície do epitélio (Cheng, 1970b); assim, parece que a estratégia adaptada é a síntese e secreção de enzimas que facilitem a penetração no hospedeiro no ambiente aquático. Esta adaptação é considerada uma estratégia bioquímica que permite o parasitismo.

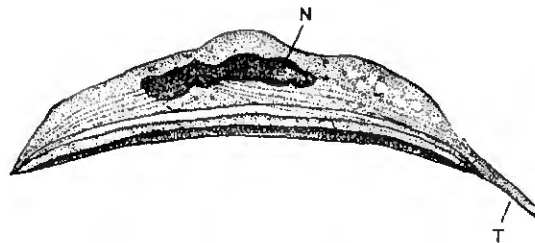


**Figura 7.** Exemplos de amebas parasitas de bivalves: **A** - *Flabellula calkensi*, no estado de trfozoíto e de cisto, parasita da ostra (in Cheng, 1988) e **B** - Ameba parasita do berbigão *Cerastoderma edule* (in Azevedo, 1997).

ii) **Flagelados**: apesar de alguns flagelados parasitas apresentarem capacidade de enquistamento (como é exemplo *Giardia* spp.), os mecanismos de infecção mais comuns são: (1) introdução através de um vector (frequentemente um artrópode, como *Trypanosoma*) ou (2) introdução através das aberturas corporais (boca, orifícios urogenitais) do hospedeiro, na forma flagelada (Cheng, 1986). Ainda não foi registada a introdução de parasitas flagelados nos hospedeiro quando se encontram na forma enquistada. Provavelmente, o parasita flagelado mais conhecido de bivalves marinhos é *Hexamita nelsoni*, parasita do intestino das ostras. Este protozoário é normalmente encontrado numa forma livre na interface água-sedimento em estuários; contudo, pode ser parasita facultativo das ostras, quando estas estão sujeitas a situações de stress ambiental,

tornando-se mesmo patogénico (Laird, 1961; Scheltema, 1962; Stein *et al.*, 1962). Entra com o alimento e multiplica-se rapidamente no hospedeiro, se o sistema de defesa deste estiver comprometido.

iii) Ciliados: a natureza da relação entre estes protozoários e os seus hospedeiros é desconhecida, mas o uso de tigmotropismo positivo para se fixarem ao seu hospedeiro indica que são geneticamente dotados para a simbiose. Uma ou mais espécies do género *Sphenophyra* foi classificada como parasita de ostras (Sindermann, 1970); estas apresentavam quistos de grandes dimensões nas suas brânquias. *Sphenophyra* spp. (Fig. 8) sofre modificações estruturais que facilitam a fixação às brânquias dos seus hospedeiros, e estas modificações podem ser interpretadas como adaptações ao parasitismo. Especificamente, há uma perda de cílios e, ventralmente, são achatados e concavados, permitindo a sucção da superfície das brânquias do hospedeiro. Como complemento, está presente um tentáculo, também com funções de fixação.

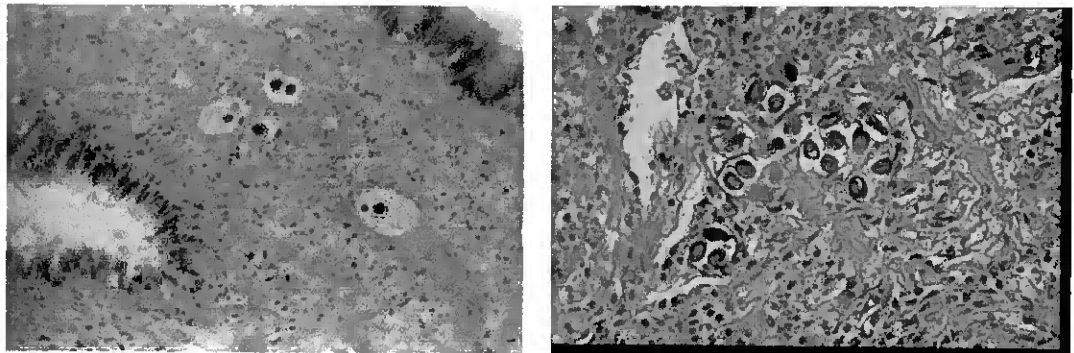


**Figura 8.** *Sphenophyra dosinia*, ciliado parasita da ostra (N - núcleo; T - tentáculo; notar a ausência de cílios) (in Cheng, 1988).

iv) Apicomplexas: muitos dos representantes deste grupo são parasitas de bivalves marinhos. O mais patogénico e melhor estudado é *Perkinsus marinus*, o agente responsável pelas mortalidades da ostra americana. O estado infeccioso deste parasita é um zoosporo flagelado (ou planonte). Após se libertar dos esporos, onde é formado, os zoosporos podem infectar tecidos adjacentes e outras ostras. White *et al.* (1987) verificaram que, em alguns casos, o gastrópode ectoparasita *Boonea impressa* pode actuar como um vector, transmitindo *P. marinus* de ostra para ostra. O par de flagelos de *P. marinus* possivelmente representa um organelo

adaptativo para a infecção dos bivalves, por conferir, ao zoosporo, capacidade de locomoção.

Várias espécies do género *Nematopsis* são heteroxenas (Fig. 9). Estes apicomplexas alternam entre o hospedeiro crustáceo e bivalve. O estado infeccioso para os moluscos é conhecido como gimnosporo. Prytherch (1940) refere que um único caranguejo, entre duas mudas, pode libertar 8 milhões de gimnosporos. Este exemplo de estratégia-*r* deve ser considerado como uma característica adaptativa, pois uma elevada percentagem de gimnosporos provavelmente nunca entrará nos fagócitos da ostra.



**Figura 9.** **A** - *Nematopsis ostrearum* no manto de *Ostrea edulis* (x400) (in Figueras e Villalba, 1988) e **B** - Outras gregarinas em *Ruditapes decussatus* (x400).

v) Ascetosporídeos: os organismos do género *Haplosporidium* são parasitas bastante estudados da ostra americana; apesar do seu ciclo de vida já ter sido bem discutido por Farley (1968), o modo de infecção das ostras permanece desconhecido. Consequentemente, não se pode afirmar que existam características adaptativas especiais associadas aos estados infecciosos. Contudo, com base no ciclo de vida de outros ascetosporídeos (Cheng, 1986), o estado infeccioso é, provavelmente, um esporo, que é ingerido pelo hospedeiro.

vi) Microsporídeos: *Steinhausia ovicola* e *S. mytilovum* (Fig. 10) são os microsporídeos mais conhecidos que parasitam os bivalves marinhos. *Steinhausia* spp. têm um habitat invulgar: ocorrem no citoplasma dos ovos. Apesar da via de infecção ser desconhecida, a esporulação e esporos maduros têm sido encontrados frequentemente nos ovos dos bivalves. Esta

descoberta implica que estes parasitas possam ser transmitidos transovariamente. Se este método de transmissão se verificar, então esta fase do ciclo de vida de *Steinhausia* spp. deve ser considerada uma característica adaptativa para facilitar o parasitismo.



**Figura 10.** *Steinhausia mytilovum* em ovócitos de mexilhão (x1000) (in Figueras e Villalba, 1988).

#### → HELMINTAS

Representantes de várias taxa de helmintas parasitam bivalves marinhos; entre eles incluem-se membros dos Platyhelminthes, Nematoda e Trematoda (Fig.11).



**Figura 11.** Fotografia de microscopia electrónica de *Prosorynchus squamatus*, tremátoda parasita de mexilhão (in Cousteau *et al.*, 1990).

#### → MOLUSCOS

Variadas espécies de gastrópodes (Fig. 12) têm sido reconhecidas como ectoparasitas de bivalves marinhos, em particular de mexilhões e de ostras. A maioria destes ectoparasitas pertence à classe Pyramidellidae; normalmente, situam-se na borda do manto, onde perfuram os seus hospedeiros com um estilete e extraem os fluidos e tecidos. O facto de possuírem este estilete deve ser considerado como uma adaptação ao ectoparasitismo.



Figura 12. Gastrópodes ectoparasitas de mexilhão (in Camacho, 1991).

### → ARTRÓPODES

São sobretudo as espécies de copépodes (Fig. 13) que se têm registado como parasitas de bivalves marinhos. Estes moluscos servem como hospedeiro final, uma vez que os parasitas atingem a maturidade sexual no seu interior. A forma como os hospedeiros são infectados é incerta.

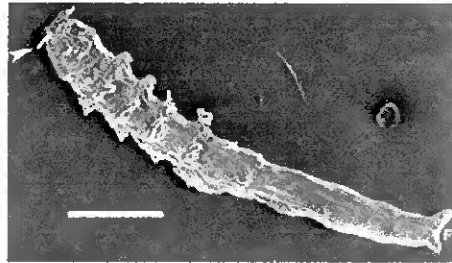


Figura 13. *Mytilicola intestinalis*, copépode parasita do mexilhão (in Canestri Trotti *et al.*, 1998).

#### 1.4.2. Fases do parasitismo

Parasitismo foi definido por Cheng (1970a) como uma relação íntima e obrigatória entre dois organismos heterospecíficos, durante a qual o parasita (normalmente o menor dos dois) é dependente do hospedeiro. É dito como obrigatório, dado que o parasita normalmente não sobrevive se não estiver em contacto com o hospedeiro durante parte do seu ciclo de vida.

Para efectuar a análise do fenómeno parasitismo, a associação hospedeiro-parasita deve ser estudada nas suas diferentes fases ou etapas, começando pelo mecanismo responsável pela atracção entre os dois associados.

**a) *Contacto hospedeiro-parasita***

Apesar do aumento do potencial biótico de quase todas as espécies parasitárias, a sobrevivência do parasita ainda depende de características genéticas adaptativas adicionais, normalmente subtis. Este aspecto é especialmente relevante para os estados infecciosos, que, com frequência, estão sujeitos a flutuações de factores ambientais e que medeiam a possibilidade de contacto com o potencial hospedeiro. Durante o decorrer da evolução, os parasitas têm desenvolvido variados mecanismos que aumentam o contacto hospedeiro-parasita.

**b) *Entrada no hospedeiro***

Em alguns casos, devem ocorrer alterações morfogenéticas do parasita antes da sua entrada no hospedeiro. Os endoparasitas entram nos seus hospedeiros passivamente (via ingestão), através de um vector, ou podem penetrar activamente. Qualquer um destes processos pode reflectir estratégias adaptativas que incrementam o estabelecimento do parasita.

**c) *Estabelecimento do parasita***

Após uma entrada bem sucedida, o parasita ainda se depara com algumas barreiras antes de se estabelecer: selecção do habitat, fixação, resistência aos mecanismos de defesa do hospedeiro e aquisição de nutrientes.

**d) *Evasão do parasita***

Para perpetuar as espécies parasitárias, os parasitas ou as suas células germinais devem libertar-se dos hospedeiros para contactar e invadir outros. A capacidade do parasita sair do hospedeiro de forma activa, involuntária ou passiva representa outra das adaptações que aumentam a perpetuação da relação parasitária.

### 1.5. Factores que influenciam a susceptibilidade à doença

Um organismo sujeito a stress ("stress" tem sido definido como a alteração do equilíbrio fisiológico induzida por uma mudança ambiental, a qual torna o indivíduo mais vulnerável a outras alterações ambientais (Bayne, 1985)) tem menos energia disponível para as funções metabólicas normais (incluindo os processos associados à resistência a doenças) e poderá tornar-se mais susceptível ao parasitismo e à doença e consequentes efeitos negativos.

É reconhecido que a supressão da imunocompetência em vertebrados e invertebrados favorece a infecção e a virulência de certos parasitas. Nos invertebrados, como os moluscos, que possuem sistema circulatório aberto, certos factores ambientais são conhecidos por reduzir a imunocompetência e tornar os hospedeiros mais susceptíveis ao parasitismo (Cheng, 1987).

A temperatura é o principal factor ambiental determinante do metabolismo e do nível de actividade dos invertebrados. Os bivalves aclimatizam-se às variações sazonais normais da temperatura, alterando as taxas de filtração e respiração; assim, a sua capacidade de crescimento é relativamente estável (Sobral e Widdows, 1997). Contudo, a elevada temperatura da água pode impor stress aos bivalves e tornar-se um importante factor no controlo da sua susceptibilidade ao efeito dos agentes patogénicos.

Quando os níveis de oxigénio dissolvido se encontram abaixo da saturação, o que, frequentemente, ocorre em lagoas, áreas confinadas, zonas lodosas e sapais, e em associação com necessidades biológicas anormalmente elevadas de oxigénio, verificam-se os denominados "acontecimentos anóxicos". A hipoxia tem sido relatada em organismos intertidais, durante os períodos em que as valvas se encontram fechadas, nos períodos de baixa-mar. As respostas adaptativas à hipoxia ambiental incluem o aumento do volume de água que passa pelas brânquias, pelo aumento da eficiência da extracção de oxigénio e pela redução geral da actividade metabólica (Widdows *et al.*, 1989). Contudo, quando esta capacidade adaptativa é excedida, a possibilidade de crescimento diminui (Bayne *et al.*, 1985). Este factor tem sido apontado como responsável pela susceptibilidade à doença e mortalidade de ostras (Laird, 1961).

O stress nutricional é originado tanto pela reduzida quantidade de alimento como pela sua qualidade inferior, o que pode ocorrer sazonalmente em áreas costeiras (Berg e Newell, 1986; Widdows *et al.*, 1989). A quantidade de energia absorvida pelo bivalve, através do alimento ingerido, influencia directamente a capacidade de crescimento.

A produção de gâmetas, na maioria dos moluscos bivalves, depende da combinação das reservas nutricionais armazenadas e do alimento ingerido. A desova pode causar uma redução da taxa de filtração (Newell e Thompson, 1984) e os animais em período pós-desova têm, frequentemente, as reservas energéticas esgotadas (Berber e Blake, 1981; Bayne *et al.*, 1982). Assim, a reprodução pode ser considerada um agente causador de stress, pois a energia é desviada do crescimento somático, da manutenção do indivíduo e das funções relacionadas com a defesa.

Potenciais problemas podem também ser devidos à sobrepopulação (ou competição pelo espaço), com especial importância em Aquacultura; estes estão relacionados com a redução da disponibilidade de alimento, aumento do nível de produtos tóxicos e incremento da transmissão da doença entre indivíduos próximos.

Também o stress de origem antropogénica (poluentes) tem vindo a aumentar progressivamente a sua prevalência, na medida em que cada vez mais se fazem sentir as pressões da população humana nas zonas costeiras e estuarinas, onde crescem mariscos comercialmente importantes.

Como foi descrito anteriormente, os bivalves marinhos são parasitados por uma grande variedade de agentes patogénicos que provocam stress aos seus hospedeiros a diferentes níveis. Apesar do seu efeito ser difícil de determinar em bivalves infectados por mais do que uma espécie de parasitas, sabe-se que a infecção por um determinado agente pode aumentar a susceptibilidade de hospedeiro a outras espécies de parasitas (Lauckner, 1983).

A discussão do possível papel dos parâmetros ambientais causadores de stress no aumento da susceptibilidade dos bivalves ao parasitismo também deve considerar igualmente relevante a forma como o parasitismo torna um animal vulnerável ao stress.

## 1.6. Efeitos fisiológicos do parasitismo sobre os bivalves

Vários órgãos são afectados por agentes patogénicos e, em cada caso, o mecanismo de patogenicidade pode ser diferente, como destruição dos tecidos, competição por nutrientes, metabolitos tóxicos ou interrupção de processos biológicos e mecanismos biossintéticos (Figueras e Fisher, 1988).

O mais completo conhecimento das causas e das consequências das doenças de moluscos só pode ser obtido quando as técnicas fisiológicas são empregues em conjunto com métodos patológicos e histológicos de rotina (Newell e Barber, 1988).

Para determinar o efeito da relação hospedeiro-parasita, torna-se necessário quantificar a que nível a saúde do hospedeiro é prejudicada ou diminuída.

A importância dos factores ambientais na regulação dos processos fisiológicos dos moluscos está bem documentada (Newell, 1979; Bayne e Newell, 1983). Deve procurar-se identificar de que modo as condições de stress ambiental conduzem a disfunções fisiológicas, assim como ao aumento da susceptibilidade à doença. Estas situações podem ocorrer em resultado da reacção geral ao stress, nas quais o balanço energético entre o hospedeiro e o agente patogénico favorece este último. O aumento da susceptibilidade pode ainda resultar da debilidade dos mecanismos de defesa celular específica e humoral relacionada com o stress.

A forma mais directa para estimar o efeito nocivo do parasita num determinado bivalve hospedeiro é a medição da redução da taxa de crescimento somático e germinal (Newell e Barber, 1988).

A taxa de consumo de alimento dos bivalves pode ser uma das primeiras taxas de funções fisiológicas a ser afectada pela infecção parasitária. As brânquias são, frequentemente, o local onde se inicia a infecção do parasita, devido ao seu íntimo contacto com o meio. Além disso, as lesões produzidas por infecções parasitárias podem estimular a produção de muco, o qual poderá interferir com a função normal das brânquias (Jogensen, 1966).

Por outro lado, alguns parasitas podem não influenciar nenhuma das funções com taxas fisiológicas mensuráveis, podendo apenas absorver nutrientes e tecidos necessários para a produção de gâmetas do hospedeiro (e, obviamente, a redução da fecundidade tem implicações ecológicas importantes) ou para a sobrevivência dos próprios indivíduos durante os períodos mais desfavoráveis.

A virulência do agente patogénico é frequentemente traduzida em termos de dosagem, mortalidades ou severidade dos prejuízos ou resposta do hospedeiro, mas muitos factores estão envolvidos na saúde do animal.

As variáveis ambientais, fisiológicas e sazonais (reprodutivas) têm um papel preponderante no efeito dos parasitas sobre os seus hospedeiros, e estas devem ser consideradas para a compreensão de uma situação de doença (Figueras e Fisher, 1988).

### **1.7. Mecanismos de defesa dos invertebrados face ao parasitismo**



Uma vez ocorrido contacto e a entrada do organismo invasor no hospedeiro, as células deste último normalmente reconhecem o material estranho e tentam destruir o invasor ou, pelo menos, restringi-lo a um espaço confinado. Se a resposta é eficaz, o invasor é eliminado; caso contrário, torna-se parasita e potencialmente patogénico (Figueras e Fisher, 1988).

Começando com os estudos de Stauber (1959), que introduziu tinta da China no coração de ostra americana e traçou o destino das partículas de carbono, foi determinado que a imunidade mediada por células é a forma predominante de defesa interna em moluscos.

Especificamente, é reconhecido que, como regra geral, após um período inicial de "dormência", incluindo o isolamento e sequestro, os materiais estranhos são fagocitados, isto é, ingeridos pelos hemócitos do molusco hospedeiro, principalmente, granulócitos; este material estranho é, então, degradado intracelularmente ou eliminado pelo corpo do hospedeiro via migração do complexo fagócito-corpo estranho através dos epitélios.

Assim, em moluscos bivalves, os hemócitos constituem principalmente a primeira linha de defesa contra invasores, e a fagocitose é considerada uma via bastante importante para o controlo e eliminação de partículas estranhas (Lopez *et al.*, 1993; Bachère *et al.*, 1995).

Este processo de defesa interno é, classicamente, subdividido em várias etapas sucessivas (Bachère *et al.*, 1995):

- 1) *quimiotaxis*, ainda pouco conhecida em bivalves;
- 2) *reconhecimento*, efectuado através da membrana e moléculas secretadas, denominadas opsoninas;
- 3) *integração das partículas estranhas*, em fagosomas primários, que depois se fundem com lisosomas para formar os fagolisosomas; variadas enzimas lisosomais têm sido identificadas em hemócitos de bivalves, entre as quais se encontram a fosfatase ácida, lisozima e  $\beta$ -glucoronidase, arilsulfatase, elastase e catepsina B e G;
- 4) *mecanismo de destruição oxidativa*, mecanismo que se encontra nos vertebrados, em que, após a estimulação dos macrófagos, a fagocitose é associada com a produção de reactivos de oxigénio (ex. superóxido, peróxido de hidrogénio), que têm um papel microbicida. Este mecanismo de destruição oxidativa foi também demonstrado em gastrópodes e em alguns bivalves, onde se detectou, por histoquímica, a produção de peróxido de hidrogénio. A técnica utilizada é a quimioluminescência, que permite uma análise qualitativa e quantitativa do metabolismo relacionado com a fagocitose e a cinética desta actividade.

Além da fagocitose, reconhecem-se geralmente dois mecanismos adicionais de defesa internos: encapsulamento e nacarização (deposição de nacre em volta do corpo estranho). Quando se introduz, natural ou experimentalmente, no corpo dum molusco, material não-próprio de dimensões demasiado grandes para que possa ser fagocitado (por exemplo, porções de tecidos, larvas de helmintas, etc.), este vai ser encapsulado por células e/ou fibras. Cheng e Rifkin (1970) sugerem que a encapsulação celular representa tentativas abortadas de fagocitose, isto é, os fagócitos aderem à superfície do corpo estranho, mas são incapazes de o envolver no seu interior. A encapsulação por fibras, por outro lado, é resultado de uma série de eventos distintos; é iniciada quando a pressão (ou outro estímulo) induz a síntese de sub-componentes das fibras definitivas intracelularmente nas células de Leydig adjacentes (tecido conjuntivo). Estas sub-unidades são libertadas para a matriz intercelular, onde se tornam mais complexas e, assim, as fibras definitivas encapsulam o corpo estranho.

A nacarização, ou formação de pérola, representa um tipo de reacção do hospedeiro mais especializada. Este processo é especializado, uma vez que o material deve estar situado na superfície do manto secretor de nacre (Wise, 1970). A nacarização, aparentemente, é induzida por um estímulo físico desencadeado pelo agente.

Há ainda menção de que a leucocitose, isto é, o aumento do número de hemócitos, precede tanto a fagocitose como o encapsulamento. Este facto implica que o invasor, através de um modo qualquer, ainda indeterminado, estimule a hematopoese e, em alguns casos, a divisão dos hemócitos existentes (Bayne, 1983). Lopez *et al.* (1993) confirmaram a existência de dois tipos de hemócitos na ameijoia *R. decussatus* (granulócitos e hialinócitos), sendo a característica distintiva a presença ou ausência de grânulos no citoplasma; estudos ultrastruturais confirmaram a existência de ambos os tipos de hemócitos, comprovando-se que os grânulos correspondem a lisosomas, devido à actividade da fosfatase ácida detectada no seu interior. A dotação de enzimas lisosomais confere-lhes capacidade para destruir os agentes estranhos ou patogénicos.

Sabe-se também que certos factores humerais em moluscos (factores solúveis, sendo alguns produzidos pelos hemócitos) têm uma função de protecção contra materiais invasores (Bachère *et al.*, 1995). Tem-se demonstrado que as aglutininas do plasma, das quais algumas são lectinas, actuam como opsoninas (Chintala *et al.*, 1994). Além das lectinas (que parecem ter um papel importante no reconhecimento de produtos estranhos aos invertebrados, porque estes não possuem imunoglobulinas), outras categorias de factores serológicos têm sido registadas em moluscos (La Peyre *et al.*, 1995). Estas incluem lisinas, inibidores de crescimento, factores especiais imobilizadores dos parasitas, hidrolases lisosomais e os denominados factores citotóxicos (Cheng e Combes, 1990). Apesar de várias destas moléculas terem sido descritas como factores de defesa em variadas espécies de bivalves, o seu papel no mecanismo de defesa contra parasitas parece não ser específico e ainda não está completamente conhecido.

Resumindo, o sistema imunitário dos invertebrados não é considerado tão complexo como o dos vertebrados, principalmente em termos de especificidade e memória (Klein, 1977); contudo, a resposta dos bivalves a infecções parasitárias pode variar bastante (Figueras e Fisher, 1988).

## 1.8. Medidas de controlo das doenças

Medidas de controlo das doenças são possíveis e têm sido aplicadas a algumas populações de invertebrados marinhos sedentários das zonas costeiras. Os métodos possíveis de controlo incluem (Sindermann e Rosenfield, 1967; Krantz e Jordan, 1996):

- a) optimização do recrutamento natural, através do desenvolvimento e manutenção do zonas de cultivo de sementes livres de parasitas;
- b) mais uso extensivo de ambientes artificiais, tais como “hatcheries” e tanques artificiais para suplementar o recrutamento natural.
- c) monitorização cuidadosa das populações, suplementada com toda a informação ambiental importante, tal como temperatura, salinidade, oxigénio dissolvido e turbidez;
- d) manipulações ambientais (qualidade do sedimento das zonas de cultivo, tratamentos químicos, controle da densidade e calendarização da pescaria);
- e) prevenção do movimento de “stocks” infectados para zonas de produção - em alguns casos, estas zonas de engorda necessitam de ser despovoadas durante um certo tempo;
- f) quarentena;

Como complemento destas medidas de controlo, tem-se vindo a desenvolver a investigação, particularmente nas seguintes áreas:

- resistência genética aos agentes patogénicos
- capacidade reprodutiva das espécies cultivadas
- eficiência dos métodos de diagnóstico
- conhecimento da dinâmica ecológica das interacções hospedeiro-parasita-ambiente.

## 2. PERKINSIOSE

### 2.1. Enquadramento histórico

A origem de *P. marinus* é obscura, mas, provavelmente, esteve sempre associado a ostras. Foi registado, pela primeira vez, em Chesapeake Bay, em 1949 (Andrews e Hewatt, 1957).

Este agente patogénico foi descrito como *Dermocystidium marinum*, devido à sua aparente afinidade com parasitas fúngicos de peixes de água doce (Mackin *et al.*, 1950). Mais tarde foi reclassificado como *Labirintomixa marina* (Mackin e Ray, 1966). Observações ultraestruturais (Perkins, 1976) do complexo apical do estado de zoosporo móvel levaram Levine (1978) a estabelecer o novo género *Perkinsus*, incluído no filo Apicomplexa.

Desde 1983, em Portugal, em consequência da mortalidade ocorrida na ameijoia-boia, *Ruditapes decussatus*, foram efectuados alguns estudos e identificado um parasita a que foi dado o nome de *Perkinsus*-“like”, isto é, um espécie semelhante ao género *Perkinsus*. Além disso, sem ser realizada uma análise comparativa do seu ciclo de vida, e baseado apenas no aspecto ultraestrutural dos trofozoítos, foi sugerida a presença de *P. marinus* na ameijoia-boia do Algarve (Chagot *et al.*, 1987).

Mais recentemente, após um estudo detalhado do ciclo de vida do parasita, e estabelecidas as comparações taxonómicas com as duas espécies do género *Perkinsus* até então descritas, foi verificado que o parasita encontrado constituía uma nova espécie, a qual Azevedo, em 1989, denominou *Perkinsus atlanticus*.

### 2.2. Ocorrência de *Perkinsus* em diferentes espécies e sua distribuição geográfica

*Perkinsus* spp. têm sido detectadas em 68 espécies de moluscos, todas bivalves, excepto 4 espécies de gastrópodes (abalones), em águas costeiras de zonas temperadas, sub-tropicais e tropicais.

O quadro seguinte (Tab. II) resume os principais registos de ocorrência de *Perkinsus* que se têm verificado.

Tabela II. Ocorrência das várias espécies de *Perkinsus*

ESPÉCIE	HOSPEDEIRO	LOCALIZAÇÃO GEOGRÁFICA	REFERÊNCIAS
<i>Perkinsus atlanticus</i>	<i>Ruditapes decussatus</i>	Portugal	Azevedo, 1989a,b; 1991 Azevedo <i>et al.</i> , 1988 Chagot <i>et al.</i> , 1987 GEA, 1988 Ruano, 1986; 1988; 1989
		Espanha	Figueras <i>et al.</i> , 1992 Gonzalez Herrero <i>et al.</i> , 1987 Navas <i>et al.</i> , 1992 Sagrista <i>et al.</i> , 1995
		França	Goggin, 1991; 1992
		Itália	DaRos e Canzonier, 1986
	<i>R. philippinarum</i>	Espanha	Montes <i>et al.</i> , 1995a,b Sagrista <i>et al.</i> , 1995 Sanmarti <i>et al.</i> , 1995
<i>Perkinsus marinus</i>	<i>Crassostrea virginica</i>	EUA	Andrews, 1988 Burreson e Calvo, 1996 Goggin e Lester, 1987 Mackin <i>et al.</i> , 1950 Perkins, 1986; 1988 Perkins e Menzel, 1966; 1967
		Golfo do México	Andrews e Ray, 1988 Ray, 1996 Soniati, 1996
		Hawai	Kern <i>et al.</i> , 1973
<i>Perkinsus olseni</i>	<i>Haliotis ruber</i>	Austrália	Goggin e Lester, 1987 Lester, 1980 Lester e Davis, 1981 Lester <i>et al.</i> , 1990
<i>Perkinsus karlssoni</i>	<i>Argopecten irradians</i>	Canadá	Goggin <i>et al.</i> , 1996 McGladdery <i>et al.</i> , 1991

### 2.3. Posição taxonómica e Filogenia do género *Perkinsus*

A posição taxonómica de *Perkinsus* é controversa e continua a ser um desafio para os cientistas. São apicomplexas? Quantas espécies de *Perkinsus* existem?

O género *Perkinsus* tem 4 espécies descritas, indicadas no item anterior, as quais foram separadas com base na identidade do hospedeiro e sua localização, assim como pelo aspecto histológico e morfológico. Contudo, estas características poderão não ser suficientes para separar, com certeza, as espécies deste género (Goggin, 1994). *Perkinsus* permanece o único género da classe Perkinsasida (Levine, 1978).

Este género foi incluído no filo Apicomplexa, devido ao facto do seu esporângio ser similar aos gametócitos das gregarinas, com um tubo de descarga semelhante ao esporoducto destes organismos. Os zoosporos de *Perkinsus* apresentam um complexo apical, característica distintiva dos apicomplexas, mas diferem por serem biflagelados (como certos fungos) e terem um vacúolo anterior (Levine, 1978).

Das quatro espécies identificadas, a validade da classificação de *P. karlssoni* é questionável, pois a zoosporulação, típica de *Perkinsus* spp. não foi observada; não foi determinado se as células biflageladas (ditas zoosporos, por McGladdery *et al.* (1991)) apresentam mastigonemas filamentosos e complexo apical nem a resposta típica de *Perkinsus* spp. ao meio de cultura FTM (Fluid Thioglycollate Medium) (Perkins, 1996).

No caso de *P. olseni* não se investigou a presença destas estruturas, mas a zoosporulação típica foi observada, com a formação de um poro e tubo de descarga, assim como a resposta ao meio de cultura.

Quanto a *P. atlanticus*, estudos ultrastruturais (Azevedo, 1989a) demonstraram que possui todas as características do género, incluindo a formação de zoosporos biflagelados com mastigonemas filamentosos e um complexo apical.

São fungos ou protistas? Também a filogenia destes parasitas tem sido questionada, tendo sido sugerido que se tem dado demasiada ênfase ao complexo apical, como característica determinante da posição filogenética, e que *Perkinsus* está mais intimamente relacionado com os fungos do que com os apicomplexas (Vivier, 1982).

A biologia molecular é uma ferramenta poderosa que tem sido usada para tentar esclarecer estas questões de filogenia, em particular através da determinação das sequências de nucleótidos de regiões intertranscripcionais de ARN ribossomal (Goggin e Barker, 1993; Goggin, 1994; Goggin e Cawthorn, 1994). Estes estudos permitiram indicar que *Perkinsus* não é um fungo e que está mais relacionado com os dinoflagelados (79% de similaridade com *Prorocentrum micans*) e com os apicomplexa, pertencente ao grupo dos coccídeos (um dos 5 grupos de esporozoários), *Sarcocystis muris*.

Para reavaliar a posição filogenética de *Perkinsus*, Reece *et al.* (1997) obtiveram sequências nucleotídicas para os genes da actina de *P. marinus* e de 2 dinoflagelados e compararam-nas com sequências disponíveis deste gene de vários ciliados e apicomplexas; os resultados obtidos corroboram a ideia de que existe uma maior afinidade de *P. marinus* com os dinoflagelados do que com os apicomplexas. Também Siddall *et al.* (1997) chegaram à mesma conclusão, estudando também sequências da actina e do fragmento 18S-"like" de rADN.

#### 2.4. Ciclo de vida e ultraestrutura de *Perkinsus atlanticus*

O ciclo de vida desta espécie encontra-se representado esquematicamente na figura 13 e a descrição que se segue das suas etapas e estados de desenvolvimento é baseada nos estudos de Azevedo (1989a,b, 1991), Auzoux-Bordenave *et al.* (1995), Goggin e Lester (1995) e Sagristà *et al.* (1996).

*P. atlanticus* encontra-se nos tecidos da ameijoia, principalmente nas lamelas branquiais, na forma de **trofozoítos**, células esféricas de 20-50 µm de diâmetro, uninucleadas, cujo citoplasma é ocupado por vários pequenos vacúolos que evoluem para apenas um de grandes dimensões. O núcleo é excêntrico e possui um nucléolo volumoso com componentes granulares e fibrilares. Externamente, são rodeados por uma densa e espessa parede de natureza proteica. Estas características conferem-lhe uma forma típica de anel, o que permite a sua fácil identificação.

Os trofozoítos, no interior do hospedeiro, vão multiplicar-se por esquizogonia, que envolve sucessivas bipartições da célula até atingirem 8 a 32 merozoítos contidos no seu interior. Há depois ruptura da membrana e estas células são

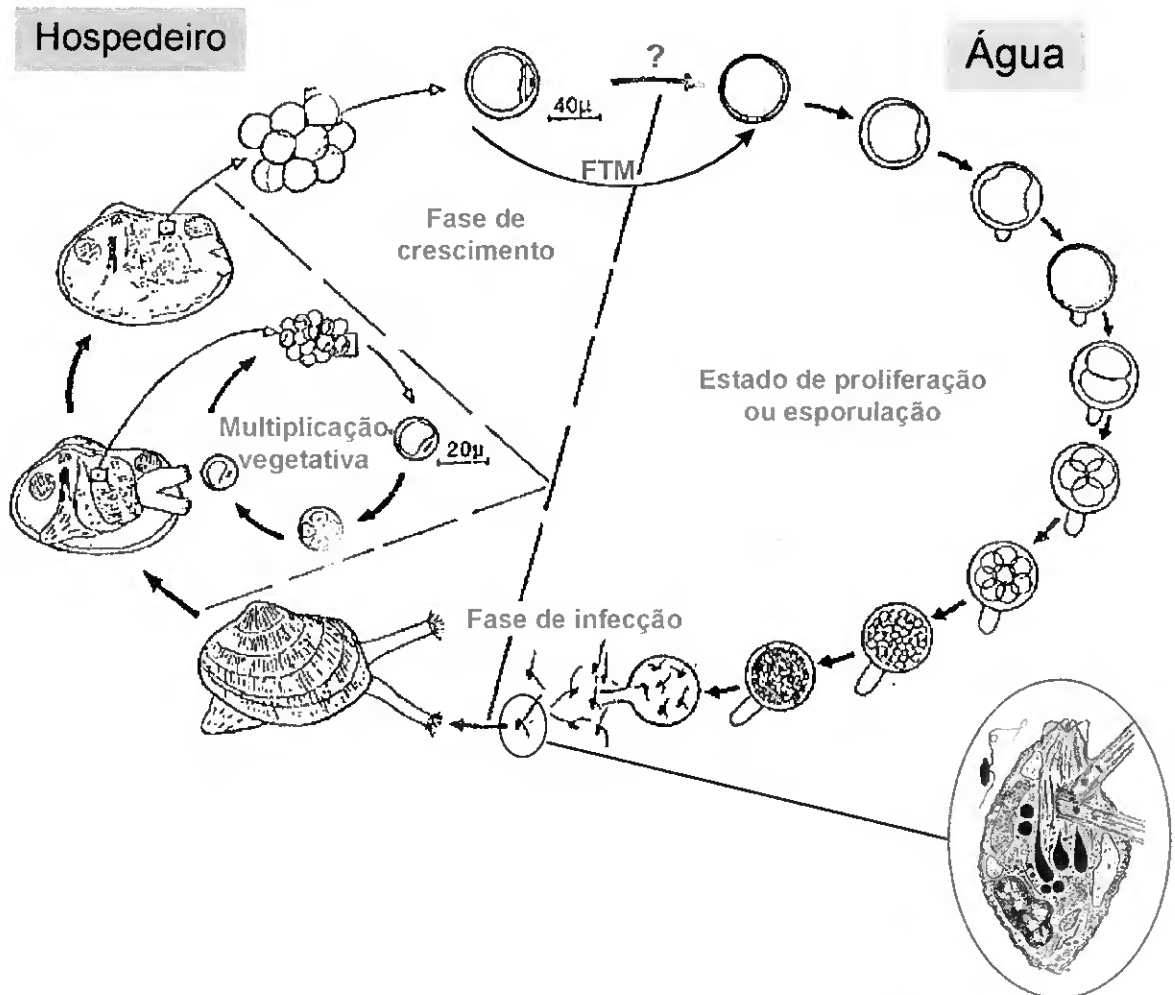
libertadas, crescem e repete-se o ciclo. Esta fase é denominada *multiplicação vegetativa*.

Os trofozoítos podem ainda ter outro destino que consiste na chamada *fase de crescimento*; quando as ameijoas estão moribundas, e acabam por morrer, ou tecidos infectados são incubados em FTM (situações anaeróbias), as células parasitárias vão desenvolver-se e crescer (sem se multiplicar), produzindo os **pré-zoosporângeos** (células com 50-100 µm de diâmetro); o vacúolo é ocupado gradualmente por citoplasma vacuolado, enquanto que o núcleo atinge um grande volume.

Quando libertados na água do mar, os pré-zoosporângeos vão dividir-se repetidamente (por bipartições sucessivas); no interior de cada pré-zoosporângeo é possível observar os pré-zoosporos e, após 3 ou 4 dias de incubação em água do mar (em condições controladas), são visíveis centenas de **zoosporos** móveis e biflagelados (*fase de proliferação ou esporulação*). Entretanto, durante este período de divisão dos pré-zoosporos, a parede do pré-zoosporângeo diferencia o tubo de descarga, órgão que controla a saída dos zoosporos, quando estes atingem o completo estado de maturação. O número de zoosporos é muito variável e depende do tamanho dos trofozoítos de que são originários; assim, os mais pequenos produzem cerca de 1500 zoosporos, enquanto que os de maiores dimensões podem produzir mais de 3000.

São estas formas livres que infectam outras ameijoas saudáveis, provavelmente quando estas filtram a água do mar (*fase de infecção*). Foi demonstrado que a transmissão pode ser directa de ameijoas para ameijoas, sem necessidade de hospedeiros intermediários.

Os zoosporos são células de grande mobilidade, devido à presença de dois flagelos inseridos lateralmente na região sub-apical; apresentam uma forma elipsoidal com cerca de 4,5 µm de diâmetro antero-posterior e cerca de 2,9 µm de secção transversal e, na porção apical, destaca-se o complexo apical, que poderá ser a estrutura que está envolvida na penetração da célula no hospedeiro.



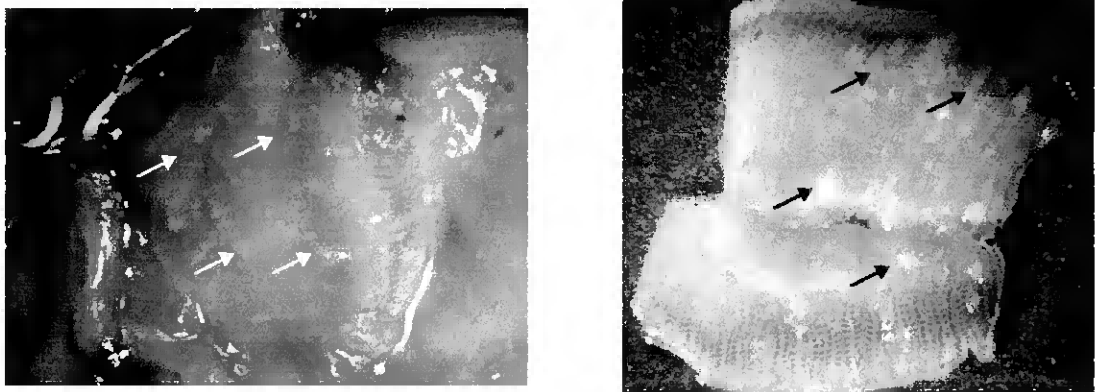
**Figura 13.** Representação esquemática do ciclo de vida de *P. atlanticus* (adaptado de Auzoux Bordenave *et al.*, 1995, Goggin e Lester, 1995 e Azevedo, 1989a).

## 2.5. Sintomatologia e lesões

O órgão alvo de *P. atlanticus* são as brânquias, mas, quando as ameijoas estão fortemente infectadas, estes parasitas encontram-se também no manto, pé, rim, gónadas, intestino e glândula digestiva (Ruano e Cachola, 1986; Villalba *et al.*, 1993; Sagristà *et al.*, 1995).

As ameijoas infectadas apresentam uma capacidade respiratória reduzida, pois a superfície disponível para a respiração é inferior à normal (a área branquial afectada pode atingir os 60%) (Ruano, 1989). Assim, no decorrer do desenvolvimento desta doença, podemos observar os seguintes sintomas (Azevedo *et al.*, 1988; Ruano, 1988; Azevedo, 1991; Ruano e Vigário, 1991; Sagristà *et al.*, 1996):

- i) as ameijoas localizam-se entre o sedimento e a coluna de água, numa tentativa de encontrarem uma zona mais oxigenada;
- ii) apresentam as valvas ligeiramente abertas, devido ao relaxamento dos músculos aductores;
- iii) os indivíduos parasitados são magros e o seu índice de condição é baixo;
- iv) a parte edível tem uma cor pálida e a sua consistência é mole e aquosa;
- v) de modo geral, as brânquias exibem uma coloração anormal acastanhada;
- vi) apresentam nódulos brancos (Fig. 14), de diferentes tamanhos e irregularmente distribuídos, nas lamelas branquiais (quando a intensidade de infecção atinge níveis relevantes).



**Figura 14.** Aspecto dos nódulos característicos da perkinsiose, em brânquias de *R. decussatus*.

A análise estrutural dos tecidos parasitados e dos tecidos circundantes permite identificar uma grande desorganização celular, com numerosas estruturas do tipo lisosomal, o que confere às células uma aparência autolítica e determina, nos casos mais graves, a necrose celular (Azevedo *et al.*, 1988). A lise celular e a ruptura do epitélio branquial junto aos nódulos parasitários são razões importantes que sugerem uma acção directa do parasita (Azevedo, 1991). Segundo Ruano e Vigário (1991), durante a infecção, é possível observar três tipos de lesões características (hemocitose, enquistamento ou encapsulamento e granuloma), cuja incidência é variável em função dos diferentes órgãos infectados. Assim, as formações granulares são observadas em 60% dos casos no tecido branquial e em apenas 10% no tecido conjuntivo da glândula digestiva. Pelo contrário, o encapsulamento parece ser uma lesão mais frequente da glândula digestiva. A hemocitose aparece com elevada frequência, quer associada aos dois casos anteriores quer isoladamente.

## 2.6. Técnicas de diagnóstico da perkinsiose

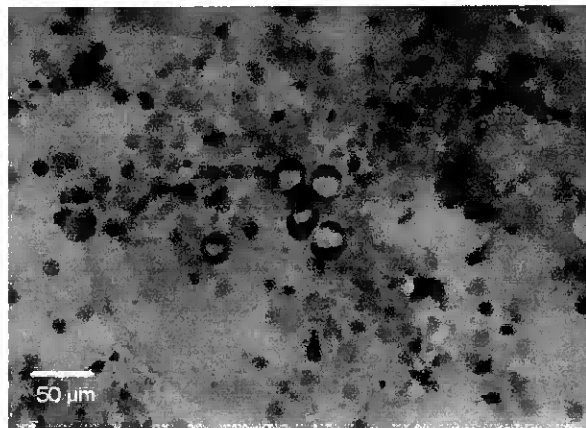
Neste sub-capítulo pretende-se fazer uma abordagem geral a todas as técnicas de diagnóstico que vêm sendo utilizadas para a detecção desta doença, descrevendo-se os seus princípios, vantagens e desvantagens, assim como a técnicas mais sofisticadas, ditas de investigação, mas igualmente importantes, para um reconhecimento mais preciso do agente patogénico. O valor das diferentes técnicas depende da sua aplicação.

### 2.6.1. Esfregaços por aposição

Esta técnica rápida, que consiste em aposições de tecido branquial, manto e glândula digestiva e coloração método May Grünwald - Giemsa ou Hemacolor, permite apenas um rastreio simples, isto é, a estimação, de modo não rigoroso, da prevalência e intensidade da infecção.

As células parasitárias observáveis são os trofozoítos, que se identificam pela sua forma típica de anel (Fig. 15). De modo geral, só quando são visíveis nódulos no tecido branquial (indicador de elevada intensidade de infecção) é que se obtém resposta positiva com esta técnica; daí a sua fraca sensibilidade.

Andrews (1988, 1996), Burreson e Ragone Calvo (1996), Ford (1996) e Soniat (1996) consideraram esta técnica como não valiosa em estudos epizootiológicos.

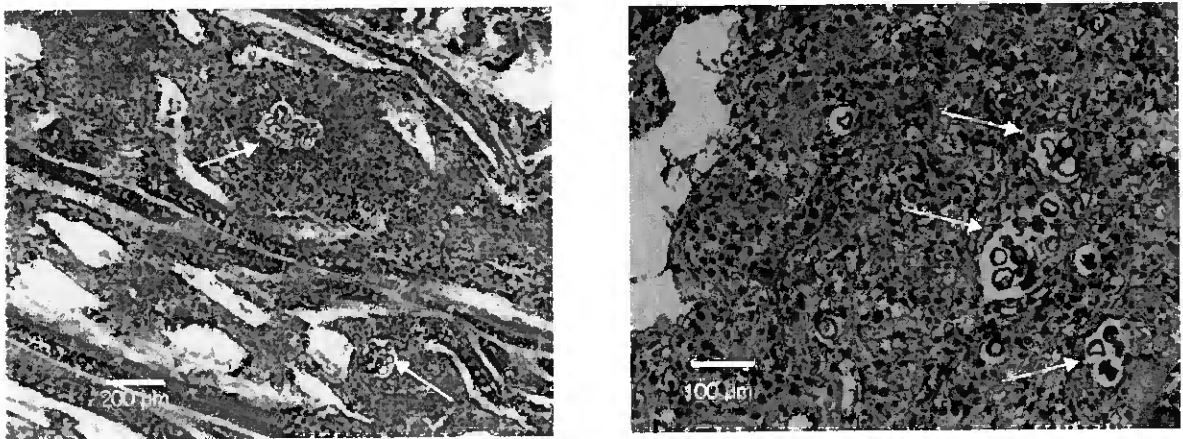


**Figura 15.** Aspecto de um esfregaço de células parasitárias, no estado trofozoíto, coradas com Hemacolor.

### 2.6.2. Histologia

O exame histopatológico também é considerado de reduzida sensibilidade, dando uma elevada percentagem de diagnósticos negativos falsos (Rodríguez e Navas, 1995). Assim, estes autores consideraram que a histologia não é um bom método de diagnóstico de *Perkinsus*; contudo, é muito útil para observar os danos provocados pela infecção e estudar a reacção do hospedeiro.

Estudos de caracterização dos vários tipos de lesões provocadas por *P. atlanticus* (Chagot *et al.*, 1987; Ruano e Cachola, 1986; Ruano e Vigário, 1991; Sagristà *et al.*, 1995) só foram possíveis graças a esta técnica (Fig. 16).



**Figura 16.** Secções histológicas de brânquias parasitadas por *P. atlanticus* e reacção do hospedeiro.

### 2.6.3. Incubação em FTM (Fluid Thioglycollate Medium)

Desde a descoberta de *P. marinus*, através do exame de secções histológicas, que se tem investido em técnicas que reduzissem o tempo, esforço e equipamento requeridos para que o diagnóstico fosse mais sensível e rápido, em especial, no caso de infecções ligeiras.

A técnica descrita por Ray (1952), baseava-se na incubação de tecidos de ostra num meio de tioglicolato modificado, com adição de antibióticos e antimicóticos, para reduzir a contaminação bacteriana e fúngica. A grande vantagem desta técnica consiste no aumento de tamanho dos parasitas, até permitirem uma mais fácil visualização, mas não se multiplicando durante este período de crescimento (Ray, 1952; Stein e Mackin, 1957). As células parasitárias

vão evoluir da fase de trofozoíto para a fase de pré-zoosporângeo. Assim sendo, esta técnica começou a ser utilizada para estimar a intensidade de infecção e a sua prevalência. Em consequência, foi estabelecida uma escala relativa de intensidades para delinear infecções ligeiras, moderadas e fortes. Foram atribuídos valores a seis categorias de intensidade subjectivas e o total era dividido pelo número de indivíduos diagnosticados, obtendo a designada "weighted incidence", isto é, uma intensidade de infecção média da população amostrada.

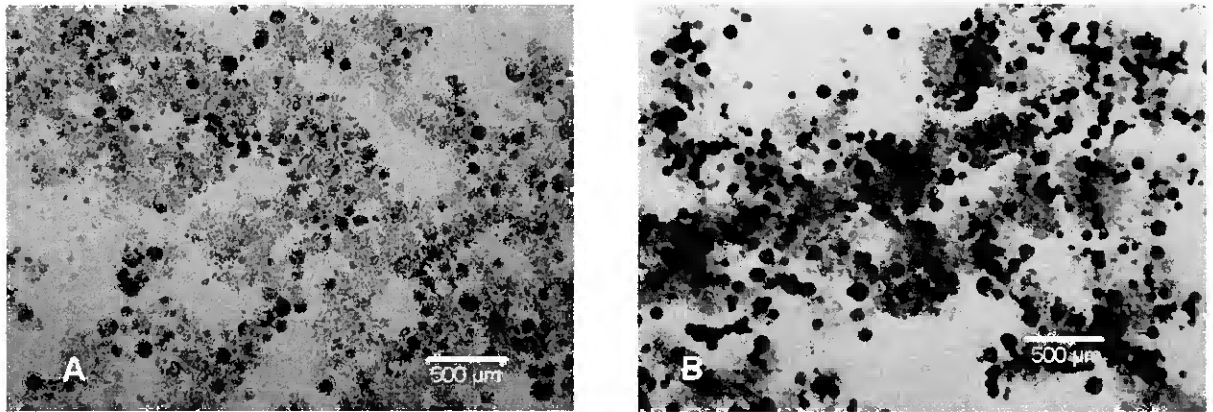
Este método tem sido usado para descrever a epizootiologia da doença originada por *P. marinus* (Andrews, 1988). Apesar de semi-quantitativo, este sistema de taxa tem sido utilizado com sucesso para estabelecer um perfil da progressão da doença, para demonstrar a forte relação entre infecções de elevada intensidade e mortalidades ocorridas, assim como para correlacionar a intensidade de infecção com alterações fisiológicas (Soniati e Koenig, 1982).

Em alternativa, também têm sido adoptadas diferentes escalas de intensidade de infecção, com diferentes níveis, consoante o número de pré-zoosporângeos contados por campo de visão ou por mm<sup>2</sup> (Goggin e Lester, 1987; Goggin *et al.*, 1989; Almeida, 1995).

O maior obstáculo a uma enumeração mais rigorosa dos parasitas é a obstrução das células parasitárias por tecidos do hospedeiro, isto é, não estarem suficientemente isoladas para a quantificação. Normalmente, os tecidos incubados eram as lamelas branquiais, por serem o primeiro órgão de contacto com o agente patogénico, logo aquele onde seria mais provável encontrar o parasita (Almeida, 1995). Também se incubavam a glândula digestiva e o manto, assim como o resto do corpo e a hemolinfa (Rodríguez e Navas, 1995), mas concluiu-se que se obtinham menos resultados negativos falsos quando se utilizava todo o corpo e as brânquias. Utiliza-se apenas a hemolinfa quando os animais não podem ser sacrificados.

Foram realizados então alguns ensaios, e Choi *et al.* (1989) verificaram que, utilizando apenas hidróxido de sódio 2M, o objectivo de eliminar os tecidos do hospedeiro era conseguido, sem alterar a integridade da parede dos pré-zoosporângeos. Vários estudos que se seguiram (Gauthier e Fisher, 1990; Fisher *et al.*, 1992a,b, 1995; Bushek *et al.*, 1994) utilizaram este protocolo de digestão pelo NaOH.

Em 1996, Fisher e Oliver otimizaram o método, utilizando conjuntamente esta técnica de digestão e a totalidade da parte edível da ostra, para a quantificação real da infecção por *P. marinus*; obviamente, a utilização de todo o indivíduo evita a perda de parasitas em tecidos não amostrados. A coloração das células parasitárias com solução de Lugol vai permitir ainda uma melhor visualização e, conseqüentemente, maior precisão na contagem (Fig.17).



**Figura 17.** Células de *P. atlanticus*, após cultura em FTM, antes (A) e depois (B) de coradas com solução de Lugol.

Assim, este é potencialmente o método de diagnóstico mais valioso, pois é quantitativo e sensível para detectar níveis baixos de infecção, além de poder ser utilizado facilmente como rotina. Estes atributos tornam-no num método standard - a partir do qual outras técnicas podem ser avaliadas - e no mais apropriado para estabelecer uma correlação da intensidade da doença com factores biológicos do hospedeiro, tais como crescimento, reprodução e imunologia (Fisher e Oliver, 1996).

#### 2.6.4. Métodos Imunológicos

O desenvolvimento de técnicas de imunologia para diagnóstico de *Perkinsus* tem sido considerado importante, como alternativa ou complemento de outros métodos, permitindo a detecção de células parasitárias nos diferentes estados do seu ciclo de vida. Goggin *et al.* (1991) obtiveram anticorpos monoclonais contra 2 estados do ciclo de vida de *P. atlanticus* (trofozoítos e zoosporos). São específicos do estado, mas ainda não foram completamente caracterizados e testados contra diferentes isolados do parasita.

Para *P. marinus*, já foi descrito o procedimento para a produção de anticorpos e a sua aplicação na identificação e quantificação do parasita (Choi *et al.*, 1991). Também Dungan e Roberson (1993) produziram anticorpos mono e policlonais para a detecção de *P. marinus*. Além de se ligar apenas aos tipos de células conhecidos, o antisoro produzido reconhece também substâncias solúveis e pequenas substâncias particuladas não celulares presentes nos tecidos adjacentes aos focos de proliferação do agente patogénico. O sinal era inexistente em tecidos não infectados e diminuía com a maior distância dos focos das lesões.

Corbier *et al.* (1997) produziram anticorpos policlonais contra trofozoítos de *P. marinus* e pretendem desenvolver testes quantitativos do parasita. É este tipo de análises que permite um melhor conhecimento da actividade e composição das substâncias imunoreactivas e o seu potencial papel na patogénese da doença.

#### **2.6.5. Métodos de Biologia Molecular**

O desenvolvimento de sondas específicas para o ADN do parasita e/ou primers de PCR permite refinar ainda mais as ferramentas disponíveis para detectar o parasita no seu hospedeiro, em outras espécies e no ambiente marinho. Além disso, a informação genética obtida através do desenvolvimento das sondas pode ser utilizada para estudos de filogenia. São exemplo, os trabalhos de Stokes e Burreson (1995) e de Stokes *et al.* (1995a, 1997), nos quais se extraiu, purificou, amplificou e clonou ADN genómico de *Haplosporidium nelsoni* (outro parasita da ostra americana), com a finalidade de hibridar em amostras de secções de tecido infectado. Outros estudos, partindo da caracterização de pequenas sub-unidades (SSU) do gene ARN ribossomal, foram realizados para a detecção de *Minchinia teredinis* (Stokes *et al.*, 1995b) e de *P. marinus* (Fong *et al.*, 1993). Também Coss *et al.* (1997) utilizaram a técnica de PCR para detectar e quantificar *P. marinus* em invertebrados marinhos. Pernas *et al.* (1997) amplificaram um segmento de 16sARN de *P. atlanticus* usando diferentes pares de primers conservados; além disso, um primer específico foi utilizado para amplificar o ADN do parasita. Estas podem ser consideradas ferramentas sensíveis usadas para a detecção e identificação de pequeno número de parasitas nos tecidos da ameijoia.

## 2.7. Influência de diferentes factores no desenvolvimento desta epizootia

Vários são os factores ambientais que têm sido estudados, como responsáveis pelas diferentes formas de desenvolvimento da doença, assim como o seu efeito nos hospedeiros.

Contudo, em ensaios *in vitro*, há que ter em conta que o parasita está sujeito a condições artificiais e, por isso, os resultados poderão não traduzir exactamente o que se passa nas zonas de cultivo de bivalves; tal como foi verificado por Goggin *et al.* (1990), formas isoladas do parasita são mais susceptíveis a variações ambientais do que quando estes se encontram rodeados pelo tecido do hospedeiro.

Para *P. marinus*, são exemplo os estudos de variações de temperatura (Chu e Greene, 1989; Goggin *et al.*, 1990; Wilson *et al.*, 1990; Fisher *et al.*, 1992a; Fisher *et al.*, 1992b; Burreson e Ragone Calvo, 1996; Soniat, 1996; Chu e Volety, 1997), salinidade (Chu e Greene, 1989; Goggin *et al.*, 1990; Chu e La-Peyre, 1991; Fisher *et al.*, 1992a; Fisher *et al.*, 1992b; Ragone e Burreson, 1993; Burreson e Ragone Calvo, 1996; Soniat, 1996; Chu e Volety, 1997), cloro (hipoclorito de sódio) (Goggin *et al.*, 1990), poluentes (Wilson *et al.*, 1990; Chu e Hale, 1994; Chu, 1996; Soniat, 1996;), actividades humanas (Soniat, 1996), alimentação (Fisher *et al.*, 1992a), época de reprodução (Wilson *et al.*, 1990), idade (Soniat, 1996), densidade (Soniat, 1996) e dose letal (Chu e Volety, 1997).

Apesar destes factores estarem, sem dúvida, interrelacionados, a mortalidade das ostras parece estar mais intimamente relacionada com a temperatura elevada (Fisher *et al.*, 1992b). Esta doença é basicamente uma "doença de Verão", causando picos de mortalidade em Agosto e Setembro, quando os valores de temperatura e salinidade são máximos. Para se observarem elevadas taxas de infecção, a temperatura deve ser superior a 25°C, enquanto que valores de temperatura inferiores a 10°C parecem inibir o desenvolvimento das células parasitárias.

A salinidade também tem sido considerada como um factor importante, dado que as intensidades de infecção e as mortalidades a elas associadas são maiores em águas mais salgadas; a exposição a baixas salinidades tende a atrasar o desenvolvimento de fortes infecções e a diminuir a incidência da infecção (Chu e La-Peyre, 1991).

Além da temperatura e salinidade ambientais, a concentração de células de *P. marinus* também tem sido considerada como um factor crucial para a transmissão da doença; observa-se um aumento de prevalência e de intensidade de infecção com o aumento da dose de células parasitárias (Chu e Volety, 1997). Tem-se também tentado determinar qual o número mínimo de células infecciosas necessário para desencadear o processo de infecção.

Um outro factor intrínseco ao próprio hospedeiro - a idade - tem sido apontado como influenciador da intensidade de infecção. Isto pode ser resultado de infecções múltiplas e/ou de multiplicação do parasita nos tecidos (Ray, 1953; Ruano, 1989; Goggin, 1996).

No que diz respeito particularmente a *P. atlanticus*, Vigário e Ruano (1991) verificaram, através de estudos *in vitro*, que temperatura próxima de 24°C e salinidade entre 25 e 35‰ são condições ideais para o desenvolvimento dos esporângios, levando à libertação dos zoosporos. Os pré-zoosporângios são, no entanto, resistentes a baixas temperaturas durante alguns dias.

Para os valores de pH, Auzoux-Bordenave *et al.* (1995) observaram uma percentagem de esporulação mais elevada entre 6,0 e 8,0.

Quanto à concentração de oxigénio dissolvido, este não parece afectar significativamente a esporulação, apenas se notando um ligeiro atraso em condições de maior carência de oxigénio.

As condições ambientais, testadas *in vitro*, que permitem um melhor desenvolvimento de *P. atlanticus* aproximam-se das verificadas dos bancos de cultura de ameijoas no Algarve (Vigário e Ruano, 1991).

Estes estudos de tolerância do parasita aos vários factores - ambientais e biológicos - são, geralmente, efectuados com um intuito prático, isto é, tentar descobrir se há possibilidade de controlar o parasita - ou mesmo eliminá-lo - durante o processo de infecção.

## 2.8. Investigações laboratoriais de patogenicidade, susceptibilidade e transmissão de *Perkinsus*

De modo a verificar as observações de campo e alcançar uma melhor compreensão do processo causador da doença e da dinâmica da sua transmissão na natureza, têm-se vindo a efectuar numerosos estudos em que se investigou a susceptibilidade, infecção e transmissão do parasita entre os seus hospedeiros.

São de grande interesse os estudos da patogenicidade dos diferentes estados do ciclo de vida do parasita e das vias de transmissão, assim como as dosagens necessárias para que a infecção se concretize.

A doença causada por *P. marinus* é infecciosa e pode ser transmitida de ostras infectadas para outras não infectadas. Quando estas últimas são colocadas num mesmo recipiente com ostras parasitadas por *P. marinus*, vão também ser infectadas.

Todos os estados do ciclo de vida identificados deste parasita (trofozoítos, pré-zoosporângeos e zoosporos biflagelados) podem causar infecção (Chu, 1996). Contudo, ainda não é bem conhecido qual é o estado mais efectivo e qual o principal estado responsável pela transmissão da doença no meio natural, mas sabe-se que quando estão na fase de trofozoítos são mais infecciosos que na fase de pré-zoosporângeos; a patogenicidade dos zoosporos não foi comparada (Chu e Volety, 1997).

Os estudos realizados por Goggin *et al.* (1989) demonstraram que a origem dos parasitas (zona temperada, tropical ou sub-tropical) não afecta a capacidade do isolado ser transferido para moluscos de outros locais. Além disso, isolados de gastrópodes foram transferidos para bivalves, e vice-versa, indicando um baixo nível de especificidade de hospedeiro deste(s) parasita(s).

Relativamente a *P. atlanticus*, parece que os seus zoosporos podem infectar *R. decussatus*, *R. philippinarum* e *Venerupis pullastra*, e o parasita é capaz de se multiplicar no seu interior (Rodriguez *et al.*, 1994).

## 2.9. Efeitos fisiológicos sub-letais da perkinsiose

A maioria dos estudos sobre os efeitos de doenças de bivalves diz respeito ao crescimento e mortalidade. Ainda que estes dados fisiológicos sejam essenciais para determinar os efeitos das doenças nas populações, pouco se tem investigado acerca dos seus efeitos fisiológicos sub-letais (Paynter, 1996).

Tipicamente, as infecções causam reduções significativas na taxa de crescimento, e, alguns estudos, revelam também reduções do índice de condição (Menzel e Hopkins, 1955; Choi *et al.*, 1989; Paynter e Burrenson, 1991; Saunders *et al.*, 1992; Paynter *et al.*, 1993). O decréscimo deste último índice pode ser resultado da perturbação do metabolismo dos aminoácidos livres, causada pela infecção. Além disso, os efeitos no metabolismo dos aminoácidos livres podem estar associados às alterações induzidas pelo parasita ao nível das funções mitocondriais (Paynter, 1996). As concentrações de taurina e ácido aspártico estão positivamente correlacionadas com os níveis de infecção por *Perkinsus*; as concentrações de glicina, alanina, isoleucina, leucina,  $\beta$ -alanina, arginina e aminoácidos totais livres decrescem com o aumento do parasitismo. A proporção molar taurina-glicina é usada como uma medida bioquímica do stress; assim, a elevada correlação entre este rácio e o nível de parasitismo por *Perkinsus*, sugere que este parasita pode ser um agente de stress (Soniati e Koenig, 1982).

Dado que são os aminoácidos livres os principais componentes orgânicos da regulação osmótica, Paynter e Pierce (1992) e Paynter *et al.* (1995) indicaram que a infecção por *P. marinus* pode alterar a capacidade das ostras aquando da regulação da água intracelular e das variações de salinidade.

A condição fisiológica das ameijoas parece ser afectada pela presença de *P. atlanticus*, mas apenas quando estas estão fortemente infectadas, apresentando uma redução significativa do índice de condição (de 10 a 20%); não se detectam efeitos significativos nas restantes classes de intensidade de infecção (Villalba, *et al.*, 1997). A prevalência da infestação deste parasita pode atingir, em ameijoas adultas, valores extremamente elevados e a gravidade e extensão das lesões branquiais aumentam significativamente a fragilidade dos indivíduos (GEA, 1988).

A ostra americana é altamente susceptível à infecção por *P. marinus*, parasita que causa paragem do crescimento e a morte (Newell *et al.*, 1993a; Powell *et al.*,

1996). A progressão desta doença sugere que o parasita pode interferir com funções fisiológicas de rotina, tais como as apontadas por Newell *et al.* (1993b): redução da incorporação de alimento, aumento da taxa metabólica e decréscimo da eficiência de assimilação.

Na infecção por *P. marinus*, pode ocorrer um número significativo de perturbações na fisiologia do hospedeiro. Dadas as alterações do pH da hemolinfa associadas com a infecção, pode esperar-se que quase todas as funções mediadas por células - incluindo batimento dos cílios, respiração, absorção de nutrientes e excreção - possam ser afectadas. Certamente, a acidose pode inibir a calcificação, conduzindo à paragem do crescimento da concha associada à infecção. Pode também alterar as características da membrana, pelo retardamento na incorporação de aminoácidos (Paynter, 1996).

Nos estados mais avançados desta parasitose, os cistos e a reacção celular produzem um colapso nos tecidos que, por sua vez, induz uma diminuição da capacidade respiratória dos bivalves, mas não dos parasitas, visto que estes são viáveis após incubação em condições de anaerobiose (Montes *et al.*, 1995b).

Também a capacidade reprodutiva pode ser afectada por estes parasitas, como demonstraram os trabalhos de Paynter e Burreson (1991) e Kennedy *et al.* (1995). Estes autores postulam que *C. virginica* pode compensar o stress causado por infecções ligeiras por *P. marinus*, "protegendo" a gametogénese e a desova, transferindo a energia destinada ao crescimento para a reprodução. Contudo, verificaram que, quando as ostras estão mais intensamente infectadas, a sua capacidade reprodutiva é severamente reduzida.

## **2.10. Reacção de defesa à infecção por *Perkinsus***

Na relação hospedeiro-agente patogénico, o sucesso ou insucesso do agente estabelecer a infecção no hospedeiro depende da eficácia do sistema de defesa interno do hospedeiro para eliminar o invasor ou da capacidade do agente patogénico evitar essa defesa. É geralmente aceite que a imunocompetência do hospedeiro é dirigida por factores genéticos e mediada por regimes ambientais extrínsecos. A compensação de stress ambiental excessivo pode competir por reservas energéticas que poderiam estar disponíveis para os mecanismos de

defesa. Do mesmo modo, a patogenicidade do agente patogénico é geneticamente controlada e afectada por factores ambientais (Chu e La-Peyre, 1993a).

Análises hematológicas de ameijoas doentes revelam que o número total de hemócitos e a percentagem de células mortas na hemolinfa e nos fluidos extrapaleais periférico e central é significativamente superior do que em indivíduos saudáveis. A actividade da lisozima no fluido extracelular é também mais elevado em indivíduos doentes. Estas alterações do número de hemócitos total e da actividade da lisozima podem ser considerados como respostas celulares e humurais à agressão microbiana (Allam *et al.*, 1997).

Os valores de número total de hemócitos não variam significativamente quando as ostras estão apenas ligeiramente infectadas, mas, quando as intensidades de infecção são consideradas moderadas ou fortes, o número de hemócitos aumenta. Estas células produzem intermediários reactivos de oxigénio citotóxicos que medeiam a destruição dos agentes patogénicos e/ou das células afectadas dos tecidos do hospedeiro (Anderson *et al.*, 1993; Anderson *et al.*, 1995). Os hemócitos das ostras fortemente infectadas por *Perkinsus* produzem níveis significativamente superiores de quimioluminescência do que os originários de indivíduos que apresentam infecções ligeiras ou moderadas. Além desta aumento, o número total de hemócitos circulantes também é mais elevado em animais intensamente parasitados (Anderson *et al.*, 1992).

Por outro lado, Chu e La Peyre (1993b) e Garreis *et al.* (1996) sugerem que *P. marinus* tem capacidade de modular alguns parâmetros celulares e humurais da ostra americana; verificaram que os produtos extracelulares secretados pelo parasita, a partir dos quais foi purificado um grupo de proteases, determinavam a diminuição dos hemócitos, da actividade da lisozima e da hemaglutinina. Também Volety e Chu (1995) sugerem que as células parasitárias têm capacidade de suprimir a libertação de intermediários de oxigénio reactivo pelos hemócitos de ostra, evitando assim estes componentes da defesa do hospedeiro. La Peyre *et al.* (1995) corroboram esta observação, demonstrando que não há aumento de metabolitos de oxigénio aquando da destruição intracelular de *P. marinus*, pois não verificaram aumento da quimioluminescência em hemócitos expostos a trofozoítos do parasita.

Também a fosfatase ácida pode estar envolvida no modo de evitar as defesas do hospedeiro por parte do parasita. Os trofozoítos apresentam uma actividade desta enzima significativamente superior, quando comparada com os pré-zoosporângios. Um aumento da temperatura de cultivo resulta num aumento da proliferação de *Perkinsus* concomitante com a secreção de fosfatase ácida. Também estudos ultraestruturais revelaram que uma actividade mais intensa da enzima ocorre no núcleo do parasita; baseada nesta distribuição, é sugerido que a fosfatase ácida pode ter um papel nos eventos que conduzem à regulação do ciclo celular (Volety e Chu, 1997).

Relativamente às ameijoas parasitadas por *Perkinsus*, Montes *et al.* (1995a) estudaram o componente principal segregado em volta dos trofozoítos de *Perkinsus* e descreveram o polipéptido Mr 225 kDa, que constitui o primeiro factor específico de tecidos descrito nos mecanismos de defesa de moluscos. Montes *et al.* (1996) demonstraram, em *R. decussatus* e em *R. semidecussatus*, a existência de dois polipéptidos muito semelhantes, a nível molecular e funcional, especificamente relacionados com a defesa destes moluscos contra a infecção causada por *Perkinsus*. Verificaram ainda que são específicos da reacção ao nível do tecido conjuntivo.

---

---

**Capítulo III**



**MATERIAL**

**E**

**MÉTODOS**

---

---

## 1. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO DA PERKINSIOSE

A primeira fase deste trabalho consistiu na aplicação dos vários métodos de diagnóstico de *Perkinsus*, correntemente utilizados, e na comparação da sua especificidade e sensibilidade; também se tentou enveredar por métodos ditos de investigação, de modo a se obter uma “ferramenta” o mais precisa possível de identificação e detecção do parasita.

Antes de descrever as metodologias aplicadas, e visto que um dos objectivos foi testar os próprios métodos, torna-se importante iniciar uma ligeira reflexão acerca dos princípios de validação dos métodos de diagnóstico das doenças infecciosas. A validação é a avaliação de um processo para determinar a sua aptidão para um caso particular. Um teste validado produz resultados que identificam a presença de um determinado factor e permite que se façam previsões sobre o assunto estudado. Contudo, para o diagnóstico de doenças infecciosas, a identificação e a definição dos critérios requeridos para a validação dos testes são imprecisos, e os processos que conduzem a esta validação não estão standardizados.

Considerando as variáveis que afectam a eficiência dos testes, os critérios a utilizar podem tornar-se mais claros. As variáveis podem ser agrupadas em três categorias: (a) a amostra - interacção hospedeiro / organismo; (b) o sistema de ensaio - factores físicos, químicos, biológicos e outros relacionados com os próprios técnicos; e (c) o resultado do teste - capacidade de se obterem resultados precisos que relacionem os sistema de ensaio com o estado do organismo relativamente ao factor em questão que está a ser analisado.

O valor de qualquer técnica de diagnóstico depende da obtenção de determinados padrões de sensibilidade, especificidade, precisão e exactidão (Bushek *et al.*, 1994). E estes padrões devem ser continuamente equilibrados com os custos, exequibilidade, capacidade técnica e finalidade. Raramente se conseguem adoptar metodologias que preencham todos estes requisitos, daí que, na maioria dos casos, o diagnóstico de uma doença seja realizado com base em mais do que uma técnica específica.

## 1.1. Descrição dos métodos

### 1.1.1. Esfregaços por aposição

Após a exposição das brânquias, retirou-se uma pequena porção, a qual foi lavada com água do mar filtrada esterilizada (para eliminar o máximo de bactérias e pequenas partículas aderidas à superfície das lamelas branquiais); secou-se ligeiramente sobre papel absorvente e fizeram-se várias aposições numa lâmina de vidro. Deixou-se secar ao ar e processou-se à coloração, utilizando Hemacolor<sup>®</sup> (Merck), um kit de coloração rápida de esfregaços de sangue (Anexo I).

### 1.1.2. Histologia

O exame histopatológico consistiu na fixação de metade de cada ameijoia (tendo o cuidado de amostrar todos os órgãos e, especialmente, as brânquias) em Líquido de Davidson (Anexo II - A) durante, pelo menos, uma semana; após este período de preservação dos tecidos, que previne a sua autólise e a putrefacção, as amostras foram processadas automaticamente durante as fases de desidratação e impregnação em parafina num processador de tecidos Tissue-Tek II (Anexo II - B). Os tecidos foram cortados em secções de 3  $\mu$ m de espessura (micrótomo automático Leica Jung RM 2055 ou micrótomo manual Leitz 1512) e corados com hematoxilina de Harris e eosina (Anexo II - C), segundo o procedimento descrito no anexo II - D.

### 1.1.3. Incubação em FTM (Fluid Thioglycollate Medium)

Em alguns estudos, apenas se incubavam as lamelas branquiais, visto ser este o órgão alvo de *P. atlanticus*. Todavia, e tendo como base o protocolo descrito por Fisher e Oliver (1996) para a quantificação de *P. marinus* na ostra americana, fez-se uma adaptação para a ameijoia, podendo, assim, não só obter uma estimação do grau de infecção, mas determinar com exactidão a quantidade de parasitas existente em cada indivíduo infectado. Esta técnica compreende três etapas:

### 1) *Incubação em meio tioglicolato*

Abre-se a ameijoia, elimina-se a água existente na cavidade intervalvar com um papel absorvente e pesa-se a parte edível. Esta é cortada em pequenas porções ou triturada num Ultra-Turax (durante alguns segundos a  $\pm 10000$  rpm), o que permite uma melhor homogeneização dos tecidos e um contacto mais eficaz com o meio de cultura. O homogeneizado é então incubado em 20 ml de meio tioglicolato de sódio (Anexo III - A), durante 3 a 4 dias, ao abrigo da luz e à temperatura ambiente. Após este período de crescimento das células parasitárias, esta mistura é centrifugada (2500 rpm, durante 10 minutos) e o sobrenadante (meio de cultura) é rejeitado.

### 2) *Lise dos tecidos*

De modo a isolar os parasitas, e, assim, facilitar a sua contagem, efectua-se a lise dos tecidos da ameijoia, que vão ser digeridos com a adição de 20 ml de solução de hidróxido de sódio 2M. Esta suspensão é incubada em banho-maria a 60°C durante 1 a 3 horas, dependendo da degradação dos tecidos. Quando apresenta um aspecto transparente, a lise é interrompida, através de lavagens sucessivas com água destilada, que consistem em centrifugar (2500 rpm, 10 min), rejeitar o sobrenadante, pelo menos três vezes, de modo a eliminar todo o NaOH.

### 3) *Coloração com solução de Lugol e quantificação das células parasitárias*

Ressuspende-se bem o precipitado obtido com 1 ml de solução de Lugol 4% (Anexo III - B). Deposita-se então uma alíquota de 100  $\mu$ l sobre um filtro de 0.22  $\mu$ m de porosidade e reticulado (de preferência). Contam-se, ao microscópio óptico (ampliação: 100x), todas as células esféricas de cor azul-negro e o valor obtido é multiplicado por 10 (factor de diluição). O resultado é o número de parasitas existente na ameijoia. Quando a infecção é ligeira, conta-se toda a amostra; pelo contrário, se a densidade de células for muito elevada, dilui-se novamente a amostra, aplicando ao resultado o factor de diluição utilizado. Para que seja possível comparar resultados, uniformiza-se esta quantificação, dividindo o número total contado pelo peso da parte edível da ameijoia obtido inicialmente. Assim, o resultado final é a intensidade de infecção, que se traduz pelo número de parasitas existente por grama de peso húmido de tecido.

#### 1.1.4. Métodos Imunológicos

Para a aplicação destas técnicas, foram recuperados hibridomas preparados por Goggin (1991) contra os estados de pré-zoosporos e zoosporos de *P. atlanticus*.

##### 1.1.4.1. Preparação de macrófagos e descongelação dos hibridomas

Para preparar a descongelação dos hibridomas armazenados em azoto líquido, prepararam-se placas de cultura de 6 poços e frascos com macrófagos, cuja função era fagocitar as células mortas e os microrganismos eventualmente presentes e metabolizar o meio de cultura.

O método utilizado para a obtenção dos macrófagos foi o seguinte: ratinhos Balb/c foram sacrificados, por asfixia com clorofórmio ou por distensão e ruptura da coluna vertebral, e, após desinfectada a pele, o abdómen foi cuidadosamente aberto, sem danificar o peritoneu; depois injectava-se na cavidade abdominal 5 ml de meio RPMI 1640 (Anexo IV - A), ao qual tinha sido previamente adicionado 10% de soro fetal de bovino. A cavidade abdominal era então ligeiramente massajada e este líquido aspirado, tendo o cuidado de não perfurar os intestinos, de modo a não haver contaminação. Seguidamente, o líquido obtido era centrifugado (900 rpm, 10 min, 4°C) e o sobrenadante rejeitado. O precipitado era ressuspensão em 10 ml de meio RPMI, e as células contadas (um ratinho permite obter entre  $1.5$  e  $3 \times 10^6$  macrófagos). Depois eram repartidas pelos frascos deitados, numa razão de  $3 \times 10^5$  células por frasco, 24 horas antes de cultura dos hibridomas e incubadas numa estufa a 37°C com 5-10% de CO<sub>2</sub>.

Imediatamente antes da descongelação dos hibridomas, o meio de cultura era eliminado por aspiração, uma vez que os macrófagos já estavam em crescimento e se encontravam aderidos ao fundo. A descongelação das ampolas contendo os hibridomas fez-se rapidamente, num banho-maria a 37°C, e a suspensão destas células era transferida para tubos contendo 15 ml de meio e centrifugada, para eliminar a solução de conservação DMSO, em que se encontravam preservados os hibridomas. O precipitado de células era ressuspensão em meio RPMI e colocado em cultura nos frascos em que se encontravam os macrófagos activos.

A cultura era mantida em presença de CO<sub>2</sub>, a 37°C, e observada diariamente ao microscópio de inversão, para verificar se as células se multiplicavam e se não havia contaminação bacteriana, o que inviabilizaria a cultura.

#### **1.1.4.2. Recuperação dos anticorpos**

Quando as células se encontravam na fase de crescimento mais activo, eram ressuspensas para tubos de centrifugação estéreis, onde eram centrifugadas (900 rpm, 10 min, 4°C). O sobrenadante, contendo os anticorpos, era recolhido e congelado a -20°C; com as células (precipitado) retomava-se a cultura em meio RPMI ou armazenavam-se novamente, procedendo-se à sua congelação para posterior utilização.

#### **1.1.4.3. Congelação dos hibridomas**

É na fase de crescimento exponencial dos hibridomas que se deve proceder à sua congelação, pois há uma percentagem mínima de células mortas; nesta fase de crescimento activo, existem aproximadamente 3 a 4 x 10<sup>5</sup> cél/ml.

Num pequeno tubo de vidro, juntam-se 100 µl de suspensão de células e 100µl de Azul de Trypan 2x e contam-se as células não coradas de azul (as que têm afinidade para o corante são células mortas) numa câmara de Malassez ou de Burker. Esta quantificação, que permite estimar a quantidade total de células em cultura, deve ser efectuada, pois a concentração final que se deve obter para congelar as células é de 3 a 4 x 10<sup>6</sup> cél/ml.

A suspensão de células é centrifugada a 1800 rpm, durante 8-10 minutos, a 10°C e o sobrenadante é rejeitado. O precipitado é ressuspenso num determinado volume (calculado para obter a concentração de células acima referida) de DMSO (Anexo IV - B) mantido em gelo; rapidamente, é distribuído 1 ml desta solução de células com DMSO em cada ampola esterilizada, e colocada de imediato no gelo. Deixam-se 48 horas no congelador a -80°C e, depois, transferem-se para azoto líquido.

Deve efectuar-se um controlo da congelação dos hibridomas, procedendo-se, após uma semana, à descongelação de uma ampola escolhida aleatoriamente e relançar a cultura para verificar a viabilidade das células.

#### 1.1.4.4. Imunofluorescência indirecta

Os testes de imunofluorescência foram realizados sobre citocentrifugações (500 rpm, 1 minuto) de suspensões de parasitas, realizadas sobre lâminas histológicas previamente preparadas com uma gota de poli-D-lisina 0.01% (para melhorar a aderência das células). As lâminas foram fixadas por imersão em acetona, durante 10 minutos. Estas preparações foram utilizadas imediatamente ou conservadas no congelador a -20°C.

Lavaram-se as lâminas (2 x 10 minutos) em tampão fosfato PBS 1x (Anexo IV - C) e saturaram-se com lactose (Régilait 6% - diluído em PBS) durante 1 hora, em câmara húmida, à temperatura ambiente. Sem lavar, incubou-se, também em câmara húmida e durante 1 hora, o primeiro anticorpo (obtido através do procedimento descrito em 1.4.2.); uma lâmina foi incubada apenas com PBS, como controlo negativo. Seguidamente, procedeu-se às lavagens das lâminas com PBS (3 x 10 min) e à incubação do segundo anticorpo (denominado conjugado ou anticorpo marcado com fluorescência; Anexo IV - D), durante uma hora, ao abrigo da luz. Lavaram-se as lâminas com PBS (3 x 5 min) e montaram-se as lamelas com uma gota de glicerina tamponizada.

A observação realizou-se ao microscópio de epifluorescência. A fluoresceína permite visualizar e localizar as células marcadas pelos anticorpos, através de emissão de fluorescência verde; o Azul de Evans, usado na composição do conjugado vai mascarar a eventual fluorescência natural das células e produzir uma coloração de fundo vermelha.

#### 1.1.4.5. Immunoperoxidase

Este método é similar à imunofluorescência, exceptuando-se algumas etapas. Antes da saturação, em Régilait, inibiu-se a peroxidase endógena, utilizando um banho de metanol e 3% de peróxido de hidrogénio puro (15 minutos). De seguida, lavou-se com PBS e prosseguiu-se com a saturação.

O conjugado, neste método, é marcado com peroxidase e diluído 1/400 em PBS.

No final, após as lavagens, procedeu-se à etapa da revelação, que consiste num banho de PBS (100 ml) contendo 60 mg de DAB (3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride) e 30 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, durante 15 minutos ao abrigo da luz e sob agitação ligeira. Seguiram-se duas lavagens de 5 minutos em PBS e a contra-coloração (Azul de UNNA puro - 5 segundos; água com uma gota de ácido acético - mergulhar as lâminas 2 ou 3 vezes; álcool 95°; álcool 100°; xilol - passagens rápidas). As lamelas foram montadas com uma gota de resina Eukitt.

Através da observação ao microscópio óptico, diferenciam-se as células marcadas com a peroxidase (com cor castanha); o Azul de UNNA permite corar as células não marcadas, obtendo-se, assim, um melhor contraste.

### **1.1.5. Métodos de Biologia Molecular**

#### **1.1.5.1. Extração de ADN**

Como a membrana das células de *Perkinsus*, após a cultura em tioglicolato, se torna mais espessa, a lise realizada segundo o método normal de extração de ADN não era suficientemente forte para expor as cadeias deste ácido nucleico. Por esta razão, procedeu-se a sucessivas congelações e descongelações das células parasitárias; entre cada repetição deste procedimento, observou-se o estado das células ao microscópio, pois, se estas se corrompessem demais, correr-se-ia também o risco de quebrar as moléculas de ADN genómico.

O precipitado de células foi então ressuspenso num tampão de extração (Anexo V - A), ao qual se juntou 0.5 mg/ml de proteinase K; a digestão ocorria durante uma noite a 37°C.

No final da incubação, adicionou-se um volume de fenol e um volume da mistura clorofórmio / álcool isoamílico (24/1); centrifugou-se a 4000 rpm, durante 10 minutos, a 4°C.

A fase aquosa (superior) era transferida para outro Eppendorf e o ADN contido nesta fase era precipitado, adicionando ½ volume de acetato de amónio 3M e 2 volumes de etanol absoluto a -20°C. Deixou-se no congelador (-20°C) durante uma hora e, seguidamente, centrifugou-se (13000 rpm, 10 min, 4°C) e eliminou-se o sobrenadante. O precipitado foi lavado, utilizando etanol a 70% e centrifugado

novamente (13000 rpm, 10 min, 4°C); o sobrenadante foi totalmente eliminado e o precipitado seco sob vácuo durante cerca de 15 minutos. Seguidamente, foi ressuspenso em água bi-destilada estéril. Para avaliar a qualidade do extracto de ADN, retirou-se uma alíquota e procedeu-se a electroforese em gel de agarose (0.7%), contendo brometo de etídio. O restante era congelado a -20°C.

Quando necessário eliminar a contaminação por ARN, adicionou-se 10mg/ml de RNase e incubou-se durante 1 hora a 37°C. Depois, repetiu-se a extracção fenol / clorofórmio, seguida da etapa de precipitação.

Seguindo o mesmo método, realizaram-se também extractos de *P. marinus* e de tecido branquial e de pé de ameijoas não parasitadas.

#### 1.1.5.2. PCR (“Polymerase Chain Reaction”)

Utilizou-se a metodologia de PCR para tentar amplificar um fragmento do ADN genómico de *P. atlanticus*, o qual poderia vir a ser usado como sonda no diagnóstico da infecção de ameijoas por este parasita. Para tal, utilizaram-se 4 pares de primers (Anexo V - B).

Preparou-se a mistura reaccional (“mix”), contendo os elementos necessários à polimerização do ADN: meio tamponado, MgCl<sub>2</sub>, solução dos 4 nucleótidos fostatados - dNTPs (dATP, dTTP, dGTP e dCTP), um par de primers e, por último, uma enzima ADN-polimerase termo-resistente, purificada a partir de *Thermus aquaticus*, (*Taq*-polimerase).

Foi adicionado o ADN extraído de culturas de *P. atlanticus* e, como controlo positivo da reacção, utilizou-se ADN de *P. marinus* e o par de primers específicos (300F e 300R).

Realizaram-se 30 ciclos de amplificação (através de um Thermocycleur Stratagene) que compreendem 3 etapas:

*1ª etapa: desnaturação* - as 2 cadeias que constituem o ADN são separadas, obtendo-se ADN de cadeia simples que servirá de matriz para a amplificação posterior; ocorre a 94°C, durante 1 minuto;

*2ª etapas: hibridação* ou “annealing” - os primers hibridam, de forma específica, sobre a matriz de ADN, de uma e de outra parte da sequência alvo de

amplificação, para iniciar a polimerização; a duração desta etapa é também de 1 minuto, e foram testadas várias temperaturas de hibridação (entre 45 e 58°C);

3ª etapa: alongamento - nesta última etapa, a enzima polimeriza uma cadeia de ADN de sequência complementar, iniciando na extremidade 3' dos primers; esta alongação é realizada a 72°C durante 1 minuto.

Após os 30 ciclos, o número de cópias da sequência alvo de ADN que se pretende multiplicar é da ordem de  $2^{30}$ .

Os produtos da amplificação foram analisados por electroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio e o seu tamanho calculado por comparação da sua migração com a do marcador de peso molecular.

#### **1.1.5.3. Clonagem de ADN de *P. marinus* amplificado por PCR**

Realizou-se novamente um PCR com ADN de *P. marinus* (pois era o de qualidade superior) a diferentes temperaturas, visualizou-se o resultado dos vários produtos da reacção e escolheu-se o que originou uma melhor banda para realizar a clonagem. Para tal, utilizou-se o Original TA Cloning® Kit (Invitrogen) e seguiu-se o procedimento dele indicado para as diferentes fases: clonagem num vector pCR®2.1, transformação e análise.

Após a identificação das colónias de bactérias que continham os plasmídeos recombinantes, recolheram-se algumas colónias que se colocaram a crescer em meio LB, ao qual se adicionou solução X-Gal. Os plasmídeos contendo o "insert" foram então purificados através do método "Quick Plasmid Miniprep by boiling".

No final, para avaliar se a clonagem tinha funcionado e determinar qual o tamanho dos clones, fez-se uma digestão do plasmídeo e correu-se o resultado num gel de agarose (1%) com brometo de etídio.

## 1.2. Comparação dos métodos histologia e incubação em FTM

De modo a comparar a sensibilidade e a especificidade do método utilizado como rotina no diagnóstico de *P. atlanticus* - a histologia - e o método de cultura em FTM, realizaram-se vários ensaios, com um número de indivíduos estatisticamente representativo, requerido para encontrar um espécimen infectado numa população, com mais de 1 milhão de indivíduos e cuja incidência da doença é de 5%, com um limite de confiança de 95%, ou seja, 60 ameijoas (Dear, 1989).

### 1.2.1. ENSAIO I

Ameijoas, *R. decussatus*, da mesma população, cultivadas em viveiros da Ria Formosa (Algarve), onde se têm vindo a registar elevadas taxas de infecção, foram sujeitas a diferentes metodologias, com a finalidade de determinar a sensibilidade dos seguintes métodos: histologia, cultura das brânquias e cultura total da ameijoas em FTM.

Comparam-se as percentagens obtidas pelos 3 métodos, dois a dois (Schwartz, 1994). Analisou-se também a frequência com base em valores esperados calculados com números totais (tabelas de contingências).

### 1.2.2. ENSAIO II

Aplicou-se o método de cultura total em ameijoas provenientes de zonas com intensidades de infecção diferentes: Algarve - zona intensamente infectada - e La Tremblade (França) - zona onde, através de técnicas histológicas, ainda não se tinha diagnosticado *P. atlanticus*. Com este ensaio pretendia-se demonstrar a especificidade do método, esperando-se não obter resultados positivos no lote de ameijoas de La Tremblade. De modo a não permitir que houvesse uma tendência, por parte do examinador, em registar resultados de acordo com os que eram esperados, as ameijoas das 2 amostras foram misturadas e atribuiu-se um número aleatório a cada ameijoas, não sendo possível estabelecer nenhuma relação lógica entre o espécimen a diagnosticar e o lote a que pertencia.

### 1.2.3. ENSAIO III

Cultivaram-se novamente em FTM ameijoas de La Tremblade e outras, do mesmo lote, foram analisadas por histologia, de modo a confirmar se este último

método continuaria a confirmar os resultados negativos obtidos como rotina pelo laboratório GAP (IFREMER) de La Tremblade. Realizou-se um teste de frequências para confirmar se havia diferença significativa entre os dois métodos.

Devido à questão levantada por Bushek *et al.* (1994) e Fisher e Oliver (1996), que consideram que a concentração da solução de Lugol pode afectar as contagens das células parasitárias, a sua quantificação foi realizada utilizando duas concentrações diferentes (também testadas pelos autores acima referidos) - 4% e 30% - comparando-se os seus resultados, através de um teste que permite comparar características qualitativas em séries emparelhadas (Schwartz, 1994).

#### **1.2.4. ENSAIO IV**

Neste ensaio pretendeu-se verificar a especificidade da coloração de Lugol, relativamente a células de *Perkinsus*, submetendo-se, para tal, espécies não sensíveis a *P. atlanticus* ao mesmo procedimento (cultura em FTM e coloração com solução de Lugol). Amostraram-se, então, ostras e mexilhões também da zona de La Tremblade. Como confirmação, aplicou-se o mesmo método a uma amostra de fitoplâncton da zona de Bouée d'Auger, cuja composição era conhecida.

#### **1.2.5. ENSAIO V**

Numa tentativa de encontrar uma população de ameijoas que, submetidas ao método de cultura total em FTM, originassem apenas resultados negativos, isto é, que se considerassem completamente isentas de *P. atlanticus*, encomendaram-se ameijoas a uma aquacultura de Lissadell (Irlanda), onde nunca se diagnosticou o parasita e onde não existe qualquer introdução de animais selvagens ou de outras origens nesta produção. A procura de indivíduos completamente indemnes à doença era também necessária, com vista à sua utilização na segunda fase deste trabalho - indução artificial da doença.

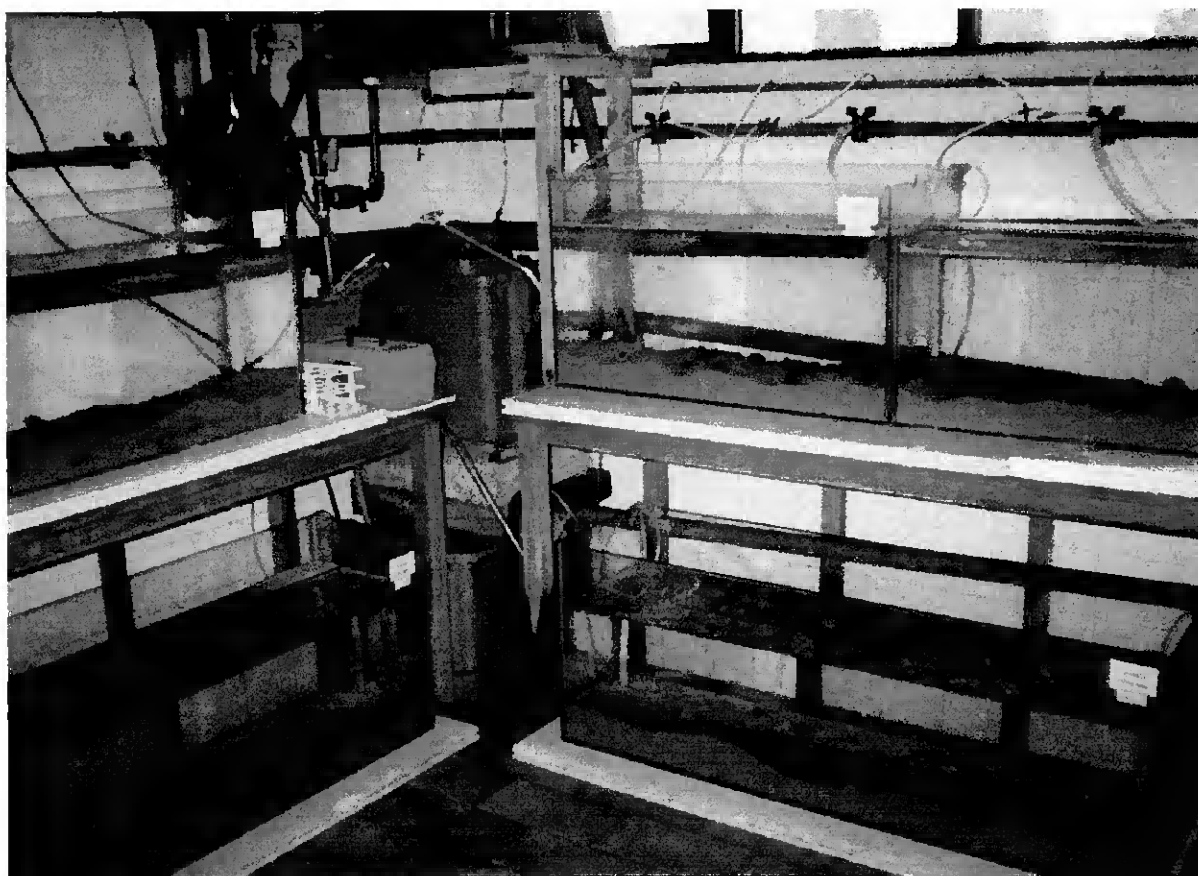
#### **1.2.6. ENSAIO VI**

Este último ensaio realizou-se em Julho, período em que as infecções começam a ser mais intensas, repetindo-se a comparação do método histologia e cultura total em FTM, desta vez usando ameijoas provenientes de 3 zonas com intensidades de infecção diferentes: Algarve, La Tremblade e Lissadell.

## 2. INDUÇÃO ARTIFICIAL DA PERKINSIOSE EM *Ruditapes decussatus*

### 2.1. Design experimental

Como se pretendeu estudar o efeito de diferentes concentrações de parasita no aparecimento e desenvolvimento da doença, instalaram-se 5 aquários de 100 - 120 litros de capacidade, com filtro de fundo, tela de lã e uma camada de 3 a 5 cm de areia previamente lavada (esterilizada com lixívia e neutralizada com tiosulfato de sódio) (Fig. 18).



**Figura 18.** Ilustração dos aquários montados para a manutenção das ameijoas durante a experiência.

Em cada um dos aquários, mantiveram-se 50 ameijoas de tamanho comercial, da espécie *R. decussatus*, encomendadas à firma North West Clam Marketing Group L<sup>td</sup>., de Lissadell (Irlanda), onde estas são totalmente cultivadas em

condições controladas, sem qualquer introdução de sementes do meio exterior, e onde nunca foi diagnosticado *Perkinsus*, condição essencial para o controlo que se impõe neste tipo de experiências.

Os aquários foram mantidos sem recirculação de água e com arejamento forte. Os parâmetros temperatura e oxigénio dissolvido foram registados de 2 em 2 dias e a salinidade ajustada, sempre que necessário, a valores entre 30 e 32 ‰.

As ameijoas foram alimentadas diariamente com um "cocktail" de microalgas (cultivadas em meio de Walne modificado) composto por *Tetraselmis chui*, *Isochrysis sp.* e *Chaetoceros calcitrans*.

O período de aclimação das ameijoas foi de um mês (03.07.97 a 03.08.97).

## **2.2. Purificação de zoosporos de *Perkinsus atlanticus***

Para a obtenção de uma suspensão de *P. atlanticus*, sacrificaram-se ameijoas, *R. decussatus*, cultivadas na Ria Formosa, fortemente infectadas por este parasita.

Extraíram-se as brânquias, trituraram-se (usando o Ultra-Turax) e incubaram-se em meio tioglicolato (Anexo III - A), durante 3 a 4 dias ao abrigo da luz e à temperatura ambiente. Após este período, as células parasitárias evoluíram para o estado de pré-zoosporângeo. Estas são purificadas conforme o método descrito seguidamente. Centrifugaram-se os tubos contendo os tecidos e o meio (2500 rpm, 10 min) e rejeitou-se o sobrenadante. O precipitado foi ressuspensão em água do mar e filtrado por um filtro de 250 µm e, de seguida, por outro de 112 µm.

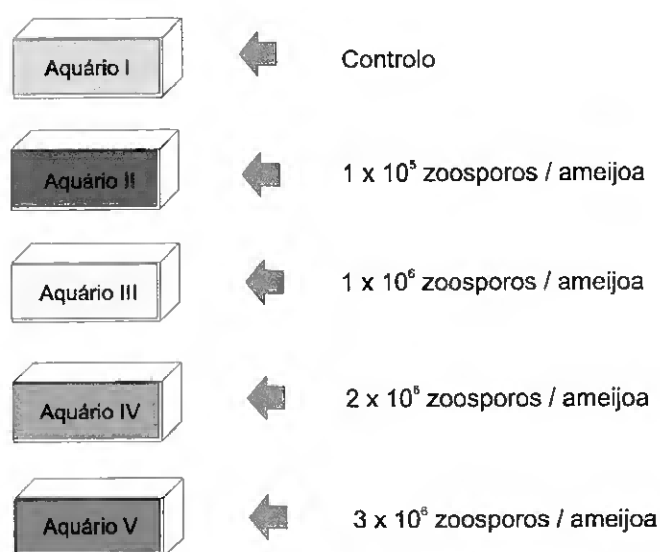
Preparou-se um gradiente de sacarose (10, 20, 30, 40, 50 e 60% de sacarose dissolvida em FSWT - água do mar filtrada com 0,5% de Tween-80), com o auxílio de uma bomba peristáltica PA-Digital IKA Labortechnik. Tween-80 permite dissociar as células, impedindo que se formem agregados, o que originaria densidades diferentes. O filtrado foi então cuidadosamente depositado nos tubos com o gradiente de sacarose e centrifugado (3500 rpm, 20 min, 8°C); este procedimento permite separar os componentes do filtrado em função do seu tamanho, isolando-se, assim, as células parasitárias de organismos contaminantes e outros fragmentos de tecidos.

A maioria dos pré-zoosporângeos foi encontrada na interface 30-40%; esta camada diferenciada foi retirada e lavada com FSWT e centrifugada (2500 rpm, 10 min) novamente duas vezes, para melhor purificação dos parasitas.

Estes pré-zoosporângeos foram depois cultivados em placas de Petri com água do mar filtrada, suplementada apenas com antibióticos (Penicilina G - 200U/ml e Streptomomicina - 200µg/ml); a cultura realizou-se a 24°C, durante cerca de 2 semanas, período após o qual se começa a observar a libertação de zoosporos livres a partir do tubo de descarga das células-mãe (zoosporângeos). Quando a maioria dos zoosporângeos se encontrava vazia e os zoosporos estavam na forma livre, juntou-se o conteúdo de todas as placas de cultura e calculou-se a quantidade de zoosporos existentes.

### 2.3. Indução da infecção das ameijoas

A infecção foi induzida artificialmente (em 04.08.97), por injeção de solução de zoosporos de *P. atlanticus* na cavidade intervalvar das ameijoas. Preparam-se suspensões de zoosporos, em diferentes concentrações, de modo a que a dose a administrar a cada ameijoas fosse a mesma (0.5 ml), e, assim, serem sujeitas às mesmas condições. As concentrações testadas encontram-se representadas esquematicamente na figura 19.



**Figura 19.** Representação da concentração de parasitas inoculada em ameijoas mantidas nos vários aquários.

Sempre que ocorria mortalidade, as ameijoas eram retiradas, pesadas, determinado o seu índice de condição (peso parte edível / peso total x 100) (Lucas e Beninger, 1985) e procedia-se à análise da presença e quantificação de *P. atlanticus* pelo método de cultura total em meio tioglicolato (descrito na secção 1.3. deste capítulo).

Após um mês, foram retiradas 5 ameijoas de cada aquário, para verificar o seu estado de infecção.

Ao fim de 2 meses, as ameijoas expostas ao parasita e também as do controlo foram sacrificadas e, tal como as anteriores, pesadas e cultivadas em meio tioglicolato para determinação da intensidade de infecção.

---

---

**Capítulo IV**



**RESULTADOS**

**E**

**DISCUSSÃO**

---

---

## 1. AVALIAÇÃO DAS TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO

### 1.1. Apreciação geral dos métodos

As metodologias testadas apresentaram uma grande variabilidade no que respeita à sensibilidade e especificidade.

→ Verificou-se que o **esfregação por aposição** é um método rápido, mas não fornece resultados fiáveis, quando a intensidade de infecção é reduzida, pois obtém-se uma percentagem muito elevada de resultados falsos negativos. Deste modo, e de acordo com outros autores (Burreson e Ragone Calvo, 1996), pode-se sugerir que é um método sem interesse prático nos estudos de diagnóstico de *P. atlanticus* na ameijoia.

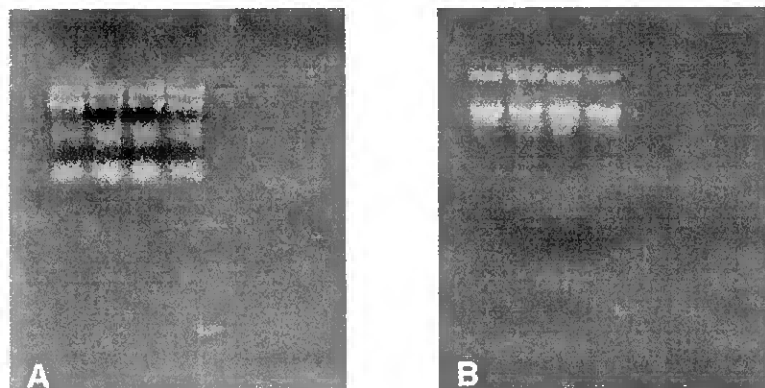
→ Relativamente ao recurso à **histologia** e à **incubação em FTM** - técnicas usadas como rotina para a detecção deste parasita - confirmou-se que são técnicas úteis para o diagnóstico desta parasitose, sendo a incubação em FTM o método mais sensível; os resultados obtidos serão descritos e discutidos mais pormenorizadamente na secção seguinte.

→ Quanto aos **métodos imunológicos**, ou seja, à utilização de anticorpos monoclonais previamente preparados contra *P. atlanticus*, não se conseguiram obter resultados positivos. Com qualquer dos métodos - imunofluorescência ou imunoperoxidase - não houve reconhecimento de células parasitárias no estado de pré-zoosporângios e zoosporos cultivadas *in vitro* e purificadas. Contudo, num controlo positivo, realizado com hemócitos de ostra e anticorpos monoclonais específicos preparados recentemente, observou-se marcação, pelo que se descarta a hipótese de deficiência do método. Uma justificação possível para este insucesso é o facto dos hibridomas estarem congelados desde 1991, o que poderia alterar as suas características. Esta hipótese poderá ter alguma validade, pois também se usaram, como controlo positivo, anticorpos obtidos através da cultura de hibridomas

preparados na mesma altura contra *Marteilia* sp. e lâminas contendo este parasita, que habitualmente funcionavam, e, desta vez, não houve reconhecimento. Deste modo, poder-se-á especular que seria a qualidade dos hibridomas que impediu o funcionamento desta técnica.

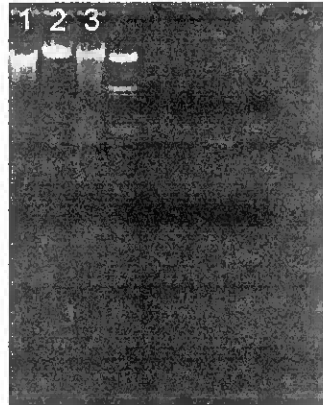
→ Também com os **métodos de biologia molecular**, surgiram alguns problemas, que, por limitações de tempo, não foram resolvidos, e, assim, o objectivo de conseguir obter uma sonda de ADN para detecção de *P. atlanticus* não foi atingido.

Realizámos a extracção de ADN de *P. marinus*, a partir de cultura de células parasitárias purificadas, o qual foi utilizado como controlo positivo nos vários ensaios de PCR efectuados com primers específicos. A extracção de ADN de *P. atlanticus* não resultou inicialmente, o que possivelmente se ficou a dever à reduzida quantidade de células utilizada. Após algumas tentativas, obteve-se uma banda visualizada em gel de agarose, que poderá corresponder ao ADN do parasita. A figura 20 apresenta o resultado de electroforese de deposições de 5 µl de ácidos nucleicos extraídos, antes e depois do tratamento com RNase.



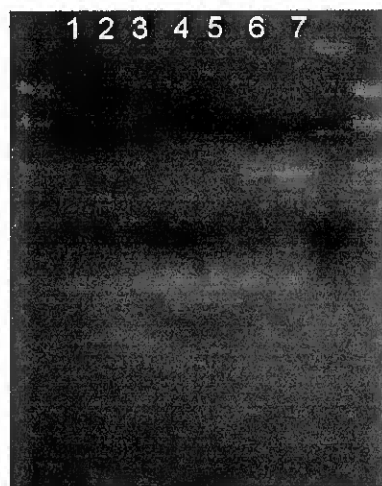
**Figura 20.** Resultado de electroforese em gel de agarose 1% de ADN de *P. atlanticus*, antes (A) e depois (B) de tratado com RNase.

Comparou-se o ADN obtido a partir das células de *P. atlanticus* com o ADN extraído de tecido do pé e das brânquias de ameijoas de Lissadell (não infectadas por este parasita) (Fig. 21), verificando-se uma diferença no tamanho das bandas, o que eliminou a possibilidade de o ADN extraído inicialmente de *P. atlanticus* ser apenas contaminação de restos de tecido de ameijoas.



**Figura 21.** Resultado de electroforese em gel de agarose de ADN de *Perkinsus* (1), ADN de tecido branquial (2) e ADN de tecido do pé de ameijoia (3).

No entanto, quando se realizou o PCR com estes ADN, não se registou amplificação, o que poderá indicar uma fraca afinidade dos primers desenhados para *P. atlanticus*. Haveria, contudo, que suspeitar desta hipótese, dado que o ADN de *P. marinus* era amplificado quer com os primers específicos, quer com os considerados universais, que deveriam funcionar, com maior ou menor eficácia, para qualquer tipo de ADN. Sabendo-se que uma matriz muito concentrada pode também inibir a amplificação, realizou-se novamente um PCR, utilizando ADN de *P. atlanticus* e de tecido de ameijoia puros, diluídos a 1/10 e a 1/100. Como resultado, verificou-se que apenas o ADN de ameijoia diluído 1/100 e o controlo positivo foram amplificados (Fig. 22).



- 1 - ADN *P. atlanticus* puro
- 2 - ADN *P. atlanticus* diluído 1/10
- 3 - ADN *P. atlanticus* diluído 1/100
- 4 - ADN ameijoia puro
- 5 - ADN ameijoia diluído 1/10
- 6 - ADN ameijoia diluído 1/100
- 7 - ADN *P. marinus* puro

**Figura 22.** Resultado de electroforese de produtos de PCR.

## 1.2. Comparação dos métodos histologia e incubação em FTM

### 1.2.1. ENSAIO I

Ameijoas provenientes de uma mesma população, sujeitas a 3 testes de diagnóstico diferentes, apresentaram os seguintes resultados, relativamente à percentagem de infecção detectada (Tab. III):

**Tabela III.** Número e percentagem de ameijoas não infectadas por *P. atlanticus* (-), pouco infectadas (+), medianamente infectadas (++) e intensamente infectadas (+++), segundo as várias técnicas de diagnóstico aplicadas.

	-		+		++		+++	
	# / total	%	# / total	%	# / total	%	# / total	%
<b>Histologia</b>	43/60	71.7	12/60	20.0	5/60	8.3	0/60	0
<b>Cultura das brânquias</b>	12/60	20.0	28/60	46.7	17/60	28.3	3/60	5.0
<b>Cultura total</b>	3/60	5.0	22/60	36.7	19/60	31.7	16/60	26.6

Os resultados dos testes de comparação de frequências indicam que há diferenças significativas ( $|\varepsilon| \geq 1.96$ , com  $\alpha=0.05$ ) entre as percentagens obtidas pelos métodos histologia / cultura das brânquias ( $|\varepsilon|=3.84$ ) e pelos métodos histologia / cultura total ( $|\varepsilon|=4.65$ ).

A diferença entre os resultados obtidos com os métodos cultura das brânquias e cultura total não foi significativa ( $|\varepsilon|=0.8$ ). No entanto, realizando uma análise de frequências - teste de  $\chi^2$  - em que se utilizaram os totais para o cálculo das frequências esperadas (tabela de contingências), verificou-se que os resultados obtidos pelos métodos cultura das brânquias e cultura total diferem significativamente ( $\chi^2 = 15.131 > \chi^2_{tab} = 7.815$ ,  $\alpha=0.05$ ).

O método de cultura total em meio tioglicolato é o que permite encontrar mais resultados positivos; a histologia apresenta um número considerável de respostas negativas, em comparação com os outros testes.

Rodriguez e Navas (1995) também verificaram que a análise histológica apresentou 60% de resultados falsos negativos, o que os induziu a afirmar que a histologia não é um método adequado para o diagnóstico de *Perkinsus*; por outro lado, este método é muito útil para observar as reacções do hospedeiro e para precisar a repartição do parasita pelos diferentes órgãos.

### 1.2.2. ENSAIO II

Com o método de cultura total, registou-se, na amostra de ameijoas do Algarve, uma percentagem de infestação de 89% (n=44), com uma intensidade de infecção média de 4187 células parasitárias por grama de peso húmido de ameijoas.

No lote de La Tremblade, registou-se uma percentagem considerável de resultados positivos - 30%; contudo, a intensidade de infecção média desta amostra (n=44) foi muito inferior - 19 parasitas / g peso húmido. Fazendo este cálculo, tendo em consideração apenas as ameijoas parasitadas, o valor médio obtido foi 59 parasitas (mínimo = 7 e máximo = 190), o que se considera bastante baixo.

Como, por métodos histológicos, esta zona era ainda classificada como indemne deste parasita, verificámos a sua presença, continuando a cultura das células encontradas. Verificou-se que estas se desenvolviam normalmente como as culturas de células de *P. atlanticus* purificadas.

### 1.2.3. ENSAIO III

Comparando novamente os métodos de cultura total com a histologia (Tab. IV), confirmou-se que haveria ameijoas potencialmente infectadas, cujo diagnóstico por histologia originava resultados falsos negativos.

A aplicação de um teste de análise destas frequências, confirma que há diferença significativa entre os resultados obtidos por cada um dos métodos aplicados ( $|\epsilon|=7.5$ ).

**Tabela IV.** Número e percentagem de ameijoas não infectadas (-) e infectadas (+) por *P. atlanticus*, obtidos por histologia e método de cultura total.

	-		+	
	# / total	%	# / total	%
<b>Histologia</b>	60/60	100	0	0
<b>Cultura total</b>	43/60	71.7	17/60	28.3

Quando se aplicou o mesmo método, variando a concentração da solução de Lugol (4% e 30%), confirmou-se que este factor teria influência nas contagens efectuadas, assim como no número de resultados positivos encontrados (17 com Lugol 4% e 31 com Lugol 30%).

A tabela V resume as diferenças entre os resultados obtidos aquando da detecção de *P. atlanticus* com as duas concentrações de corante utilizadas.

**Tabela V.** Número de ameijoas consideradas parasitadas por *P. atlanticus*, variando a concentração da solução de Lugol.

Lugol 4%	Lugol 30%	Nº indivíduos infectados
-	-	28
+	+	16
-	+	15
+	-	1

Observa-se que a utilização da concentração mais elevada resulta num acréscimo de 25% de resultados positivos (15/60); o contrário apenas ocorreu num caso, o que poderá indicar simplesmente um erro do observador.

Comparando estatisticamente os dois tratamentos, usando como percentagem de sucesso a percentagem de respostas positivas, pode considerar-se que a diferença é significativa ( $|\epsilon|=2.62$ ). Comparando apenas os resultados que discordam, a diferença é ainda mais evidente ( $|\epsilon|=3.5$ ).

#### 1.2.4. ENSAIO IV

Os resultados de quantificação de células com afinidade ao Lugol cultivadas em FTM, a partir de homogeneizados de ostras e mexilhões encontram-se registados na tabela seguinte (Tab. VI).

**Tabela VI.** Número e percentagem de indivíduos em que se detectaram células coradas com solução de Lugol.

	Nº indiv <sup>s</sup> positivos	%	Nº cél <sup>s</sup> contadas
OSTRAS	12/60	20.0	1 a 3
MEXILHÕES	11/60	18.3	1 ou 2

Apesar da percentagem de resultados positivos poder ser considerada elevada, é necessário realçar que, nas contagens efectuadas, apenas se observaram 1, 2 ou 3 células com afinidade para o corante.

Pode, então, colocar-se a hipótese de, esporadicamente, encontrarmos células de *P. atlanticus* em espécies não sensíveis, que incorporem os parasitas através da filtração, mas estes não deverão conseguir proliferar.

Outra justificação possível para este facto é a afinidade de outras células por este corante, que não unicamente células de *Perkinsus* como, por exemplo, dinoflagelados, cuja posição filogenética é muito próxima do parasita em questão.

Para testar esta segunda hipótese, analisou-se uma amostra de fitoplâncton, da qual se conhecia a composição e quantidade dos vários componentes (Anexo VI). Um litro desta água do mar continha 121000 células (102000 diatomáceas, 5500 dinoflagelados e 13500 fitoflagelados diversos). Desta amostra, resultaram 40 células coradas com a solução de Lugol. Contudo, esta percentagem é mínima, relativamente ao total (0.033%). De qualquer modo, estes resultados positivos podem indicar a provável existência de algumas respostas falsas positivas. Poder-se-ia tentar encontrar um valor mínimo, a partir do qual se consideraria que na realidade se tratava de células de *Perkinsus*, descontando estes valores que

existem “naturalmente” na água, mas alguns problemas se colocam: a composição e quantidade de fitoplâncton varia sazonal e geograficamente.

Assim, e como não foi possível provar por métodos mais específicos se os organismos que coram com o Lugol são somente células de *Perkinsus*, como o sugerido por DaRos (com. pess.), optou-se por considerar que, quando se encontram estes níveis de resultados positivos, estes seriam falsos positivos.

#### 1.2.5. ENSAIO V

A análise de uma amostra de ameijoas de Lissadell, por cultura total em FTM e coloração com solução de Lugol, permitiu verificar que esta população era indemne de *Perkinsus*, pois apenas 3 ameijoas (n=60) apresentaram uma ou duas células coradas pelo Lugol.

#### 1.2.6. ENSAIO VI

Comparando novamente os métodos de diagnóstico em ameijoas de diferentes proveniências (Tab. VII), confirma-se que há diferença significativa dos resultados obtidos pelas diferentes metodologias aplicadas.

**Tabela VII.** Número e percentagem de ameijoas infectadas por *P. atlanticus*, utilizando, para detecção do parasita, histologia e cultura total da ameijoas em FTM.

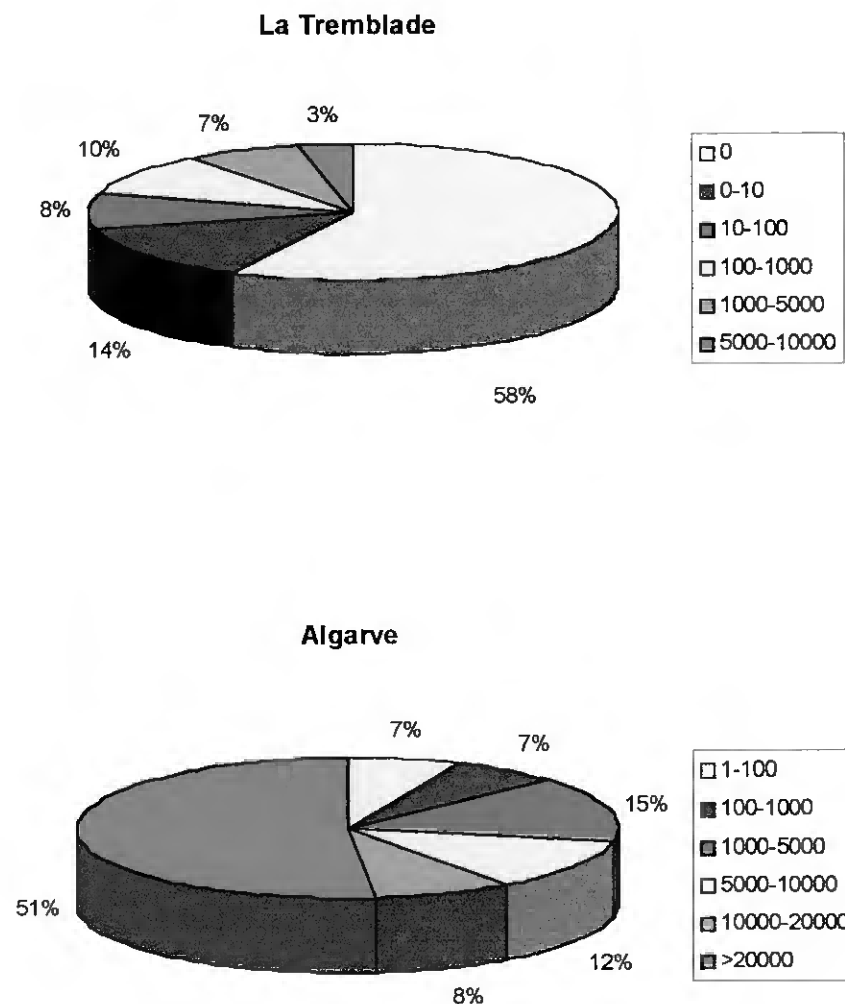
	Algarve		La Tremblade		Lissadell	
	+ / total	%	+ / total	%	+ / total	%
<b>Histologia</b>	30/60	50	0/60	0	0/60	0
<b>Cultura total</b>	60/60	100	26/60	43.3	3/60*	5.0*

(\* nestas 3 ameijoas apenas se contou uma célula corada em cada)

Neste período, reconhecido como mais propício para o desenvolvimento desta epizootia, verificou-se um aumento na percentagem de ameijoas infectadas, se compararmos com as percentagens de infestação registadas aquando do ensaio II, quer na zona do Algarve (de 89% para 100%) quer na zona de La Tremblade (de 30% para 43%).

Também a intensidade média de infecção aumentou consideravelmente, em ambas as zonas. O número mínimo de parasitas contados na amostra do Algarve foi de 72 e 51.7% das ameijoas apresentava uma quantidade incontável de células parasitárias. No lote de La Tremblade, a intensidade de infecção média foi de 453 células / grama peso húmido; considerando apenas as ameijoas parasitadas, este valor foi de 1046 cél./g, contra 59 cél./g registadas no ensaio II.

Os gráficos da figura 23 representam a distribuição da frequência de ameijoas parasitadas em função da intensidade de infecção, das amostras do Algarve e La Tremblade.



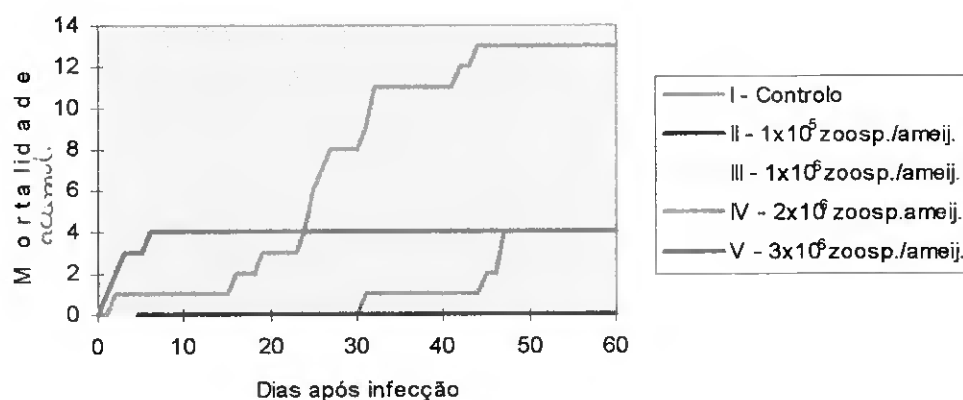
**Figura 23.** Intensidade de infecção (nº células / g peso húmido) de ameijoas do Algarve e de La Tremblade.

## 2. INDUÇÃO ARTIFICIAL DA PERKINSIOSE EM *R. decussatus*

### 2.1. Mortalidade vs. Intensidade de Infecção

Durante o período de aclimação registou-se a mortalidade de 5, 7, 6, 8, e 6 ameijoas nos aquários I, II, III, IV e V, respectivamente.

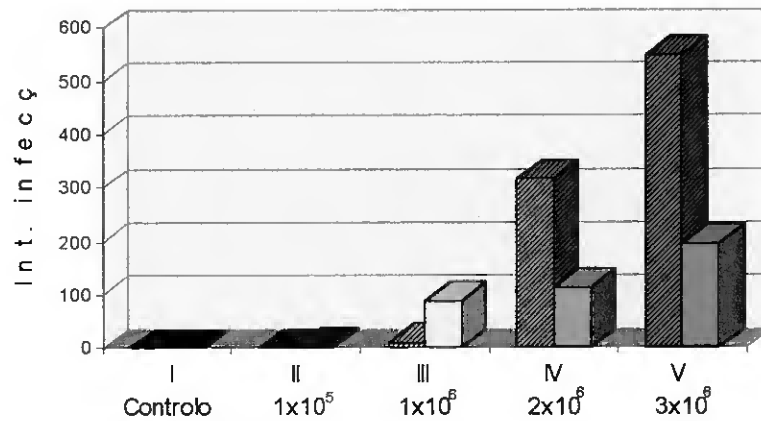
No decorrer da experiência propriamente dita não se verificou mortalidade significativa nos vários aquários, exceptuando-se o aquário IV, onde se registou um total de 13 ameijoas mortas. No aquário II não houve mortalidade (Fig. 24). Este parâmetro não parece estar directamente relacionado com a concentração de parasitas a que as ameijoas foram expostas, pois o que seria de esperar era que houvesse maior mortalidade nas ameijoas injectadas com uma concentração superior do parasita.



**Figura 24.** Evolução da mortalidade de ameijoas ocorrida nos vários aquários, após a exposição a *P. atlanticus*.

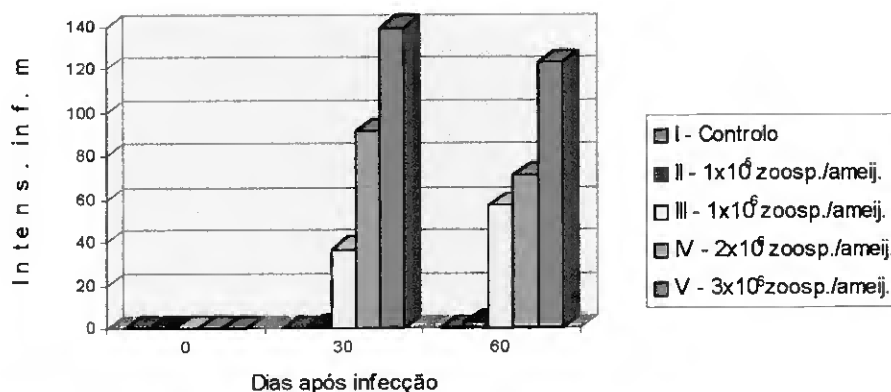
Contudo, se compararmos a intensidade de infecção das ameijoas que morreram no decorrer da experiência com as sacrificadas para amostragem (Fig.25), pode observar-se que este valor foi superior nas ameijoas que morreram naturalmente, nos aquários IV e V (concentrações mais elevadas de parasitas).

Mas, para justificar estes valores mais elevados, pode colocar-se uma outra hipótese que não a quantidade de parasita, que é a fragilidade das próprias ameijoas, já que se verificou que as ameijoas do aquário IV eram portadoras de um elevado número de copépodes parasitas, o que poderia ter diminuído a sua resistência.



**Figura 25.** Intensidade de infecção, expressa como número de parasitas por grama de peso húmido de ameijoas, nos vários aquários. As barras listadas correspondem às ameijoas que morreram durante a experiência e as barras a cheio às ameijoas amostradas.

Também é possível que, ao longo da experiência, as ameijoas expostas a maior concentração de parasitas se conseguissem libertar destes progressivamente; assim, e uma vez que a mortalidade foi registada na fase inicial de exposição, pode-se também sugerir que os valores mais elevados de intensidade de infecção se relacionem simplesmente com este facto. Esta explicação pode ser apoiada pelos resultados apresentados no gráfico seguinte (Fig. 26), onde se observa um aumento da intensidade de infecção nos aquários II e III e um decréscimo nos aquários IV e V.

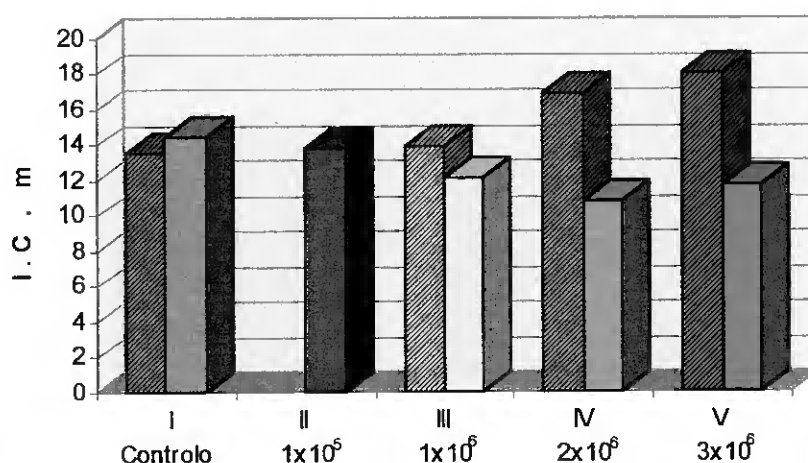


**Figura 26.** Variação da intensidade de infecção média de ameijoas amostradas, expostas a diferentes concentrações de *P. atlanticus*, ao longo do decorrer da experiência.

A interpretação destes resultados teria sido facilitada se se tivesse efectuado uma amostragem inicial, por exemplo, após uma semana de exposição ao parasita.

## 2.2. Índice de Condição

Também no índice de condição se observou uma variação ao longo do tempo. Este índice, nas ameijoas que morreram nos primeiros dias, foi de 16,4; na amostragem aos 30 dias foi de 15,3 e, na amostragem final, foi de 12,6. Aplicando uma regressão linear a estes resultados, constata-se uma relação negativa desta variável em função do tempo ( $r^2=0.98$ ). No gráfico seguinte (Fig. 27) confirma-se esta observação - as ameijoas mortas naturalmente (o que ocorreu na fase inicial da experiência) apresentam maior índice de condição, em qualquer dos aquários, excepto no aquário I, mas, neste caso, a mortalidade apenas ocorreu durante o segundo mês, pelo que não é possível estabelecer esta comparação.

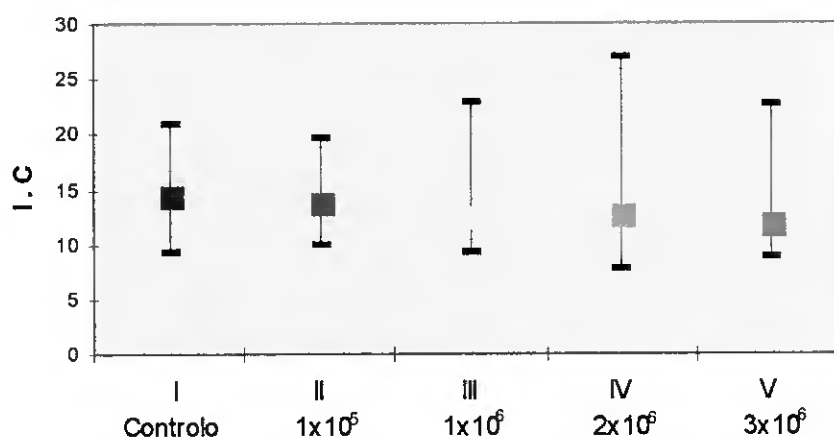


**Figura 27.** Comparação dos valores do índice de condição médio registados em cada aquário, nas ameijoas que morreram naturalmente (barras listadas) e nas sacrificadas para amostragem (barras a cheio).

Relativamente à intensidade de infecção, esta não parece ter influenciado significativamente a condição fisiológica das ameijoas, segundo os resultados obtidos por análise de variância  $\rightarrow F = 4,53 < F_{\text{tab.}} = 5,32$  (Anexo VII). Também Chu e Volety (1997) não observaram diferenças significativas do índice de condição entre grupos de ostras infectadas e não infectadas por *P. marinus*.

Na figura 28 apresentam-se os valores do índice de condição das ameijoas expostas às diferentes concentrações de células parasitárias, assim como os valores máximos e mínimos registados.

Os valores médios mostram uma ligeira tendência para diminuir com o aumento da concentração de parasitas ( $r^2 = 0,805$ ), mas não se pode afirmar que haja uma relação significativa entre estas variáveis, pois o desvio padrão é elevado (atingindo o valor 4,32 no aquário IV).

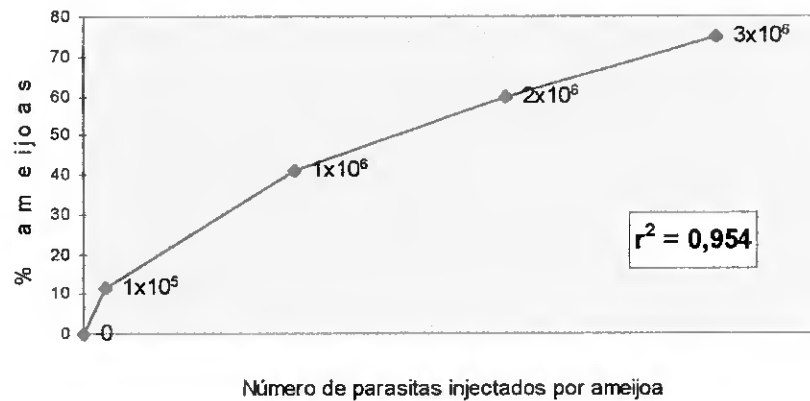


**Figura 28.** Variação do índice de condição médio, valores máximos e mínimos registados, em ameijoas expostas a diferentes concentrações de *P. atlanticus*.

Paynter (1996) especulou que exposições laboratoriais de relativamente curta duração podem não permitir que haja tempo suficiente para reduzir a condição fisiológica dos indivíduos, mas, todavia, quando há redução, esta nem sempre pode estar relacionada com o aumento das intensidades de infecção.

### 2.3. Prevalência do parasita

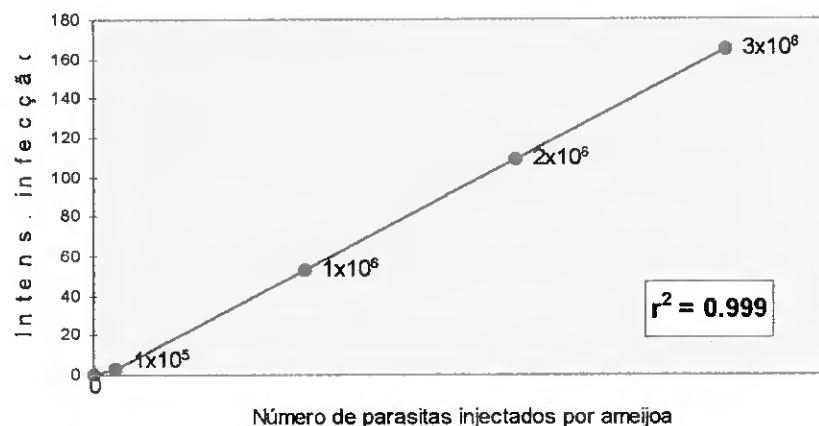
A prevalência de *P. atlanticus*, ou seja, a percentagem de ameijoas infectadas, encontra-se bastante relacionada com a quantidade de parasitas inoculada, como se pode observar na figura 29 e confirmar pelo valor do coeficiente de regressão. As percentagens de infecção de ameijoas expostas a  $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $2 \times 10^6$  e  $3 \times 10^6$  zoosporos foram, respectivamente, de 12, 41, 50 e 75%. Não se detectou nenhuma célula de *P. atlanticus* nas ameijoas do controlo.



**Figura 29.** Variação da prevalência de *P. atlanticus* relativamente à concentração de células injectadas.

## 2.4. Intensidade de Infecção

Também a intensidade de infecção varia positivamente com a concentração de células parasitárias a que as ameijoas foram expostas (Fig. 30). O mesmo foi verificado por outros autores, entre os quais, Chu e Volety (1997), que induziram artificialmente a doença em ostras com diferentes concentrações de células de *P. marinus*.



**Figura 30.** Variação da intensidade de infecção média de *P. atlanticus* relativamente à concentração de células injectadas.

O presente estudo mostra que  $1 \times 10^5$  células por ameijoas são suficientes para induzirem infecção via inoculação; contudo, não é possível prever qual o número mínimo de células infecciosas necessário para desencadear a doença, pois não se testaram concentrações inferiores.

Assumindo que a filtração / alimentação é a principal via de entrada do parasita no hospedeiro, será de prever que o número de células requerido para que se efectue a transmissão da doença no meio natural seja bastante superior a este obtido em condições laboratoriais, onde a infecção foi induzida artificialmente através de injeção de solução de células infecciosas na cavidade intervalvar. Segundo Bushek *et al.* (1994), a injeção na cavidade intervalvar parece ser mais eficaz que a alimentação nos estudos de indução de infecção; verificaram que ostras alimentadas com uma dose de  $10^7$  células por ostra não sucumbiam à infecção, enquanto que se desenvolviam infecções ligeiras, em 50 dias, com doses da ordem de  $10^4$  células por ostra inoculadas directamente na cavidade intervalvar ou no músculo adutor.

Por outro lado, se na natureza são necessárias mais de  $1 \times 10^5$  células para iniciar a infecção de uma ameijoas, uma vez incorporado este número de parasitas no interior da concha, por alimentação e / ou filtração, o processo de infecção desencadear-se-á. Obviamente que esta situação não será assim tão linear, pois haverá que ter em consideração uma série de outros factores físicos, químicos e biológicos (para além da dose de células infecciosas) que actuam, isolada ou conjuntamente, favorecendo ou não a infecção e a transmissão da doença.

---

---



**Capítulo V**

**CONCLUSÕES**

---

---

Na prática, as doenças podem ser controladas com maior eficácia se as regras zoonosológicas forem regularmente cumpridas nos diferentes estados de produção, mas também antes de qualquer transferência de moluscos em larga escala.

Através da análise dos estudos de epizootias de moluscos bivalves, podemos concluir que a maioria tem sido investigada usando técnicas disponíveis, tais como a histologia e microscopia electrónica. Estas técnicas são fundamentais na patologia, mas apresentam várias limitações (são morosas e não permitem que a infecção seja quantificada); por conseguinte, não são aplicáveis em larga escala. Assim, actualmente, tem-se vindo a verificar a necessidade de desenvolver novas metodologias para o diagnóstico da patologia de moluscos (Renault, 1996).

A técnica descrita para quantificação de *P. atlanticus* em ameijoas parece ser uma técnica de diagnóstico valiosa, dado os níveis de sensibilidade e especificidade apresentados; além disso, outros requisitos, igualmente importantes, são atingidos - fácil exequibilidade, rapidez e baixos custos - o que permite que seja um método a utilizar como rotina.

Assim, uma monitorização da infecção ao longo do tempo, e geograficamente, apresenta grande relevância para um melhor conhecimento e posterior controlo desta epizootia. O acompanhamento da progressão da doença poderá, então, ser traduzido como um modelo, tal como o realizado para *P. marinus* por Burreson e Ragone Calvo (1996), em que se descrevem as épocas de menor e maior infecção, a correlação entre as novas infecções e a mortalidade (prevendo que os indivíduos moribundos são a fonte dos estados infecciosos), bem como a relação entre a prevalência e intensidade de infecção com a variação de temperatura e salinidade, entre outros parâmetros.

Além desta aplicação prática directa da técnica de cultura total da ameijoia - que permite uma quantificação fiável da prevalência e intensidade de infecção - pode concluir-se ainda que esta apresenta um grande potencial, quer no exame de correlação da parasitose com variáveis biológicas do hospedeiro quer na avaliação ou calibração de outras técnicas.

Apesar deste protocolo poder ser recomendado como standard, quando se trabalha com populações cujas intensidades de infecção são bastante reduzidas, há um aspecto que permanece questionável, e que diz respeito à possibilidade de haver respostas falsas-positivas. Devido a estes casos, a continuidade dos trabalhos direccionados para um refinamento desta técnica deve ser considerada.

A determinação do estatuto de "livre de doença" é mais fiável usando técnicas de reconhecimento por ácidos nucleicos, como, por exemplo, as desenvolvidas por Marsh e Vasta (1995).

Relativamente à histologia, este trabalho permitiu concluir também que este é um método essencial, quando se pretende verificar até que nível o parasitismo afecta o hospedeiro, danificando os seus tecidos e órgãos. É também através desta técnica que se pode observar qual a distribuição do parasita, isto é, quais os tecidos preferencialmente infectados.

O estudo que consistiu na indução artificial da perkinsiose, permitiu-nos concluir que as formas infecciosas utilizadas - zoosporos - podem efectivamente desencadear a doença em ameijoas que nunca tinham sido expostas ao parasita.

O modo de infecção - injeção das células parasitárias na cavidade intervalvar - revelou-se também bastante eficaz, o que se traduziu pela forte relação encontrada entre a percentagem de ameijoas infectadas a concentração de parasitas a que as ameijoas foram expostas. Esta eficácia é confirmada, quando se considera a variação directamente proporcional da intensidade de infecção média com o número de parasitas injectados por ameijoa.

Por outro lado, em condições laboratoriais controladas, pode sugerir-se que uma concentração de células infecciosas na ordem de  $3 \times 10^6$  não é suficiente para desencadear mortalidade nas ameijoas.

Finalmente, há que lembrar que, através dos vários ensaios realizados para testar a técnica de cultura total dos tecidos em FTM, se demonstrou uma situação até então desconhecida: a presença de *P. atlanticus* nas ameijoas da zona de La Tremblade; contudo, a intensidade de infecção é considerada reduzida, razão pela

qual anteriormente não se obtiveram resultados positivos, já que a técnica utilizada como diagnóstico de rotina era a histologia.

Paralelamente, confirmou-se que ameijoas provenientes de um empresa de cultivo intensivo desta espécie, em que não há introdução de indivíduos potencialmente infectados, não estavam parasitadas por *P. atlanticus*. Desta observação, podemos inferir da importância do cuidado a ter aquando da sementeira ou cultivo de ameijoas em zonas declaradas como indemnes ao parasita.

---

---



**Capítulo VI**

**CONSIDERAÇÕES**

**FINAIS**

---

---

As técnicas de detecção de agentes patogénicos que não requerem o seu cultivo, como ELISA e PCR - técnicas baseadas em princípios imunológicos ou genéticos - têm vindo a ser desenvolvidas para a identificação destes organismos. Apesar da maioria destas técnicas ser direccionada para o diagnóstico clínico das doenças, o seu potencial para a detecção de microrganismos patogénicos em todo o ambiente aquático é extremamente aliciente.

Teoricamente, as técnicas não baseadas na cultura dos patógenos podem ser concebidas para detectar especificamente quantidades reduzidas de organismos alvo num meio bastante vasto de outros microrganismos. Além disso, permitem amostragens não letais de peixes, ou outras espécies cultivadas, o que pode servir como um sistema de controlo e alerta para problemas de doenças, assim como ajudar significativamente na elucidação de questões ecológicas e epizootológicas, ainda não resolvidas, respeitantes a vários agentes patogénicos.

Além da vertente prática imediata, abordada no capítulo anterior, pode ainda reflectir-se acerca de outras áreas de investigação, tais como a genética. Existem indivíduos que sobrevivem melhor que outros às epizootias; pensa-se que possuem determinadas características genéticas ou fisiológicas que os tornam menos susceptíveis aos agentes patogénicos. Têm sido sugeridas duas hipóteses para a ocorrência desta resistência: (1) os indivíduos resistentes à doença são fisiológica ou geneticamente diferentes dos não resistentes e (2) os resistentes adquirem imunidade através de uma exposição prévia aos agentes patogénicos (Chu, 1988).

Estudos na área da engenharia genética moderna mostraram que há variabilidade genética face à resistência dos hospedeiros a um determinado parasita, tanto entre regiões geográficas distintas como dentro de populações locais. Determinar esta variabilidade e desenvolver linhas resistentes às doenças para a aquacultura e repovoamento de stocks naturais representa um desafio aos cientistas, o que é frequentemente sugerido como uma forma de controlo possível de epizootias. Esta abordagem pode ser exequível, uma vez que se desenvolvam métodos para produção de bivalves transgénicos e que o(s) gene(s) que confere(m)

a resistência à doença sejam identificados. Contudo, este não é um assunto trivial, dadas as suas implicações, nomeadamente, ecológicas (Gaffney e Bushek, 1996).

A tentativa de explicar a não patogenicidade do parasita em diferentes locais, mesmo que este esteja presente, tem desencadeado também estudos de biologia molecular e de imunologia, em que se pretende verificar se há diferentes estirpes de parasitas. Vários atributos importantes da interacção parasita-hospedeiro devem ser considerados, assim como a sua relação com os factores ambientais, recrutamento e práticas de manutenção e pescaria (Krantz e Jordan, 1996).

Ponderando sobre as estratégias de manutenção para controlar as parasitoses, e, em especial, a originada por *P. atlanticus*, podem fazer-se algumas recomendações, à semelhança das indicadas por Andrews e Ray (1988) e Powell *et al.* (1996), para o controlo da perkinsiose da ostra americana: a) otimizar o recrutamento natural, desenvolvendo e mantendo o cultivo de sementes isolado de indivíduos infectados ou suplementar este recrutamento com "hatcheries" locais; b) transplantar apenas stocks livres de doença (mesmo baixas prevalências do parasita podem acelerar a mortalidade); c) isolar as várias zonas de cultivo, mantendo uma distância de segurança entre os vários viveiros; c) recolher as ameijoas, assim que se detectem valores de mortalidade superiores aos considerados normais; e, finalmente, d) monitorizar todos os viveiros, em particular aqueles que reconhecidamente apresentam mais problemas.

---

---



**Capítulo VII**

**REFERÊNCIAS  
BIBLIOGRÁFICAS**

---

---

- Allam, B., Paillard, C. e Auffret, M. (1997). Defence factors in manila clam, *Ruditapes philippinarum*, affected by brown ring disease. In: VIII<sup>th</sup> International Conference "Diseases of Fish and Shellfish" Book of Abstracts, Edinburg, 14-17 Sept., p. O-29.
- Almeida, M. (1995). Estudo da patogenia de *Perkinsus atlanticus* Azevedo, 1989 (Apicomplexa, Perkinsea), em função da variação do tipo de sedimento e da carga animal, na ameijoaboia *Ruditapes decussatus* Linnaeus, 1758. Relatório de estágio de licenciatura em Biologia Marinha e Pescas, Universidade do Algarve, 57 p.
- Anderson, R.S., Paynter, K.T. e Burreson, E.M. (1992). Increased reactive oxygen intermediate production by hemocytes withdraw from *Crassostrea virginica* infected with *Perkinsus marinus*. *Biol. Bull.*, **183**: 476-481.
- Anderson, R.S., Brubacher, L.L., Mora, L.M., Paynter, K.T. e Burreson, E.M. (1993). Hemocyte responses in *Crassostrea virginica* infected with *Perkinsus marinus*. *Journal of Shellfish Research*, **12(1)**: 135.
- Anderson, R.S., Burreson, E.M. e Paynter, K.T. (1995). Defense responses of hemocytes withdrawn from *Crassostrea virginica* infected with *Perkinsus marinus*. *Journal of Invertebrate Pathology*, **66(1)**: 82-89.
- Andrews, J.D. e Hewatt, W.G. (1957). Oyster mortality studies in Virginia - II. The fungus disease caused by *Dermoscydium marinum* in oysters of Chesapeake Bay. *Ecol. Monogr.*, **27**: 1-26.
- Andrews, J.D. (1988). Epizootiology of the disease caused by the oyster pathogen *Perkinsus marinus* and its effects on the oyster industry. *Amer. Fish. Soc. Spec. Publ.*, **18**: 47-63.
- Andrews, J.D. e Ray, S.M. (1988). Management strategies to control disease caused by *Perkinsus marinus*. *Amer. Fish. Soc. Spec. Publ.*, **18**: 257-264.
- Andrews, J.D. (1996). History of *Perkinsus marinus*, a pathogen of oysters in Chesapeake Bay 1950-1984, *Journal of Shellfish Research*, **15(1)**: 13-16.
- Auzoux-Bordenave, S., Vigário, A.M., Ruano, F., Domart-Coulon, I. e Doumenc, D. (1995). *In vitro* sporulation of the clam pathogen *Perkinsus atlanticus* (Apicomplexa, Perkinsea) under various environmental conditions. *Journal of Shellfish Research*, **14(2)**: 469-475.
- Azevedo, C., Corral, L. e Cachola, R. (1988). Estudo ultrastrutural de protozooses da fauna da Ria Formosa. *Textos das comunicações do 5º Congresso do Algarve*, **1**: 531-536.
- Azevedo, C. (1989a). Fine structure of *Perkinsus atlanticus* n. sp. (Apicomplexa, Perkinsea) parasite of the clam *Ruditapes decussatus* from Portugal. *J. Parasitol.*, **75(4)**: 627-635.

- Azevedo, C. (1989b). *Perkinsus atlanticus* nova espécie protoparasita da ameijoia *Ruditapes decussatus* (Mollusca, Bivalvia). *Pesca e Navegação*, **93**: 8-10.
- Azevedo, C. (1991). Estudo comparativo ultraestrutural e *in vitro* do ciclo de vida de *Perkinsus atlanticus* (Phylum Apicomplexa), parasita da ameijoia boa do Algarve. *Seminário sobre Aquacultura Mediterrânica '91*, nº19, pp.353-363.
- Azevedo, C. (1997). Some observations on an amoeba, destructive agent of the gills of *Cerastoderma edule* (Mollusca, Bivalvia). *Dis. Aquat. Org.*, **30**: 223-225.
- Bachère, E., Mialhe, E., Noel, D., Boulo, V., Morvan, A. e Rodriguez, J. (1995). Knowledge and research prospects in marine molluscs and crustacean immunology. *Aquaculture*, **132**: 17-32.
- Banning, P. (1982). Some aspects of the occurrence, importance and control of the oyster pathogen *Bonamia ostreae* in the Dutch oyster culture. *Invertebrate Pathology and Microbial Control*, 261-265.
- Banning, P. (1991). Observations on bonamiasis in the stock of the European flat oyster, *Ostrea edulis*, in the Netherlands, with special reference to the recent developments in Lake Grevelingen, *Aquaculture*, **93(3)**: 205-211.
- Bannister, R.C.A. e Key, D. (1982). *Bonamia*, a new threat to the native oyster industry. *Fish. Not. Dir. Fish. Res. G.B.*, nº71, 9 p.
- Barber, B.J. e Blake, N.J. (1981). Energy storage and utilization in relation to gametogenesis in *Argopecten irradians concentricus* (Say). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **52(2-3)**: 121-134.
- Bayne, B.L., Bubel, A., Gabbott, P.A., Livingstone, D.R., Lowe, D.M. e Moore, M.N. (1982). Glycogen utilisation and gametogenesis in *Mytilus edulis* L.. *Mar. Biol. Lett.*, **3(2)**: 89-105.
- Bayne, B.L. e Newell, R.C. (1983). Physiological energetics of marine molluscs. *In*: Saleuddin, A.S.M. e Wilbur, K.M. (eds.). *The Mollusca*. Academic Press, New York. Vol. 4: 407-515.
- Bayne, B.L. (1985). Ecological consequences of stress. *In*: Bayne, B.L. *et al.* (Eds.) *The effects of stress and pollution in marine animals*. pp. 141-160.
- Bayne, B.L., Hawkins, A.J.S. e Navarro, E. (1985). Feeding and digestion in suspension-feeding bivalve molluscs: the relevance of physiological compensations. *Am. Zool.*, **28(1)**: 147-159.
- Bayne, C.J. (1983). Molluscan immunobiology. *In*: Saleuddin, A.S.M. e Wilbur, K.M. (Eds.), *The mollusca*. Vol. 5 - Physiology, pp. 407-486.
- Beare, W.E., Culloty, S.C. e Burnell, G. (1998). Some observations on spatial and temporal variation in prevalence of infection of *Bonamia ostreae* (Pichot *et al.*, 1980) in the native flat oyster *Ostrea edulis* (L.) in Galway Bay, Ireland. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, **18(2)**: 39-42.

- Berg, J. e Newell, R.I.E. (1986). Temporal and spatial variations in the composition of seston available to the suspension feeder *Crassostrea virginica*. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, **23**:375-386.
- Bucke, D., Hepper, B., Key, D. e Bannister, R.C.A. (1984). A report on *Bonamia ostreae* in *Ostrea edulis* in the UK. *ICES-CM-1984/K:9*.
- Burreson, E.M. e Ragone Calvo, L.M. (1996). Epizootiology of *Perkinsus marinus* disease of oysters in Chesapeake Bay, with emphasis on data since 1985. *Journal Shellfish Research*, **15(1)**: 17-31.
- Bushek, D., Ford, S.E. e Allen Jr., S.K. (1994). Evaluation of methods using Ray's fluid thioglycollate medium for diagnosis of *Perkinsus marinus* infections in the eastern oyster *Crassostrea virginica*. *Annu. Rev. Fish Dis.*, **4**: 201-217.
- Camacho, A.P. (1991). Cultivo de mexillón na batea da Xunta de Galicia. Vol. 12. Consellería de Pesca, Marisqueo e Acuicultura. Xunta de Galicia.
- Canestri Trotti, G., Baccarani, E.M., Giannetto, S., Giuffrida, A. e Paesanti, F. (1998). Prevalence of *Mytilicola intestinalis* (Copepoda, Mytilicolidae) and *Urastoma cyprinae* (Turbellaria, Hypotrichinidae) in marketable mussels *Mytilus galloprovincialis* in Italy. *Dis. Aquat. Org.*, **32**: 145-149.
- Chagot, D., Comps, M., Boulo, V., Ruano, F. e Grizel, H. (1987). Histological study of a cellular reaction in *Ruditapes decussatus* infected by a protozoan. *Aquaculture*, **67(1-2)**: 260-261.
- Cheng, T.C. (1967). Marine molluscs as hosts for symbioses: with a review of known parasites of commercially important species. *Advances in Marine Biology*, **5**: 1-424.
- Cheng, T.C. (1970a). Symbioses. Organisms living together. Pegasus, New York.
- Cheng, T.C. (1970b). *Hartmannella tahitiensis* sp. n., an amoeba associated with mass mortalities of *Crassostrea commercialis* in Tahiti, French Polynesia. *Journal of Invertebrate Pathology*, **15**: 405-419.
- Cheng, T.C. e Rifkin, E. (1970). Cellular reactions in marine molluscs in response to helminth parasitism. *Am. Fisher. Soc.*, **5**: 443-496.
- Cheng, T.C. (1986). General Parasitology. 2<sup>nd</sup> edition. Academic Press, Orlando. 29p.
- Cheng, T.C. (1987). Some cellular mechanisms governing self and nonself recognition and pathogenicity in vertebrates and invertebrates relative to protistan parasites. *Aquaculture*, **67**: 1-14.

- Cheng, T.C. (1988). Strategies employed by parasites of marine bivalves to effect successful establishment in host. *American Fisheries Society, Special Publication*, **18**: 112-129.
- Cheng, T.C. e Combes, C. (1990). Influence of environmental factors on the evasion of molluscs by parasites: with special reference to Europe. In: Castri *et al.*, Biological invasions in Europe and the Mediterranean basin, pp. 307-332.
- Chintala, M.M., Ford, S.E., Fisher, W.S. e Ashton-Alcox, K.A. (1994). Oyster serum agglutinins and resistance to protozoan parasites. *Journal of Shellfish Research*, **13(1)**: 115-121.
- Choi, K.-S., Wilson, E.A., Lewis, D.H., Powell, E.N. e Ray, S.M. (1989). The energetic cost of *Perkinsus marinus* parasitism in oysters: quantification of the thioglycollate method. *Journal of Shellfish Research*, **8(1)**: 125-131.
- Choi, K.-S., Lewis, D.H., Powell, E.N., Frelter, P.F. e Ray, S.M. (1991). A polyclonal antibody developed from *Perkinsus marinus* hyphospores fails to cross react with other life stages of *P. marinus* in oyster (*Crassostrea virginica*) tissues. *Journal of Shellfish Research*, **10(2)**: 411-415.
- Chu, F.-L.E. (1988). Humoral defense factors in marine bivalves. American Fisheries Society Special Publication, **18**: 178-188.
- Chu, F.-L.E e Greene, K.H. (1989). Effect of temperature and salinity on *in vitro* culture of the oyster pathogen, *Perkinsus marinus* (Apicomplexa: Perkinsea). *Journal of Invertebrate Pathology*, **53**: 260-268.
- Chu, F.-L.E. e La Peyre, J.F. (1991). Effect of salinity of *Perkinsus marinus* susceptibility and defense-related activities in eastern oysters, *Crassostrea virginica*. *Journal of Shellfish Research*, **10(1)**: 294.
- Chu, F.-L.E. e La Peyre, J.F. (1993a). Development of disease caused by the parasite, *Perkinsus marinus* and defense-related hemolymph factors in three populations of oysters from the Chesapeake Bay, USA. *Journal of Shellfish Research*, **12(1)**: 21-27.
- Chu, F.-L.E. e La Peyre, J.F. (1993b). *Perkinsus marinus* susceptibility and defense-related activities in eastern oysters *Crassostrea virginica*: temperature effects. *Diseases of Aquatic Organisms*, **16**: 223-234.
- Chu, F.-L.E. e Hale, R.C. (1994). Relationship between pollution and susceptibility to infectious disease in eastern oyster, *Crassostrea virginica*. *Mar. Environ. Res.*, **38**: 243-256.
- Chu, F.-L.E. (1996). Laboratory investigations of susceptibility, infectivity and transmission of *Perkinsus marinus* in oysters, *Journal of Shellfish Research*, **15(1)**: 45-56.

- Chu, F.-L.E. (1997). Trends in research on *Crassostrea virginica* and its two protozoan parasites, *Perkinsus marinus* and *Haplosporidium nelsoni*. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, **17(6)**: 184-187.
- Chu, F.-L.E. e Volety, A.K. (1997). Disease processes of the parasite *Perkinsus marinus* in oyster *Crassostrea virginica*: minimum dose for infection initiation, and interaction of temperature, salinity and infective cell dose. *Dis. Aquat. Org.*, **28**: 61-68.
- Code OIE (1995). Code Sanitaire International pour les Animaux Aquatiques. Office International des Epizooties. Organisation Mondiale de la Santé Animale. Titre 2.2. Maladie des Mollusques: 83-107.
- Comps, M. (1970). Observations sur les causes d'une mortalité anormale des huîtres plates dans le bassin de Marennes. *Rev. Trav. Inst. Pêches Marit.*, **34**: 317-326.
- Comps, M. (1972). Observations sur la résistance d'huîtres du genre *Crassostrea* au cours de la mortalité massive de 1970-1971 dans le bassin de Marennes-Oléron. ICES, Shellfish Benthos Committee, Comité Mariculture, 1972/K:22.
- Comps, M. e Bonami, J.R. (1977). Virus infection associated with mortality of the oyster *Crassostrea gigas* Thunberg. *C.R. Hebd. Seances Acad. Sci., Paris, Ser. D*, **285(11)**: 1139-1140.
- Comps, M. (1980). Les infections virales associées aux épizooties des huîtres du genre *Crassostrea*. ICES, *Special Meeting on Diseases of Commercially Important Marine Fish and Shellfish*, Copenhagen, N°6.
- Comps, M. (1982). Research on a protist, a new parasite of flat oysters from the French coast. *Proceedings of the 7<sup>th</sup> International Malacological Congress*, **22(1-2)**: 1-2.
- Corbier, F., Coste, F., Romestand, B. e Terreilles, J. (1997). *Perkinsus marinus* production of a polyclonal antibody probe and study of the parasite's effect on hemocytes of oysters *Crassostrea virginica* and *Crassostrea gigas*. In: XXXV<sup>ème</sup> Reunion du GPLF, Paris, 8-11 Mai.
- Cousteau, C., Combes, C., Renaud, F e Delay, B. (1990). *Prosorhynchus squamatus* (Trematoda) parasitosis in the *Mytilus edulis* - *Mytilus galloprovincialis* complex: specificity and host-parasite relationships. In: Perkins, F.O. e Cheng, T.C. (Eds.). *Pathology in Marine Science*. Academic Press, pp.291-298.
- Coss, C.A., Wright, A.C., Robledo, J.A., Vasta, G.R. e Ruiz, G.M. (1997). PCR detection and quantitation of *Perkinsus marinus* in Chesapeake Bay invertebrates. National Shellfisheries Association. Abstracts of the 89<sup>th</sup> Annual Meeting, Florida. p. 41.
- DaRos, L. e Canzonier, W.J. (1986). *Perkinsus*, a protistan threat to bivalve culture in the mediterranean basin. *Pathology in Marine Aquaculture - European Aquaculture Society, Special Publication*, **9**.

- Dear, G. (1989). Methods for sampling fish and shellfish. *In: Austin, B e Austin, D.A. (Eds.). Methods for the microbiological examination of fish and shellfish. Ellis Horwood Limited, pp. 25-39.*
- Dungan, C.F. e Roberson, B.S. (1993). Binding specificities of mono- and polyclonal antibodies to the protozoan oyster pathogen *Perkinsus marinus*. *Diseases of Aquatic Organisms*, **15**: 9-22.
- Elston, R.A., Farley, C.A. e Kent, M.L. (1986). Occurrence and significance of bonamiasis in European flat oysters *Ostrea edulis* in North America. *Dis. Aquat. Org.*, **2(1)**: 49-54.
- Farley, C.A. (1968). *Minchinia nelsoni* (Haplosporida) disease syndrome in the american oyster *Crassostrea virginica*. *J. Protozool.*, **10**: 94-110.
- Figueras, A.J. e Fisher, W.S. (1988). Ecology and evolution of bivalve parasites. *American Fisheries Society - Special Publication*, **18**: 130-137.
- Figueras, A.J. e Villalba, A. (1988). Patologia de moluscos. *In: Espinosa de los Monteros, J. e Labarta, U. (Eds.). Patologia en Acuicultura. Plan de Formación de Técnicos Superiores en Acuicultura, pp.327-389.*
- Figueras, A., Robledo, J.A.F. e Novoa, B. (1992). Occurrence of Haplosporidian and *Perkinsus*-like infections in carpet-shell clams, *Ruditapes decussatus* (Linnaeus, 1758), of the Ria de Vigo (Galicia, NW Spain), *Journal of Shellfish Research*, **11(2)**: 377-382.
- Figueras, A., Robledo, J.A.F. e Novoa, B. (1996). Brown ring disease and parasites in clams (*Ruditapes decussatus* and *R. philippinarum*) from Spain and Portugal. *Journal of Shellfish Research*, **15(2)**: 363-368.
- Fisher, W.S., Gauthier, J.D. e Winstead, J.T. (1992a). Infection intensity of *Perkinsus marinus* disease in *Crassostrea virginica* (Gmelin, 1791) from the Gulf of Mexico maintained under different laboratory conditions. *Journal of Shellfish Research*, **11**: 363-369.
- Fisher, W.S., Winstead, J.T. e Gauthier, J.D. (1992b). Field and laboratory studies on effects of salinity and temperature on *Perkinsus marinus* infection of oysters from the Gulf of Mexico. *Aquaculture '92*, p.92.
- Fisher, W.S. e Oliver, L.M. (1996). A whole-oyster procedure for diagnosis of *Perkinsus marinus* disease using Ray's fluid thioglycollate culture medium. *Journal of Shellfish Research*, **15(1)**: 109-117.
- Fong, D., Rodriguez, R., Koo, K., Sogin, M.L., Bushek, D., Littlewood, D.T.J. e Ford, S.E. (1993). Small subunit ribosomal RNA gene sequence of the oyster parasite *Perkinsus marinus*. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.*, **2**: 346-350.
- Ford, S.E. (1996). Range extension by the oyster parasite *Perkinsus marinus* into the northeastern United States: response to climate change?. *Journal of Shellfish Research*, **15(1)**: 45-56.

- Gaffney, P.M. e Bushek, D. (1996). Genetic aspects of disease resistance in oysters. *Journal of Shellfish Research*, **15**(1): 135-140.
- Garreis, K.A., La Pere, J.F. e Faisal, M. (1996). The effects of *Perkinsus marinus* extracellular products and purified proteases on oyster defence parameters *in vitro*. *Fish & Shellfish Immunology*, **6**: 581-597.
- Gauthier, J.D. e Fisher, W.S. (1990). Hemolymph assay for diagnosis of *Perkinsus marinus* in oysters *Crassostrea virginica* (Gmelin, 1791). *Journal of Shellfish Research*, **9**: 367-371.
- G.E.A. (1988). Mortalidade da ameijoia-boia - que causas? *Textos e comunicações do 5º Congresso do Algarve*, **1**: 491-497.
- Goggin, C.L. e Lester, R.J.G. (1987). Occurrence of *Perkinsus* species (Protozoa, Apicomplexa) in bivalves from the Great Barrier Reef. *Diseases of Aquatic Organisms*, **3**: 113-117.
- Goggin, C.L., Sewell, K.B. e Lester, R.J.G. (1989). Cross-infection experiments with Australian *Perkinsus* species. *Diseases of Aquatic Organisms*, **7**: 55-59.
- Goggin, C.L., Sewell, K.B. e Lester, R.J.G. (1990). Tolerances of *Perkinsus* spp. (Protozoa, Apicomplexa) to temperature, chlorine and salinity. *Journal of Shellfish Research*, **9**(1): 145-148.
- Goggin, C.L. (1991). Studies on *Perkinsus atlanticus* (Protozoa, Apicomplexa) from *Ruditapes decussatus* (Mollusca, Bivalvia) in France. Rapport de stage, IFREMER, 19 p.
- Goggin, C.L., Boulo, V., Mialhe, E., Cousin, K. e Hervio, D. (1991). Diagnosis of *Perkinsus atlanticus* with monoclonal antibodies and DNA probes. In: DePauw, N. e Joyce, J. (comps.) *Aquaculture and the Environment*, nº14, p.123.
- Goggin, C.L. (1992). Occurrence of parasites of the genus *Perkinsus* in France. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, **12**(5): 174-176.
- Goggin, C.L. e Barker, S.C. (1993). Phylogenetic position of the genus *Perkinsus* (Protista, Apicomplexa) based on small subunit ribosomal RNA. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **60**: 65-70.
- Goggin, C.L. (1994). Variation in the two internal transcribed spacers and 5.8S ribosomal RNA from five isolates of the marine parasite *Perkinsus* (Protista, Apicomplexa). *Molecular and Biochemical Parasitology*, **65**: 179-182.
- Goggin, C.L. e Cawthorn, R.J. (1994). Using molecules to diagnose *Perkinsus* species and determine the affinities of parasites of uncertain phylogenetic affinities from fish and shellfish. *Journal of Shellfish Research*, **13**(1): 296.

- Goggin, C.L. e Lester, R.J.G. (1995). *Perkinsus*, a protistan parasite of abalone in Australia: a review. *Mar. Freshwater Res.*, **46**: 639-646.
- Goggin, C.L. (1996). Effect of *Perkinsus olseni* (Protozoa, Apicomplexa) on the weight of *Tridacna crocea* (Mollusca, Bivalvia) from Lizard Island, Great Barrier Reef. *Aquaculture*, **141**: 25-30.
- Goggin, C.L., McGladdery, S.E., Whyte, S.K. e Cawthorn, R.J. (1996). An assessment of lesions in bay scallops *Argopecten irradians* attributed to *Perkinsus karlssoni* (Protozoa, Apicomplexa). *Diseases of Aquatic Organisms*, **24(1)**: 77-80.
- Gonzalez Herrero, V., Peñas Rodriguez, J. e Diaz Martinez, A. (1987). Dermocystidiosis en almeja fina portuguesa de importación. *Cuad. Marisq. Publ. Téc.*, **12**: 695-700.
- Grizel, H., Comps, M., Bonami, J.-R., Cousserans, F., Duthoit, J.-L. e Le Penneq, M.A. (1974). Recherche sur l'agent de la maladie de la glande digestive de *Ostrea edulis* Linné. *Bull. Inst. Pêches Marit.*, **240**: 7-30.
- Grizel, H. e Tige, G. (1982). Evolution of the haemocytic disease caused by *Bonamia ostreae*. *Invertebrate Pathology and Microbial Control*, 258-260.
- Hine, P.M. e Jones, J.B. (1994). *Bonamia* and other aquatic parasites of importance to New Zealand. *N.Z.J. Zool.*, **21(1)**: 49-56.
- Hine, P.M. e Thorne, T. (1998). *Haplosporidium* sp. (Haplosporidia) in hatchery-reared pearl oysters, *Pinctada maxima* (Jameson, 1901), in north western Australia. *J. Invert. Pathol.*, **71**: 48-52.
- Jørgensen, C.B. (1966). The biology of suspension feeding. Pergamon Press, Oxford, England.
- Kennedy, V.S., Newell, R.I.E., Krantz, G.E. e Otto, S. (1995). Reproductive capacity of the eastern oyster *Crassostrea virginica* infected with the parasite *Perkinsus marinus*. *Diseases of Aquatic Organisms*, **23**: 135-144.
- Kern, F.G. (1973). *Minchinia nelsoni* (MSX) disease of the american oyster. US National Marine Fisheries Service. *Marine Fisheries Review*, **38(10)**: 22-24.
- Klein, J. (1977). Evolution and function of the major histocompatibility system: facts and speculations. In: Gotze, D. (ed.). The major histocompatibility system in man and animals. Springer-Verlag, Berlin. p. 339-378.
- Kleinschuster, S.J. e Swink, S.L. (1993). A simple method for the *in vitro* culture of *Perkinsus marinus*. *The Nautilus*, **107(2)**: 76-78.

- Krantz, G.E. e Jordan, S.J. (1996). Management alternatives for protecting *Crassostrea virginica* fisheries in *Perkinsus marinus* enzootic and epizootic areas, *Journal of Shellfish Research*, **15(1)**: 167-176.
- Laird, M. (1961). Microecological factors in oyster epizootics. *Canad. J. Zool.*, **39**: 449-485.
- La Peyre, J.F., Faisal, M. e Bureson, E.M. (1993). *In vitro* propagation of the protozoan *Perkinsus marinus*, a pathogen of the eastern oyster, *Crassostrea virginica*, *J. Euk. Microbiol.*, **40(3)**: 304-310.
- La Peyre, J.F., Chu, F.-L.E. e Meyers, J.M. (1995). Haemocytic and humoral activities of eastern and Pacific oysters following challenge by the protozoan *Perkinsus marinus*. *Fish & Shellfish Immunology*, **5**: 179-190.
- La Peyre, J.F., Chu, F.-L.E. e Vogelbein, W.K. (1995). *In vitro* interactions of *Perkinsus marinus* merozoites with eastern and pacific oyster hemocytes. *Developmental and Comparative Immunology*, **19(4)**: 291-304.
- Lauckner, G. (1983). Diseases of Mollusca: Bivalvia. In: Kinne, O. (ed.). Diseases of marine animals, vol. 2: 477-961.
- Le Gall, G. e Mialhe, E. (1992). Purification of rickettsiales-like organisms associated with *Pecten maximus* (Mollusca: Bivalvia): serological and biochemical characterisation. *Dis. Aquat. Org.*, **12**: 215-220.
- Lester, R.J.G. (1980). Histopathological observations on a *Perkinsus* infection in Habalone - *Haliotis ruber*. ICES - Special meeting on "Diseases of commercially important marine fish and shellfish", Copenhagen, 1-3 Oct.
- Lester, R.J.G. e Davis, G.H.G. (1981). A new *Perkinsus* species (Apicomplexa, Perkinsea) from the abalone *Haliotis ruber*. *Journal of Invertebrate Pathology*, **37(2)**: 181-187.
- Lester, R.J.G., Goggin, L. e Sewell, K.B. (1990). *Perkinsus* in Australia. *Pathology in Marine Science*, 189-199.
- Levine, N.D. (1978). *Perkinsus* gen. n. and other new taxa in the protozoan phylum Apicomplexa. *J. Parasitology*, **64(3)**: 549.
- Lopez, M.C., Carballal, M.J., Villalba, A., Corral, L. e Azevedo, C. (1993). Estudio de los tipos hemocitarios y de su dotacion enzimatica en la almeja, *Ruditapes decussatus*, de Galicia. *Actas IV Congreso Nac. Acuicult.*, 443-448.
- Lucas, A. e Beninger, P.G. (1985). The use of physiological condition indices in marine bivalve aquaculture. *Aquaculture*, **44**: 187-200.

- Mackin, J.G., Owen, H.M. e Collier, A. (1950). Preliminary note on the occurrence of a new protistan parasite, *Dermocystidium marinum* n. sp. in *Crassostrea virginica* (Gmelin). *Science*, **111**: 328-329.
- Mackin, J.G. e Ray, S.M. (1966). The taxonomic relationships of *Dermocystidium marinum* Mackin, Owen and Collier. *Journal of Invertebrate Pathology*, **8**: 544-545.
- Marsh, A.G. e Vasta, G.R. (1995). Parasite-specific PCR amplification of an intergenic mtDNA domain of *Perkinsus marinus* in oyster hemolymph: a rapid and sensitive assay for infection screening. *Journal of Shellfish Research*, **14**: 271.
- Matias, E.R. (1997). Caracterização da ostreicultura do estuário do Sado. Relatório de estágio de licenciatura em Biologia Aplicada aos Recursos Animais Marinhos. 35p.
- McGladdery, S.E., Cawthorn, R.J. e Bradford, B.C. (1991). *Perkinsus karlssoni* n.sp. (Apicomplexa) in bay scallops *Argopecten irradians*. *Diseases of Aquatic Organisms*, **10(2)**: 127-137.
- Medlin, L., Elwood, H.J., Stickel, S. e Sogin, M.L. (1988). The characterization of enzymatically amplified eukaryotic 16S-like rRNA-coding regions. *Gene*, **71**: 491-499.
- Menzel, R.W. e Hopkins, S.W. (1955). The growth of oysters parasitized by the fungus *Dermocystidium marinum* and by the trematode *Bocephalus cuculus*. *The Journal of Parasitology*, **41(4)**: 333-342.
- Mialhe, E., Bachère, E., Le Bec, C. e Grizel, H. (1985). Isolement et purification de *Marteilia* (Protozoa: Ascetospora) parasites de bivalves marins. C.R. Acad. Sci. Paris, serie III, **301**: 137-142.
- Mialhe, E., Bachère, E., Chagot, D. e Grizel, H. (1988). Isolation and purification of the protozoan *Bonamia ostreae* (Pichot et al., 1980), a parasite affecting the flat oyster *Ostrea edulis* L. *Aquaculture*, **71**: 293-299.
- Montes, J.F., Durfort, M. e García-Valero, J. (1995a). Characterization and localization of an Mr 225 kDa polypeptide specifically involved in the defence mechanisms of the clam *Tapes semidecussatus*. *Cell Tissue Res.*, **280**: 27-37.
- Montes, J.F., Durfort, M. e García-Valero, J. (1995b). Cellular defence mechanism of the clam *Tapes semidecussatus* against infection by the protozoan *Perkinsus* sp.. *Cell Tissue Res.*, **279**: 529-538.
- Montes, J.F., Durfort, M. e García-Valero, J. (1996). When the venerid clam *Tapes decussatus* is parasitized by the protozoan *Perkinsus* sp. it synthesizes a defensive polypeptide that is closed related to p225. *Diseases of Aquatic Organisms*, **26**: 149-157.

- Montes, J., Longa, A., Ferro, B., Santamarina, J. e Prado, S. (1997). Epidemiological survey of *Bonamia ostreae* in different stocks of flat oyster (*Ostrea edulis* L.) in Galicia (NW Spain). . In: VIII<sup>th</sup> International Conference "Diseases of Fish and Shellfish" Book of Abstracts, p. P-032.
- Navas, J.I., Castillo, M.C., Vera, P. e Ruiz-Rico, M. (1992). Principal parasites observed in clams *Ruditapes decussatus* (L.), *Ruditapes philippinarum* (Adam e Reeve), *Venerupis pullastra* (Montagu) and *Venerupis aureus* (Gmelin), from the Huelva coast (SW Spain), *Aquaculture*, **107**(2-3): 193-199.
- Newell, R.C. (1979). Biology of intertidal animals. Marine Ecological survey, England.
- Newell, R.I.E. e Thompson, R.J. (1984). Reduced clearance rates associated with spawning in mussel, *Mytilus edulis* (L.) (Bivalvia, Mytilidae). *Marine Biology Letters*, **5**: 21-33.
- Newell, R.I.E. e Barber, B.J. (1988). A physiological approach to the study of bivalve molluscan diseases. *American Fisheries Society - Special Publication*, **18**: 269-280.
- Newell, R.I.E., Newell, C.J., Paynter, K.T. e Burreson, E.M. (1993a). The physiological effects of protozoan parasitism on the eastern oyster *Crassostrea virginica*: feeding and metabolism. *Journal of Shellfish Research*, **12**(2): 362-363.
- Newell, R.I.E., Newell, C.J., Paynter, K.T. e Burreson, E.M. (1993b). The physiological effects of protozoan parasitism on the eastern oyster *Crassostrea virginica*: feeding and metabolism. *Journal of Shellfish Research*, **12**(1): 136-137.
- Paillard, C., Percelay, L., Le Pennec, M. e Le Picard, D. (1989). Pathogenic origin of the "brown ring" in *Tapes philippinarum* (Mollusca, Bivalvia). *C.R. Herd. Seances Acad. Sci. III, Paris*, **309**(7):235-241.
- Paillard, C., Maes, P. e Oubella, R. (1994). Brown ring disease in clams. *Annual Review of Fish Diseases*, **4**: 219-240.
- Paillard, C., Allam, B., Maes, P. e Howard, A. (1997). Isolation of the pathogen, *Vibrio tapetis*, from brown ring diseased manila clam cultured in England. In: VIII<sup>th</sup> International Conference "Diseases of Fish and Shellfish" Book of Abstracts, p. P-039.
- Paynter, K.T. e Burreson, E.M. (1991). Effects of *Perkinsus marinus* infection in the eastern oyster, *Crassostrea virginica*: II. Disease development and impact on growth rate at different salinities. *Journal of Shellfish Research*, **10**(2): 425-431.
- Paynter, K.T. e Pierce, S.K. (1992). Effects of *Perkinsus marinus* infection on free amino acid levels in oyster tissues. *Aquaculture*, 182-183.

- Paynter, K.T., Caudill, C. e Burreson, E.M. (1993). The physiological effects of protozoan parasitism on the eastern oyster, *Crassostrea virginica*: introductory overview. *Journal of Shellfish Research*, **12**(1): 137.
- Paynter, K.T., Pierce, S.K. e Burreson, E.M. (1995). Levels of intracellular free amino acids used for salinity tolerance by oysters (*Crassostrea virginica*) are altered by protozoan (*Perkinsus marinus*) parasitism. *Marine Biology*, **122**: 67-72.
- Paynter, K.T. (1996). The effects of *Perkinsus marinus* infection on physiological processes in the eastern oyster, *Crassostrea virginica*. *Journal of Shellfish Research*, **15**(1): 119-125.
- Perkins, F.O. e Menzel, R.W. (1966). Morphological and cultural stages in the life cycle of *Dermocystidium marinum*. *Proc. Natl. Shellfish Assoc.*, **56**: 23-30.
- Perkins, F.O. e Menzel, R.W. (1967). Ultrastructure of sporulation in the oyster pathogen *Dermocystidium marinum*. *J. Invertebr. Pathol.*, **9**: 205-229.
- Perkins, F.O. (1976). Zoospores of the oyster pathogen, *Dermocystidium marinum* - I. Fine structure of the conoid and other sporozoan-like organelles. *J. Parasitol.*, **62**: 959-974.
- Perkins, F.O. (1986). Shellfish parasites. *Parasitology Today*, **2**(3): 55-57.
- Perkins, F.O. (1988). Parasite morphology, strategy, and evolution - Structure of protistan parasites found in bivalve molluscs. *American Fisheries Society Special Publication*, **18**: 93-111.
- Perkins, F.O. (1996). The structure of *Perkinsus marinus* (Mackin, Owen and Collier, 1950) Levine, 1978 with comments on taxonomy and phylogeny of *Perkinsus* spp.. *Journal of Shellfish Research*, **15**(1): 67-87.
- Pernas, M., Ordás, C. e Figueras, A. (1997). Detection of cultured *Perkinsus atlanticus* using the polymerase chain reaction. In: VIII<sup>th</sup> International Conference "Diseases of Fish and Shellfish" Book of Abstracts, p. P-035.
- Pichot, Y., Comps, M., Tige, G., Grizel, H. e Rabouin, M.-A. (1980). Recherches sur *Bonamia ostreae* gen. n., sp. n., parasite nouveau de l'huître plate *Ostrea edulis* L.. *Rev. Trav. Inst. Pêches Marit.*, **43**: 131-140.
- Polanco, E., Montes, J., Outon, M. e Melendez, M.I. (1984). Situation pathologique du stock d'huîtres plates en Galice (Espagne) en relation avec *Bonamia ostreae*. *Haliotis*, **14**: 91-95.
- Powell, E.N., Klinck, J.M. e Hofmann, E.E. (1996). Modeling diseased oyster populations. II. Triggering mechanisms for *Perkinsus marinus* epizootics. *Journal of Shellfish Research*, **15**(1): 141-165.

- Price, P.W. (1980). Evolutionary biology of parasites. Princeton University Press, New Jersey.
- Prytherch, H.F. (1940). The life cycle and morphology of *Nematopsis ostrearum* sp. nov., a gregarine parasite of the mud crabs and oysters. *Journal of Morphology*, **66**: 39-65.
- Ragone, L.M. e Burreson, E.M. (1993). Effect of salinity on infection progression and pathogenicity of *Perkinsus marinus* in the eastern oyster, *Crassostrea virginica* (Gmelin). *Journal of Shellfish Research*, **12(1)**: 1-7.
- Ray, S.M. (1952). A culture technique for the diagnosis of infection with *Dermocystidium marinum* Mackin, Owen and Collier in oysters. *Science*, **116**: 360-361.
- Ray, S.M. (1953). Studies on the occurrence of *Dermocystidium marinum*, in young oysters. *Proc. Natl. Shellfish Assoc.*, **54**: 55-69.
- Ray, S.M. (1996). Historical perspective on *Perkinsus marinus* disease of oysters in the Gulf of Mexico, *Journal of Shellfish Research*, **15(1)**: 9-11.
- Reece, K.S., Siddall, M.E., Burreson, E.M. e Graves, J.E. (1997). Phylogenetic analysis of *Perkinsus* based on actin gene sequences. *Journal of Parasitology*, **83(3)**: 417-423.
- Renault, T. (1996). Appearance and spread of diseases among bivalve molluscs in the northern hemisphere in relation to international trade. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, **15(2)**: 551-561.
- Rodriguez, F., Godoy, T. e Navas, J.I. (1994). Cross-infection with *Perkinsus atlanticus* in *Ruditapes decussatus*, *Ruditapes philippinarum* and *Venerupis pullastra*. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, **14(1)**: 24-27.
- Rodriguez, F. e Navas, J.I. (1995). A comparison of gill and hemolymph assays for the thioglycollate diagnosis of *Perkinsus atlanticus* (Apicomplexa, Perkinsea) in clams, *Ruditapes decussatus* (L.) and *Ruditapes philippinarum* (Adams et Reeve). *Aquaculture*, **132**: 145-152.
- Ruano, F. (1986). Outbreak of a severe epizootic of *Perkinsus marinus* (Levin-78) at Ria de Faro clam's culture beds. *2<sup>nd</sup> Intern. Colloq. Pathol. Marine Aquac.*, 41-42.
- Ruano, F. e Cachola, R. (1986). Outbreak of a severe epizootic of *Perkinsus marinus* (Levin - 78) at Ria de Faro clam's culture beds. *2<sup>nd</sup> Intern. Colloq. Pathol. Marine Aquac.*, 7-11 Sept., Porto, pp. 41-42.
- Ruano, F. (1988). Pathology of bivalves. *Development of Aquaculture in Portugal - Technical Report*, 12p.
- Ruano, F. (1989). Agentes patogénicos da ameijoia boa (*Ruditapes decussata*) em populações cultivadas no litoral algarvio. *Seminário Aquacultura em Portugal*. Universidade do Algarve.

- Ruano, F. e Vigário, A.M. (1991). Patologia da perkinsiose na ameijoia boa *Ruditapes decussatus*. *Seminário sobre Aquacultura Mediterrânica '91*. Nº19, pp. 365-372.
- Sagristà, E., Durfort, M. e Azevedo, C. (1995). *Perkinsus* sp. (Phylum Apicomplexa) in Mediterranean clam *Ruditapes semidecussatus*: ultrastructural observations of the cellular response of the host. *Aquaculture*, **132**: 153-160.
- Sagristà, E., Durfort, M. e Azevedo, C. (1996). Ultrastructural data on the life cycle of the parasite, *Perkinsus atlanticus* (Apicomplexa), on the clam, *Ruditapes philippinarum*, in the Mediterranean. *Scientia Marina*, **60(2-3)**: 283-288.
- Sanmarti, M.M., Garcia Valero, J., Montes, J., Pech, A. e Durfort, M. (1995). Seguimiento del protozoo *Perkinsus* sp. en las poblaciones de *Tapes decussatus* y *Tapes semidecussatus* del delta des Ebro. *Actas V Congreso Aquacultura Español*, Barcelona, 260-265.
- Saunders, G.L., Powell, E.N. e Levis, D.H. (1992). Determination of *Perkinsus marinus* growth rates *in vivo* (and *in situ*). *Aquaculture*, 201-202.
- Scheltema, R.S. (1962). The relationship between the flagellate protozoan *Hexamita* and the oyster *Crassostrea virginica*. *J. Parasitol.*, **48**: 137-141.
- Schwartz, D. (1994). Méthodes statistiques à l'usage des médecins et des biologistes. *Médecine-Sciences Flammarion*. Paris. 314 p.
- Siddall, M.E., Reece, K.S., Graves, J.E. e Burreson, E.M. (1997). Total evidence refutes the inclusion of *Perkinsus* species in the phylum Apicomplexa. *Parasitology*, **115(2)**: 165-176.
- Sindermann, C.J. e Rosenfield, A. (1967). Principal diseases of commercially important marine bivalve mollusca and crustacea. *Fishery Bulletin*, **66(2)**: 335-385.
- Sindermann, C.J. (1970). *Principal diseases of marine fish and shellfish*. Academic Press, New York. 369 p.
- Sindermann, C.J. (1990). *Principal diseases of marine fish and shellfish - Diseases of marine shellfish*, Vol. 2. Academic Press Inc., 516 p.
- Sobral, P. e Widdows, J. (1997). Effects of elevated temperatures on the scope for growth and resistance to air exposure of the clam *Ruditapes decussatus* (L.), from southern Portugal. *Sci. Mar. Barc.*, **61(2)**: 163-171.
- Soniat, T.M. e Koenig, M.L. (1982). The effects of parasitism by *Perkinsus marinus* on the free amino acid composition of *Crassostrea virginica* mantle tissue. *Journal of Shellfish Research*, **2(1)**: 25-28.

- Soniat, T.M. (1996). Epizootiology of *Perkinsus marinus* disease of eastern oysters in Gulf of Mexico, *Journal of Shellfish Research*, **15**(1): 35-43.
- Stauber, L.A. (1959). Immunity in invertebrates, with special reference to the oyster. *Proceedings of the National Shellfisheries Association*, **50**: 7-20.
- Stein, J.E. e Mackin, J.G. (1957). An evolution of the culture method used in determining the intensity of *Dermocystidium marinum* in the oyster *Crassostrea virginica*. *Texas A&M Res. Found. Project 23, Tech. Rept.*, **22**: 1-5.
- Stein, J.E., Deninson, J.G. e Mackin, J.G. (1962). *Hexamita* sp. and a infectious disease in the commercial oyster, *Ostrea lurida*. *National Shellfisheries Association*, **50**: 67-81.
- Stokes, N.A. e Burreson, E.M. (1995). A sensitive and specific DNA probe for yhe oyster pathogen *Haplosporidium nelsoni*. *J. Euk. Microbiol.*, **42**(4): 350-357.
- Stokes, N.A., Siddall, M.E. e Burreson, E.M. (1995a). Detection of *Haplosporidium nelsoni* (Haplosporidia: Haplosporidiidae) in oysters by PCR amplification. *Diseases of Aquatic Organisms*, **23**: 145-152.
- Stokes, N.A., Siddall, M.E. e Burreson, E.M. (1995b). Small subunit ribosomal RNA gene sequence of *Minchinia teredinis* (Haplosporidia: Haplosporidiidae) and a specific DNA probe and PCR primers for its detection. *Journal of Invertebrate Pathology*, **65**: 300-308.
- Stokes, N.A., Flores, B.S., Burreson, E.M., Alcox, K.A., Guo, X. e Ford, S.E. (1997). Life cycle studies of *Haplosporidium nelsoni* (MSX) using PCR technology. National Shellfisheries Association. Abstracts of the 89<sup>th</sup> annual meeting, Florida. p.36.
- Tige, G., Grizel, H., Martin, A.G., Langlade, A. e Rabouin, M.A. (1980). Epidemiological situation caused by the presence of the parasite *Bonamia ostreae* in Britain. Evolution during the year 1980. *Sci. Peche*, **315**: 13-20.
- Vigário, A.M. e Ruano, F. (1991). Influência de diferentes factores ambientais no desenvolvimento in vitro do agente patogénico *Perkinsus atlanticus* (Apicomplexa: Perkinsea). *Seminário sobre Aquacultura Mediterrânica '91*, nº19, pp. 407-412.
- Villalba, A., Lopez, M.C. e Carballal, M.J. (1993). Parasitos y alteraciones patologicas de tres especies de almeja, *Ruditapes decussatus*, *Venerupis pullastra*, y *Venerupis rhomboides*, en las rias galegas. *Actas IV Congreso Nac. Acuicult.*, 551-556.
- Villalba, A., Carballal, M.J., López, C. e Casas, S. (1997). Effect of the infection by *Perkinsus* sp. on the condition of the carpet-shell clam *Ruditapes decussatus* (L.). In: VIII<sup>th</sup> International Conference "Diseases of Fish and Shellfish" Book of Abstracts, p. P-034.

- Vivier, E. (1982). Reflexions et suggestions à propos de la systématique des sporozoaires: création d'une classe des Haematozoa. *Protistologica*, **18**: 49-457.
- Volety, A.K. e Chu, F.-L.E. (1995). Suppression of chemiluminescence of eastern oyster (*Crassostrea virginica*) hemocytes by the protozoan parasite *Perkinsus marinus*. *Developmental and Comparative Immunology*, **19**(2): 135-142.
- Volety, A. K. e Chu, F.-L.E. (1997). Acid phosphatase activity in *Perkinsus marinus*, the protistan parasite of the american oyster, *Crassostrea virginica*. *Journal of Parasitology*, **83**(6): 1093-1098.
- White, M.E., Powell, E.N., Ray, S.M. e Wilson, E.A. (1987). Host-to-host transmission of *Perkinsus marinus* in oyster (*Crassostrea virginica*) populations by the ectoparasitic snail *Boonea impressa* (Pyramidellidae). *Journal of Shellfish Research*, **6**(1): 1-5.
- Widdows, J., Newell, R.I.E. e Mann, R. (1989). Effects of hypoxia and anoxia on survival, energy metabolism, and feeding of oyster larvae (*Crassostrea virginica*, Gmelin). *Biol. Bull. Mar. Biol. Lab. Woods Hole*, **177**(1): 154-166.
- Wilson, E.A., Powell, E.N., Craig, M.A., Wade, T.L. e Brooks, J.M. (1990). The distribution of *Perkinsus marinus* in Gulf Coast oysters: its relationship with temperature, reproduction, and pollutant body burden. *Int. Rev. Gesamt. Hydrobiol.*, **75**(4): 533-550.
- Wise, S.W. (1970). Microarchitecture and deposition of gastropod nacre. *Science*, **167**: 1486-1488.



---

---

# **Anexo I**

*Esfregaços por aposição*

---

---

## COLORAÇÃO DE ESFREGAÇOS POR APOSIÇÃO

### Hemacolor® (Merck)

1. Fixar as aposições durante 2 minutos em metanol.
2. Corar com o corante Hamacolor 1, durante 1 minuto.
3. Passar as lâminas para o corante Hemacolor 2 e aguardar mais 1 minuto.
4. Lavar em água corrente.
5. Deixar secar e montar a lamela com DPX ou resina Eukitt.

---

---

# **Anexo II**

*Histologia*

---

---

**A. COMPOSIÇÃO DO FIXADOR DE DAVIDSON**

- Água salgada.....1200 ml
- Álcool 95°.....1200 ml
- Formaldeído a 38%.....300 ml
- Glicerol.....400 ml
- Ácido acético (adicionado extemporaneamente).....10 %

**B. SEQUÊNCIA DE DESIDRATAÇÃO**

- 1) RAS ou xilol
- 2) RAS ou xilol
- 3) Álcool 95° - 30 minutos
- 4) Álcool 95° - 30 minutos
- 5) Álcool 100° - 30 minutos
- 6) Álcool 100° - 30 minutos
- 7) Álcool 100° - 1 hora
- 8) Xilol - 30 minutos
- 9) Xilol - 1 hora
- 10) Xilol - 1 hora (ou até à inclusão em parafina)

**C. COMPOSIÇÃO E PREPARAÇÃO DOS CORANTES HEMATOXILINA E EOSINA****→ Hematoxilina:**

- Hematoxilina..... 4 g
  - Álcool 95° ..... 200 ml
  - Potassium aluminium sulfate ..... 11 g
  - Água destilada ..... 200 ml
  - Glicerol ..... 200 ml
  - Ácido acético ..... 20 ml
  - Iodate de potassium ..... 0,8 g\*
- (\* ou 4,07 g de KMnO)

Dissolver a hematoxilina no álcool.

Dissolver o potassium aluminium sulfate na água destilada.

Juntar as 2 soluções e adicionar os outros reagentes segundo a ordem indicada.

**→ Eosina:**

- Eosina ..... 2,5 g
- Água ..... 250 ml

#### **D. SEQUÊNCIA DE COLORAÇÃO COM HEMATOXILINA E EOSINA**

- 1) Xilol - 30 minutos
- 2) Xilol - 30 minutos
- 3) Etanol absoluto - 15 minutos
- 4) Etanol absoluto - 15 minutos
- 5) Água corrente - 10 minutos
- 6) Hematoxilina - 1 min 30 s
- 7) Água corrente - 5 minutos
- 8) Eosina - 3 min 30s
- 9) Água corrente - 1 minuto
- 10) Etanol absoluto - 1 minuto
- 11) Etanol absoluto - 1 minuto
- 12) Etanol absoluto - 1 minuto
- 13) Xilol - 10 minutos
- 14) Xilol - 10 minutos

---

---

# **Anexo III**

*Incubação em FTM*

---

---

---

## A. COMPOSIÇÃO E PREPARAÇÃO DO MEIO TIOLICOLATO (FTM)

- Meio tioglicolato desidratado com dextrose ..... 14,6 g
- NaCl ..... 10,0 g
- Água destilada..... 485 ml

Aquecer até ferver, com agitação; autoclavar (20 min, 120°C);

## B. SOLUÇÃO DE LUGOL

- Iodeto de potássio ..... 6,0 g
- Iodo ..... 4,0 g
- Água destilada ..... 100 ml

A solução de trabalho deve ser diluída a 4% (1:25).

---

---

*Imunologia*

**Anexo IV**

---

---

**A. COMPOSIÇÃO E PREPARAÇÃO DO MEIO RPMI 1640**

- Meio RPMI w/ L-glutamine, w/o NaHCO<sub>3</sub> ..... 10,43 g
- Bicarbonato de sódio ..... 2,0 g
- Água bi-destilada ..... 1000 ml

Dissolver bem o meio RPMI e o bicarbonato de sódio, agitando durante um mínimo de 2 horas.

Ajustar o pH, adicionando CO<sub>2</sub> durante 1 minuto (a cor deve mudar de rosa para vermelho alaranjado).

Filtrar por um filtro estéril de 0,22 µm de porosidade.

Incubar na estufa a 37°C durante 36 horas para verificar se há contaminação bacteriana. Conservar a 4°C.

Antes de utilizar, adicionar, a 500 ml de meio, 200 µl de solução de antibióticos (\*) e 10% (50 ml) de soro fetal de bovino descomplementado.

(\*) Solução de antibióticos:

- Penicilina G ..... 300 mg
- Streptomicina ..... 500 mg
- Água destilada ..... 10 ml

**B. COMPOSIÇÃO DA SOLUÇÃO DMSO**

- DMSO ..... 7,5%
- Sero fetal de bovino ..... 92,5%

**C. COMPOSIÇÃO DO TAMPÃO FOSFATO (PBS 1x)**

- NaCl ..... 9 g/l
- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> anidro ..... 1,48 g/l
- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ..... 0,43 g/l

Ajustar o pH a 7,2. Conservar a 4°C.

Pode-se preparar uma solução stock deste tampão 10x concentrado.

**D. COMPOSIÇÃO DO CONJUGADO COM FLUORESCÊNCIA (DILUÍDO 1/200)**

- Anticorpo marcado ..... 10 µl
- Azul de Evans ..... 20 µl
- PBS 1x ..... 1970 µl

---

---

# **Anexo V**

*Biología Molecular*

---

---

## A. COMPOSIÇÃO DO TAMPÃO DE EXTRACÇÃO

- TRIS 50 mM .....	10 ml
- EDTA 5 mM .....	2 ml
- NaCl 100 mM .....	4 ml
- Água destilada .....	completar 200 ml
- SDS .....	10%

## B. PRIMERS UTILIZADOS EM PCR

*PERKF*: 5'-CGT GGT ACC GGG AAT TTG CCA CTG GC-3'  
*PERKR*: 5'-GCT TCG CCA AGG GCG TCC ATC ACG GC-3'

*COMPF*: 5'-ACT GGC AGC ATC CGA AGT TCT TGG-3'  
*COMPR*: 5'-CGA AAG TGA TCA GGT CAC CGA AGG-3'  
(desenhados pelo programa PRIMER (version 0.5))

*300F*: 5'-CAC TTG TAT TGT GAA GCA CCC-3'  
*300R*: 5'-TTG GTG ACA TCT CCA AAT GAC-3'  
(cedidos por J.A. Robledo)

*MEDLF*: 5'-CCG AAT TCG TCG ACA ACC TGG TTG ATC CTG CCA GT-3'  
*MEDLR*: 5'-CCC GGG ATC CAA GCT TGA TCC TTC TGC AGG TTC ACC TAC-3'  
(Medlin *et al.*, 1988)

---

---

# **Anexo VI**

## *Composição do Fitoplâncton*

---

---

## COMPOSIÇÃO DE UMA AMOSTRA DE FITOPLÂNCTON DE BOUÉE D'AUGER

D I A T O M E E S  C E N T R I Q U E S	<i>Leptocylindrus danicus</i>	800	TOTAL 65.000
	<i>Melosira spp.</i>	1200	
	<i>Paralia marina</i>	800	
	<i>Skeletonema costatum</i>	13000	
	<i>Thalassiosira spp.</i>	600	
	<i>Thalassiosira decipiens</i>	1200	
	<i>Thalassiosira levanderi</i>	46000	
	<i>Thalassiosira gravida</i>	1400	
D I A T O M E E S  P E N N E S	<i>Asterionella kariana</i>	4000	TOTAL 36.900
	<i>Fragilaria spp.</i>	2400	
	<i>Navicula spp.</i>	4000	
	<i>Nitzschia longissima</i>	11200	
	<i>Pleurosigma spp.</i>	200	
	<i>Pseudonitzschia seriata</i>	12200	
	<i>Surirella spp.</i>	100	
<i>Thalassionema sp.</i>	2800		
D I N O F L A G E L L E S	<i>Alexandrium sp.</i>	100	TOTAL 5500
	<i>Ceratium lineatum</i>	100	
	<i>Heterocapsa niei</i>	200	
	<i>Gyrodinium spp.</i>	200	
	<i>Gymnodinium spp.</i>	2200	
	<i>Protooperidinium spp.</i>	100	
	<i>Scripsiella spp.</i>	1800	
	<i>Divers dinoflagellés</i>	800	
PHYTO- FLAGELLE	<i>Euglènes</i>	1400	TOTAL 13.600
	<i>Divers</i>	12200	

Phytoplankton contenu dans un litre d'eau de mer, 1m prof., coef 88, BM+3 Bouée d'Auger le 24 mars 1997 : 121.000 cellules/l

(Dados cedidos por D. Fouché, IFREMER)

---

---

# **Anexo VII**

*Análises estatísticas*

---

---

---

**ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO ÍNDICE DE CONDIÇÃO EM RELAÇÃO À  
INTENSIDADE DE INFECÇÃO**

Anova: Single Factor.

SUMMARY

<i>Groups</i>	<i>Count</i>	<i>Sum</i>	<i>Average</i>	<i>Variance</i>
Column 1	5	6100000	1220000	1,64E+12
Column 2	5	65,4701399	13,094028	1,078621

ANOVA

<i>Source of Variation</i>	<i>SS</i>	<i>df</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>P-value</i>	<i>F crit</i>
Between Groups	3,7209E+12	1	3,721E+12	4,53218	0,0659066	5,31764499
Within Groups	6,568E+12	8	8,21E+11			
Total	1,0289E+13	9				

---

---

## **Anexo VIII**

*Publicações decorrentes deste trabalho*

---

---

- Almeida, M. (1997). Diagnostic quantitatif de *Perkinsus atlanticus* (Apicomplexa, Perkinsea) chez les palourdes *Ruditapes decussatus* et *Ruditapes philippinarum*. Relatório de actividades no Laboratoire de Génétique, Aquaculture et Pathologie (IFREMER), Outubro/96 - Maio/97, 23 p.
- Almeida, M., Berthe, F. e Dinis, M.T. (1997). Whole clam culture as a quantitative diagnostic procedure of *Perkinsus atlanticus* (Apicomplexa, Perkinsea) in clams *Ruditapes decussatus*. In: "Third International Symposium on Research for Aquaculture: Fundamental and Applied Aspects", Barcelona, August 24-27, p.62.

**WHOLE CLAM CULTURE AS A QUANTITATIVE  
DIAGNOSTIC PROCEDURE OF *Perkinsus atlanticus*  
(APICOMPLEXA, PERKINSEA) IN CLAMS *Ruditapes decussatus***

Manuela Almeida, Franck Berthe & Maria Teresa Dinis  
IFREMER - Laboratoire de Génétique, Aquaculture et Pathologie  
BP 133, 17390 La Tremblade, France

The protozoan parasite *Perkinsus atlanticus* (Azevedo, 1989) causes severe losses among cultured clams, *Ruditapes decussatus* (Linnaeus, 1758). Experimental reproduction of *Perkinsus* infection models were set up in order to study the role of clam density, temperature, or salinity in perkinsiosis.

The aim of our study was to develop a quantitative diagnostic procedure to optimize the evaluation of infection intensity and detect low levels or early infection of clams by *P. atlanticus*. This technique is based on the culture of all clam tissues in fluid thioglycollate medium (FTM), sodium hydroxide lysis, and iodine staining of the parasites on cellulose filters. *Perkinsus* prezoosporangia were also purified and different stages of life cycle were cultured *in vitro*. Positive results were assessed by the use of monoclonal antibodies previously prepared by Goggin (1991). The parasite is routinely diagnosed by means of histology or incubation of gills in FTM. However, the parasite is known to occur in several tissues (gill, mantle, kidney, muscular foot, gonads, gut and digestive gland). The different available diagnostic methods were then compared in terms of sensibility and specificity.

Results suggest that the whole-clam culture technique provides reliable value for quantification of infection intensity (number of parasites per gramme wet weight tissue) and a minimum level was determined to avoid false positive results. However, the method could be improved by the use of specific probes to detect parasite cells on the filters. Results also suggest that the routinely used methods are not sensible enough to detect low infection levels.

Goggin, C.L. (1991). Studies on *Perkinsus atlanticus* (Protozoa, Apicomplexa) from *Ruditapes decussatus* (Mollusca, Bivalvia) in France. Rapport IFREMER, 19p

- Almeida, M., Thébault, A., Dinis, M.T. e Berthe, F. (1997). Evaluation of whole clam culture as a quantitative diagnostic procedure of *Perkinsus atlanticus* (Apicomplexa, Perkinsea) in clams, *Ruditapes decussatus* and *Ruditapes philippinarum*. In: VIII<sup>th</sup> International Conference "Diseases of Fish and Shellfish", Edinburg, September 14-19, p. P-038.

**EVALUATION OF WHOLE CLAM CULTURE AS A QUANTITATIVE DIAGNOSTIC PROCEDURE OF *PERKINSUS ATLANTICUS* (APICOMPLEXA, PERKINSEA) IN CLAMS, *RUDITAPES DECUSSATUS* AND *RUDITAPES PHILIPPINARUM*.**

Manuela Almeida (1), Anne Thébault (1), Maria Teresa Dinis (2), and Franck Berthe (1).

(1) IFREMER - Laboratoire de Génétique, Aquaculture et Pathologie, BP 133, 17390 La Tremblade, France

(2) Universidade do Algarve, UCTRA, Campus de Gambelas, 8000 Faro, Portugal

The protozoan parasite *Perkinsus atlanticus* (Azevedo, 1989) causes severe losses among cultured clams, *Ruditapes decussatus* (Linnaeus, 1758). Experimental reproduction of *Perkinsus* infection models were set up in order to study the role of clam density, temperature, or salinity in perkinsiosis. The goal of our study was to develop a quantitative diagnostic procedure to optimize the evaluation of infection intensity and detect low levels or early infection of clams by *P. atlanticus*. This technique is based on the culture of all clam tissues in fluid thioglycollate medium (FTM), sodium hydroxide lysis, and iodine staining of the parasites on cellulose filters.

Positive results were assessed by the use of monoclonal antibodies previously prepared by Goggin *et al.* Prior to the use of monoclonal antibodies, *Perkinsus* prezoosporangia were purified and different stages of life cycle were cultured *in vitro*.

The parasite is routinely diagnosed by means of histology or incubation of gills in FTM. However, the parasite is known to occur in several tissues (gill, mantle, kidney, muscular foot, gonads, gut and digestive gland). The different available diagnostic methods were compared in terms of sensibility and specificity. Results suggest that the whole-clam culture technique provides reliable value for quantification of infection intensity (number of parasites per gramme wet weight tissue). Question of possible false positive results is also discussed. Results suggest that the routinely used methods are not sensitive enough to detect low infection levels. However, the method could be improved by the use of specific probes to detect parasite cells in conjunction with the whole-clam culture technique.

- Almeida, M., Dinis, M.T. e Berthe, F. (1998). Infection intensity of *Perkinsus atlanticus* disease in clams *Ruditapes decussatus* challenged from different doses of the parasite. In: "Third International Symposium on Aquatic Animal Health", Baltimore, USA, August 30 - September 3.

**Author List:**

Almeida, Manuela C.R.\*  
Dinis, Maria T.  
Berthe, Franck

**Key words:** pathology, *Perkinsus atlanticus*, *Ruditapes*, infection

Infection intensity of *Perkinsus atlanticus* disease in clams *Ruditapes decussatus* challenged from different doses of the parasite

M Almeida (1,2)\*, MT Dinis (1) and F Berthe (2)

1 Universidade do Algarve, UCTRA, Campus de Gambelas, 8000 Faro, Portugal ml349@lex.si.ualg.pt; mtdinis@mozart.si.ualg.pt  
2 IFREMER, Laboratoire de Génétique et Pathologie, BP 133, 17390 La Tremblade, France fberthe@ifremer.fr

*Perkinsus atlanticus* is a protozoan parasite that has caused significant mortalities in clam culture beds along the south coast of Portugal. The disease caused by this agent is infectious and can be transmitted directly from a clam to another. The stage of zoospore (biflagellate free cell) is, probably, the most effective and the principal stage for the dissemination of the disease. Our experiments were conducted to test the response of clams to different doses of zoospores of *P. atlanticus*. These infective cells were obtained after isolation, purification and culture of trophozoites from heavily infected clams. Clams were inoculated by injection into the shell cavity with 0,  $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $2 \times 10^6$  and  $3 \times 10^6$  zoospores per clam and maintained at  $22 \pm 2^\circ\text{C}$  and  $31 \pm 1\%$  for 2 months. Infection intensity was measured by whole clam culture method in fluid thioglycolate medium. A significant direct positive relation was observed between infective cell dose and both prevalence ( $r^2=0.95$ ) and infection intensity ( $r^2=0.99$ ). The number of *P. atlanticus* cells required to determine mortality in clams was not verified, because there was no relevant mortality during these experiments.

**Presentation Topic categories:** parasitology, bivalves, aquaculture

- Almeida, M., Berthe, F. e Dinis, M.T. (*in press*). Whole clam culture as a quantitative diagnostic procedure of *Perkinsus atlanticus* (Apicomplexa, Perkinsea) in clams *Ruditapes decussatus*.

---

**WHOLE CLAM CULTURE AS A QUANTITATIVE DIAGNOSTIC PROCEDURE OF  
*Perkinsus atlanticus* (APICOMPLEXA, PERKINSEA)  
IN CLAMS *Ruditapes decussatus***

Manuela Almeida<sup>1,2</sup>, Franck Berthe<sup>1</sup>, Anne Thébault<sup>1</sup> & Maria Teresa Dinis<sup>2</sup>

<sup>1</sup> IFREMER - Laboratoire de Génétique et Pathologie, BP133, 17390 La Tremblade, France

<sup>2</sup> Universidade do Algarve - UCTRA - Campus de Gambelas, 8000 Faro, Portugal

---

**Abstract**

The protozoan parasite *Perkinsus atlanticus* (Azevedo, 1989) causes severe losses among cultured clams, *Ruditapes decussatus*. This parasite is routinely diagnosed by means of histology or incubation of gills in fluid thioglycollate medium. However, in order to develop models of experimental reproduction of the disease, a procedure for infection intensity evaluation was required. Thus, we adapted a diagnostic method, based on the culture of all clam tissues in fluid thioglycollate medium, followed by sodium hydroxide lysis, and iodine staining of the parasites on cellulose filters. This method was compared with histology. Results suggest that histology is not sensitive enough to detect low levels of infection. The whole-clam culture technique allows detection of low levels or early infection of clams by *P. atlanticus*. Moreover, this method provides a quantification of infection intensity as number of parasites per gramme wet weight tissue.

*Keywords:* Clams, *Ruditapes decussatus*, *Perkinsus atlanticus*, Diagnosis

---

**1. Introduction**

*Perkinsus* spp. (Apicomplexa, Perkinsea) have been reported as responsible for substantial mortalities in cultured and wild mollusc populations throughout the world (Perkins, 1993). *P. marinus* was described from eastern oysters *Crassostrea virginica* in the Gulf of Mexico and East coast of North America (Andrews and Hewatt, 1957; Craig *et al.*, 1989; Wilson *et al.*, 1990). Since 1983, abnormal high mortality rates, ranging between 50 and 80%, occurred in cultured clams from South of Portugal. Search for the causes of these outbreaks led to the description of *Perkinsus atlanticus* (Azevedo, 1989). Since then, *P. atlanticus* was observed from clams *Ruditapes decussatus* and *R. philippinarum* in Portugal (Azevedo, 1989; Ruano, 1989), Spain (Navas *et al.*, 1992; Figueras *et al.*, 1992), Italy (DaRos and Canzonier, 1986; Ceschia *et al.*, 1991) and France (Goggin, 1991). Two other species were also described: *P. olseni* from abalone *Haliotis rubra* and *H. laevigata*, from clams *Tridacna crocea* and other molluscs in Australia (Goggin and Lester, 1995; Goggin, 1996); and *P. karlssoni* from Bay scallops *Argopecten irradians* on the eastern coast of Canada and United States (McGladdery *et al.*, 1991; McGladdery *et al.*, 1993).

Histological examination of fixed host tissues and incubation of gills in a fluid thioglycollate medium (FTM), followed by staining and microscopic observation are the currently available methods for detection and determination of infection levels for *P. atlanticus* (Figueras *et al.*, 1992; Goggin, 1996; Goggin and Lester, 1987; Navas *et al.*, 1992; Ruano, 1988).

Because this parasite is one of the major concerns for molluscan aquaculture (code OIE, 1995), experimental infection models were set up to study perkinsiosis (Barber and Mann, 1994; Chu, 1996; Chu and Volety, 1997; La Peyre, 1996). The aim of this preliminary study was to develop a quantitative diagnostic procedure to optimize the evaluation of infection intensity of the clams in the *P. atlanticus* / *R. decussatus* experimental infection model. Moreover, a sensitive and early diagnosis of *P. atlanticus* infections is an essential management tool needed to avoid infection progression and mortality when parasitized seed clams are transferred to growout areas or between culture beds. Thus, the ability to rapidly and accurately detect this virulent parasite of clams has broad implications for both research and industry.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Clams

Clams included in this study were commercial size specimens of *Ruditapes decussatus* originating from 3 different zones: Algarve (South of Portugal); La Tremblade (France), and Lissadell (Ireland). These latter two are reported as areas where no infection by *Perkinsus* was found (Goggin, 1991; Duguy, pers. com.). Algarve is an area where very high infection levels have been reported; the gills of heavily infected clams present a variable number of cysts on the surface of filaments (Fig. 1).



**Figure 1.** Localization of the cysts of the parasite among the branchial lamellae.

## 2.2. Histology

For histological examination, clams were cut along a sagittal plane, which passes through the gills, digestive tract, gonads, mantle and foot. Tissues were then placed in Davidson's fixative, dehydrated and embedded in paraffin. Sections were stained with conventional hematoxylin and eosin and examined under a light microscope (Fig. 2).

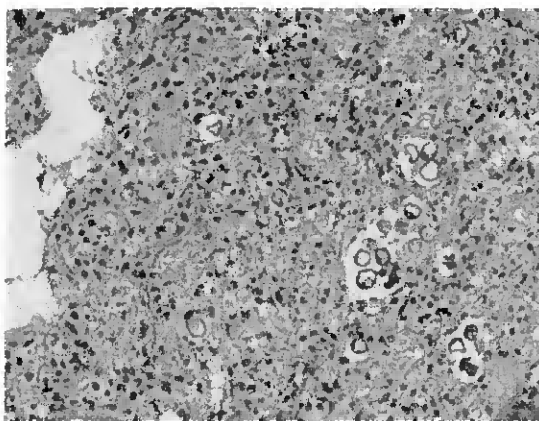


Figure 2. *P. atanticus* cells (stage trophozoites) and nodule reaction in *R. decussatus* (x400).

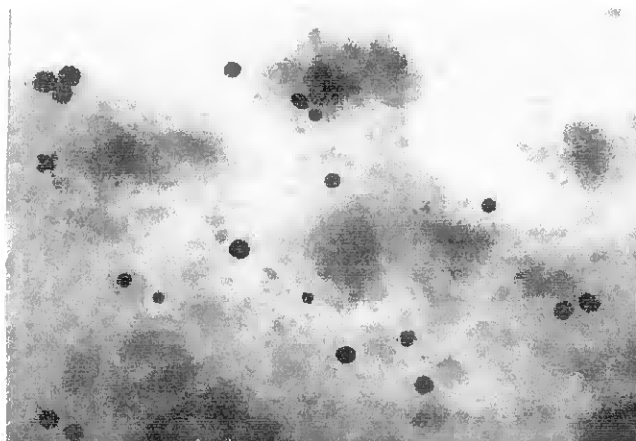
## 2.3. Incubation of Gills in a Fluid Thioglycollate Medium (FTM)

Pieces of gills were excised and placed in fluid thioglycollate medium (OXOID CM173) containing antibiotics (penicillin G, 500 U/ml and streptomycin sulphate, 500 µg/ml), and incubated at room temperature for 4 days. During the incubation, the size of cultured parasites increased from 3-10 to 70-250 µm. After incubation, the fragments of gills were collected and placed in Lugol's iodine solution 4% for 10 min, and mounted between a slide and a cover slip for microscopic examination in the fresh state. *Perkinsus* hyphospores are spherical and stain brown or bluish-black with Lugol's iodine solution.

## 2.4. Whole Clam Culture Method

This method was adapted from the technique developed by Fisher and Oliver (1996) to quantify *P. marinus* in oysters *Crassostrea virginica*. It consists of the culture of all clam homogenised tissues in FTM, sodium hydroxide lysis, and iodine staining of the parasites on cellulose filters (Fig. 3).

The most important assumption of FTM diagnostic procedure is that all of the parasite cells, including different stages, are retrieved from the host. Obviously, diagnosis of the whole organism avoids loss of parasites from unsampled tissue (Fisher and Oliver, 1996). The protocol that we used is summarised in the table I.



**Figure 3.** Coloration of parasite cells with Lugol's iodine solution.

**Table I.** Whole clam culture protocol.

- A. Open the clam and measure the wet weight of all tissues;
- B. Mince or homogenize clam tissues and place into 50 ml tubes containing 20 ml of FTM (supplemented with antibiotics), for enlargement of parasites (from stage of trophozoites to prezoosporangia), during 4 days, in the dark at room temperature;
- C. After this incubation period, centrifuge the tubes at 2500 rpm for 10 minutes and discard the FTM supernate;
- D. Add 20 ml of 2M NaOH to the tubes, mix well, and incubate in a 60°C water bath for 1-3 hours to degrade tissues;
- E. When this solution appears more transparent, tissues are degraded, and lysis stopped by centrifugation (2500 rpm, 10 min) and NaOH supernate removed;
- F. Wash this pellet 3 times with 20 ml of distilled water, mixing well and centrifuging (2500 rpm, 10 min) each time;
- G. Resuspend the parasites in 1 ml of Lugol's solution (4%) and mix vigorously;
- H. Place on a 0.22  $\mu\text{m}$  pore-size filter paper (mixed cellulose ester composition) an aliquot of 100  $\mu\text{l}$ ;
- I. Count the dark blue parasites at 100x magnification;
- J. Multiply this number by the dilution factor and divide by the respective wet weight of tissues;
- K. The result is the estimation of infection intensity as number of prezoosporangia per gramme wet weight tissue.

In order to test the specificity of the *Perkinsus* cells staining by Lugol's solution, a sample of phytoplankton from La Tremblade (Bouée d'Auger) was submitted to the same procedure of detection after 4 days of culture in FTM in standard conditions.

### 3. Results and Discussion

Results of the *P. atlanticus* detection by means of histology and whole clam culture are presented in the table II. The presence of the parasite in clams originating from Algarve was confirmed by means of both of histological (28% of infected animals) and whole clam culture (95% of infected animals) methods. However, high discrepancies were found in the percentage of infected animals detected by the two methods. These discrepancies are statistically significant when tested by frequencies of infection comparison ( $|\epsilon| = 4,65$  with the level  $\alpha = 5\%$ ). The whole-clam culture allowed us to detect many more infections than histology. Rodriguez and Navas (1995) already stated that histological analysis may give false negative results.

**Table II.** Number and percentage of infected clams by *P. atlanticus*, comparing whole-clam culture procedure and histology, from 3 different sites.

	Whole-clam culture		Histology	
	+/total	%	+/total	%
<b>Algarve</b>	57/60	95	17/60	28
<b>La Tremblade</b>	13/44	30	0/44	0
<b>Lissadell</b>	3/60	5	0/60	0

No positive diagnoses were obtained by means of histological observations in the clams originating from La Tremblade when 30% of infected individuals were detected in the same batch by means of whole clam culture. However, *Perkinsus* cells were also directly observed in these animals, after parasite purification into a sucrose gradient (Goggin, pers. com.) and culture in Petri dishes (Auzoux-Bordenave *et al.*, 1995). These results suggest that histology is not sensitive enough to detect low levels of infection, whereas the whole-clam culture method appears more suitable.

Three positive individuals for *Perkinsus* detection were found by means of whole clam culture from Lissadell. However, one of these individuals had three cells stained by Lugol's iodine solution on the cellulose filter and the two others had only one cell stained. If one considers the very low number of presumptive *Perkinsus* cells that were counted on the filters (<3), these results could be regarded as false positives or very low level infections.

Fisher and Oliver (1996) asserted that enlargement and staining by the FTM technique are specific for *Perkinsus* at the genus level. However, the FTM culture assay of phytoplankton, sampled in the open sea, gave positive results (40 positively stained cells). This sample contained 121 000 planktonic cells per litre (Fouché, pers. com.), among which about 5 500 cells of various dinoflagellates (*Alexandrium* sp., *Ceratium lineatum*, *Heterocapsa niei*, *Gyrodinium* spp., *Gymnodinium* spp., *Protoperidinium* spp., *Scripsiella* spp., and other undetermined dinoflagellates). This suggests that some planktonic species could give positive results by means of the FTM method. Goggin and Barker (1993) demonstrated that *Perkinsus* was phylogenetically related to dinoflagellates.

In order to solve this question, and demonstrate the specificity of the whole clam culture method, would be necessary to do further experiments. It was foreseen to do the purification of the positively stained cells and then submit them to immunological tests. We had available some monoclonal antibodies, prepared by Goggin (1991), but practical problems interrupted these experiments; so, these essays will be repeated. Another method that will be also tested with the same aim is the detection of *Perkinsus atlanticus* cells by the use of DNA-probes.

If we compare the results of *Perkinsus* detection in clams from Algarve using the gill culture method (80%) and the whole clam culture method (95%), the latter seems to be more sensitive. However the infection frequencies comparison give a statistically non-significant result ( $|\varepsilon| = 0.8$  with the level  $\alpha = 5\%$ ). Nevertheless, the whole-clam culture method provides a quantification of infection intensity as the number of parasites per gramme wet weight tissue. This method could be suitable in the study of perkinsiosis and the role of physical and chemical parameters, such as density and age of the clams and parasite exposure, on susceptibility, infectivity, disease processes, and transmission of *P. atlanticus* in clams by the use of experimental infection models.

#### 4. Conclusions

From our results, the whole-clam culture technique provides detection of low levels or early infections of clams by *P. atlanticus*. Nevertheless, in the course of this preliminary study, the question of possible false positive results was raised. Obviously, more work has to be done before this question is answered. However, the whole-clam culture technique seems as a very simple and sensitive method to detect *Perkinsus atlanticus*. Moreover, this method provides a quantification of infection intensity. This could be used in the study of perkinsiosis by means of experimental reproduction of the disease. Our results also confirm that histology is probably not sensitive enough to detect low levels of infection. However, it is important to say that more work is needed to validate the whole-clam culture procedure as a diagnostic method.

#### Acknowledgements

This study has been carried out with the financial assistance of the European Community reference laboratory for bivalve mollusc diseases (97/260/EC). Manuela Almeida was supported by PRAXIS XXI/BM/7075/95. The authors wish to acknowledge the contribution of Dominique Fouché (IFREMER) for sampling and identifying phytoplankton species.

#### References

- Andrews, J.D. and Hewatt, W.G. (1957). Oyster mortality studies in Virginia. II. Fungus disease caused by *Dermocystidium marinum* in oysters of Chesapeake Bay. *Ecol. Monogr.*, **27**:1-25.
- Auzoux-Bordenave S., Vigário, A.M., Ruano, F., Doumart-Coulon, I. and Doumenc, D. (1995). *In vitro* sporulation of the clam pathogen *Perkinsus atlanticus* (Apicomplexa, Perkinsa) under various environmental conditions. *Journal of Shellfish Research*, **14**(2): 469-475.
- Azevedo, C. (1989). Fine structure of *Perkinsus atlanticus* n.sp. (Apicomplexa, Perkinsa) parasite of the clam *Ruditapes decussatus* from Portugal. *Journal of Parasitology*, **75**(4): 627-635.
- Barber, B.J. and Mann, R. (1994). Growth and mortality of eastern oysters, *Crassostrea virginica* (Gmelin, 1791), and pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) under challenge from the parasite, *Perkinsus marinus*. *Journal of Shellfish Research*, **13**(1): 109-114.
- Ceschia, G., Zentilin, A. and Giorgetti, G. (1991). Occurrence of *Perkinsus* in clams (*Ruditapes philippinarum*) farmed in Northeast Italy. *Boll. Soc. Ital. Patol. Ittica*, **5**: 101-108.
- Chu, F.-L.E. (1996). Laboratory investigations of susceptibility, infectivity, and transmission of *Perkinsus marinus* in oysters. *Journal of Shellfish Research*, **15**(1): 57-66.
- Chu, F.-L.E. and Volety, A.K. (1997). Disease processes of the parasite *Perkinsus marinus* in eastern oyster *Crassostrea virginica*: minimum dose for infection initiation, and interaction of temperature, salinity and infective cell dose. *Disease of Aquatic Organisms*, **28**: 61-68.
- Code OIE (1995). Code Sanitaire International pour les Animaux Aquatiques. Office International des Épizooties. Organisation Mondiale de la Santé Animale. Titre 2.2. Maladie des mollusques: 83-107.

- Craig, A., Powell, E.N., Fay, R.R. and Brooks, J.M. (1989). Distribution of *Perkinsus marinus* in Gulf Coast oyster populations. *Estuaries*, **12**(2): 82-91.
- DaRos, L. and Canzonier, W.J. (1986). *Perkinsus*, a protistan threat to bivalve culture in the mediterranean basin. Pathology in Marine Aquaculture - *European Aquaculture Society, special publication*, nº9.
- Figueras, A., Robledo, J.A.F., and Novoa, B. (1992). Occurrence of haplosporidian and *Perkinsus*-like infections in carpet-shell clams, *Ruditapes decussatus* (Linnaeus, 1758), of the Ria de Vigo (Galicia, NW Spain). *Journal of Shellfish Research*, **11**(2): 377-382.
- Fisher, W.S. and Oliver, L.M. (1996). A whole-oyster procedure for diagnosis of *Perkinsus marinus* disease using Ray's fluid thioglycollate culture medium. *Journal of Shellfish Research*, **15**(1): 109-117.
- Goggin, C.L. (1991). Studies on *Perkinsus atlanticus* (Protozoa, Apicomplexa) from *Ruditapes decussatus* (Mollusca, Bivalvia) in France. *Rapport de stage*, IFREMER, 19p.
- Goggin, C.L. (1996). Effect of *Perkinsus olseni* (Protozoa, Apicomplexa) on the weight of *Tridacna crocea* (Mollusca, Bivalvia) from Lizard Island, Great Barrier Reef. *Aquaculture*, **141**: 25-30.
- Goggin, C.L. and Barker, S.C. (1993). Phylogenetic position of the genus *Perkinsus* (Protista, Apicomplexa) based on small subunit ribosomal RNA. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **60**: 65-70.
- Goggin, C.L. and Lester, R.J.G. (1987). Occurrence of *Perkinsus* species (Protozoa, Apicomplexa) in bivalves from the Great Barrier Reef. *Diseases of Aquatic Organisms*, **3**: 113-117.
- Goggin, C.L. and Lester, R.J.G. (1995). *Perkinsus*, a protistan parasite of abalone in Australia: a review. *Marine and Freshwater Research*, **46**: 639-646.
- La Peyre, J.F. (1996). Propagation and in vitro studies of *Perkinsus marinus*. *Journal of Shellfish Research*, **15**(1): 89-101.
- McGladdery, S.E., Bradford, B.C. and Scarratt, D.J. (1993). Investigations into the transmission of parasites of the bay scallop *Argopecten irradians* (Lamarck, 1819), during quarantine introduction to Canadian waters. *Journal of Shellfish Research*, **12**: 49-58.
- McGladdery, S.E., Cawthorn, R.J. and Bradford, B.C. (1991). *Perkinsus karlssoni* n.sp. (Apicomplexa) in bay scallops *Argopecten irradians*. *Disease of Aquatic Organisms*, **10**(2): 127-137.
- Navas, J.I., Castilho, M.C., Vera, P. and Ruiz-Rico, M. (1992). Principal parasites observed in clams, *Ruditapes decussatus* (L.), *Ruditapes philippinarum* (Adams and Reeve), *Venerupis pullastra* (Montagu) and *Venerupis aureus* (Gmelin), from the Huelva coast (S.W. Spain). *Aquaculture*, **107**: 193-199.
- Perkins, F.O. (1993). Infectious diseases of molluscs. In: Couch, J.A. and Fournie, J.W., eds., *Pathobiology of marine and estuarine organisms*, 255-287.
- Rodriguez, F. and Navas, J.I. (1995). A comparison of gill and hemolymph assays for the thioglycollate diagnosis of *Perkinsus atlanticus* (Apicomplexa, Perkinsea) in clams, *Ruditapes decussatus* (L.) and *Ruditapes philippinarum* (Adams and Reeve). *Aquaculture*, **132**: 145-152.
- Ruano, F. (1988). Pathology of bivalves. Development of Aquaculture in Portugal. *Technical Report*. 12p.
- Ruano, F. (1989). Agentes patogénicos da ameijoia boa (*Ruditapes decussata*) em populações cultivadas no litoral algarvio. *Seminário Aquacultura em Portugal*.
- Wilson, E.A., Powell, E.N., Craig, M.A., Wade, T.L. and Brooks, J.M. (1990). The distribution of *Perkinsus marinus* in Gulf coast oysters: its relationship with temperature, reproduction, and pollutant body burden. *Int. Rev. Gesamt. Hydrobiol.*, **75**(4): 533-550.

