



**CAPTAR**  
ciência e ambiente para todos

volume 8 • número 2 • p 28-35

## **Deteção da infeção por *Perkinsus* sp. em diferentes zonas de produção europeias de amêijoa-boia, *Ruditapes decussatus***

A amêijoa-boia, *Ruditapes decussatus*, é uma espécie nativa da Europa com um elevado valor gastronómico e económico. As populações naturais desta espécie estão a ser drasticamente reduzidas devido à sobre-exploração dos bancos naturais, à poluição, ao impacto dos fatores abióticos (entre eles, as variações significativas de temperatura, salinidade e pH), e a patologias causadas por bactérias, vírus e protozoários. Uma das patologias que afeta mais severamente a amêijoa-boia é a infeção por um parasita protozoário do género *Perkinsus* que causa relevantes taxas de mortalidade em bivalves em várias partes do mundo. As espécies que podem ter um impacto económico mais relevante são *Perkinsus marinus* e *Perkinsus olseni*, pois provocam mortalidades massivas que afetam significativamente a produção. O presente trabalho, teve como principal objetivo o estudo da suscetibilidade/resistência de várias populações europeias infetadas por *Perkinsus* sp. através do método de tioglicolato líquido de Ray (RFTM). Esta informação permitirá às empresas eleger as populações de amêijoa-boia que poderão vir a ser usadas em programas de melhoramento da espécie, na descoberta de marcadores moleculares envolvidos na resistência a *Perkinsus* sp., entre outras aplicações.

### **Palavras-chave**

*Ruditapes decussatus*  
amêijoa-boia  
*Perkinsus*  
protozoário  
mortalidade  
RFTM

Andreia Cruz •

Ana Cerviño-Otero

Óscar Iglesias

Fiz da Costa

Oceano Fresco S.A., Edifício Mira Center,  
Rua do Matadouro, piso 2, Lab. B2,  
Valeirinha, 3070-436 Mira, Portugal.

• [andreia.cruz@oceano-fresco.pt](mailto:andreia.cruz@oceano-fresco.pt)

ISSN 1647-323X

## INTRODUÇÃO

Com o aumento da população mundial, as exigências alimentares, em qualidade e quantidade, têm vindo a ser cada vez maiores, sendo que as respostas a esse desafio terão necessariamente de considerar duas preocupações centrais: (a) limites da capacidade de produção agrícola (disponibilidade) de terra arável e recursos hídricos e, diminuição dos ganhos marginais de produtividade que têm sido conseguidos pela aplicação da Ciência e Tecnologia); (b) formas mais sustentáveis de produção de proteína animal (redução da pegada ecológica pela anulação ou redução significativa dos inputs alimentares, energéticos, químicos).

É neste contexto que se explica a crescente importância dos recursos marinhos como alternativa à sobre-exploração do meio terrestre. Estima-se que nos próximos 20 anos mais de 40 milhões de toneladas de alimento de origem aquática sejam necessárias de forma a dar resposta ao atual consumo *per capita* (19,2 kg/ano) (FAO, 2013). Perspetiva-se, pois, que o consumo destes alimentos aumente, estimando-se em 2022, um consumo médio mundial *per capita* de 20,7 kg/ano. Verifica-se que os recursos alimentares marinhos diretamente recolhidos no meio natural (sobretudo peixe) têm vindo a decrescer como resultado da sua exploração intensiva, tornando-se a aquicultura a alternativa mais sustentável de resolução deste problema (FAO, 2013). Compreende-se assim que a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO) preveja um crescimento bastante expressivo da aquicultura a nível mundial, tanto no que se refere à sua disseminação e consolidação, como à diversificação das espécies cultivadas. Entre 1980 e 2012, o volume de produção aquícola mundial teve uma taxa de aumento de 8,6% ao ano (FAO, 2014).

É importante realçar que a atividade aquícola, praticada em determinadas condições, contribui de forma importante para a recuperação e preservação ambiental e para a conservação da biodiversidade. Entre os vários alimentos aquáticos, os bivalves têm um papel importante no desenvolvimento sustentável da aquicultura na Europa e no Mundo, contribuindo para a melhoria da qualidade ambiental, em particular da qualidade da água, bem como para as operações de 'repovoamento ecológico', promovendo a reconstituição de populações selvagens.

A nível mundial, a produção aquícola, principalmente de bivalves, caracteriza-se por um baixo custo, baixo rendimento e um baixo nível tecnológico. Neste sentido, a competitividade deste setor deverá passar por uma forte aposta a nível da Ciência & Tecnologia, de forma a garantir a sustentabilidade do setor e os elevados padrões de segurança e qualidade para o consumidor final (Plano Estratégico para a Aquicultura Portuguesa 2014-2020).

No universo dos bivalves, as amêijoas são gastronomicamente muito apreciadas e procuradas a nível mundial, apresentando um valor comercial bastante relevante que atingiu em 2013 um valor de produção de mais de 3,5 mil milhões de euros, segundo dados da FAO. No entanto, os aquicultores e a comunidade científica têm-se deparado com um decréscimo significativo das populações de bivalves, que têm sido afetadas pela ação antropogénica e pelas alterações climáticas (Gosling, 2008), conduzindo em algumas zonas à extinção de populações nativas, com significativas consequências negativas ao nível do equilíbrio dos ecossistemas marinhos. Entre as espécies de amêijoa mais afetadas podem referir-se as espécies nativas europeias onde se destaca a amêijoa-boia (*Ruditapes decussatus*), com uma elevada valorização gastronómica e económica, cuja produção tem diminuído radicalmente em detrimento da sua concorrente mais direta, a amêijoa-japonesa (*Ruditapes philippinarum*), uma espécie invasora na Europa.

A área de distribuição geográfica de *R. decussatus* vai desde o sul e oeste de Inglaterra até à Península Ibérica e Mediterrâneo. *R. decussatus* está ainda presente a sul e oeste de Marrocos e do Senegal e na costa Oeste Africana. *R. decussatus* é uma das espécies de bivalves mais importantes da Europa, onde a captura e o consumo se registam desde o século 16. Apesar disso, atualmente apenas 6 países produzem *R. decussatus*, sendo Itália o líder da lista de países, seguido de Portugal, Tunísia e Espanha (FAO, 2013).

Devido ao seu elevado custo (duas a três vezes mais elevado que a espécie competidora, *R. philippinarum*) e ao seu valor gastronómico, *R. decussatus* é uma das espécies de moluscos mais procuradas na Europa. Além da forte intensidade da captura, a quantidade de amêijoas-boa disponível diminuiu fortemente, devido ao aumento da poluição em portos marítimos e áreas urbanas, degradando assim o seu habitat. Além disso, as mortalidades anormais têm sido associadas a variações significativas de temperatura, salinidade (que são em parte explicadas pelas mudanças climáticas) e a doenças causadas por diferentes patógenos (nomeadamente, bactérias, vírus, protozoários).

Os organismos *Perkinsus* são um grupo de parasitas protozoários unicelulares que podem infetar moluscos, especialmente moluscos bivalves, em várias partes do mundo. Em Portugal, o primeiro registo de infeção de *R. decussatus* por *Perkinsus* foi em 1989 por Azevedo (1989). O parasita terá chegado à Europa após a introdução da amêijoas-japonesa vinda da Ásia (Vilas et al., 2011). *P. marinus* e *P. olseni* podem ter um impacto severo nos moluscos bivalves e, conseqüentemente, são parasitas economicamente importantes. A infeção por *P. marinus* e *P. olseni* é frequentemente letal em moluscos suscetíveis, embora um animal infetado possa viver durante vários anos antes de apresentar sinais clínicos de doença ou morrer abruptamente, estando associado a elevadas taxas de mortalidade em diferentes espécies em todo o mundo, resultando em graves perdas (Ruano et al., 2015).

Considerando os desafios atuais que a produção de *R. decussatus* enfrenta, é crucial desenvolver soluções que atualmente não estão disponíveis no setor da aquicultura. Para abordar os problemas dos aquicultores, é preciso desenvolver variedades melhoradas de bivalves que resistam a condições de stress biótico e abiótico, como tem sido feito há muitas décadas na agricultura e na produção de peixes através de programa de melhoramento. Os programas de melhoramento podem produzir novas combinações de genes que originam variedades melhoradas com diferentes genótipos e características de interesse (por exemplo, maior taxa de sobrevivência, maior taxa de crescimento, entre outros). Os bivalves são ótimos candidatos para programas de melhoramento, por várias razões: possuem um elevado valor económico; muitas espécies já são domesticadas e possuem protocolos de cultivo padrão bem desenvolvidos; possuem um elevado nível de variabilidade genética; e uma elevada fecundidade. Atualmente, existem vários programas de melhoramento nos Estados Unidos, Austrália, Nova Zelândia, França e China, envolvendo principalmente ostras (*Crassostrea gigas*, *C. virginica* e *Saccostrea glomerata*), mexilhões (*Perna canaliculus*) e algumas espécies de moluscos (*Ruditapes philippinarum* e *Sinonovacula constricta*). A resistência a doenças é uma das características mais importantes para a produção aquícola e em que mais se tem apostado (Fang e Lin, 2016; Guo, 2009; Xie et al., 2018).

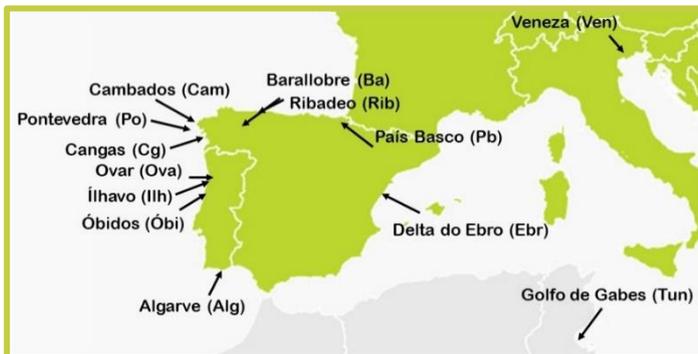
Durante a implementação de um programa de melhoramento de espécies, um dos aspetos que mais afeta o sucesso do programa é o estabelecimento da população fundadora, e, por conseguinte, a escolha da origem dos indivíduos que a compõem (Gjedrem e Baranski, 2009). Assim, a escolha do local de origem dos indivíduos da população fundadora deve ter em conta, entre outros aspetos, a presença da doença por *Perkinsus*; considerando que a tolerância/resistência ao *Perkinsus* é uma das características alvo para a

qual é necessário selecionar. Neste contexto, no presente trabalho, um método padrão - RFTM - foi usado para avaliar semi-quantitativamente o nível de infecção de *Perkinsus* sp. em indivíduos adultos de *R. decussatus*. O objetivo deste estudo foi avaliar o nível de infecção por *Perkinsus* sp. de vários indivíduos de diferentes populações relevantes da Europa. Esta informação é importante para auxiliar empresas e institutos de investigação que pretendam fazer experiências com *R. decussatus* e/ou implementar programas de melhoramento nas suas instalações, particularmente, e tal como anteriormente referido, se estiverem relacionadas com a resistência ao parasita.

## METODOLOGIA

### Recolha das amostras e análise de parâmetros biométricos

As populações de *R. decussatus* foram recolhidas de locais onde atualmente existem bancos naturais de amêijoas-boas ou onde a produção é feita de forma intensiva, desde a costa Atlântica da Península Ibérica, Mar Mediterrâneo e Mar Adriático (Figura 1 e Tabela I). As amostras foram transportadas para o laboratório da Oceano Fresco devidamente refrigeradas. Cerca de 50 indivíduos de cada amostra, com um comprimento médio da concha de  $41,3 \pm 2,1$  mm, foram analisados. Apenas foram usados neste estudo os indivíduos que apresentavam todos os caracteres morfológicos típicos de *R. decussatus* (Hurtado et al., 2011; Habtemariam et al., 2015). O índice de condição visceral (ICV) e gonadal (ICG), foram avaliados através da fórmula: índice visceral/gonadal = (peso fresco da víscera ou gónada (g)/peso fresco da concha (g)) x 100.



**FIGURA 1:** Distribuição geográfica dos locais onde foram recolhidas amostras de *R. decussatus*.

**TABELA I:** Origem das populações de *R. decussatus* analisadas.

País	Local	Data de amostragem
Portugal	Ovar (OVA)	31-01-2017
	Ílhavo (Ilh)	10-01-2017
	Óbidos (Óbi)	31-11-2017
	Óbidos (Óbi)	6-01-2017
	Óbidos (Óbi)	7-12-2017
	Algarve (Alg)	16-11-2016
	Algarve (Alg)	11-01-2017
Espanha	Algarve (Alg)	25-10-2017
	Pais Basco (Pb)	20-02-2018
	Ribadeo	25-10-2017
	Barallobre (Ba)	24-10-2017
	Cambados (Ca)	17-11-2017
	Pontevedra (Po)	13-01-2017
	Cangas (Cg)	7-11-2017
Itália	Delta do Ebro (Ebr)	6-02-2018
	Delta do Ebro (Ebr)	17-10-2017
Itália	Veneza (Ven)	27-01-2017
	Veneza (Ven)	16-12-2017
Tunísia	Golfo de Gabes (Tun)	27-01-2017

### Deteção da infeção por *Perkinsus* sp. através do meio fluído de tioglicolato de Ray (RFTM)

A deteção da infeção por *Perkinsus* sp. nas várias amostras, foi efetuada recorrendo ao ensaio semi-quantitativo de RFTM (Ray, 1966; Bushek e Allen, 1996). Resumidamente, uma hemi-brânquia foi retirada de cada um dos indivíduos e incubada durante 5 dias, no escuro, a 25 °C, em meio tioglicolato suplementado com cloranfenicol e nistatina. Em seguida, o tecido foi corado com uma solução de Lugol e observado num microscópio ótico para avaliar a presença de células do parasita. Os resultados foram registados de acordo com a escala de intensidades da infeção de Mackin (Tabela II) (Ray, 1954).

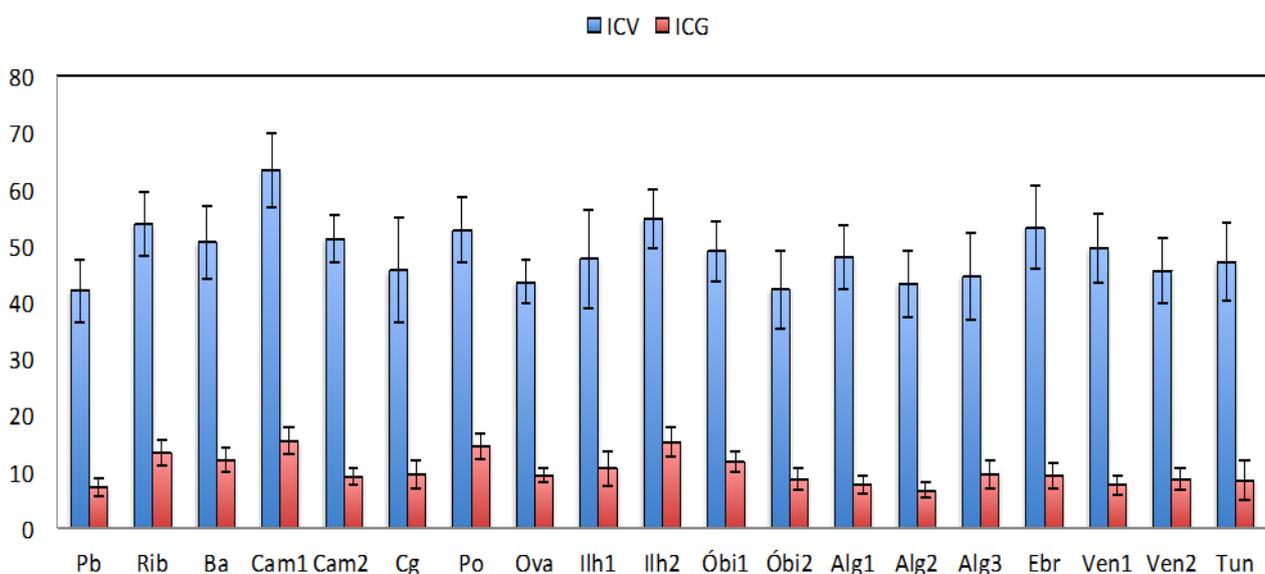
**TABELA II:** Escala de intensidade da infeção por *Perkinsus* sp.

Intensidade do nível de infeção	Descrição
0	Ausência de parasita: 0 células na preparação microscópica
1	Infeção muito leve: De 1 a 10 células na preparação microscópica
2	Infeção leve: Em 10 campos microscópicos (c.m.) aleatórios (4x), > 1 célula/c.m.
3	Infeção moderada: Em 10 c.m. aleatórios (4x), > 10 células/c.m.
4	Infeção intensa: Em 10 c.m. aleatórios (10x), > 50 células/c.m.
5	Infeção muito intensa: Em 10 c.m. aleatórios (40x), > 25 células/c.m.

## RESULTADOS

### Parâmetros biométricos

Foram determinados os índices de condição gonadal e visceral dos indivíduos recolhidos. O índice de condição visceral (ICV) e gonadal (ICG) variou entre as populações amostradas, entre  $42,1 \pm 7,0$  e  $54,7 \pm 5,4$  e entre  $8,5 \pm 2,0$  e  $15,1 \pm 2,5$ , respetivamente (Figura 2).



**FIGURA 2:** Índice de condição visceral (ICV) e índice de condição gonadal (ICG) das várias populações de *R. decussatus* amostradas. Pb: País Basco; Rib: Ribadeo; Ba: Barallobre; Cam: Cambados; Cg: Cangas; Po: Pontevedra; Ova: Ovar; Ilh: Ilhavo; Óbi: Óbidos; Alg: Algarve; Ebr: Delta do Ebro; Ven: Veneza; Tun: Tunísia.

### Semi-quantificação da infecção por *Perkinsus* sp.

Diferentes níveis da infecção por *Perkinsus* sp. foram observados entre os diferentes locais (Figura 3). Entre indivíduos do mesmo local (nomeadamente Ba, Po, Cg, Óbi, Alg e Ven), diferentes níveis de infecção por *Perkinsus* sp. foram detetados em amêijoas com tamanho e idade semelhante, variando desde níveis de infecção baixo (0 ou 1) a elevado (4 ou 5). Os locais que demonstraram um menor nível de infecção foram Rib e Ilh (Figura 3).

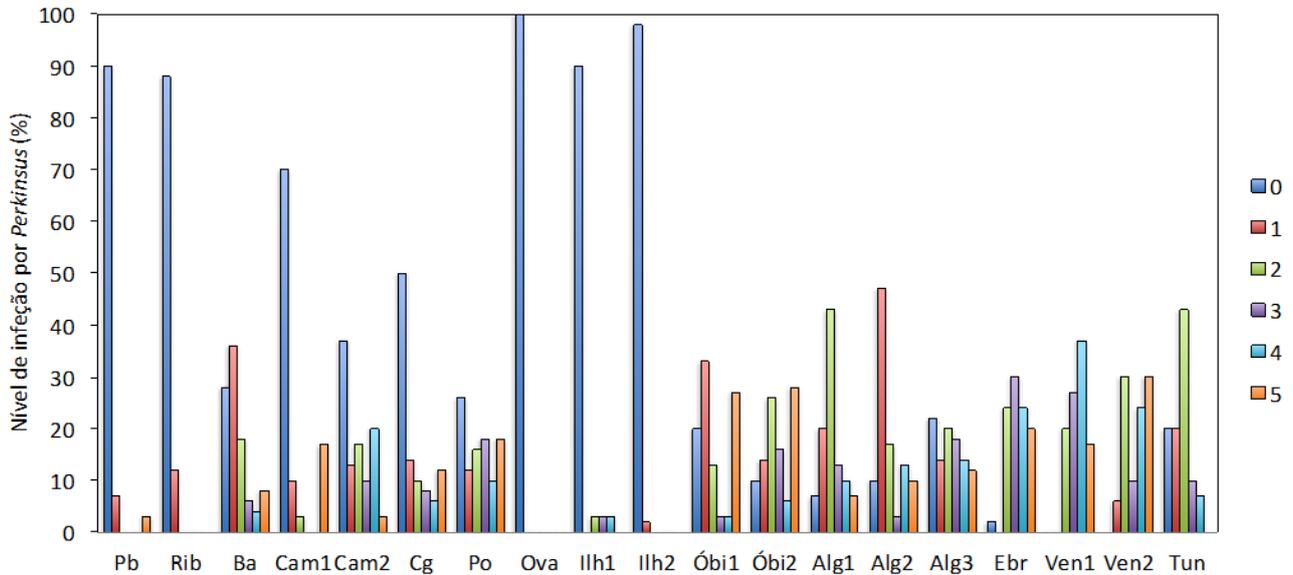


FIGURA 3: Nível de infecção por *Perkinsus* sp. em diferentes populações de *R. decussatus*.

## DISCUSSÃO

O índice de condição gonadal (ICG) das populações amostradas foi relativamente baixo, variando entre 6 e 15 (Figura 2), devido ao facto de as amostras terem sido recolhidas no final do outono e início do inverno. Considerando o ciclo reprodutivo da amêijoas, cuja época de desova acontece geralmente entre maio e agosto (Matias, 2013), no final do outono e início do inverno, o desenvolvimento gonadal tende a ser sempre mais baixo do que noutros meses do ano. Os níveis de infecção por *Perkinsus* nas populações europeias têm vindo a ser estudados devido à sua associação a diferentes episódios de mortalidades maciça (Ruano et al., 2015). Neste estudo, foi utilizado um método semi-quantitativo de RFTM para avaliar o nível de infecção por *Perkinsus*. Este método é fácil de executar, sensível e muito económico, sendo vulgarmente utilizado para monitorização da infecção entre diferentes locais. No entanto, trata-se de um método que não é específico à espécie do parasita, para além de ser um método invasivo (envolve o sacrifício do animal). Apesar de não permitir a distinção entre espécies de *Perkinsus*, o método RFTM permite a deteção de todas as espécies conhecidas de *Perkinsus*, com exceção de *P. qugwadi* (Blackbourn et al., 1998). No presente trabalho, *Perkinsus* sp. foi detetado em todos os locais analisados, onde Ve e Ilh foram os locais com maior e menor nível de infecção por *Perkinsus*, respetivamente. Além disso, no mesmo local, diferentes níveis de infecção por *Perkinsus* sp. foram detetados em amêijoas com tamanho/idade

semelhante. Pelos resultados obtidos, pode sugerir-se que dentro do mesmo local, existem indivíduos com diferente suscetibilidade/resistência para serem infetados pelo parasita, e/ou que existirá um número limitado de parasitas em fase infetante nos locais. Estes resultados estão de acordo com aqueles obtidos por Ruano et al. (2015), que verificou a presença de *Perkinsus* em diferentes locais de Portugal, Espanha e Itália. De facto, a distribuição de *Perkinsus* spp. na Europa é extensa, variando do Atlântico Nordeste ao Mar Mediterrâneo (Ruano et al., 2015), sendo *P. olseni* a espécie mais prevalente. Apesar disso, há pelo menos dois locais de produção de amêijoas em Espanha (Camariñas e Noia/Testal), onde parasitas do género *Perkinsus* não foram detetados em *R. decussatus* (Darriba, 2017). Diferentes fatores podem afetar o nível de infeção por *Perkinsus* em moluscos, nomeadamente a abundância de estágios infeciosos, a hidrodinâmica do ambiente, a densidade da população hospedeira e a idade dos moluscos. Além disso, a temperatura, a salinidade e a condição dos organismos (stress, sistema de imunidade, estágio gonadal, disponibilidade de alimentos, entre outros) podem afetar o nível de infeção dos indivíduos num mesmo local.

## APLICAÇÕES E PERSPETIVAS FUTURAS

Tal como anteriormente referido, as mortalidades massivas que se verificam em diferentes zonas de produção de *R. decussatus* estão muito vezes associadas à infeção por *Perkinsus* sp. Assim, é imprescindível monitorizar de forma fácil, rápida e económica os níveis de infeção por *Perkinsus* dos indivíduos de um determinado local. Desta forma, será possível selecionar os melhores reprodutores da população fundadora de um programa de melhoramento e a realização de diferentes atividades experimentais de suporte (por exemplo, otimização do cultivo da espécie, *challenge tests* – ensaios de infeção controlados). Aumentando a atividade em I&D associada à infeção por *Perkinsus*, será possível desenvolver programas de melhoramento da espécie com o objetivo de obter variedades mais tolerantes/resistentes ao parasita.

---

**agradecimentos** • Este estudo foi co-financiado pelo projeto I&DT SEMEAR nº 22390 (16/SI/2016) no âmbito do Programa Operacional Regional do Centro, Portugal (CENTRO-01-0247-FEDER-022390). Fiz da Costa foi financiado pelo instrumento da União Europeia 'H2020 SME Innovative Associate' (acordo de subvenção Nº 739773).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Azevedo C (1989). Fine structure of *Perkinsus atlanticus* n. sp. (Apicomplexa, Perkinsea) parasite of the clam *Ruditapes decussatus* from Portugal. *Journal of Parasitology*. 75(4): 627-635.
- Blackbourn J, Bower SM, Meyer GR (1998). *Perkinsus qugwadi* sp. nov. (*incertae sedis*), a pathogenic protozoan parasite of Japanese scallops, *Patinopecten yessoensis*, cultured in British Columbia, Canada. *Canadian Journal of Zoology*. 76(5): 942-953.
- Bushek D, Allen Jr SK (1996). Host-parasite interactions among broadly distributed populations of the eastern oyster *Crassostrea virginica*, and the protozoan *Perkinsus marinus*. *Marine Ecology Progress Series*. 139: 127-141.
- Darriba S (2017). Informe epidemiológico de moluscos bivalvos de Galicia. Ano 2017. Intecmar. Galicia. Spain.
- Fang J, Lin Z (2016). Development of Manila clam industry in China. *Bulletin of Japan Fisheries Research and Education Agency*. 42: 29-34.

- FAO (2013). The State of World Fisheries and Aquaculture – Opportunities and challenges. Rome: FAO.
- FAO (2014). The State of World Fisheries and Aquaculture – Opportunities and challenges. Rome: FAO.
- Gjedrem T, Baranski M (2009). Selective Breeding in Aquaculture: An Introduction. Dordrecht, Netherlands: Springer.
- Gosling E (2008). Bivalve molluscs: biology, ecology and culture. John Wiley & Sons.
- Guo X (2009). Use and exchange of genetic resources in molluscan aquaculture. *Reviews in Aquaculture* 1(3-4): 251-259.
- Habtemariam BT, Arias A, García-Vázquez E, Borrel YJ (2015). Impacts of supplementation aquaculture on the genetic diversity of wild *Ruditapes decussatus* from northern Spain. *Aquaculture Environment Interactions* 6: 241-254.
- Hurtado NS, Perez-García C., Moran P, Pasantes JJ (2011). Genetic and cytological evidence of hybridization between native *Ruditapes decussatus* and introduced *Ruditapes philippinarum* (Mollusca, Bivalvia, Veneridae) in NW Spain. *Aquaculture* 311: 123–128.
- Matias D (2013). Bases biológicas e ambientes para a optimização da produção de amêijoia boa *Ruditapes decussatus* (Linnaeus, 1758). 176 p. Tese de Doutoramento. Universidade Nova de Lisboa.
- Plano Estratégico para a Aquicultura Portuguesa 2014-2020. Governo de Portugal, Ministério da Agricultura e do Mar, Direção-Geral e dos Recursos Naturais, Segurança e Serviços Marítimos.
- Ray SM (1954). Biological studies of *Dermocystidium marinum*, a fungus parasite of oysters. Houston: Rice Institute, 120 p. Doctoral Thesis in Natural Sciences.
- Ray SM (1966). A review of the culture method for detecting *Dermocystidium marinum*, with suggested modifications and precautions. *Proceedings of the National Shellfisheries Association* 54: 55–69.
- Ruano F, Batista F, Arcangeli G (2015). Perkinsosis in the clams *Ruditapes decussatus* and *R. philippinarum* in the Northeastern Atlantic and Mediterranean Sea: A review. *Journal of Invertebrate Pathology* 131: 58-67.
- Vilas R, Cao A, Pardo BG, Fernández S, Villalba A, Martínez P (2011). Very low microsatellite polymorphism and large heterozygote deficits suggest founder effects and cryptic structure in the parasite *Perkinsus olseni*. *Infection, Genetics and Evolution* 11: 904-911.
- Xie S, Niu D, Wei K, Dong Z, Li J (2018). Polymorphism in the FOXO gene are associated with growth in the Sanmen breeding population of the razor clam *Sinonovacula constricta*. *Aquaculture and Fisheries* 3 (5): 177-183.