

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE AQUICULTURA

**Enfermidades de notificação obrigatória em moluscos marinhos:
protocolos para identificação e viabilidade de execução**

PATRICIA GARCIA

Florianópolis
2005

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE AQUICULTURA

**Enfermidades de notificação obrigatória em moluscos marinhos:
protocolos para identificação e viabilidade de execução**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Aqüicultura do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Aqüicultura.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Aimê Rachel Magenta Magalhães

PATRICIA GARCIA

Florianópolis
2005

GARCIA, Patricia

Enfermidades de notificação obrigatória em moluscos marinhos: protocolos para identificação e viabilidade de execução.

Dissertação (Mestrado) – Orientadora: Prof^a Dr^a Aimê Rachel Magenta Magalhães – Universidade Federal de Santa Catarina, 2005.

1. Enfermidades; 2. Moluscos marinhos; 3. Aqüicultura

**Enfermidades de notificação obrigatória em moluscos marinhos:
protocolos para identificação e viabilidade de execução**

Por

PATRÍCIA GARCIA

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de

MESTRE EM AQÜICULTURA

e aprovada em sua forma final pelo Programa de
Pós-Graduação em Aqüicultura.

Profa. Débora Machado Fracalossi, Dra.
Coordenadora do Curso

Banca Examinadora:

Dra. Aimê Rachel Magenta Magalhães - *Orientadora*

Dr. Carlos Rogério Poli

Dr. João Bosco Rozas Rodrigues

Dra. Maria Risoleta Freire Marques

"...Não são os mais fortes da espécie que sobrevivem, nem os mais inteligentes, mas sim os que respondem melhor às mudanças"

Charles Darwin

AGRADECIMENTOS

À CAPES pela concessão da bolsa de Mestrado que auxiliou na realização desta pesquisa.

À Universidade Federal de Santa Catarina através de seus Professores, pela oportunidade de ampliar meus conhecimentos em relação à Aqüicultura e por ter possibilitado acesso irrestrito à rede mundial de computadores.

À rede mundial de computadores que viabilizou o contato com diversos pesquisadores de renome que forneceram materiais essenciais a este trabalho como: Dr^a Susan Bower, Dr^a Sharon E. McGladdery, Dr. Franck C.J. Berthe (Canadá), Dr^a Melba Reantaso (Tailândia), Dr^a Rorana P. Subasinghe (Roma), Dr. Ryan B. Carnegie, Miss Susie Hines, Dr. Eric N. Powell e Miss Elaine Barber (Estados Unidos), Dr. M. L. Sanmartín (Espanha), Dr. Thierry Comtet (França), Dr. Christopher D McQuaid e Miss Moira Poggrund (África do Sul), Dr. José Luis Luque (Brasil), Dr. Marcelo E. Oliva (Chile).

À Dr^a Aimê Rachel Magenta Magalhães por generosamente ter concedido orientar-me pela terceira vez, agora no Mestrado.

À Dr^a Maria Risoleta Freire Marques, Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática e Imunoquímica – CCB/UFSC, pela generosidade em corrigir a tradução dos protocolos das enfermidades de notificação obrigatória da OIE em relação aos testes moleculares. Minha gratidão também, pelos preciosos conhecimentos transmitidos de forma tão serena, durante as disciplinas cursadas.

À Ms. Maria Luiza Toschi Maciel, do Ministério da Agricultura pelas preciosas e fundamentais conversas relativas às enfermidades de moluscos, legislação necessária ao credenciamento de Laboratórios e sugestões de trabalhos. Meu carinho, agradecimento e dívida eterna.

À Ilona Joerdens Marques, Sanitarista e Responsável Técnica pelo Laboratório da CIDASC – Joinville, pelas preciosas informações acerca da legislação necessária ao credenciamento de laboratórios pelo MAPA e sobre a confecção do Manual de Qualidade. Minha eterna gratidão e respeito.

À Ms. Cláudia Pinto Figueiredo, Laboratório de Imuno-histoquímica – HU/UFSC, e à Dr^a. Célia Regina Monte Barardi, do Departamento de Microbiologia e Parasitologia - CCB/UFSC, por informações quanto ao teste de hibridização *in situ*. Obrigada pela gentileza.

Ao Dr. Jaime Fernando Ferreira, Laboratório de Moluscos Marinhos – CCA/UFSC, por informações preciosas durante minha estadia no LMM e pelo auxílio fornecido sempre que solicitado. Obrigada pela disponibilidade e atenção.

Ao Laboratório de Moluscos Marinhos – CCA/UFSC, por ter fornecido os animais utilizados no trabalho “Protocolo de identificação e quantificação de bucefalose (enfermidade laranja) em mexilhões *Perna perna*”. Por ter permitido o uso do fotomicroscópio e pelas gentileza em acolher-me quando necessário. A todos os integrantes deste Laboratório meu sincero agradecimento.

Ao Dr. Carlos Tramonte, Chefe do Departamento de Morfologia – CCB/UFSC, por ter permitido a utilização do micrótomo do Laboratório de Histologia “Neci Moraes”.

À técnica Ivete, Laboratório de Histologia – CCB/UFSC, pelo auxílio no uso do micrótomo utilizado na confecção das lâminas do trabalho “Protocolo de identificação e quantificação de bucefalose (enfermidade laranja) em mexilhões *Perna perna*”.

Ao Dr. Mário Steidel, Departamento de Microbiologia e Parasitologia - CCB/UFSC, por ter permitido o uso do fotomicroscópio deste Departamento.

Ao Dr. Carlos Azevedo (Portugal) pela gentileza e generosidade em dividir seus preciosos conhecimentos acerca de protoparasitas causadores de enfermidades em moluscos. Muito obrigada.

Aos colegas do curso de Mestrado em Aqüicultura, em especial à Luciana, Andréa, Pedro, Washington (Ton), Moira, Carlos (Baiano), Rodrigo Randow, pelo convívio, pelas risadas e trocas de informação. Muito obrigada.

Aos técnicos do EPAGRI, pela atenção dispensada e pelas informações valiosas.

Em especial à Carmen Brückheimer, minha mãe, por ter me gerado, por me amar, por saber esperar.

À Luciana Garcia, minha irmã, e Marcelo Vitor Andrade, meu cunhado, pelos agradáveis almoços diante do mar esplendoroso do Ribeirão da Ilha.

À Ms. Ana Lúcia pelo auxílio fornecido sempre que solicitado e pelas horas de conversa, meu muito obrigado.

Ao Sr. José Geraldino (Keka), pelas festas, pelas flores, pelas risadas e pelo auxílio generoso.

A todas as pessoas que de alguma forma contribuíram na realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE TABELAS	xii
LISTA DE ABREVIATURAS	xii
RESUMO	xvi
ABSTRACT	xvii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. OBJETIVOS	23
1.1.1. Geral	23
1.1.2. Específicos	23
2. ARTIGO CIENTÍFICO 1	24
2.1. ENFERMIDADES DE NOTIFICAÇÃO OBRIGATÓRIA PARA O SERVIÇO DE SANIDADE ANIMAL EM MOLUSCOS MARINHOS: PROTOCOLOS PARA IDENTIFICAÇÃO E VIABILIDADE DE EXECUÇÃO	24
2.1.1. Resumo	24
2.1.2. Abstract	25
2.1.3. Introdução	26
2.1.4. Material e Métodos	29
2.1.5 Resultados e Discussão	31
2.1.6. Conclusão	41
2.1.6. Agradecimentos	42
2.1.6. Referências Bibliográficas	42
3. ARTIGO CIENTÍFICO 2	49
3.1. PROTOCOLO DE IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE BUCEFALOSE (ENFERMIDADE LARANJA) EM MEXILHÕES <i>Perna perna</i>	49
3.1.1. Resumo	49
3.1.2. Abstract	49
3.1.3. Introdução	50

3.1.4. Material e Métodos	53
3.1.5. Resultados e Discussão	54
3.1.6. Conclusão	57
3.1.6. Agradecimentos	58
3.1.6. Referências Bibliográficas	58
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS	64
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA INTRODUÇÃO	66
6. ANEXOS	71
6.1. Protocolo: Solução de Davidson (fixador)	72
6.2. Protocolo: Solução de Carson (fixador)	74
6.3. Protocolo: Enfermidade MSX (<i>Haplosporidium nelsoni</i>)	75
6.4. Protocolo: Enfermidade SSO (<i>Haplosporidium costale</i>)	82
6.5. Protocolo: Silanagem de lâminas (Hibridização <i>in situ</i>)	89
6.6. Protocolo: Marteliose (<i>Marteilia refringens</i> e <i>M. sydneyi</i>)	91
6.7. Protocolo: Microcitose (<i>Mikrocytos mackini</i>)	99
6.8. Protocolo: Perkinsiose (<i>Perkinsus marinus</i> and <i>P. olseni/atlanticus</i>)	103
6.9. Protocolo: Meio de cultura fluído de tioglicolato de Ray	111
6.10. Protocolo: Iridovirose (Iridovírus)	112
6.11. Portaria nº 021/02/SDA - 01/10/2002	116
6.12. Documentos para solicitação de alvará sanitário para Laboratório de Análises Clínicas (Saúde)	126
6.13. Resolução RDC nº 189 - 18/07/2003 (ANVISA)	127
6.14. Documentos para solicitação de credenciamento de laboratório a rede animal do MAPA	132
6.15. Formulário 1: solicitação de credenciamento ao MAPA	133
6.16. Formulário 2: solicitação de credenciamento ao MAPA	134
6.17. Formulário 3: solicitação de credenciamento ao MAPA	135
6.18. Instrução normativa nº 24 – 07/06/2001 (MAPA)	136

LISTA DE FIGURAS

1. <i>Haplosporidium nelsoni</i> (esporos)	6
2. <i>Haplosporidium costale</i> (esporos)	7
3. Hibridização <i>in situ</i> (<i>Haplosporidium nelsoni</i> e <i>H. costale</i>)	7
4. <i>Marteilia maurini</i>	9
5. <i>Marteilia refringens</i>	10
6. <i>Marteilia refringens</i> identificada através de exame citológico de “imprints” de tecidos	10
7. <i>Marteilia sydneyi</i> identificada por hibridização <i>in situ</i>	11
8. <i>Crassostrea virginica</i> com <i>Perkinsus marinus</i>	12
9. <i>Perkinsus olseni/atlanticus</i> (trofozoítos maduros)	13
10. <i>Perkinsus marinus</i> (trofozoítos maduros)	14
11. Diagnóstico de <i>Perkinsus</i> spp cultivado em fluído tioglicolato	15
12. <i>Mikrocytos mackini</i> em <i>Crassostrea gigas</i> e <i>Ostrea edulis</i>	16
13. Detecção de microcélulas por hibridização <i>in situ</i>	17
14. Iridovirus em larvas de <i>Crassostrea gigas</i>	18
15. <i>Bucephalus</i> sp parasitando manto de <i>Perna perna</i>	20
16. <i>Bucephalus</i> nas brânquias de <i>Perna perna</i>	21
17. Intensidade de bucefalose em <i>Perna perna</i>	57
18. Possível ciclo de vida <i>Bucephalus varicus</i>	144
19. Secção transversal em diagonal de mexilhão	146
20. Aspecto da lâmina de mexilhão em secção transversal	147
21. Uso da gráticula de Weibel	148

LISTA DE TABELAS

1. Correspondência entre os capítulos sobre enfermidades de moluscos contidos no Manual Aquático com os do Código Aquático da OIE	4
2. Lista de patógenos de notificação obrigatória da OIE e do Programa de Sanidade Aqüícola do Estado de Santa Catarina	33
3. Patógenos a serem investigados, controlados e/ou erradicados conforme indicação da Portaria nº 021/02/SDA	34
4. Volume fracionário (%) dos constituintes tissulares do parasita (TP), hospedeiro (TH) e dos espaços vazios (EV), mensurados ao microscópio óptico com objetiva de 10x e 40x	56

LISTA DE ABREVIATURAS

ACARPESC - Associação de Crédito e Assistência Pesqueira de Santa Catarina

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

APEC - Asia Pacific Economic Co-operation

Art. - artigo

BCIP - 5-bromo-4-cloro-3-indolfosfato p-toluidina

bp - pares de base

°C - grau centígrado

CCA - Centro de Ciências Agrárias

CCB - Centro de Ciências Biológicas

CLA - Coordenação de Laboratório Animal

CASCO - Committee on Conformity Assessment

CIDASC - Companhia Integrada de Desenvolvimento Agrícola de Santa Catarina

cm - centímetro

CNL - Cadastro Nacional de Laboratórios

CNPJ - Cadastro Nacional de Pessoa Jurídica

CNCMB - Comitê Nacional de Controle Higiênico-Sanitário de Moluscos Bivalves

CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente

DDA - Departamento de Defesa Animal

DIG-dUTP - digoxigenina-dUTP

dH₂O - água deionizada

DNA - Desoxyribonucleic Acid / Ácido Desoxirribonucléico

DSP - Diarrhetic Shellfish Poisoning / Toxina diarréica em moluscos

dATP - desoxiadenosina trifosfato

dCTP - desoxicitidina trifosfato

dGTP - desoxiguanosina trifosfato

dTTP - desoxitimidina trifosfato

dUTP - desoxiuridina trifosfato

EMAPA - Empresa Municipal de Apoio à Aqüicultura

EDTA - ácido etileno diamino tetra-acético

EPAGRI - Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina S.A.

FAO - Food and Agriculture Organization

h - hora

HE - hematoxilina e eosina

HHE - hematoxilina de Harris e eosina

HIV - Hemocytic infection vírus / Enfermidade hemocítica infecciosa de vírus

IIIA - mexilhões com gônadas repletas de gametas

IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis

IEC - International Electrotechnical Commission / Comissão Internacional de Eletroquímica

ILAC - International Laboratory Accreditation Cooperation / Laboratório Internacional de Acreditação e Cooperação

ISO - The International Organization for Standardization / Organização Internacional de Padronização

IT- Instrução de Trabalho

ITS - Internal Transcribed Spacers / Espaçadores Internos Transcritos

KCl - cloreto de potássio

LADPAQ - Laboratório de Diagnóstico e Patologia em Aqüicultura

LABICAI - Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática e Imunoquímica

LO - localizada

MAPA - Ministério da Agricultura, Pesca e Abastecimento

MBAOPSLC - Manual Brasileiro de Acreditação de Organizações Prestadoras de Serviços de Laboratório Clínico

MBP - Manual de Boas Práticas

mM - milimolar

MgCl₂ - cloreto de magnésio

MSX - Multinucleate Sphere X / Esfera Multinucleada X

Nº ou nº - número

NACA - Network of Aquaculture Centres in Asia-Pacific

NaCl - cloreto de sódio

NaH₂PO₄.2H₂O - fosfato de sódio monobásico bi-hidratado

NB - Nível de Biossegurança

NBT - nitroblue tetrazolium

OMC - Organização Mundial do Comércio

OIE - Office International Des Epizooties / Organização Internacional de Epizootias

ONA - Organização Nacional de Acreditação

OVVD - Oyster virus velar disease / Enfermidade viral do véluo de ostra

PBS - solução salina tamponada com fosfato

PCR - Polymerase chain reaction / Reação em Cadeia da Polimerase

PSP - Paralytic shellfish poisons / Toxinas paralisantes em moluscos

POP - Plano operacional padronizado

QX - Queensland unknown / Desconhecido de Queensland

RDC - Resolução de Diretoria Colegiada

RFLP-PCR - Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism / Polimorfismo no comprimento de fragmento de restrição, obtidos pela reação em cadeia da polimerase

RNA - Ribonucleic Acid / Ácido Ribonucléico

RNAt - Ácido Ribonucléico Transportador

RT - Responsável Técnico

SDA - Secretaria do Desenvolvimento Rural e da Agricultura

SDS – dodecil sulfato de sódio

SEMARNAP - Secretario de Medio Ambiente Recursos Naturales y Pesca of México

sp - qualquer espécie

spp. - Mais de uma espécie

SSC - Solução salina com citrato de sódio

SSO - Seaside Organism

TAC - Termo de Ajustamento de Conduta

Tampão TE - tampão TRIS-EDTA

Tris - Tris-hidroxi-metil-amino-metano

TRT - Termo de Responsabilidade Técnica

μ l - microlitro

μ m - micra

μ M - micromolar

μ g/ml - micrograma por mililitro

% - por cento / porcentagem

‰ - partes por mil

RESUMO

O incremento da malacocultura catarinense não foi acompanhado pela infra-estrutura sanitária necessária. Em função da Portaria nº021/02/DAS, que aprovou as normas técnicas do Projeto de Sanidade Aquícola - SC, foram identificados os protocolos de diagnóstico das enfermidades listadas no Código Aquático da OIE e na Portaria estadual. Foram averiguados os requisitos ao credenciamento do LADPAQ (CCA-UFSC) pelo MAPA. A infra-estrutura atual do LADPAQ e a capacidade técnica permitem realizar: histologia clássica, exame citológicos com “imprints” de tecidos e cultura em meio líquido de tioglicolato de Ray. Parcerias entre o LADPAQ e o LABICAI (CCB-UFSC) permitiriam a execução de hibridização *in situ*, PCR e RFLP-PCR. Atualmente, não há infra-estrutura para executar testes de microscopia eletrônica na UFSC. O credenciamento deve cumprir a mesma legislação aplicada aos laboratórios de análises clínicas em saúde humana. Este trabalho também propõe um protocolo de identificação e quantificação de bucefalose em *Perna perna*, através da histologia clássica e análise estereológica. A análise histopatológica compreende: secções transversais do manto, fixação em Davidson, cortes de 3µm e coloração com HHE. A quantificação da bucefalose, quando necessária, deve ser feita por estereologia, utilizando-se a objetiva de 10 vezes de aumento.

Disease of obligatory notification in marine molluscs: protocols and execution viability

ABSTRACT

The intensive growth of mollusc aquaculture in Santa Catarina has not been accompanied by the necessary sanitary infrastructure. Based on the Law n° 021/02/SDA, that approved the technical norms of the Sanitary Aquaculture Project - SC, the protocols of disease diagnostic methods (OIE Aquatic Code and State Law) were identified, as well as the requirements for the accreditation of LADPAQ (CCA-UFSC) to the MAPA. The current infrastructure of LADPAQ and the technical capacity, allow the accomplishment of: classical histology, exams of tissue imprints, and the culture in Ray's fluid thioglycollate medium. Partnerships between LADPAQ and LABICAI (CCB-UFSC), would allow the execution of *in situ* hybridization, PCR and RFLP-PCR. At present, there is not infrastructure to execute tests of electron microscopy at UFSC. The accreditation must meet the same legislation applied to the laboratories of clinical analyses in human health. This study also proposed a protocol to the MAPA, for the identification and bucefalose quantification in *Perna perna*, using classical histology and stereological analysis. The histopathological analysis understands: transverse sections of the mantle, fixation in Davidson, tissue slides of 3µm and HHE stain. If necessary, the quantification of bucefalose, would be done by stereology, with the objective of 10X.

INTRODUÇÃO

A produção de moluscos marinhos é uma atividade econômica em crescimento no estado de Santa Catarina, colocando o Estado em primeiro lugar na produção nacional destes animais (POLI, 1998). Em Santa Catarina são produzidas em larga escala, essencialmente, duas espécies de moluscos: uma exótica, a ostra do Pacífico *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) e outra nativa, o mexilhão *Perna perna* (Linné, 1758) (OLIVEIRA NETO, 2005).

Segundo MAGALHÃES (1998), o cultivo de mexilhões começou experimentalmente em Santa Catarina em 1986, com os trabalhos da Universidade Federal de Santa Catarina, por intermédio do Laboratório de Mexilhões - LAMEX. Comercialmente, foi iniciada em 1989, por meio de convênio firmado entre a Secretaria da Agricultura, através da Associação de Crédito e Assistência Pesqueira de Santa Catarina - ACARPESC (atual EPAGRI) e a UFSC. O intuito era o repasse da tecnologia de cultivo aos extencionistas e aos pescadores artesanais interessados no novo empreendimento (FERREIRA e MAGALHÃES, 1997; OLIVEIRA NETO, 2005). Esta atividade foi apresentada inicialmente como uma fonte complementar de renda familiar, como alternativa de atividade aos pescadores artesanais, frente ao declínio da pesca.

Atualmente, há 786 malacocultores com permissão para o cultivo de moluscos em Santa Catarina. A permissão a estes produtores foi concedida mediante assinatura do Termo de Ajustamento de Conduta – TAC, em conformidade com a Portaria do IBAMA n.º 69 de 30/10/2003 (OLIVEIRA NETO, 2005). Contudo, o número pode chegar a 883, considerando os produtores sem o TAC, dentro ou fora das áreas legalmente destinadas a esta atividade, (OLIVEIRA NETO, comunicação pessoal).

Nas condições climáticas de Santa Catarina, o bivalve nativo *Perna perna* apresenta rápido crescimento, atingindo o tamanho comercial, de 8 cm de comprimento, em 7 meses. Em outros países produtores, como Espanha, França e Holanda, as espécies de mexilhões atingem tamanho comercial após 18, 24 e 36 meses, respectivamente. Segundo FERREIRA e MAGALHÃES (1995), a produtividade dos mexilhões de Santa Catarina é a maior do mundo. Apenas no Brasil são conseguidas duas safras por ano em determinadas condições climáticas e de cultivo, com os animais atingindo o tamanho comercial em menos de 6 meses.

Segundo GARCIA (2001) e OLIVEIRA NETO (2005), é possível encontrar cultivos nos municípios de Balneário Barra do Sul, Balneário Camboriú, Biguaçu, Bombinhas, Florianópolis, Garopaba, Governador Celso Ramos, Itapema, Jaguaruna, Palhoça, Penha, Porto Belo, São Francisco do Sul e São José. Os quatro maiores produtores do estado são Bombinhas, Governador Celso Ramos, Palhoça e Penha, com uma produção de 7.700 toneladas de mexilhão em 2004. Em Florianópolis, a EPAGRI contabilizou 487,8 toneladas de mexilhão produzidas no mesmo ano, o que torna o município o 7º produtor catarinense (OLIVEIRA

NETO, 2005). Em 2004, foram produzidas 9.800,8 toneladas de mexilhão (OLIVEIRA NETO, 2005) e estima-se um crescimento de 30% no ano de 2005 (OLIVEIRA NETO, comunicação pessoal). Segundo relatório da FAO (2004), a produção de mexilhões de diversas espécies no mundo foi de 1.370.953 toneladas em 2000, de 1.444.734 toneladas em 2002 e 1.775.803 toneladas em 2003, demonstrando um crescimento contínuo na produção anual (FAOSTAT data, 2005a).

A ostra do Pacífico, *Crassostrea gigas* é a espécie de molusco mais produzida no mundo. A produção mundial deste bivalve tem crescido anualmente, com 3.997.394 toneladas em 2000, 4.317.380 toneladas em 2002 e 5.272.947 toneladas em 2003 (FAO, 2004; FAOSTAT data, 2005b).

Essa espécie foi introduzida em Santa Catarina no ano de 1985, com 5.000 sementes adquiridas em Cabo Frio/RJ, como parte de um projeto realizado pelo Laboratório de Moluscos Marinhos (LMM – UFSC). Os experimentos foram satisfatórios e culminaram na situação atual, em que o estado de Santa Catarina produz em cultivo, quantidades comercialmente significativas deste molusco no Brasil (POLI, 1990). Em 2004, a produção de *Crassostrea gigas* em Santa Catarina foi de 2.512,7 toneladas e, destas, 1.542,4 toneladas foram provenientes do município de Florianópolis (OLIVEIRA NETO, 2005).

Além destas espécies cultivadas com sucesso, outros animais têm sido estudados e representam uma forma de ampliar o setor de cultivo de moluscos. Dentre eles temos dois bivalves nativos, a vieira *Nodipecten nodosus* (Linné, 1758) e a ostra nativa *Crassostrea rhizophorae* (Guilding, 1828), bem como o cefalópodo *Octopus vulgaris* (Cuvier, 1797) (POLI, 1998; EMAPA/EPAGRI, 2004 OLIVEIRA NETO, 2005).

A aquíicultura é o setor de produção de alimentos com maior crescimento mundial, exibindo taxas acima de 11% ao ano desde 1984 na Ásia e de 6,9% no resto do mundo, enquanto a produção de proteína animal terrestre cresce apenas 3,1%. No Brasil, entre 2000 e 2002, a taxa anual média de crescimento da atividade foi de 18,1% (FAO/NACA, 2001; FAO, 2004).

O crescimento da produção aquícola de peixes, crustáceos e moluscos nos países em desenvolvimento tem sido superior ao registrado nos países desenvolvidos. O incremento anual médio nestes países é de 10,4% desde 1970, frente aos 4,0% observados nos países desenvolvidos (FAO, 2004).

A malacocultura é o segundo setor aquícola em importância no mundo. Dos 16,3 kg de pescado *per capita* consumidos em 2001, 12,2 kg corresponderam a peixes, 2,1 kg a moluscos, 1,5 kg a crustáceos e 0,5 kg a cefalópodos (FAO, 2004).

A Organização Mundial do Comércio (OMC) tem estabelecido uma série de acordos multilaterais que, entre outras coisas, recomendam aos países membros a adoção de normas

de qualidade e inocuidade para os organismos aquáticos comercializados. Estes também incentivam, no “Acordo sobre a Aplicação de Medidas Sanitárias e Fitosanitárias” (FAO, 2004), os signatários a utilizarem as práticas harmonizadas entre os membros e sugeridas por órgãos internacionais competentes. No caso da aqüicultura, a OMC preconiza aos seus membros, dentre eles o Brasil, a adoção das diretrizes estabelecidas pela Organização Internacional de Epizootias – OIE (OMC, 1994).

A OIE é uma organização intergovernamental, criada em 1924 para promover a saúde animal mundial. Suas atividades principais são: coleccionar e disseminar aos países sócios, informações sobre a ocorrência, curso e tratamento de enfermidades animais, inclusive em situações de emergência; prover diretrizes e padrões para regulamentos de saúde, aplicáveis ao comércio internacional de animais; promover a pesquisa coordenada na patologia, diagnóstico, tratamento e prevenção de enfermidades animais quando a colaboração internacional em tal pesquisa é desejável (OIE, 2004).

O CÓDIGO DE SAÚDE ANIMAL da OIE (Código Aquático), lista atualmente onze infecções em moluscos marinhos, causadas pelos protistas *Bonamia ostreae*, *Bonamia exitiosus*, *Mikrocytos roughleyi*, *Haplosporidium nelsoni*, *Haplosporidium costale*, *Marteilia refringens*, *Marteilia sydneyi*, *Mikrocytos mackini*, *Perkinsus marinus*, *Perkinsus olseni/atlanticus* e pela bactéria *Candidatus xenohalotus californiensis* (OIE, 2005a). O MANUAL DE TESTES DE DIAGNÓSTICO PARA ANIMAIS AQUÁTICOS da OIE (Manual Aquático) apresenta uma organização diferente da encontrada no Código Aquático. Este Manual lista primariamente as enfermidades (Tabela 1).

Em linhas gerais e considerando o rápido crescimento da aqüicultura, não tem sido verificada uma expansão correspondente da infra-estrutura sanitária para os animais aquáticos. Além disto, este setor não dispõe atualmente de serviços de diagnóstico, nem de serviços profissionais de sanidade como no setor pecuário (OIE, 2004), principalmente nos países em desenvolvimento.

Sem dúvida, a experiência gerada com o cultivo de organismos marinhos tem demonstrado que devido à mobilização de exemplares de uma região do planeta a outra, a distribuição geográfica das enfermidades está mudando. Aliada à mudança geográfica das enfermidades, a deterioração do meio ambiente e as mutações sofridas por agentes patogênicos, têm propiciado o aparecimento de parasitas em novos organismos.

Existem inúmeros trabalhos relatando morte massiva em determinadas regiões, diminuindo a possibilidade de cultivo da espécie na região afetada, bem como a rentabilidade

Tabela 1. Correspondência entre os capítulos sobre as enfermidades de moluscos, contidos no Manual de Aquático com os do Código Aquático (OIE, 2003).

Manual Aquático	Código Aquático
Bonamiose	infecção por <i>Bonamia ostreae</i> infecção por <i>Bonamia exitiosus</i> infecção por <i>Mikrocytos roughleyi</i>
Enfermidade MSX	infecção por <i>Haplosporidium nelsoni</i>

(II - MOLUSCOS: iridovirose, bucefalose, hepatite e identificação das toxinas DSP/PSP) (SANTA CATARINA, 2002).

Algumas destas patologias já estão sendo estudadas em laboratórios de pesquisa da UFSC e da Universidade do Vale do Itajaí – UNIVALI. O vírus da hepatite e sua possível transmissão dos moluscos ao homem, tem sido averiguada por pesquisadores do Departamento de Microbiologia e Parasitologia - CCB/UFSC. A identificação de toxinas DSP/PSP produzidas por algas causadoras de maré vermelha, está sendo desenvolvida por pesquisadores da Engenharia Sanitária e Ambiental - CTC/UFSC e da UNIVALI.

Em 2004 foi criado o Laboratório de Diagnóstico e Patologia em Aqüicultura - LADPAQ, no Departamento de Aqüicultura – CCA/UFSC, reunindo os pesquisadores envolvidos com sanidade e patologia em organismos aquáticos, desse Departamento.

Dentre os diversos patógenos contidos na lista de notificação obrigatória da OIE, com potencial para infectar os moluscos cultivados no litoral catarinense, estão: *Haplosporidium nelsoni*, *H. costale*, *Marteilia refringens*, *Perkinsus marinus*, *P. olsenii/atlanticus*. Estes patógenos podem causar forte impacto no desenvolvimento sócio-econômico da malacocultura, quer pela possibilidade de morte massiva, castração parasitária ou pela diminuição na qualidade visual do molusco, como explicitado a seguir.

***Haplosporidium* spp.**

Haplosporidium nelsoni (= *Minchinia nelsoni*) e *H. costale* (= *Minchinia costale*) são protoparasitas do Filo Haplosporidia (OIE, 2003).

H. nelsoni causa a enfermidade MSX (Multinucleate Sphere X), ou Haplosporidiose ou Enfermidade da Baía Delaware, em *Crassostrea virginica* e *C. gigas* (Figura 1). Contudo, sua prevalência e virulência é maior em *C. virginica*. Pode ser encontrado na costa Atlântica dos Estados Unidos (da Flórida ao Maine) até a Nova Escócia (Canadá). Áreas enzoóticas são as Baías Delaware e Chesapeake, os estuários de Long Island Sound, Cape Cod e Nova Escócia. *H. nelsoni* foi encontrado infectando *C. gigas* nos Estados Unidos (Califórnia e Washington), na Korea, Japão e França (BONDAD-RENTASO *et al.*, 2001; OIE, 2003).

Outros *Haplosporidium* spp. infectam diversos bivalves. *H. tumefaciens* infecta *Mytilus californianus* nos Estados Unidos (Califórnia) e *H. (=Minchinia) armoricanum* infecta *Ostrea edulis*, na Europa (França e Holanda) e *O. angasi* na Austrália. *Haplosporidium* sp também ocorre em *C. gigas* na França. *H. tapetis* em *Ruditapes decussatus* e *R. philippinarum* na Europa (França, Espanha e Portugal) e Austrália (BONDAD-RENTASO *et al.*, 2001; AFF, 2002; OIE, 2003).

Plasmódios do protozoário ocorrem entre células do tecido conjuntivo, epitelial e glândulas digestivas. A esporulação é rara em ostras adultas, freqüente em juvenis (1 a 2 anos)

e só ocorrem no epitélio digestivo, causando sua ruptura. A enfermidade MSX está restrita às salinidades acima de 15 ‰ e mortalidades rápidas e elevadas podem ocorrer a 20 ‰. A imersão de ostras infectadas, por duas semanas em água a 10 ‰ de salinidade ou abaixo de 20°C, matam apenas *H. nelsoni*. Animais suscetíveis à infecção morrem rapidamente, sem perda da condição. Nas ostras tolerantes, o índice de condição diminui com o aumento da infecção. Ao morrer, estão com o estoque celular reduzido e rompido (BONDAD-RENTASO *et al.*, 2001; OIE, 2003).

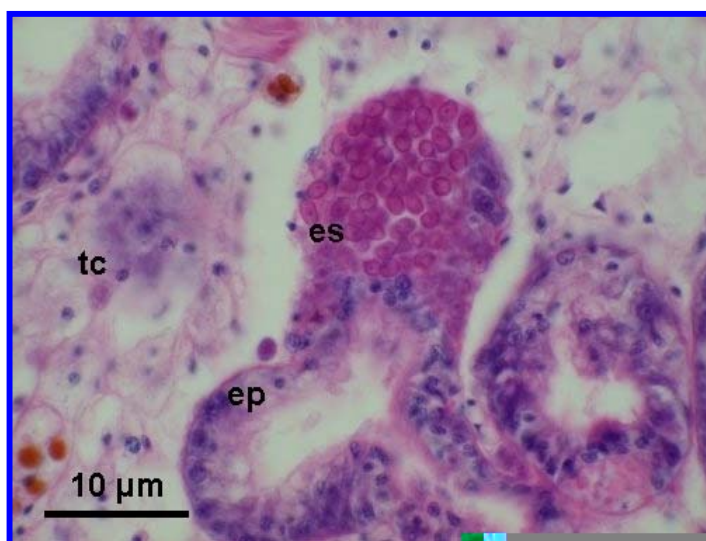


Figura 1. Esporos de *Haplosporidium nelsoni* no epitélio digestivo de *Crassostrea virginica*. Tc- tecido conjuntivo; ep- epitélio da glândula digestiva; es- esporos de *H. nelsoni* (HE) (modificado de VIMS, 2003a).

H. costale causa a enfermidade SSO (Seaside Organism) e infecta *Crassostrea virginica*. Ocorre em baías com salinidade alta (25‰) ao longo da costa leste dos Estados Unidos (da Virginia à Nova Escócia), Canadá e Austrália.

Plasmódios de *H. costale* ocorrem entre as células do tecido conjuntivo, glândula digestiva, manto e gônada (Figura 2). A esporulação é tida como final das infecções; causa rompimento do tecido conjuntivo e morte. A parasitose tem sazonalidade limitada entre maio e junho e apresenta vestígios subclínicos durante o outono e inverno. Os plasmódios se desenvolvem entre março e abril, seguidos por esporulações e mortalidade entre maio e junho. A distribuição de *H. costale* e *H. nelsoni* coincide em áreas com alta salinidade nos Estados Unidos ao Canadá. Co-infecções com os dois patógenos foram reportadas e sua diferenciação ocorre através da esporulação. Enquanto *H. costale* esporula no tecido conjuntivo, *H. nelsoni*

esporula no epitélio dos túbulos digestivos. Nos estágios plasmodiais e na ausência de esporos, a identificação dos parasitas requer testes moleculares (OIE, 2003).

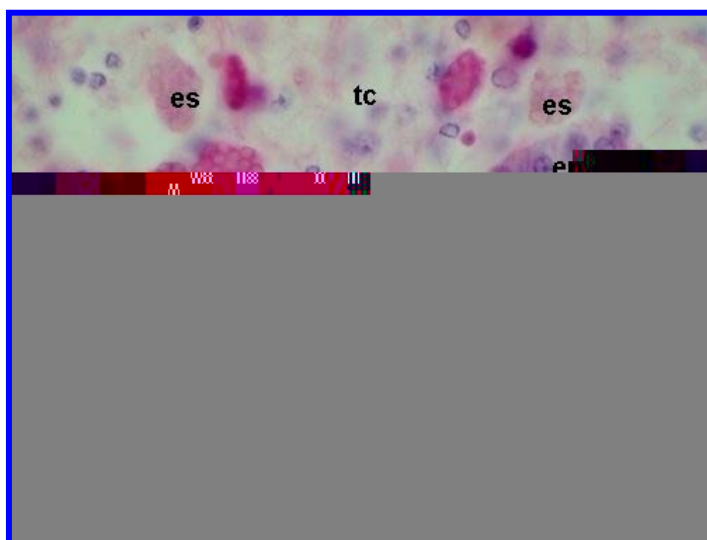


Figura 2. Esporos de *Haplosporidium costale* no tecido conjuntivo de *Crassostrea virginica*. Tc- tecido conjuntivo; ep- epitélio da glândula digestiva; es- esporos de *H. costale* (HE) (modificado de VIMS, 2003a).

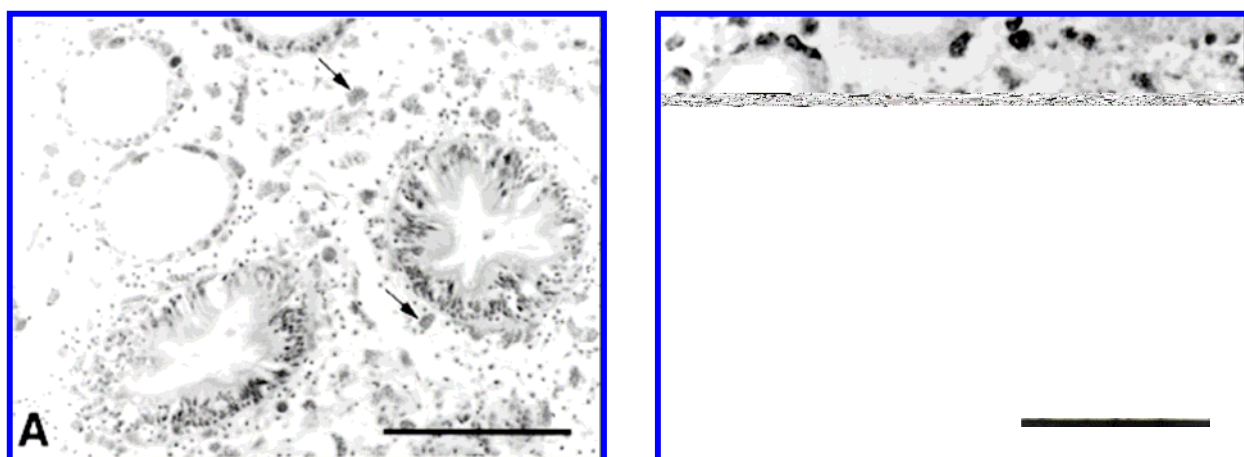


Figura 3. Hibridização *in situ* (HIS) de secções histológicas consecutivas de ostra *Crassostrea virginica*, com infecção mista de *Haplosporidium nelsoni* e *H. costale*. **A.** Dois plasmódios, de muitos estão no tecido conjuntivo indicados pelas setas (HE). Barra= 100 μ m. **B.** HIS com sonda de DNA de *H. costale* da mesma área mostrada em A. Note os plasmódios de *H. costale* no tecido conjuntivo (indicado pelas setas) mas não no tecido epitelial (modificado de BURRESON e FORD, 2004).

A transmissão experimental, em laboratório, de *H. nelsoni* e *H. costale* ainda não foi realizada. O ciclo vital dos haplosporídios não foi elucidado, mas suspeita-se da existência de hospedeiros intermediários (BONDAD-RENTASO *et al.*, 2001; OIE, 2003). O diagnóstico presuntivo para *H. nelsoni* e *H. costale* é feito por histologia clássica e PCR a partir de DNA obtido do tecido de ostra. A confirmação da identificação dos patógenos ocorre por exames de hibridização *in situ* (Figura 3) (BONDAD-RENTASO *et al.*, 2001; OIE, 2003).

***Marteilia* spp.**

No Filo Paramyxia são encontrados protoparasitas do gênero *Marteilia*, causadores de infecção e mortalidade em massa em diversos bivalves comerciais na Austrália, Europa e Estados Unidos. Sua presença em qualquer bivalve deve ser considerada séria e o Laboratório de Referência da OIE deve ser consultado (OIE, 2003).

Marteilia refringens causa a enfermidade Aber ou da Glândula Digestiva. É um parasita letal da ostra Europeia, *Ostrea edulis*. Infecta também, outros bivalves como *O. angasi*, *O. puelchana*, *Ceratoderma (=Cardim) edule*, *Mytilus edulis*, *M. galloprovincialis*, *Crassostrea gigas*, *C. virginica* e *Tiostrea lutaria (=chilensis)*. Pode ser encontrado no sul da Inglaterra, na França, Itália, Portugal, Espanha, Marrocos e Grécia (BOWER *et al.*, 1994; BONDAD-RENTASO *et al.*, 2001; OIE, 2003, BERTHE *et al.*, 2004).

M. sydneyi causa a enfermidade QX (Queensland unknown) e infecta *Saccostrea commercialis (=glomerata)* e possivelmente também *S. echinata* e *Ostrea concha*. Este parasita infecta *S. commercialis* na Austrália (New South Wales, Queensland e Austrália Ocidental) (BOWER *et al.*, 1994; BONDAD-RENTASO *et al.*, 2001; OIE, 2003; BERTHE *et al.*, 2004).

M. maurini parasita *Mytilus galloprovincialis* e *Mytilus edulis* da França, Itália e Espanha (Figura 4) (BONDAD-RENTASO *et al.*, 2001; OIE, 2003, BERTHE *et al.*, 2004).

M. christenseni infecta o venerídeo *Scrobicularia plana* na França e *M. lengehi* a ostra *Saccostrea cucullata*, do Golfo Pérsico e Austrália (OIE, 2003; BERTHE *et al.*, 2004). Outras *Marteilia* sp. foram observadas em *Cardium edule*, *Tapes rhomboides* e *T. pullastra* (FIGUERAS *et al.*, 1996); em *Ensis minor* e *E. siliqua* (CESCHIA *et al.*, 2001); *Mytilus galloprovincialis* na Croácia (ZRNCIC *et al.*, 2001); *Argopecten gibbus*, na Flórida (MOYER *et al.*, 1993) e *Tridacna maxima*, em Fiji (NORTON *et al.*, 1993).

A infecção por *Marteilia refringens* e *M. sydneyi* está associada ao baixo índice de condição com completa reabsorção da gônada, emaciação da ostra, exaustão das reservas de glicogênio, descoloração da glândula digestiva, parada no crescimento e mortalidade. Plasmódios iniciais destes protozoários ocorrem na parede do estômago, causam destruição dos tecidos, aumento da secreção de muco e infiltração de hemócitos dentro da glândula digestiva (FIGUERAS *et al.*, 1991).

O local inicial da infecção por *M. sydneyi* é o epitélio dos palpos e das brânquias (OIE, 2003). Segundo KLEEMAN *et al.* (2002a), no início da infecção ocorre hiperplasia epitelial, infiltração de hemócitos, hipertrofia e fusão dos filamentos branquiais. Os estágios de pré-esporulação são encontrados no tecido conjuntivo e epitélio da glândula digestiva. Infecções massivas desorganizam o epitélio da glândula digestiva e a morte resulta por inanição, 60 dias após o início da infestação (OIE, 2003).

A pré-esporulação de *M. refringens* ocorre no epitélio dos palpos labiais, estômago, túbulos digestivos e talvez nas brânquias (Figura 5). A morte do hospedeiro parece estar relacionada à ais,

(COMPS e JOLY *apud* BERTHE *et al.*, 2004). Existe a possibilidade de haver hospedeiros intermediários (BONDAD-RENTASO *et al.*, 2001; OIE, 2003).

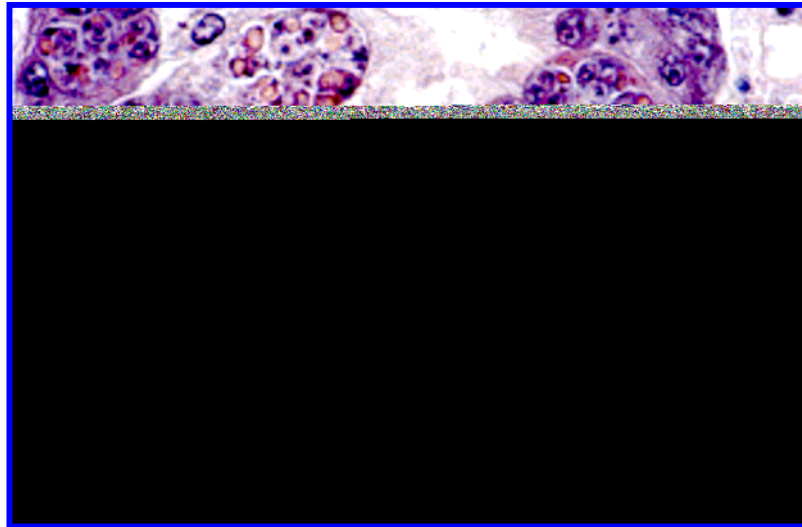


Figura 5. *Marteilia refringens* (seta), estágios avançados no epitélio da glândula digestiva da ostra plana, *Ostrea edulis*, observado em microscópio óptico (HE, $\times 1000$) (BERTHE *et al.*, 2004).

O diagnóstico presuntivo de *M. refringens* e *M. sydneyi* ocorre por histologia clássica e pelo exame citológico com “imprints” de tecidos (Figura 6). A confirmação da identificação dos patógenos requer exames de hibridização *in situ* de *Marteilia* spp. (Figura 7).

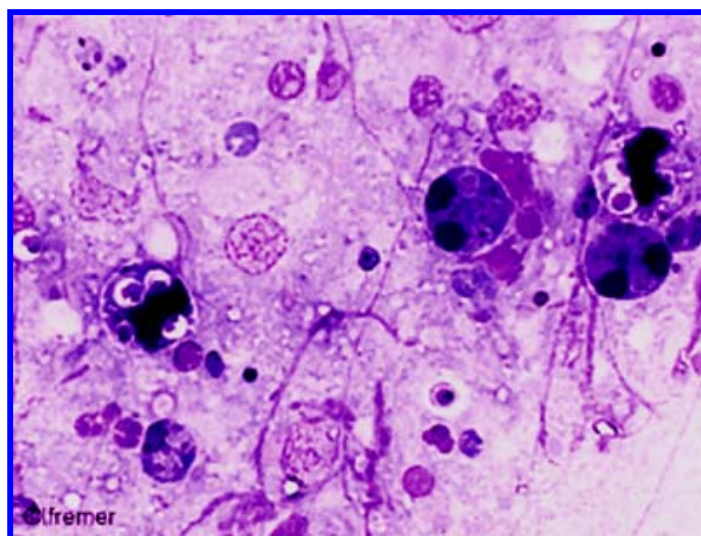


Figura 6. Diagnóstico presuntivo de *M. refringens* através de exame citológico com “imprints” de tecidos. Foto: Franck Berthe (HERFORT, 2004).

Outro teste é feito para detectar o polimorfismo no comprimento do fragmento de restrição, obtidos pela reação em cadeia da polimerase (RFLP-PCR) para identificação de *Marteilia refringens* e *M. sydneyi*, além de discriminar *M. refringens* de *M. maurini*. Como não é fácil distinguir *M. maurini* de *M. refringens*, a detecção do parasita em mexilhões requer este exame de confirmação (OIE, 2003).

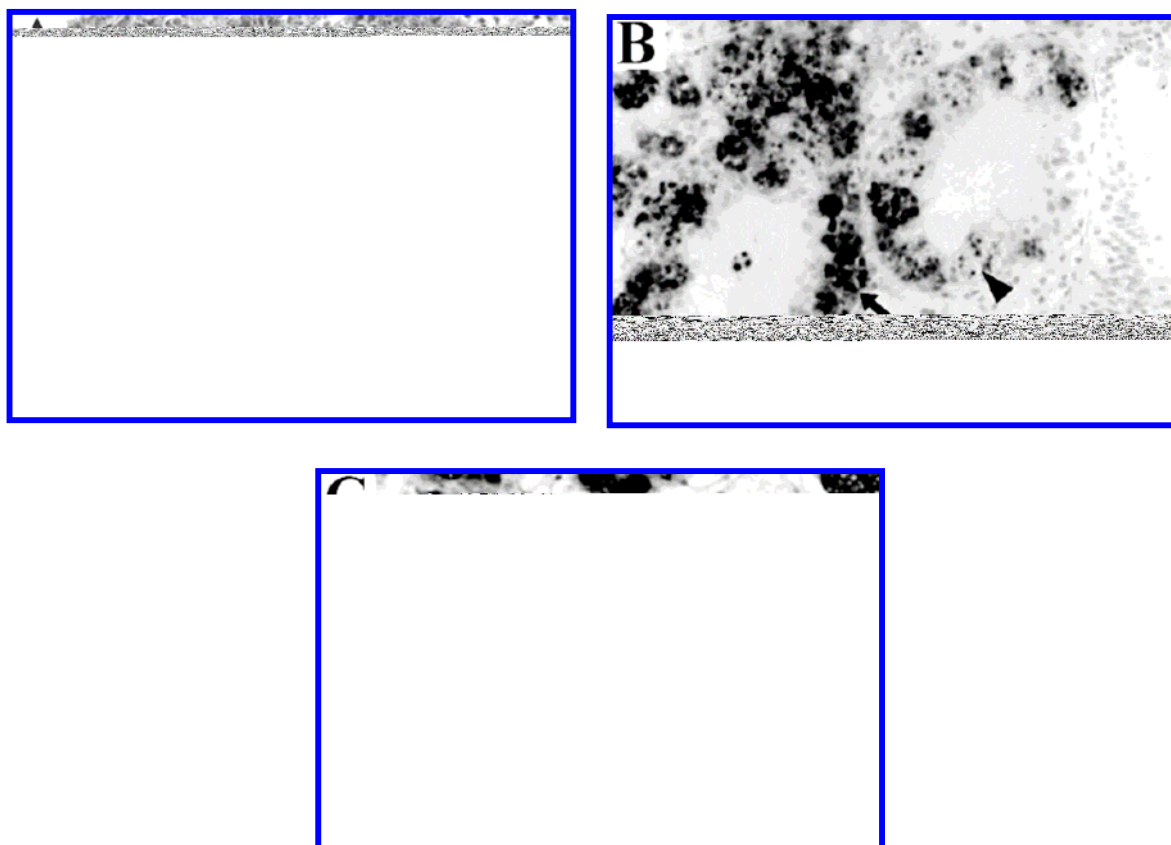


Figura 7. Especificidade das sondas ITS1 e Smart 2 em hibridização *in situ*, testados em *Marteilia sydneyi*, nos túbulos digestivos de *Saccostrea glomerata*. **A.** Detecção por histologia clássica em HE. **B.** Detecção de estágios esporontes maduros (\blacktriangleright) e imaturos (\blacktriangleleft) pela sonda ITS1. **C.** Detecção de estágios maduros e esporontes pela sonda Smart 2 (KLEEMAN *et al.*, 2002)

***Perkinsus* spp.**

Investigações moleculares indicaram que *Perkinsus* spp. não pertencem ao Filo Apicomplexa, como sugeria sua ultraestrutura. Estes protoparasitas letais estão mais relacionados à Dinoflagelada. Alguns autores os têm classificado no Filo Perkinsozoa ou no Filo Dinozoa, subfilo Protalveolata (BONDAD-RENTASO *et al.*, 2001; OIE, 2003).

Perkinsiose, também chamada de enfermidade Dermo é a denominação genérica das enfermidades infecciosas causadas por *Perkinsus marinus* e *P. olseni/atlanticus*. *Perkinsus marinus* recebeu 7 nomes desde 1940, dentre eles, *Dermocystidium marinum* e *Labyrinthomyxa marina* (ICES, 2003; OIE, 2003). Esta espécie causa sérios danos em *Crassostrea virginica* (Figura 8). Pode infectar *C. gigas* e *C. ariakensis*, porém estas ostras são mais resistentes à enfermidade. Infecta também *Dendostrea frons* e *Ostreola equestris* (CASTILLO, 1998). Outros *Perkinsus* spp. infectam diversos bivalves no hemisfério norte e no sul, em águas tropicais e subtropicais. *P. chesapeaki* (=andrewsi) infecta *Mya arenaria* e *Macoma balthica*, nos Estados Unidos, enquanto *P. qugwadi* em *Patinopecten yessoensis* no Canadá. Estas espécies não são consideradas atualmente de notificação pela OIE. Contudo, até que se conheça melhor a identidade, biologia e patologia dos outros *Perkinsus* spp., sua presença em qualquer bivalve, deve ser considerada séria e o Laboratório de Referência da OIE deve ser consultado (BONDAD-RENTASO *et al.*, 2001; OIE, 2003).



Figura 8. *Crassostrea virginica* saudável (1) e infectada (2) com *P. marinus*.
Foto: F. Berthe (HERFORT, 2004).

Perkinsus marinus é encontrado nos Estados Unidos (Baía de Delaware, New Jersey, Cape Cod, Maine à Florida), no Golfo do México (Península de Yucutan), Venezuela; Porto Rico, Cuba, Hawaii. (BOWER *et al.*, 1994; BONDAD-RENTASO *et al.*, 2001; AFF, 2002; OIE, 2003). APEC/FAO/NACA/SEMARNAP (2001) e BOWER *et al.*, 1994 citam o Brasil entre os países de ocorrência de *Perkinsus marinus*. Contudo, a citação foi um equívoco ocorrido por ocasião da publicação do trabalho “Synopsis of infection diseases e parasites of commercially exploited shellfish”, segundo BOWER (comunicação pessoal), devendo ser desconsiderada.

Perkinsus marinus se multiplica e causa liquefação dos tecidos infectados das ostras. Observações *in vitro* indicam a produção de fatores proteolíticos, liberados extracelularmente, o

que explica as lises dos tecidos e o bloqueio de alguns dos mecanismos defensivos das ostras (CASTILLO, 1998). *C. virginica* com a enfermidade Dermo, apresenta a glândula digestiva com “aspecto pálido”, redução do índice de condição, severa emaciação, abertura da concha (gaping), retração do manto, inibição do desenvolvimento gonádico, crescimento retardado, abscessos e lesões. A mortalidade ocorre em 95% das ostras infectadas (BOWER *et al.*, 1994; BONDAD-RENTASO *et al.*, 2001; OIE, 2003).

Perkinsus olseni foi descrito a partir de *Haliotis ruber rubra*, na Austrália e *P. atlanticus* a partir *Ruditapes decussatus* (AZEVEDO, 1989) em Portugal (Figura 9). Outros hospedeiros susceptíveis incluem *Haliotis cyclobates*, *H. scalaris*, *H. laevigata*, *Anadara trapezia*, *Austrovenus stutchburyi* e *Ruditapes philippinarum*. Similaridades nas seqüências de nucleotídeos dos espaçadores internos transcritos (ITS) e da região dos espaçadores não transcritos (NTS) do RNA ribossomal sugeriram “co-especificidade” de *P. olseni* e *P. atlanticus*. A sinonímia das duas espécies foi estabelecida e *Perkinsus olseni* tem prioridade taxonômica (OIE, 2003).

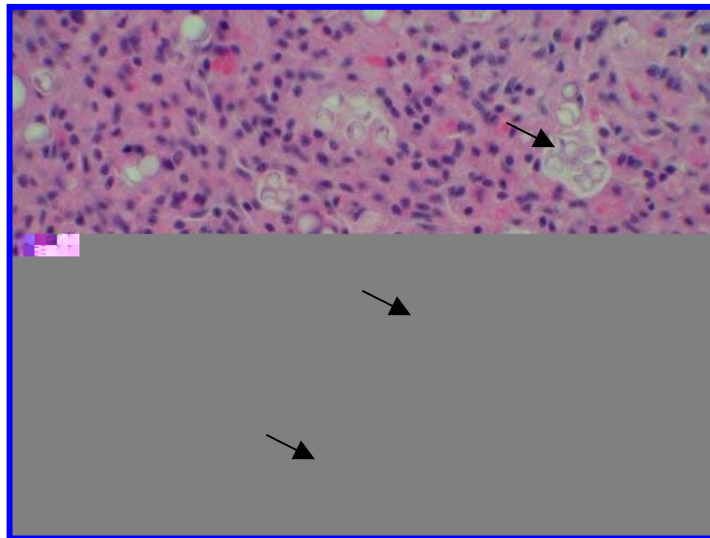


Figura 9. *P. olseni/atlanticus* no bivalve arenícola *Ruditapes decussatus*. Trofozoítos maduros (seta) com o característico núcleo acêntrico (VIMS, 2003b).

P. olseni/atlanticus ocorre em Austrália, Vanuata, Nova Zelândia, Korea, Japão, Kuwait, Portugal, França, Itália, Holanda e Espanha (BOWER *et al.*, 1994; BONDAD-RENTASO *et al.*, 2001; AFF, 2002; OIE, 2003).

A disseminação de *P. olseni/atlanticus* é causada pela ruptura do tecido conjuntivo e epitelial. Cistos macroscópicos ocorrem nas brânquias infectadas de *R. decussatus*. Pode haver abscessos no abalone *Haliotis* spp.. Pústulas com mais de 8 mm de diâmetro no pé e

manto *Haliotis* spp. infectados, reduzem seu valor comercial. *Perkinsus olseni/atlanticus* foi associado a perdas do abalone *H. laevigata*, na Austrália e mortalidade do venerídeo *R. decussatus* em Portugal e *R. philippinarum* na Korea (BONDAD-RENTASO *et al.*, 2001; OIE, 2003).

A morfologia dos estágios e ciclo vital é similar a todos os *Perkinsus* spp.. O ciclo vital de *P. marinus* ocorre, geralmente, dentro de fagócitos ou “bolsas” (Figura 10). A proliferação de *Perkinsus* spp. está correlacionada ao aumento da temperatura da água acima 20°C, quando a patogenicidade e mortalidades associadas, se elevam. Todos os estágios do ciclo vital parecem ser infectantes.

Trofozoítos maduros, com grandes vacúolos que deslocam o núcleo para a periferia da célula (núcleo acêntrico), têm de 3 a 10 µm de diâmetro. Estes trofozoítos ocorrem dentro das células do tecido conjuntivo e epitelial, onde realizam cissiparidade sucessiva (zooesporulação). Neste estágio de “roseta”, esporângios ou esquizontes, medem de 4 a 15 µm de diâmetro e contém 2, 4, 8, 16 ou 32 trofozoítos em desenvolvimento. No final do processo ocorre liberação de 8 a 32 trofozoítos imaturos. Estes trofozoítos imaturos, merontes, merozoítos ou aplanósporos, têm de 2-3 µm de diâmetro (BONDAD-RENTASO *et al.*, 2001; OIE, 2003).

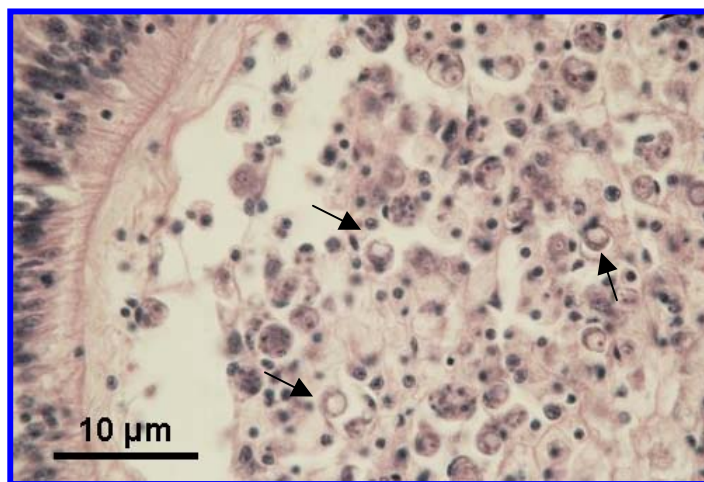


Figura 10. *Perkinsus marinus* em *Crassostrea virginica* apresentando trofozoítos maduros com núcleo acêntrico (seta) (VIMS, 2003b).

Os hospedeiros são infectados através de zoósporos biflagelados. Todavia a função do zoósporo na transmissão no ambiente não está clara (BONDAD-RENTASO *et al.*, 2001; OIE, 2003).

Há quatro testes presuntivos para detecção de *Perkinsus* spp.. A histologia clássica não é eficiente em infestações leves, porém associada à cultura em meio líquido de tioglicolato (Figura 11) é eficiente na identificação de *Perkinsus* spp.. A microscopia eletrônica de transmissão não é adequada à identificação, pois a ultra-estrutura não é exclusiva para esta espécie. O teste de PCR identifica a presença do parasito, mas não pode ser usado para separar as espécies entre si. Para o diagnóstico de confirmação da identificação de *Perkinsus* spp., recomenda-se a análise da seqüência da região ITS. Os produtos do PCR podem ser seqüenciados para a identificação das espécies. (OIE, 2003).

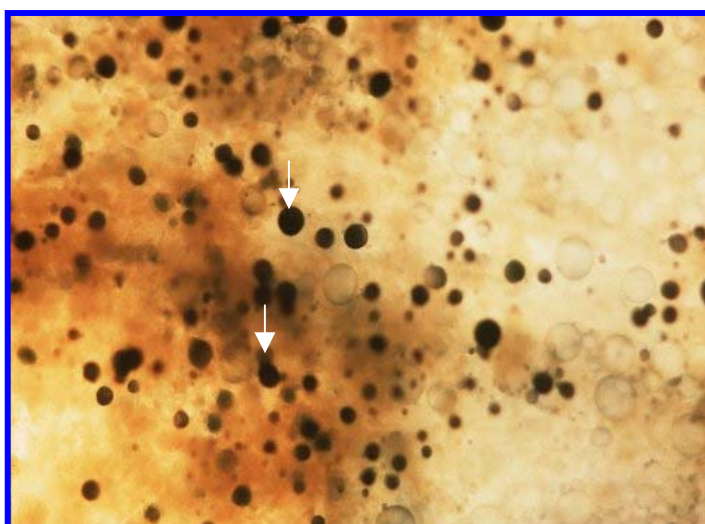


Figura 11. Diagnóstico de *Perkinsus* spp. (seta) cultivado em fluido tioglicolato e corado com tintura de iodo ou lugol (VIMS, 2003b)

As enfermidades a serem investigadas, controladas e/ou erradicadas contidas na Portaria nº 021/02/SDA, são descritas a seguir.

Mikrocytos mackini

Mikrocytos mackini causa Microcitose (Enfermidade da Microcélula) ou Enfermidade da Ilha Denman (Canadá). Este parasita de afiliação taxonômica desconhecida não tem relação com outras microcélulas parasitas (*Bonamia* (= *Mikrocytos*) *roughleyi*, *B. ostreae*, *B. exitiosus*) (CARNEGIE *et al.*, 2004). Pode infectar *Crassostrea gigas*, que parece ser mais resistente, *Ostrea edulis*, *O. conchaphila* (= *lurica*) e, experimentalmente, *C. virginica* e *S. glomerata* (= *commercialis*) (HINE *et al.*, 2001; OIE, 2003; BOWER *et al.*, 2005).

A ocorrência de *Mikrocytos mackini* foi registrada na costa oeste da América do Norte (sudeste da Columbia Britânica - Canadá) e nas adjacências do Estado de Washington (Estado Unidos) (BOWER *et al.*, 2005).

O pequeno protoparasita, 2-4µm de diâmetro, não possui organelas como mitocôndria e haplosporossomos. A infecção tem início com vesículas nas células do tecido conjuntivo, nos miócitos do coração, do músculo adutor e nos hemócitos dos hospedeiros (CARNEGIE *et al.*, 2003; BOWER *et al.*, 2005). Este induz a formação de pústulas amarelo-esverdeadas (Figura 12), abscessos, úlceras, necrose tecidual, freqüentemente no manto, com correspondente cicatrização marrom na concha. Lesões macroscópicas nem sempre estão presentes. Os abscessos, com hemócitos granulares e hialinos, podem conter células de 1-3 µm de diâmetro.

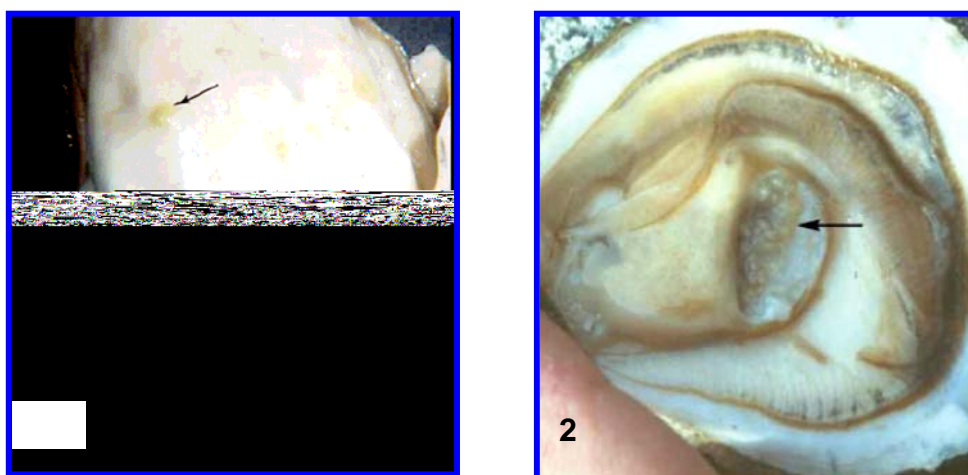


Figura 12. Pústulas amarelo-esverdeadas ocasionadas pela infecção com *Mikrocytos mackini*. 1. Pústulas no manto de *Crassostrea gigas*, indicando o estágio final da infecção. 2. Pústulas no músculo adutor da ostra europeia *Ostrea edulis*. Fotos: Susan Bower (HERFORT, 2004).

Infecções severas parecem ser restritas a ostras com mais de 2 anos de idade, com mortalidade em torno de 40% (OIE, 2003). Contudo, BOWER *et al.* (2005) em experimento de laboratório, infectaram juvenis de *Crassostrea gigas* com *M. mackini*, extraídos de *O. edulis* (JOLY *et al.*, 2001). Os resultados demonstraram que além de ser suscetível ao parasita, com prevalência de 100%, os juvenis desenvolveram a enfermidade e mortalidades ocorreram em ostras com 18 mm de comprimento (BOWER *et al.*, 2005).

A enfermidade ocorre quando a temperatura da água se eleva, após 3 a 4 meses sob temperaturas abaixo de 10°C. A colheita ou movimentação de ostras para locais mais

profundos, com água mais fria tem sido implementado com sucesso para controlar a enfermidade (OIE, 2003).

A diagnose presuntiva usa o exame citológico com “imprints” de tecidos. Os exames de confirmação da parasitose, por *M. mackini*, usam a histologia clássica e os procedimentos para análise por microscopia eletrônica de transmissão (OIE, 2003).

A identificação positiva requer testes moleculares (Figura 13) e microscopia eletrônica, para identificar e distinguir *M. mackini* de outras microcélulas (*Bonamia (=Mikrocytos) roughleyi*, *B. ostreae*, *B. exitiosus*) onde exista co-ocorrência. A presença destes patógenos, em qualquer bivalve, deve ser considerada séria e o Laboratório de Referência da OIE, consultado (OIE, 2003; BOWER *et al.*, 2005).

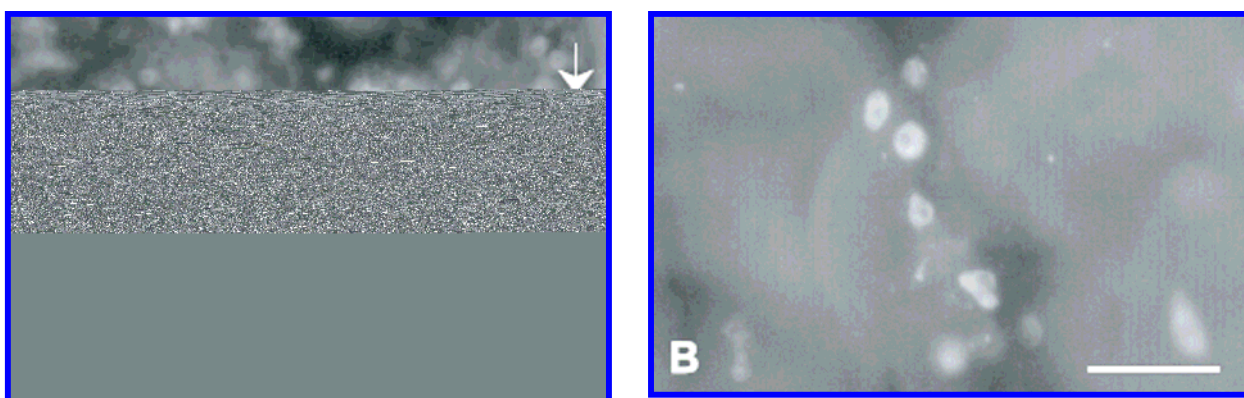


Figura 13. Detecção de microcélulas por hibridização *in situ* fluorescente. **A-** *Bonamia ostreae* em hemócitos infiltrados no tecido branquial de *Ostrea edulis*. Um *B. ostreae* maior está indicado pela seta e o grupo de células menores pela extremidade da seta. Barra= 10 µm. **B-** Células de *Mikrocytos mackini* no músculo adutor de *O. edulis* infectada experimentalmente. Barra = 10 µm (CARNEGIE, 2004).

Iridovirus

Iridovirus é o vírus causador da Iridovirose, Enfermidade Viral do Vélum de Ostras (OVVD) ou Enfermidade da Bolha, somente em larvas de *Crassostrea gigas* (Figura 14). Este vírus tem morfologia similar aos Iridoviridae, causadores da Enfermidade ou Mal da Brânquia e Enfermidade Hemocítica Infecciosa de Vírus (HIV), em *Crassostrea angulata* e *C. gigas*. Foram reportadas infecções em larvas de *C. gigas* somente em duas larviculturas de moluscos nos Estados Unidos (Washington). Acredita-se ser virtualmente ubíquo em águas temperadas do mundo. Há 20 anos esta enfermidade, OVVD, não é reportada. Foi listada em “outras enfermidades significantes” na lista da OIE de 1997 e FAO/NACA, mas foi retirada de listas mais recentes da OIE (BOWER, 1994; APEC *et al.*, 2000; BONDAD-RENTASO *et al.*, 2001; AFF, 2002).

A OVVD causa degradação e necrose do epitélio do vélum, em larvas com concha >150 µm de comprimento e mais de 10 dias de idade, quando cultivadas entre 25 e 30°C. Células infectadas são hipertrofiadas e sem cílios, o que causa as "bolhas" características desta enfermidade. Pode haver perda total do cílios do vélum, mas esta não é uma característica específica para OVVD. Causa perdas severas nas larviculturas, de quase 100% em tanques afetados. Pode aparecer de março a maio e ao longo do verão do hemisfério norte. O efeito subclínico da exposição a esta enfermidade em assentamentos remotos de larvas e crescimento da semente não é conhecido (BOWER, 1994; BONDAD-RENTASO *et al.*, 2001).



Figura 14. Iridovirus causador da Enfermidade Viral do Vélum de Ostras (OVVD), em larvas da ostra do Pacífico (*Crassostrea gigas*). Viroplasma citoplasmático (seta) está rodeado por partículas virais completas (vp) e partículas incompletas (vc) ligadas ao estroma viroplásmico. Barra = 1 µm. (Elston and Wilkinson, 1985 *apud* ELSTON, 1997).

O vírus ocorre como corpos de inclusão intracitoplasmáticos, com 1,2-2,4 µm de diâmetro, forma esférica/icosaedra, com DNA e com cápside bilamelar. Estes corpos são densos e basofílicos nas fases iniciais das infecções, mas podem se tornar irregulares e menos

basofílicos com a formação de vírions. Os corpos de inclusão ocorrem no epitélio esofágico da base do vélu, epitélio oral e raramente no epitélio do manto (BOWER, 1994; BONDAD-RENTASO *et al.*, 2001).

A profilaxia da enfermidade é feita pela destruição e descarte das larvas infectadas. A única forma de controle é o rápido reconhecimento da infecção e subsequente desinfecção dos tanques e equipamentos para prevenir a disseminação do patógeno. Crescimento lento, ausência de alimentação e natação podem indicar a presença de OVVD (BOWER, 1994; BONDAD-RENTASO *et al.*, 2001).

O diagnóstico presuntivo é feito por observação do comportamento das larvas nas incubadoras e por histologia clássica. A confirmação da identificação é feita pela associação entre a histologia clássica e os procedimentos de microscopia eletrônica de transmissão (BOWER, 1994; BONDAD-RENTASO *et al.*, 2001).

***Bucephalus* spp.**

A bucefalose ou “enfermidade laranja” é causada pelo trematódeo digenético *Bucephalus* sp, do Filo Platyhelminthes (CHENG, 1978). Há diversas espécies de *Bucephalus*: *B. papillosus* (OLSEN, 1974), *B. brevitentaculatus*, *B. cynoscion*, *B. gorgon*, *B. kathetostomae*, *B. priacanthi*, *B. scorpaenae* (AMATO, 1982), *B. cuculus*, *B. elegans*, *B. heterotentaculatus*, *B. introversus*, *B. varicus* (ITIS, 2005), dentre outras. Estes digenéticos podem ser encontrados nas Américas, Europa, África, Ásia e Oceania.

Bucephalus spp. foram reportados nos bivalves *Mytilus edulis platensis*, *Crassostrea virginica*, *C. madrasensis*, *Ostrea edulis*, *Pinctada radiata*, *Dreissena polymorpha*, *Donax variabilis*, *Paphia aurea*, *Anomalocardia brasiliana*, *Eurynia iris*, *Pecten fumatus*, *Chlamys* (= *Mimachlamys*) *asperrima*, *Perumytilus* sp. e *Perna perna* (GARCIA, 2005).

Acredita-se que *B. varicus*, de ampla distribuição geográfica, possa infestar *P. perna* no litoral brasileiro. Este trematódeo ocorre em peixes no litoral do Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Rio de Janeiro (PEREIRA JR. *et al.*, 1996; CHAVES, 1998; ALVES *et al.*, 2004). Há registro de seus esporocistos e cercárias em mitíldeos no litoral da Argentina (MORRIS, 1982 *apud* PEREIRA JR. *et al.*, 1996).

O ciclo vital dos trematódeos digenéticos é muito complexo. Segundo AMATO (1982), ROBALDO (1995) e PEREIRA JR. *et al.* (1996), os adultos de *Bucephalus* sp. têm como hospedeiro definitivo um peixe carnívoro, como *Urophycis brasiliensis* (abrótea), *Menticirrhus americanus*, *M. littoralis* (papa-terra), *Chloroscombrus chrysurus* (palombeta) e *Centropomus undecimalis* (robalo-flexa). As formas larvais (miracídeos, “esporocistos” e cercárias) infestam o primeiro hospedeiro intermediário, um molusco como *Perna perna*. A forma larval metacercária infesta o segundo hospedeiro intermediário, um peixe herbívoro e/ou carnívoro. O parasita

pode chegar ao hospedeiro definitivo, quando este se alimenta do primeiro ou do segundo hospedeiro intermediário (PEREIRA JR. *et al.*, 1996; UMIJI *et al.*, 1976).

O manto de mexilhões infectados tem filamentos alaranjados, devido à pigmentação dos esporocistos (Figura 15). Estes são bolsas ramificadas, de tamanhos irregulares, que penetram nas cavidades dos vasos sangüíneos, intestino, glândula digestiva, câmaras brânquias, gonodutos e folículos gonádicos. Infestações elevadas impossibilitam a identificação macroscópica e, muitas vezes, microscópica do sexo do hospedeiro. O parasita eleva o consumo de glicogênio na infestação inicial e de lipídeos em estágios avançados. A deficiência nutricional causa castração parasitária, emaciação do corpo e, provavelmente, há rompimento dos tecidos do hospedeiro durante a saída das cercárias. Existe possibilidade de morte em mexilhões e outros moluscos parasitados. As características das cercárias facilitam sua identificação até gênero. Contudo, a identificação da espécie é mais difícil em função do complexo ciclo vital (CHENG, 1978; LAUCKNER, 1983; MAGALHÃES, 1998; SILVA *et al.*, 2002).



Figura 15. *Perna perna* parasitado pelo trematódeo *Bucephalus* sp. Esporocistos, filamentos de coloração alaranjada (seta), ramificam-se intensamente através do manto dificultando a identificação do sexo do mexilhão. Foto: Andréa Ricetti Cochôa.

O início da enfermidade em *P. perna* está relacionado ao tamanho do mexilhão: animais menores que 30mm não são parasitados (LASIAK, 1989; MAGALHÃES, 1998), sendo mais intensa em animais entre 60 e 70mm. Não é possível identificar esporocistos de *Bucephalus* sp.,

em cerca de 8% da população de mexilhões, nos estágios iniciais da enfermidade (MAGALHÃES, 1998).

O diagnóstico presuntivo é feito por observação macroscópica do manto de mexilhões e a confirmação da enfermidade utiliza histologia clássica (Figura 16).

Em maio de 2003, durante a 71ª Sessão Geral da OIE, o Comitê Internacional aprovou uma série de critérios para inscrição de enfermidades de animais aquáticos em sua lista de notificação obrigatória, além de revisar as enfermidades estabelecidas até então. Este Comitê solicita aos Países Membros, entre eles o Brasil, que entendam bem estes novos dispositivos para que subscrevam e cumpram suas obrigações de notificação de enfermidades (OIE, 2004). Neste caso é necessário ter laboratórios e profissionais capazes de realizar diagnósticos confiáveis acerca das patologias de notificação obrigatórias da OIE, bem como as requeridas pelo Estado. Por outro lado, a lista pertencente ao projeto estadual para sanidade de animais aquáticos, tem por base a lista de enfermidades da OIE.



Figura 16. Brânquias do mexilhão *Perna perna* com esporocistos do trematódeo *Bucephalus* sp, repletos de cercárias (fi- filamentos branquiais, ci- câmaras interbranquiais, es- esporocisto, c- cercárias). Foto: Patricia Garcia.

A maior parte dos Países Membros da OIE apresenta informes anuais e trimestrais sobre as enfermidades dos animais aquáticos, porém são numerosos os erros de notificação como, por exemplo, o uso de símbolos inadequados; o fornecimento de informações contraditórias e a falta de declaração de ocorrências de enfermidades que poderiam ter repercussões epidemiológicas para os demais países da região (OIE, 2004). No Relatório Plurianual da Situação Zoonosológica (OIE, 2005b) todas as enfermidades de notificação

obrigatória para moluscos estão catalogados, para o Brasil, como “não avaliadas” entre os anos de 1996 a 2002 e “nunca reportadas” para 2003 e 2004. Isto indica claramente não haver qualquer tipo de acompanhamento clínico ou laboratorial destas enfermidades.

Em maio de 2004, durante a 72ª Sessão Geral da OIE, a Comissão de Normas Biológicas afirmou que os Laboratórios de Referência e Centros Colaboradores desempenham

1. OBJETIVO GERAL:

Contribuir para a exeqüibilidade de parte do programa estadual de sanidade para moluscos marinhos cultivados no litoral catarinense, que trata do diagnóstico das enfermidades.

1.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Listar as enfermidades de notificação obrigatória pela OIE e pelo Projeto de Sanidade Aqüícola do Estado;
- Fazer um levantamento dos testes para diagnóstico e confirmação das enfermidades indicadas na Portaria nº 021/02/SDA (microcitose, iridovirose e bucefalose) e pela OIE (*Haplosporidium* spp., *Perkinsus* spp. e *Marteilia* spp.);
- Avaliar a viabilidade de execução técnica dos referidos testes;
- Realizar o levantamento da legislação referente ao credenciamento de um laboratório de diagnóstico de enfermidades em Aqüicultura, pelo Ministério da Agricultura, Pesca e Abastecimento;
- Propor um protocolo para identificação e quantificação de bucefalose em mexilhões *Perna perna*.

Enfermidades de notificação obrigatória para o serviço de sanidade animal em moluscos marinhos: protocolos de diagnóstico e viabilidade de execução

Patricia Garcia*

Aimê Rachel Magenta Magalhães

Laboratório de Diagnóstico e Patologia em Aqüicultura – LADPAQ
Departamento de Aqüicultura — Centro de Ciências Agrárias – CCA
Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC

Rodovia Ademar Gonzaga, 1346, Itacorubi, CEP 88034 – 001 – Florianópolis – SC
patricigarcia@gmail.com

*Autor para correspondência

Resumo

A infra-estrutura sanitária para organismos aquáticos não acompanhou o incremento da aqüicultura brasileira. Em função da Portaria nº 021/02/SDA - SC, foram averiguados os protocolos das enfermidades de moluscos (microcitose, iridovirose, bucefalose) e requisitos ao credenciamento do LADPAQ pelo MAPA. Na lista de patógenos de notificação obrigatória da OIE, dos organismos que podem infectar moluscos cultivados no estado de Santa Catarina, foram averiguados: *Haplosporidium nelsoni*, *H. costale*, *Marteilia refringens*, *M. sydneyi*, *Mikrocytos mackini*, *Perkinsus marinus*, *P. olseni/atlanticus*. A infraestrutura atual do LADPAQ e a capacidade técnica permitem realizar: histologia clássica, exame citológico com “imprints” de tecidos e cultura em tioglicolato. Parcerias entre o LADPAQ (CCA-UFSC) e o LABICAI (CCB-UFSC) permitiria a execução dos testes de hibridização *in situ*, PCR e RFLP-PCR. Não há infra-estrutura, no momento, para executar testes de microscopia eletrônica. O

credenciamento deve cumprir a mesma legislação aplicada aos laboratórios de análises clínicas em saúde humana. Dentre elas: Instruções Normativas nº 24 e nº 51; RDC nº 50 (21/02/2002); RDC nº 189 (18/07/2003); RDC nº 245 (15/09/2003); RDC nº 302 (13/10/2005); RDC nº 306 (07/12/2004); Resolução nº 358 (29/04/2005); Portaria nº 021/02/SDA; obter concessão do alvará sanitário; código de obras do município e Padrão Internacional ISO/IEC 17025.

Unitermos: Protocolos; enfermidades; moluscos; aquicultura;

Abstract

Disease obligatory notification to sanitary service in marine molluscs: diagnostic protocols and execution viability. The sanitary infrastructure for aquatic organisms didn't accompany the increment of the Brazilian aquaculture. Because of the Law nº. 021/02/SDA - SC, the protocols for the mollusc disease (Mikrocytosis, oyster velar virus disease, bucephalosis) were acquired, as well as the requirements to the accreditation of LADPAQ for the MAPA. From the obligatory notification list of the OIE pathogens, the organisms that can infect molluscs cultivated in the state of Santa Catarina, the following were studied: *Haplosporidium nelsoni*, *H. costale* *Marteilia refringens*, *M. sydneyi*, *Mikrocytos mackini*, *Perkinsus marinus*, *P. olseni/atlanticus*. With the current infrastructure of LADPAQ and the technical capacity, the following could be accomplished: classical histology, cytological exam of tissue imprints and in Ray's fluid thioglycollate medium. Partnerships between LADPAQ (CCA-UFSC) and LABICAI (CCB-UFSC), would allow the execution of the *in situ* hybridization tests, PCR and RFLP-PCR. Currently, there is no infrastructure to execute tests of electron

microscopy. The accreditation must meet the same legislation applied to the laboratories of clinical analyses in human health. Among the regulations that must be met are: Normative Instructions n° 24 and n° 51; RDC n° 50 (21/02/2002); RDC n° 189 (18/07/2003); RDC n° 245 (15/09/2003); RDC n° 302 (13/10/2005); RDC n° 306 (07/12/2004); Resolution n° 358 (29/04/2005); Law n°. 021/02/SDA; concession of the sanitary license; construction codes of the municipality and International Standart ISO/IEC 17025.

Key words: Protocols, disease, molluscs, aquaculture

Enfermidades de notificação em bivalves marinhos: diagnóstico e execução

INTRODUÇÃO

Santa Catarina é o maior produtor de moluscos marinhos no Brasil. Atualmente, há 786 malacocultores com permissão de cultivo no Estado, com assinatura do Termo de Ajustamento de Conduta – TAC, em conformidade com a Portaria do IBAMA n.º 69 de 30/10/2003 (Oliveira Neto, 2005).

No litoral catarinense são produzidos em larga escala um molusco nativo, o mexilhão *Perna perna* (Linné, 1758) e outro exótico, a ostra *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793). Esta ostra é a espécie mais produzida no mundo (FAO/NACA, 2001). Em 2004, 9.800,8 toneladas de mexilhão e 2.512,7 toneladas de ostras foram cultivadas no Estado de Santa Catarina (Oliveira Neto, 2005). Estima-se um incremento de 30% na produção destes animais em 2005. Segundo Garcia (2001) e Oliveira Neto (2005) há cultivos de moluscos nos municípios de Balneário Barra do Sul, Balneário Camboriú, Biguaçu, Bombinhas, Florianópolis, Garopaba, Governador Celso Ramos, Itapema, Jaguaruna, Palhoça, Penha, Porto Belo, São Francisco do Sul e São José.

O transporte de animais vivos é o grande vetor de patógenos no mundo e a introdução de novas enfermidades pode causar danos ecológicos e econômicos incalculáveis, sendo um risco constante. Surtos de enfermidades epizoóticas em muitos países causam impacto social, econômico e ambiental. Estes tem resultado de irresponsabilidade humana, do transporte de animais aquáticos infectados ou de seus produtos sem os devidos cuidados sanitários (Elston, 1990; Bower et al., 1994; Bondad-Rentaso et al., 2001; OIE, 2003a).

A infra-estrutura sanitária para os animais aquáticos não tem acompanhado o incremento da aqüicultura. Atualmente, o setor não dispõe de serviços de diagnóstico, nem de serviços profissionais de sanidade como no setor pecuário. A experiência com o cultivo tem demonstrado que a alteração na distribuição geográfica das enfermidades, a deterioração do meio ambiente e as mutações sofridas por agentes patogênicos, têm propiciado o aparecimento de patógenos em novos organismos (OIE, 2004; FAO/NACA, 2001).

A globalização do comércio impõe, entre outros, restrições não tarifárias ao comércio internacional de produtos de origem animal e vegetal, incluindo a aqüicultura. Estas restrições estão consolidadas em acordos comerciais estabelecidos em negociações multilaterais, como o “Acordo sobre a Aplicação de Medidas Sanitárias e Fitosanitárias” da Organização Mundial do Comércio (OMC) (FAO, 2004). Tal acordo recomenda a adoção de medidas necessárias à proteção da vida e saúde dos seres humanos, bem como de plantas e animais. Determina, ainda, que os países exportadores se enquadrem as normas das organizações internacionais (OMC, 1994). No caso dos animais aqüícolas, aplicam-se as regras sanitárias da Organização Internacional de Epizootias (OIE), também conhecida como Organização Mundial para Saúde Animal.

As recomendações sanitárias da OIE estão contidas no Código de Saúde de Animais Aquáticos (Código Aquático) e no Manual de Diagnóstico para Animais Aquáticos (Manual Aquático).

O Código de Saúde Animal da OIE (Código Aquático), lista atualmente onze infecções de moluscos, causadas pelos protistas *Bonamia ostreae*, *Bonamia exitiosus*, *Mikrocytos roughleyi*, *Haplosporidium nelsoni*, *Haplosporidium costale*, *Marteilia refringens*, *Marteilia sydneyi*, *Mikrocytos mackini*, *Perkinsus marinus*, *Perkinsus olseni/atlanticus*, e pela bactéria *Candidatus xenohaliotis californiensis* (OIE, 2005a).

A expansão da malacocultura e de outros setores aquícolas em Santa Catarina, requer cuidados sanitários especiais para evitar a transmissão de patógenos ao homem e a disseminação de enfermidades entre os cultivos. Em 01 de outubro de 2002 o governo estadual aprovou a Portaria nº 021/02/SDA que contém as normas técnicas para execução do Programa de Sanidade Aquícola de Santa Catarina. A Portaria discrimina as enfermidades de notificação obrigatória de moluscos no Art. 12 (II - MOLUSCOS: Microcitose) e as enfermidades a serem investigadas, controladas e/ou erradicadas no Art. 13 (II - MOLUSCOS: iridovirose, bucefalose, hepatite e identificação das toxinas DSP/PSP) (Santa Catarina, 2002).

Estas enfermidades podem causar forte impacto nos cultivos catarinenses, quer pela possibilidade de morte massiva, castração parasitária ou pela diminuição na qualidade visual do molusco. Um grande problema é a falta de laboratórios e técnicos especializados na identificação dos patógenos causadores destas enfermidades.

Os Países Membros da OIE devem apresentar informes anuais e trimestrais das enfermidades em animais aquáticos. No Relatório Plurianual da Situação Zoonosológica, todas as doenças de notificação obrigatória para moluscos estão catalogadas, para o

Brasil, como “não avaliadas” entre os anos de 1996 a 2002 e “nunca reportadas” para 2003 e 2004 (OIE, 2005b). Isto indica a inexistência de acompanhamento ou diagnóstico destas enfermidades.

A Comissão de implantação do Programa de Sanidade Aquícola Estadual propõe a criação de um laboratório capaz de realizar as análises sugeridas pela OIE e exigidas pela Portaria nº 021/02/SDA. É propósito deste laboratório solicitar reconhecimento junto ao Ministério da Agricultura, Pesca e Abastecimento – MAPA (Santa Catarina, 2001). Existe, ainda, a intenção de obter o reconhecimento da OIE às atividades deste Laboratório.

A OIE (2004), por sua vez, deseja identificar laboratórios nos países em desenvolvimento que possam desempenhar este papel, bem como fortalecer suas operações, aumentando sua ligação com laboratórios de países desenvolvidos. Através de normas de padrão administrativo e exigências técnicas, a OIE estabeleceu regras para credenciar e/ou reconhecer estes laboratórios de diagnóstico e confirmação das patologias.

Objetivou-se listar as enfermidades de notificação obrigatória da OIE e do Projeto de Sanidade Aquícola Estadual; identificar os testes para diagnóstico e confirmação das enfermidades e discutir a viabilidade de sua realização. Verificou-se, também, os requisitos ao credenciamento de um Laboratório de diagnóstico pelo MAPA. O objetivo geral é contribuir com parte do programa de sanidade para moluscos marinhos cultivados no Estado de Santa Catarina.

MATERIAL E MÉTODOS

Enfermidades de notificação obrigatória

Foram selecionadas as enfermidades com potencial para infestar moluscos cultivados no litoral catarinense, contidos na lista de notificação obrigatória do Código Aquático da OIE: *Haplosporidium nelsoni*, *H. costale*, *Marteilia refringens*, *M. sydneyi*, *Mikrocytos mackini*, *Perkinsus marinus*, *P. olseni/atlanticus*. E também as infecções de notificação obrigatória (microcitose) do Projeto de Sanidade Aquícola do Estado de Santa Catarina e as enfermidades a serem investigadas, controladas e/ou erradicadas: iridovirose e bucefalose.

Protocolos das enfermidades

Os protocolos de identificação e confirmação das infecções de notificação obrigatória da lista da OIE e do Projeto de Sanidade Aquícola Estadual foram obtidos no Manual Aquático da OIE (OIE, 2003a). O protocolo para identificação e confirmação da iridovirose foi elaborado segundo Bondad-Rentaso et al. (2001) e Bower et al. (1994). O de bucefalose foi obtido em Garcia (2005).

Requisitos ao credenciamento de laboratórios pelo MAPA

Foram verificados os requisitos necessários ao reconhecimento pelo MAPA, do Laboratório de Diagnóstico e Patologia em Aquicultura (LADPAQ) pretendido pelo Programa Estadual de Sanidade Aquícola. Na legislação federal foram consultadas as Instruções Normativas n° 24 (Brasil, 2001) e n° 51 (Brasil, 2003a); os documentos para solicitação de credenciamento do laboratório à rede animal, estipulados pelo MAPA (MAPA, 2001); as Resoluções da Diretoria Colegiada (RDC) da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA): RDC n° 50 - 21/02/2002 (Brasil, 2002); RDC n° 189 - 18/07/2003 (Brasil, 2003b); RDC n° 245 - 15/09/2003 (Brasil, 2003c); RDC n° 302 -

13/10/2005 (Brasil, 2005a); RDC n° 306 – 07/12/2004 (Brasil, 2004); Resolução (CONAMA) n° 358 – 29/04/2005 (Brasil, 2005b). No âmbito estadual, o Projeto de Sanidade Aquícola do Estado de Santa Catarina (Santa Catarina, 2001) e a Portaria n° 021/02/SDA (Santa Catarina, 2002). No âmbito municipal, as normas referentes ao alvará sanitário (Pró-cidadão, 2005a) para estabelecimentos com atividades relacionadas a laboratórios de análises clínicas e o código de obras do município (Pró-cidadão, 2005b). As normas internacionais que regem os requisitos ao reconhecimento de um laboratório de ensaios, podem ser encontradas no Manual Aquático da OIE (2003a) e no Padrão Internacional 17025 (ISO/IEC, 1999).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Enfermidades de notificação obrigatória

São listadas, atualmente, onze enfermidades significantes de moluscos no Código Aquático (OIE, 2005a). Informações pertinentes a estas enfermidades são fornecidas no Manual Aquático (OIE, 2003a).

Os agentes patogênicos em potencial dos moluscos cultivados no litoral catarinense, sua distribuição geográfica e hospedeiros estão resumidos e listados na tabela 1, a partir de Bower et al. (1994; 2005), Bondad-Rentaso et al. (2001), APEC/FAO/NACA/SEMARNAP (2001), AFF (2002) e OIE (2003a).

Segundo a OIE (2003a), até que se conheça melhor a identidade, biologia e patologia dos protozoários considerados de notificação obrigatória (Tabela 1), sua presença em qualquer bivalve deve ser considerada potencialmente séria. Recomenda ainda, que os Laboratórios de Referência da OIE para estas enfermidades sejam consultados.

Análises moleculares filogenéticas forneceram informações que reorganizaram a lista de enfermidades do Código Aquático da OIE. A nova afiliação taxonômica de *Mikrocytos* (agora *Bonamia*) *roughley* (Carnegie, 2004), em função de sua íntima relação com *Bonamia*, resultou em redefinição das enfermidades bonamiose e microcitose.

Os patógenos a serem investigados, controlados e/ou erradicados, conforme indicação da Portaria nº 021/02/SDA, estão discriminados na tabela 2 (Bower et al., 1994; Bondad-Rentaso et al., 2001; AFF, 2002; Garcia, 2005).

Protocolos das enfermidades

O protocolo para o diagnóstico presuntivo de Enfermidade MSX (*Haplosporidium nelsoni*) e Enfermidade SSO (*H. costale*) envolve histologia clássica e PCR do DNA obtido do tecido de ostra. A confirmação da identificação dos patógenos ocorre por exames de hibridização *in situ* (OIE, 2003b; OIE, 2003c).

No diagnóstico presuntivo de Enfermidade de Aber (*Marteilia refringens*) e Enfermidade QX (*M. sydneyi*), o protocolo do Manual Aquático da OIE recomenda histologia clássica e exame citológico de “imprints” de tecidos. A confirmação da identificação dos patógenos requer exames de hibridização *in situ* de *Marteilia* spp. Outro teste é feito para determinar o polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição, obtidos pela reação em cadeia da polimerase (RFLP-PCR) para identificação de *Marteilia refringens* e *M. sydneyi*, além de discriminar *M. refringens* de *M. maurini*. Como não é fácil distinguir *M. maurini* de *M. refringens*, a detecção do parasita em mexilhões requer este exame de confirmação (OIE, 2003d).

TABELA 1 – Lista de patógenos de notificação obrigatória da OIE e do Programa de Sanidade Aquícola do Estado de Santa Catarina, indicando as enfermidades, hospedeiros e distribuição geográfica.

Patógeno	Enfermidade	Hospedeiros	Distribuição geográfica	Observação
<i>Haplosporidium</i> (=Minchinia) <i>nelsoni</i>	Haplosporidiose; MSX; Enfermidade da Baía Delaware.	<i>Crassostrea virginica</i> e <i>C. gigas</i> (mais resistente).	Estados Unidos, Canadá, França, Japão, Korea.	<ul style="list-style-type: none"> •<i>Haplosporidium tumefaciens</i> infecta <i>Mytilus californianus</i> (Estados Unidos). •<i>H.</i> (=Minchinia) <i>armoricanum</i> infecta <i>Ostrea edulis</i> (França e Holanda) e <i>O. angasi</i> (Austrália). •<i>Haplosporidium</i> sp infecta <i>C. gigas</i> (França). •<i>H. tapetis</i> em <i>Ruditapes decussatus</i> e <i>R. philippinarum</i> (França, Espanha, Portugal e Austrália).
<i>Haplosporidium</i> (=Minchinia) <i>costale</i>	Haplosporidiose, SSO.	<i>Crassostrea virginica</i>	Estados Unidos, Canadá, Austrália, Kuwait, Martinica e Holanda.	<ul style="list-style-type: none"> •<i>Marteilia maurini</i> parasita <i>Mytilus edulis</i> e <i>M. galloprovincialis</i> (França, Itália e Espanha). •<i>M. christenseni</i> infecta <i>Scrobicularia plana</i> (França). •<i>M. lengehi</i>: <i>Saccostrea cucullata</i> (Golfo Pérsico e Austrália).
<i>Marteilia refringens</i>	Enfermidade de Aber, Enfermidade da Glândula Digestiva, Marteiliose.	<i>Crassostrea gigas</i> , <i>C. virginica</i> , <i>Mytilus edulis</i> , <i>M. galloprovincialis</i> , <i>Ostrea edulis</i> , <i>O. puelchana</i> , <i>Tiostrea lutaria</i> (=chilensis), <i>Ceratoderma</i> (<i>Cardim</i>) <i>edule</i> .	Grécia, França, Itália, Marrocos, Portugal, Espanha.	<ul style="list-style-type: none"> •Outras <i>Marteilia</i> sp. infectam <i>Cardium edule</i>, <i>Tapes rhomboides</i> e <i>T. pullastra</i>, <i>Ensis minor</i> e <i>E. siliqua</i>, <i>Modiolus modiolus</i>, <i>Mytilus edulis</i>, <i>M. galloprovincialis</i> (Croácia), <i>Argopecten gibbus</i> (Florida), <i>Tridacna maxima</i> (Fiji).
<i>Marteilia sydneyi</i>	Enfermidade QX, Marteiliose.	<i>Ostrea conchaphila</i> ; <i>Saccostrea glomerata</i> (<i>commercialis</i>), possivelmente em <i>S. echinata</i> .	Austrália	<ul style="list-style-type: none"> •Em infecção experimental de juvenis de <i>Crassostrea gigas</i> com <i>M. mackini</i>: prevalência de 100%, juvenis desenvolveram a enfermidade e houve ocorrência de morte (animais com 18mm de comprimento) (Bower <i>et al.</i>, 2005).
<i>Mikrocytos mackini</i>	Microcitose, Enfermidade da Ilha Denman, Enfermidade da Microcélula.	<i>Crassostrea gigas</i> , <i>Ostrea edulis</i> , <i>O. conchaphila</i> (=lurica), experimentalmente, <i>C. virginica</i> e <i>S. glomerata</i> (<i>commercialis</i>).	Canadá, Estados Unidos, Austrália, Kuwait.	

Continuação Tabela 1

Patógeno	Enfermidade	Hospedeiros	Distribuição Geográfica	Observação
<i>Perkinsus marinus</i>	Enfermidade Dermo, Perkinsiose.	<i>Crassostrea virginica</i> , <i>Mercenaria mercenaria</i> , <i>Macoma mitchelli</i> , experimentalmente em <i>C. gigas</i> .	Estados Unidos, Golfo do México, Venezuela; Porto Rico, Cuba, Hawaii.	•Mais de 50 espécies de moluscos, como <i>Pinctada máxima</i> e <i>Arca</i> spp. são infectados por <i>Perkinsus</i> spp., sem patogenicidade aparente.
<i>P. olseni/ atlanticus</i>	Perkinsiose	<i>Haliotis ruber</i> , <i>H. cyclobates</i> , <i>H. scalaris</i> , <i>H. laevigata</i> , <i>Anadara trapezia</i> , <i>Austrovenus stutchburyi</i> e <i>Ruditapes philippinarum</i> , <i>R. decussatus</i> , <i>Venerupis</i> spp..	Sul da Austrália, Itália, Korea, Kuwait, Nova Zelândia, Japão, Espanha, Portugal, França, Vanuata, Holanda.	• <i>P. chesapeakei</i> (=andrewsi) infecta <i>Mya arenaria</i> e <i>Macoma balthica</i> (Estados Unidos). • <i>P. qugwadi</i> infecta <i>Patinopecten yessoensis</i> (Canadá).

Como teste presuntivo para identificação da Microcitose (*Mikrocytos mackini*), o protocolo da OIE usa o exame citológico de “imprints” de tecidos. Os exames de confirmação da enfermidade requerem histologia clássica e procedimentos para análise por microscopia eletrônica de transmissão (OIE, 2003e).

Há quatro testes presuntivos para detecção de *Perkinsus* spp. A histologia clássica não é indicada em infecções leves, porém associada à cultura em meio líquido de tioglicolato torna-se eficiente na identificação de *Perkinsus* spp.. A microscopia eletrônica de transmissão não é adequada à identificação, pois a ultra-estrutura não é exclusiva para esta espécie. O teste de PCR identifica a presença do parasito, mas não pode ser usado para distinguir as espécies. Para o diagnóstico de confirmação da identificação de *Perkinsus* spp., recomenda-se a análise da seqüência da região ITS. Os produtos do PCR, neste caso podem ser seqüenciados para a identificação das espécies (OIE, 2003f).

O diagnóstico presuntivo da iridovirose é feito por observação do comportamento das larvas nas incubadoras e por histologia clássica. A confirmação da identificação é feita pela associação entre a histologia clássica e os procedimentos de microscopia eletrônica de transmissão (Bower et al., 1994; Bondad-Rentaso et al., 2001).

O protocolo para o diagnóstico presuntivo da Bucefalose (*Bucephalus* sp.), recomenda observação macroscópica do manto dos moluscos. A confirmação da enfermidade utiliza histologia clássica (Garcia, 2005).

Requisitos ao credenciamento de laboratórios pelo MAPA

Um laboratório de diagnóstico de enfermidades em animais aquáticos para ser reconhecido pelo MAPA, deve se filiar à rede de laboratórios da área animal, deste Ministério. Etapas prévias devem ser efetuadas antes do pedido de filiação ao MAPA. Dentre elas, está a obtenção do alvará sanitário para estabelecimentos que exerçam atividades relacionadas com laboratórios de análises clínicas. Como não há legislação específica para os laboratórios de análises clínicas em patologia animal, deve-se considerar o tipo de análise laboratorial a ser efetuado. No caso das enfermidades em moluscos, os testes preconizados nos protocolos pesquisados são exames macroscópicos, histologia clássica, exames de “imprints” de tecidos, cultura de parasita em meio específico, hibridização *in situ*, PCR, RFLP-PCR e microscopia eletrônica de transmissão. Neste caso, é necessário cumprir os mesmos requisitos exigidos aos laboratórios de análises clínicas em saúde humana.

Nos municípios com vigilância sanitária estruturada, a ANVISA delegou poder à entidade local para fiscalizar e conceder o alvará sanitário. A concessão deste está condicionada ao cumprimento da RDC nº 50 - 21/02/2002 (Brasil, 2002), que regulamenta o planejamento, programação, elaboração e avaliação de projetos físicos de estabelecimentos assistenciais de saúde. Também deve atender a RDC nº 189 - 18/07/2003 (Brasil, 2003a), que determina os procedimentos de análise, avaliação e aprovação dos projetos físicos de estabelecimentos de saúde e altera o Regulamento Técnico aprovado pela RDC nº 50. Neste caso, obras de construção ou reforma do laboratório, deverão seguir as normas previstas no Código de Obras e Edificações do Município (Pró-Cidadão, 2005b). Além do cumprimento desta legislação, há o fornecimento dos documentos exigidos pela Secretaria Municipal de Saúde (Pró-

Cidadão, 2005). Dentre eles, merecem atenção o Manual de Boas Práticas (MBP) e o Termo de Responsabilidade Técnica (TRT).

O Manual de Boas Práticas ou Manual de Qualidade é formado por um conjunto de Planos Operacionais Padronizados (POPs), que devem explicitar os requisitos da gerência relativos: à organização; ao sistema de qualidade; ao controle de documentos; à análise crítica dos pedidos, propostas e contratos; à subcontratação de ensaios e calibrações; à aquisição de serviços e suprimentos; ao atendimento ao cliente; à solução de reclamações; ao controle de ensaios e/ou calibrações não-conformes; às ações corretivas às não conformidades; às ações corretivas; às ações preventivas; ao controle de registros; às auditorias internas; às análises críticas pela gerência. Os POPs devem explicitar também os requisitos técnicos do laboratório como: pessoal; as acomodações e condições ambientais do laboratório; os métodos de ensaio e calibração e validação de métodos; os equipamentos; a rastreabilidade de medição; as amostragens; o manuseio de itens de ensaio e calibração através das Instruções de Trabalho (IT); a garantia de qualidade de resultados de ensaio e calibração; a apresentação dos resultados (ISO/IEC, 1999).

Sendo assim, a concessão do alvará requer também o cumprimento da RDC nº 245 - 15/09/2003. Esta resolução aprovou o Manual Brasileiro de Acreditação de Organizações Prestadoras de Serviços de Laboratório Clínico – MBAOPSLC (Brasil, 2003b). Determinou, também, que a Organização Nacional de Acreditação - ONA e as Instituições Acreditoras por ela credenciadas utilizem apenas os padrões e níveis definidos pelo MBAOPSLC. Este manual, de fácil acesso e em português, se baseia na norma internacional ISO/IEC 17025, cuja adoção é recomendada pela OIE no Manual Aquático (OIE, 2003a). Esta norma estabelece aos laboratórios a serem acreditados, os

critérios à demonstração de sua competência técnica, da existência de sistema de qualidade efetivo e de sua capacidade em produzir resultados tecnicamente válidos (Valle e Bicho, 2001). Neste caso, o Manual de Boas Práticas deve seguir rigorosamente o formato e as orientações do MBAOPSLC.

O laboratório deve seguir também a RDC nº 302 – 13/10/2005 que dispõe sobre o Regulamento Técnico para funcionamento de Laboratórios Clínicos, em função da necessidade de normalizar o funcionamento destas instituições (Brasil, 2005a). Outra resolução importante é a RDC nº 306 – 07/12/2004, que dispõe sobre o Regulamento Técnico para o gerenciamento de resíduos de serviços de saúde humana ou animal, requisito exigido na RDC nº 50. Esta norma determina o emprego de medidas técnico-administrativas, considerando os princípios de biossegurança na prevenção de acidentes, preservação da saúde pública e do meio ambiente. Estabelece competência à Vigilância Sanitária Estadual e Municipal, com apoio dos Órgãos de Meio Ambiente, de Limpeza Urbana para divulgar, orientar e fiscalizar o cumprimento desta Resolução (Brasil, 2004). O CONAMA também regulamentou matéria neste sentido, por meio da Resolução nº 358 – 29/04/2005. Esta norma dispõe sobre o tratamento e a disposição final dos resíduos dos serviços de saúde (Brasil, 2005b).

A biossegurança em laboratórios representa um conjunto de práticas, equipamentos e instalações voltadas ao controle dos riscos inerentes às suas atividades. O intuito é preservar a saúde humana, o meio ambiente e a qualidade de seus resultados (Brasil, 2002). Considerando os protocolos de enfermidades supracitados e a lista de enfermidades da Portaria nº 021/02/SDA, o Nível de Biossegurança (NB) 2 seria adequado ao laboratório de patologia em aqüicultura. Informações acerca dos requisitos necessários ao trabalho seguro em ambiente de contenção, serão encontradas nos

manuais: “Diretrizes Gerais para o Trabalho em Contenção com Material Biológico” e “Biossegurança em Laboratórios Biomédicos e de Microbiologia” (Ministério da Saúde, 2004a; 2004b).

O município exige um Responsável Técnico (TRT) como requisito ao alvará sanitário e o MAPA, ao credenciamento. O Responsável Técnico designado pelo laboratório é um profissional de nível superior, registrado no respectivo Conselho de Classe. O RT responderá pelas operações técnicas efetuadas no laboratório, pelas ações e atividades do credenciamento. A nomeação e a substituição do RT ou seu substituto deverá ser aprovada pela CLA. Este RT pode ser um biólogo, bioquímico, engenheiro de aquicultura ou médico veterinário, pois são profissionais habilitados legalmente a realizar diagnósticos laboratoriais.

Cumprindo todos os requisitos anteriores, os procedimentos de solicitação de acreditação ao MAPA devem seguir as diretrizes da Instrução Normativa nº 24 - 07/07/2001 (Brasil, 2001). Esta Instrução da Secretaria de Defesa Agropecuária do MAPA trata das “Normas Gerais de Credenciamento e Reconhecimento de Laboratórios da Área Animal e Vegetal”. Deve seguir também a Instrução Normativa nº 51 – 27/06/2003, que é uma atualização das normas gerais contidas na Instrução Normativa nº 24 (Brasil, 2001). Ambas estabelecem os requisitos de qualidade ao laboratório para que seja credenciado ou reconhecido pela Coordenação de Laboratório Animal (CLA) do Departamento de Defesa Animal (DDA) do MAPA. Em linhas gerais, o reconhecimento se fundamenta no Sistema da Qualidade, excelência técnica, norma específica e o cumprimento da legislação vigente e os atos complementares a serem baixados (Brasil, 2001; 2003a).

O processo de credenciamento inicia mediante solicitação formal à CLA ou ao representante legal, através dos formulários de diagnóstico 1, 2 e 3 (MAPA, 2001). Devem ser anexados a estes formulários os seguintes documentos: solicitação de credenciamento; formulário de cadastro nacional de laboratório animal; planta baixa ou croqui do laboratório com a localização dos equipamentos; cadastro nacional de pessoa jurídica-CNPJ (cópia, dentro da validade); relação da equipe técnica do laboratório com nome, função e carga horária; *curriculum vitae* resumido dentro da atividade a ser credenciada; carteira de habilitação profissional (cópia).

Outros documentos deverão ser anexados ao pedido, como: manual da qualidade do laboratório ou manual de boas práticas (cópia controlada); formulários de registros, manutenção, verificação e calibração de equipamentos e padrões; formulários de registros de reagentes, padrões e soluções; formulários de registros de dados brutos de ensaios; alvará de funcionamento atualizado (cópia autenticada); declaração de funcionamento emitida por autoridade maior, no caso de instituição de ensino e pesquisa; procedimentos para manuseio de amostras para ensaio; manual de procedimentos de aplicação e uso de equipamentos de proteção individual e coletivo; manual de procedimentos de descarte de produtos químicos e/ou biológicos (MAPA, 2001). Ou seja, deverá ter entrado em conformidade com todas as RDCs citadas anteriormente.

O laboratório credenciado deverá disponibilizar e atualizar à equipe os Manuais de Metodologia, da Política de Qualidade e o de Procedimentos Técnicos, ou documentação equivalente, discriminando as ações e atividades do laboratório.

Concretizado o processo, o laboratório credenciado fará parte do Cadastro Nacional de Laboratórios (CNL) da Coordenação de Laboratório Animal (CLA) do

Departamento de Defesa Animal (DDA). O reconhecimento atende as exigências contidas no Decreto n.º 24.548 - 3/07/1934 que regulamenta o Serviço de Defesa Sanitária Animal Federal (SDFEA). Tal serviço determina medidas profiláticas para preservar o País da invasão de zoonoses exóticas, combater as moléstias infecto-contagiosas e parasitárias existentes (Brasil, 1934). Estará em conformidade com o Decreto n.º 3527 – 15/12/1998, que regulamenta e padroniza a Política de Defesa Sanitária Animal no Estado (Santa Catarina, 1998). Cumpre também, com a Portaria n.º 021/02/SDA – 01/10/2002, composta pelas normas técnicas para execução do Programa de Sanidade Aquícola estadual (Santa Catarina, 2002). Atende, também, ao disposto no Decreto federal n.º 5.564 – 19/10/2005 (Brasil, 2005c), que Institui o Comitê Nacional de Controle Higiênico-Sanitário de Moluscos Bivalves – CNCMB. Este Comitê irá estabelecer e avaliar os requisitos necessários para garantir a qualidade higiênico-sanitária dos moluscos bivalves. Visa, também, proteger a saúde da população e criar mecanismos seguros ao comércio nacional e internacional de moluscos. O CNCMB irá elaborar, propor a implementação e avaliar o Programa Nacional de Controle Higiênico-Sanitário de Moluscos Bivalves, contemplando todas as etapas da cadeia produtiva (Brasil, 2005b).

CONCLUSÃO

A Portaria n.º 021/02/SDA contempla alguns dos patógenos com potencial para infectar os moluscos cultivados no litoral catarinense. No Código Aquático da OIE há outros como *Haplosporidium* sp, *Marteilia* sp e *Perkinsus* sp., considerados agentes de notificação obrigatória da OIE. Estes patógenos são responsáveis por sérios danos em

ostras, mexilhões e bivalves arenícolas (venerídeos) em muitos países e necessitam ser melhor pesquisados.

A infra-estrutura atual do LADPAQ e a capacidade técnica permitem realizar: histologia clássica, exame citológico de “imprints” de tecidos e cultura em tioglicolato. Parcerias entre o LADPAQ (CCA-UFSC) e o Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática e Imunoquímica (CCB-UFSC) permitiria a execução dos testes de hibridização *in situ*, PCR e RFLP-PCR. Atualmente, não há infra-estrutura para executar os testes de microscopia eletrônica.

Por não haver legislação específica para os laboratórios de diagnóstico em animais, devem ser cumpridos os requisitos das legislações pertinentes aos laboratórios de análises clínicas em saúde humana. O credenciamento pelo MAPA requer o cumprimento: das Instruções Normativas nº 24 e nº 51; RDC nº 50 (21/02/2002); RDC nº 189 (18/07/2003); RDC nº 245 (15/09/2003); RDC nº 302 (13/10/2005); RDC nº 306 (07/12/2004); Resolução nº 358 (29/04/2005); concessão do alvará sanitário; código de obras do município; Padrão Internacional ISO/IEC 17025.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Maria Luiza Toschi Maciel, do Ministério da Agricultura/SC e à Ilona Joerdens Marques, do Laboratório da CIDASC- Joinville, pelas informações preciosas quanto à legislação e requisitos ao credenciamento de laboratórios pelo MAPA. Este trabalho teve financiamento da CAPES, através de Bolsa de Mestrado.

Referência Bibliográfica:

AFF. Import risk analysis (IRA) of non-viable bivalve molluscs. Canberra: Biosecurity Australia, 2002. 75 p. Disponível em: <http://www.affa.gov.au/corporate_docs/publications/pdf/market_access/biosecurity/anima

Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 2002. **Resolução RDC nº. 50, de 21 de fevereiro de 2002**. D.O.U. - Diário Oficial da União; Poder Executivo, Brasília, DF, 21 de fevereiro de 2002.

Brasil. Ministério da Agricultura Pesca e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. 2003a. **Instrução Normativa nº 51, de 27 de junho de 2003**. D.O.U. - Diário Oficial da União; Poder Executivo, Brasília, DF, 30 de junho de 2003.

Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 2003b. **Resolução RDC nº. 189, de 18 de julho de 2003**. D.O.U. - Diário Oficial da União; Poder Executivo, Brasília, DF, 21 de julho de 2003.

Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 2003c. **RDC nº 245, de 15 de setembro de 2003**. D.O.U. - Diário Oficial da União; Poder Executivo, Brasília, DF, 16 de setembro de 2003.

Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 2004. **RDC nº 306, de 07 de dezembro de 2004**. D.O.U. - Diário Oficial da União; Poder Executivo, Brasília, DF, de 10 de dezembro de 2004.

Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 2005a. **RDC nº 302, de 13 de outubro de 2005**. D.O.U. - Diário Oficial da União; Poder Executivo, Brasília, DF, 14 de outubro de 2005.

Brasil. Conselho Nacional do Meio Ambiente . 2005b. **Resolução nº_358, de 29 de abril de 2005**. D.O.U. - Diário Oficial da União; Poder Executivo, Brasília, DF, 04 de maio de 2005.

Brasil. Presidência de República. 1934. **Decreto n.º 24.548, de 3 de julho de 1934**. D.O.U. - Diário Oficial da União; Poder Executivo, Rio de Janeiro, 3 de julho de 1934.

Brasil. Presidência de República. 2005c. **Decreto nº 5.564, de 19 de outubro de 2005.** D.O.U. - Diário Oficial da União, Poder Executivo, Brasília, DF, 20 de outubro de 2005.

Carnegie, R.B; Cochenec-Laureau, N. 2004. Microcell parasites of oysters: Recent insights and future trends. **Aquatic Living Resources**, 17: 519–528.

Elston, R.A. 1990. **Mollusc diseases. Guide for the shellfish farmer.** University of Washington Press, Seattle, USA, 73 p.

FAO. 2004. **El estado mundial de la pesca y la acuicultura.** FAO, Rome, Italy, 174 pp. Disponível em <http://www.fao.org/documents/show_cdr.asp?url_file=/docrep/007/y5600s/y5600s00.tm>. Acesso em 07 março de 2005.

FAO/NACA. 2001. Manual of Procedures for the Implementation of the Asia Regional Technical Guidelines on Health Management for the Responsible Movement of Live Aquatic Animals. **FAO Fisheries Technical Paper. No. 402**, Suppl. 1. FAO, Rome, Italy, 106 pp.

Garcia, P. 2001. **Obtenção de sementes do mexilhão *Perna perna* (Linné, 1758) em Florianópolis e a sustentabilidade do cultivo.** Monografia de Especializa

Garcia, P. 2005. **Enfermidades de notificação obrigatória em moluscos marinhos: protocolos de identificação e viabilidade de execução.** Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil, 160pp.

ISO/IEC. 1999. **ISO/IEC 17025: General requirements for the competence of testing and calibration laboratories.** 1st ed. CASCO, Geneva, Switzerland, 20 pp.

MAPA. 2001. **Formulários para solicitação de credenciamento na área de diagnósticos e alimentos.** Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/>>. Acesso em 16 de fevereiro de 2005.

Ministérios da Saúde. 2004a. **Diretrizes Gerais para o Trabalho em Contenção com Material Biológico**. Brasília, DF, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, 60 p. Disponível em: <http://dtr2001.saude.gov.br/editora/produtos/livros/genero/amb_saude.htm>. Acesso em 29 de julho de 2005.

Ministérios da Saúde. 2004b. **Biossegurança em Laboratórios Biomédicos e de Microbiologia**. Brasília, DF, Departamento de Vigilância Epidemiológica, 3ª ed. 290p. Disponível em: <<http://dtr2001.saude.gov.br/editora/produtos/livros/gênero/laboratório.htm>>. Acesso em 29 de julho de 2005.

OIE. 2003a. **Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals**. Disponível em: <http://www.oie.int/esp/normes/fmanual/A_summry.htm>. Acesso em 16 de fevereiro de 2005.

OIE. 2003b. **MSX disease: *Haplosporidium nelsoni***. Disponível em: <http://www.oie.int/eng/normes/fmanual/A_00038.htm>. Acesso em 05 de fevereiro de 2005.

OIE. 2003c. **SSO disease: *Haplosporidium costale***. Disponível em: <http://www.oie.int/eng/normes/fmanual/A_00042.htm>. Acesso em 05 de fevereiro de 2005.

OIE. 2003d. **Marteiliosis: *Marteilia refringens* and *M. sydneyi***. Disponível em: <http://www.oie.int/eng/normes/fmanual/A_00039.htm>. Acesso em 16 de fevereiro de 2005.

OIE. 2003e. **Mikrocytosis: *Mikrocytos mackini***. Disponível em: <http://www.oie.int/eng/normes/fmanual/A_00040.htm>. Acesso em 16 de fevereiro de 2005.

OIE. 2003f. **Perkinsosis: *Perkinsus marinus* and *P. olseni/atlanticus***. Disponível em: <http://www.oie.int/eng/normes/fmanual/A_00041.htm>. Acesso em 16 de fevereiro de 2005.

OIE. 2004. **72ª Sessão Geral: Informe Final 2004**. Disponível em: <http://www.oie.int/downld/SG/2004/E_RESO_2004_WP.pdf>. Acesso em 05 de fevereiro de 2005.

OIE. 2005a. **Código Sanitario para los Animales Acuáticos**. Disponível em <http://www.oie.int/esp/normes/fcode/E_summry.htm>. Acesso em 16 setembro de 2005.

OIE. 2005b. **Situación zoonositaria plurianual**. Disponível em: <<http://www.oie.int/hs2/report.asp?lang=en>>. Acesso em 20 de outubro de 2005.

Oliveira Neto, F.M. 2005. **Diagnóstico do cultivo de moluscos em Santa Catarina**. EPAGRI, Florianópolis, Brasil, 67 pp.

OMC. 1994. **Acuerdo sobre la Aplicación de Medidas Sanitarias y Fitosanitarias**. Disponível em <http://www.wto.org/spanish/docs_s/legal_s/legal_s.htm>. Acesso em 01 de março de 2005.

Pró-cidadão. Florianópolis. 2005a. **Saneamento e Saúde: Laboratório de Análises Clínicas (Saúde)**. Disponível em: <http://www.pmf.sc.gov.br/procidadao/index.php?link=mostra_servico&codigoServico=353>. Acesso em 27 de julho de 2005.

Pró-cidadão. Florianópolis. 2005b. **Código de Obras e Edificações**. Disponível em: <http://www.pmf.sc.gov.br/?link=codigo_obras&sublink=cap16>. Acesso em 25 de julho de 2005.

Santa Catarina. Assembléia Legislativa 1998. **Decreto nº 3527, de 15 de dezembro de 1998**. Disponível em: <<http://www.agricultura.sc.gov.br/internas/lei.php?id=7>>. Acesso em 07 de março de 2005.

Santa Catarina. 2001. **Proposta para o programa de defesa sanitária para animais aquáticos no Estado de Santa Catarina**. Secretaria de estado do desenvolvimento rural e da agricultura, Florianópolis, Brasil, 103 pp.

Santa Catarina. Secretaria de Estado do Desenvolvimento Rural e da Agricultura. 2002. **Portaria nº 021/02/SDA, de 01 de outubro de 2002.** Disponível em: <<http://www.agricultura.sc.gov.br/internas/portaria.php?id=2>>. Acesso em 02 de março de 2005.

Valle, B.; Bicho, G.G. 2001. **ISO/IEC 17025: A Nova Norma para Laboratórios de Ensaio e Calibração.** Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/divulga/artigos/metrologia.htm>>. Acesso em 02 de março de 2005.

**PROTOCOLO DE IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE BUCEFALOSE
(ENFERMIDADE LARANJA) EM MEXILHÕES *Perna perna***

Patrícia GARCIA* ^{1,2} e Aimê Rachel Magenta MAGALHÃES ^{1,2}

RESUMO

Este trabalho propõe um protocolo de identificação e quantificação da bucefalose em *Perna perna*, através da histologia clássica e análise estereológica. De 50 mexilhões entre 30 e 70mm, obtidos em cordas do cultivo experimental da UFSC, na Praia de Sambaqui - Florianópolis/SC, foram identificados 6 animais parasitados por *Bucephalus* sp., com prevalência de 12%. Secções transversais dos moluscos foram fixadas em Davidson, processadas por histologia clássica, cortadas (3µm) e coradas com HHE. O volume fracionário do tecido do parasita (TP), do hospedeiro (TH) e espaços vazios (EV) foi quantificado por estereologia, com a grátula de Weibel acoplada ao microscópio óptico. A objetiva de 10X foi mais eficiente do que a de 40X, na análise microscópica das secções. Metade dos animais apresentou grau moderado (5-50%) de parasitismo e, a outra metade, grau pesado (>50%). Não foram encontrados animais com parasitismo leve (<5% da secção com tecidos do parasita).

Palavras – chave: *Perna perna*; protocolo; *Bucephalus* sp, histopatologia; estereologia.

**PROTOCOL OF IDENTIFICATION AND QUANTIFICATION OF
BUCEPHALOSIS (ORANGE DISEASE) IN MUSSEL *Perna perna***

ABSTRACT

This study proposes a protocol for the identification and quantification of bucephalosis in *Perna perna*, by classical histology and stereological methods. Fifty animals, between 30 and 70mm, from experimental mussel culture strings of the UFSC, at Sambaqui Beach - Florianópolis /SC, were identified six animals infected with *Bucephalus* sp., with 12% of prevalence. Transverse standard section of the molluscs were fixed in Davidson's solution, processed through classical histology, cut (3µm) and stained with HHE. The fractional volume of the parasite tissue (PT), host tissue (HT)

¹ Laboratório de Diagnóstico e Patologia em Aqüicultura, CCA, UFSC, Florianópolis, SC, Brasil.

² Endereço/Address: Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Aqüicultura - Rodovia Ademar Gonzaga, 1346, Itacorubi, CEP: 88034-001, Florianópolis, SC, Brasil. E-mail: patricigarcia@gmail.com
Bolsista da Capes *

and empty spaces (EV) were quantified by Weibel graticule attached to a microscope. The objective of 10X was more efficient than that of 40X, for the stereological analysis of the sections. Half of the animals presented a moderate rate of parasite infections (5-50%), while the other half, presented greater rates (>50%). Animals with light infections were not found (<5% on the section with parasite tissue).

Key words: *Perna perna*; protocol; *Bucephalus* sp.; histopathology; stereology

INTRODUÇÃO

A produção de moluscos é uma atividade econômica recente e em plena expansão no estado de Santa Catarina, considerado o maior produtor destes animais marinhos no Brasil (MAGALHÃES, 1998; POLI, 1998). Em 2004 foram produzidas no litoral catarinense, 9.800,8 toneladas de mexilhão e 2.512,7 toneladas de ostras (OLIVEIRA NETO, 2005). Estima-se um incremento de 30% na produção destes moluscos em 2005.

Em muitos países a produção de moluscos marinhos é afetada por diversas enfermidades, causando impacto severo na economia e gerando um ponto de estrangulamento do crescimento e sustentabilidade desta atividade (OIE, 2003). A introdução do agente patogênico ocorre por transferências de moluscos vivos (ELSTON, 1990; BOWER *et al.*, 1994; WALKER e SUBASINGHE, 2000). Segundo a OIE (2003), esta foi a principal causa de surtos de enfermidades epizooticas, podendo resultar num decréscimo significativo das populações de bivalves (BOWER e FIGUERAS, 1989). São registrados em diversos países mortalidade massiva em bivalves, causada por microorganismos (GRIZEL *et al.*, 1988; CACERES-MARTÍNEZ e FIGUERAS, 1995; BURRESON e CALVO, 1996), bem como efeitos deletérios e mortalidade imposta por metazoários parasitas (ABREU, 1965; BAYNE, 1978; CHENG *et al.*, 1983; TURNER, 1985; ELSTON, 1990; BLATEAU *et al.*, 1992; JONSSON e ANDRÉ, 1992; FUENTES *et al.*, 1998; SILVA *et al.*, 2002; KIM e POWELL, 2004).

Em mexilhões, a ocorrência de patógenos causadores de enfermidades é pouco documentada (SILVA *et al.*, 2002), o que não significa uma saúde superior a de outros moluscos (FIGUERAS e VILLALBA, 1988). Provavelmente isto advém da falta de informações em função do menor valor econômico, se comparados às ostras (BOWER e FIGUERAS, 1989) e da carência de pesquisas relativas à sanidade dos mexilhões.

Os trematódeos digenéticos são metazoários de interesse na patologia de moluscos (KINNE, 1983). Compreendem mais de 40.000 espécies, com o ciclo vital mais complexo não só dentre os platelmintos, mas de todo o reino animal (CHENG, 1978).

A bucefalose ou “enfermidade laranja”, denominada por Cole, *apud* UMIJI *et al.* (1976), é causada pelo trematódeo *Bucephalus*. Caracteriza-se macroscopicamente pela existência de estruturas filamentosas de cor laranja brilhante no manto, em função da pigmentação dos esporocistos do parasita. Em infestações elevadas o manto adquire uma tonalidade laranja intenso, tornando impossível a identificação macroscópica e, muitas vezes, microscópica do sexo do hospedeiro. O parasitismo eleva o consumo de nutrientes como glicogênio (infestação inicial) e lipídeos (infestação elevada) e reduz as reservas do hospedeiro (MAGALHÃES, 1998). A deficiência nutricional inviabiliza a gametogênese, emacia seu corpo e provavelmente destrói seus tecidos pela saída das cercárias, com possibilidade de morte aos mexilhões (LAUCKNER, 1983; MAGALHÃES, 1998).

A identificação das cercárias, presentes no bivalve, até gênero é relativamente fácil, em função das características da larva (CHENG, 1978). Porém, a identificação da espécie é mais difícil em função do complexo ciclo de vida. O adulto de *Bucephalus* sp. elimina ovos que saem com as fezes do hospedeiro definitivo, um peixe que pode ser *Urophycis brasiliensis* (abrótea), *Menticirrhus americanus* (papa-terra), *M. litoralis* e *Centropomus undecimalis* (robalo-flexa) (AMATO, 1982; PEREIRA JR, 1996; ROBALDO, 1995). Destes eclodem larvas com cílios plumulados (CHENG, 1978), denominadas miracídeos, que penetram no primeiro hospedeiro intermediário, moluscos como *Perna perna* (UMIJI *et al.*, 1976). Aí se transformam em esporocistos, sacos ovais com células germinais (CHENG, 1978). Neste estágio, os esporocistos de tamanhos irregulares se ramificam e penetram em cavidades corpóreas como as dos vasos sangüíneos, intestino, glândula digestiva, câmaras branquiais, gonodutos e folículos gonádicos, causando castração parasitária (ELSTON, 1990; MAGALHÃES, 1998). Dentro dos esporocistos podem ser encontrados diversos estágios de cercárias (CHENG, 1978). As cercárias maduras rompem os tecidos do primeiro hospedeiro intermediário, um molusco e, na água, penetram no segundo hospedeiro intermediário, um peixe como *Micropogonias furnier* (corvina), transformando-se em metacercárias. *Bucephalus* sp. pode chegar ao hospedeiro definitivo, um peixe carnívoro, quando este se alimenta do hospedeiro intermediário com metacercárias ou do mexilhão com cercárias (UMIJI *et al.*, 1976; CHENG, 1978; PEREIRA JR. *et al.*, 1996). Esporocistos e cercárias de *Bucephalus* sp. ocorrem nos moluscos *Perna perna* (LUNETTA, 1969), *Mytilus edulis platensis* (Morris, *apud* PEREIRA JR. *et al.*, 1996), *Crassostrea virginica* (WINSTEAD *et al.*, 2004), *C. madrasensis* (KUMAR, 2000), *Ostrea edulis* (PRINCEP *et al.*, 1996), *Pinctada*

radiata (KHAMDAN, 1998), *Dreissena polymorpha* (LAURELLE *et al.*, 2002), *Donax variabilis* (Hopkins, *apud* PEREIRA JR. *et al.*, 1996), *Paphia aurea* (POLENTA E FROGLIA, 1997), *Anomalocardia brasiliana* (ARAÚJO, 2001), *Eurynia iris* (OLSEN, 1974), *Pecten fumatus* e *Chlamys (Mimachlamys) asperrima* (HEASMAN *et al.*, 1996) e *Perumytilus* sp. (LASIAK, 1992).

No gênero *Bucephalus* são conhecidas as espécies: *Bucephalus papillosus* (OLSEN, 1974), *B. brevitentaculatus*, *B. cynoscion*, *B. gorgon*, *B. kathetostomae*, *B. priacanthi*, *B. scorpaenae* (AMATO, 1982), *B. cuculus*, *B. elegans*, *B. heterotentaculatus*, *B. introversus*, *B. varicus* (ITIS, 2005), dentre outras.

Adultos de *Bucephalus varicus*, de ampla distribuição geográfica, são facilmente encontrados em peixes no litoral do Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Rio de Janeiro (PEREIRA JR. *et al.*, 1996; CHAVES, 1998; ALVES *et al.*, 2004). Há registro de seus esporocistos e cercárias em mitilídeos no litoral da Argentina (Morris, *apud* PEREIRA JR. *et al.*, 1996).

Na África do Sul, 3[181.c48 4520 10.98 101.5814 493.4769 Tm5 1080.0012 Tc 0.

Embora de fácil identificação macroscópica, nos estágios iniciais da bucefalose não é possível identificar a presença dos esporocistos de *Bucephalus* sp. em cerca de 8% da amostra de mexilhões (MAGALHÃES, 1998). Portanto, recomenda-se a histologia clássica (OIE, 2003), associada à estereologia por classificar o grau de infestação nos mexilhões, evitando equívocos da observação macroscópica e estereoscópica (ARAÚJO, 1993; MAGALHÃES, 1998; SILVA *et al.*, 2002).

Este trabalho teve por objetivo propor o protocolo de identificação e de quantificação da bucefalose em *P. perna*, através da histologia clássica e análise estereológica. O principal intuito é contribuir com o diagnóstico da bucefalose, parte do programa estadual de sanidade para moluscos marinhos cultivados no litoral catarinense.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Os mexilhões *Perna perna* Linné, 1758 (Bivalvia: Mytilidae) deste trabalho, foram provenientes do cultivo experimental do Laboratório de Moluscos Marinhos (LMM) da Universidade Federal de Santa Catarina, localizado na Praia de Sambaqui (27°29' S e 48°33' W), município de Florianópolis/SC.

Em agosto de 2005, 50 mexilhões cultivados, de 3 a 7 cm de comprimento, foram aleatoriamente selecionados.

*Prevalência de **Bucephalus** sp.*

Após seccionar o músculo adutor posterior e abrir as valvas, procedeu-se o exame macroscópico das partes moles com o intuito de identificar a presença do trematódeo *Bucephalus* sp.. A prevalência do parasita em *P. perna* foi estimada pelo cálculo percentual dos animais infestados através de observação macroscópica em relação ao número total de animais amostrados (MAGALHÃES, 1998; SILVA, 1999; SILVA *et al.*, 2002).

Análise histopatológica

Com auxílio de um escalpelo, o corpo de cada mexilhão parasitado foi cuidadosamente separado de sua respectiva concha para efetuar cortes transversais em diagonal, da massa visceral. Estas seções incluíam brânquias, manto, intestino e glândula digestiva, conforme recomendação da OIE (2003) e HOWARD *et al.* (2004). As

peças foram fixadas em solução de Davidson marinho por 24-48h (MAGALHÃES, 1998; OIE, 2003) e posteriormente transferidas para álcool 70° (MAGALHÃES, 1998; SABRY, 2003).

O material foi submetido aos procedimentos histológicos clássicos de desidratação (álcool 70°, 90° e 100° - com dois banhos cada), diafanização em 2 banhos cada de xilol e inclusão em parafina. Cortes de 3µm de espessura (micrótomo CUT 4055 - Olympus) foram corados com hematoxilina de Harris e eosina aquosa 1% - HHE (BEÇAK e PAULETTE, 1976; MAGALHÃES, 1998; HOWARD *et al.*, 2004).

Intensidade da infestação

Foi determinada quantitativamente pela análise estereológica, através do uso da gráticula de Weibel acoplada ao microscópio óptico (LOWE e MOORE, 1985; MAGALHÃES, 1998; SILVA, 1999; SILVA *et al.*, 2002). A análise foi feita pela contagem dos constituintes tissulares do hospedeiro (TH), do parasita (TP) e dos espaços vazios (EV) subpostos a cada um dos 42 pontos presentes na gráticula. A contagem foi realizada em duas áreas de cada animal. Em cada uma, cinco campos escolhidos aleatoriamente e não sobrepostos foram mensurados (42 x 2 x 5), totalizando 420 pontos no máximo, por corte, por animal. As contagens foram realizadas em microscópio óptico (Olympus CX 31), utilizando as objetivas de 10x e 40x. A fração do volume de cada item foi calculada segundo fórmula de LOWE e MOORE (1985).

A intensidade da infestação foi expressa em porcentagem de TP encontrado no manto do mexilhão. Os animais foram classificados em diferentes graus: leve (L) <5% de TP; moderado (M) 5-50 % e pesado (P) >50%, adaptado de MAGALHÃES (1998).

A comparação entre as objetivas foi realizada pelo teste t de Student, utilizando o procedimento de permutação implementado no pacote computacional SAS (2002). Tal procedimento permite comparar as médias utilizando a real distribuição dos dados, evitando o viés produzido pela falta de normalidade.

RESULTADOS e DISCUSSÃO

A prevalência do parasita *Bucephalus* sp. em *P. perna*, no presente trabalho, foi relativamente alta: 12% (n=50) em animais coletados em agosto de 2005.

Embora a prevalência desta patologia tenha oscilado, nos diversos locais amostrados do litoral catarinense, de <1% a 49% (CASAS, 1986; GARCIA, 1990; SILVA *et al.*, 1996; MAGALHÃES, 1998; MARENZI, *et al.*, 1998; MAGALHÃES, 1999; SILVA,

1999; MAGALHÃES *et al.*, 2000; SILVA *et al.*, 2002), espera-se uma incidência maior do parasita de junho a setembro. MAGALHÃES (1998), pesquisando o efeito da bucefalose na reprodução, composição bioquímica e índice de condição em *P. perna*, verificou uma quantidade maior de animais férteis nos meses de maio a agosto, coincidindo com maior prevalência de *Bucephalus* sp nos meses de junho a setembro. Este fato também foi observado por SILVA *et al.* (2002).

Em pesquisas prévias, LASIAK (1989 e 1993) e CALVO-UGARTEBURU e MCQUAID (1998a) na África do Sul, e MAGALHÃES (1998) em Palhoça-SC, encontraram correlação positiva entre o tamanho dos mexilhões e a presença de *Bucephalus* sp.. A partir de 30mm, o mexilhão *P. perna* já inicia a produção de gametas. Estes animais já armazenam quantidades consideráveis de glicogênio e lipídios, que na fase reprodutiva serão direcionados principalmente à gametogênese. Isto auxilia o entendimento da presença do parasita em meses nos quais estas reservas são maiores em função do ciclo gonádico do hospedeiro. Contudo, MAGALHÃES (1998) considera que a sazonalidade da bucefalose esteja mais vinculada à presença de diferentes espécies de peixes na região que seriam os hospedeiros definitivos.

Em função das características citadas anteriormente: parasita, tamanho do hospedeiro e seu estágio sexual, é que foram selecionados apenas animais entre 30 e 70mm de concha. Esta faixa de tamanho mostrou-se adequada à obtenção de animais portadores de bucefalose e indicadores de sua prevalência naquela população.

A identificação macroscópica deste parasita, após um certo grau de infestação, é percebida pelos filamentos alaranjados no manto, característicos da ramificação dos esporocistos através do corpo do bivalve. A remoção da concha permitiu visualizar um maior grau de infestação na região dorsal-anterior, indicando um possível sítio inicial de infestação, conforme verificado por MAGALHÃES (1998). Esta observação corrobora a necessidade de realizar cortes transversais em diagonal. Os cortes de 3µm fornecem dados do aspecto morfológico dos esporocistos jovens e velhos; das massas germinais intraesporocísticas; dos estágios das cercárias e do efeito deletério da parasitose sobre o tecido conjuntivo e gonádico do hospedeiro.

Acertadamente, FIGUERAS e FIGUERAS (1987) e a OIE (2003) propõem a histologia clássica como método inicial e rotineiro de vigilância de patógenos em moluscos, por sua eficiência e pela incapacidade do exame macroscópico indicar claramente o potencial da patogenia. A OIE (2003) no MANUAL AQUÁTICO e BONDAD-RENTASO *et al.* (2001), no GUIA ASIÁTICO DE DIAGNÓSTICO PARA ENFERMIDADES EM

ANIMAIS AQUÁTICOS, recomendam cortes de 2-3µm de espessura para os exames histológicos, em todos os protocolos de identificação de patologias de moluscos. Tal procedimento facilita a primeira análise de investigação da possível presença de outros patógenos em moluscos.

A quantificação da infestação de *Bucephalus* sp em secções histológicas de *P. perna*, ao microscópio óptico com as objetivas de 10x e 40x (Tabela 1), foram expressas em volume fracionário de cada item amostrado.

Tabela 1. Volume fracionário (%) dos constituintes tissulares do parasita (TP), hospedeiro (TH) e dos espaços vazios (EV), mensurados ao microscópio óptico com objetiva de 10x e 40x.

<i>Indivíduo</i>	<i>TP (%)</i>		<i>TH(%)</i>		<i>EV(%)</i>		Total
	10x	40x	10x	40x	10x	40x	
1	60,2	40,7	31,5	34,8	8,3	24,5	100
2	8,6	16,9	83,3	65,2	8,1	17,9	100
3	33,8	26,7	20,0	17,4	46,2	56,0	100
4	50,5	25,5	41,7	46,4	7,9	28,1	100
5	50,4	25,7	30,7	46,7	18,9	27,6	100
6	44,3	37,9	38,8	27,6	16,9	34,5	100

Não houve diferença significativa nas análises realizadas para TH e TP, utilizando as duas objetivas. Contudo, houve indicação de distorções na análise de EV (<.0001), nos indivíduos 5 e 6, em comparação efetuada entre as objetivas de 10X e 40X. A objetiva de 10X foi mais eficiente do que a de 40X, na quantificação da bucefalose com a gráticula de Weibel, em função da varredura mais ampla em cada área. Sendo mais abrangente, mais representativo foi o resultado fracionário do tecido do parasita em relação aos tecidos do hospedeiro. A objetiva de 40X causa certa distorção nas análises, por avaliar uma área reduzida do animal, principalmente quando há redução significativa do tecido conjuntivo interfolivular. A parasitose foi moderada nos animais analisados: indivíduos 2, 3 e 6 (M=5-50%), enquanto nos indivíduos 1, 4 e 5 foi pesada (P=>50%), não sendo encontrados indivíduos com parasitismo leve (L=>5%) (Figura 1).

No parasitismo moderado foi possível determinar o sexo do indivíduo 6 macroscopicamente, enquanto os animais 2 e 3, apenas ao microscópio. Houve predomínio dos tecidos do hospedeiro (tecido conjuntivo interfolicular; remanescência dos folículos e/ou paredes foliculares), incremento do tecido parasitário, células germinativas foliculares raras, esporocistos com muitas esferas germinais ou massas germinais formadoras de cercárias e cercárias de diversos tamanhos. O animal 3

apresentou alto grau de emaciação, com redução do tecido conjuntivo interfolicular, provavelmente em função do desgaste causado pelo parasito.

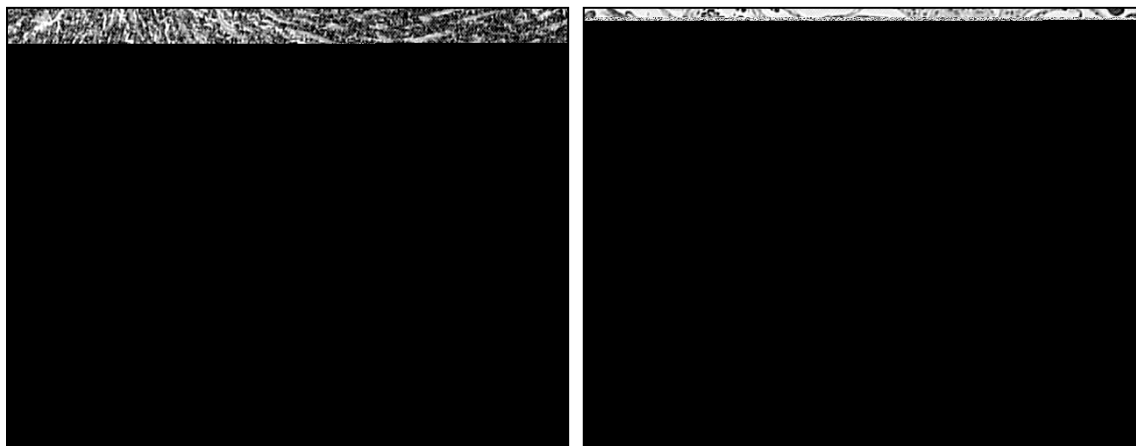


Figura 1. Intensidade de bucefalose em *Perna perna*: **(1) M** - moderada, **(2) P** - pesada. Legenda: fg- fólculo da gônada; es- esporocisto; c- cercária; tc- tecido conjuntivo.

Na bucefalose pesada, foi possível determinar o sexo do indivíduo 1 e 4 macroscopicamente, enquanto o animal 5 apenas ao microscópio. Houve predomínio na análise macro e microscópica, de tecido do parasita, com folículos remanescentes e esporocistos com predomínio de cercárias maduras.

Nos dois casos foram encontrados animais emaciados, com redução do tecido conjuntivo interfolicular, provavelmente por desgaste nutricional e com tecidos rompidos pela saída das cercárias maduras. Nas câmaras branquiais observou-se muitos esporocistos, repletos de cercárias maduras.

CONCLUSÃO

O protocolo sugerido para diagnóstico de bucefalose, também denominada “enfermidade laranja” dos mexilhões inclui: exame macroscópico das partes moles; seções transversais em diagonal da massa visceral (brânquias, manto, intestino e glândula digestiva); fixação das peças em solução de Davidson marinho por 24-48h; transferência para álcool 70°; procedimentos histológicos clássicos de desidratação (álcool 70°, 90° e 100°); diafanização e inclusão em parafina. Cortes de 3µm de espessura; coloração com HHE. Análise microscópica e se necessário, a quantificação da infestação deve ser realizada com estereologia. Sugere-se a seguinte classificação, para expressar a intensidade da infestação em porcentagem de tecido do parasita (TP) encontrado no manto do mexilhão: leve (L) <5%; moderado (M) 5-50 % e pesado (P) >50% de TP.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Laboratório de Moluscos Marinhos do Departamento de Aqüicultura-UFSC por ter fornecido os animais deste experimento. Este trabalho teve financiamento da CAPES, através de Bolsa de Mestrado.

REFERÊNCIAS. BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, B. 1965 Biología y parasitología del mejillon gallego. *Las Ciencias*. 30(2):107-118
- ALVES, D.; PARAGUASSÚ, A.R.; LUQUE, J. L. 2004 Metazoários parasitos da abrótea, *Urophycis brasiliensis* (Kaup, 1858), (Osteichthyes: Phycidae) do litoral do estado do Rio de Janeiro, Brasil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 13 (1): 49-55.
- AMATO, J.F.R. 1982 Digenetic trematodes of percoid fishes of Florianópolis, southern Brasil-Bucephalidae. *Rev. Brasil. Biol.* 42(4): 667-680.
- ARAÚJO, C.M.Y.; FERREIRA, J.F.; MAGALHÃES, A.R.M. 1993 Análise quantitativa de cortes histológicos do mexilhão *Perna perna* (Linnaeus, 1758) (Mollusca: Bivalvia) através da utilização do método de estereologia. In: ENCONTRO BRASILEIRO DE MALACOLOGIA, 13., Rio de Janeiro, 20-23/07/1993. *Anais do XIII Encontro Brasileiro de Malacologia*. p.34.
- ARAÚJO, C.M.Y. 2001 *Biologia reprodutiva do berbigão **Anomalocardia brasiliensis** na reserva extrativista marinha do Pirajubaé*. São Paulo: 204p. (Tese de Doutorado. Instituto de Biociências, USP).
- BEČAK, W. and PAULETTE, J. 1976 *Técnicas de citologia e histologia*. Rio de Janeiro: Livros técnicos e científicos. 305p.
- BLATEAU, D.; Le COGUIC, Y.; MIALHE, E.; GRIZEL, H. 1992 Mussel (*Mytilus edulis*) treatment against the red copepod *Mytilicola intestinalis*. *Aquaculture*. 107(2-3): 165-169.
- BONDAD-RENTASO, M.G.; MACGLADDERY, S.E.; EAST, I.; SUBASINGHE, R.P. 2001 (eds) Asia Diagnostic Guide to Aquatic Animal Diseases. *FAO Fisheries Technical Paper* N° 402, Supplement 2. Roma. 240p.
- BOWER, S.M. and FIGUERAS, A.J. 1989 Infectious diseases of mussels, especially pertaining to mussel transplantation. *World Aquaculture Review*, 20(4):89-93.
- BOWER, S.M.; MCGLADDERY, S.E.; PRICE, I.M. 1994 Synopsis of infection diseases e parasites of commercially exploited shellfish. *Annu. Rev. Fish Dis.* 4:1-199.

- BURRESON, E.M. and CALVO, L.M.R. 1996 Epizootiology of *Perkinsus marinus* disease of oysters in Chesapeake Bay, with emphasis on data since 1985. *J. Shellfish Res.* 15: 17-34.
- CACERES-MARTÍNEZ, J. y FIGUERAS, A. 1995 The mussel, oyster, clam and pectinid fisheries of Spain. In: MACKENZIE JR., C.L.; BURREL JR., V.G.; ROSENFELD, A.; HOBART, W.L. ed. *The history, present condition and the future of the molluscan fisheries of north and central America and Europe*. Seattle: European National oceanic and atmospheric administration, 3: 165-190.
- CALVO-UGARTEBURU, G. and MCQUAID, C.D. 1998a Parasitism and introduced species: epidemiology of trematodes in the intertidal mussels *Perna perna* and *Mytilus galloprovincialis*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 220: 47-65.
- CALVO-UGARTEBURU, G. and MCQUAID, C.D. 1998b Parasitism and invasive species: effects of digenetic trematodes on mussels. *Mar. Ecol. Progr. Ser.* 169: 149-163.
- CASAS, M.G. 1986 *Ciclo reprodutivo do mexilhão **Perna perna** (Mollusca: Bivalvia) (Linné, 1758) na Ilha de Santa Catarina*. Florianópolis: 37p. (Trabalho para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas. Centro de Ciências Biológicas, UFSC).
- CHAVES, N. D. e LUQUE, J. L. 1998 Trematodeos digenéticos parasitos de *Menticirrhus americanus* (Osteichthyes: Sciaenidae) no litoral do estado do Rio De Janeiro, Brasil. *Parasitol. día*, ene. 22(1-2): 33-37.
- CHENG, T.C. 1978 *Parasitologia General*. 2ªed. Madrid: Editorial AC. 965p.
- CHENG, T.C.; SULLIVAN, J.T.; HOWLAND, K.H.; JONES, T.F.; MORAN, H.J. 1983 Studies on parasitic castration: soft tissue and shell weights of *Ilyanassa obsoleta* (Mollusca) parasited by larval trematodes. *Journal of Invertebrate Pathology*. 42: 43-150.
- DAVEY, J.T.; SCULLARD, C. 1978 Physiological responses of *Mytilus edulis* L. to parasitic infestation by *Mytilicola intestinalis*. *J. Cons. Int. Explor. Mer*, 38(1): 12-17.
- ELSTON, R.A. 1990 *Mollusc diseases. Guide for the shellfish farmer*. Seattle: University of Washington Press. 73p.
- FIGUERAS, A.J. y FIGUERAS, A. 1987 La patologia de moluscos y la acuicultura. *Cuad. Marisq. Publ. Téc.* 10: 11-29.
- FIGUERAS, A.J. y VILLALBA, A. 1988 Patologia de moluscos. In: MONTEROS, J.E. y LABARTA, U. ed. *Patologia em acuicultura*. MADRID: Feuga. p. 327-389.

- FUENTES, J.; MOLARES, J.; VILLALBA, A. 1998 Growth, mortality and parasitization of mussels cultivated in the Ría de Arousa_NW Spain/from two sources of seed: intertidal rocky shore vs. collector ropes. *Aquaculture*. 162: 231-240.
- GARCIA, P. 1990 *Estudo do ciclo gonadal do mexilhão **Perna perna** (Linné, 1758) (Mollusca, Bivalvia) na região do Pântano do Sul Ilha de Santa Catarina SC*. Florianópolis: 47p. (Trabalho para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas. Centro de Ciências Biológicas, UFSC).
- GRIZEL, H.; MIALHE, E.; CHAGOT, D.; BOULO, V.; BACHÈRE, E. 1988 Bonamiosis: a model study of diseases in marine mulluscs. *Am. Fish. Soc. Spec. Publ.* 18: 1-4.
- HEASMAN, M.P.; O'CONNOR, W.A.; FRAZER, A.W.J. 1996 Digenean (bucephalidae) infections in commercial scallops, *Pecten fumatus* Reeve, and doughboy scallops, *Chlamys (Mimachlamys) asperrima* (Lamarck) in Jervis Bay, New South Wales. *Journal of Fish Diseases*. 19(5): 333-339.
- HENRIQUES, M.B. 2004 *Resistência do mexilhão **Perna perna** (Linnaeus, 1758) provenientes de bancos naturais da baixada santista, a variações de temperatura, salinidade, tempo de exposição ao ar e determinação da incidência de parasitismo*. Rio Claro: 113p. (Tese de Doutorado. Instituto de Biociências, UEPJMF).
- HOWARD, D.W.; LEWIS, E.J.; KELLER, B.J.; SMITH, C.S. 2004 *Histological techniques for marine bivalve mollusks and crustaceans*. Oxford: NOAA technical Memorandum NOS NCCOS. 5, 218p.
- ITIS. 2005 Integrated Taxonomic Information System. Disponível em: <<http://www.itis.usda.gov/whatsnew.html>> Acesso em: 20 set. 2005.
- JONSSON, R. and ANDRÉ, C. 1992 Mass mortality of the bivalve *Cerastoderma edule* on the Swedish west coast caused by infestation with the digenean trematode *Cercaria cerastodermæ* I.. *Ophelia*. 36(2): 151-157.
- KHAMDAN, S.A.A. 1998 Occurrence of *Bucephalus* sp. trematode in the gonad of the pearl oyster, *Pinctada radiata*. *Environment International*, 24(1-2): 117-120.
- KIM, Y. and POWELL, E.N. 2004 Surfclam hispotopatology survey along the Delmarva mortality line. *Journal of Shellfish Research*. 23(2): 429-441
- KINNE, O. (Ed.), *Diseases of Marine Animals, Introduction Bivalvia to Scaphopoda*, vol. 2. Biologische Anstalt Helgoland, Hamburg. p.477-961.
- KUMAR, A.B. 2000 Foulers, borers, and parasites associated with *Crassostrea madrasensis* (Preston) cultured in Ashtamudi Lake, Kerala, India. In: International Congress and Workshop of the Tropical Marine Mollusc Programme, 11. India,

- 28/sep.-8/oct./2000. Spec. Publ. Phuket Mar. Biol. Cent.. v.25, p. 1-28.
- LASIAK, T. 1989 The prevalence of Proctoeces (Trematoda: Fellodistomidae) metacercarial infections in the brown mussel *Perna perna* (Bivalvia: Mytilidae) around the southern African coast. *S.-Afr. J. Zool.* 24(3):178-186.
- LASIAK, T. 1992 Bucephalid trematode infections in mytilid bivalves from the rocky intertidal of southern Chile. *J. Mollus. Stud.* 58: 29-36.
- LASIAK, T.A. 1993 Bucephalid trematode infections in the brown mussel *Perna perna* (Bivalvia: Mytilidae). *S. Afr. J. Marine Sci.* 13:127-134.
- LAUCKNER, G. 1983 Diseases of Mollusca: Bivalvia. In: KINNE, O. (Ed.), *Diseases of Marine Animals, Introduction Bivalvia to Scaphopoda*, vol. 2. Biologische Anstalt Helgoland, Hamburg. p.477-961.
- LAURELLE, F.; MOLLOY, D.P.; ROITMAN, V.A. 2002 Histological analysis of trematodes in *Dreissena polymorpha*: their location, pathogenicity, and distinguishing morphological characteristics. *J. Parasitol.*, 88(5): 856-863.
- LIMA, F.C.; ABREU, M.G.; MESQUITA, E.F.M. 2001 Monitoramento histopatológico de mexilhão *Perna perna* da Lagoa de Itaipu, Niterói, RJ. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 53 (2): 1-5.
- LOWE, D.M. and MOORE, M.N. 1985 Cytological and cytochemical procedures. In: BAYNE, B.L. et al. *The effects of stress and pollution on marine animals*. New York: Preager Sci. p.179-204.
- LUNETTA, J.E., 1969 Fisiologia da reprodução de mexilhões (*Mytilus perna* L. Mollusca Lamellibranchia). *Bol. Zool. Biol. Mar.* 26: 33-111.
- MAGALHÃES, A. R. M. 1998 *Efeito da parasitose por trematoda Bucephalidae na reprodução, composição bioquímica e índice de condição do mexilhão Perna perna (L.)*. São Paulo: 185p. (Tese de Doutorado. Instituto de Biociências, USP).
- MAGALHÃES, A.R.M.; FERREIRA, J.F.; SALOMÃO, L.C. 1999 Incidence and effect of the parasite trematoda Bucephalidae on the reproduction of the brazilian mussel *Perna perna*, natural and cultured. In: AQUACULTURE ON THE RISE AMERICA '99. Tampa, 27-30/jan./1999. *Books of abstracts* Tampa: World Aquaculture Society. p.109.
- MAGALHÃES, A. R. M. 2000 Parasitoses em moluscos bivalves marinhos cultivados no Brasil. In: ENCONTRO LATINO-AMERICANO DE PATOLOGISTAS DE ORGANISMOS AQUÁTICOS,2.;ENCONTRO BRASILEIRO DE PATOLOGISTAS

- DE ORGANISMOS AQUÁTICOS, 6., Florianópolis, 21-26/julho./2000. *Anais do II Elapoa e VI Embrapoa*. v. único, p. 39.
- MARENZI, A.W.C.; BIU, C.C.; WOJCIECHOWSKI JR, E.; GOMES, R.O.M. 1998 monitoramento do parasitismo de bucephalideos em mexilhões *Perna perna* (Linné, 1758) no litoral centro norte de Santa Catarina, BR. In: SEMANA NACIONAL DE OCENOGRAFIA, 11., Rio Grande, 18-24/out./1998. *Anais da XI Semana Nacional de Ocenografia*. v.9, p.658-659.
- OIE. 2003 Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals. Paris: OIE. [on line] Disponível em: <http://www.oie.int/esp/normes/fmanual/A_summry.htm> Acesso em: 16 fev. 2005.
- OLIVEIRA NETO, F.M. 2005 *Diagnóstico do cultivo de moluscos em Santa Catarina*. Florianópolis: EPAGRI. 67p.
- OLSEN, O.W. 1974 *Animal Parasites – their life cycles and ecology*. Baltimore: University Park Press. 562p.
- PEREIRA JR, J.; ROBALDO, R. B.; SOUTO-RAITER, V. M. M. 1996 Um possível ciclo de vida *Bucephalus varicus* Manter, 1940 (Trematoda: Bucephalidae) no Rio Grande do Sul. *Comunicações do Museu de Ciência e Tecnologia, Pontifícia Universidade Católica do RS*. 9 (1): 31-36.
- POLENTA, R. and FROGLIA, C.P. 1997 Preliminary data on the Trematoda Digenea observed in the clam *Paphia aurea* from the Adriatic Sea. *Biol. Mar. Mediterr.* 4(1):431-432.
- POLI, C.R. 1998 Situação atual do cultivo de moluscos marinhos em Santa Catarina. Florianópolis: Blue Water Aquaculture LTDA, Disponível em: <<http://www.dwa.com.br>> Acesso em: 25 set. 2004.
- PRINCEP, M ; BIGAS, M ; DURFORT, M. 1996 Incidence of *Bucephallus haimeanus* (Lacaze-Duthiers, 1854) (Trematoda, Digenea) in the digestive gland of *Ostrea edulis* Linne . *Iberus*. 14(2): 211-220.
- ROBALDO, R. B. *Parasitos digenéticos do camarim **Centropomus undecimalis** (BLOCH, 1792), cultivado em itamaracá, PE, Brasil*. 1995. Dissertação (Mestrado em Oceanografia Biológica) Universidade Federal de Pernambuco. Disponível em: <<http://www.octopus.furg.br/pesquisa/publicacoes/fisiologia/teserobaldo/teserobaldo.html>> Acesso em: 23 ago. 2005.
- SAS INSTITUTE INC. 2002 SAS on line doc®. CARY, N.C.: SAS INSTITUTE INC

- SABRY, R.C. 2003 *Parasitas em ostras de cultivo (**Crassostrea rhizophorae** e **Crassostrea gigas**) da Ponta do Sambaqui, Florianópolis, SC*. Florianópolis, 39 p. (Dissertação de Mestrado. Centro de Ciências Agrárias, UFSC)
- SILVA, P.M.; MAGALHÃES, A.R M.; FERREIRA, J.F. 1996 Infestation of *Perna perna* mussel (Bivalvia: Mytilidae) by digenetic trematodes of the family Bucephalidae, *Bucephalus* genus, in Brasil. *J. Med. & Appl. Malacol.* 8(1): 25.
- SILVA, P.M. da. 1999 *Estudo da infecção de **Bucephalus** sp. (Trematoda: Bucephalidae) no mexilhão **Perna perna** e de algumas reações imunológicas induzidas pelo parasita*. Florianópolis, 120 p. (Dissertação de Mestrado. Centro de Ciências Agrárias, UFSC)
- SILVA, P.M. da; MAGALHÃES, A. R. M; BARRCCO, M.A. 2002 Effects of *Bucephalus* sp. (Trematoda: Bucephalidae) on *Perna perna* mussels from a culture station in Ratones Grande Island, Brazil. *Journal of Invertebrate Pathology.* 79: 154-162.
- TURNER, H. 1985 Parasites of eastern oysters from subtidal reefs in a Louisiana Estuary with a note on their use as indicators of water quality. *Estuaries.* 8(3): 323-325.
- UMIJI, S.; LUNETTA, J.E.; LEONEL, R.M.V. 1976 Infestation of the mussel *Perna perna* by digenetic trematodes of the Bucephalidae family, gen *Bucephalus*. *An. Acad. Bras. Cienc.* 47(Suppl.): 115- 17.
- WALKER P. and SUBASINGHE, R.P. 2000. DNA-based Molecular Diagnostic Techniques. Research needs for standardization and validation of the detection of aquatic animal pathogens and diseases. *FAO Fisheries Technical Paper*, n°395, 93 p.
- WINSTEAD, J.T.; VOLETY, A.K.; TOLLEY, S.G. 2004 Parasitic and symbiotic fauna in oysters (*Crassostrea virginica*) collected from the Caloosahatchee River and estuary in Florida. *J. Shellfish Res.* 23(3): 831-840.

Conclusões Gerais

- O diagnóstico de bucefalose e a prevalência no hospedeiro devem ser feitos através de exame microscópico, a partir do protocolo que inclui fixação por Davidson, histologia clássica e coloração HHE.
- A infraestrutura atual do LADPAQ e a capacidade técnica, permitem realizar: histologia clássica, exame citológico com “imprints” de tecidos e cultura em tioglicolato. Parcerias entre o LADPAQ (CCA-UFSC) e o Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática e Imunoquímica (CCB-UFSC) permitiria a execução dos testes de hibridização *in situ*, PCR e RFLP-PCR. Atualmente, não há infra-estrutura para executar os testes de microscopia eletrônica, pela falta dos equipamentos (microscópio eletrônico, ultramicrotomo, etc.)
- Por não haver legislação específica para o credenciamento de laboratórios de diagnóstico em animais, devem ser cumpridos os requisitos das legislações pertinentes aos laboratórios de análises clínicas em saúde humana, através do cumprimento: das Instruções Normativas nº 24 e nº 51; RDC nº 50 (21/02/2002); RDC nº 189 (18/07/2003); RDC nº 245 (15/09/2003); RDC nº 302 (13/10/2005); RDC nº 306 (07/12/2004); Resolução nº 358 (29/04/2005); concessão do alvará sanitário; código de obras do município; Padrão Internacional ISO/IEC 17025.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O Estado de Santa Catarina precisa efetivar o Programa de Sanidade Aquícola elaborado pela comissão instituída pela Secretaria da Agricultura e Desenvolvimento Rural.

É fundamental a realização de trabalhos contínuos de investigação, relacionados à presença de possíveis patógenos nos moluscos cultivados ou de estoques naturais do litoral catarinense. Isto ocorrerá através da implementação de ações que permitam:

1. Viabilizar as análises dos patógenos através da disponibilização de reagentes, equipamentos e instalações adequadas;
2. Implementar parcerias nacionais e internacionais com o intuito de formar e manter recursos humanos que possibilitem atingir autonomia na realização destas análises.

É essencial o reconhecimento, por todas as autoridades envolvidas no processo produtivo, da importância do Programa de Sanidade Aquícola para concretizar a malacocultura como atividade segura, do ponto de vista da saúde animal e pública.

6. BIBLIOGRAFIA

- ABREU, B. Biología y parasitología del mejillon gallego. **Las Ciéncias**, **30**(2):107-118. 1965.
- ALVES ,D.; PARAGUASSÚ, A.R.; LUQUE, J. L. Metazoários parasitos da abrótea, *Urophycis brasiliensis* (Kaup, 1858), (Osteichthyes: Phycidae) do litoral do estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, **13** (1): 49-55. 2004.
- AFF. Import risk analysis (IRA) of non-viable bivalve molluscs. Canberra: Biosecurity Australia, 2002. 75p . Disponível em: <http://www.affa.gov.au/corporate_docs/publications/pdf/market_access/biosecurity/animal/2002/2002-44a.pdf>. Acesso em: 23 maio 2005.
- AMATO, J.F.R. Digenetic trematodes of percoid fishes of Florianópolis, southern Brasil-Bucephalidae. **Rev. Brasil. Biol.**, **42**(4) 667-680. 1982.
- APEC/FAO/NACA/SEMARNAP. 2001. Trans-boundary aquatic animal pathogen transfer and the development of harmonized standards on aquaculture health management. **Report of the joint APEC/FAO/NACA/SEMARNAP Workshop, Puerto Vallarta, Jalisco, México, 24-28, Julho 200 pp**. Disponível em <<http://faostat.fao.org/faostat/form?collection=Fishes&Domain=FishCatch&servlet=1&hasbulk=&version=ext&language=EN>>. Acesso em: 23 maio 2005.
- AZEVEDO, C. Fine structure of *Perkinsus atlanticus* n. sp. (Apicomplexa, Perkinsea) parasite of the clam *Ruditapes decussates* from Portugal. **J. Parasitol.**, **75**(40): 627-635p. 1989.
- BERTHE, F.C.J.; LE ROUX, F.; ADLARD, R. D.; FIGUERAS, A. J. Marteilliosis of molluscs: a review. **Aquatic Living Resources proofs.**, **17**: 433-448. 2004.
- BLATEAU, D.; Le COGUIC, Y.; MIALHE,E.; GRIZEL, H. Mussel (*Mytilus edulis*) treatment against the red copepod *Mytilicola intestinalis*. **Aquaculture**, **107**(2-3): 165-169. 1992.
- BONDAD-RENTASO, M.G.; MACGLADDERY, S.E.; EAST,I.; SUBASINGHE, R.P. (eds) Asia Diagnostic Guide to Aquatic Animal Diseases. **FAO Fisheries Technical Paper N° 402**, Supplement 2. Roma. 2001, 240p.
- BOWER, S.M. and FIGUERAS, A.J. Infectious diseases of mussels, especially pertaining to mussel transplantation. **Word Aquaculture Review**, **20**(4):89-93. 1989.
- BOWER, S.M.; MCGLADDERY, S.E.; PRICE, I.M. Synopsis of infection diseases e parasites of commercially exploited shellfish. **Annu. Rev. Fish Dis.**, **4**:1–199. 1994.
- BOWER, S.M; BATE, K.; MEYER, G.R. Susceptibility of juvenile *Crassostrea gigas* and resistance of *Panope abrupta* to *Mikrocytos mackini*. **Journal of Invertebrate Pathology**, **88**: 95–99. 2005.
- BURRESON, E. M.; FORD, S. E. A review of recent information on the Haplosporidia, with special reference to Haplosporidium nelsoni (MSX disease). **Aquat. Living Resour.**, **17**, 499–517. 2004.
- CARNEGIE, R. B.; COCHENNEC-LAUREAU, N. Microcell parasites of oysters: Recent insights and future trends. **Aquat. Living Resour.**, **17**: 519–528. 2004.

CARNEGIE, R. B; MEYER, G. R.; BLACKBOURN, J.; COCHENNEC-LAUREAU, N; BERTHE, F.C.J; BOWER, S.M. Molecular detection of the oyster parasite *Mikrocytos mackini*, and a preliminary phylogenetic analysis. **Diseases of Aquatic Organisms**, **54**: 219–227, 2003.

CASTILLO, J.A. Enfermedades de Declaración Obligatoria en Moluscos (y II): Perkinsosis (*Perkinsus marinus* y *Perkinsus olseni*). **AquaTIC**, nº 4. 1998. Disponível em: <<http://www.revistaaquatic.com/>>. Acesso em: 17 outubro 2005.

CESCHIA, G.; ZANCHETTA, S.; SELLO, M.; MONTESI, F.; ANTONETTI, P.; FIGUERAS, A. Presence of parasites in razor clam (*Ensis minor* and *Ensis siliqua*) harvested from coastal areas of the southern Tyrrhenian and Adriatic Seas. **Bollettino Societa Italiana di Patologia Ittica**, **13** (30), 20-27. 2001.

CHAVES, N. D. e LUQUE, J. L. Trematodeos digenéticos parasitos de *Menticirrhus americanus* (Osteichthyes: Sciaenidae) no litoral do estado do Rio De Janeiro, Brasil. **Parasitol.**, **22**(1-2): 33-37. 1998.

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

CHENG, T.C.; SULLIVAN, J.T.; HOWLAND, K.H.; JONES, T.F.; MORAN, H.J. Studies on parasitic castration: soft tissue and shell weights of *Ilyanassa obsoleta* (Mollusca) parasited by larval trematodes. **Journal of Invertebrate Pathology**, **42**: 43-150. 1983.

COMPS e JOLY *apud* BERTHE *et al.*, 2004.

ELSTON, R.A. **Mollusc diseases. Guide for the shellfish farmer**. Seattle: University of Washington Press, 1990. 73p.

EMAPA/EPAGRI. **Quadro da malacocultura em Santa Catarina**. Florianópolis, 2004 Disponível em: <http://www.acaq.org.br/artigos/malacacultura_2002.htm>. Acesso em: 10 outubro 2005.

FAO Fisheries Department. **El estado mundial de la pesca y la acuicultura**. Rome: FAO, 2004. 174 p. Disponível na em: <http://www.fao.org/documents/show_cdr.asp?url_file=/docrep/007/y5600s/y5600s00.htm>. Acesso em: 07 março 2005.

FAO/NACA. Manual of Procedures for the Implementation of the Asia Regional Technical Guidelines on Health Management for the Responsible Movement of Live Aquatic Animals. **FAO Fisheries Technical Paper. No. 402**, Suppl. 1. FAO, Rome, Italy, 106 pp. 2001.

FAOSTAT data. Produção de mexilhões de diversas partes do mundo. 2005a Disponível em <<http://www.faostat.fao.org/faostat/form?collection=Fishes&Domain=FishCatch&servlet=1&hasblik=&version=ext&language=EN>>. Acesso em: 12 setembro 2005.

FAOSTAT data, 2005b. Produção de ostras de diversas partes do mundo. Disponível em <<http://www.faostat.fao.org/faostat/form?collection=Fishes&Domain=FishCatch&servlet=1&hasblik=&version=ext&language=EN>>. Acesso em: 12 setembro 2005.

FERREIRA, J. F. e MAGALHÃES, A. R. M. Desenvolvimento do cultivo de mexilhões em Santa Catarina (Sul Brasil) **VI congresso Latinoamericano de Ciências del Mar**, Mar del Plata, 80 p. 1995. Resumo.

FERREIRA, J. F. e MAGALHÃES, A. R. M. **Mexilhões: Biologia e cultivo**. Florianópolis: UFSC, 1997. 56 p.

FIGUERAS, A.J.; JARDON, C.F.; CALDAS, J.R. Diseases and parasites of mussels (*Mytilus edulis* Linneaus, 1758) from two sites on the East coast of the United States. **Journal of Shellfish Research**, **10**, 89–94. 1991.

FIGUERAS, A.J.; ROBLEDO, J.A.F.; NOVOA, B. Brown ring disease and parasites in clams (*Ruditapes decussatus* and *R. philippinarum*) from Spain and Portugal. **Journal of Shellfish Research**, **15**: 363-368. 1996.

FUENTES, J.; MOLARES, J.; VILLALBA, A. Growth, mortality and parasitization of mussels cultivated in the Ría de Arousa_NW Spain/from two sources of seed: intertidal rocky shore vs. collector ropes. **Aquaculture**., **162**: 231–240. 1998.

GARCIA, Patrícia. **Obtenção de sementes do mexilhão *Perna perna* (Linné, 1758) em Florianópolis e a sustentabilidade do cultivo.**

LASIAK, T. The prevalence of *Proctoeces* (Trematoda: Fellodistomidae) metacercarial infections in the brown mussel *Perna perna* (Bivalvia: Mytilidae) around the southern African coast. **S.-Afr. J. Zool.**, **24**(3):178-186. 1989.

LAUCKNER, G. Diseases of Mollusca: Bivalvia. In: KINNE, O. (Ed.), **Diseases of Marine Animals, Introduction Bivalvia to Scaphopoda**, vol. 2. Biologische Anstalt Helgoland, Hamburg. p.477–961. 1983.

MAGALHÃES, A. R. M. **Efeito da parasitose por trematoda Bucephalidae na reprodução, composição bioquímica e índice de condição do mexilhão *Perna perna***. 1998. 185p Tese (Doutorado em Fisiologia) Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1998.

MORRIS, 1982 *apud* PEREIRA JR. *et al.*, 1996.

MOYER, M.A.; BLAKE, N.J.; ARNOLD, W.S. An ascetosporan disease causing mass mortality in the Atlantic calico scallop, *Argopecten gibbus* (Linnaeus, 1758). **Journal of Shellfish Research**, **12**(2): 305-310. 1993.

NORTON, J.H., PERKINS, F.P.; LEDUA E. *Marteilia*-like infection in a giant clam, *Tridacna maxima*, in Fiji. **J. Invertebr. Pathol.**, **61**, 328-330. 1993.

OIE. **Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals**. Paris: OIE, 2003. Disponível em: <http://www.oie.int/esp/normes/fmanual/A_summry.htm>. Acesso em: 16 fevereiro 2005.

OIE. **72ª Sesión General: Informe Final 2004**. OIE, Paris, França, 209 pp. 2004. Disponível em: <http://www.oie.int/download/SG/2004/E_Rfinal_2004_WP.pdf>. Acesso em: 17 fevereiro 2005.

OIE. **Código Sanitario para los Animales Acuáticos**. 8th edition. OIE, Paris, França, 2005a. Disponível em: <http://www.oie.int/esp/normes/fcode/E_summry.htm>. Acesso em: 16 fevereiro 2005.

OIE. **Situación zoonositaria plurianual**. 2005b Disponível em: <<http://www.oie.int/hs2/report.asp?lang=en>>. Acesso em: 20 outubro 2005.

OLIVEIRA NETO, F.M. **Diagnóstico do cultivo de moluscos em Santa Catarina**. Florianópolis: EPAGRI, 2005. 67p.

OLSEN, O.W. **Animal Parasites – their life cycles and ecology**. Baltimore: University Park Press, 1974. 562 p.

OMC. **Acuerdo sobre la Aplicación de Medidas Sanitarias y Fitosanitarias. LOCAL: OMC**, 1994. Disponível em: <http://www.wto.org/spanish/docs_s/legal_s/legal_s.htm>. Acesso em: 01 março 2005.

PEREIRA JR, J.; ROBALDO, R. B.; SOUTO-RAITER, V. M. M. Um possível ciclo de vida *Bucephalus varicus* Manter, 1940 (Trematoda: Bucephalidae) no Rio Grande do Sul. **Comunicações do Museu de Ciência e Tecnologia, Pontifícia Universidade Católica do RS**. **9**(1): 31-36. 1996.

POLI, C.R. **Situação atual do cultivo de moluscos marinhos em Santa Catarina**. Florianópolis: Blue Water Aquaculture LTDA, 1998. Disponível em: <<http://www.dwa.com.br>>. Acesso em: 25 setembro 2004.

POLI, C. R. Introdução da Ostra do Pacífico (*Crassostrea gigas*) no sul do Brasil. **Boletim Red. de Acuicultura**, Bogotá, p.14-15, 1990.

ROBALDO, R. B. **Parasitas digenéticos do camorim *Centropomus undecimalis* (BLOCH, 1792), cultivado em itamaracá, PE, Brasil.** 1995. Dissertação (Mestrado em Oceanografia Biológica) Universidade Federal de Pernambuco. Disponível em: <www.octopus.furg.br/pesquisa/publicacoes/fisiologia/teserobaldo/teserobaldo.html>. Acesso em: 23 agosto 2005.

SANTA CATARINA. **Proposta para o programa de defesa sanitária para animais aquáticos no Estado de Santa Catarina.** Florianópolis: Secretaria de Estado do Desenvolvimento Rural e da Agricultura, 2001. 103p.

SANTA CATARINA. **Portaria nº 021/02/SDA.** Florianópolis: Secretaria de estado do desenvolvimento rural e da agricultura, 2002. Disponível em: <<http://www.agricultura.c.gov.br/internas/portaria.php?id=2>>. Acesso em: 02 março 2005.

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

UMIJI, S.; LUNETTA, J.E.; LEONEL, R.M.V. Infestation of the mussel *Perna perna* by digenetic trematodes of the Bucephalidae family, gen *Bucephalus*. **An. Acad. Bras. Cienc.**, **47**(Suppl.)115– 17. 1976.

VIMS. **Oyster Diseases of the Chesapeake Bay: Photo Gallery.** 2003a. Disponível em: <<http://www.vims.edu/env/research/shellfish/gallery.html>>. Acesso em: 25 outubro 2005.

VIMS. **OIE Reference Laboratory for the molluscan diseases Haplosporidiosis and Perkinsosis: Photo Gallery.** 2003b. Disponível em: <<http://www.vims.edu/env/research/shellfish/oie/gallery.html>>. Acesso em: 25 outubro 2005.

ZRNCIC, S.; LE ROUX, F.; ORAIC, D.; SOSTARIC, B.; BERTHE. F.C.J. First record of *Marteilia* sp. in mussels *Mytilus galloprovincialis* in Croatia. **Diseases of Aquatic Organisms**, **44**: 143–148, 2001.

ANEXOS

SOLUÇÃO DE DAVIDSON (FIXADORES)

INFORMAÇÕES GERAIS

A função do fixador é manter a morfologia dos tecidos como estavam quando vivos, para evitar a necrose pós-amostragem. A solução de Davidson é o fixador recomendado para patologias de moluscos em geral, por preservar adequadamente as estruturas dos tecidos de espécimens grandes. Além disto, as secções de tecidos fixadas com este fixador podem ser coradas posteriormente por diferentes métodos histoquímicos, bem como com sondas de DNA na hibridização *in situ*. O tempo adequado de fixação deve ser entre 24 e 48h. Superfixação deve ser evitada. O material fixado deve ser refrigerado a 4°C. Após a primeira etapa de fixação o material deve ser transferido em seguida para álcool 70°. A proporção indicada para uma boa fixação deve ser de 1 volume de tecido para 10 volumes de fixador. Recomenda-se fixar uma parte da amostra dos moluscos em solução de Davidson e a outra em solução de Carson, para futura investigação em microscopia eletrônica. Se estes fixadores não estiverem disponíveis, formalina 10% tamponada, preparada com água do mar filtrada é adequada. Dentro de cada país, a indústria aquícola de moluscos deve acordar sobre o modo mais efetivo de assegurar uma fixação adequada.

Para melhores resultados, seguir a ordem dos ingredientes quando da preparação da solução estoque. Armazenar em sala a temperatura ambiente e agitar antes de usar.

Fórmula: Manual Aquático (OIE, 2003)

Glicerol	400 ml
Formaldeído 38%	300 ml
Álcool 95%	1200 ml
Água do mar	1200 ml
Ácido acético glacial	10% (adicionar na hora da fixação)

Fórmula: Shaw and Battle (1957) *apud* HOWARD *et al.* (2004)

1 galão de solução estoque (3600ml)

Glicerol	400 ml
Formaldeído 37-40%	800 ml
Álcool 95%	1200 ml

Água do mar filtrada 1200 ml

Solução de trabalho - 10% ácido acético (Shaw and Battle (1957) *apud* HOWARD *et al.*, 2004)

1. Solução de Davidson estoque 9 partes
2. Ácido acético glacial 1 parte

Nota:

Para extração futura de DNA, fixar apenas com solução estoque. O ácido acético na solução de trabalho, interfere com a recuperação do DNA. Adicionar ácido acético na solução de Davidson estoque, somente no momento da fixação. O ácido acético auxilia na desintegração da concha de pequenos bivalves. Em preparações citológicas, usar 1% de ácido acético.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

HOWARD, D.W.; LEWIS,E.J.; KELLER, B.J.; SMITH, C.S. **Histological techniques for marine bivalve mollusks and crustaceans**. Oxford: NOAA technical Memorandum NOS NCCOS. 5: 76 -77p. 2004

OIE. **Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals**. Paris: OIE, 2003. Disponível em: <http://www.oie.int/esp/normes/fmanual/A_summry.htm>. Acesso em: 16 de fevereiro de 2005.

SOLUÇÃO DE CARSON (FIXADOR)

INFORMAÇÕES GERAIS

A função do fixador é manter a morfologia dos tecidos como estavam quando vivos para evitar a necrose pós-amostragem. A solução de Carson pode não ser tão boa quanto a solução de Davidson para análise histológica. Não obstante, permite boa preservação da ultraestrutura e pode ser usado para preservar amostras para posterior estudo através de microscopia eletrônica. A microscopia eletrônica pode ser um valioso auxiliar no diagnóstico ou confirmação de infecções em moluscos. O material fixado em solução de Carson e que contenha níveis adequados de agentes patogênicos ou anormalidades, pode ser refixado em glutaraldeído. Recomenda-se que parte dos moluscos sejam fixados em solução de Davidson e outra parte, em solução de Carson para investigação adicional. Isto deveria ser feito para assegurar fixação de todos os tecidos/órgãos nos dois fixadores. Caso estes fixadores não estiverem disponíveis, formalina 10% tamponada, preparada com água do mar filtrada é adequada. Dentro de cada país, a indústria aquícola de moluscos deve acordar sobre o modo mais efetivo de assegurar uma fixação adequada.

Fórmula: Manual Aquático (OIE, 2003)

NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O	23,8 g
NaOH	5,2 g
Água destilada	900 ml
Formaldeído 40%	100 ml

Ajustar o pH para 7,2-7,4

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

OIE. **Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals**. Paris: OIE, 2003. Disponível em: <http://www.oie.int/esp/normes/fmanual/A_summry.htm>. Acesso em: 16 de fevereiro de 2005.

Enfermidade MSX (*Haplosporidium nelsoni*)

INFORMAÇÕES GERAIS

A enfermidade MSX é causada pelo protista *Haplosporidium nelsoni* (= *Minchinia nelsoni*) do filo Haplosporidia (14). *Haplosporidium nelsoni* é conhecido comumente como MSX (Esfera Multinucleada X). As ostras *Crassostrea virginica* e *Crassostrea gigas* são infectadas por *H. nelsoni*; contudo, a prevalência e virulência destes patógenos são mais altas em *C. virginica* do que em *C. gigas* (1, 5, 10, 11).

A distribuição geográfica de *H. nelsoni* em *C. virginica* vai da costa leste da Florida (América do Norte, EUA, até a Nova Escócia, Canadá (9, 12). Áreas enzoóticas são as Baías Delaware e Chesapeake, com ocasional epizooticos nos estuários da Carolina do Norte, Long Island Sound, Cape Cod e Nova Escócia (1, 8, 22). *Haplosporidium nelsoni* foi identificado em *Crassostrea gigas* na California, EUA (10, 11), na Korea, Japão, e França (5, 10, 15, 16, 18). Outro *Haplosporidium* sp. também ocorre em *C. gigas* na França (6).

O estágio de plasmódio de *H. nelsoni* ocorre intercelularmente no tecido conjuntivo e epitelial. Esporos de *H. nelsoni* ocorrem exclusivamente no epitélio dos túbulos digestivos. A esporulação de *H. nelsoni* é rara em ostras adultas infectadas, mas é frequentemente observada em ostras jovens infectadas (2, 3). A infecção por *H. nelsoni* ocorre entre o meio de maio e o fim de outubro. Mortalidades de novas infecções ocorrem durante o verão e no pico em julho/agosto. Mortalidades podem ocorrer na primavera de infecções adquiridas no inverno. A enfermidade MSX está restrita as salinidades acima de 15 ‰; rápidas e altas mortalidades podem ocorrer a 20 ‰ (1, 8, 13). Ostras infectadas mantidas por 2 semanas em água a 10 ‰ de salinidade ou menos de 20°C, matam *H. nelsoni*, mas não matam *C. virginica* (7).

Mortalidade de ostras altamente suscetíveis às infecções de *H. nelsoni*, é rápida e ocorre sem a perda da condição. Ostras mais tolerantes sobrevivem mais tempo e mostram redução no índice de condição correlacionado com a intensidade da infecção (9). Até a morte eles estão excessivamente emaciados e o estoque de células apresenta-se reduzido e rompido. A esporulação causa ruptura do epitélio do tubo digestivo.

Não tem sido possível transmitir *H. nelsoni* experimentalmente em laboratório. Nenhum ciclo vital de qualquer membro do filo Haplosporidia foi elucidado, mas suspeita-se da existência de hospedeiro intermediário (12).

Para diagnose, recomenda-se usar o guia de amostras contidos nos Capítulos 1.1.4 e Capítulo I.2, do Manual Aquático.

PROCEDIMENTOS DE EXAME

1. Métodos de Varredura

1.1. Exame histológico

Os procedimentos histológicos gerais estão detalhados no Capítulo I.2., do Manual Aquático. Corte uma secção transversal através da massa visceral que inclui o manto, brânquia e glândula digestiva. Coloque a amostra em um fixador, como a solução de Davidson ou Carson (mais tarde as amostras podem ser re-utilizadas para microscopia eletrônica, se necessário). A proporção não deve ser maior que 1 volume de tecido para 10 volumes de fixador. Os cortes são subsequentemente tratados pelos procedimentos convencionais de histologia (4). Haplosporídios são revelados por muitos corantes não específicos, como hematoxilina e eosina (HE).

O plasmódio multinucleado de *Haplosporidium nelsoni* (usualmente com 5-15 µm diâmetro, mas pode ser mais de 25 µm) ocorre em todo tecido conjuntivo e frequentemente, no epitélio das brânquias e intestino. Os plasmódios são detectados ao longo de todo ano. Esporocistos contêm esporos e estão restritos aos túbulos do epitélio digestivo. A esporulação de *H. nelsoni* é rara em ostras adultas infectadas, mas é frequentemente observada em jovens ostras infectadas. Esporos maduros medem cerca de 6 x 8 µm. Esporocistos podem romper o epitélio digestivo pela liberação dos esporos desenvolvidos e maduros dentro do lúmen dos túbulos digestivos. Os esporos podem ser encontrados de junho a dezembro em *C. virginica*.

A intensidade da infecção tem sido classificada como:

1. **localizada (LO)** = qualquer infecção onde o plasmódio está localizado em uma pequena área em um tipo de tecido, usualmente o epitélio das brânquias ou intestino;
2. **rara (R)** = infecções sistemáticas com menos de dez plasmódios dentro da secção;
3. **leve (L)** = infecções sistemáticas com menos de dois plasmódios por campo em aumento de 400X, mas acima de dez plasmódios em toda a secção;
4. **moderada (M)** = infecções sistemáticas com 2-5 plasmódios por campo, em aumento de 400X;
5. **pesada (P)** = mais de cinco plasmódios por campo, em aumento de 400X;
6. **esporulação (E)** = qualquer infecção onde os esporos estão presentes.

2. Métodos de Diagnóstico Presuntivo

2.1. Histologia

Veja na seção 1.1. acima os procedimentos técnicos. Quando os esporos estão presentes, *H. nelsoni* pode ser presuntivamente diagnosticado em ostras se os esporos são do tamanho correto e se ocorrem exclusivamente no epitélio dos túbulos digestivos. Em áreas ao longo da costa leste dos EUA, onde a salinidade é menor que 25 ‰, plasmódios dos haplosporídios em ostras podem ser presumidos como sendo de *H. nelsoni*. Em áreas onde a salinidade é consistentemente maior do que 25 ‰, *H. nelsoni* e *H. costale* (o agente causador da enfermidade SSO) co-ocorrem e os plasmódios das duas espécies não podem distinguidos histologicamente (ver Capítulo 3.1.6. enfermidade SSO).

2.2. PCR do DNA de tecido de ostra

Um resultado positivo da reação em cadeia da polimerase (PCR) é somente um diagnóstico presuntivo, porque ela detecta DNA do patógeno e não necessariamente um patógeno viável. Outras técnicas, preferencialmente hibridização *in situ*, devem ser usadas para visualizar o patógeno.

Os iniciadores de PCR desenvolvidos para a detecção de *H. nelsoni*, MSX-A' (5'-CGA-CTT-TGG-CAT-TAG-GT-TTC-AGA-CC-3') e MSX-B (5'-ATG-TGT-TGG-TGA-CGC-TAA-CCG-3'), têm como alvo o DNA da subunidade ribossomal menor. Estes iniciadores têm se mostrado sensíveis e específicos para este patógeno (18, 21). Um PCR múltiplo (17) para *H. nelsoni* e *H. costale* (SSO) foi desenvolvido usando estes iniciadores, mas ele não foi validado. As reações de PCR contém tampão da reação (Tris 10 mM; pH 8,3; KCl 50 mM; MgCl₂ 1,5 mM; 10 µg/ml gelatina), 400 µg/ml de albumina de soro bovino, 25 pmoles de cada iniciador (MSX-A' e MSX-B), 200 µM de cada dATP, dCTP, dGTP, dTTP, 0,6 unidades AmpliTaq DNA polimerase (Applied Biosystems), e DNA molde, em um volume final de 25 µl. As reações ocorrem em um termo-ciclador. O programa para o termo-ciclador "GeneAmp PCR System 9600" da Applied Biosystems, tem início com uma desnaturação a 94°C por 4 minutos; seguida de 35 ciclos a 94°C, por 30 segundos; a 59°C por 30 segundos e a 72°C por 1,5 minutos, e uma extensão final a 72°C, por 5 minutos. Uma alíquota (10% do volume da reação) de cada reação de PCR é checada quanto à presença do produto amplificado (573 pares de bases-bp) por eletroforese em gel de agarose, após coloração do gel com brometo de etídio.

3. Confirmação da Identificação do Patógeno

3.1. Exame de hibridização *in situ* de *Haplosporidium nelsoni*

A hibridização *in situ* é o método indicado para confirmar a identificação de *H. nelsoni*, porque ele permite a visualização da hibridização de uma sonda específica com o organismo alvo. As sondas de DNA devem ser cuidadosamente testadas quanto à especificidade e validadas através de estudos comparativos antes que possam ser usadas na identificação confirmatória.

A hibridização *in situ* foi desenvolvida recentemente para diferenciar plasmódios de *H. nelsoni* dos de *H. costale* em tecidos seccionados (19, 20). Oligonucleotídeos espécie-específicos, marcados e usados como sondas, hibridizam com o RNA ribossomal do parasito, localizado na subunidade menor do ribossomo. Esta hibridização é detectada por um anticorpo conjugado que reconhece as sondas marcadas. O substrato para o anticorpo conjugado é adicionado, causando uma reação colorimétrica que permite a visualização da hibridização do RNA-parasita com a sonda.

O procedimento para hibridização *in situ* é feito como segue abaixo. Controles, positivo e negativo, devem estar inclusos nos procedimentos.

- i) Cortar uma secção transversal através da massa visceral e colocar em um frasco com fixador de Davidson AFA (glicerina [10%], formalina [20%], 95% etanol [30%], dH₂O [30%], ácido acético glacial [10%]) por 24-48 horas, e então transferir para etanol 70% até realizar os procedimentos de inclusão histológica (passo ii). A proporção não deve ser mais do que 1 volume de tecido para 10 volumes de fixador.
- ii) As amostras são, subseqüentemente, embebidas em parafina por procedimentos convencionais de histologia. Fazer cortes de 5-6 µm e colocá-los sobre lâminas positivamente carregadas ou lâminas cobertas com 3-aminopropil-trietosilano. Os cortes histológicos são então secos durante a noite em estufa a 40°C.
- iii) Os cortes são desparafinados por imersão em xilol ou outro produto diafanizador menos tóxico, por 10 minutos. O solvente é eliminado por imersão em dois banhos sucessivos em etanol absoluto, por 10 minutos cada e reidratados por imersão em uma série de banhos em etanol. Os cortes são então lavados duas vezes por 5 minutos, em solução salina tamponada com fosfato (PBS).

- iv) Os cortes são tratados com proteinase K, 50 µg/ml em PBS, a 37°C por 15 minutos. A reação é interrompida por lavagem dos cortes em PBS com 0,2% de glicina por 5 minutos. Os cortes são colocados em 2 x SSC (solução salina com citrato sódico) por 10 minutos.
- v) Os cortes são pré-hibridizados por 1 hora, a 42°C em solução de pré-hibridização (4 x SSC, 50% formamida, 5 x solução de Denhardt, 0,5 mg/ml de RNAt de levedura, e 0,5 mg/ml de DNA de esperma de arenque termo-desnaturado).
- vi) A solução de pré-hibridização é substituída por tampão de pré-hibridização contendo 2ng/µl da sonda de oligonucleotídeo marcado com digoxigenina. A seqüência da sonda designada **MSX1347** (19) é 5'-ATG-TGT-TGG-TGACGC-TAA-CCG-3'. Os cortes são cobertos com lamínulas plásticas de hibridização *in situ* e colocados em uma placa aquecida ou banho seco a 90°C, por 12 minutos. As lâminas são resfriadas sobre gelo por 1 minuto, antes da hibridização durante a noite a 42°C, em uma câmara úmida.
- vii) Os cortes são lavados duas vezes por 5 minutos cada em 2 x SSC à temperatura ambiente, duas vezes por 5 minutos cada em 1 x SSC à temperatura ambiente, e duas vezes por 10 minutos cada em 0,5 x SSC a 42°C. Os cortes são colocados em tampão 1 (Tris 100 mM pH 7,5, NaCl 150 mM) por 1-2 minutos.
- viii) Os cortes são colocados em tampão 1 (ver passo vii) suplementados com 0,3% de Triton X-100 e 2% de soro de ovelha por 30 minutos. O anticorpo anti-digoxigenina conjugado com fosfatase alcalina é diluído 1/500 (ou de acordo com o manual do fabricante) em tampão 1 suplementado com 0,3% de Triton X-100 e 1% de soro de ovelha e aplicado nos cortes do tecido. Os cortes são cobertos com lamínulas de hibridização *in situ* e incubados por 3 horas à temperatura ambiente em câmara úmida.
- ix) As lâminas são lavadas duas vezes em tampão 1 por 5 minutos cada (ver passo vii) e duas vezes em tampão 2 (Tris 100 mM, pH 9,5, NaCl 100 mM, MgCl₂ 50 mM) por 5 minutos cada. As lâminas são, então, colocadas em uma solução para desenvolvimento de cor (337,5 µg/ml de NBT, 175 µg/ml de de sal 5-bromo-4-cloro-3-indol-fosfato-toluidina - BCIP, 240 µg/ml de levamisol em tampão 2) por 2 horas no escuro. A reação de coloração é interrompida por lavagem em tampão TE (Tris 10 mM, pH 8,0, EDTA 1 mM).

- x) As lâminas são lavadas em dH₂O. Os cortes são contra-corados com Bismarck Brown Y, lavados em dH₂O, e laminulas são aplicados usando um meio de montagem aquoso. A presença de *H. nelsoni* é demonstrada pela coloração púrpura-negra das células do parasita.

REFERÊNCIAS

1. Andrews J.D. & Wood J.L. (1967). Oyster mortality studies in Virginia. VI. History and distribution of *Minchinia nelsoni*, a pathogen of oysters in Virginia. **Chesapeake Sci.**, **8**: 1-13.
2. Barber B.J., Kanaley S.A. & Ford S.E. (1991). Evidence for regular sporulation by *Haplosporidium nelsoni* (MSX) (Acestospora: Haplosporidiidae) in spat of the American oyster, *Crassostrea virginica*. **J. Protozool.**, **38**:305-306.
3. Burreson E.M. (1994). Further evidence of regular sporulation by *H. nelsoni* in small oysters, *C. virginica*. **J. Parasitol.**, **80**: 1036-1038.
4. Burreson E.M., Robinson M.E. & Villalba A. (1988). A comparison of paraffin histology and hemolymph analysis for the diagnosis of *Haplosporidium nelsoni* (MSX) in *Crassostrea virginica* (Gmelin). **J. Shellfish Res.**, **7**: 19-23.
5. Burreson E.M., Stokes N.A. & Friedman C.S. (2000). Increased virulence in an introduced pathogen: *Haplosporidium nelsoni* (MSX) in the eastern oyster *Crassostrea virginica*. **J. Aquat. Anim. Health**, **12**: 1-8.
6. Comps M. & Pichot Y. (1991). Fine spore structure of a haplosporidian parasitizing *Crassostrea gigas*: taxonomic implications. **Dis. Aquat. Org.**, **11**: 73-77.
7. Ford S.E. (1985). Effects of salinity on survival of the MSX parasite *Haplosporidium nelsoni* (Haskin, Stauber, and Mackin) in oysters. **J. Shellfish Res.**, **2**: 85-90.
8. Ford S.E. & Haskin H.H. (1982). History and epizootiology of *Haplosporidium nelsoni* (MSX), an oyster pathogen in Delaware Bay, 1957-80. **J. Invertebr. Pathol.**, **40**: 118-141.
9. Ford S.E. & Tripp M.R. (1996). Diseases and defense mechanisms. In: **The Eastern Oyster *Crassostrea virginica***, Kennedy V.S., Newell R.I.E. & Eble A.F., eds. Maryland Sea Grant College, College Park, Maryland, USA, 581-660.
10. Friedman C.S. (1996). Haplosporidian infections of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), in California and Japan. **J. Shellfish Res.**, **15**: 597-600.
11. Friedman C.S., Cloney D.F., Manzer D. & Hedrick R.P. (1991). Haplosporidiosis of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. **J. Invertebr. Pathol.**, **58**: 367-372.
12. Haskin H.H. & Andrews J.D. (1988). Uncertainties and speculations about the life cycle of the eastern oyster pathogen *Haplosporidium nelsoni* (MSX). In: **Disease Processes**

in Marine Bivalve Molluscs, Fisher W.S., ed. Amer. Fish. Soc. Spec. Publ. 18. Bethesda, Maryland, USA, 5-22.

13. Haskin H.H. & Ford S.E. (1982). *Haplosporidium nelsoni* (MSX) on Delaware Bay seed oyster beds: a host-parasite relationship along a salinity gradient. **J. Invertebr. Pathol.**, **40**: 388-405.
14. Haskin H.H., Stauber L.A. & Mackin J.A. (1966). *Minchinia nelsoni* sp. n. (Haplosporida, Haplosporidiidae): causative agent of the Delaware Bay oyster epizootic

Enfermidade SSO (*Haplosporidium costale*)

INFORMAÇÕES GERAIS

A enfermidade SSO é causada pelo protista *Haplosporidium costale* (= *Minchinia costalis*) (13) do filo Haplosporidia. *Haplosporidium costale*, comumente conhecido como SSO (seaside organism) e infecta a ostra *Crassostrea virginica* (3).

A distribuição geográfica de *H. costale* está em baías com alta salinidade (25‰) ao longo da costa leste da América do Norte da Virginia, USA, a Nova Escócia, Canadá (2, 7). Mortalidades significantes em ostras são atribuídas à enfermidade SSO, que tem historicamente estado restrita a costa da Virginia, Maryland e Delaware, USA (2, 3), mas mortalidades significantes atribuídas a SSO recentemente ocorreram em Massachusetts, EUA.

O estágio plasmodial de *H. costale* ocorre intercelularmente no tecido conjuntivo da glândula digestiva, manto e gônada (3, 11); Esporos ocorrem por todo tecido conjuntivo dos nos mesmos órgãos (2, 3, 10). *Haplosporidium costale* tem sazonalidade limitada. As ostras infectam-se em maio e junho, às vezes quando os esporos são eliminados de ostras moribundas previamente infectadas (3, 6). As infecções apresentam vestígios subclínicos ao longo do outono e inverno. Então, o plasmódio se desenvolve nos meses de março/abril, seguido por esporulações sincrônicas e mortalidade das ostras em maio/junho (2, 3, 6). Esta sazonalidade epizootológica pode ser mais complicada do que foi historicamente percebida. A esporulação de *H. costale* tem sido recentemente detectada, e verificada usando testes/ferramentas moleculares, em ostras coletadas em outubro (11, 12).

A distribuição de *H. costale* e *H. nelsoni* (o agente causador da enfermidade MSX) tem coincidido em áreas de alta salinidade da Virginia, USA, à Nova Escócia, Canadá, e co-infecções com ambos os patógenos têm sido reportadas (5, 6, 11). Os patógenos podem ser facilmente diferenciados durante a esporulação. *Haplosporidium costale* esporula por todo tecido conjuntivo da maioria dos órgãos, enquanto *H. nelsoni* esporula somente no epitélio dos túbulos digestivos (1, 3, 5). Todavia, os estágios plasmodiais destes dois patógenos não podem ser diferenciados de forma confiável com base na morfologia (5), e o diagnóstico definitivo na ausência de esporos requer ferramentas moleculares (11, 12).

A esporulação rompe o tecido conjuntivo e a alta prevalência de esporos em ostras mortas sugere que a esporulação resulta na morte da ostra. A esporulação é vista como o resultado final de todas as infecções de *H. costale* (1) e desta forma, as infecções são invariavelmente fatais (7).

Não foi possível, ainda, transmitir *H. costale* experimentalmente em laboratório. O ciclo vital não foi elucidado para qualquer membro do filo Haplosporidia, mas suspeita-se da existência de um hospedeiro intermediário (7).

Para diagnóstico, recomenda-se usar o guia de amostras contidos nos Capítulo 1.1.4 e Capítulo 1.2., do Manual Aquático.

PROCEDIMENTOS DE EXAME

1. Métodos de Varredura

1.1. Exame Histológico

Os procedimentos gerais para histologia estão detalhados no Capítulo 1.2. do Manual Aquático. Cortar uma secção transversal através da massa visceral e coloque em um fixador como solução de Davidson ou Carson (mais tarde as amostras podem ser reutilizadas para microscopia eletrônica, se necessário). A proporção não deve ser a mais do que 1 volume de tecido para dez volumes de fixador. O material é subsequencialmente tratado pelos procedimentos convencionais de histologia (4). Os Haplosporidia são indicados por muitos corantes não específicos, como hematoxilina e eosina (HE).

O plasmódio multinucleado de *Haplosporidium costale* (geralmente com 5-8 µm de diâmetro) ocorre em todo o tecido conjuntivo. Os plasmódios são facilmente detectados, somente, entre março e junho. Sincronia na esporulação de *H. costale* pode ser observada em todo tecido conjuntivo da glândula digestivo, manto e gônadas. A esporulação não ocorre no epitélio dos túbulos digestivos, como ocorre com os esporos de *H. nelsoni* (1, 10). Os esporos (3 x 5 µm de tamanho) são encontrados normalmente em ostras abertas e moribundas. O parasita não pode ser detectado, com facilidade, entre julho e março (1, 3). Todavia, infecções de *H. costale* têm co-ocorrido com as de *H. nelsoni*, sendo recentemente reportadas em Outubro (11, 12). O plasmódio de *H. costale* não pode ser facilmente diferenciado dos de *H. nelsoni* com base em sua morfologia.

A intensidade da infecção tem sido classificada como:

1. **localizada (LO)** = qualquer infecção onde o plasmódio está localizado em uma pequena área em um tipo de tecido;
2. **rara (R)** = infecções sistemáticas com menos do que dez plasmódios dentro

da secção;

3. **leve (L)** = infecções sistemáticas com menos do que dois plasmódios por campo em aumento de 400X, mas mais do que dez plasmódios em toda a secção;
4. **moderada (M)** = infecções sistemáticas com 2-5 plasmódios por campo, em aumento de 400X;
5. **pesada (H)** = mais do que cinco plasmódios por campo em aumento de 400X;
6. **esporulação (S)** = qualquer infecção onde os esporos estão presentes.

2. Métodos de Diagnóstico Presuntivo

2.1. Histologia

Quando os esporos estão presentes, *H. costale* pode ser presuntivamente diagnosticado na ostra *Crassostrea virginica*, se os esporos tiverem o tamanho correto e ocorrerem em todo o tecido conjuntivo. Para os procedimentos histológicos detalhados, ver a Secção 1.1. deste Capítulo e Capítulo 1.2. do Manual Aquático.

2.2. PCR do DNA de tecido de ostra

Um resultado positivo através da reação em cadeia da polimerase (PCR) é somente um diagnóstico presuntivo, porque ela detecta DNA e não necessariamente um patógeno viável. Outras técnicas, preferencialmente hibridização *in situ*, devem ser usadas para visualizar o patógeno.

Dois conjuntos de iniciadores de PCR foram desenvolvidos para detecção de *H. costale*: **SSO1358F** (5'-TAC-TGC-TAG-CGC-TTG-TTC-GCA-AGA-T-3'), **SSO1507R** (5'-TCG-GGT-CGG-CCC-GCT-GAC-TGG-GT-3') (8) e **SSO-A** (5'-CAC-GAC-TTT-GGC-AGT-TAG-TTT-TG-3'), **SSO-B** (5'-CGA-ACA-AGC-GCT-AGC-AGT-ACA-T-3') (11). Ambos os pares de iniciadores têm como alvo o DNA da subunidade menor do ribossomo e têm se mostrado sensíveis e específicos para este patógeno (8, 11). Um PCR múltiplo (9) foi desenvolvido para *H. costale* e *H. nelsoni* (MSX), usando um desenvolvido previamente para SSO (8), mas ele não foi validado. As reações de PCR contêm tampão de reação (Tris 10 mM, pH 8.3;

KCl 50 mM; MgCl₂ 1.5 mM; 10 µg/ml gelatina), 400 µg/ml de albumina de soro bovino, 25 pmoles cada de **SSO1358F** e **SSO1507R** ou **SSO-A** e **SSO-B**, 200 µM de cada dATP, dCTP, dGTP, dTTP, 0.6 unidades AmpliTaq DNA polimerase (Applied Biosystems), e DNA molde, em um volume final de 25 µl. Os reagentes são colocadas em um termo-ciclador. O programa "GeneAmp PCR System 9600" (Applied Biosystems) do termo-ciclador, usando **SSO-A** e **SSO-B**, inicia-se com a desnaturação a 94°C por 4 minutos, seguida de 35 ciclos de 94°C durante 30 segundos, 59°C por 30 segundos, e 72°C durante 1,5 minutos, e uma extensão final a 72°C por 5 minutos. O programa do ciclo é idêntico, quando **SSO1358F** e **SSO1507R** estão em uso, exceto a temperatura de renaturação que é de 55°C. Uma alíquota (10% do volume da reação) de cada reação de PCR é submetida a eletroforese em gel de agarose, o qual é corado com brometo de etídio para visualizar os produtos amplificados. Neste caso, 150 bp para o par **SSO1358F** e **SSO1507R** ou 557 bp para o par **SSO-A** e **SSO-B**.

3. Confirmação da Identificação do Patógeno

3.1. Exame da hibridização *in situ* de *Haplosporidium costale*

A hibridização *in situ* é o método indicado para confirmar a identificação do parasito, por que ela permite a visualização de uma sonda específica que hibridiza com o organismo alvo. As sondas de DNA devem ser cuidadosamente testadas quanto à especificidade e validadas em estudos comparativos, antes de serem utilizadas na identificação confirmatória.

A hibridização *in situ* foi desenvolvida recentemente, para diferenciar plasmódios de *H. costale* dos de *H. nelsoni* em cortes histológicos de tecidos (11). Oligonucleotídeos espécie-específicos, marcados e usados como sondas, hibridizam com o RNA ribossomal do parasito localizado na subunidade menor do ribossomo. Esta hibridização é detectada por um anticorpo conjugado que reconhece as sondas marcadas. O substrato para o anticorpo conjugado é adicionado, causando uma reação colorimétrica que permite a visualização da hibridização do RNA parasita com a sonda.

- i) Corte uma secção transversal através da massa visceral incluindo manto, brânquias e glândula digestiva. Coloque na solução fixadora de Davidson

AFA (glicerina [10%], formalina [20%], 95% etanol [30%], dH₂O [30%], ácido acético glacial [10%]) por aproximadamente 24 horas. Transfira o material para etanol 70%, antes de realizar os procedimentos histológicos (passo ii). A proporção não deve ser superior a 1 volume de tecido para dez volumes de fixador.

- ii) As amostras são, subseqüentemente, embebidas em parafina por procedimentos convencionais de histologia. Fazer cortes de 5-6 µm e colocá-los sobre lâminas positivamente carregadas ou cobertas com 3-aminopropil-trietosilano. Os cortes histológicos são então secos durante a noite, em uma estufa a 40°C.
- iii) Os cortes são desparafinados por imersão em xilol ou outro produto diafanizador menos tóxico, por 10 minutos. O solvente é eliminado por imersão em dois banhos sucessivos em etanol absoluto, por 10 minutos cada e reidratados por imersão em uma série de banhos em etanol. Os cortes são então lavados duas vezes por 5 minutos, em solução salina com tampão fosfato (PBS).
- iv) Os cortes são tratados com proteinase K, 50 µg/ml em PBS, a 37°C por 15 minutos. A reação é interrompida por lavagem dos cortes em PBS com 0,2% glicina por 5 minutos. Os cortes são colocados em 2 x SSC (solução salina com citrato de sódio) por 10 minutos.
- v) Os cortes são pré-hibridizados por 1 hora, a 42°C em solução de pré-hibridização (4 x SSC, 50% formamida, 5 x solução de Denhardt, 0.5 mg/ml de RNAt de levedura, e 0,5 mg/ml de DNA de esperma de arenque termo-desnaturado DNA).
- vi) A solução de pré-hibridização é substituída por tampão de pré-hibridização contendo 5 ng/µl da sonda de oligonucleotídeo marcada com digoxigenina. A seqüência da sonda designada de **SSO1318** (11) é 5'-CGA-ACA-AGC-GCT-AGC-AGT-ACA-T-3'. Os cortes são cobertos com lamínula plástica de hibridização *in situ* e colocados em uma placa aquecida a 90°C, por 12 minutos. As lâminas são resfriadas sobre gelo por 1 minuto, antes da hibridização, durante a noite, a 42°C, em uma câmara úmida.
- vii) Os cortes são lavados duas vezes por 5 minutos cada em 2 x SSC à temperatura ambiente, duas vezes por 5 minutos cada em 1 x SSC à

temperatura ambiente, e duas vezes por 10 minutos cada em 0.5 x SSC a 42°C.. Os cortes são colocados em tampão 1 (Tris 100 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM) por 1-2 minutos.

- viii) Os cortes são colocados em tampão 1 (ver passo vii) suplementados com 0,3% de Triton X-100 e soro de ovelha 2%, por 30 minutos. O anticorpo anti-digoxigenina conjugado com fosfatase alcalina é diluído 1/500 (ou de acordo com o manual do fabricante) em tampão 1 suplementado com 0,3% de Triton X-100, com soro de ovelha 1% e aplicado nos cortes do tecido. Os cortes são cobertos com lamínulas de hibridização *in situ* e incubados por 3 horas à temperatura ambiente em câmara úmida.
- ix) As lâminas são lavadas duas vezes em tampão 1 por 5 minutos cada (ver passo vii) e duas vezes em tampão 2 (Tris 100 mM, pH 9,5, NaCl 100 mM, MgCl₂ 50 mM) por 5 minutos cada. As lâminas são então colocadas em uma solução para desenvolvimento de cor (337,5 µg/ml de nitroblue tetrazolium - NBT, 175µg/ml de sal 5-bromo-4-cloro-3-indol-fosfato-toluidina - BCIP, 240 µg/ml de levamisol em tampão 2) por 2 horas no escuro. A reação de coloração é parada por lavagem em tampão TE (Tris 10 mM, pH 8,0; EDTA 1mM [ácido etileno diamino tetra-acético]).
- x) As lâminas são lavadas em dH₂O. Os cortes são contra-corados com Bismarck Brown Y, lavados em dH₂O, e as lamínulas são aplicados usando um meio de montagem aquoso. A presença de *H. costale* é demonstrado pela marcação púrpura-negra das células do parasita.

REFERÊNCIAS

1. Andrews J.D. (1982). Epizootiology of late summer and fall infections of oysters by *Haplosporidium nelsoni*, and comparison to annual life cycle of *Haplosporidium costalis*, a typical haplosporidan. **J. Shellfish Res.**, **2**: 15-23.
2. Andrews J.D. (1988). *Haplosporidium costale* disease of oysters. In:

4. Burreson E.M., Robinson M.E. & Villalba A. (1988). A comparison of paraffin histology and hemolymph analysis for the diagnosis of *Haplosporidium nelsoni* (MSX) in *Crassostrea virginica* (Gmelin). **J. Shellfish Res.**, **7**: 19-23.
5. Couch J.A. (1967). Concurrent haplosporidian infections of the oyster, *Crassostrea virginica* (Gmelin). **J. Parasitol.**, **53**: 248-253.
6. Couch J.A. & Rosencampo A. (1968). Epizootiology of *Minchinia costalis* and *Minchinia nelsoni* in oysters introduced into Chincoteague Bay, Virginia. **Proc. Natl. Shellfish. Assoc.**, **58**: 51-59.
7. Ford S.E. & Tripp M.R. (1996). Diseases and defense mechanisms. In: **The Eastern Oyster *Crassostrea virginica***, Kennedy V.S., Newell R.I.E. & Eble A.F., eds. Maryland Sea Grant College, College Park, Maryland, USA, 581-660.
8. Ko Y.-T., Ford S.E. & Fong D. (1995). Characterization of the small subunit ribosomal RNA gene of the oyster parasite *Haplosporidium costale*. **Molec. Marine Biol. Biotechnol.**, **4**: 236-240.
9. Penna M.-S., Khan M. & French R.A. (2001). Development of a multiplex PCR for the detection of *Haplosporidium nelsoni*, *Haplosporidium costale* and *Perkinsus marinus* in the eastern oyster (*Crassostrea virginica*, Gmelin, 1791). **Molec. Cell. Probes**, **15**: 385-390.
10. Perkins F.O. (1969). Electron microscope studies of sporulation in the oyster pathogen *Minchinia costalis* (Sporozoa: Haplosporida). **J. Parasitol.**, **55**: 897-920.
11. Stokes N.A. & Burreson E.M. (2001). Differential diagnosis of mixed *Haplosporidium costale* and *Haplosporidium nelsoni* infections in the eastern oyster, *Crassostrea virginica*, using DNA probes. **J. Shellfish Res.**, **20**: 207-213.
12. Sunila I., Stokes N.A., Smolowitz R., Karney R. C., & Burreson E.M. (2002). *Haplosporidium costale* (Seaside Organism), a parasite of the eastern oyster, is present in Long Island Sound. **J. Shellfish Res.**, **21**: 113-118.
13. Wood J.L. & Andrews J.D. (1962). *Haplosporidium costale* (Sporozoa) associated with a disease of Virginia oysters. **Science**, **136**: 710-711.

LÂMINAS SILANADAS (AMINOALKISILANO)

INFORMAÇÕES GERAIS

Recomendado para preparações com ciliados, bem como em seções de tecidos para histologia ou imuno-histoquímica.

PROCEDIMENTOS DE PREPARAÇÃO

1. Limpar as lâminas em *álcool ácido (vide fórmula abaixo);
2. Mergulhe as lâminas em solução de aminoalkisilano

- HCl concentrado, peso específico 1,19 1,0ml

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

HOWARD, D.W.; LEWIS, E.J.; KELLER, B.J.; SMITH, C.S. 2004 **Histological techniques for marine bivalve mollusks and crustaceans**. Oxford: NOAA technical Memorandum NOS NCCOS. 5: 76 -77p.

MARTEILIOSE (*Marteilia refringens* e *M. sydneyi*)

INFORMAÇÕES GERAIS

Marteiliose aqui, refere-se a enfermidades causadas por *Marteilia refringens* e *M. sydneyi*. Outras *Marteilia* spp., infectam ostras e outros bivalves. Até é conhecido sobre a identidade, biologia e patologia destes outros *Marteilia* spp.. A presença destes patógenos, em qualquer bivalve, deveria ser considerada e o Laboratório de Referência da OIE deveria ser consultado.

Marteiliose é primariamente causado por dois protistas parasitas do gênero *Marteilia*: *M. refringens* e *M. sydneyi* (filo Paramyxia) (3, 11, 12, 26, 30). Marteiliose também é conhecida como enfermidade Aber (*M. refringens*), e enfermidade QX (*M. sydneyi*).

A espécie tipo do gênero, *M. refringens*, é um parasita letal da ostra plana Européia, *Ostrea edulis* (12). *Marteilia sydneyi* infecta *Saccostrea glomerata* (= *commercialis*) e, possivelmente também, *Saccostrea echinata* (30, 31).

Encontra-se *M. maurini* (9) parasitando *Mytilus galloprovincialis* e *Mytilus edulis* tem sido descrito da França, Itália e Espanha (21). Como não é fácil distinguir *M. maurini* de *M. refringens*, a detecção do parasito em mexilhões requer diagnóstico de confirmação, como descrito neste capítulo. *Marteilia lengehi* (7, 16) em *Saccostrea cucullata* do Golfo Pérsico e Austrália Ocidental, e *M. christenseni* (8) em *Scrobicularia plana* da França pode aparentemente ser diferenciado de outras espécies pelas características do conteúdo citoplasmático dos esporângios e morfologia dos esporos. *Marteilia* spp. têm sido descritas nas seguintes espécies: *Tiostrea chilensis* (13), *Ostrea angasi* (5), *O. puelchana* (25), *Cerastoderma* (= *Cardium*) *edule* (10), *Mytilus edulis* (10, 22), *Mytilus galloprovincialis* (29), *Crassostrea gigas* (6) e *C. virginica* (27). Um protista similar a *M. sydneyi* foi reportado no bivalve gigante *Tridacna maxima* (24). A vieira *Argopecten gibbus*, é infectada por um tipo de *Marteilia* sp. na Florida, Estados Unidos da América, que não foi identificada ao nível de espécie (23).

A distribuição geográfica de *M. refringens* é: França, Grécia, Itália, Marrocos, Portugal, e Espanha. *Marteilia sydneyi* é encontrada em New South Wales, Queensland e Austrália Ocidental.

Marteilia refringens e *M. sydneyi* esporulam no epitélio da glândula digestiva, onde a infecção está associada com um baixo índice de condição, emaciação da ostra, exaustão das reservas de energia (glicogênio), descoloração da glândula digestiva, parada no crescimento e mortalidade. A mortalidade parece estar relacionada à esporulação do parasita (12). O sítio inicial de infecção de *M. sydneyi* está no epitélio dos palpos e das brânquias e os estágios de pré-esporulação são encontrados em todo o tecido conjuntivo e epitélio da glândula digestiva

(18). Os estágios de pré-esporulação de *M. refringens* ocorrem no epitélio dos palpos labiais, estômago, ductos digestivos e possivelmente nas brânquias. Ostras infectadas com *M. sydneyi* e *M. refringens* tem uma pobre condição com completa reabsorção das gônadas (28). A invasão massiva de *M. sydneyi* leva a completa desorganização do epitélio da glândula digestiva. A morte resulta da inanição sob 60 dias após o início da infecção.

O período de infecção para *M. refringens* em *Ostrea edulis* está confinada a primavera e verão, quando a temperatura da água é maior que 17°C (1, 12, 14). As ostras podem ser infectadas com *M. sydneyi* no verão e início do outono. Entretanto, a enfermidade não é sazonal; ocorre forte mortalidade e esporos podem ser encontrados ao longo do ano. Salinidade alta limita o desenvolvimento de *Marteilia* spp.

O modo de infecção e o ciclo vital fora do hospedeiro são desconhecidos. Em função disto não tem sido possível transmitir a enfermidade experimentalmente em laboratório. Existe a possibilidade de haver hospedeiros intermediários (2, 4, 14, 22, 28).

Para

digestivos, intestino e estômago. Estágios esporulantes de *M. refringens* e *M. sydneyi* podem ser encontrados no epitélio dos túbulos digestivos. Esporângios livres também podem ser observados no lúmen do intestino. A característica única da clivagem interna para produzir células dentro de células durante a esporulação, diferencia *Marteilia* spp. de todos os outros protistas.

2. Métodos de Diagnóstico Presuntivo

2.1. Histologia

Ver Secção 1.1. abaixo

2.2. Exame citológico: “imprints” de tecidos

Ordem de preparação das lâminas: cortar uma secção através da glândula digestiva, remover o excesso de água por colocação da amostra em papel absorvente, então pressione a amostra, correspondente a secção que passa através do trato digestivo, na lâmina. As lâminas são secas ao ar e então fixadas em metanol (2-3 minutos).

As amostras são coradas usando um kit comercial disponível para corar células sangüíneas de acordo com as instruções do fabricante. Após a coloração, enxaguar com água de torneira, seguido de secagem completa e cobrir com uma lamínula usando uma resina sintética apropriada.

O tamanho do parasita é de 5-8 µm nos estágios iniciais e pode chegar a 40 µm durante a esporulação. O citoplasma das células tem coloração basofílica e o núcleo, eosinofílico. As células secundárias ou esporoblastos são circundados por um halo brilhante (a coloração pode ficar muito leve em função do corante usado). Observações por 10 minutos, por lâmina são consideradas suficiente.

3.

Confirmação da Identificação do Patógeno

3.1. Exame por Hibridização *in situ* de *Marteilia* spp.

http://www.oie.int/eng/normes/fmanual/A_00039.htm

Um ensaio de hibridização *in situ* pode ser realizado para avaliar a afiliação taxonômica dos organismos observados ao nível de gênero (20). Estudos

situ. A produção da sonda é feita através da reação em cadeia da polimerase (PCR), usando os iniciadores **SS2** (5'-CCG-GTG-CCA-GGT-ATA-TCT-CG-3') e **SAS1** (5'-TTC-GGG-TGG-TCT-TGA-AAG-GC-3'). A reação de PCR é realizada como descrito na Secção 3.2., a partir *M. refringens* purificada do DNA de *Ostrea edulis*, exceto pela adição de 1 µl de digoxigenina-dUTP (DIG-dUTP) 25 mM à reação.

A sonda **ITS 1** (espaçador interno transcrito) de *M. sydneyi* é usada para detectar especificamente este indivíduo, dentre as espécies relatadas. A sonda é obtida pela reação em cadeia da polimerase (PCR) usando os iniciadores **PRO2** (5'-TCA-AGG-GAC-ATC-CAA-CGG-TC-3') e **LEG1** (5'-CGA-TCT-GTG-TAG-TCG-GAT-TCC-GA-3'). A reação de PCR é realizada como descrita na Secção 3.2., a partir *M. sydneyi* purificada do DNA de *Saccostrea glomerata*, exceto pela adição de 1 µl de digoxigenina-dUTP (DIG-dUTP) 25 mM à reação.

A hibridização *in situ* é realizada como segue. Controles positivos e negativos devem ser incluídos nos procedimentos.

Para a sonda **Smart 2**, a massa visceral do molusco é fixada com Davidson AFA (glicerina [10%], formalina [20%], 95° etanol [30%], dH₂O [30%], e ácido acético glacial [10%]) ou formalina 10% tamponada por aproximadamente 24 horas. Em seguida é embebida em parafina. Cortes de 5 µm são colocados sobre lâminas silanadas (cobertas com aminoalkilsilano / aminopropiltriétoxi-silano) e então mantidos durante a noite em estufa a 40°C. Os cortes são desparafinados por imersão em xileno por 10 minutos. Este passo é repetido mais uma vez e o solvente é eliminado por imersão em dois banhos sucessivos, em etanol absoluto por 10 minutos cada. Os cortes são reidratados por imersão em uma série de etanóis. Em seguida são tratados com proteinase K (100 µg/ml) em tampão TE (Tris [50 mM], ácido etileno diamino tetra-acético [EDTA, 10 mM]), a 37°C por 30 minutos. As lâminas são desidratadas por imersão em uma série de etanóis e secas ao ar. Os cortes são incubados em 100 µl de tampão de hibridização (4 x SSC [solução salina com citrato de sódio], formamida 50%, 1x solução de Denhardt, 250 µg/ml de RNAt de levedura, sulfato de dextran 10% contendo 10 ng (1 µl de reação de PCR) de digoxigenina marcada para o teste. As lâminas são cobertas com lamínula plástica para hibridização *in situ* e

colocadas sobre uma placa aquecida ou banho seco a 95°C por 5 minutos. As lâminas são então resfriadas no gelo por 1 minuto antes da hibridização durante a noite, a 42°C em uma câmara úmida. As lâminas são lavadas duas vezes por 5 minutos em 2 x SSC, a temperatura ambiente, e uma vez por 10 minutos em 0.4 x SSC a 42°C. As etapas de detecção serão executadas conforme instruções do fabricante. As lâminas são lavadas em dH₂O. Os cortes são contra-corados com Bismarck Brown Y, lavadas em dH₂O e cobertos com lamínula usando um meio aquoso de montagem. A presença de *Marteilia* sp. é demonstrada pela coloração púrpuro-negra das células do parasita.

3.2. Polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição, obtidos pela reação em cadeia da polimerase (RFLP-PCR) para *Marteilia refringens*/*M. sydneyi* e discriminação para *M. refringens*/*M. maurini*.

Ensaio de polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição realizados a partir de fragmentos obtidos por PCR (RFLP-PCR) foram desenvolvidos para diferenciar *M. refringens* de *M. maurini* (21). Um ensaio de PCR foi desenvolvido para detectar especificamente *M. sydneyi* (17-19).

Para extração de DNA, animais infectados são congelados a -80°C e os tecidos são pulverizados. Cerca de 10 volumes de tampão de extração (NaCl [100 mM], EDTA [25 mM], pH 8, SDS, 0,5%) são adicionados com proteinase K (100 µg/ml). Após uma incubação durante a noite, a 50°C, o DNA é extraído usando um protocolo padrão fenol/clorofórmio e precipitado com etanol.

O PCR é realizado em um volume de 50 µl. Após a desnaturação do DNA a 94°C por 5 minutos, realiza-se 30 ciclos como descrito a seguir: desnaturação a 94°C por 1 minuto, pareamento a 55°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto por par de kilo-base. Uma extensão final de 10 minutos, a 72°C, é realizada.

Para a detecção de *M. refringens*, o PCR é realizado com iniciadores (4 + 5), cujo alvo é a seqüência **ITS 1** (4: 5'-CCG-CAC-ACG-TTC-TTC-ACT-CC-3' e 5: 5'-CTC-GCG-AGT-TTC-GAC-AGA-CG-3').

Para detecção de *M. sydneyi*, o PCR é realizado com os iniciadores **LEG1** (5'-CGA-TCT-GTG-TAG-TCG-GAT-TCC-GA-3') e **PRO2** (5'-TCA-AGG-GAC-ATC-CAA-CGG-TC-3') cujo alvo é a seqüência ITS.

Para diferenciar *M. refringens* de *M. maurini*, o polimorfismo entre os produtos de PCR é identificado através de clivagem com a enzima de restrição Hha1. Os fragmentos de restrição resultantes são analisados por eletroforese em gel de agarose a 2%. O perfil correspondente a *M. maurini* exibe três bandas de 156, 157 e 68 bp, respectivamente, enquanto o de *M. refringens* mostra duas bandas de: 226 e 156 bp, respectivamente.

3.3. Exame por Microscopia Eletrônica

Os procedimentos para microscopia eletrônica de transmissão estão no Capítulo 1.2, do Manual Aquático da OIE.

Marteilia sydneyi pode ser diferenciada de *M. refringens* pela falta de inclusões estriadas no plasmódio, formação de 8-16 esporângios primordiais por plasmódio (ao invés de 8 para *M. refringens*), ocorrência de 2-3 esporos em cada esporângio (em lugar de 4 em *M. refringens*), e a presença de uma capa pesada de membranas concêntricas ao redor do esporo maduro de *M. sydneyi*.

REFERÊNCIAS

1. Audemard C., Barnaud A., Collins C.M., Le Roux F., Sauriau P.G., Coustau C., Blachier P. & F. Berthe (2001). Claire ponds as an experimental model for *Marteilia refringens* life-cycle studies: new perspectives. **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.**, **257**: 87-108.
2. Audemard C., Le Roux F., Barnaud A., Collins C.M., Sautour B., Sauriau P.G., de Montaudoin X., Coustau C., Combes C. & F. Berthe (2002). Needle in a haystack: involvement of the copepod *Paracartia grani* in the life cycle of the oyster pathogen *Marteilia refringens*. **Parasitology**, **124**: 315-323.
3. Berthe F.C.J., Le Roux F., Peyretailade E., Peyret P., Rodriguez D., Gouy M. & Vivares C.P. (2000). The existence of the phylum Paramyxea Desportes and Perkins, 1990 is validated by the phylogenetic analysis of the *Marteilia refringens* small subunit ribosomal RNA. **J. Euk. Microbiol.**, **47**: 288-293.
4. Berthe F.C.J., Pernas M., Zerabib M., Haffner P., Thebault A. & Figueras A.J. (1998). Experimental transmission of *Marteilia refringens* with special considerations for its life cycle. **Dis. Aquat. Org.**, **34**: 135-144.
5. Bougrier S., Tige G., Bachere E. & Grizel H. (1986). *Ostrea angasi* acclimatization to French coasts. **Aquaculture**, **58**: 151-154.
6. Cahour A. (1979). *Marteilia refringens* and *Crassostrea gigas*. **Mar. Fish Rev.**, **41**: 19-20.

7. Comps M. (1976). *Marteilia lengehi* n. sp. parasite de l'huitre *Crassostrea cucullata* Born. **Rev. Trav. Inst. Peches Marit.**, **40**: 347-349.
8. Comps M. (1985). Etude morphologique de *Marteilia christenseni* sp. n. parasite du lavignon *Scrobicularia piperata* P. (mollusque pélécyopode). **Rev. Trav. Inst. Peches Marit.**, **47**: 99-104.
9. Comps M., Grizel H. & Papayanni Y. (1982). Infection parasitaire causée par *Marteilia maurini* sp. n. chez la moule *Mytilus galloprovincialis*. **Cons. Inter. Explor. Mer**, **CM, F: 24**: 2 pp.
10. Comps M., Tige G., Grizel H. & Duthoit J.-L. (1975). Parasites nouveaux de la glande digestive des mollusques marins *Mytilus edulis* L. et *Cardium edule* L. **C.R. Acad.**, Paris, série D., **281**: 179-181.
11. Desportes I. & Perkins F.O. (1990). Phylum Paramyxea. In: **Handbook of Protoctista**, Margulis L., Corliss J.O., Melkonian M. & Chapman D.J., eds. Jones and Bartlett Publishing Corporation, Boston, USA, 30-35.
12. Grizel H., Comps M., Bonami J.R., Cousserans F., Duthoit J.L. & Le Pennec M.A. (1974). Recherche sur l'agent de la maladie de la glande digestive de *Ostrea edulis* L. **Sci. Peche**, **240**: 7-30.
13. Grizel H., Comps M., Ragueneas D., Leborgne Y., Tige G. & Martin A.G. (1982). Bilan des essais d'acclimatation d'*Ostrea chilensis* sur les côtes de Bretagne. **Rev. Trav. Inst. Peches Marit.**, **46**: 209-225.
14. Grizel H. & Tige G. (1979). Observations sur le cycle de *Marteilia refringens*. **Haliotis**, **8**: 327-330.
15. Gutierrez M. (1977). Técnica de cloración del agente de la enfermedad de la glandula digestiva de la ostra plana, *Ostrea edulis* L. **Investigacion Pesquera**, **41**: 643-645.
16. Hine P.M. & Thorne T. (2000). A survey of some parasites and diseases of several species of bivalve mollusc in northern Western Australia. **Dis. Aquat. Org.**, **40**: 67-78
17. Kleeman S. & Adlard R. (2000). Molecular detection of *Marteilia sydneyi*, pathogen of Sydney rock oysters. **Dis. Aquat. Org.**, **40** (2): 137-146.
18. Kleeman S., Adlard R. & Lester R. (2002). Detection of the initial infective stages of the protozoan parasite *Marteilia sydneyi* in *Saccostrea glomerata* and their development through to sporogenesis. **Int. J. Parasitol.**, **32**: 767-784.
19. Kleeman S., Le Roux F., Adlard R., & Berthe, F.C.J. (2002). Specificity of PCR and *in situ* hybridisation assays designed for detection of *Marteilia sydneyi* and *M. refringens*: **Parasitology**, **125**: 131-141.
20. Le Roux F., Audemard C., Barnaud A. & Berthe F.C.J. (1999). DNA probes as potential

tools for the detection of *Marteilia refringens*. **Mar. Biotechnol.**, **1**: 588-597.

21. Le Roux F., Lorenzo G., Peyret P., Audemard C., Figueras A. J., Vivares C.P., Gouy M. & Berthe F. (2001). Molecular evidence for the existence of two species of *Marteilia* in Europe. **J. Euk. Microbiol.**, **48**: 449-454.
22. Lester R.J.G. (1986). Field and laboratory observations on the oyster parasite *Marteilia sydneyi*. In: **Parasites Lives**, Cremin M., Dobson C. & Moorhouse D.E., eds. University of Queensland Press, Brisbane, Australia, 33-40.
23. Moyer M.A., Blake N.J. & Arnold W.S. (1993). An ascetosporan disease causing mass mortality in the Atlantic calico scallop, *Argopecten gibbus* (Linnaeus, 1758). **J. Shellfish Res.**, **12**: 305-310.
24. Norton J.H., Perkins F.P. & Ledua E. (1993). *Marteilia*-like infection in a giant clam, *Tridacna maxima*, in Fiji. **J. Invertebr. Pathol.**, **61**: 328-330.
25. Pascual M., Martin A.G., Zampatti E., Coatanea D., Defosse J. & Robert R. (1991). Testing of the Argentina oyster, *Ostrea puelchana*, in several French oyster farming sites. **Cons. Inter. Explor. Mer, C.M. K:30**: 17 pp.
26. Perkins F.O. & Wolf P.H. (1976). Fine structure of *Marteilia sydneyi* sp. n. Haplosporidian pathogen of Australian oysters. **J. Parasitol.**, **62**: 528-538.
27. Renault T., Cochennec N. & Chollet B. (1995). Marteiliosis in American oysters *Crassostrea virginica* reared in France. **Dis. Aquat. Org.**, **23**: 161-164.
28. Roubal F.R., Masel J. & Lester R.J.G. (1989). Studies on *Marteilia sydneyi*, agent of QX disease in the Sydney rock oyster, *Saccostrea commercialis*, with implications for its life cycle. **Aust. J. Mar. Freshwater Res.**, **40**: 155-167.
29. Villalba A., Mourelle S.G., Carballal M.J. & Lopez M.C. (1993). Effects of infection by the protistan parasite *Marteilia refringens* on the reproduction of cultured mussels *Mytilus galloprovincialis* in Galicia (NW Spain). **Dis. Aquat. Org.**, **17**: 205-213.
30. Wolf P.H. (1972). Occurrence of a Haplosporidian in Sydney Rock oysters (*Crassostrea commercialis*) from Morton Bay, Queensland, Australia. **J. Invertebr. Pathol.**, **19**: 416-417.
31. Wolf P.H. (1979). Life cycle and ecology of *Marteilia sydneyi* in the Australian oyster, *Crassostrea commercialis*. **Mar. Fish Rev.**, **41**: 70-72.

MICROCITOSE (*Mikrocytos mackini*)

INFORMAÇÕES GERAIS

Microcitose refere-se somente a enfermidade em ostras, causada por *Mikrocytos mackini* na costa oeste do Canadá. Se detectado fora da área conhecida de ocorrência *M. mackini*, microscopia eletrônica ou provas moleculares, se disponíveis, devem ser utilizadas para identificar e distinguir o organismo detectado de outras espécies de microcélulas (*Mikrocytos roughleyi*, *Bonamia ostreae*, *B. exitiosus*). A presença destes patógenos, em qualquer bivalve deve ser considerada séria e o Laboratório de Referência da OIE deve ser consultado.

Mikrocytos mackini não tem uma afinidade taxonômica certa, mas ele não está intimamente relacionado as outras microcélulas (8, 10, 11). A Microcitose também é conhecida como Enfermidade da Ilha Denman (Denman Island disease) (2, 13) e Enfermidade da Microcélula de ostras. *Mikrocytos mackini* infecta *Crassostrea gigas*, *Ostrea edulis* e *O. conchaphila* (= *O. lurida*); e experimentalmente, *C. virginica* (1, 3, 4, 9). *Crassostrea gigas* parece ser mais resistente à enfermidade do que outras espécies.

Mikrocytos mackini ocorre na costa sudoeste do Canadá. Ele provavelmente é ubíquo por todo o Estreito da Geórgia, incluindo Baía Henry, Ilha Denman e está confinado a outras localidades ao redor das Ilhas Vancouver (Columbia Britânica).

Mikrocytos mackini produz infecção intracelular no músculo e vesicular de células do tecido conjuntivo, que resultam em infiltração de hemócitos e necrose tecidual (5). O parasito pode induzir a formação de pústulas amarelo-esverdeadas, abscessos e úlceras, freqüentemente no manto, com correspondente cicatrização marrom na concha. Lesões macroscópicas nem sempre estão presentes. Os abscessos são compostos por hemócitos granulares e hialinos e podem conter pequenas células de 1-3 µm de diâmetro. Infecções severas parecem ser restritas a ostras com mais de 2 anos de idade.

A taxa de mortalidade tem girado em torno de 40%, em ostras mais velhas, até níveis mais baixos (13). A enfermidade ocorre mais frequentemente em abril e maio, após um período de 3 a 4 meses com temperaturas menores que 10°C. A colheita ou a movimentação de grandes ostras para locais mais distantes da zona intertidal antes de março e não colocação de ostras abaixo da linha de maré antes de junho, têm sido implementado com sucesso para controlar a enfermidade (1).

Para diagnose, recomenda-se usar o guia de amostras contidos nos Capítulos 1.1.4 e Capítulos I.2, do Manual Aquático.

PROCEDIMENTOS DOS EXAMES

1. Métodos de Varredura

1.1. Histologia

Corte uma secção através do corpo da ostra incluindo o manto e glândula digestiva. Incluir pústulas, abscessos e úlceras, se elas estiverem presentes. Fixar a amostra em solução de Davidson ou Carson (mais tarde as amostras podem ser re-utilizadas para microscopia eletrônica, se necessário). A proporção não deve ser maior que 1 volume de tecido para 10 volumes de fixador.

Após a preparação histológica, corar os cortes com hematoxilina e eosina. Recomenda-se examinar 2 secções (lâminas) por ostra com objetiva de 100X (vezes).

M. mackini intracelular, com 1-3 µm de diâmetro, pode ser detectado pelo exame de vesículas nas células do tecido conjuntivo imediatamente adjacente a lesões similares a abscessos. Este parasito tem sido observado em células musculares e ocasionalmente em hemócitos ou livre dentro lesões, mas é mais difícil detectá-lo nestas situações.

Microcytos mackini diferem de todas as outras microcélulas pela ocorrência de vesículas dentro do citoplasma de células do tecido conjuntivo e na periferia das lesões.

2. Método de Diagnóstico Presuntivo

2.1. Exame citológico: “imprints” de tecidos

Para detectar o parasito, a impressão de tecidos em lâminas é melhor do que histologia (9). Corte uma secção através dos abscessos ou úlceras, se presentes e coloque sobre papel filtro para remover o excesso de água. Então faça impressões com a superfície da amostra sobre a lâmina, correspondendo à seção que passou através da lesão. Seque a lâmina ao ar e fixe em metanol (2-3 minutos).

Core as lâminas usando um kit de corante disponível comercialmente para células sanguíneas, de acordo com as instruções do fabricante. Após secar, a lâmina impressa pode ser examinada diretamente usando óleo de imersão, em objetiva de 100X. Todavia, se as lâminas forem guardadas para futuros exames, elas deverão ser montadas usando uma resina sintética com lamínula, para aplicação com óleo de imersão.

O parasita, com 1-3 µm de diâmetro, aparece livre das células do hospedeiro ou,

raramente, nos hemócitos. Tem citoplasma azul (basofílico) e um pequeno núcleo vermelho (eosinofílico). A cor pode variar conforme o corante utilizado.

7. Cochenec N., Le Roux F., Berthe F. & A. Gerard (2000). Detection of *Bonamia ostreae* based on small subunit ribosomal probe. **J. Invertebr. Pathol.**, **76**, 26-32.
8. Farley C.A., Wolf P.H. & Elston R.A. (1988). A long-term study of 'microcell' disease with a description of a new genus, *Mikrocytos* (g. n.), and two new species, *Mikrocytos mackini* (sp. n.) and *Mikrocytos roughleyi* (sp. n.). **Fishery Bull.**, **86**, 581-593.
9. Hervio D., Bower S.M. & Meyer G.R. (1996). Detection, isolation and experimental transmission of *Mikrocytos mackini*, a microcell parasite of Pacific oysters *Crassostrea gigas* (Thunberg). **J. Invertebr. Pathol.**, **67**, 72-79.
10. Hine P.M., Bower S.M., Meyer G.R., Cochenec-Laureau N. & Berthe F.C.J. (2001). Ultrastructure of *Mikrocytos mackini*, the cause of Denman Island disease in oysters *Crassostrea* spp. and *Ostrea* spp. in British Columbia, Canada. **Dis. Aquat. Org.**, **45**, 215-227.
11. Hine P.M., Cochenec-Laureau N. & Berthe F.C.J. (2001). *Bonamia exitiosus* n. sp. (Haplosporidia) infecting flat oysters *Ostrea chilensis* (Philippi) in New Zealand. **Dis. Aquat. Org.**, **47**, 63-72.
12. Joly J.-P., Bower S.M. & Meyer G.R. (2001). A simple technique to concentrate the protozoan *Mikrocytos mackini*, causative agent of Denman Island disease in oysters. **J. Parasitol.**, **87**, 432-434.
13. Quayle D.B. (1982). Denman Island oyster disease 1960-1980. **British Columbia Shellfish Mariculture Newsletter**, **2**, 1-5, (Victoria, Canada).

PERKINSIOSE (*Perkinsus marinus* e *P. olsenii/atlanticus*)

INFORMAÇÕES GERAIS

Perkinsiose refere-se somente a enfermidades causadas por *Perkinsus marinus* e *P. olsenii/atlanticus*. Outras espécies descritas de *Perkinsus* incluem *P. chesapeaki* de *Mya arenaria* (26), *P. andrewsi* em *Macoma balthica* (14), ambos da costa leste dos Estados Unidos da América, e *P. qugwadi* de *Patinopecten yessoensis* do oeste do Canadá (5). Estas espécies não são consideradas atualmente causadoras de enfermidades de notificação da OIE. Outra espécie não identificada de *Perkinsus* spp infecta muitas espécies de bivalves em águas tropicais e subtropicais (22). Até que se conheça mais sobre a identidade, biologia e patologia destes outros *Perkinsus* spp., a presença deles em qualquer bivalve, deve ser considerada séria e o Laboratório de Referência da OIE deve ser consultado.

Perkinsiose é uma enfermidade infecciosa de moluscos marinhos, causada pelo protista parasita do gênero *Perkinsus*. Investigações recentes usando dados de seqüência molecular (21, 39, 42) indicaram que *Perkinsus* não é do filo Apicomplexa como sugeria sua ultra-estrutura (25), mas está mais relacionado aos Dinoflagellida. Alguns autores têm classificado *Perkinsus* no filo Perkinsozoa (33), ou no filo Dinozoa subfilo Protalveolata (12), mas mais informações moleculares são necessárias sobre *Perkinsus* e gêneros relacionados antes de esclarecer as relações filogenéticas.

Perkinsus marinus causa enfermidades de importância econômica em *Crassostrea virginica* (2, 7). Embora infecções de *C. gigas* e *C. ariakensis* sejam possíveis, estas espécies parecem ser mais resistentes à enfermidade (4, 9, 10). *Perkinsus marinus* foi formalmente nomeado de *Dermocystidium marinum* (29), e então de *Labyrinthomyxa marina* (30). Infecção por *P. marinus* é conhecida como “Dermo disease” (19). *Perkinsus marinus* é encontrado na costa leste dos USA (2, 7) do Maine até a Florida, e ao longo do Golfo do México (costa da Península de Yucutan) (6). A recente expansão para o norte, de *P. marinus*, na Baía de Delaware, New Jersey, Cape Cod e Maine, USA, é atribuído à repetida introdução por muitos anos, em conjunto com o recente aumento na temperatura superficial da água do mar (13, 18). Os efeitos da infecção de *P. marinus* em *C. virginica* vão do “aspecto pálido” da glândula digestiva, redução do índice de condição, severa emaciação, abertura da concha (gaping), retração do manto, inibição do desenvolvimento gonadal, crescimento retardado até a morte (27, 28).

Perkinsus olsenii foi originalmente descrito a partir de *Haliotis ruber* na Austrália (24) e *P. atlanticus* a partir *Ruditapes decussatus* em Portugal (3). Similaridades nas seqüências de nucleotídeos dos espaçadores internos transcritos (ITS) do grupo de gene do RNA ribossomal

(20) têm sugerido que *P. olsenii* é “co-específico” com *P. atlanticus*. Recentemente, a sinonímia das duas espécies foi formalmente estabelecida baseada também na seqüência similar da região de espaçadores não transcritos (NTS) no RNAr (32); *Perkinsus olsenii* tem prioridade taxonômica. Outros hospedeiros susceptíveis a *P. olsenii/atlanticus* incluem *Haliotis cyclobates*, *H. scalaris*, *H. laevigata*, *Anadara trapezia*, *Austrovenus stutchburyi* e *Ruditapes philippinarum* (22, 23, 32, 34). A distribuição geográfica de *P. olsenii/atlanticus* vai do leste ao sul da Austrália, New Zealand, Korea, Japan, Portugal, France, Italy e Espanha (1, 3, 11, 22, 23, 34, 40).

A proliferação de *P. olsenii/atlanticus* resulta em ruptura do tecido conjuntivo e as lâminas celulares do tecido epitelial ficam enfraquecidas. Cistos são visíveis macroscopicamente nas brânquias infectadas de *R. decussatus* (3). Abscessos podem ser vistos ocasionalmente no abalone (*Haliotis* spp.) (24). Pústulas com mais de 8 mm de diâmetro no pé e manto do infectado *Haliotis* spp., reduzem seu valor comercial. *Perkinsus olsenii/atlanticus* foi diretamente associado com o aumento nas perdas do abalone *H. laevigata* na Austrália (22) e mortalidade no molusco (arenícola) *R. decussatus* em Portugal (3) e *R. philippinarum* na Korea (34).

A morfologia dos estágios do ciclo vital é similar a todas as espécies de *Perkinsus*. Trofozoítos, caracterizados por um grande vacúolo e núcleo acêntrico (deslocado), ocorrem intercelularmente no tecido conjuntivo e epitelial. Trofozoítos maduros se dividem por cissiparidade sucessiva, resultando na liberação de 8-32 trofozoítos imaturos (36, 44). O desenvolvimento (ciclo) de *P. marinus* ocorre frequentemente dentro de fagócitos (“bolsas”). A proliferação de todas as espécies de *Perkinsus* está correlacionada com a elevação da temperatura da água no verão (mais de 20°C) quando a patogenicidade e mortalidades associadas, são mais altas. Todos os estágios do ciclo vital parecem ser infectantes (45). Sob certas condições, pouco estudadas, os trofozoítos maduros expandem e suportam a zoosporulação. Os hospedeiros são infectados através de zoósporos biflagelados, todavia a função do zoósporo na transmissão no ambiente não está clara.

Os métodos de referência para detecção de *Perkinsus* spp. são cortes histológicos e cultura em meio líquido tioglicolato (8, 17, 37, 38). Para diagnose, recomenda-se usar o guia de amostras contidos nos Capítulos 1.1.4 e Capítulo I.2, do Manual Aquático.

PROCEDIMENTOS DE EXAME

1. Métodos de Varredura

1.1. Diagnose por cultura em meio líquido de tioglicolato de Ray

Amostras de tecidos, medindo cerca de 5 x 10 mm, são retiradas de bivalves arenícolas preferencialmente do reto, brânquias e tecido do manto; em abalones, do músculo adutor, do pé ou manto e colocados no meio fluído de tioglicolato (Difco), contendo antibióticos. Recomenda-se um antifúngico/antibiótico nas doses: 200 unidades de micostatina (Nystatin), 500 unidades de penicilina G e 500 mg diidro-estreptomicina por ml de meio de cultura (37). Cloromicetina pode ser usado em lugar da penicilina/estreptomicina (38). A incubação ocorre a 22-25°C, por 4 a 7 dias, no escuro.

Os parasitos cultivados se expandem de 2-10 µm para 50-70 µm durante a incubação. Após a incubação, os fragmentos dos tecidos são coletados e macerados com uma lâmina de escalpelo em uma lâmina de vidro, uma gota solução de iodo (Lugol) a 1/5 é adicionada. A preparação é coberta com uma lamínula e deixada descansar por 10 minutos. As preparações são examinadas em estado fresco. Os “hipnosporos” de *Perkinsus* são esféricos e as paredes são coradas de azul ou negro-azulado com solução de Lugol.

A intensidade da infecção tem sido medida (37) em uma escala de 0 a 5 como segue:

- a) **0** = não infectado;
- b) **0.5 (muito leve)** = menos de 10 parasitas encontrados no tecido preparado;
- c) **1 (leve)** = 11-100 células ao todo na preparação, os parasitas podem estar espalhados ou ocorrer em grupos isolados de 10-15 células;
- d) **2 (leve a moderado)** = algumas áreas livres de parasita, mas outras áreas mostram concentrações localizadas de 24-50 células, ou células distribuídas uniformemente de 2-3 células ocorrem a cada campo, em objetiva de 100x;
- e) **3 (moderado)** = parasitas numerosos, espera-se encontrar 3 células em todos os campos, em objetiva de 100x, massas de 50 células são ainda mais ou menos localizados; tecidos não mostram, macroscopicamente, coloração azul/negra;
- f) **4 (moderado a forte [pesado])** = células parasitas presentes em grande número em todos os tecidos, mas menos da metade do tecido apresenta a coloração azul/negra, macroscopicamente;
- g) **5 (forte/pesada)** = células parasitas ocorrem em grande número; a maior parte do tecido apresenta coloração azul/negro, macroscopicamente.

1.2. Histologia

Os procedimentos gerais de histologia estão detalhados no Capítulo I.2. do Manual Aquático. Corte uma secção transversal através da massa visceral incluindo brânquias, manto e glândula digestiva. Coloque os tecidos em um fixador, como a solução de Davidson. A proporção deve ser de 1 volume de tecido para 10 volumes de fixador.

As amostras são processadas por histologia clássica. *Perkinsus* spp. são “revelados” por corantes não específicos, como hematoxilina e eosina. A Histologia não é uma técnica sensível como a cultura em solução de tioglicolato, não permitindo a identificação de infecções leves (19).

A infecção por *Perkinsus marinus* é usualmente sistemática, embora células possam ser localizadas no epitélio do intestino. A infecção causada por *P. olsenii/atlanticus*, normalmente se localiza no tecido conjuntivo. Assim, o tecido conjuntivo de todos os órgãos pode conter trofozoítos imaturos, trofozoítos maduros e estágios em divisão, contendo 2, 4, 8, 16 ou 32 trofozoítos em desenvolvimento (19, 36, 44). Trofozoítos maduros caracterizam-se pela presença de vacúolos que deslocam o núcleo para a periferia da célula.

O histórico morfológico dos estágios do ciclo vital é similar para todas as espécies. O tamanho dos trofozoítos em hospedeiros infectados varia de 2-10 µm em *P. marinus* e de 16 µm em *P. olsenii/atlanticus*. Como sempre, as características morfológicas são similares para todas as espécies de *Perkinsus* e o tamanho é altamente variável. Então a morfologia sozinha não pode ser utilizada para distinguir as espécies.

2. Métodos de diagnóstico Presuntivo

2.1. Diagnose por cultura em meio fluído tioglicolato e histologia

Estes métodos, como descrito acima (ver Seções 1.1. e 1.2. deste Capítulo) e usados em conjunto, podem ser utilizados no diagnóstico presuntivo para o gênero *Perkinsus*. As técnicas não podem ser usadas para distinguir as espécies.

2.2. Microscópio eletrônico de transmissão

Os procedimentos para microscopia eletrônica de Transmissão estão detalhados no Capítulo I.2 do Manual Aquático. A ultraestrutura do zoósporo foi cogitada como mecanismo para diagnosticar o gênero *Perkinsus* (3, 5, 36). Todavia, evidências recentes baseadas em dados moleculares, mostraram que *Colpodella*, um

flagelado predador tem ultraestrutura idêntica ao dos zoósporos de *Perkinsus*. Não há, portanto, exclusividade na ultraestrutura dos zoósporos para *Perkinsus* (43). Sendo assim, a ultraestrutura morfológica dos zoósporos não é adequada à identificação do gênero *Perkinsus*.

2.3. PCR (Reação em cadeia da polimerase)

A amplificação da reação em cadeia da polimerase (PCR) é um diagnóstico presuntivo porque detecta DNA e não necessariamente um patógeno viável. Iniciadores para PCR, têm sido desenvolvidos para *P. marinus* (31, 41, 46) e *P. atlanticus* (15, 40), mas eles não têm sido cuidadosamente testados por inclusividade, especificidade e sensibilidade, especialmente sob os conhecimentos atuais quanto à variabilidade dentro da seqüência de uma simples espécie de *Perkinsus* na região dos espaçadores internos transcritos (ITS) (11, 16). Um PCR múltiplo (35) foi desenvolvido para *P. marinus*, *Haplosporidium nelsoni* (MSX) e *Haplosporidium costale* (SSO), mas ele não foi validado. O desenvolvimento de ferramentas espécie-específicas e sensíveis para o diagnóstico molecular é uma área de pesquisa ativa. O PCR não é recomendado até o momento, como um método presuntivo de diagnóstico para qualquer espécie de *Perkinsus*.

3. Confirmação da Identificação do Patógeno

3.1. Análise da seqüência da região ITS

Até o momento, o caminho para confirmar a identificação das espécies de *Perkinsus* é comparar a seqüência de nucleotídeos da região ITS com as seqüências depositadas no banco de dados GenBank: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/>. Os iniciadores de PCR têm sido designados para amplificar a região ITS de qualquer *Perkinsus* spp. descrito. Exceto para *P. qugwadi*, de tecidos infectados do hospedeiro (11). Os produtos do PCR podem ser seqüenciados para a identificação das espécies.

REFERÊNCIAS

1. Almeida M., Berthe F., Thebault A. & Dinis M.T. (1999). Whole clam culture as a quantitative diagnostic procedure of *Perkinsus atlanticus* (Apicomplexa, Perkinsea) in clams *Ruditapes decussatus*. **Aquaculture**, **177**: 325-332.
2. Andrews J.D. (1996). History of *Perkinsus marinus*, a pathogen of oysters in Chesapeake Bay 1950-1984. **J. Shellfish Res.**, **15**: 13-16.
3. Azevedo C. (1989). Fine structure of *Perkinsus atlanticus* n. sp. (Apicomplexa, Perkinsea) parasita of clams. *Ruditapes decussatus*. from Portugal. **J. Parasitol.**, **75**:

627-635.

4. Barber B.J. & 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*. **J. Shellfish Res.**, **13**: 109-114.
5. Blackburn J., Bower, S.M. & Meyer G.R. (1998). *Perkinsus qugwadi* sp. nov. (incertae sedis), a pathogenic protozoan parasite of Japanese scallops, *Patinopectin yessoensis*, cultured in British Columbia, Canada. **Can. J. Zool.**, **76**: 627-635.
6. Burreson E.M., Alvarez R.S., Martinez V.V. & Macedo L.A. (1994). *Perkinsus marinus* (Apicomplexa) as a potential source of oyster *Crassostrea virginica* mortality in coastal lagoons of Tabasco, Mexico. **Dis. Aquat. Org.**, **20**: 77-82.
7. Burreson E.M. & Ragone Calvo L.M. (1996). Epizootiology of *Perkinsus marinus* disease of oysters in Chesapeake Bay, with emphasis on data since 1985. **J. Shellfish Res.**, **15**: 17-34.
8. Bushek D., Ford S.E. & Allen S.K. (1994). Evaluation of methods using Ray's fluid thioglicolato medium for diagnosis of *Perkinsus marinus* infection in the eastern oyster, *Crassostrea virginica*. **Ann. Rev. Fish Dis.**, **4**: 201-217.
9. Calvo G.W., Luckenbach M.W., Allen S.K. & Burreson E.M. (1999). A comparative field study of *Crassostrea gigas* (Thunberg 1793) and *Crassostrea virginica* (Gmelin 1791) in relation to salinity in Virginia. **J. Shellfish Res.**, **18**: 465-474.
10. Calvo G.W., Luckenbach M.W., Allen S.K. & Burreson E.M. (2001). A comparative field study of *Crassostrea ariakensis* (Fujita 1913) and *Crassostrea virginica* (Gmelin 1791) in relation to salinity in Virginia. **J. Shellfish Res.**, **20**: 221-229.
11. Casas S.M., Villalba A. & Reece K.S. (2002). Study of the perkinsosis of the carpet shell clam *Tapes decussatus* in Galicia (NW Spain). I. Identification of the etiological agent and in vitro modulation of zoosporulation by temperature and salinity. **Dis. Aquat. Org.**, **50**: 51-65.
12. Cavalier-Smith T. (1998). A revised six-kingdom system of life. **Biol. Rev.**, **73**: 203-266.
13. Cook T., Folli M., Klinck J., Ford S. & Miller J. (1998). The relationship between increasing sea-surface temperature and the northward spread of *Perkinsus marinus* (Dermo) disease epizootics in oysters. **Estuarine Coastal Shelf Sci.**, **46**: 587-597.
14. Coss C.A., Robledo J.F., Ruiz G.M. & Vasta G.R. (2001). Description of *Perkinsus andrewsi* n. sp. isolated from the Baltic clam (*Macoma balthica*) by characterization of the ribosomal RNA locus, and development of a species-specific PCR-based diagnostic assay. **J. Eukaryot. Microbiol.**, **48**: 52-61.
15. de la Herrán R., Garrido-Ramos M.A., Navas J.I., Ruiz Rejón, C. & Ruiz Rejón, M. (2000). Molecular characterization of the ribosomal RNA gene region of *Perkinsus atlanticus*: its use in phylogenetic analysis and as a target for a molecular diagnosis. **Parasitology**, **120**: 345-353.
16. Dungan C.F., Hamilton R.M., Hudson K.L., McCollough C.B. & Reece K.S. (2002). Two epizootic infectious diseases in Chesapeake Bay commercial clams *Mya arenaria* and *Tagelus plebius*. **Dis. Aquat. Org.**, **50**: 67-78.

17. Fisher W.S. & Oliver L.M. (1996). A whole-oyster procedure for diagnosis of *Perkinsus marinus* disease using Ray's fluid tioglicolato culture medium. **J. Shellfish Res.**, **15**: 109-117.
18. Ford S.E. (1996). Range extension by the oyster parasita *Perkinsus marinus* into the northeastern United States: response to climate change? **J. Shellfish Res.**, **15**; 45-56.
19. Ford S.E. & Tripp M.R. (1996). Diseases and defense mechanisms. In: **The Eastern Oyster *Crassostrea virginica***, Kennedy V.S., Newell R.I.E. & Eble A.F., eds. Maryland Sea Grant College, College Park, Maryland, USA, 581-660.
20. Goggin C.L. (1994). Variation in the two internal transcribed spacers and 5.8S ribosomal RNA from five isolates of the marine parasita *Perkinsus* (Protista, Apicomplexa). **Molec. Biochem. Parasitol.**, **65**: 179-182.
21. Goggin C.L. & Barker S.C. (1993). Phylogenetic position of the genus *Perkinsus* (Protista, Apicomplexa) based on small subunit ribosomal RNA. **Molec. Biochem. Parasitol.**, **60**: 65-70.
22. Goggin C.L. & Lester R.J.G. (1995). *Perkinsus*, a protistan parasita of abalone in Australia: a review. **Aust. J. Mar. Freshwater Res.**, **46**: 639-646.
23. Hamaguchi M., Suzuki N., Usuki H. & Ishioka H. (1998). *Perkinsus* protozoan infection in short-necked clam *Tapes (=Ruditapes) philippinarum* in Japan. **Fish Pathol.**, **33**: 473-480.
24. Lester R.J.G. & Davis G.H.G. (1981). A new *Perkinsus* species (Apicomplexa, Perkinsea) from the abalone, *Haliotis ruber*. **J. Invertebr. Pathol.**, **37**: 181-187.
25. Levine N.D. (1978). *Perkinsus* gen. n. and other new taxa in the protozoan phylum Apicomplexa. **J. Parastitol.**, **64**: 549.
26. McLaughlin S.M., Tall B.D., Shaheen A., Elsayed E.E. & Faisal M. (2000). Zoosporulation of a new *Perkinsus* species isolated from the gills of the softshell clam *Mya arenaria*. **Parasita**, **7**: 115-122.
27. Mackin J.G. (1951). Histopathology of infection of *Crassostrea virginica* Gmelin by *Dermocystidium marinum* Mackin, Owen and Collier. **Bull. Marine Sci. Gulf Caribb.**, **1**: 72-87.
28. Mackin J.G. (1962). Oyster disease caused by *Dermocystidium marinum* and other microorganisms in Louisiana. **Publ. Inst. Mar. Sci. Univ. Texas**, **7**: 132-299.
29. Mackin J.G., Owen H.M. & Collier A. (1950). Preliminary note on the occurrence of a new protistan parasita, *Dermocystidium marinum* n. sp., in *Crassostrea virginica* (Gmelin). **Science**, **111**: 328-329.
30. Mackin J.G. & Ray S.M. (1966). The taxonomic relationship of *Dermocystidium marinum*, Mackin, Owen and Collier. **J. Invert. Pathol.**, **8**: 544-545.
31. Marsh A.G., Gauthier J.D. & Vasta G.R. (1995). A semiquantitative PCR assay for assessing *Perkinsus marinus* infections in the eastern oyster, *Crassostrea virginica*. **J. Parasitol.**, **81**, 577-583.
32. Murrell A., Kleeman S.N., Barker S.C. & Lester R.J.G. (2002). Synonymy of *Perkinsus olseni* Lester & Davis. 1981 and *Perkinsus atlanticus* Azevedo. 1989 and an update on

- the phylogenetic position of the genus *Perkinsus*. Bull. Euro. **Assoc. Fish Pathol.**, **22**: 258-265.
33. Noren F., Moestrup O. & Rehnstam-Holm A. (1999). Parvilucifera infectans Norén et Moestrup gen. et sp. nov. (Perkinsozoa phylum nov.): a parasitic flagellate capable of killing toxic microalgae. Europ. **J. Protistol.**, **35**: 233-254.
 34. Park K.-I. & Choi K.-S. (2001). Spatial distribution of the protozoan parasite *Perkinsus* sp. Found in Manila clams, *Ruditapes philippinarum*, in Korea. **Aquaculture**, **203**: 9-22.
 35. Penna M.-S., Khan M. & French R.A. (2001). Development of a multiplex PCR for the detection of *Haplosporidium nelsoni*, *Haplosporidium costale* and *Perkinsus marinus* in the eastern oyster (*Crassostrea virginica*, Gmelin, 1791). **Molec. Cell. Probes**, **15**: 385-390.
 36. Perkins F.O. (1996). The structure of *Perkinsus marinus* (Mackin, Owen & Collier, 1950) Levine, 1978 with comments on taxonomy and phylogeny of *Perkinsus* spp. **J. Shellfish Res.**, **15**: 67-87.
 37. Ray S.M. (1954). **Biological studies of Dermocystidium marinum, a fungus parasite of oysters**. Rice Institute Pamphlet, Houston, Texas, USA, 114 pp.
 38. Ray S.M. (1966). A review of the culture method of detecting *Dermocystidium marinum* with suggested modifications and precautions. **Proc. Natl. Shellfish. Assoc.**, **54**: 55-69.
 39. Reece K.S., Siddall M.E., Burreson E.M. & Graves J.E. (1997). Phylogenetic analysis of *Perkinsus* based upon actin gene sequences. **J. Parasitol.**, **83**: 417-423.
 40. Robledo J.A.F., Coss C.A. & Vasta G.R. (2000). Characterization of the ribosomal RNA locus of *Perkinsus atlanticus* and development of a polymerase chain reaction-based diagnostic assay. **J. Parasitol.**, **86**: 972-978.
 41. Robledo J.A.F., Gauthier J.D., Coss, C.A., Wright A.C. & Vasta G.R. (1998). Species-specificity and sensitivity of a PCR-based assay for *Perkinsus marinus* in the eastern Oyster, *Crassostrea virginica*: a comparison with the fluid tioglicolato assay. **J. Parasitol.**, **84**: 1237-1244.
 42. Siddall M.E., Reece K.S., Graves J.E. & Burreson E.M. (1997). 'Total evidence' refutes the inclusion of *Perkinsus* species in the phylum Apicomplexa. **Parasitology**, **115**: 165-176.
 43. Siddall M.E., Reece K.S., Nerad T.A. & Burreson E.M. (2001). Molecular determination of the phylogenetic position of a species in the genus *Colpodella* (Alveolata). **Am. Mus. Novitates**, **3314**: 1-10.
 44. Sunila I., Hamilton R.M. & Dungan C.F. (2001). Ultrastructural characteristics of the in vitro cell cycle of the protozoan pathogen of oysters, *Perkinsus marinus*. **J. Eukaryot. Microbiol.**, **48**: 348-361.
 45. Volety A.K. & Chu F.-L.E. (1994). Comparison of infectivity and pathogenicity of meront (trophozoite) and prezoosporangiae stages of the oyster pathogen *Perkinsus marinus* in eastern oysters, *Crassostrea virginica* (Gmelin, 1791). **J. Shellfish. Res.**, **13**: 521-527.
 46. Yarnall H.A., Reece K.S., Stokes N.A. & Burreson E. M. (2000). A quantitative competitive polymerase chain reaction assay for the oyster pathogen *Perkinsus marinus*. **J. Parasitol.**, **86**: 827-837.

Meio de cultura: Fluido Tioglicolato de Ray

Código do Produto	500g - BC2025R
Descrição	Meio estéril, feito por especificação da farmacopéia dos Estados Unidos. O meio suporta crescimentos de organismos aeróbios e anaeróbios.

Fórmula (gramas por litro)

Tryptone	15,0	Cloreto de sódio	2,5
----------	------	------------------	-----

IRIDOVIROSE (Iridovirus)

INFORMAÇÕES GERAIS

Iridovirus é o vírus causador da Iridovirose, Enfermidade Viral do Vélum de Ostras (OVVD) ou Enfermidade da Bolha, somente em larvas de *Crassostrea gigas* (Figura 15). Este vírus tem morfologia similar aos Iridoviridae, causadores da Enfermidade ou Mal da Brânquia e Enfermidade Hemocítica Infecciosa de Vírus (HIV), em *Crassostrea angulata* e *C. gigas*. Foram reportadas infecções em larvas de *C. gigas* somente em duas “hatcheries” (incubadoras) de moluscos nos Estados Unidos (Washington). Acredita-se ser virtualmente ubíquo em águas temperadas do mundo e na produção de juvenis de *C. gigas*, com manifestação clínica somente sob condições de crescimento sub-ótimas. Há 20 anos esta enfermidade, OVVD, não é reportada. Foi listada em “outras enfermidades significantes” na lista da OIE de 1997 e FAO/NACA, mas foi retirado de listas mais recentes da OIE (BOWER, 1994; APEC/FAO/NACA/SEMARNAP, 2000; BONDAD-RENTASO *et al.*, 2001; AFF, 2002).

A OVVD causa degradação e necrose do epitélio do vélum, em larvas com concha >150 µm de comprimento e mais de 10 dias de idade, quando cultivadas entre 25 e 30°C. Células infectadas são hipertrofiadas e sem cílios, o que causa as “bolhas” características desta doença. Pode haver perda total do cílios do vélum, mas esta não é uma característica específica para OVVD. A larva doente não pode se alimentar, enfraquece e morre. Esta enfermidade causa perdas severas nas “hatcheries”, de quase 100% em tanques afetados.

Larvas véliger amontodas e que demonstram desprendimento da superfície do epitélio ciliado podem ser consideradas suspeitas de possuírem iridovirose. Outros patógenos podem ocasionar sintomas similares, como bactérias e o herpes-like vírus (BONDAD-RENTASO *et al.*, 2001).

Pode aparecer de março a maio e ao longo do verão. O efeito subclínico da exposição a esta doença em assentamentos remotos de larvas e crescimento da semente não é conhecido (BOWER, 1994; BONDAD-RENTASO *et al.*, 2001).

O vírus ocorre como corpos de inclusão intracitoplasmáticos, com 1,2-2,4 µm de diâmetro, forma esférica/icosaedra, com DNA e com cápside bilamelar. Estes corpos são densos e basofílicos nas fases iniciais das infecções, mas podem se tornar irregulares e menos basofílicos com a formação de vírions. Os corpos de inclusão ocorrem no epitélio esofágico da base do vélum, epitélio oral e raramente no epitélio do manto (BOWER, 1994; BONDAD-RENTASO *et al.*, 2001).

A profilaxia da enfermidade é feita pela destruição e descarte das larvas infectadas. A única forma de controle é o rápido reconhecimento da infecção e subsequente desinfecção dos

tanques e equipamentos para prevenir a disseminação do patógeno (BOWER, 1994; BONDAD-RENTASO *et al.*, 2001). Não há métodos de controle conhecidos, exceto pela redução da densidade nas larviculturas, troca de água e por métodos gerais de cuidados sanitários (desinfecção de tanques e utensílios, etc).

O diagnóstico presuntivo é feito por observação do comportamento das larvas nas incubadoras e por histologia clássica. A confirmação da identificação é feita pela associação entre a histologia clássica e os procedimentos de microscopia eletrônica de transmissão (BOWER, 1994; BONDAD-RENTASO *et al.*, 2001).

PROCEDIMENTOS DOS EXAMES

1. Métodos de Investigação e Diagnóstico Presuntivo

1.1. Observação do comportamento

De forma genérica e considerando ser esta uma infecção oportunista, somente infecções clínicas demonstrarão infecções detectáveis.

Crescimento lento, ausência de alimentação e natação podem indicar a presença de OVVD.

1.2. Histologia

Através das técnicas da histologia clássica, caso haja detecção de inclusões ou patologia no epitélio ciliado, pode ser confirmatório da presença da doença.

2. Confirmação da Identificação do Patógeno

2.1. Histologia

Onde há um histórico de iridovirose em larvas, a detecção de inclusões e patologia no epitélio ciliado, como descrito abaixo, pode ser considerado confirmatório da doença. Todavia, deveria ser observado que outras infecções microbianas podem induzir histopatologia similar e a microscopia eletrônica é a técnica confirmatória ideal.

As larvas devem ser concentradas por centrifugação ou filtração em um pellet previamente para emblocar. O emblocamento ou inclusão ocorre de forma mais adequada se o material for pós-fixado em solução de Davidson, 1G4F (1% glutaraldeído:4% de formaldeído) ou outro fixador.

É possível incluir o material em parafina, mas a inclusão em resina é recomendada pela ótimo seccionamento. A parafina permite cortes acima de 3µm usando um

micrótomo padrão. Tecidos incluídos em resina podem ser seccionados em cortes inferiores a 1 μm de espessura, mas requer micrótomos especializados e/ou suporte de blocos e colorações especiais.

Colorações padrão, tipo hematoxilina e eosina, detectam corpos de inclusão intracitoplasmáticos nas células do epitélio ciliado do vélu. No início os corpos de inclusão são esféricos, mas tornam-se mais irregulares a medida que os vírus proliferam. Os corpos de inclusão podem ser detectado no esôfago, epitélio oral ou, mais raramente, nas células epiteliais do manto.

2.2. Microscópio eletrônico de transmissão

A microscopia eletrônica de transmissão é necessária para visualizar a virose *in situ*, em cortes do tecido das brânquias das larvas que foram concentradas em “pellets”.

A fixação em glutaraldeído 2-3% misturado e tamponado para água do mar filtrada não deveria exceder 1h, para reduzir artefatos. Os tecidos podem também ser fixados em 1G4F por 12-24 h. Após a fixação primária, enxaguar em um tampão adequado e pós-fixar em tetróxido de ósmio 1-2% (OsO_4). A fixação secundária deveria ser completada dentro de 1h. O material fixado em OsO_4 deve ser enxaguado em tampão preparado com água salgada filtrada (0,22 μm) previamente. Em seguida desidratar e incluir em parafina.

Tecidos pós-fixados deveriam ser guardados em tampão compatível ou incluídos em resina adequada pós enxague, para cortar em ultramicrótomo. Varreduras nos cortes de 1 μm colocados sobre lâminas de microscópio com solução de azul de toluidina 1% é um dos métodos para selecionar os melhores espécimens para seccionamento ultrafino. Os cortes ultrafinos são montados sobre grades de cobre para corar com citrato de chumbo + acetato uranil ou corante equivalente para microscopia eletrônica.

Partículas virais icosaédricas (+/-228 nm de diâmetro) com uma membrana bilamelar no cápside, deveriam ser visualizadas para confirmar a presença do iridovírus.

REFERÊNCIAS

AFF. Import risk analysis (IRA) of non-viable bivalve molluscs. Canberra: Biosecurity Australia, 2002. 75p . Disponível em: <http://www.affa.gov.au/corporate_docs/publications/pdf/market_access/biosecurity/animal/2002/2002-44a.pdf>. Acesso em: 23 maio 2005.

APEC/FAO/NACA/SEMARNAP. 2001. Trans-boundary aquatic animal pathogen transfer and the development of harmonized standards on aquaculture health management. **Report of the joint APEC/FAO/NACA/SEMARNAP Workshop, Puerto Vallarta, Jalisco, México, 24-28, Julho 200 pp.** Disponível em <<http://faostat.fao.org/faostat/form?collection=Fishes&Domain=FishCatch&servlet=1&hasbulk=&version=ext&language=EN>>. Acesso em 23 de maio de 2005.

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

BONDAD-RENTASO, M.G.; MACGLADDERY, S.E.; EAST, I.; SUBASINGHE, R.P. (eds) Asia Diagnostic Guide to Aquatic Animal Diseases. **FAO Fisheries Technical Paper N° 402, Supplement 2.** Roma. 240 pp. 2001

SECRETARIA DE ESTADO DO DESENVOLVIMENTO RURAL E DA AGRICULTURA

Portaria nº 021/02/SDA, de 01 de outubro de 2002

O Secretário de Estado do Desenvolvimento Rural e da Agricultura, no uso de suas atribuições legais e tendo em vista o disposto na Lei nº 10.366, de 24 de Janeiro de 1997 e no Decreto Estadual nº 2.919, de 1º de junho de 1998, alterado pelo Decreto nº 3.527, de 15 de dezembro de 1998 e na Resolução nº 004/96/SDR/Cederural, de 07 de março de 1996 e,

Considerando a necessidade de proteger sanitariamente os estabelecimentos de aquicultura.

Considerando que a Companhia Integrada de Desenvolvimento Agrícola de Santa Catarina é o órgão executor das ações Estaduais de Defesa Sanitária Animal e do Projeto de Sanidade Aquícola criado pela Resolução nº 004/96/SDR/Cederural, de 07 de março de 1996.

Resolve:

Art. 1º Aprovar as normas técnicas para a execução do Projeto de Sanidade Aquícola no Estado de Santa Catarina.

Art. 2º Esta Portaria entra em vigor na data de sua publicação.

OTTO LUIZ KIEHN

Secretário de Estado

NORMAS TÉCNICAS PARA A EXECUÇÃO DO PROJETO DE SANIDADE AQUÍCOLA**CAPÍTULO I****DAS ABREVIATURAS E DAS DEFINIÇÕES**

Art. 1º Para efeitos destas normas entende-se por:

I - ALEVINO: designa a primeira fase do peixe, biologicamente com as características do peixe adulto da mesma espécie;

II - ANIMAL AQUÁTICO: são os peixes, moluscos e crustáceos destinados a aquicultura, em qualquer de sua fase de desenvolvimento;

III - AQUICULTURA: é o cultivo de organismos aquáticos, incluindo peixes, moluscos, crustáceos e plantas aquáticas mediante a intervenção do homem no processo de criação visando aumentar a produção em operações como reprodução, estocagem, alimentação e proteção contra predadores e outros;

IV - BIOSSEGURANÇA: são medidas de ordem sanitária, de controle de segurança das instalações físicas dos estabelecimentos de aquicultura, da unidade de quarentena, das zonas de cultivo, da população de animais aquáticos e que visam garantir a saúde e o controle sanitário, reduzindo o risco de introdução e de disseminação de agentes patogênicos;

V - CERTIFICADO SANITÁRIO: é um documento no qual consta o estado sanitário do estabelecimento de aquicultura no que diz respeito ao monitoramento das enfermidades de notificação obrigatória e as de certificação em conformidade com a legislação sanitária estadual vigente, emitido pelo órgão executor;

VI - CISTO: designa o ovo seco, em estado latente;

VII - COMERCIALIZAÇÃO: designa o comércio de animais aquáticos e produtos de animais aquáticos;

VIII - COMÉRCIO INTERNACIONAL: designa a importação, a exportação e o transito de animais aquáticos, os produtos de animais aquáticos, produtos biológicos e materiais patológicos;

IX - CRUSTÁCEO: designa os animais aquáticos pertencentes ao grupo Artropoda, categoria de animais aquáticos caracterizados por um exoesqueleto de quitina e apêndices articulados;

X - ENFERMIDADE: designa a infecção provocada por agentes etiológicos;

XI - ESPÉCIE ORNAMENTAL: designa o animal aquático em qualquer de suas fases de desenvolvimento que se destine ou não ao comércio, com fins de exposição e/ou adorno;

XII - ESPÉCIE EXÓTICA: espécie aquática de origem e ocorrência natural fora dos limites das águas sob jurisdição federal, quer tenha ou não sido já artificialmente introduzida em tais águas;

XIII - ESTABELECIMENTO DE AQUICULTURA: é um estabelecimento onde se criam e/ou conservam animais aquáticos com fins de reprodução ou comercialização;

XIV - FISCAL FEDERAL AGROPECUÁRIO: é o fiscal do MAPA, com formação em medicina veterinária, que realiza fiscalização e supervisão relativa a defesa sanitária animal e a produção animal;

XV - FOCO DE ENFERMIDADE: é o aparecimento em uma população de animais aquáticos, de casos de mortalidade/morbidade provocadas por agente(s) infeccioso(s) como bactérias, vírus, fungos ou parasitas;

XVI - GAMETA: designa o material genético (sêmen/óvulo) de animais aquáticos conservado ou transportados separadamente antes da fecundação;

XVII - GUIA DE TRÂNSITO ANIMAL - GTA: é o documento obrigatório para trânsito de animais aquáticos emitido com propósito de qualquer movimentação e finalidade;

XVIII - HABILITAÇÃO DO ESTABELECIMENTO: é a avaliação realizada pelo serviço estadual de defesa sanitária animal do local destinado ao isolamento de animais aquáticos quanto ao risco de introdução e de disseminação de agentes patogênicos;

XIX - ISOLAMENTO: é o tempo transcorrido desde o momento da recepção dos animais aquáticos vivos no estabelecimento até sua liberação pelo serviço estadual de defesa sanitária animal;

XX - LABORATÓRIO CREDENCIADO: são laboratórios de outras instituições federais, estaduais, municipais ou privados, que tenham sido habilitados e reconhecidos pelo MAPA, para a identificação de agentes patogênicos por meio de técnicas de diagnóstico laboratorial;

XXI - LABORATÓRIO OFICIAL: são os laboratórios da rede do MAPA;

XXII - LARVA: designa o período inicial da vida de alguns animais aquáticos que engloba várias fases, sendo que cada uma delas apresenta peculiaridades específicas em relação ao comportamento, suas necessidades nutricionais e ambientais;

XXIII - LOTE: designa um grupo de animais aquáticos de um estabelecimento de aquicultura que pertence à mesma espécie, procedem da mesma desova e tenham compartilhado sempre o mesmo suprimento de água;

XXIV - MAPA: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento;

XXV - MOLUSCO: designa os animais aquáticos pertencentes ao filo Mollusca, caracterizados por corpo mole e sem divisões, envolto ou não em uma concha calcárea;

XXVI - MONITORAMENTO DAS POPULAÇÕES: é o acompanhamento sanitário acrescido de análises laboratoriais que incluem: testes sorológicos, provas com materiais biológicos ou não, análises epidemiológicas das condições de saúde dos animais aquáticos com padronização dos resultados;

XXVII - ÓRGÃO EXECUTOR: Companhia Integrada de Desenvolvimento Agrícola de Santa Catarina - Cidasc, delegada pela SDA/SC para a execução do serviço estadual de defesa sanitária animal no Estado de Santa Catarina;

XXVIII - PESA: Projeto Estadual de Sanidade Aquícola;

XXIX - PRODUTOS DE ANIMAIS AQUÁTICOS: são os produtos de animais aquáticos destinados a criação (ovos, embriões, cistos, gametas, larvas, alevinos e outros), destinados ao consumo humano, ao consumo animal ou para uso farmacêutico, biológico ou industrial;

<http://www.agricultura.sc.gov.br/internas/portaria.php?id=2>

XXX - PRODUTO BIOLÓGICO: designa os reagentes biológicos que se utilizam para o diagnóstico de certas enfermidades, tais como os soros que se utilizam para a prevenção e o tratamento, as vacinas inativadas ou modificadas que se utilizam para a vacinação preventiva, o material genético de agentes infecciosos e os tecidos endócrinos de peixes ou utilizados em peixes;

XXXI - RESPONSÁVEL TÉCNICO: é o médico veterinário responsável pelo controle sanitário dos estabelecimentos de aquicultura;

XXXII - SANIDADE AQUÍCOLA: Conjunto de ações de vigilância, prevenção, controle sanitário e/ou erradicação das enfermidades que acometem os animais aquáticos e fiscalização do trânsito e de estabelecimentos de aquicultura;

XXXIII - SDA/SC: Secretaria de Estado do Desenvolvimento Rural e da Agricultura de Santa Catarina;

XXXIV - SEMENTES: designa os jovens moluscos aquáticos;

XXXV - UNIDADE DE ISOLAMENTO: designa a instalação ou o conjunto de instalações mantidas em completo isolamento e estritas condições de controle sanitário, destinadas à recepção de animais aquáticos vivos, em qualquer de suas fases de desenvolvimento, após o processo de importação e/ou exportação.

CAPÍTULO II

DAS DISPOSIÇÕES PRELIMINARES

Art. 2º As presentes normas técnicas se aplicam no que couber aos estabelecimentos de aquicultura que desenvolvem as atividades relacionadas com a reprodução, o cultivo, a comercialização e outras, de animais aquáticos.

Art. 3º O órgão executor desenvolverá as medidas de vigilância e prevenção das enfermidades previstas nestas normas com a finalidade de impedir a introdução de enfermidades exóticas e controlar e/ou erradicar as existentes no seu território.

Art. 4º Como medida de defesa das populações estaduais de animais aquáticos, fica terminantemente proibida a entrada em território catarinense de animais aquáticos acometidos ou suspeitos de estarem acometidos de enfermidades, direta ou indiretamente transmissíveis, mesmo estando aparentemente em estado hígido e ainda dos portadores de parasitas externos ou internos cuja disseminação possa constituir ameaça às populações estaduais de animais aquáticos.

Art. 5º É igualmente proibido o ingresso em território estadual de produtos, subprodutos, despojos de animais aquáticos, vísceras, alimento vivo ou outro qualquer material veiculador dos agentes etiológicos de enfermidades contagiosas.

Art. 6º Os animais aquáticos procedentes de estados onde grassam, em estado enzoótico, as enfermidades previstas nestas normas, só poderão ingressar no Estado, mediante prévia análise de risco do órgão executor do serviço estadual de defesa sanitária animal, que estabelecerá as condições em que a importação será permitida.

Art. 7º No intuito de evitar a propagação de enfermidades no território catarinense fica estabelecida a obrigatoriedade de atestado sanitário emitido por médico veterinário, para a emissão da GTA.

CAPÍTULO III

CARACTERIZAÇÃO DOS ESTABELECIMENTOS DE AQUICULTURA

Art. 8º Para efeito destas normas os estabelecimentos que desenvolvem as atividades de aquicultura são caracterizados em:

I - ESTABELECIMENTO DE REPRODUÇÃO: estabelecimento destinado à reprodução e/ou manipulação de material genético (gametas/ovos/náuplios e sementes);

II - ESTABELECIMENTO DE RECRIA: estabelecimento ou zona de cultivo destinado a recria de animais aquáticos (alevinos /larva e pós-larva);

III - ESTABELECIMENTO DE TERMINAÇÃO: estabelecimento ou zona de cultivo destinado à terminação de animais aquáticos do juvenil até a comercialização;

IV - ESTABELECIMENTO DE RECREAÇÃO: estabelecimento onde os animais aquáticos estão destinados à pesca de lazer (pesque-pague e similares).

CAPÍTULO IV

CADASTRO DE ESTABELECIMENTOS DE AQUICULTURA

Art. 9º Todos os estabelecimentos de aquicultura serão cadastrados pelo órgão executor iniciando-se o processo na Gerência Regional onde se localizam, respeitando-se estas normas e a legislação ambiental vigente.

Art. 10 O registro será realizado posteriormente ou concomitantemente com a avaliação do órgão do meio ambiente devendo ser incluído no memorial descritivo as observações relativas a essa avaliação.

CAPÍTULO V

NOTIFICAÇÃO DE SUSPEITA OU OCORRÊNCIA DE ENFERMIDADE

Art. 11 Os médicos veterinários, proprietários ou qualquer outro cidadão que tenha conhecimento ou suspeita da ocorrência das enfermidades de notificação obrigatória constantes destas normas deverão notificar de imediato ao órgão executor das ações de defesa sanitária animal.

Art. 12 São consideradas enfermidades de notificação obrigatória para animais aquáticos:

I - PEIXES: Necrose hematopoiética infecciosa, Necrose hematopoiética epizootica, Herpesvirose dos salmonídeos, Viremia primaveril da carpa e Septicemia hemorrágica viral;

II - MOLUSCOS: Microcitose;

III - CRUSTÁCEOS: Mancha branca, Cabeça amarela e Síndrome de Taura;

Art. 13 O órgão executor também deve investigar, controlar e/ou erradicar outras enfermidades infecciosas de disseminação entre os animais aquáticos e de importância entre eles e outras espécies, incluindo o homem quais sejam:

I - PEIXES: Ierineose, gyrodactilose, dactilogirose, costiose, heneguiose, edwardsiellose e aeromonose;

II - MOLUSCOS: iridovirose, bucefalose, hepatite e identificação das toxinas DSP/PSP;

III - CRUSTÁCEOS: IHHV, vibriose e gregarinas.

Art. 14 A notificação da suspeita de ocorrência das enfermidades de animais aquáticos será encaminhada ao órgão executor, com periodicidade mensal, através de formulário próprio, salvo para o caso das enfermidades de notificação obrigatória cuja notificação deve ser imediata.

Art. 15 A notificação poderá ser efetuada pessoalmente, por telefone, rádio, fax, correio eletrônico ou qualquer outro meio disponível.

Art. 16 A infração do disposto nos artigos anteriores será investigada pelo serviço estadual de defesa sanitária animal, que utilizará os meios disponíveis para apuração de responsabilidades e aplicação de penalidades previstas na legislação sanitária estadual vigente.

CAPÍTULO VI

DA VIGILÂNCIA, CONTROLE E FISCALIZAÇÃO SANITÁRIA

Art. 17 Todos os estabelecimentos de aquicultura estão sujeitos à fiscalização do serviço estadual de defesa sanitária animal.

Art. 18 A inobservância das exigências constantes destas normas, dependendo da situação identificada pelo serviço estadual de defesa sanitária animal, implicará na adoção das sanções estabelecidas na Lei nº 10.366,

<http://www.agricultura.sc.gov.br/internas/portaria.php?id=2>

de 24 de Janeiro de 1997 e no Decreto Estadual nº 2.919, de 1º de junho de 1998, alterado pelo Decreto nº 3.527, de 15 de dezembro de 1998.

Art. 19 Os estabelecimentos de aquicultura que pratiquem o comércio internacional deverão cumprir as normas estabelecidas pelo MAPA para tal fim, bem como cumprir as exigências dos países importadores.

Art. 20 Para fins de importação de produtos de animais aquáticos o interessado deverá obter autorização prévia junto ao MAPA.

Art. 21 O sistema de vigilância epidemiológica das enfermidades de animais aquáticos está centrado no controle da introdução em território estadual de possíveis agentes de enfermidades exóticas.

Art. 22 Ao desembarque em território catarinense, os animais aquáticos e seus produtos procedentes de outras bacias hidrográficas serão transferidos em seus recipientes de viagem ainda lacrados, para o viveiro de isolamento e monitoramento sanitário, previamente habilitado pelo serviço estadual de defesa sanitária animal, visando à confirmação de ausência dos agentes patogênicos das enfermidades previstas nestas normas.

Art. 23 O monitoramento sanitário será realizado no viveiro de isolamento de acordo com a espécie e controlado pelo serviço estadual de defesa sanitária animal.

Art. 24 A colheita de material de animais aquáticos e de produtos, se necessária, será realizada pelo serviço estadual de defesa sanitária animal no momento da chegada no estabelecimento e encaminhada para realização de provas laboratoriais acompanhada de formulário próprio, em conformidade com o disposto na legislação sanitária estadual vigente.

Art. 25 Todo o material colhido oficialmente pelo médico veterinário do serviço estadual de defesa sanitária animal ou médico veterinário credenciado deverá ser lacrado e acompanhado de formulário padronizado.

Art. 26 Se durante o período de isolamento forem identificados agentes causadores das enfermidades especificadas nestas normas, o serviço estadual de defesa sanitária animal comunicará ao interessado, por escrito, num prazo máximo de setenta e duas horas os resultados das provas e procederá a destruição dos lotes positivos.

Art. 27 Os resultados dos testes laboratoriais deverão ser emitidos em formulário próprio, padronizado pelo órgão executor e comunicados conforme o fluxograma abaixo:

I - Resultado negativo: enviar imediatamente via FAX, correio eletrônico ou outro meio de comunicação, para o médico veterinário do serviço estadual de defesa sanitária animal requisitante e para o estabelecimento em questão;

II - Resultado positivo: enviar imediatamente via FAX, correio eletrônico ou outro meio de comunicação ao médico veterinário do serviço estadual de defesa sanitária animal onde se localiza o estabelecimento, que notificará ao mesmo.

Art. 28 Confirmada a identificação de agente(s) patogênico(s) referidos nestas normas, os animais aquáticos que fizeram parte do carregamento serão imediatamente sacrificados e tomadas todas as medidas de profilaxia que se fizerem necessárias sem que o proprietário tenha direito a indenização de qualquer espécie.

Art. 29 O sacrifício dos animais referido no artigo anterior será realizado em conformidade com o previsto na legislação estadual de defesa sanitária animal vigente.

Art. 30 Os custos das colheitas oficiais para a realização das provas laboratoriais, bem como os custos de remessa para os laboratórios de referência ou os credenciados pelo MAPA para este fim, serão de inteira responsabilidade do interessado.

Art. 31 Ao término do isolamento, não havendo resultado positivo o serviço estadual de defesa sanitária animal comunicará ao interessado a liberação do lote.

Art. 32 O período de isolamento para as diferentes espécies de animais aquáticos vivos, em qualquer de suas fases de desenvolvimento, deverá compreender o tempo necessário para a obtenção dos resultados laboratoriais.

Art. 33 Para as espécies em que não se dispõe de informações científicas suficientes, o período de isolamento será determinado pelo serviço estadual de defesa sanitária animal.

Art. 34 O intervalo entre isolamentos deverá observar um período mínimo de vazio sanitário de dez dias, onde será realizada a limpeza e a desinfecção de todas as instalações.

Art. 35 Todos os materiais e equipamentos utilizados no isolamento devem ser mantidos limpos e desinfetados com produtos específicos, recomendados pelo órgão executor.

Art. 36 A entrada de pessoas, veículos, equipamentos e materiais nas áreas internas da unidade de isolamento, somente será permitida quando cumpridas rigorosas medidas de biossegurança.

Art. 37 O acesso ao isolamento deve ser único para entrada e saída, provida de equipamentos de lavagem e desinfecção.

CAPÍTULO VII

DAS FEIRAS E EXPOSIÇÕES

Art. 38 Para a liberação, fiscalização oficial e o controle de enfermidades em feiras e exposições de animais aquáticos, deverão ser observadas:

I - As legislações e normas federais e estaduais vigentes;

II - O controle das enfermidades de notificação obrigatória e aquelas de importância econômica contempladas nestas normas;

III - Havendo a ocorrência de foco das enfermidades de notificação obrigatória na região, o serviço estadual de defesa sanitária animal estabelecerá as medidas restritivas para a realização do evento.

CAPÍTULO VIII

ATIVIDADES EM FOCO

Art. 39 Sempre que houver a notificação de suspeita de foco de enfermidade de notificação obrigatória, os procedimentos deverão atender as seguintes atividades:

I - Confirmar foco: visita inicial, coleta de material e remessa ao laboratório, com preenchimento de formulários próprios;

II - Rastreamento epidemiológico: baseado na obtenção de informações que levam o profissional médico veterinário a encontrar a origem do foco, visando definir sua extensão, evolução, difusão e conseqüências;

III - Isolar estabelecimento ou zona de cultivo: considerado procedente, deverá ser providenciado o isolamento do estabelecimento ou da zona de cultivo que contenha animais aquáticos sanitariamente comprometidos;

IV - Interditar área focal e perifocal: conforme a gravidade da enfermidade os estabelecimentos ou zonas de cultivo serão interditados, assim como as propriedades vizinhas e microbacias, caso também se verifique a ocorrência da enfermidade;

V - Comunicar foco: o foco será comunicado ao médico veterinário do serviço estadual de defesa sanitária animal local e este ao órgão executor, por meio de formulário próprio, para a apreciação epidemiológica e tomada de decisão frente à gravidade requerida;

VI - Sacrifício sanitário: dependendo da gravidade da enfermidade, os animais existentes no estabelecimento ou zona de cultivo serão sacrificados sendo o processamento realizado em local previamente autorizado pelo serviço estadual de defesa sanitária animal;

VII - Tratamento terapêutico: nos casos em que for viável, proceder-se-á ao tratamento dos animais enfermos, utilizando-se produtos veterinários aprovados e recomendados para cada situação;

VIII - Desinfetar: constatando-se a necessidade de desinfecção, será feita a despesca, com esvaziamento completo e desinfecção adequada, pelo período necessário ao extermínio do(s) agente(s) causador(es) da(s) enfermidade(s);

IX - Acompanhar foco: o estabelecimento ou zona de cultivo focal, bem como os demais pertencentes à área perifocal e microbacia deverão ser periodicamente visitados com a finalidade de monitoramento da evolução da enfermidade e a execução das medidas que foram recomendadas, bem como a adoção de outras providências visando o controle total da enfermidade existente;

X - Encerrar foco: uma vez constatada a inexistência de agentes patogênicos que causaram a enfermidade, bem como o tempo de despovoamento dos estabelecimentos ou zona de cultivo e o sucesso das desinfecções realizadas, o foco será encerrado e a interdição será suspensa.

CAPÍTULO IX

DAS EXIGÊNCIAS HIGIÊNICO-SANITÁRIAS E DOS PROCEDIMENTOS DE BIOSSEGURANÇA A SEREM CUMPRIDAS PELO ESTABELECIMENTO DE AQUICULTURA

Art. 40 Os Estabelecimentos devem atender as seguintes exigências:

I - Ter localização geográfica e hidrográfica adequada, devendo ser respeitadas as distâncias mínimas necessárias para a biossegurança do estabelecimento;

II - Estar protegido por cercas de segurança e com acesso único, provido de pedilúvio e rodolúvio com aspersão e/ou equipamentos para lavagem e desinfecção dos veículos;

III - Possuir critérios para o rígido controle de trânsito e acesso de pessoas (portões/portaria);

IV - Controlar e disciplinar a entrada de pessoas, veículos, equipamentos e materiais nas áreas internas do estabelecimento, somente quando cumpridas rigorosas medidas de biossegurança;

V - Proibir acesso de pessoas estranhas ao serviço;

VI - Ter as superfícies interiores das instalações construídas de forma que permitam limpeza e desinfecção adequadas, janelas teladas, balcões de material impermeável, iluminação e ventilação adequadas;

VII - Dispor de tapetes sanitários ou outros meios de desinfecção à entrada das diferentes instalações do estabelecimento;

VIII - Dispor de meios devidamente aprovados pelo órgão executor e dos órgãos competentes de controle

XVI - Possuir vestiário com paredes e pisos que permitam fácil desinfecção, dotados de banheiro, chuveiro e vestuário para o pessoal de serviço e visitantes.

CAPÍTULO X

DAS EXIGÊNCIAS SANITÁRIAS PARA O TRÂNSITO DE ANIMAIS AQUÁTICOS

Art. 41 No intuito de evitar a propagação de enfermidades no território catarinense fica estabelecida a obrigatoriedade de atestado sanitário emitido por médico veterinário, para a emissão da Guia de Trânsito Animal - GTA, para o trânsito de animais aquáticos por qualquer motivo ou finalidade.

Art. 42 Para o trânsito de animais aquáticos deverão ser obedecidas as seguintes exigências:

I - O documento oficial a ser utilizado para o ingresso e o trânsito interno no Estado de Santa Catarina é a Guia de Trânsito Animal - GTA;

II - O ingresso e o trânsito de animais aquáticos e produtos no Estado de Santa Catarina só será permitido quando acompanhados da GTA expedida em conformidade com estas normas, devendo, na ausência desse documento, serem aplicadas as sanções previstas na Lei Estadual nº 10.366, de 24 de Janeiro de 1997 e no Decreto Estadual nº 2.919, de 1º de junho de 1998, alterado pelo Decreto nº 3.527, de 15 de dezembro de 1998;

III - O controle de trânsito interno será realizado nas barreiras e postos de fiscalização pelo serviço estadual de defesa sanitária animal;

IV - Por ocasião da expedição do documento sanitário para trânsito de animais aquáticos para qualquer finalidade, serão requeridos os critérios estabelecidos nas normas e legislação estadual de defesa sanitária animal vigente.

V - A GTA para animais aquáticos e produtos deverá ser emitida por médico veterinário fiscal federal agropecuário, médico veterinário do serviço estadual de defesa sanitária animal ou médico veterinário credenciado;

VI - A GTA para animais aquáticos e produtos deverá estar acompanhada do atestado de saúde e do controle sanitário do estabelecimento bem como do atestado negativo para as enfermidades previstas nestas normas, realizados em laboratórios credenciados pelo serviço oficial.

VII - Os veículos ou recipientes empregados para o transporte dos animais aquáticos deverão ser desenhados, construídos e acondicionados de modo que suportem o peso dos animais aquáticos e da água garantindo a segurança durante o transporte, e que permitam a adequada desinfecção;

VIII - Os veículos transportadores de animais aquáticos deverão ser lavados e desinfetados de acordo com as normas previstas pelo órgão executor;

IX - Os recipientes destinados ao transporte de animais aquáticos deverão conter dispositivo para vedação da água bem como permitir o uso de lacre de segurança;

X - Os animais aquáticos deverão estar acondicionados em recipiente de transporte que permita a fácil visualização de seu conteúdo;

XI - Os recipientes em trânsito que contenham produtos de animais aquáticos não deverão ser abertos, salvo se necessário e a critério do serviço estadual de defesa sanitária animal e nesse caso deverão ser adotadas as devidas precauções para evitar qualquer risco de contaminação;

XII - Durante o transporte de animais aquáticos, o transportador não poderá drenar ou reabastecer a água dos recipientes de transporte em local que não esteja previamente autorizado pelo serviço estadual de defesa sanitária animal para esta finalidade;

XIII - As águas residuais e de enxágüe não deverão ser depositadas em sistemas de drenagem que possa atingir o meio aquático natural;

XIV - A água de descarte dos recipientes de transporte poderá ser depositada em terras que não drenem em águas povoadas de animais aquáticos ou ser tratada mediante procedimento recomendado pelo órgão executor;

XV - Para o caso do transporte ser realizado em sacos plásticos, estes deverão estar acondicionados em contentores adequados e tão logo seja feita a liberação dos animais, os mesmos deverão ser incinerados ou esterilizados;

XVI - Para a emissão da GTA, os animais aquáticos e produtos devem ser procedentes de estabelecimento de aquicultura, no qual no ciclo atual ou anterior não tenha sido constatado nenhum foco das enfermidades de certificação ou notificação especificadas nestas normas, e que na mesma zona de cultivo, não tenha sido constatado nenhum caso destas enfermidades nos últimos noventa dias.

CAPÍTULO XI

DA CLASSIFICAÇÃO E CERTIFICAÇÃO DOS ESTABELECIMENTOS

Art. 43 Os estabelecimentos de reprodução, recria e/ou manipulação de material genético, após inspeção e monitoramento sanitário, receberão uma classificação de conformidade com o estado sanitário do plantel, dos procedimentos de biossegurança adotados, das condições de infraestrutura e da localização do empreendimento:

I - CLASSE A: estabelecimento com estudos sanitários de dois anos livre de patógenos de declaração obrigatória e de enfermidade de impacto econômico, o qual foi inspecionado em intervalos de 06 (seis) meses ou menos. Deve possuir protocolo de biossegurança onde conste mapa de risco e responsáveis setoriais que assinam e ratificam o protocolo;

II - CLASSE B: estabelecimento com estudos sanitários de dois anos livre de patógenos de declaração obrigatória e de enfermidade de impacto econômico, o qual foi inspecionado em intervalos de 06 (seis) meses ou menos, mas cujo entorno (microbacia) possa estar infectado. Deve possuir protocolo de biossegurança onde conste mapa de risco e responsáveis setoriais que assinam e ratificam o protocolo;

III - CLASSE C: estabelecimento livre de patógenos de declaração obrigatória, mas onde uma ou mais enfermidades de declaração não obrigatória tenha ocorrido dentro dos 2 (dois) últimos anos;

IV - CLASSE D: estabelecimento que na inspeção não apresenta sintomas clínicos de qualquer enfermidade mas que possuem registro de enfermidades anteriores;

Art. 44 O estabelecimento que satisfizer as presentes normas e exigências, será certificado como Estabelecimento Aquícola com um Mínimo de Enfermidades - EAME, recebendo documento oficial assinado pelo serviço estadual de defesa sanitária animal.

Art. 45 Todos os estabelecimentos de aquicultura registrados ou cadastrados, para fins de certificação são obrigados além de seguir os requisitos sanitários estabelecidos nestas normas, cumprir com as seguintes instruções:

I - Permitir ao médico veterinário fiscal federal agropecuário e ao médico veterinário do serviço estadual de defesa sanitária animal, livre acesso a qualquer momento aos documentos e às instalações, bem como aplicar os procedimentos de biossegurança estabelecidos nestas normas;

II - Manter registro do controle semestral da qualidade de água e do tratamento efetuado na água de abastecimento, dos tratamentos de efluentes líquidos, de limpeza de equipamentos e instalações;

III - Manter registro dos procedimentos de monitoramento sanitário, de cada lote de animais aquáticos e produtos, referentes às enfermidades nominadas nestas normas;

IV - Os exames deverão ser realizados obrigatoriamente, em laboratório oficial e/ou credenciado pelo MAPA para este fim, estando os laudos e relatórios disponíveis ao médico veterinário do serviço estadual de defesa sanitária animal sempre que solicitados;

V - O responsável técnico do estabelecimento de aquicultura deverá encaminhar, mensalmente, ao serviço estadual de defesa sanitária animal local o informe epidemiológico dos animais aquáticos existentes no estabelecimento;

VI - Manter registro referente ao manejo dos animais aquáticos, constando dados sobre mortalidade, diagnóstico de enfermidades, monitoramento sanitário, tratamentos, etc., os quais deverão estar disponíveis ao médico veterinário do serviço estadual de defesa sanitária animal, sempre que solicitados;

VII - Remeter ao órgão executor relatório trimestral, conforme modelo por este aprovado, sob pena de ter sua certificação cancelada.

Art. 46 A certificação do estabelecimento será suspensa sempre que ocorrer diagnóstico de enfermidade de notificação obrigatória ou impacto econômico, ou no descumprimento das demais normas sanitárias e exigências do serviço estadual de defesa sanitária animal.

Art. 47 O retorno da certificação ficará condicionado ao cumprimento das medidas sanitárias cabíveis, além do atendimento das normas e exigências do serviço estadual de defesa sanitária animal.

CAPÍTULO XII

DAS DISPOSIÇÕES GERAIS

Art. 48 Os responsáveis pelo estabelecimento ficam obrigados a permitir o livre acesso aos documentos e às instalações, a qualquer momento, ao médico veterinário do serviço estadual de defesa sanitária animal.

Art. 49 Apresentar, até o último dia útil de cada mês, relatório de suas atividades, conforme modelo a ser definido pelo órgão executor.

Art. 50 Os estabelecimentos de aquicultura que pratiquem o comércio interestadual e internacional deverão cumprir as normas estabelecidas pelo MAPA, bem como cumprir as exigências dos países importadores.

Art. 51 O estabelecimento que estiver produzindo ou comercializando animais aquáticos, e não constar do registro oficial, será advertido de acordo com a legislação estadual de defesa sanitária animal vigente, independentemente das demais medidas legais cabíveis.

Art. 52 Os casos omissos e as dúvidas suscitadas na aplicação destas normas serão dirimidas pelo órgão executor, e em instância superior pela Secretaria de Estado do Desenvolvimento Rural e da Agricultura de Santa Catarina.

Art. 53 Quando necessário, estas normas poderão ser modificadas através de portaria da SDA/SC ou quando da emissão de instruções normativas ou de serviço federais.

Pró-cidadão da Prefeitura de Florianópolis

Saneamento e Saúde: Laboratório de Análises Clínicas (Saúde)

Descrição: Referente ao alvará sanitário para estabelecimentos que exerçam atividades relacionadas com laboratórios de análises clínicas.

Forma de Solicitar: Pessoalmente ou por meio de terceiros portando: CPF e/ou RG, em qualquer Unidade Pró – Cidadão.

Documentos Necessários:

- Requerimento;
- Cópia do Contrato Social e Alterações;
- Cópia do CNPJ;
- Taxa de Alvará Sanitário (DAM);
- Relação com o nome completo de todos os funcionários, com os respectivos números de RG ou Registros nos Conselhos de Classe ou no MEC/Secretaria de Educação, assinada pelo representante legal da empresa;
- Termo de Responsabilidade Técnica emitido pelo Conselho de Classe respectivo;
- Descrição de serviços desenvolvidos discriminando as respectivas atividades para clínicas médicas;
- Manual de Boas Práticas (2 cópias);
- Layout das instalações com memorial descritivo;
- Consulta de Viabilidade de Instalação ou Habite-se de Construção Comercial ou Alvará de Licença da Prefeitura do ano corrente;
- Croquis de localização ;
- Programa de Controle Médico de Saúde Ocupacional (PCMSO), conforme Normas Regulamentadoras da CLT;
- Programa de Prevenção de Riscos Ambientais (PPRA), conforme Normas Regulamentadoras da CLT.

Obs.:

1 - Para substituir a Consulta de Viabilidade de Instalação, poderá ser aceito o Alvará Sanitário, mesmo vencido, de uma outra Pessoa Jurídica ou Física, que esteve estabelecida no mesmo endereço e com a mesma atividade. Para isso, deve-se proceder da seguinte maneira: - *para Alvará Sanitário do Município* solicita-se um processo de baixa do Alvará Sanitário da empresa anterior e um processo de Alvará Sanitário para a nova empresa, anexando uma cópia do Alvará Sanitário aos outros documentos. - *para Alvará Sanitário Estadual ou Alvará Sanitário Municipal de Temporada*, basta anexar ao processo uma cópia do Alvará Sanitário da empresa anterior.

2 - Após a formação do Processo Administrativo, poderão ser requisitados outros documentos que a Autoridade Sanitária entender pertinentes.

3 - Renovação: são necessários os documentos sublinhados, juntamente com (01) uma cópia do alvará anterior.

Resolução - RDC nº 189, de 18 de julho de 2003
D.O.U de 21/07/2003

Dispõe sobre a regulamentação dos procedimentos de análise, avaliação e aprovação dos projetos físicos de estabelecimentos de saúde no Sistema Nacional de Vigilância Sanitária, altera o Regulamento Técnico aprovado pela RDC nº 50, de 21 de fevereiro de 2002 e dá outras providências.

A Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, no uso de sua atribuição que lhe confere o art. 11, inciso IV, do Regulamento da ANVISA aprovado pelo Decreto 3.029, de 16 de abril de 1999, art. 111, inciso I, alínea "b", § 1º do Regimento Interno aprovado pela Portaria nº 593, de 25 de agosto de 2000, republicada no DOU de 22 de dezembro de 2000, em reunião realizada em 16 de julho de 2003,

considerando o princípio da descentralização político-administrativa, previsto na Constituição Federal;

considerando o disposto no Art. 7º, inciso IX e no Art. 16, inciso III, alínea "d" da Lei nº 8.080 de 19 de setembro de 1990;

considerando o disposto no Art. 2º, inciso V e Art. 7º, inciso III da Lei nº 9782, de 26 de janeiro de 1999;

considerando o disposto no Art. 10, inciso II e Art. 14 da Lei 6.437/77, de 20 de agosto de 1977;

considerando a Resolução da Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA, RDC nº 50, de 21 de fevereiro de 2002;

considerando a Consultas Públicas da ANVISA nº 07 de 02 de abril de 2003 e nº 16 de 22 de abril de 2003;

considerando a necessidade de regulamentação no Sistema Nacional de Vigilância Sanitária dos procedimentos de análise, avaliação e aprovação dos projetos físicos de estabelecimentos de saúde,

considerando que o disposto nesta Resolução não se trata da revisão do Regulamento Técnico com o objetivo de atualização ao desenvolvimento científico e tecnológico do País, disposta no art. 4º da RDC nº 50 de 21 de fevereiro de 2002;

adota a seguinte Resolução de Diretoria Colegiada e eu, Diretor-Presidente, determino a sua publicação:

Art 1º Todos projetos de arquitetura de estabelecimentos de saúde públicos e privados devem ser avaliados e aprovados pelas vigilâncias sanitárias estaduais ou municipais previamente ao início da obra a que se referem os projetos.

Art. 2º A Licença Sanitária de Funcionamento destinada a construções novas, áreas a serem ampliadas e/ou reformadas de estabelecimentos já existentes e dos anteriormente não destinados a estabelecimentos de saúde, de serviços de saúde públicos e privados fica condicionada ao cumprimento das disposições contidas nesta Resolução e na Resolução ANVISA RDC nº 50 de 21 de fevereiro de 2002.

Art. 3º O item 1.2.2.1. da Parte I do Regulamento Técnico aprovado pela Resolução nº 50/02 passa a vigorar com a seguinte redação:

1.2.2.1 Arquitetura

O projeto básico de arquitetura - PBA será composto da representação gráfica + relatório técnico conforme descrito a seguir.

1.2.2.1.1. Representação Gráfica:

a) as plantas baixas, cortes e fachadas, com escalas não menores que 1:100; exceto as plantas de locação, de situação e de cobertura, que poderá ter a escala definida pelo autor do projeto ou pela legislação local pertinente;

b) todos os ambientes com nomenclatura conforme listagem contida nesta Resolução e demais normas federais;

c) todas as dimensões (medidas lineares e áreas internas dos compartimentos e espessura das paredes);

d) a locação de louças sanitárias e bancadas, posição dos leitos (quando houver), locação dos equipamentos não portáteis médico-hospitalares e de infra-estrutura, equipamentos de geração de água quente e vapor, equipamentos de fornecimento de energia elétrica regular e alternativa, equipamentos de fornecimento ou geração de gases medicinais, equipamentos de climatização, locais de armazenamento e, quando houver, tratamento de RSS (Resíduos de Serviços de Saúde);

e) indicações de cortes, elevações, ampliações e detalhes;

f) em se tratando de reforma e/ou ampliação e/ou conclusão, as plantas devem conter legenda indicando área

a ser demolida, área a ser construída e área existente;

g) locação da edificação ou conjunto de edificações e seus acessos de pedestres e veículos;

h) planta de cobertura com todas as indicações pertinentes;

i) planta de situação do terreno em relação ao seu entorno urbano;

j) identificação e endereço completo do estabelecimento, data da conclusão do projeto, número seqüencial das pranchas, área total e do pavimento.

1.2.2.1.2. Relatório Técnico:

a) dados cadastrais do estabelecimento de saúde, tais como: razão social, nome fantasia, endereço, CNPJ e número da licença sanitária de funcionamento anterior, caso exista, dentre outras que a vigilância sanitária local considere pertinente;

b) memorial do projeto de arquitetura descrevendo as soluções adotadas no mesmo, onde se incluem, necessariamente, considerações sobre os fluxos internos e externos;

c) resumo da proposta assistencial, contendo listagem de atividades que serão executadas na edificação do estabelecimento de saúde, assim como de atividades de apoio técnico ou logístico que sejam executadas fora da edificação do estabelecimento em análise ;

d) quadro de número de leitos, quando houver, discriminando: leitos de internação, leitos de observação e leitos de tratamento intensivo, conforme Portaria nº 1101/GM de 12 de junho de 2002, do Ministério da Saúde publicada no DOU de 13 de junho de 2002;

e) especificação básica de materiais de acabamento e equipamentos de infra-estrutura (poderá estar indicado nas plantas de arquitetura) e quando solicitado, dos equipamentos médico-hospitalares não portáteis;

f) descrição sucinta da solução adotada para o abastecimento de água potável, energia elétrica, coleta e destinação de esgoto, resíduos sólidos e águas pluviais da edificação;

g) no caso de instalações radioativas, o licenciamento de acordo com as normas do Conselho Nacional de Energia Nuclear - CNEN NE 6.02.

O Projeto Básico de Arquitetura - PBA (representação gráfica + relatório técnico) será a base para o desenvolvimento dos projetos complementares de engenharia (estrutura e instalações).

Art 4º O item 1.3 da Parte I do Regulamento Técnico aprovado pela RDC nº 50/2002 passa a vigorar com a seguinte redação:

1.3 RESPONSABILIDADES

1.3.1. Cabe a cada área técnica o desenvolvimento do projeto executivo respectivo. O projeto executivo completo da edificação será constituído por todos os projetos especializados devidamente compatibilizados, de maneira a considerar todas as suas interferências.

1.3.2. Só serão analisados pelas vigilâncias sanitárias estaduais ou municipais, projetos elaborados por técnicos ou firmas legalmente habilitados pelo Conselho Regional de Engenharia, Arquitetura e Agronomia - CREA local.

1.3.3. O autor ou autores dos projetos devem assinar todas as peças gráficas dos projetos respectivos, mencionando o número do CREA e providenciar sempre a ART (Anotação de Responsabilidade Técnica) correspondente e recolhida na jurisdição onde for elaborado o projeto.

1.3.4. O autor ou autores do projeto de arquitetura e o responsável técnico pelo estabelecimento de saúde devem assinar o Relatório Técnico descrito no item 1.2.2.1.2., mencionando o seu número de registro no órgão de classe.

A aprovação do projeto não eximirá seus autores das responsabilidades estabelecidas pelas normas, regulamentos e legislação pertinentes às atividades profissionais. O projeto deverá ser encaminhado para aprovação formal nos diversos órgãos de fiscalização e controle, como Prefeitura Municipal, Corpo de Bombeiros e entidades de proteção sanitária e do meio ambiente, assim como, será de responsabilidade do autor ou autores do projeto a introdução das modificações necessárias à sua aprovação.

Art. 5º O item 1.6 da Parte I do Regulamento Técnico aprovado pela RDC nº 50/2002 passa a vigorar com a seguinte redação:

Para a execução de qualquer obra nova, de reforma ou de ampliação de estabelecimento assistencial de saúde-EAS é exigida a avaliação do projeto físico em questão pela Vigilância Sanitária local (estadual ou

municipal), que licenciará a sua execução, conforme o inciso II do art. 10 e art. 14 da Lei 6437/77 que configura as infrações à legislação sanitária federal, Lei 8080/90 - Lei Orgânica da Saúde e Constituição Federal.

A avaliação de projetos físicos de EAS exige a documentação denominada PBA - Projeto Básico de Arquitetura (representação gráfica + relatório técnico), conforme descrito no item 1.2.2.1 e ART prevista no item 1.3 dessa Resolução.

Quando do término da execução da obra e solicitação de licença de funcionamento do estabelecimento, as vigilâncias sanitárias estaduais ou municipais farão inspeção no local para verificar a conformidade do construído com o projeto aprovado anteriormente. A equipe de inspeção deve possuir necessariamente um profissional habilitado pelo sistema CREA/CONFEA.

O proprietário deve manter arquivado em conjunto com o projeto aprovado pela vigilância sanitária, as ARTs referentes aos projetos complementares de estruturas e instalações, quando couber, conforme previsto no item 1.3 dessa Resolução.

Art. 6º O item 1.6.1 do Regulamento Técnico aprovado pela Resolução nº 50/2002 passa a vigorar com a seguinte redação:

A avaliação do PBA pelas vigilâncias sanitárias estaduais ou municipais, compreende a análise do projeto por uma equipe multiprofissional e elaboração de parecer técnico assinado no mínimo por arquiteto, engenheiro civil, ou outro técnico legalmente habilitado pelo sistema CREA/CONFEA, para as atividades em questão.

O parecer deverá descrever o objeto de análise e conter uma avaliação do projeto básico arquitetônico quanto a:

Adequação do projeto arquitetônico às atividades propostas pelo EAS - verificação da pertinência do projeto físico apresentado com a proposta assistencial pretendida, por unidade funcional e conjunto do EAS, objetivando o cumprimento da assistência proposta;

Funcionalidade do edifício - verificação dos fluxos de trabalho/materiais/insumos propostos no projeto físico, visando evitar problemas futuros de funcionamento e de controle de infecção (se for o caso) na unidade e no EAS como um todo;

Dimensionamento dos ambientes - verificação das áreas e dimensões lineares dos ambientes propostos em relação ao dimensionamento mínimo exigido por este regulamento, observando uma flexibilidade nos casos de reformas e adequações, desde que justificadas as diferenças e a não interferência no resultado final do procedimento a ser realizado;

Instalações ordinárias e especiais - verificação da adequação dos pontos de instalações projetados em relação ao determinado por este regulamento, assim como das instalações de suporte ao funcionamento geral da unidade (ex.: sistema de ar condicionado adotado nas áreas críticas, sistema de fornecimento de energia geral e de emergência (transformadores, e gerador de emergência e no-break), sistema de gases medicinais adotado, sistema de tratamento de esgoto e sistema de tratamento de resíduos de serviços de saúde-RSS , quando da instalação de sistemas para esses fins, e equipamentos de infra-estrutura, tais como: elevadores, monta-cargas, caldeiras, visando evitar futuros problemas decorrentes da falta dessas instalações;

Especificação básica dos materiais - verificação da adequação dos materiais de acabamento propostos com as exigências normativas de uso por ambiente e conjunto do EAS, visando adequar os materiais empregados com os procedimentos a serem realizados.

O parecer deve ser conclusivo e conter a análise do PBA sobre cada um dos itens acima relacionados, identificando os problemas existentes de forma descritiva e solicitando as alterações ou complementações necessárias para a correção, assim como conter a observação da necessidade de apreciação e aprovação do projeto pelos órgãos competentes do nível local para execução da obra.

No caso de obras públicas, o parecer deve conter ainda a observação quanto à exigência de conclusão dos projetos de instalações e estruturas (Lei 8.666 em seus artigos 6º e 7º e Resolução CONFEA n.º 361/91), assim como sua apreciação e aprovação pelos órgãos competentes do nível local, quando couber, para realização do processo de licitação e conseqüente execução da obra.

Nota: As peças gráficas e descritivas do PBA analisado devem possuir registro de identificação do parecer técnico emitido, com data, nome, assinatura e número de inscrição no Conselho Regional de Engenharia, Arquitetura e Agronomia-CREA, do responsável pelo parecer.

Art. 7º O item 1.6.2 da Parte I do Regulamento Técnico aprovado pela RDC nº 50/2002 passa a vigorar com a seguinte redação:

Para edificações novas, sejam estabelecimentos completos ou partes a serem ampliadas, é obrigatória a aplicação total desta norma e da legislação em vigor.

Para obras de reforma e adequações, quando esgotadas todas as possibilidades sem que existam condições de cumprimento integral desta norma, devem-se privilegiar os fluxos de trabalho/material/paciente (quando houver), adotando-se a seguinte documentação complementar, que será analisada em conjunto com o projeto básico de arquitetura:

1 - Planta baixa com leiaute dos equipamentos não portáteis (quando houver) e mobiliário principal, com as devidas dimensões consignadas ou representadas em escala;

2 - Declaração do projetista e do responsável pelo EAS de que o projeto proposto atende parcialmente as normas vigentes para o desenvolvimento das atividades assistenciais e de apoio previstas, relacionando as ressalvas que não serão atendidas e o modo como estão sendo supridas no projeto em análise.

Procedimento igual ao das reformas deve ser seguido quando se tratar da adoção de uma nova tecnologia não abordada pela legislação sanitária, diferente das usuais.

Em todos os casos, os projetos deverão ser acompanhados de relatório técnico conforme explanado no item 1.2.2.1 do item Elaboração de Projetos Físicos desta norma.

A Gerência do Estabelecimento de Saúde deve manter arquivados os projetos aprovados, mantendo-os disponíveis para consulta por ocasião das inspeções ou fiscalizações.

A direção do Estabelecimento de Saúde deverá encaminhar as vigilâncias sanitárias estaduais ou municipais, os projetos físicos referentes as modificações na estrutura física que impliquem mudanças de fluxos ou alteração substancial de leiaute ou incorporação de nova atividade, para que sejam avaliadas, segundo as normas vigentes.

A área técnica de análise de projetos da vigilância sanitária estadual ou municipal poderá solicitar os projetos complementares de estruturas e instalações ordinárias e especiais, conforme dispõe os itens 1.2.1.3. e 1.2.2.2. do capítulo - Elaboração de Projetos Físicos, quando couber.

Art. 8º O item 1.6.3 da Parte I do Regulamento Técnico aprovado pela RDC nº 50/2002 passa avigorar com a seguinte redação:

1.6.3. Obras Financiadas por Órgãos Públicos

As obras a serem financiadas por órgãos públicos terão seus projetos físicos avaliados conforme as orientações contidas nas normas de financiamento destes órgãos, sem prejuízo dos definido nesta Resolução, em especial do item 1.6.

Art. 9º Todos os projetos de estabelecimentos de saúde devem dar entrada no setor de protocolo das vigilâncias sanitárias estaduais ou municipais, quando da solicitação de avaliação dos mesmos.

I - Só serão protocolados os projetos cuja documentação esteja completa, conforme o item 1.6 do Regulamento Técnico aprovado pela RDC nº 50/2002.

Art. 10 Mediante a entrega de toda a documentação para a análise, será fixado um prazo máximo 90dias, contados a partir da data do protocolo, ou inferior, definido em função da capacidade operacional de cada vigilância sanitária, para entrega do parecer técnico ou aprovação do projeto, assinado por técnico das vigilâncias sanitárias estaduais ou municipais.

Art. 11 As vigilâncias sanitárias estaduais ou municipais devem possuir um setor responsável pela análise e aprovação dos projetos físicos de estabelecimentos de saúde.

Art. 12 A aprovação dos projetos de estabelecimentos de saúde pelas vigilâncias sanitárias estaduais ou municipais, não exclui a necessidade de sua avaliação pelos demais órgãos competentes da administração pública para respectiva aprovação, nem exime o responsável pelo estabelecimento de saúde do atendimento das demais obrigações legais.

Art. 13 A aprovação dos projetos físicos de estabelecimentos de saúde nas vigilâncias sanitárias estaduais ou municipais devem atender preferencialmente as seguintes atividades:

I. Solicitação de consulta prévia do projeto físico por parte do interessado no setor de análise de projetos da vigilância sanitária (opcional)

II. Entrega do projeto físico no setor de protocolo da vigilância sanitária ou da secretaria de saúde, conforme definição administrativa local ;

- III. Abertura de processo com o projeto;
- IV. encaminhamento do processo para o setor de análise de projetos da vigilância sanitária;
- V. Análise do projeto com emissão de parecer técnico;
- VI. encaminhamento de exigências ao interessado (se for o caso);
- VII. recebimento do projeto corrigido pelo interessado no setor de protocolo (se for o caso);
- VIII. Re-análise do projeto;
- IX. Aprovação do projeto pelo setor de análise de projetos da vigilância sanitária , ao serem atendidas as exigências, com emissão de parecer técnico final;
- X. Entrega ao interessado de uma cópia do projeto aprovado com carimbo da vigilância sanitária estadual ou municipal, nas plantas e no relatório técnico;
- XI. Arquivamento na vigilância sanitária estadual ou municipal dos projetos físicos, do relatório técnico aprovado e do parecer final carimbados.

Art 14 As vigilâncias sanitárias estaduais ou municipais devem elaborar material informativo, disponibilizado através de seu protocolo e meios de comunicação, contendo todas as instruções necessárias a análise e aprovação dos projetos físicos de estabelecimentos de saúde, de modo a divulgar essas informações aos interessados.

Art. 15 A inobservância das normas aprovadas por esta Resolução, constitui infração à Legislação Sanitária Federal, conforme dispõe o artigo 10, incisos II e III, da Lei Nº 6437, de 20 de agosto de 1977, bem como Legislação Estadual pertinente.

Art. 16 Os municípios, habilitados em Gestão Plena de Sistema, que possuem serviços de vigilância sanitária devidamente estruturados, com profissional habilitado nos termos do item 1.6.1. do Regulamento Técnico aprovado pela RDC nº 50/2002 deverão analisar, avaliar e aprovar os projetos físicos de estabelecimentos de saúde localizados em seus limites territoriais, cabendo ao estado prestar assessoria técnica quando solicitado.

Art. 17 A Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde prestará cooperação técnica às secretarias estaduais e municipais de saúde, a fim de orientá-las sobre o exato cumprimento e interpretação desta resolução.

Art. 18 As secretarias estaduais e municipais de saúde podem estabelecer normas de caráter supletivo ou complementar a fim de adequar o disposto nesta Resolução às especificidades locais.

Art. 19 Projetos que já se encontram em trâmite de análise seguirão as normas anteriores a esta Resolução. Projetos já aprovados e com obra não iniciada terão sua aprovação validada por 180 dias. Projetos já aprovados e com obra já iniciada terão seu trâmite conforme rotina anterior a esta Resolução.

Art. 20 As secretarias estaduais e municipais terão um prazo de 180 dias a contar da data da publicação desta Resolução para se adequar ao disposto nesta Resolução.

Art. 21 Esta Resolução da Diretoria Colegiada entrará em vigor na data da sua publicação.

CLÁUDIO MAIEROVITCH PESSANHA HENRIQUES

Formulários para solicitação de credenciamento na área de diagnósticos e alimentos

- Form 1 - Diagnóstico
- Form 2 - Diagnóstico
- Form 3 - Diagnóstico

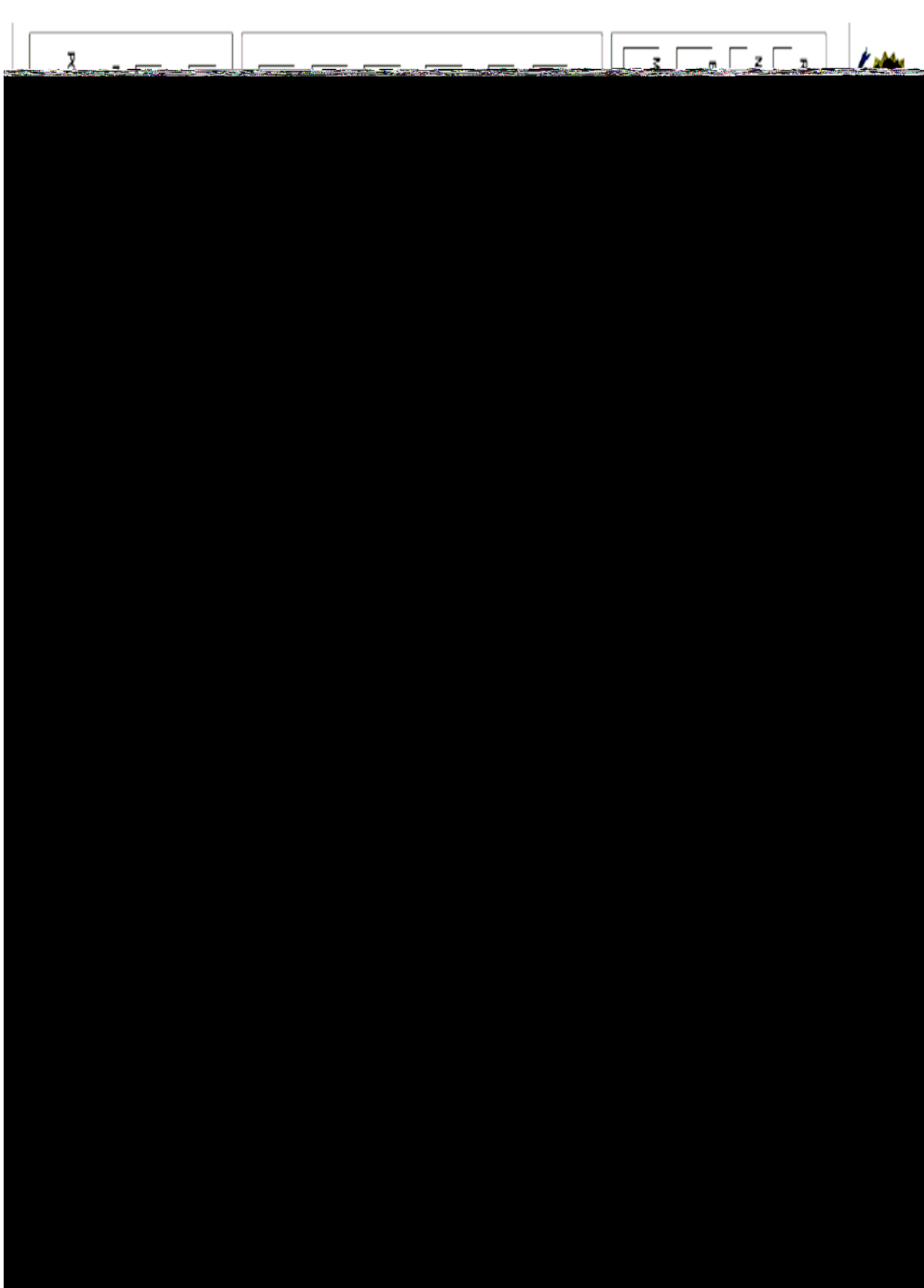
Anexar ao formulário da área de diagnóstico os seguintes documentos:

- SOLICITAÇÃO DE CREDENCIAMENTO;
- PREENCHER O FORMULÁRIO DE CADASTRO NACIONAL DE LABORATÓRIO ANIMAL;
- PLANTA BAIXA OU CROQUI DO LABORATÓRIO COM A LOCALIZAÇÃO DOS EQUIPAMENTOS;
- CADASTRO NACIONAL DE PESSOA JURÍDICA - CNPJ (CÓPIA, DENTRO DA VALIDADE);
- RELAÇÃO DA EQUIPE TÉCNICA DO LABORATÓRIO COM: NOME, FUNÇÃO E CARGA HORÁRIA;
- CURRÍCULUM VITAE RESUMIDO DENTRO DA ATIVIDADE A SER CREDENCIADA;
- CARTEIRA DE HABILITAÇÃO PROFISSIONAL (CÓPIA);
- O LABORATÓRIO DEVE ESTAR CIENTE DA LEGISLAÇÃO QUE REGE O CREDENCIAMENTO.

- Formulário para solicitação de credenciamento na área de físico-química de alimentos e água
- Formulário para solicitação de credenciamento na área de microbiologia de alimentos e água
- Formulário para solicitação de credenciamento na área de físico-química - Resíduo

Anexar ao formulário da área de alimentos os seguintes documentos:

- MANUAL DA QUALIDADE DO LABORATÓRIO (CÓPIA CONTROLADA);
- FORMULÁRIOS DE REGISTROS, MANUTENÇÃO, VERIFICAÇÃO E CALIBRAÇÃO DE EQUIPAMENTOS E PADRÕES;
- FORMULÁRIOS DE REGISTROS DE REAGENTES, PADRÕES E SOLUÇÕES;
- FORMULÁRIOS DE REGISTROS DE DADOS BRUTOS DE ENSAIOS;
- PLANTA BAIXA DO LABORATÓRIO COM IDENTIFICAÇÃO DE EQUIPAMENTOS E FLUXOGRAMA DAS ATIVIDADES;
- COMPROVANTE DO CADASTRO NACIONAL DE PESSOA JURÍDICA-CNPJ (CGC) E ALVARÁ DE FUNCIONAMENTO ATUALIZADOS (CÓPIA AUTENTICADA);
- DECLARAÇÃO DE FUNCIONAMENTO EMITIDA POR AUTORIDADE MAIOR, NO CASO DE INSTITUIÇÃO DE ENSINO E PESQUISA;
- PROCEDIMENTOS PARA MANUSEIO DE AMOSTRAS PARA ENSAIO;
- MANUAL DE PROCEDIMENTOS DE APLICAÇÃO E USO DE EQUIPAMENTOS DE PROTEÇÃO INDIVIDUAL E COLETIVO;
- MANUAL DE PROCEDIMENTOS DE DESCARTE DE PRODUTOS QUÍMICOS E/OU BIOLÓGICOS.





MINISTÉRIO DA AGRICULTURA
COORDENAÇÃO DE LABORATÓRIO ANIMAL / DDA / SDA

IDENTIFICAÇÃO DO LABORATÓRIO

CÓDIGO N ° _____

CADASTRO NACIONAL DE LABORATÓRIO ANIMAL

Página: _____ / _____

DESCRIÇÃO DOS EXAMES E/OU ANÁLISES	TÉCNICA(S) UTILIZADA(S)	TÉCNICO RESPONSÁVEL



<p style="text-align: center;">SISTEMA CFMV/CRMVs INSTRUÇÃO NORMATIVA N.º 24</p>
--

**SECRETARIA DE DEFESA AGROPECUÁRIA DO MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E DO
ABASTECIMENTO**

INSTRUÇÃO NORMATIVA N.º 24, DE 07 DE JUNHO DE 2001

O SECRETÁRIO DE DEFESA AGROPECUÁRIA DO MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E DO ABASTECIMENTO, no uso da atribuição que lhe confere o art. 83, inciso IV do Regimento Interno da Secretaria, aprovado pela Portaria Ministerial nº 574, de 8 de dezembro de 1998, considerando a necessidade de atualização das Normas Gerais de Credenciamento de Laboratório da Área Animal, e o que consta do Processo nº 21000.004184/2000-65, resolve:

Art. 1º Aprovar as Normas Gerais de Credenciamento e Reconhecimento de Laboratórios da Área Animal e Vegetal, constante do anexo.

Art. 2º Esta Instrução Normativa entra em vigor na data de sua publicação.

Art. 3º Ficam revogadas as Portarias DLA nº 01, de 14 de agosto de 1991 e nº 53 de 20 de maio de 1991.

LUIZ CARLOS DE OLIVEIRA

ANEXO

**NORMAS GERAIS DE CREDENCIAMENTO E RECONHECIMENTO DE LABORATÓRIOS DA ÁREA
ANIMAL E VEGETAL**

1. Objetivo

Estabelecer os requisitos de qualidade para que o laboratório seja credenciado ou reconhecido pela Coordenação de Laboratório Animal - CLA do Departamento de Defesa Animal - DDA, e pela Coordenação de Laboratório Vegetal - CLAV do Departamento de Defesa e Inspeção Vegetal - DDIV .

2. Aplicação

A presente Norma aplica-se a qualquer laboratório que realize: diagnóstico de enfermidades animais; análises de resíduos biológicos; pragas em produtos de origem vegetal; controle de insumos agrícolas e químicos; análises físico-químicas e microbiológicas de alimentos de origem animal e vegetal e alimentos para o consumo animal.

2.1. O credenciamento ou reconhecimento de laboratórios obedecerá aos critérios, de necessidades e de prioridades do Ministério da Agricultura e do Abastecimento.

3. Definições

3.1. Credenciamento de laboratório: é o reconhecimento formal da idoneidade de um laboratório para realizar análises por metodologia específica.

3.2. Reconhecimento de laboratório: é o reconhecimento formal de um laboratório de realizar as análises em produtos de origem animal e de alimentos para animais com vistas a dar credibilidade aos resultados do autocontrole.

3.3. Laboratório credenciado: laboratório público ou privado que se submeteu ao processo de

avaliação ou auditoria da CLA ou CLAV, por meio da qual recebeu o reconhecimento formal de sua excelência técnica e de seu Sistema de Garantia da Qualidade. Os resultados obtidos nas metodologias credenciadas têm valor oficial e de fiscalização.

3.4. Laboratório reconhecido: laboratório que obteve aprovação de seu Sistema de Garantia da Qualidade e de sua excelência técnica pela CLA ou CLAV. Os resultados obtidos nas análises de autocontrole não têm valor oficial.

4. Disposições gerais

4.1. Do credenciamento ou reconhecimento

4.1.1. O credenciamento ou reconhecimento de laboratórios fundamentar-se-á no Sistema de Garantia da Qualidade e excelência técnica, bem como no cumprimento da legislação vigente ou quaisquer atos complementares que vierem a ser baixados.

4.1.2. O processo de credenciamento ou reconhecimento de laboratórios iniciar-se-á mediante solicitação formal à CLA ou CLAV, quando pertinente será efetivado através de ato do DDA/SDA e do DDIV/SDA.

4.1.3. O laboratório deverá ter área física e instalações compatíveis para realização das atividades e equipamentos apropriados para a execução correta das análises, objeto do credenciamento ou reconhecimento.

4.1.4. O laboratório credenciado ou reconhecido deverá ter procedimentos documentados para assegurar os direitos de propriedade e de confidencialidade das informações.

4.1.5. O laboratório credenciado ou reconhecido usará metodologias analíticas reconhecidas e/ou validadas. Qualquer modificação ou outra metodologia proposta, pelo laboratório, deverá ser documentada, validada e submetida à aprovação pela CLA ou CLAV.

4.1.6. O laboratório credenciado estará organizado de modo que qualquer componente da sua equipe compreenda a extensão e responsabilidade de sua atribuição.

4.1.7. O laboratório credenciado ou reconhecido manterá disponível e atualizado, para toda a equipe, o Manual de Metodologia e o Manual da Política da Qualidade, bem como o de Procedimentos Técnicos, ou documentação equivalente, na qual discriminará as ações e atividades do laboratório.

4.1.8. A CLA, a CLAV ou seu representante legal terá acesso livre e permanente a todas as partes do estabelecimento, necessárias para se certificar do cumprimento destas Normas.

4.1.9. Se o resultado da análise laboratorial ou qualquer outra informação de que disponha revelar a suspeita ou a existência de doença de notificação obrigatória ou que constitua risco sanitário, o laboratório deverá informar imediatamente à autoridade competente.

4.1.10. O laboratório deverá comunicar dentro de 48 horas, quaisquer fatos que impliquem em : paralisação ou suspensão de suas atividades; mudança de endereço; mudança de direção técnica do laboratório.

4.2. Da responsabilidade técnica

4.2.1. O laboratório designará um diretor técnico, responsável pelas operações técnicas efetuadas no laboratório, registrado no Conselho de Classe.

4.2.2. O diretor técnico responderá pelas ações e atividades do credenciamento ou reconhecimento. Na sua eventual ausência, responderá o substituto, previamente designado.

4.2.3. A substituição eventual ou definitiva do titular ou substituto deverá ser comunicada à CLA ou CLAV, em tempo hábil.

4.2.4. O laboratório credenciado ou reconhecido designará um responsável pelo sistema de controle da qualidade do laboratório e de sua aplicação, com acesso direto ao diretor técnico e à diretoria executiva.

4.2.5. As funções do responsável pelo sistema da qualidade e do diretor técnico podem ser exercidas pela mesma pessoa.

4.3. Do monitoramento e das auditorias

4.3.1. O laboratório será submetido a monitoramento analítico e auditorias técnicas periódicas ou eventuais, devendo obrigatoriamente estar presente o diretor técnico e responsável pelo sistema de controle da qualidade ou seus substitutos.

4.3.2. Em conformidade com o resultado do monitoramento ou auditoria técnica, a equipe auditora elaborará relatório final que será submetido a uma Comissão Técnica - CT, nomeada pela Secretaria de Defesa Agropecuária - SDA.

4.3.3. A Comissão Técnica executará a verificação do cumprimento das disposições legais e administrativas necessárias para dar cumprimento à presente Norma.

4.3.4. A Comissão Técnica proporá o ato de credenciamento ou reconhecimento de laboratórios ou seu cancelamento, os quais serão efetivados pelo órgão competente segundo o Regimento Interno da SDA.

4.3.5. A advertência ou suspensão será efetivada por meio de ato da CLA ou CLAV.

5. Laboratórios credenciados

5.1. O laboratório credenciado fará parte do Cadastro Nacional de Laboratórios da CLA ou da CLAV.

5.2. O livro de registro de amostras oficiais é aberto por escopo de credenciamento.

5.3. Os resultados obtidos pelos laboratórios, de cada metodologia analítica credenciada, serão emitidos em formulário próprio (certificado de análise), previamente aprovado pela CLA ou CLAV.

5.4. Os dados de amostras oficiais oriundos de laboratórios credenciados são de propriedade do Ministério e somente poderão ser utilizados para quaisquer fins mediante autorização da CLA ou da CLAV.

5.5. O laboratório credenciado deverá manter todos os registros gerados durante o processo analítico de forma apropriada e permanentemente disponíveis.

5.6. O laboratório fornecerá relatório de suas atividades com fluxo e periodicidade estabelecidos pela CLA ou CLAV.

5.7. As amostras de contraprova serão de responsabilidade do laboratório credenciado e deverão ser mantidas lacradas e invioladas até que seja autorizado seu uso ou descarte.

5.8. As amostras analisadas serão destruídas, observando-se as Normas de Gerenciamento da Segurança, internacionalmente recomendadas.

5.9. O laboratório credenciado manterá por 5 (cinco) anos as informações e dados gerados, incluindo a via do laboratório dos laudos emitidos.

6. Laboratório Reconhecido

6.1. O laboratório deve manter livro de registro atualizado e disponível para apresentação à autoridade competente.

6.2. Os resultados das análises e de seus controles serão mantidos por um período mínimo de 2 (dois) anos.

7. Das penalidades

7.1. Quando a auditoria programada não for realizada devido a ausência do diretor técnico ou seu substituto o laboratório terá suas atividades suspensas temporariamente até que nova auditoria seja realizada.

7.2. As infrações à presente Norma serão punidas administrativamente e, quando for o caso, mediante responsabilidade civil.

7.3. As penalidades administrativas a serem aplicadas pela SDA através da CLA ou da CLAV são: advertência, suspensão temporária e cancelamento do credenciamento ou reconhecimento do laboratório, conforme avaliação da Comissão Técnica, quando:

7.3.1. For constatado, em auditorias técnicas, falhas que interfiram na qualidade dos resultados das análises, em qualquer etapa de seu processamento.

7.3.2. Houver falta de cumprimento dos requisitos técnicos ou administrativos que determinaram o credenciamento ou reconhecimento;

7.3.3. Modificação ou substituição de metodologia analítica, sem prévia autorização da CLA ou CLAV.

7.3.4. For comprovado que o funcionamento do laboratório constitui risco para a saúde pública, saúde animal e vegetal;

7.3.5. Ocorrerem falsificações ou adulterações de resultados, na manipulação das amostras ou manobras diversas;

7.4. Em casos de comprometimento da idoneidade da instituição, o laboratório terá seu

credenciamento cancelado em todas as atividades para as quais foi credenciado pelo DDA e pelo DDIV.

7.5. Outras ocorrências serão julgadas pela Comissão Técnica específica de cada Coordenação, CLA ou CLAV.

7.6. Os atos de alterações, cancelamento, advertência ou suspensão de credenciamento serão comunicados, por meio de documento oficial, às autoridades competentes, responsáveis pelos laboratórios, e demais interessados.

7.7. Em caso de cancelamento do credenciamento, o laboratório deverá entregar, dentro de 48 (quarenta e oito) horas, todas as amostras oficiais e a respectiva documentação à CLA, à CLAV ou a seus representantes legais.

7.8. No cancelamento do credenciamento ou do reconhecimento, o Livro de Registro será encerrado e recolhido pela CLA, CLAV ou seu representante legal.

7.9. Na suspensão, o laboratório terá sua situação revista após as adequações necessárias.

7.10. O não cumprimento do prazo estabelecido, na auditoria técnica, para as devidas correções, caracterizará falta de interesse do laboratório em se manter credenciado ou reconhecido.

8. Havendo suspensão, cancelamento do credenciamento ou do reconhecimento, a Comissão Técnica julgará o interesse em manter o laboratório credenciado ou reconhecido.

9. Disposições finais

9.1. Do Pagamento das análises

As despesas com a realização de análises serão remuneradas pelos interessados diretamente às unidades laboratoriais.

9.2. Os laboratórios já credenciados ou reconhecidos terão 2 (dois) anos para se adequar à presente Norma.

Atualizado em: 02.09.2002



Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

GABINETE DO MINISTRO

INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 9, DE 27 DE JUNHO DE 2003

O MINISTRO DE ESTADO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, no uso da atribuição que lhe confere o art. 87, da Constituição, tendo em vista o que dispõe o Decreto-Lei nº 457, de 13 de fevereiro de 1969, o Decreto nº 76.986, que regulamenta a Lei nº 6.198, de 26 de dezembro de 1974, o Decreto nº 1.662, de 6 de outubro de 1995, o Decreto nº 2.062, de 7 de novembro de 1996, e tendo em vista o que consta do Processo nº 21000.005292/2003-06 e nº 21000.005646/2003-12, resolve:

Art. 1º Proibir a fabricação, a manipulação, o fracionamento, a comercialização, a importação e o uso dos princípios ativos clo-ranfenicol e nitrofuranos e os produtos que contenham estes princípios ativos, para uso veterinário e suscetível de emprego na alimentação de todos os animais e insetos.

Art. 2º Ficam cancelados a partir da vigência dessa Instrução Normativa as licenças e registros concedidos às matérias-primas e aos produtos acabados para uso veterinário e suscetíveis de emprego na alimentação animal contendo os princípios ativos referidos no art. 1º, em decorrência da proibição nelas contida.

Parágrafo único. Os produtos até então autorizados deverão ser retirados do comércio no prazo de 90 (noventa) dias, contados a partir da publicação da presente Instrução Normativa.

Art. 3º Esta Instrução Normativa entra em vigor na data de sua publicação.

Art. 4º Ficam revogadas a Instrução Normativa nº 38, de 8 de maio de 2002, a Instrução Normativa nº 67, de 4 de dezembro de 2002, o Ofício Circular nº 06/SDA e o Ofício Circular nº 1.271/CPV.

Art. 3º As partidas de grãos (Categoria 3, Classe 9), especificadas no art. 1º, deverão estar acompanhadas de Certificado Fitossanitário - CF, emitido pela Organização Nacional de Proteção Fitossanitária - ONPF da Bolívia.

Art. 4º As partidas de sementes serão inspecionadas no ponto de ingresso (Inspeção Fitossanitária - IF), serão coletadas amostras para exames fitossanitários em laboratórios oficiais credenciados, ficando o restante da partida sob Quarentena Pós-Entrada (QPE) e depositária ao interessado, não podendo ser plantada até a conclusão dos exames.

Parágrafo único. Os custos do envio das amostras e das análises fitossanitárias serão com ônus para os interessados.

Art. 5º As partidas de grãos serão inspecionadas no ponto de ingresso (Inspeção Fitossanitária - IF) e, estando em conformidade com a Legislação Fitossanitária Brasileira, terão o despacho autorizado.

Art. 6º Caso seja detectada a presença de qualquer praga quarentenária nas partidas de sementes ou de grãos de girassol, procedentes da Bolívia, deverão ser suspensas as importações do produto até a conclusão da revisão da Análise de Risco de Pragas - ARP.

Art. 7º A Organização Nacional de Proteção Fitossanitária - ONPF da Bolívia comunicará à ONPF do Brasil qualquer alteração das ocorrências fitossanitárias no local de produção.

Art. 8º Esta Instrução Normativa entra em vigor na data de sua publicação.

MAÇAO TADANO

(Of. El. nº OF-SDA178-03)

INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 51, DE 27 DE JUNHO DE 2003

O SECRETÁRIO DE DEFESA AGROPECUÁRIA DO MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, no uso da atribuição que lhe confere o art. 15, inciso II,

4. Requisitos técnicos e gerenciais

4.1. Do credenciamento ou reconhecimento

4.1.1 O credenciamento ou reconhecimento de laboratórios fundamentar-se-á no Sistema da Qualidade, excelência técnica, norma específica, bem como no cumprimento da legislação vigente ou quaisquer atos complementares que vierem a ser baixados.

4.1.2 O processo de credenciamento ou reconhecimento de laboratórios iniciar-se-á mediante solicitação formal à CLA, CLAV ou seu representante legal. Quando julgado pertinente, o processo será efetivado por meio de ato do DDA/SDA (Secretaria de Defesa Agropecuária) ou do DDIV/SDA.

4.1.3 O laboratório deverá ter área física e instalações compatíveis para realização das atividades e equipamentos apropriados para a execução correta das análises, objeto do credenciamento ou reconhecimento.

4.1.4 O laboratório credenciado ou reconhecido deverá ter procedimentos documentados para assegurar os direitos de propriedade e de confidencialidade das informações.

4.1.5 O laboratório credenciado ou reconhecido usará metodologias analíticas oficiais, devidamente reconhecidas e/ou validadas pelo MAPA.

4.1.5.1. Qualquer modificação ou outra metodologia proposta pelo laboratório deverá ser documentada, validada e submetida à aprovação pela CLA ou CLAV.

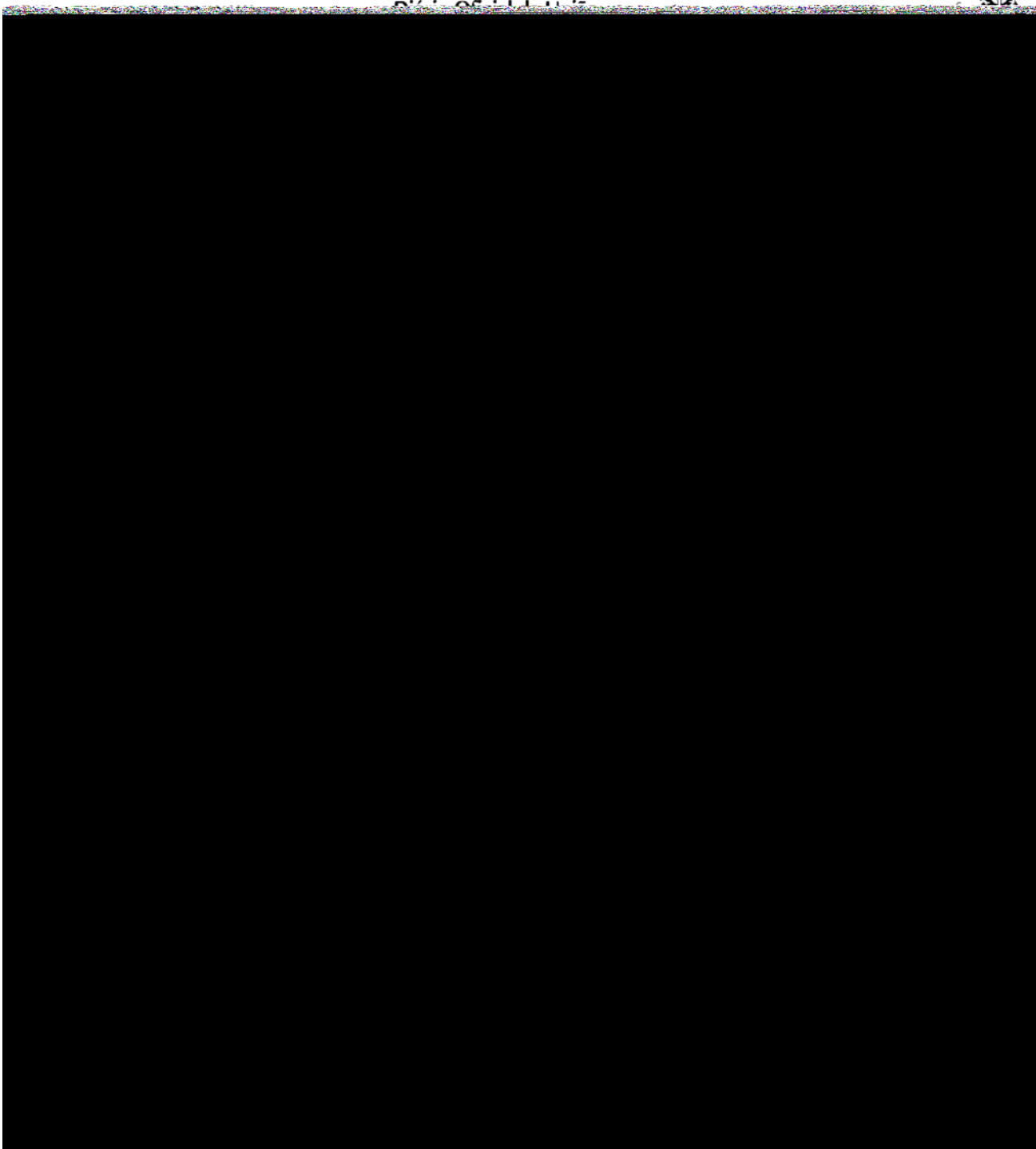
4.1.6 O laboratório credenciado ou reconhecido manterá disponível e atualizado, para toda a equipe, o Manual de Metodologia e o Manual da Qualidade, bem como o de Procedimentos Técnicos, ou documentação equivalente, na qual discriminará as ações e atividades do laboratório.

4.1.7 O laboratório credenciado estará organizado de modo que qualquer componente da sua equipe compreenda a extensão e responsabilidade de sua atribuição.

4.1.8 A CLA, CLAV ou seu representante legal terá acesso livre a todas as partes do estabelecimento necessário para se certificar do cumprimento destas Normas.

4.1.9 Se o resultado da análise laboratorial ou qualquer outra informação de que disponha revelar a suspeita ou a existência de doença de notificação obrigatória ou que constitua risco sanitário ou fitossanitário, o laboratório deverá informar imediatamente à CLA, CLAV ou seu representante legal.

4.1.10 O laboratório deverá comunicar à CLA, CLAV ou





DECRETO Nº 5.564, DE 19 DE OUTUBRO DE 2005

Institui o Comitê Nacional de Controle Higiênico-Sanitário de Moluscos Bivalves - CNCMB, e dá outras providências.

O PRESIDENTE DA REPÚBLICA, no uso da atribuição que lhe confere o art. 84, inciso VI, alínea "a", da Constituição,

DECRETA:

Art. 1º Fica instituído o Comitê Nacional de Controle Higiênico-Sanitário de Moluscos Bivalves - CNCMB, com a finalidade de estabelecer e avaliar os requisitos necessários para garantia da qualidade higiênico-sanitária dos moluscos bivalves, visando à proteção da saúde da população e à criação de mecanismos seguros para o comércio nacional e internacional.

Art. 2º O CNCMB será composto por um representante, titular e suplente, de cada órgão e entidade a seguir indicados:

I Secretaria Especial de Agricultura e Pesca da Presidência da República, que o coordenará;



DIÁRIO OFICIAL DA UNIÃO



Possível ciclo de *Bucephalus varicus*

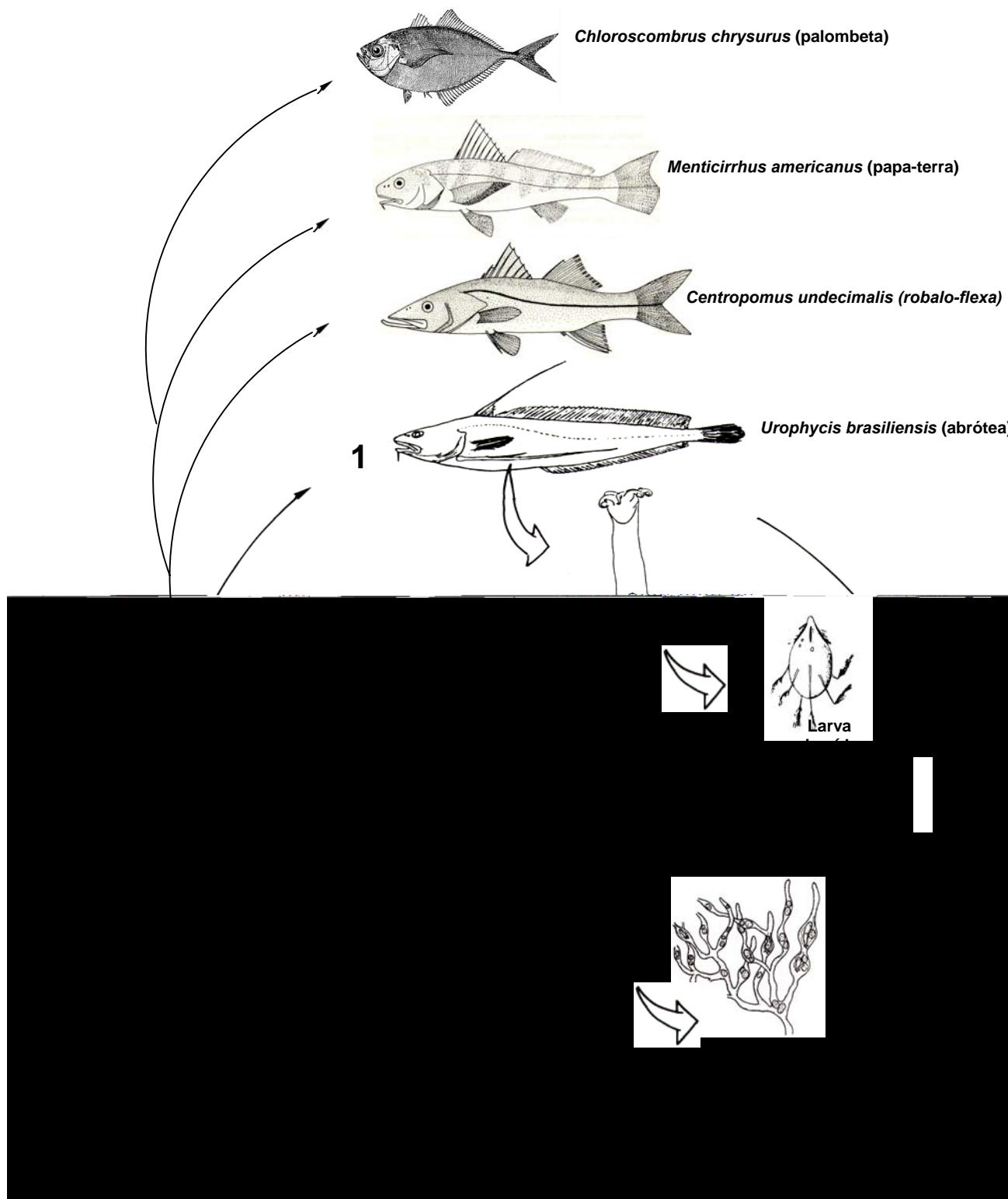


Figura 18. Possível ciclo de *Bucephalus varicus*. 1. Diversos hospedeiros definitivos; 2. Primeiro hospedeiro intermediário; 3. Segundo hospedeiro intermediário (baseado em EVERMANN e MARSH, 1902; CHENG, 1978; AMATO, 1982; SZPILMAN, 1991 e PEREIRA JR, 1996).

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

AMATO, J.F.R. Digenetic trematodes of percoid fishes of Florianópolis, southern Brasil-Bucephalidae. **Rev. Brasil. Biol.**, **42**(4) 667-680. 1982.

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

EVERMANN, B.W. ; M.C. MARSH. The fishes of Porto Rico. Bull. U.S. Fish Comm., Vol 10. fig. 36. 1902. In: Massey, L. L.; Harper, D.E. **Selected Computer Images of Southeastern U.S. Marine Fishes**, U.S. Department of Commerce, NOAA .1996. Disponível em: <http://www.sefsc.noaa.gov/fishimages/fish_img/chl_chry.htm>. Acesso em 10 fevereiro 2006.

PEREIRA JR, J.; ROBALDO, R. B.; SOUTO-RAITER, V. M. M. Um possível ciclo de vida *Bucephalus varicus* Manter, 1940 (Trematoda: Bucephalidae) no Rio Grande do Sul. **Comunicações do Museu de Ciência e Tecnologia, Pontifícia Universidade Católica do RS**. **9**(1): 31-36. 1996.

SZPILMAN, M. **Guia Agualang de Peixes: Guia prático de identificação dos peixes do litoral brasileiro**. 1º ed. Rio de Janeiro: Ed. Agualung Confecção Ltda, 1991. 284 p.

Análise histopatológica

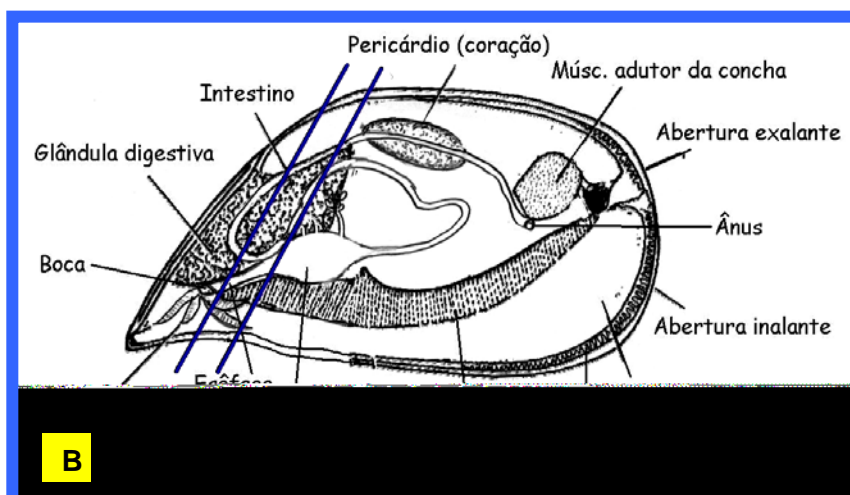


Figura 19. Cortes indicados na análise histopatológica em moluscos bivalves. **A.** Secção transversal em diagonal em mexilhão, indicada pela faixa dupla azul (||). Foto: Andréa Ricetti Cochôa **B.** Representação esquemática dos órgãos internos a serem removidos na secção transversal em diagonal. Desenho: Patricia Garcia.

Análise histopatológica: lâmina com corte em secção transversal diagonal

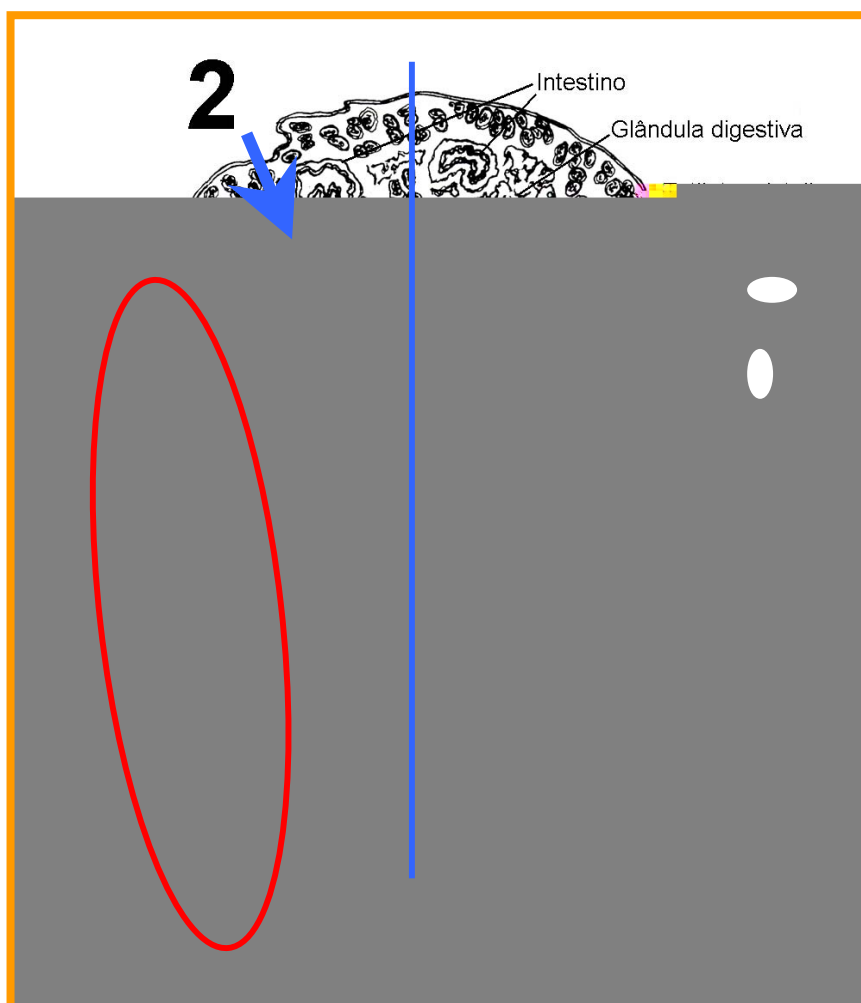


Figura 20. Aspecto de lâmina de mexilhão com corte transversal em diagonal. Áreas 1 e 2, onde foram realizadas as contagens dos constituintes tissulares do hospedeiro, parasita e dos espaços vazios (modificado de HOWARD, 2004).

Uso da Gráticula de Weibel na quantificação da intensidade de bucefalose

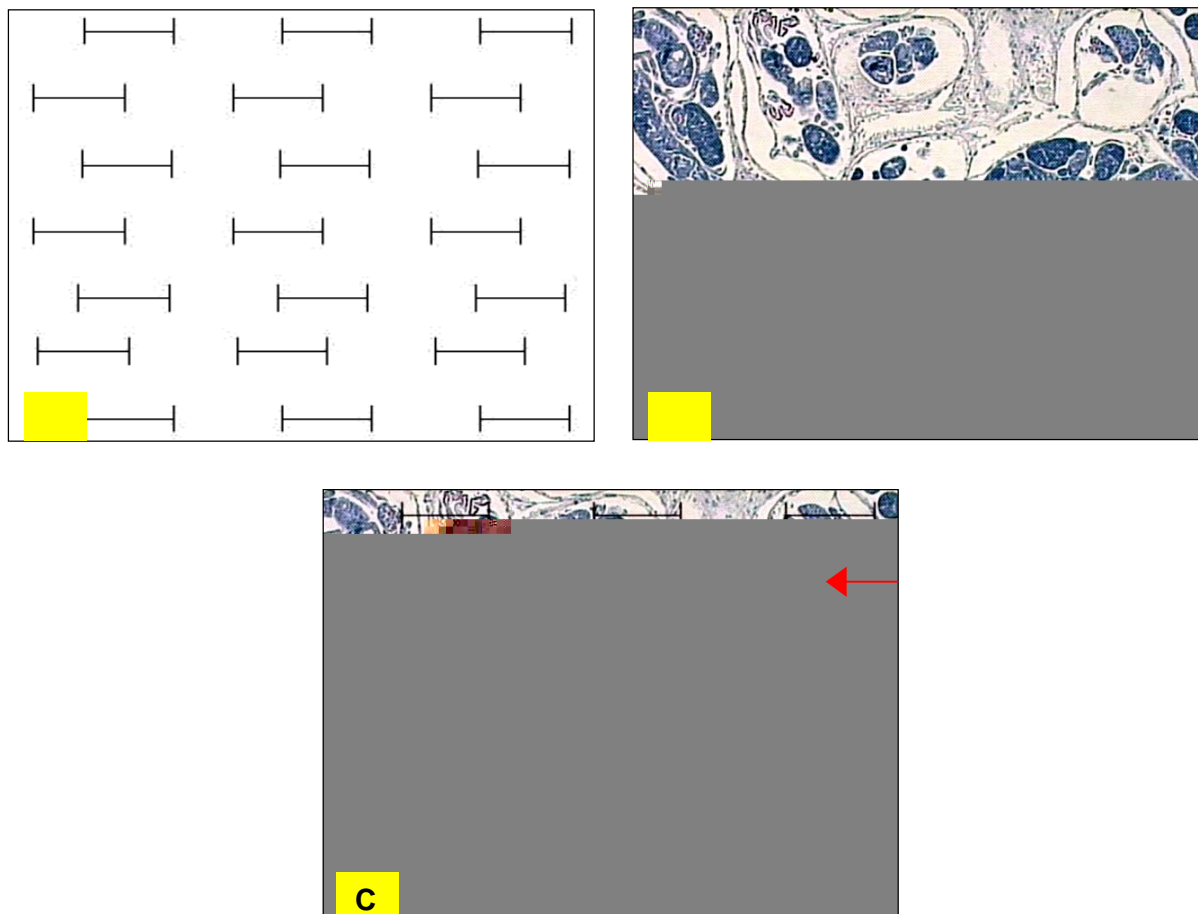


Figura 21. **A.** Representação esquemática da gráticula de Weibel, mostrando os 42 pontos de amostragem. Desenho: Jaime Fernando Ferreira. **B.** Aspecto de uma lâmina de mexilhão com bucefalose ao microscópio óptico. **C.** Esquema da sobreposição da Gráticula de Weibel em uma lâmina de mexilhão com bucefalose ao microscópio óptico, utilizando a objetiva de 10x. A seta (\rightarrow) indica o ponto exato de amostragem que corresponde à intersecção das linhas transversal e vertical. Fotos: Patricia Garcia

Valores absolutos da quantificação de tecido do parasita (TP), tecido do hospedeiro (TH) e espaços vazios (EV), em cortes histológicos do mexilhão *Perna perna*, utilizando a gráticula de Weibel acoplada ao microscópio óptico com as objetivas de 10X e 40X.

Objetiva de 10x						
Animal	Área	Campo	TP	TH	EV	Total de pontos
1	1	1	28	6	8	42
		2	22	10	10	42
		3	14	25	3	42
		4	27	15	0	42
		5	31	6	5	42
		Média	24	12	5,2	42
	2	1	31	6	5	42
		2	16	18	0	34
		3	19	11	0	30
		4	22	13	1	36
		5	21	11	0	32
		Média	22	12	1,2	34,8
2	1	1	4	34	4	42
		2	3	36	3	42

Objetiva de 40x						
Animal	Área	Campo	TP	TH	EV	Total de pontos
1	1	1	14	13	15	42
		2	16	13	13	42
		3	15	18	9	42
		4	15	13	14	42
		5	21	5	16	42
		Média	16	12	13	42
	2	1	19	16	7	42
		2	13	16	13	42
		3	17	20	5	42
		4	20	18	4	42
		5	21	14	7	42
		Média	18	17	7,2	42
2	1	1	10	23	9	42
		2	24	11	7	42

Continuação tabela

Objetiva de 10x							
Animal	Área	Campo	TP	TH	EV	Total de pontos	
3	1	1	13	17	12	42	
		2	11	10	21	42	
		3	14	8	20	42	
		4	15	6	21	42	
		5	18	5	19	42	
		Média	14	9,2	19	42	
	2	1	8	6	28	42	
		2	7	5	30	42	
		3	23	6	13	42	
		4	16	15	11	42	
		5	17	6	19	42	
		Média	14	7,6	20	42	
	4	1	1	24	17	1	42

Objetiva de 40x							
Animal	Área	Campo	TP	TH	EV	Total de pontos	
3	1	1	12	5	25	42	
		2	11	7	24	42	
		3	15	9	18	42	
		4	8	14	20	42	
		5	6	16	20	42	
		Média	10	10	21	42	
	2	1	13	4	25	42	
		2	6	5	31	42	
		3	9	9	24	42	
		4	10	3	29	42	
		5	22	1	19	42	
		Média	12	4,4	26	42	
	4	1	1	12	27	3	42

Continuação tabela

Objetiva de 10x						
Animal	Área	Campo	TP	TH	EV	Total de pontos
5	1	1	23	6	13	42
		2	26	5	11	42
		3	13	21	8	42

Objetiva de 40x						
Animal	Área	Campo	TP	TH	EV	Total de pontos
5	1	1	10	19	13	42
		2	6	25	11	42
		3	8	24	10	42

Volume fracionário (%) de tecido do parasita (TP), tecido do hospedeiro (TH) e espaços vazios (EV), em cortes histológicos do mexilhão *Perna perna*, utilizando a gráticula de Weibel acoplada ao microscópio óptico com as objetivas de 10X e 40X.

Objetiva de 10x						
Animal	Área	Campo	TP	TH	EV	Total de pontos %
1	1	1	66,7	14,3	19,0	100
		2	52,4	23,8	23,8	100
		3	33,3	59,5	7,1	100
		4	64,3	35,7	0,0	100
		5	73,8	14,3	11,9	100
	Média	58,1	29,5	12,4	100	
	2	1	73,8	14,3	11,9	100
		2	47,1	52,9	0,0	100

Objetiva de 40x						
Animal	Área	Campo	TP	TH	EV	Total de pontos %
1	1	1	33,3	31,0	35,7	100
		2	38,1	31,0	31,0	100
		3	35,7	42,9	21,4	100
		4	35,7	31,0	33,3	100
		5	50,0	11,9	38,1	100
	Média	38,6	29,5	31,9	100	
	2	1	45,2	38,1	16,7	100
		2	31,0	38,1	31,0	100

Continuação tabela

Objetiva de 10x						
Animal	Área	Campo	TP	TH	EV	Total de pontos %
3	1	1	31,0	40,5	28,6	100
		2	26,2	23,8	50,0	100
		3	33,3	19,0	47,6	100
		4	35,7	14,3	50,0	100
		5	42,9	11,9	45,2	100
		Média	33,8	21,9	44,3	100
	2	1	19,0	14,3	66,7	100
		2	16,7	11,9	71,4	100
		3	54,8	14,3	31,0	100
		4	38,1	35,7	26,2	100
		5	40,5	14,3	45,2	100

Objetiva de 40x						
Animal	Área	Campo	TP	TH	EV	Total de pontos %
3	1	1	28,6	11,9	59,5	100
		2	26,2	16,7	57,1	100
		3	35,7	21,4	42,9	100
		4	19,0	33,3	47,6	100
		5	14,3	38,1	47,6	100
		Média	24,8	24,3	51,0	100
	2	1	31,0	9,5	59,5	100
		2	14,3	11,9	73,8	100
		3	21,4	21,4	57,1	100
		4	23,8	7,1	69,0	100
		5	52,4	2,4	45,2	100

Continuação tabela

Objetiva de 10x							
Animal	Área	Campo	TP	TH	EV	Total de pontos %	
5	1	1	54,8	14,3	31,0	100	
		2	61,9	11,9	26,2	100	
		3	31,0	50,0	19,0	100	
		4	33,3	42,9	23,8	100	
		5	50,0	26,2	23,8	100	
		Média	46,2	29,0	24,8	100	
	2	1	47,1	52,9	0,0	100	
		2	53,1	43,8	3,1	100	
		3	64,3	4,8	31,0	100	
		4	76,2	9,5	14,3	100	
		5	14,3	85,7	0,0	100	
		Média	51,0	39,3	9,7	100	
	6	1	1	26,2	64,3	9,5	100
			2	40,5	47,6	11,9	100
3			61,9	31,0	7,1	100	

Objetiva de 40x							
Animal	Área	Campo	TP	TH	EV	Total de pontos %	
5	1	1	23,8	45,2	31,0	100	
		2	14,3	59,5	26,2	100	
		3	19,0	57,1	23,8	100	
		4	21,4	45,2	33,3	100	
		5	23,8	45,2	31,0	100	
		Média	20,5	50,5	29,0	100	
	2	1	14,3	57,1	28,6	100	
		2	59,5	16,7	23,8	100	
		3	31,0	28,6	40,5	100	
		4	11,9	73,8	14,3	100	
		5	38,1	38,1	23,8	100	
		Média	31,0	42,9	26,2	100	
	6	1	1	47,6	19,0	33,3	100
			2	7,1	76,2	16,7	100
3			28,6	52,4	19,0	100	

NORMAS DE PUBLICAÇÃO

biotemas@ccb.ufsc.br

... NORMAS PARA PUBLICAÇÃO ...

BIOTEMAS é uma revista semestral, editada pelo Centro de Ciências Biológicas da UFSC, e visa publicar artigos na área de Ciências Biológicas. Nela são publicados trabalhos teóricos, artigos originais de pesquisa e comunicações breves, bem como revisões e resenhas de livros, a convite da Comissão Editorial. Desde 1998, BIOTEMAS tem seus artigos específicos da área zoológica, ou que usavam animais como objeto de estudos, indexados no Zoological Records – UK.

Os manuscritos deverão ser encaminhados à:

Secretaria de BIOTEMAS
Centro de Ciências Biológicas
Universidade Federal de Santa Catarina
Campus Universitário – Trindade
CEP 88040-900 – Florianópolis – SC
Fax: 0 XX 48 331-9672

1- Os artigos deverão ser redigidos em português, inglês ou espanhol, com resumos em português e em inglês. Os manuscritos (original mais 2 cópias) deverão ser enviados digitados em **espaço duplo, fonte Times New Roman, tamanho 12**, obedecendo margens de **3 cm**. As **páginas** deverão ser **numeradas**. Os artigos deverão apresentar uma linguagem clara e precisa e o texto conciso. Os manuscritos serão analisados por 2 consultores e a aceitação será baseada no conteúdo científico e na adequação do material às normas da revista.

2- Na **página de rosto**, deverão constar o **título do artigo, nome completo dos autores e das instituições envolvidas**, indicando o **autor para correspondência, endereço postal completo e endereço eletrônico** de pelo menos um dos autores. Abaixo devem vir: **resumo, unitermos** (cinco no máximo), **abstract, key words e título abreviado** (máximo 60 espaços).

3- O limite de páginas de **trabalhos teóricos**, artigos originais de pesquisa e revisões, incluindo figuras, tabelas e referências bibliográficas, é de **25 páginas**, enquanto que para as comunicações breves e resenhas de livros é sete páginas. **O resumo e o abstract** não poderão exceder a **200 palavras**.

4- Os artigos originais de pesquisa deverão conter, sempre que possível, Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão, Agradecimentos e Referências Bibliográficas. As demais formas de publicação não necessitam apresentar as subdivisões acima.

5- As citações de referências bibliográficas no texto devem obedecer o seguinte padrão: um autor (Netto, 2001); dois autores (Motta-Júnior e Lombardi, 2002); três ou mais autores (Ramos et al., 2002). No caso do nome dos autores fazerem parte da frase, apenas o ano da publicação deve vir entre parênteses. Quando houver, no mesmo ano, mais de um artigo de mesma autoria, acrescentar letras minúsculas após o ano, conforme o exemplo: (Davidson et al., 2000a; 2000b). Quando houver mais de uma citação dentro de um mesmo parêntese, estas devem ser colocadas em ordem cronológica. Exemplo: (Girard, 1984; Grovum, 1988; Steindel et al., 1993; De Toni et al., 2000).

6- As citações de referências bibliográficas no final do artigo devem obedecer ordem alfabética do sobrenome do primeiro autor. Apenas citações que aparecem no texto devem constar na lista de referências. **Cada referência deverá incluir: sobrenome e iniciais de todos os autores, ano, título completo do artigo, nome do periódico por extenso (em negrito), volume (em negrito), número e páginas inicial e final. As citações de resumos de congressos e reuniões científicas não poderão ultrapassar a 10% do total de referências citadas.** Trabalhos aceitos para publicação devem ser referidos como “no prelo” ou “in press”, quando tratar-se de artigo redigido em inglês. Dados não publicados devem ser citados apenas no texto como “dados não publicados” ou “comunicação pessoal”, entre parênteses.

Exemplos de citação na lista final de referências:

a) artigos em periódicos

Netto, L. E. S. 2001. Oxidative stress response in sugarcane. **Genetics and Molecular Biology**, **24** (1): 93 - 102.

Ramos, A.; Kangerski, A. L.; Basso, P.; Silva Santos, J. E.; Assreuy, J.; Vendruscolo, L. F.; Takahashi, R. N. 2002. Evaluation of Lewis and SHR rat strains as a genetic model for the study of anxiety and pain. **Behavioural Brain Research**, **129**: 113-123.

b) livros na íntegra

Gilbert, S. F. 2000. **Developmental Biology**. 6th ed. Sinauer Associates, Sunderland, USA, 749 pp.

c) capítulo de livros

Colleaux, L. 1999. Genetic basis of mental retardation. In: Jones, B. C. & Mormède, P. (eds). **Neurobehavioral Genetics – Methods and applications**. CRC Press, New York, USA, p. 275-290.

d) teses, dissertações e monografias

Horta, P. 2000. **Macroalgas do infralitoral do sul e sudeste do Brasil**. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, Brasil, 301 pp.

e) publicações em Congressos, Reuniões Científicas, Simpósios

Pereira, J. B.; Conceição, M. J.; Coura, J. R. 1985. Evolução da esquistossomose mansoni um ano após o tratamento específico. **Anais da III Jornada Científica da Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil, p. 369.**

f) páginas da Internet

Fox, R. 2003. **Invertebrate Anatomy – *Daphnia magna***. Disponível em <<http://www.science.lander.edu/refox/daphnia.html>>. Acesso em 22 de maio de 2003.

7- As ilustrações (figuras, fotografias, desenhos) e as tabelas já devem ser inseridas no corpo do texto, no melhor local após o final do parágrafo em que foram citadas pela primeira vez. Os autores devem ter em mente que haverá redução de até 70% da figura no tamanho final do impresso. Quando for o caso, as figuras devem conter a representação da escala em barras. Fotografias só serão aceitas em branco e preto, e se apresentarem um bom contraste e intensidade. Tabelas e figuras devem ser numeradas com algarismos arábicos de acordo com sua seqüência no texto, sendo que este deve incluir referências a todas elas. Cada tabela deve ter um título breve e auto-explicativo. Informações adicionais, necessárias à compreensão da tabela, devem ser dadas em forma de nota de rodapé, embaixo da tabela.

8- Os autores receberão os pareceres dos consultores, do revisor da língua inglesa e do editor, observando a adequação do artigo às normas da revista. **O artigo deverá ser devolvido, em um prazo máximo de 15 dias, com as alterações sugeridas e encaminhado em disquete 3 1/2 em Word for Windows 97**, além de uma cópia impressa. No caso do não atendimento de alguma sugestão dos consultores, os autores deverão apresentar uma justificativa circunstanciada sobre o não atendimento.

9- Após a aceitação para publicação, provas definitivas do artigo serão enviadas para correção e devem ser devolvidas dentro de 3 dias, a contar do recebimento. Erros nesta última forma são de total responsabilidade dos autores.

10- Os autores poderão receber 30 (trinta) separatas do artigo, mediante o pagamento de uma taxa a ser estabelecida.

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

O **BOLETIM DO INSTITUTO DE PESCA** tem por objetivo a divulgação de trabalhos científicos inéditos, relacionados a Pesca, Aqüicultura e Limnologia. É publicado 01 volume por ano, com o necessário número de tomos.

Os trabalhos publicados no *Boletim do Instituto de Pesca* são: Artigo Científico, Nota Científica, Artigo de Revisão ou Relato de Caso. Podem ser redigidos em português, inglês ou espanhol e devem conter os seguintes itens:

com algarismos arábicos e encaixadas pela respectiva legenda, os dados apresentados nesta não devem ser repetidos em gráficos, a não ser quando absolutamente necessário. Gráficos, desenhos, mapas, fotografias etc., nunca ultrapassando as medidas 16x21 cm, devem ser encaixados no texto, citados como figura e numerados, consecutivamente, com algarismos arábicos, com título auto-explicativo abaixo. Desenhos, mapas e fotografias devem ser apresentados no original e em arquivos distintos, preferencialmente em formato digital "tiff". Ex.: *nome do arquivo.tif*. Figuras coloridas poderão ser incluídas somente em casos estritamente necessários.

DISCUSSÃO: Resultados e Discussão podem constituir um capítulo único.

CONCLUSÃO(ões): Discussão e Conclusão também podem constituir capítulo único.

AGRADECIMENTOS

trabalho consultado, o qual irá figurar na lista de referências. Ex.: "Segundo Gulland, *apud* SANTOS (1978), os coeficientes...".

2 - NA LISTAGEM BIBLIOGRÁFICA

2.1. Documentos impressos

- Relacionar os trabalhos referidos no texto, com os nomes de todos os autores do trabalho separados por **e**, **and** ou **y**, se dois autores, e por ponto e vírgula, se mais de dois autores. As referências devem ser ordenadas alfabeticamente pelo último sobrenome do autor. Havendo mais de uma obra com a mesma entrada, considera-se a ordem cronológica e, em seguida, a alfabética do terceiro

WOHLFARTH, G.W.; MOAY, R.; HULATA, G. 1983 A genotype-environment interaction for growth rate in the common carp, growing in intensively managed ponds. *Aquaculture*, Amsterdam, 33: 187-195.

produção pesqueira marítima - ProPesq®. III: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA DE PESCA, 11.; CONGRESSO LATINO AMERICANO DE ENGENHARIA DE PESCA, 1., Recife, 17-21/out./1999. *Anais...* v.2, p.824-832.

2.2. Informações eletrônicas (Documentos consultados online, em CD-ROM, etc.)

- Utilizar as normas de referência de *documentos impressos*, acrescentando o endereço eletrônico em que o documento foi consultado.

Exemplos:

2. O trabalho deve ser enviado em três vias impressas, e o(s) arquivo(s) do mesmo, em disquete ou CD-ROM.
3. O trabalho será analisado pelo Comitê Editorial do Instituto de Pesca (CEIP), segundo a ordem cronológica de recebimento, e por revisores científicos da área. Em seguida, caso necessário, retornará ao(s) autor(es) para modificações. O prazo de retorno do trabalho do(s) autor(es) ao CEIP será de 30 (trinta) dias, após o qual o trabalho será automaticamente cancelado.
4. Os originais de trabalho não aceito para publicação serão devolvidos ao(s) autor(es).
5. Os autores receberão, ao todo, 20 (vinte) separatas. Havendo interesse por maior número, as despesas correrão por conta do autor.
6. Os trabalhos n: Instituto de Pesca:
Av. Francisco M
e-mail: instituto@pesca.sp.gov.br / página: www.pesca.sp.gov.br
7. Trabalho, cuja apresentação não seguir estritamente estas normas, será devolvido ao(s) autor(es).