UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

KAMILA DOS SANTOS BEZERRA

DESENVOLVIMENTO DE ENSAIOS DE qPCR PARA DETECÇÃO DE DOIS PARASITAS, *Perkinsus marinus* E *Perkinsus beihaiensis* DA OSTRA *Crassostrea gasar*

JOÃO PESSOA
2026

KAMILA DOS SANTOS BEZERRA

DESENVOLVIMENTO DE ENSAIOS DE qPCR PARA DETECÇÃO DE DOIS PARASITAS, *Perkinsus marinus* E *Perkinsus beihaiensis* DA OSTRA *Crassostrea gasar*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, do Centro de Ciências Exatas e da Natureza, da Universidade Federal da Paraíba como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Biologia Celular e Molecular**.

Linhas de Pesquisa: Biologia e Fisiologia Celular

Orientador(a): Patrícia Mirella da Silva Scardua

Coorientador: Natanael Dantas Farias

JOÃO PESSOA
2026

Catalogação na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

B574d Bezerra, Kamila Dos Santos.
Desenvolvimento de ensaios de qPCR para detecção de dois parasitas, Perkinsus Marinus e Perkinsus Beihaiensis da Ostra Crassostrea Gasar / Kamila Dos Santos Bezerra. - João Pessoa, 2026.
72 f. : il.

Orientação: Patrícia Mirella da Silva Scardua.
Coorientação: Natanael Dantas Farias.
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCEN.

1. Bivalves. 2. Coinfecção. 3. Protozoários parasitas. 4. Diagnóstico molecular. I. Scardua, Patrícia Mirella da Silva. II. Farias, Natanael Dantas. III. Título.

UFPB/BC CDU 576.8:639.51(043)

Elaborado por KAROLLYNE FERREIRA DANTAS - CRB-4/2319

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

FICHA DE AVALIAÇÃO DO TRABALHO FINAL

IDENTIFICAÇÃO

Curso ou Programa:	**Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**
Área de concentração:	**Biologia Celular e Molecular**
Linha de Pesquisa	**Biologia Molecular e Estrutural**

DEFESA

Data:	**01 de julho de 2026**	Hora:	**14:00**
Local:	**Auditório – Departamento de Biologia Molecular do CCEN da UFPB**		

DADOS DO TRABALHO (DISSERTAÇÃO)

Título:
DESENVOLVIMENTO DE ENSAIOS DE qPCR PARA DETECÇÃO DE DOIS PARASITAS, *Perkinsus marinus* E *Perkinsus beihaiensis* DA OSTRA *Crassostrea gasar*
Nome do(a) orientador(a):
Patrícia Mirella da Silva Scardua
Observações da banca examinadora:

Tendo em vista a apresentação oral realizada pelo(a) discente **KAMILA DOS SANTOS BEZERRA** e as arguições realizadas, a Banca Examinadora considerou o Trabalho Final:

[X] APROVADO [ ] INSUFICIENTE [ ] REPROVADO

MEMBROS DA BANCA

Nome	Título	IES	Assinatura (SouGov)
Patrícia Mirella dos Santos Scardua	Doutor	UFPB	Documento assinado digitalmente gov.br PATRICIA MIRELLA DA SILVA SCARDUA Data: 02/07/2026 16:41:42-0300 Verifique em https://validar.iti.gov.br
João Felipe Bezerra	Doutor	UFPB	Documento assinado digitalmente gov.br JOAO FELIPE BEZERRA Data: 02/07/2026 16:44:32-0300 Verifique em https://validar.iti.gov.br
Paulo Ricardo Porfírio do Nascimento	Doutora	UFPB	Documento assinado digitalmente gov.br PAULO RICARDO PORFIRIO DO NASCIMENTO Data: 02/07/2026 16:49:18-0300 Verifique em https://validar.iti.gov.br

João Pessoa/PB, 01 de julho de 2026.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a minha orientadora Drª Patrícia Mirella, a quem tenho grande admiração e respeito e que me acolheu prontamente em meu retorno ao LABIPI, onde tive oportunidade de fazer meu primeiro projeto de Iniciação Científica anos atrás. Agradeço por toda dedicação, atenção e paciência. Sua forma de conduzir a pesquisa sempre com carinho, entusiasmo e muita disponibilidade foi essencial para tornar este processo mais leve e inspirador.

Ao meu Coorientador, Dr. Natanael Farias que esteve comigo desde o primeiro momento, me instruindo e orientando em cada experimento e técnica realizada, sua atenção e acompanhamento foram essenciais em todo conhecimento que adquiri nesta pesquisa.

Aos meus pais, especialmente minha mãe a quem lutou comigo incansavelmente ao longo deste tempo e quem tornou possível chegar até aqui. Obrigada por acreditar em mim e apoiar minhas escolhas, por toda garra e dedicação e por sempre ser exemplo de força e bondade. Aos meus irmãos por toda parceria e cuidado, vocês são parte de minhas conquistas.

À Hysadora, a quem compartilho o peso e a beleza da vida, obrigada por todo apoio e incentivo, pela paciência e cuidado, por me inspirar e me mostrar que é fundamental manter a sensibilidade e o bom humor, que há beleza e felicidade também durante o processo e que o amor é sempre um refúgio e uma força que nos impulsiona a crescer.

Aos amigos que fiz no LABIPI, Fernando, Felipe, Darlânea e Diego, pela parceria de bancada, por me acolherem e dividirem comigo experiências e aprendizados.

Aos funcionários da coordenação do PPGBCM, professora Drª Ângela Menegatti e a Socôrro, pela disponibilidade e prontidão que sempre estiveram para atender aos alunos. Aos Técnicos João Ricardo e Sr. Bosco.

À Universidade Federal da Paraíba pelo apoio institucional e oportunidade acadêmica à Capes e CNPq pelo apoio financeiro.

E a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

RESUMO

A produção de ostras é uma importante atividade aquícola em expansão em todo o mundo, no entanto, a ostreicultura enfrenta desafios sanitários consideráveis, principalmente em relação a doenças parasitárias que resultam em mortalidade em massa com consequente prejuízo ambiental e perdas econômicas significativas. Entre esses agentes, parasitas protozoários do gênero *Perkinsus* afetam populações de bivalves nas Américas, Europa e Ásia tanto em populações cultivadas quanto selvagens. Uma preocupação recente é sua rápida disseminação para regiões distantes de suas áreas geográficas naturais, representando uma ameaça às populações nativas de moluscos. No Brasil, desde 2008 *Perkinsus* spp. têm sido detectado infectando bivalves, destacando-se as espécies *P. marinus* e *P. beihaiensis* por serem mais frequentemente detectadas em populações de ostras, atingindo altas intensidades de infecção e prevalências, dependendo das populações e espécies (*Crassostrea gasar*, *C. rhizophorae* e *Magallana gigas*). O diagnóstico de infecções por protozoários parasitas, incluindo espécies de *Perkinsus*, tem se utilizado de técnicas moleculares como a qPCR, entretanto os ensaios desenvolvidos até o momento para o diagnóstico de *P. marinus* e *P. beihaiensis* apresentam limitações: como não foram projetados para distinguir entre todas as sete espécies reconhecidas do gênero, não são totalmente específicos nem validados. Considerando a disseminação de *Perkinsus* spp. pelos continentes, impulsionada por diversos fatores ambientais e antropogênicos, há uma necessidade urgente de detectar com precisão as espécies de *Perkinsus* que infectam hospedeiros em regiões onde múltiplas espécies coexistem ou há ocorrência de coinfecção. Neste contexto, o objetivo do presente trabalho foi desenvolver e validar dois ensaios de qPCR específicos para a detecção desses protozoários parasitas, *P. marinus* e *P. beihaiensis*, para isso, foram desenvolvidos *primers* específicos tendo como alvo o complexo de genes rRNA (ITS2) dessas espécies. As qPCRs foram validadas em bivalves provenientes de diferentes regiões geográficas, com indivíduos livres de infecção e infectados por *Perkinsus* spp. com diferentes intensidades de infecção. Os resultados demonstraram alta sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade na detecção e na quantificação de *P. beihaiensis* e *P. marinus*, sendo capaz de detectar baixas quantidades de cópias do gDNA dos parasitas e indicaram potencial par o uso em estudos de monitoramento de prevalência e intensidade da infecção, incluindo cenários de infecção única ou múltipla, inicial ou avançada.

Palavras-chave: Bivalves; Coinfecção; Diagnóstico.

ABSTRACT

Oyster production is an important and expanding aquaculture activity worldwide; however, oyster farming faces considerable sanitary challenges, mainly related to parasitic diseases that result in mass mortality, consequent environmental damage, and significant economic losses. Among these agents, protozoan parasites of the genus *Perkinsus* affect bivalve populations in the Americas, Europe, and Asia, in both cultivated and wild populations. A recent concern is their rapid spread to regions distant from their natural geographic areas, posing a threat to native mollusk populations. In Brazil, since 2008, *Perkinsus* spp. have been detected infecting bivalves, with *P. marinus* and *P. beihaiensis* standing out as they are more frequently detected in oyster populations, reaching high infection intensities and prevalences, depending on the populations and species (*Crassostrea gasar*, *C. rhizophorae* and *Magallana gigas*). The diagnosis of infections caused by parasitic protozoa, including *Perkinsus* species, has relied on molecular techniques such as qPCR; however, the assays developed to date for the diagnosis of *P. marinus* and *P. beihaiensis* have limitations: as they were not designed to distinguish between all seven recognized species of the genus, they are neither fully specific nor validated. Considering the spread of *Perkinsus* spp. across continents, driven by various environmental and anthropogenic factors, there is an urgent need to accurately detect the *Perkinsus* species that infect hosts in regions where multiple species coexist or co-infection occurs. In this context, the objective of the present work was to develop and validate two specific qPCR assays for the detection of these parasitic protozoa, *P. marinus* and *P. beihaiensis*. In this context, the objective of the present work was to develop and validate two specific qPCR assays for the detection of these parasitic protozoa, *P. marinus* and *P. beihaiensis*. To this end, specific primers were developed targeting the rRNA gene complex (ITS2) of these species. The qPCRs were validated in bivalves from different geographic regions, with individuals free of infection and infected with *Perkinsus* spp. with different infection intensities. The results demonstrated high sensitivity, specificity, and reproducibility in the detection and quantification of *P. beihaiensis* and *P. marinus*, being able to detect low quantities of gDNA copies of the parasites and indicating potential for use in studies monitoring the prevalence and intensity of infection, including scenarios of single or multiple, early or advanced infection.

Keywords: Bivalves; Coinfection: Diagnosis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 — Produção de ostras Crassostrea gasar. A. e B. Sementes produzidas na empresa PRIMAR. C. Sistema de cultivo tipo mesa no estuário da Lagoa de Guaraíras (RN).....20
Figura 2 — Trofozoítos e proliferação de Perkinsus spp. por esquizogonia 23
Figura 3 — Processo de zoosporulação de Perkinsus olsenii.....25
Figura 4 — Mapa do Brasil: Estados costeiros com relatos de infecções por Perkinsus spp. 28
Figura 5 — Representação esquemática da organização da região ITS do rRNA 32
Figura 6 — Padrão de restrição (PCR-RFLP) da região ITS de Perkinsus spp., mostrando o perfil de bandas dos controles positivos (Perkinsus olseni, P. marinus e P. beihaiensis) 36
Figura 7 — Árvore filogenética de máxima verossimilhança inferida a partir da análise do ITS2 de 73 Perkinsus spp......43
Figura 8 — Alinhamento (ClustalW) das Sequências ITS2 de P. beihaiensis e P. marinus 44
Figura 9 — Eficiência dos primers em reações de qPCR 45
Figura 10 — Teste de especificidade e sensibilidade.....47
Figura 11 — PCR-RFLP para o diagnóstico diferencial de Perkinsus spp. 48
Figura 12 — Alinhamento das sequências ITS2 das sete espécies de Perkinsus 53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 — Sensibilidade analítica (ASe), repetibilidade dos ensaios de qPCR determinadas pelo coeficiente de variação (CV, %) dos valores de Ct para as diluições da curva padrão (10^8 a 10^2 cópias) e Limite de Detecção (LoD) 46

Tabela 2 — Concordância (n, %) entre as técnicas de diagnóstico para *Perkinsus* spp.....49

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 — *Primers* de qPCR projetados para o diagnóstico de *P. marinus* e *P. beihaiensis* 33
Quadro 2 — Amostras utilizadas na preparação dos plasmídeos para as curvas padrão e os controles 39
Quadro 3 — Sequências dos primers desenhados para ensaios de qPCR.....44

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ase	Sensibilidade analítica
ASp	Especificidade analítica
BA	Bahia
CE	Ceará
Ct	*Cycle threshold* (limiar de ciclo)
CV	Coeficiente de variação
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNAg (gDNA)	DNA genômico
DNAp (pDNA)	DNA plasmidial
dNTPs	Desoxinucleotídeos trifosfatados
Fw	*Forward* (sentido direto)
ITS	Espaçador interno transcrito (*Internal Transcribed Spacer*)
ITS1 / ITS2	Espaçadores internos transcritos 1 e 2
LB	*Lysogeny Broth*
LoD	Limite de detecção
MGB	Minor Groove Binder
$MgCl_2$	Cloreto de magnésio
NCBI	National Center for Biotechnology Information
ODS	Objetivos de Desenvolvimento Sustentável
PA	Pará
PB	Paraíba
PCR	Reação em cadeia da polimerase
qPCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real
rDNA	DNA ribossomal
RFLP	Polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição
RFTM	Meio fluido de tioglicolato de Ray (*Ray's Fluid Thioglycolate Medium*)
RJ	Rio de Janeiro
RN	Rio Grande do Norte

rRNA	RNA ribossomal
Rv	*Reverse* (sentido reverso)
SC	Santa Catarina
SE	Sergipe
Tm	Temperatura de *melting*
WOAH	Organização Mundial para a Saúde Animal (*World Organisation for Animal Health*)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 15

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA 19

2.1. *Crassostrea gasar* e *C. rhizophorae* 19

2.2. O gênero *Perkinsus*: biologia, histórico de descobertas e patogenicidade 21

2.3. Ciclo de vida e estratégias de sobrevivência no ambiente 22

2.4. Mecanismos de infecção e proliferação intracelular 26

2.5. Perkinsiose: distribuição e ocorrência no Brasil 27

2.6. Técnicas de diagnóstico de *Perkinsus*: avanços e desafios 28

2.7. Aplicação da qPCR no diagnóstico de *Perkinsus* spp.: avanços, desafios e perspectivas 30

3 OBJETIVOS 34

3.1. Objetivo geral 34

3.2. Objetivos específicos 34

4 MATERIAIS E MÉTODOS 35

4.1. Obtenção e processamento das amostras de bivalves 35

4.2. Diagnóstico de *Perkinsus* spp. pelo Meio Fluido de Tioglicolato de Ray (RFTM) .35

4.3. Diagnóstico de *Perkinsus* spp. por PCR convencional e polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição (RFLP). 35

4.4. Desenvolvimento de PCR quantitativa em tempo real (qPCR) para o diagnóstico de *P. marinus* e *P. beihaiensis*. 37

4.4.1. Filogenia molecular 37

4.4.2. Desenho dos iniciadores espécie-específicos 37

4.4.3. Produção de plasmídeos para curvas padrão da qPCR 38

4.4.4. Ensaio de eficiência dos iniciadores em qPCR 39

4.5. Efeito inibitório do tecido do hospedeiro 39

4.5.1. Sensibilidade analítica e repetibilidade 40

4.5.2. Especificidade analítica 41

4.6. Validação dos ensaios 41

4.7. Análises dos dados e estatísticas 42

5 RESULTADOS 43

5.1. Análise filogenética da região its2 de *perkinsus* spp.. 43

5.2. Desenvolvimento das qPCRs e o efeito inibitório dos tecidos dos hospedeiros 44

5.3. Sensibilidade analítica (Ase) 45

5.4. Especificidade analítica (ASp) 47

5.5. Validação das duas qPCRs em amostras de bivalves 48

6 DISCUSSÃO 50

7 CONCLUSÃO 54

REFERÊNCIAS 55

APÊNCIDE A — SEQUÊNCIAS ITS2 DE *PERKINSUS* SPP. (73) USADAS PARA PROJETAR MANUALMENTE PRIMERS ESPECÍFICOS PARA QPCR DE *P. MARINUS* E *P. BEIHAIENSIS* APÓS ALINHAMENTO E ANÁLISE FILOGENÉTICA. 65

APÊNCIDE B — RESULTADOS OBTIDOS NO PRIMER-BLAST (NCBI). 69

APÊNCIDE C — AMOSTRAS UTILIZADAS PARA A VALIDAÇÃO DOS ENSAIOS DE qPCR DE *P. marinus* E *P. beihaiensis.* 71

ANEXO A – PRIMEIRA PÁGINA DO ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA JOURNAL OF INVERTEBRATE PATHOLOGY 74

1 INTRODUÇÃO

A aquicultura é atualmente a indústria de produção de alimentos que mais cresce globalmente, responsável por aproximadamente 37% do pescado consumido no mundo (FAO, 2024). Essa atividade representa uma alternativa sustentável à pesca extrativista tradicional, reduzindo a pressão sobre os estoques naturais e contribuindo para a segurança alimentar e nutricional de milhões de pessoas (Luna; Llorente; Luna, 2023; FAO, 2024). Além disso, destaca-se por sua inserção em vários Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS), da agenda internacional da ONU, como, por exemplo, o ODS 14, que visa à conservação e ao uso sustentável dos oceanos, mares e recursos marinhos (FAO, 2024).

Dentro desse cenário, a malacocultura — ramo da aquicultura voltado à produção de moluscos — tem ganhado relevância na produção global de alimentos, com destaque para a ostreicultura (cultivo de ostras). Em 2022, a produção mundial de ostras foi estimada em 6,2 milhões de toneladas (Fao, 2025). Apesar da produção nacional de bivalves ainda ser baixa (8.969,63 toneladas) (BRASIL, 2025), a expansão da criação de ostras vem ocorrendo e hoje é sustentada por dois viveiros estrategicamente localizados nas regiões Sul e Nordeste do país.

No Brasil, o cultivo de moluscos iniciou-se na década de 1970, com o desenvolvimento da produção de sementes de ostras japonesas (*Magallana gigas*) importadas, com apoio direto de instituições de ensino superior (Suplicy, 2022). Posteriormente, avançou-se na produção de outras espécies nativas brasileiras, como a vieira *Nodipecten nodosus*, o mexilhão *Perna perna* e, mais recentemente, a ostra nativa *Crassostrea gasar* (de Souza; Silva; Novaes, 2022; Suplicy, 2022; Valenti *et al*., 2021).

O Estado de Santa Catarina é o maior produtor nacional, responsável por 97,23% da produção total de moluscos, com produção em 2024 de 8.721,28 toneladas, o que representa um aumento de 25,58% em relação ao ano anterior (BRASIL, 2025), com 7.005,1 toneladas produzidas, sendo 5.273,1 toneladas de mexilhões, 1.731,8 toneladas de ostras e 0,2 toneladas de vieiras (Epagri, 2025). Cabe ressaltar que o cultivo de mexilhões utiliza sementes captadas diretamente do ambiente, sem necessidade de produção em laboratório. Em seguida, vem a região Nordeste, que se destaca por apresentar condições ambientais fortemente favoráveis à ostreicultura, sendo o Rio Grande do Norte o maior produtor, com 152 toneladas de ostras em 2024 (BRASIL, 2024). Em 2024, a produção total de ostras *Crassostrea* spp., foi de 2.676,02 toneladas, correspondendo a 1,8% de toda a produção aquícola nacional (BRASIL, 2024).

A espécie *C. gasar* tem demonstrado ótimo desempenho produtivo nos estuários do Norte e do Nordeste, sendo a única espécie cultivada nessas regiões. Protocolos de produção de sementes já foram desenvolvidos inicialmente pela Fazenda PRIMAR Orgânica (RN) e, atualmente, também pelo Laboratório de Moluscos Marinhos da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Este fato tem favorecido o crescimento dessa atividade no Brasil (BRASIL, 2024).

Entretanto, um dos principais entraves sanitários à expansão da ostreicultura é a ocorrência de doenças parasitárias, que resultam em mortalidades em massa e prejuízos econômicos e ambientais (Guo; Ford, 2016; Zannella *et al.*, 2017). Entre os patógenos mais relevantes estão os protozoários do gênero *Perkinsus*, sendo as espécies *P. marinus* e *P. olsenii* as de maior impacto para as populações de ostras e mariscos, como indica a lista de infecções de notificação obrigatória da Organização Mundial para a Saúde Animal (do inglês, WHOAH, *World Organization for Animal Health*). Uma das preocupações atuais é a disseminação destes patógenos nos oceanos do planeta, que pode ocorrer por diferentes meios, inclusive de forma involuntária, como a água de lastro de navios (Costello *et al.*, 2021).

P. marinus foi inicialmente identificado como causador de mortalidades em massa em populações da espécie de ostra americana (*C. virginica*) na costa Atlântica dos Estados Unidos (Mackin; Owen; Collier, 1950; Perkins, 1996). *P. olsenii* foi descoberta posteriormente infectando o gastrópode *Haliotis ruber* no sul da Austrália (Lester; Davis, 1981). Subsequentemente, foram descobertas outras espécies deste gênero em outros bivalves, sendo descritas: *P. chesapeaki, P. honshuensis, P. mediterraneus* (Lester; Davis, 1981; Moss *et al*., 2008; Villalba *et al*., 2004; Choi; Park, 2010) e *P. beihaiensis*, última espécie deste gênero a ser identificada (Moss *et al.*, 2008).

No Brasil, a primeira detecção de *Perkinsus* ocorreu em 2007, em ostras *C. rhizophorae* do estuário do Rio Pacoti, CE, com identificação de *P. beihaiensis* (Sabry *et al.*, 2009, 2013). Desde então, estudos registraram a ocorrência de outras espécies, totalizando quatro: *P. beihaiensis* (Sabry *et al*., 2009, 2013), *P. olsenii, P. marinus* (Da Silva *et al*., 2014) e *P. chesapeaki*, em 8 dos 17 estados costeiros. No entanto, são mais prevalentes as infecções por *P. marinus* e *P. beihaiensis* com casos de coinfecções em *C. gasar* e *C. rhizophorae* como relatado no estuário do Rio Mamanguape, PB (Queiroga *et al*., 2015; Da Silva, *et al*., 2024).

Há evidências que sugerem susceptibilidade diferencial das duas espécies simpátricas *C. gasar* e *C. rhizophorae* frente a estes dois parasitas, com prevalências e intensidades variando conforme a espécie de ostra e do parasita (Da Silva, *et al*., 2024).

Diante da importância ambiental, econômica e social da ostreicultura, além de sua contribuição como fonte de proteína animal para manutenção da segurança alimentar em diversas regiões do mundo, é fundamental desenvolver estratégias de monitoramento e controle das enfermidades parasitárias que afetam as ostras cultivadas. Os métodos tradicionais de diagnóstico recomendados pela WOAH como o cultivo em meio fluído de tioglicolato de Ray (do inglês, RFTM, *Ray's Fluid Thioglycolate Medium*) e a histopatologia, embora eficazes, apresentam limitações quanto à especificidade e especialmente quanto à capacidade de quantificar precisamente a carga parasitária no hospedeiro (Ray, 1952; WHOAH, 2024; Dungan; Bushek, 2015).

As técnicas moleculares, especialmente a PCR quantitativa em tempo real (qPCR), surgem como ferramentas poderosas por sua alta sensibilidade e especificidade (Casas, Villalba; Reece, 2002; Kim *et al*., 2024a), especialmente quando trata-se de situações onde há duas espécies do parasita (Batchelor *et al.*, 2023; Canier *et al.*, 2020; Itoïz *et al.*, 2024; Marquis *et al.*, 2020; Moloney *et al.*, 2023; Piesz *et al.*, 2022; Travis *et al.*, 2021; Xie *et al.*, 2013).

A qPCR pode ser aprimorada com a utilização de uma sequência interna denominada sonda de hidrólise, adicionada à reação, além dos flanqueadores (iniciadores ou *primers*, do *inglês*). A sonda é ligada em suas extremidades a um fluoróforo (*reporter*) e a um *quencher* (TaqMan) conferindo a possibilidade de detectar e quantificar a carga parasitária (multiplex) de dois parasitas simultaneamente. Esse ensaio foi desenvolvido para detectar simultaneamente *P. olsenii* e *P. chesapeaki* (Itoïz *et al.*, 2021) e foi utilizado pelos autores para estudar a relação com o hospedeiro, o bivalve *Ruditapes philippinarum.*

No Brasil, apenas uma qPCR foi empregada até o momento para a detecção de *P. marinus* em ostras *Crassostrea* spp. selvagens coletadas no estuário do Guaraíras, RN (Rocha *et al.*, 2023). No entanto, a qPCR utilizou iniciadores previamente desenvolvidos por Audemard, Reece e Burreson (2004).

Até o presente não há qPCRs validadas para *P. beihaiensis*. Assim, o desenvolvimento de ensaios de qPCR para detecção e quantificação de *P. beihaiensis* e *P. marinus* representa uma inovação metodológica para o estudo da dinâmica da infecção por esses parasitas no Brasil ou em regiões onde são simpátricos. Essa abordagem permitirá diagnósticos mais rápidos e

precisos, promovendo avanços nos estudos de susceptibilidade diferencial das ostras *C. gasar* e *C. rhizophorae*, além de subsidiar ações de biossegurança, de manejo sanitário e de políticas públicas para o fortalecimento da ostreicultura no país.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. *Crassostrea gasar* e *C. rhizophorae*

As espécies de ostra de maior destaque no Brasil são a exótica *M. gigas* e as nativas *C. gasar* e *C. rhizophorae*, que constituem parte significativa da alimentação e do sustento de populações costeiras tradicionais. No entanto, devido às suas características zootécnicas mais favoráveis, *C. gasar* é a espécie mais cultivada nas regiões Norte e Nordeste, com grande potencial de expansão. A distribuição destas espécies está associada com suas tolerâncias e preferências ambientais, *C. rhizophorae*, com preferência por ambientes de águas mais salinas e predominantes em zona de entremarés e *C. gasar*, com preferência por ambientes de águas salobras e submersas (Absher, 1989; Boehs; Luz; de Andrade, 2019; Ignacio *et al*., 2000), sendo encontrada em ambientes marinhos e estuarinos (Lopes *et al.*, 2013); esta maior plasticidade ambiental a torna especialmente adequada para o cultivo na região nordeste.

Além das diferenças em relação às condições ambientais, as espécies apresentam também diferenças na sua susceptibilidade frente a patógenos, como demonstrado por Da Silva *et al*. (2024), que avaliaram a intensidade e prevalência de duas espécies de parasitas, *P. marinus* e *P. beiahiensis*, nas duas espécies de ostras nativas. As análises preliminares têm demonstrado que *C. gasar* é suscetível a ambas as espécies de *Perkinsus*, sendo as infecções por *P. marinus* mais intensas, enquanto as ostras *C. rhizophorae* são resistentes a infecções por *P. beihaiensis*, mas muito suscetíveis a infecções por *P. marinus*, que atingem intensidades avançadas. Entender essas relações é de grande importância para estabelecer as melhores estratégias e condições de cultivo e de controle da disseminação dessas espécies.

A produção de sementes em laboratório tem se configurado como uma ferramenta importante no desenvolvimento sustentável da ostreicultura, principalmente em relação às espécies nativas *C. gasar* e *C. rhizophorae*, uma vez que o sucesso do cultivo está relacionado à disponibilidade de suas formas juvenis, chamadas de sementes (Figura 1), que atendem à demanda da produção em escalas maiores, com previsibilidade e constância expressivas. A produção de sementes em laboratório torna-se crucial por reduzir a pressão sobre os estoques naturais e permitir a padronização genética e sanitária dos cultivos (Uriarte; Rupp; Abarca, 2002). No Brasil, atualmente existem dois laboratórios que produzem sementes de ostras *C. gasar*, o Laboratório da empresa Primar Orgânica, situado em Tibau do Sul (RN), e o

Laboratório de Moluscos Marinhos na UFSC, localizado em Florianópolis (SC) (Suplicy, 2022).

Figura 1 — Produção de ostras *Crassostrea gasar*. A. e B. Sementes produzidas na empresa PRIMAR. C. Sistema de cultivo tipo mesa no estuário da Lagoa de Guaraíras (RN)



Fonte: LABIPI, 2022.

Instituições públicas têm se destacado nesse setor, empregando tecnologias avançadas para garantir a qualidade e a disponibilidade de sementes ao longo de todo o ano, como é o caso do Laboratório de Moluscos Marinhos (LMM), localizado na Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), que, há anos, fornece *sementes* de *M. gigas* aos produtores de SC. Desde 1990, a unidade atua no desenvolvimento de tecnologias para a produção comercial de sementes de diversos bivalves. Sua produção anual atende cerca de 80 maricultores, fornecendo aproximadamente 50 milhões de sementes de ostras (*M. gigas*) e iniciou recentemente a produção de sementes de *C. gasar*.

Outro destaque na produção de *sementes* em laboratório é o da Primar Orgânica, que, em 2014, inaugurou seu laboratório exclusivo para produção de ostras nativas *C. gasar* e dispõe de tecnologia e estrutura para produzir até 6 milhões de sementes por safra. O Sebrae-RN vem prestando assistência técnica aos produtores locais e incentivando o associativismo; além de auxiliar na regularização de áreas aquícolas e na ampliação do acesso ao mercado, o que tem refletido no crescimento da atividade, consolidando o Estado do RN como o segundo maior

produtor nacional, segundo o Boletim da Aquicultura em Águas da União de 2024, o RN registrou um salto na produção de ostras nativas, de 0,80 toneladas em 2020 para 152 toneladas em 2023, número que se manteve em 2024 (BRASIL, 2025).

A ostreicultura segue se consolidando como um grande potencial para a geração de renda e para a inclusão de pequenos produtores de comunidades litorâneas, promovendo o desenvolvimento econômico e ambientalmente sustentável.

2.2. O gênero *Perkinsus*: biologia, histórico de descobertas e patogenicidade

O gênero *Perkinsus* reúne protozoários parasitas intracelulares que infectam moluscos bivalves em diversas partes do mundo, associados a eventos de mortalidade em massa e responsáveis por consideráveis perdas econômicas na aquicultura (Villalba *et al.*, 2004). A descoberta do primeiro representante do gênero ocorreu na década de 1940, durante investigações sobre as causas das altas mortalidades da ostra americana *C. virginica* no Golfo do México, nos Estados Unidos. Inicialmente, o parasita foi descrito, com base em observações morfológicas, como um fungo, *Dermocystidium marinum* (Dermo) (Mackin; Owen; Collier, 1950). Essa classificação, no entanto, foi posteriormente derrubada após análises mais detalhadas da morfologia celular e de suas estruturas reprodutivas, confirmando que se tratava de um protozoário, quando então foi renomeado para *P. marinus* (Sprague, 1954; Perkins, 1996).

Em 1978, Levine, formalizou o gênero *Perkinsus*, alocando-o no Filo Apicomplexa, com base na presença de estruturas apicais semelhantes às observadas nesse grupo, como o conóide e os microporos (Levine, 1978). No entanto, essa proposta foi questionada por Vivier (1982), que argumentou que essas estruturas não seriam exclusivas dos apicomplexos, pois também ocorrem em ciliados e dinoflagelados.

A partir da década de 1990, com o advento das técnicas de biologia molecular e da filogenia baseada em sequências gênicas, a classificação do gênero *Perkinsus* sofreu uma nova reformulação. Os primeiros estudos moleculares com o gene do RNA ribossomal 18S (SSU rRNA) indicaram que *Perkinsus* possui maior afinidade filogenética com os dinoflagelados do que com os apicomplexos (Fong *et al.*, 1993; Goggin; Barker, 1993). Essa evidência foi reforçada por estudos posteriores que incluíram análises com genes adicionais, como actina e

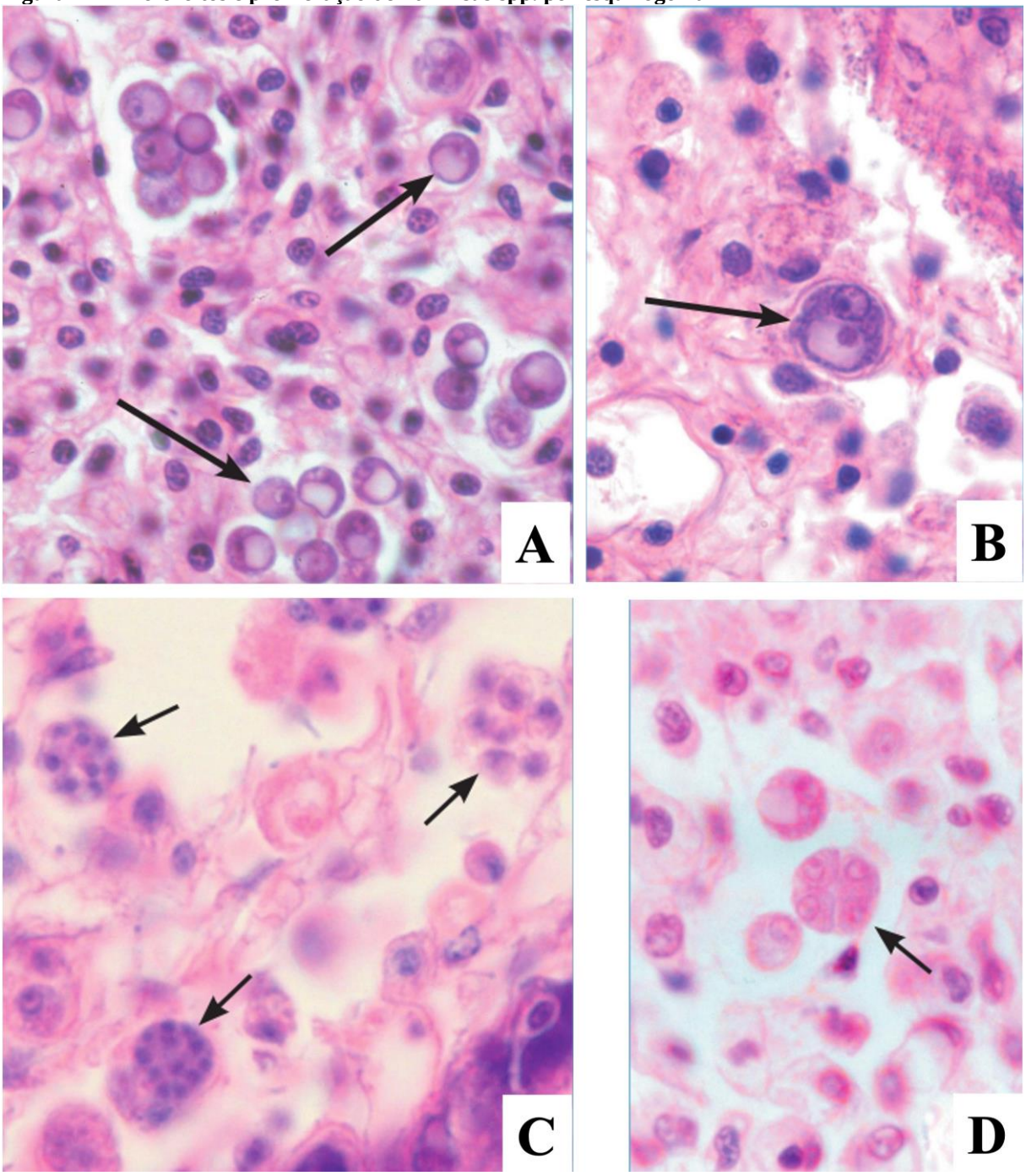
tubulina, posicionando o gênero na base do clado dos dinoflagelados, no supergrupo Alveolata (Escalante; Ayala, 1995; Reece *et al.*, 1997; Saldarriaga *et al.*, 2003). Com base nesses dados, Nóren *et al.* (1999) propuseram a criação de um novo filo, denominado Perkinsozoa, para incluir *Perkinsus, Parvilucifera* e outros alveolados relacionados. Esse novo filo foi sugerido devido às diferenças marcantes entre *Perkinsus* e os demais membros de Apicomplexa ou de Dinophyta, tanto morfológicas quanto moleculares. Desde então, *Perkinsus* tem sido reconhecido como o principal representante do Filo Perkinsozoa, no clado dos alveolados, ao lado de apicomplexos, dinoflagelados e ciliados (Saldarriaga *et al*., 2003; Villalba *et al*., 2004).

Atualmente, o gênero conta com 7 espécies descritas: *P. marinus, P. olsenii, P. qugwadi, P. chesapeaki, P. mediterraneus, P. honshuensis* e *P. beihaiensis* (Moss *et al*., 2008; Villalba *et al*., 2004). A delimitação dessas espécies se baseia principalmente em análises moleculares, especialmente da região do complexo gênico ribossomal (rDNA), incluindo as regiões18S, 5,8S, 28S e os espaçadores internos transcritos (ITS) 1 e 2, uma vez que as diferenças morfológicas entre os estágios de vida são frequentemente sutis e influenciadas por fatores ambientais ou pelo hospedeiro (Dungan *et al*., 2002; Casas *et al*., 2004). Assim, essas regiões são as mais importantes para o desenvolvimento de novos protocolos de diagnostico molecular, visto a ampla disponibilidade de sequências em bancos de dados, como o NCBI e o fato de que o genoma destes parasitas não está ainda sequenciado para todas, apenas para *P. marinus* (GenBank Project ID: 12736), *P. olsenii*, e para *P. chesapeaki* (Bogema *et al.*, 2021).

2.3. Ciclo de vida e estratégias de sobrevivência no ambiente

O gênero *Perkinsus* apresenta um conjunto de características morfológicas marcantes que se relacionam intimamente com o seu ciclo de vida e a capacidade de persistir no ambiente. Os estágios proliferativos no hospedeiro correspondem a trofozoítos de formato esférico a levemente irregular, com dimensões variando de 3 a 6 μm nos estágios iniciais, podendo atingir até 80 μm em formas hipertrofiadas (Perkins, 1996; Villalba *et al*., 2004). Estes apresentam um núcleo único, excêntrico, e um vacúolo citoplasmático proeminente, possivelmente relacionado ao armazenamento de nutrientes e à regulação osmótica (Perkins, 1996), grânulos refringentes no citoplasma, observados em diferentes espécies, são uma característica adicional distintiva (Villalba *et al*., 2004) (Figura 2A-B).

Figura 2 — Trofozoítos e proliferação de *Perkinsus* spp. por esquizogonia



Nota: Cortes histológicos de tecidos infectados por trofozoítos (A e B) e esquizontes (C e D) (flechas). **A.** *P. olsenii* na brânquia de *Ruditapes decussatus*. **B.** *P. mediterraneus* na glândula digestiva de *Ostrea edulis.* **C**. Estágio de divisão de *P. marinus*, com inúmeras células, na glândula digestiva da ostra *C. virginica*. **D**. Estágio de divisão de *P. olsenii* contendo quatro células.
Fonte: Villalba *et al*., 2011.

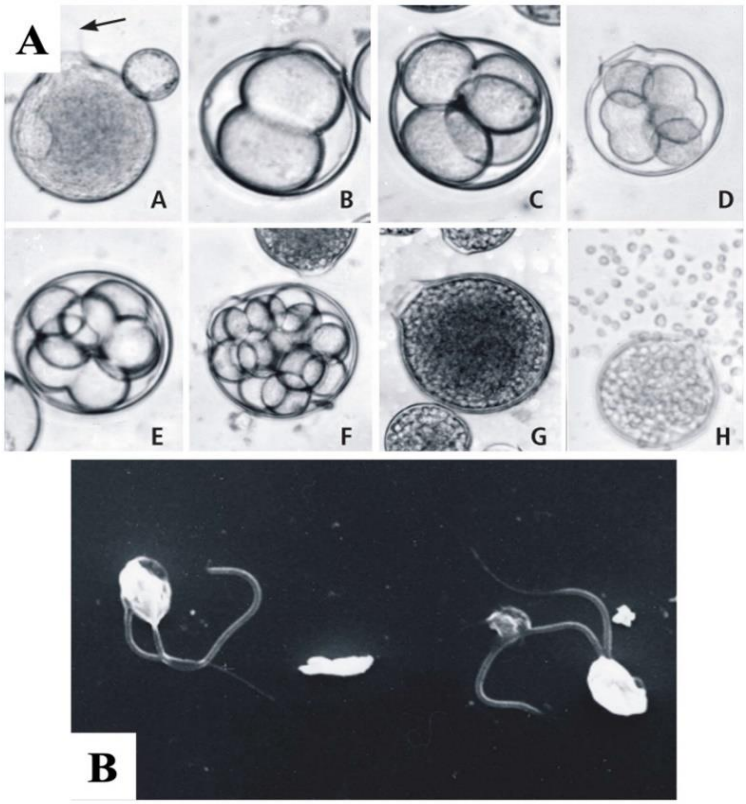
O ciclo de vida inclui fases intracelulares, extracelulares e livres no ambiente. No hospedeiro, os trofozoítos proliferam principalmente por esquizogonia, processo em que ocorrem divisões nucleares sucessivas, seguidas de segmentação citoplasmática, originando

múltiplas células-filhas a partir de uma célula-mãe (Figura 2C-D). Em alguns estágios iniciais, também pode ocorrer divisão binária (Villalba *et al*., 2004). A esquizogonia é um padrão de multiplicação típico de protozoários (Bogema *et al.*, 2021), e é também observada no Filo Perkinsozoa (Villalba *et al*., 2004). Esses processos formam focos infecciosos nos tecidos, especialmente nas brânquias, no manto e na glândula digestiva (Villalba *et al*., 2004).

A eliminação para o meio externo pode ocorrer por morte do hospedeiro, criando condições anaeróbias e desfavoráveis à proliferação dos trofozoítos. Nessas circunstâncias, ocorre a transformação em pré-zoosporângios ou hipnósporos, que desenvolvem uma parede celular espessa, estrutura de resistência capaz de permanecer viável por longos períodos no sedimento, mesmo na ausência de hospedeiros (Azevedo, 1989; Chu; Greene, 1989; Park *et al.*, 2010). A capacidade de detecção de *Perkinsus* em sedimentos e fezes por meio de técnicas imunológicas e moleculares confirma a persistência ambiental (Park *et al.*, 2010; Regan *et al.*, 2025).

Quando o tecido do hospedeiro é degradado e as condições ambientais se tornam favoráveis, os hipnósporos se dissociam da matriz tecidual e entram em contato com a água do mar, iniciando o processo de zoosporulação (Figura 3A). Nessa fase, o protoplasma interno sofre sucessivas bipartições, formando numerosas células internas que se diferenciam em zoósporos biflagelados (La Peyre; Faisal, 1995; Villalba *et al*., 2004) (Figura 3B). Estes são liberados por meio de um tubo de descarga formado na parede celular do hipnósporo, iniciando a fase móvel do ciclo e permitindo a infecção de novos hospedeiros (Casas; Villalba; Reece, 2002; Coss; Robledo; Vasta, 2001; Sunila; Hamilton; Duncan, 2001).

Figura 3 — Processo de zoosporulação de *Perkinsus olsenii*



Nota: Imagens de microscopia óptica de *P. olsenii* em cultivo *in vitro*. **A.** Sequência de desenvolvimento celular (A-H), a partir do pré-zoosporângio (A), mostrando as diferentes fases de divisão interna do zoosporângio (B-F), formação do tubo de descarga (G) e a liberação de zoósporos (H). **B.** Detalhes de dois zoósporos biflagelados.
Fonte: Villalba *et al.*, 2011.

A motilidade desses zoósporos favorece sua dispersão na coluna d'água e aumenta as chances de contato com bivalves suscetíveis, geralmente penetrando pela filtração branquial (Choi *et al.*, 1989). A zoosporulação pode ser modulada por fatores ambientais, como temperatura e salinidade, que influenciam a taxa de germinação e a sobrevivência dos estágios infectantes (Casas; Villalba; Reece, 2002).

Entre as principais estratégias de sobrevivência de *Perkinsus* no ambiente, destacam-se: a formação de hipnósporos altamente resistentes à degradação física e química (Azevedo, 1989); a persistência no sedimento por meses ou anos, mantendo viabilidade em condições adversas (Bushek, Ford; Chintala, 2002; Park *et al*., 2010); e a produção em massa de zoósporos móveis, maximizando a probabilidade de infecção de novos hospedeiros (Casas; Villalba; Reece, 2002; Villalba *et al*., 2004). Essas adaptações sustentam a continuidade dos ciclos de infecção e explicam a ampla distribuição geográfica e impacto patogênico do gênero.

A combinação de estratégias morfológicas, reprodutivas e ambientais confere ao gênero *Perkinsus* uma elevada capacidade de disseminação e manutenção em ecossistemas costeiros, tornando-o um patógeno de relevância epidemiológica global para moluscos bivalves e um desafio constante para programas de monitoramento e controle.

2.4. Mecanismos de infecção e proliferação intracelular

As espécies do gênero *Perkinsus* são parasitas intracelulares facultativos que infectam predominantemente moluscos bivalves, utilizando mecanismos especializados para a penetração, a evasão das defesas do hospedeiro e a proliferação no ambiente intracelular. A infecção inicia-se, geralmente, com a entrada dos zoósporos pela filtração branquial, estabelecendo contato com células epiteliais e hemócitos, que atuam como as primeiras células hospedeiras (Soudant; Chu; Volety, 2013; Villalba *et al*., 2004).

Após a adesão, mediada por interações específicas entre moléculas de superfície do parasita e receptores do hospedeiro, ocorre uma resposta imune do hospedeiro contra o parasita, que envolve a concentração de hemócitos nas áreas onde o parasita está presente e a fagocitose ou encapsulamento sucessivos, a depender da espécie (Casas *et al.*, 2002). *P. marinus* apresenta elevada capacidade de sobreviver no vacúolo fagocítico, inibindo a fusão fagossomo-lisossomo e modulando a resposta oxidativa para evitar a degradação intracelular (Soudant; Chu; Volety, 2013). Esse mecanismo de evasão do sistema imunológico representa um fator-chave para o sucesso da infecção e contribui para explicar sua ampla distribuição e maior impacto patogênico em populações de bivalves (Fuertes, Watanabe; Itoh, 2024). A invasão dos tecidos pode ser extensa, comprometendo órgãos como as brânquias, o manto e a glândula digestiva. Esse avanço pode culminar na morte do hospedeiro (Casas; Villalba; Reece, 2002; Coss; Robledo; Vasta, 2001; Sunila; Hamilton; Duncan, 2001).

As consequências da infecção variam de acordo com a intensidade e o avanço do parasitismo. Em infecções graves, a rápida proliferação dos trofozoítos pode levar à mortalidade em massa em populações de moluscos (Park *et al.*, 2010; Villalba *et al.*, 2011). Mesmo em casos não letais, *Perkinsus* pode provocar redução do crescimento, prejuízo à reprodução e comprometimento imunológico, aumentando a suscetibilidade a infecções oportunistas secundárias (Park *et al.*, 2010; Villalba *et al.*, 2011). Assim, o sucesso da infecção por *Perkinsus* resulta da combinação de estratégias de invasão ativa, resistência estrutural na forma de

hipnósporos e alta capacidade de disseminação por meio de zoósporos móveis, tornando-o um agente patogênico de grande relevância ecológica e econômica.

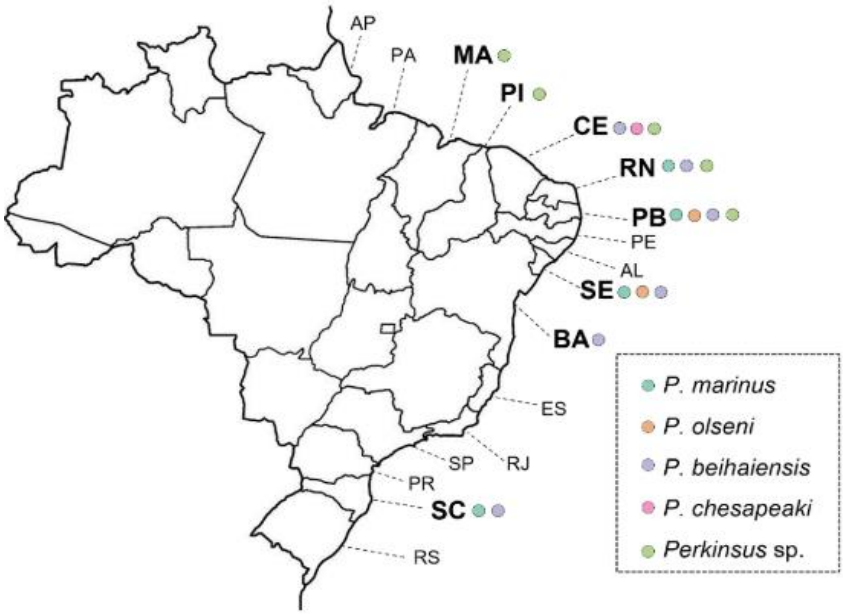
2.5. Perkinsiose: distribuição e ocorrência no Brasil

Perkinsus spp. distribui-se de forma global, havendo relatos de sua ocorrência em praticamente todos os continentes demonstrando sua ampla dispersão e capacidade de infecção de uma vasta gama de moluscos. Na Ásia *P. olsenii, P. beihaiensis* e *P. honshuensis* foram registradas em bivalves (Hamaguchi *et al.*, 1998; Moss *et al.*, 2008; Ye *et al.*, 2022); na Europa, *P. olsenii* e *P. mediterraneus* sendo amplamente distribuídos em amêijoas e ostras (Azevedo, 1989; Carella *et al.*, 2023; Casas *et al.*, 2004), nas Américas *P. marinus* é historicamente associado às ostras dos Estados Unidos desde a descrição pioneira infectando *C. virginica* (Mackin; Owen; Collier, 1950), posteriormente encontrado no México e no Canadá infectando outras espécies de bivalves (Bower; Blackbourn; Meyer, 1998; Cáceres-Martínez *et al.*, 2008). Em regiões da Oceania, como a Austrália e a Nova Zelândia, *P. olsenii* é amplamente relatado (Goggin; Lester, 1995; Lester; Davis, 1981).

A recente revisão de Da Silva *et al*., (2024) traz um panorama geral da ocorrência e diversidade de *Perkinsus* spp. em moluscos bivalves da América do Sul, destacando as infecções relatadas na Argentina e no Uruguai (Cremonte; Balseiro; Figueras, 2005; Vázquez; Itoh; Cremonte, 2022), e especialmente no Brasil, onde há um maior número de estudos. Desde o primeiro registro, em 2007, no Ceará (Sabry *et al.*, 2009), diversos estudos foram realizados, mas as populações naturais e cultivadas de ostras *C. gasar* e *C. rhizophorae* da região Nordeste são as que apresentam os maiores registros (Figura 3), com destaque para as espécies *P. marinus* e *P. beihaiensis*, de maior incidência, além de *P. olsenii* e *P chesapeaki*.

As prevalências e intensidades das infecções variam conforme o hospedeiro e as condições ambientais, como temperatura e salinidade. Embora apresente vasta distribuição geográfica, o estudo aponta que a Perkinsiose no Brasil não está associada a eventos de mortalidade massiva, indicando uma possível susceptibilidade diferencial na relação parasita-hospedeiro (Queiroga *et al.*, 2015). Da Silva *et al*., (2024) aponta ainda para a ausência de relatos de infecções por *Perkinsus* spp. em alguns estados brasileiros, que estaria mais associada a uma limitação da cobertura geográfica dos estudos, reforçando a necessidade de ampliação do monitoramento contínuo ao longo de toda a costa litorânea (Da Silva *et al.*, 2024).

Figura 4 — Mapa do Brasil: Estados costeiros com relatos de infecções por *Perkinsus* spp.



Fonte: da Silva *et al*., 2024.

2.6. Técnicas de diagnóstico de *Perkinsus*: avanços e desafios

A WOAH juntamente com os governos de diferentes países, busca continuamente alertar e estabelecer medidas de controle e prevenção da introdução e disseminação de doenças, por meio do estabelecimento de legislações específicas e de recomendações. Como parte desta política, está incluído o diagnóstico dos parasitas.

Dentre os métodos de diagnóstico de *Perkinsus* spp. recomendados pela WOAH (2024) está o método *padrão-ouro*, chamado de ensaio de cultivo RFTM. Este método consiste na incubação de amostras de tecidos do hospedeiro no RFTM, no qual as células do parasita (trofozoítos) serão induzidas a aumentar de tamanho; até 30 vezes, sem haver proliferação, formando uma fase de resistência denominada hipnósporo. Esse método também é semiquantitativo, pois é possível estabelecer níveis de infecção (de 0 a 5) por meio da contagem de hipnósporos observados na amostra após coloração com Lugol, que pode ser realizada com tecido de brânquias ou com o animal inteiro (Dungan; Bushek, 2015). O método é considerado padrão pela WOAH, por ser de fácil execução, de baixo custo e sensível até em intensidades de infecção baixas, sendo muito útil para o monitoramento da Perkinsiose de rotina.

Já a análise histológica de cortes de tecidos corados com hematoxilina e eosina, representa um método de avaliação da saúde global do hospedeiro, pois, além de identificar o parasita, verifica as lesões ocasionadas (WHOAH, 2024).

Por outro lado, as técnicas moleculares, como, por exemplo, a PCR convencional e a PCR quantitativa em tempo real (qPCR), contribuem para auxiliar no diagnóstico de espécies de *Perkinsus*, demonstrando serem altamente específicas e sensíveis (Casas *et al*., 2002; Kim *et al*., 2024a), e a hibridização *in situ* pode ainda localizar o parasita nos tecidos (Da Silva *et al.*, 2014).

A PCR quantitativa em tempo real (qPCR) é uma variação da PCR convencional, na qual a fluorescência emitida pelo SYBR Green I, ligado à dupla fita do DNA, quantifica o fragmento alvo amplificado a cada ciclo da reação (Pfaffl, 2001). Apesar da especificidade promovida pelo par de iniciadores na reação de qPCR (*singleplex*), a fluorescência emitida pelo SYBR Green I não é específica, pois se liga a qualquer dupla fita de DNA presente na reação, o que não permite reações com mais de um par de iniciadores (*multiplex*). Na qPCR, a quantificação pode ser realizada em relação a um gene de referência (relativa) ou a uma quantidade conhecida de DNA (absoluta), com base em uma curva padrão.

A qPCR com sonda de hidrólise é uma técnica variante da qPCR, na qual são utilizadas sondas TaqMan para aumentar a especificidade. Estas sondas são desenhadas para hibridizar-se na região flanqueada pelos iniciadores (Heid *et al.*, 1996). A sonda possui um fluoróforo na extremidade 5' (*reporter*) e uma molécula inibidora (*quencher*) na extremidade 3', cuja interação impede a emissão de fluorescência. A ativação do sinal de fluorescência ocorre quando a sonda é clivada pela Taq DNA-polimerase durante a amplificação do DNA. Essa clivagem separa fisicamente o *reporter* do inibidor, permitindo, assim, a emissão da fluorescência. Essa característica confere alta especificidade ao sistema e permite o uso para a detecção de múltiplos alvos na mesma reação (*multiplex*) (Livak; Schmittgen, 2001).

Um dos destaques na utilização da TaqMan é a possibilidade de detecção e avaliação da carga parasitária, que tem grande relevância em estudos visando ao monitoramento da progressão de infecções ao longo do tempo, bem como da relação parasita-hospedeiro, especialmente quando dois parasitas infectam o mesmo animal (Ríos *et al.*, 2020). Com o aprimoramento das técnicas moleculares, foi possível identificar a ocorrência de mais de uma espécie de *Perkinsus* no mesmo ambiente e em coinfecções em um mesmo hospedeiro (Coss; Robledo; Vasta, 2001; Reece; Dungan; Burreson, 2008; Takahashi *et al.*, 2009).

Até o momento, já foram desenvolvidas qPCRs para a detecção simples ou simultânea de *Perkinsus* spp. em tecidos de vários hospedeiros (ostras, amêijoas, abalones e mexilhões) ou em amostras de DNA ambiental (Audemard, Reece; Burreson, 2004). Um estudo recente apontou a relevância da abordagem *multiplex* de qPCR ao estudar a relação do hospedeiro com o bivalve *R. philippinarum*, infectado por *P. olsenii* e *P. chesapeaki* (Itoïz *et al.*, 2021).

Estudos recentes, como os conduzidos por Marquis e colaboradores (2020), demonstram que a qPCR é uma ferramenta essencial para levantamentos epizootiológicos de *P. marinus* em populações de ostras, permitindo monitorar, por longos períodos, a prevalência e a intensidade. Além de detectar infecções precoces e revelar variações sazonais e geográficas importantes para a compreensão de padrões epizootiológicos, a técnica também tem sido empregada para investigar a resposta imunológica e a susceptibilidade de diferentes espécies e linhagens de *Crassostrea*. Nesse contexto, estudos com *C. corteziensis* indicam que aumentos na carga parasitária de *P. marinus* estão associados a mudanças significativas na expressão de genes relacionados à imunidade, reforçando a relevância da qPCR na investigação da correlação entre intensidade de infecção e modulação das defesas do hospedeiro (Escobedo-Fregoso; Ramirez-Salcedo; Vázquez-Juárez, 2017).

2.7. Aplicação da qPCR no diagnóstico de *Perkinsus* spp.: avanços, desafios e perspectivas

O desenvolvimento da qPCR para a detecção de *Perkinsus* spp. vem se consolidando ao longo das duas últimas décadas como uma resposta à necessidade crescente de métodos sensíveis, específicos e quantitativos para um diagnóstico cada vez mais prático e eficiente. Os primeiros avanços ocorreram no início dos anos 2000, a partir da adaptação de *primers* previamente utilizados em PCR convencional, dirigidos a regiões do rDNA, especialmente ITS e 18S para abordagens quantitativas capazes de estimar com precisão a carga parasitária em tecidos e amostras ambientais.

Um marco inicial foi o estudo de Audemard, Reece e Burreson (2004), que demonstrou a viabilidade de utilizar qPCR baseada em SYBR Green I para detectar e quantificar *P. marinus* em amostras ambientais. Esse trabalho destacou que a qPCR não apenas apresentava maior sensibilidade do que as técnicas convencionais, mas também permitia estimar cargas parasitárias, fornecendo dados essenciais para o monitoramento epizootiológico. A

incorporação de curvas padrão possibilitou estimativas robustas do número de células parasitárias, abrindo caminho para uma abordagem quantitativa que viabilizou o início do estabelecimento de uma correlação entre níveis de parasitismo, fatores ambientais e padrões de transmissão.

A busca por maior especificidade levou ao desenvolvimento dos ensaios TaqMan apresentados por Gauthier, Miller e Wilbur (2006), que diferiam ao substituir os intercalantes fluorescentes por sondas MGB de alta especificidade, permitindo a diferenciação precisa entre *P. marinus* e outras espécies do gênero, TaqMan, como já comentado anteriormente. Esses ensaios superaram limitações associadas à elevada conservação de regiões ITS entre espécies próximas, reduzindo o risco de amplificação inespecífica e oferecendo parâmetros de validação mais rigorosos. Com isso, a técnica tornou-se referência para estudos de prevalência e intensidade de infecção, como os conduzidos posteriormente por Marquis *et al*. (2020) e por Batchelor *et al*. (2023).

O avanço das aplicações moleculares levou à ampliação da cobertura diagnóstica para além de *P. marinus*. Ensaios dirigidos a *P. olsenii, P. honshuensis* e *P. chesapeaki*, demonstraram a importância de métodos específicos para diferentes espécies que afetam bivalves em ambientes asiáticos, europeus e norte-americanos (Itoïz *et al.*, 2021; Ríos *et al.*, 2020; Umeda; Yoshinaga, 2012).

A evolução metodológica seguiu com o desenvolvimento de abordagens *duplex* e *multiplex*, voltadas à detecção simultânea de múltiplos patógenos em matrizes complexas. Neste contexto, um dos primeiros trabalhos desenvolveu um ensaio duplo capaz de detectar, a nível de gênero, *Perkinsus* e *Haplosporidium*, em uma única reação, possibilitando uma vigilância integrada em ambientes nos quais esses parasitas frequentemente coexistem (Xie *et al*., 2013).

Esse conceito foi expandido com o desenvolvimento de um ensaio *duplex* espécie-específico para *P. olsenii* e *P. chesapeaki* (Itoïz *et al.*, 2021) e posteriormente o desenvolvimento de ensaio *multiplex* com TaqMan capaz de detectar simultaneamente *P. marinus*, *Haplosporidium nelsoni* e *Haplosporidium costale*, integrando em uma única reação análises que antes requeriam múltiplas etapas (Piesz *et al.*, 2022), ampliando desta forma as estratégias diagnósticas em regiões onde diferentes espécies do gênero e infecções coexistem.

No Brasil, a aplicação da qPCR ao diagnóstico de *Perkinsus* spp. é recente e teve seu único registro confirmado da espécie *P. marinus* infectando ostras do gênero *Crassostrea* no Rio Grande do Norte, utilizando *primers* já descritos por Audemard *et al*. (2004) com ensaio baseado em SYBR Green I (Rocha *et al.*, 2023). Além de validar o uso da técnica em matrizes nacionais, o estudo evidencia a necessidade de fortalecer os sistemas de vigilância molecular no país.

Atualmente, o desenvolvimento de qPCRs para *Perkinsus* spp. busca novos alvos moleculares cada vez mais exclusivos, para uma caracterização mais precisa das espécies. Os principais ensaios de qPCR utilizados para detecção de *Perkinsus* spp. estão sintetizados no Quadro 1.

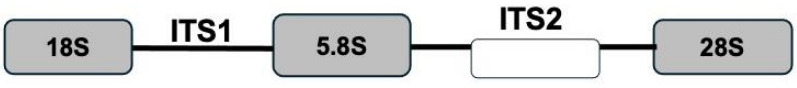
Nesse contexto, foi desenvolvido um ensaio TaqMan utilizando uma região do genoma que os autores denominaram gene hipotético, exclusivo de *P. marinus*, que se mostrou altamente sensível (Kim *et al*., 2024a).

Do ponto de vista epizootiológico, a qPCR desempenha papel central na compreensão da dinâmica de infecção, na estimativa da intensidade parasitária e no acompanhamento de variações temporais e geográficas na sua prevalência, fatores indispensáveis no estabelecimento de estratégias de manejo (Batchelor *et al.*, 2023; Marquis *et al.*, 2020; Piesz *et al.*, 2022).

Em relação à espécie *P. beihaiensis*, um único ensaio de qPCR descrito utilizou um alvo da região do ITS para quantificação; este foi utilizado apenas como referência para a validação de outros métodos alternativos (Wu *et al.*, 2019). A existência de apenas um ensaio específico para essa espécie reforça as lacunas ainda presentes no diagnóstico molecular.

A utilização da região ITS (*Internal Transcribed Spacer*) é recomendada tanto para PCR do gênero *Perkinsus* quanto para ensaios específicos, por ser a região do complexo rRNA cuja variabilidade genética é mais amplamente conhecida e documentada, o que proporciona maior confiabilidade na detecção de diferentes linhagens do parasito (WOAH, 2024).

Figura 5 — Representação esquemática da organização da região ITS do rRNA



Fonte: Elaborada pelo autor (2026).

Quadro 1 — *Primers* de qPCR projetados para o diagnóstico de *P. marinus* e *P. beihaiensis*

Nome	Sequência (5'-3')	Produto (pb)	Alvo	Referência
P. marinus				
Pmar-ITS2q-Fw Pmar-ITS2q-Rv	AACTAACTCTTCGGAGGTGG GTCGAGTTTGCGAGTACCTC	141	ITS2	**Este estudo**
PmarITS-70F PmarITS-600R	CTTTTGYTWGAGWGTTGCGAGATG CGAGTTTGCGAGTACCTCKAGAG	509#	ITS	(Audemard *et al.*, 2004)
PMAR-Fw * PMAR-Rv PMAR-Probe	TTGTTAACGCAACTCAATGCTTTGT AAGCGCACATAACGAACCACC GCTTGAACTAACTCT-MGB	71	ITS2	(Gauthier *et al.*, 2006)
Fw ## Rv * Probe **	CGCCTGTGAGTATCTCT**C**GA GTTGAAGAGAAGAATCGCGTGAT 56-FAM-CGCAAACTCGACTGTGTTGTGGTG-BHQ1	90	ITS2	(Faveri *et al.*, 2009)
PmHP-Fw PmHP-Rv PmHP-P	CCCAGTTCACAGTGCCTGTC CATGGAATGCCGAGGGTACA [FAM]AGCGTCAT[i-EBQ]CGGACCTCGTGCA[P]			(Kim *et al.*, 2024a)
P. beihaiensis				
Pbei-ITS2q-Fw Pbei-ITS2q-Rv	TATCCCGCTTGACTCCTCAC CAGTCGAGTTTGCGGACATC	160	ITS2	**Este estudo**
PerkITS-85F PerkITS-430R	CCGCTTTGTTTRGMTCCC TCTGAGGGGCTACAATCAT	449	ITS	(Casas *et al.*, 2002) (Moss *et al.*, 2008)
Q2-F *** Q2-R # # #	TCGATGAAGGACGCA**A**CGAA CTCATTTCTG**C**GGGGCTACA	291	ITS	(Wu *et al.*, 2019)

Nota: #Amplicon longo; * Hibridiza com *P. marinus*, *P. olseni*, *P. mediterraneus* e *P. honshuensis*; ** Hibridiza com *P. marinus*, *P. mediterraneus*, *P. honshuensis* e *P. beihaiensis*. # # O nucleotídeo **C** destacado deveria ser **M** para hibridizar no polimorfismo (A/C). *** O nucleotídeo **A** destacado é o único nucleotídeo que difere entre as cinco espécies de *Perkinsus*. # # # O nucleotídeo **C** destacado representa um erro na sequência do *primer*, que deveria ser **A**.

Fonte: Elaborado pelo autor (2026).

3 OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Desenvolver e validar dois ensaios de PCR em tempo real para a detecção e quantificação de *P. marinus* e *P. beihaiensis*.

3.2. Objetivos específicos

- Desenhar iniciadores para qPCRs espécie-específicas para diagnosticar e quantificar *P. marinus* e *P. beihaiensis*;
- Avaliar a eficiência dos iniciadores em reações de qPCR;
- Validar as duas qPCRs desenvolvidas em amostras de animais cultivados.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Obtenção e processamento das amostras de bivalves

Foram utilizadas 100 amostras de bivalves marinhos das espécies de ostras nativas *C. gasar* e *C. rhizophorae*, da ostra-do-pacífico *M. gigas*, da vieira *N. nodosus* e do sururu *M. falcata*. Os organismos foram provenientes dos estados de Santa Catarina (SC), Rio de Janeiro (RJ), Pará (PA), Bahia (BA), Rio Grande do Norte (RN), Paraíba (PB) e Sergipe (SE), abrangendo diferentes regiões geográficas e contextos epidemiológicos.

Fragmentos de tecido de brânquias de cada animal foram removidos e subdivididos em duas partes para a aplicação de diferentes métodos diagnósticos, conforme descritos a seguir. O DNA extraído de todas as amostras foi analisado quanto à sua integridade em gel de agarose (1%) e/ou por PCR convencional usando o primer (16SAR–16SBR) que amplifica uma região do DNA mitocondrial da subunidade menor do RNA ribossômico (16S) (Kessing *et al*. 1989).

4.2. Diagnóstico de *Perkinsus* spp. pelo Meio Fluido de Tioglicolato de Ray (RFTM)

O ensaio de incubação em meio fluido de tioglicolato (RFTM) foi utilizado para avaliar o nível de infecção por *Perkinsus* spp. nas ostras (Dungan; Bushek, 2015). Cada animal foi aberto e porções das brânquias foram excisadas e incubadas em tubos contendo RFTM com adição de penicilina, estreptomicina (100 U/mL e 0,1 mg/mL, respectivamente) e nistatina (100 U/mL), no escuro, à temperatura ambiente (25 °C), por 5 dias. Após esse período, as brânquias foram maceradas com bisturi sobre lâmina e coradas com solução de Lugol a 4%. A preparação foi examinada ao microscópio óptico para determinar a prevalência e a intensidade de *Perkinsus* spp. de acordo com uma escala de quatro níveis adaptada de Mackin (Ray, 1952) por Da Silva *et al*. (2013b), que inclui infecção muito leve (1); leve (2); moderado (3) e avançado (4).

4.3. Diagnóstico de *Perkinsus* spp. por PCR convencional e polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição (RFLP).

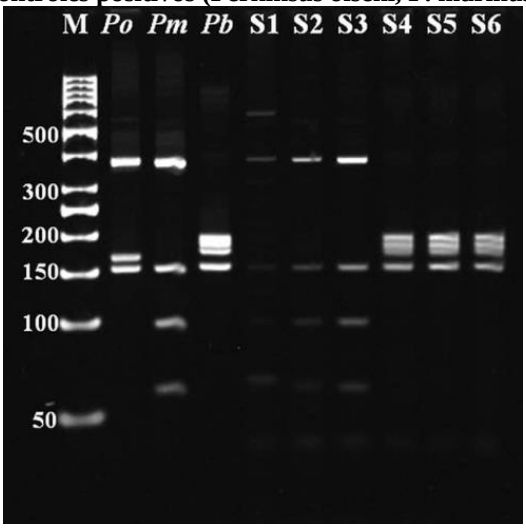
As porções das brânquias de cada bivalve foram removidas, depositadas em microtubos contendo álcool a 95% e armazenadas a 4 °C para utilização em todos os métodos de

diagnóstico molecular. Fragmentos das brânquias (25-50 mg) de cada bivalve foram utilizados para a extração de DNA genômico (DNAg), segundo o protocolo de extração com acetato de amônio adaptado de Aidar; Line (2007). Foi determinada a concentração de DNAg das amostras e ajustada a 100 ng/µL.

As PCRs foram realizadas conforme o protocolo de Casas *et al*. (2002), utilizando iniciadores (PerkITS-85/PerkITS-750) que hibridizam em regiões conservadas dos espaçadores internos transcritos (ITS1 e ITS2) e da região 5.8S do complexo do RNA ribossômico (rRNA) de *Perkinsu*s spp. no DNAg. As reações de PCR foram preparadas em um volume total de 25 µL, contendo 100 ng de gDNA, 0,4 µM de cada iniciador, 200 µM de mistura de dNTPs, 1,5 mM de $MgCl_2$ e 1 U de Taq DNA polimerase (Sinapse Biotecnologia Ltda, Brasil). Os parâmetros de ciclagem foram 94°C por 10 min, 40 ciclos de 94°C por 1 min, 55°C por 1 min, 72°C por 1 min e uma extensão final a 72°C por 10 min, em um termociclador (MiniAmpTM, Thermo Fisher). Os produtos das PCRs (denominados aqui ITS2) foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1,5% para confirmação do tamanho esperado de 700 pb.

Os produtos amplificados foram submetidos à digestão com a enzima de restrição HinfI (Fermentas, Brasil), produzindo fragmentos que foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida a 8%. O perfil obtido foi comparado ao de outras espécies de *Perkinsus* spp. (Queiroga *et al.*, 2015), (Figura 6).

Figura 6 — Padrão de restrição (PCR-RFLP) da região ITS de *Perkinsus* spp., mostrando o perfil de bandas dos controles positivos (Perkinsus olseni, P. marinus e P. beihaiensis)



Nota: **M**: marcador de peso molecular, **Po**: *Perkinsus olseni*, **Pm**: *P. marinus*, **Pb**: *P. beihaiensis*. **S1**-**S6**: amostras.
Fonte: Queiroga *et al*., 2015.

4.4. Desenvolvimento de PCR quantitativa em tempo real (qPCR) para o diagnóstico de *P. marinus* e *P. beihaiensis*.

O desenvolvimento de duas qPCRs em tempo real envolveu várias etapas: i) alinhamento e filogenia das sequências de ITS de *Perkinsus* spp., para o desenho de iniciadores; ii) teste dos iniciadores em PCR convencional; iii) preparação de plasmídeos contendo os fragmentos para testes de suas eficiências em qPCR; iv) efeito inibitório de tecidos de bivalves nas reações de qPCR; v) testes de especificidade, vi) testes de sensibilidade e repetibilidade; e, vii) determinação do limite de detecção.

Após a conclusão destas etapas, foi realizada a validação das reações de qPCR em amostras infectadas (n = 60) e não infectadas (n = 40) por *Perkinsus* spp.

4.4.1. Filogenia molecular

Foram obtidas do Genbank NCBI 73 sequências gênicas da região alvo (ITS2) das 7 espécies de *Perkinsus: P. marinus, P. olsenii, P. qugwadi, P. chesapeaki, P. mediterraneus, P. honshuensis* e *P. beihaiensis* (Apêndice A). Esta região foi escolhida porque é bastante conservada, mas apresenta variações suficientes para distinguir as espécies.

Com as sequências obtidas, realizou-se um alinhamento múltiplo, seguido de uma análise filogenética no MEGA 11 (versão 11.0.13) (Tamura; Stecher; Kumar, 2021), com o algoritmo ClustalW. O objetivo foi avaliar as relações filogenéticas entre as espécies, confirmar que as sequências escolhidas pertenciam a diferentes espécies e utilizá-las na busca por regiões potenciais para o desenho dos iniciadores.

4.4.2. Desenho dos iniciadores espécie-específicos

A partir do alinhamento das sequências do ITS2, regiões com alto número de nucleotídeos exclusivos de *P. beihaiensis* ou de *P. marinus* foram visualmente selecionadas e utilizadas para o desenho dos dois pares de iniciadores. Os iniciadores manualmente desenhados também foram analisados no Primer-BLAST (NCBI) (Ye *et al.*, 2012) para confirmar sua especificidade *in silico*, bem como para determinar a temperatura de *melting* (Tm), o conteúdo de GCs e os índices de autocomplementaridade, que poderiam ser críticos para a reação.

Os iniciadores foram testados em reações de PCR convencionais, utilizando amostras positivas, conforme descrito no item 4.3, variando-se as concentrações (300 nM, 250 nM e 200 nM) e a temperatura de anelamento (60 °C e 62 °C), a fim de determinar as melhores condições para evitar a formação de dímeros.

Os produtos das PCRs amplificados foram purificados com o kit NZYGelpure (NZYTech™), utilizados na produção de plasmídeos, e estes foram utilizados nos testes de eficiência dos iniciadores.

4.4.3. Produção de plasmídeos para curvas padrão da qPCR

Os produtos amplificados das PCRs do ITS realizadas com amostras de *P. beihaiensis* e *P. marinus*, como descrito anteriormente, assim como de *P. olsenii* e *P. chesapeaki* oriundos de reações de PCR e purificação (Quadro 2) foram clonados no vetor pGEM-T easy I (Promega). O plasmídeo recombinante foi transformado em células quimicamente competentes de *Escherichia coli* DHα. A *E. coli* transformada foi cultivada em meio de ágar sólido Lysogeny Broth (LB) a 37 °C para triagem de colônias azuis/brancas. Em seguida, as colônias brancas foram selecionadas para PCR e cultivadas *overnight* em meio LB líquido. O DNA plasmidial (DNAp) foi purificado usando o sistema PureYield™ Plasmid Miniprep (Promega) e quantificado em nanodrop (Thermofisher).

O número de cópias/µL do DNAp de cada amostra foi calculado pela calculadora da Thermofisher (https://www.thermofisher.com/br -copy-number-calculator) e leva em consideração a concentração (ng/µL) da amostra, o número total de nucleotídeos (vetor + produto da PCR) e a constante de Avogadro. Após a determinação do número de cópias/µL para cada plasmídeo, diluições seriadas foram realizadas (10^8-10^2 cópias/µL) para obter uma curva padrão, destinada aos testes da eficiência de cada iniciador.

Quadro 2 — Amostras utilizadas na preparação dos plasmídeos para as curvas padrão e os controles

***Perkinsus* spp.**	**Código Genbank/ Amostra**	**pb**	**Referência**
P. beihaiensis	Ostra infectada (FJ472346)	648	(Sabry *et al.*, 2009)
P. marinus	Ostra infectada (JX144335)	669	(Da Silva *et al.*, 2013)
P. olsenii	Cultivo *In vitro* (PX424270)	673	Cordialmente fornecido por Villlaba, A.
P. chesapeaki	Cultivo *In vitro* (PX424271)	689	Cordialmente fornecido por Chambouvet, A.
P. marinus	Cultivo *In vitro* (PX424269)	666	Este estudo
Bonamia ostreae	Isolado de *Ostrea edulis*	-	Cordialmente fornecido por Arzul, I.

Fonte: Elaborado pelo autor (2026).

4.4.4. Ensaio de eficiência dos iniciadores em qPCR

As reações de qPCR foram preparadas em um volume total de 10 µL utilizando o PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix para qPCR (Applied Biosystems), 200 nM de cada iniciador, 1 µL do DNA molde (pDNA ou gDNA, dependendo do teste) e água destilada UltraPure™ (Invitrogen). Todas as reações de qPCR incluíram um controle positivo e um controle negativo (sem DNA) e foram realizadas em triplicata. As condições de ciclagem térmica foram as seguintes: desnaturação inicial do DNA a 95 °C por 5 min; 40 ciclos consistindo de uma etapa de desnaturação a 95 °C por 30 s, uma etapa de anelamento/extensão a 60 °C por 1 min e uma extensão a 75 °C por 30 min; e análise da temperatura da curva de melting (15 s a 95 °C, 1 min a 60 °C e 30 s a 95 °C), utilizando o termociclador 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Os resultados foram obtidos utilizando o software 7500 v2.3.

4.5. Efeito inibitório do tecido do hospedeiro

A fim de avaliar possíveis interferências de DNAg nas reações de qPCR, como inibidor ou modificador da eficiência dos iniciadores, testes foram realizados com quatro órgãos diferentes (brânquias, gônadas, glândula digestiva e manto) obtidos de uma ostra juvenil (de

quatro meses de idade) da espécie *C. gasar*, os quais foram utilizados em mistura ou separadamente. Adicionalmente, foi testada uma amostra contendo uma mistura de órgãos de três espécies de bivalves de importância comercial (*M. gigas*, *C. rhizophorae* e *N. nodosus*), que também foram testadas por RFTM e PCR (ITS2) a fim de confirmar a ausência de infecção por *Perkinsus* spp., conforme recomendado pela WOAH. Todas as amostras foram negativas para *Perkinsus* spp.

Cada amostra de DNAg (100 ng) descrita anteriormente foi adicionada, separadamente, a cada diluição dos plasmídeos de *P. marinus* e *P. beihaiensis*, nas concentrações de 10^8 a 10^2 cópias, a fim de avaliar o possível efeito inibitório dos tecidos hospedeiros nas reações de qPCR. As reações foram realizadas conforme descrito no item 4.4.4.

4.5.1. Sensibilidade analítica e repetibilidade

A eficiência e a sensibilidade analítica das qPCRs, expressas como limite de detecção (LoD), foram determinadas utilizando diluições decimais dos plasmídeos de *P beihaiensis* e de *P marinus*, separadamente. Inicialmente, sete diluições seriadas (10^8 a 10^2 cópias/μL), foram avaliadas em triplicata, ao longo de nove ensaios independentes de qPCR realizados em dias distintos.

Os valores do coeficiente angular (*slope*), do intercepto em Y, do coeficiente de correlação (R^2) e da eficiência de amplificação (%) foram obtidos a partir da regressão linear entre o limiar de ciclo (Ct) e o número de cópias, os quais foram fornecidos automaticamente pelo software 7500 v2.3 (Applied Biosystems).

Em seguida, considerando que a sensibilidade analítica pode situar-se abaixo da faixa linear de amplificação, foram testadas quatro diluições adicionais, correspondentes a 50, 10, 5 e 1 cópia de cada plasmídeo, avaliadas em réplicas de três ensaios independentes de qPCR. O limite de detecção (LoD) foi definido como a menor diluição em que pelo menos 95% das amostras apresentaram amplificação positiva.

Adicionalmente, a repetibilidade do ensaio foi avaliada com base nos mesmos testes de sensibilidade analítica, por meio da análise da variação intra- e interensaio dos valores de Ct entre as réplicas. Para cada diluição dos plasmídeos da faixa linear (10^8 a 10^2 cópias/μL),

calculou-se o coeficiente de variação (CV %) com base nos resultados de qPCR obtidos em nove ensaios independentes.

4.5.2. Especificidade analítica

A especificidade dos ensaios de qPCR foi avaliada com DNAg de isolados de *P. chesapeaki* e de *P. olsenii*, bem como do protozoário parasita *Bonamia ostreae* (Haplosporida). Adicionalmente, amostras de DNAg de um isolado de *P. marinus* e de uma ostra infectada por *P. baihaiensis* foram utilizadas como controles positivos e amostras não-alvo em cada um dos ensaios de qPCR (Tabela 2). O DNAg de cada parasita foi submetido a diluições seriadas, de modo a obter as concentrações finais de 1, 0,1, 0,01 e 0,001 ng para os testes de especificidade.

Na ausência de um isolado *in vitro* de *P. beihaiensis*, utilizou-se uma ostra da espécie *C. gasar* fortemente infectada. Fragmentos de brânquias desse espécime foram submetidos a diagnóstico por RFTM, PCR da região ITS e ensaio de RFLP empregando a enzima de restrição (Fermentas, Brasil) para digestão do produto ITS-PCR conforme descrito por Queiroga *et al*., (2015). A ostra foi diagnosticada como positiva para *Perkinsus* sp. por RFTM, apresentando nível 4 de infecção (avançada); a RFLP confirmou que a infecção era por *P. beihaiensis* e a qPCR com iniciadores de Audemard *et al*. (2004) confirmou a ostra não estava infectada por *P. marinus*. O DNAg da ostra foi diluído para obter 10^3, 10^2, 10^1 e 1 cópia do DNAg do parasita. As reações de qPCR foram preparadas conforme descrito no item 4.4.4.

4.6. Validação dos ensaios

Os dois ensaios de qPCR desenvolvidos foram aplicados ao DNAg extraído de brânquias de 100 bivalves de diferentes espécies e de origens geográficas distintas. O diagnóstico de *Perkinsus* spp. foi realizado previamente em todas as amostras por meio de RFTM, PCR-RFLP e, em alguns casos, sequenciamento, para o qual os códigos do GenBank são fornecidos. Foram utilizadas amostras não infectadas (n = 40) e infectadas (n = 60).

As reações de qPCR foram preparadas separadamente, conforme descrito anteriormente, utilizando 1 μL (100 ng) de DNAg de cada amostra e realizadas, em duplicata. O controle negativo consistiu em água ultrapura e os controles positivos foram os plasmídeos (10^3 cópias)

que continham sequências de *P. marinus* e *P. beihaiensis*. As curvas padrão correspondentes a cada espécie de *Perkinsus* foram utilizadas para calcular o número de cópias/100 ng de DNAg. A aquisição e análise dos dados foram realizadas no software 7500 Software v2.3, adotando-se como valor de corte um ciclo limiar (Ct) de 34.

4.7. Análises dos dados e estatísticas

Os valores do coeficiente angular (*slope*), do intercepto em Y, do coeficiente de determinação (R^2) e da eficiência de amplificação (%), da regressão linear entre os valores de limiar de ciclo (Ct) e o número de cópias do alvo, foram fornecidos automaticamente pelo software 7500 v2.3 do equipamento (Applied Biosystems).

O limite de detecção foi definido como a menor concentração da curva padrão que apresentou amplificação em pelo menos 95% das réplicas, adotando-se Ct 34 como ponto de corte. O coeficiente de variação (CV%) foi calculado com base nos valores de Ct obtidos, definido como a razão entre o desvio padrão e a média dos Ct para cada diluição da curva padrão.

A especificidade analítica foi determinada qualitativamente pela ausência de amplificação cruzada.

A quantificação absoluta foi determinada por meio da comparação dos valores de Ct das amostras com o das curvas padrão construídas a partir de diluições seriadas dos plasmídeos. A carga parasitária foi expressa como número de cópias por 100 ng de DNAg, sendo apresentados os valores mínimo, máximo e médio.

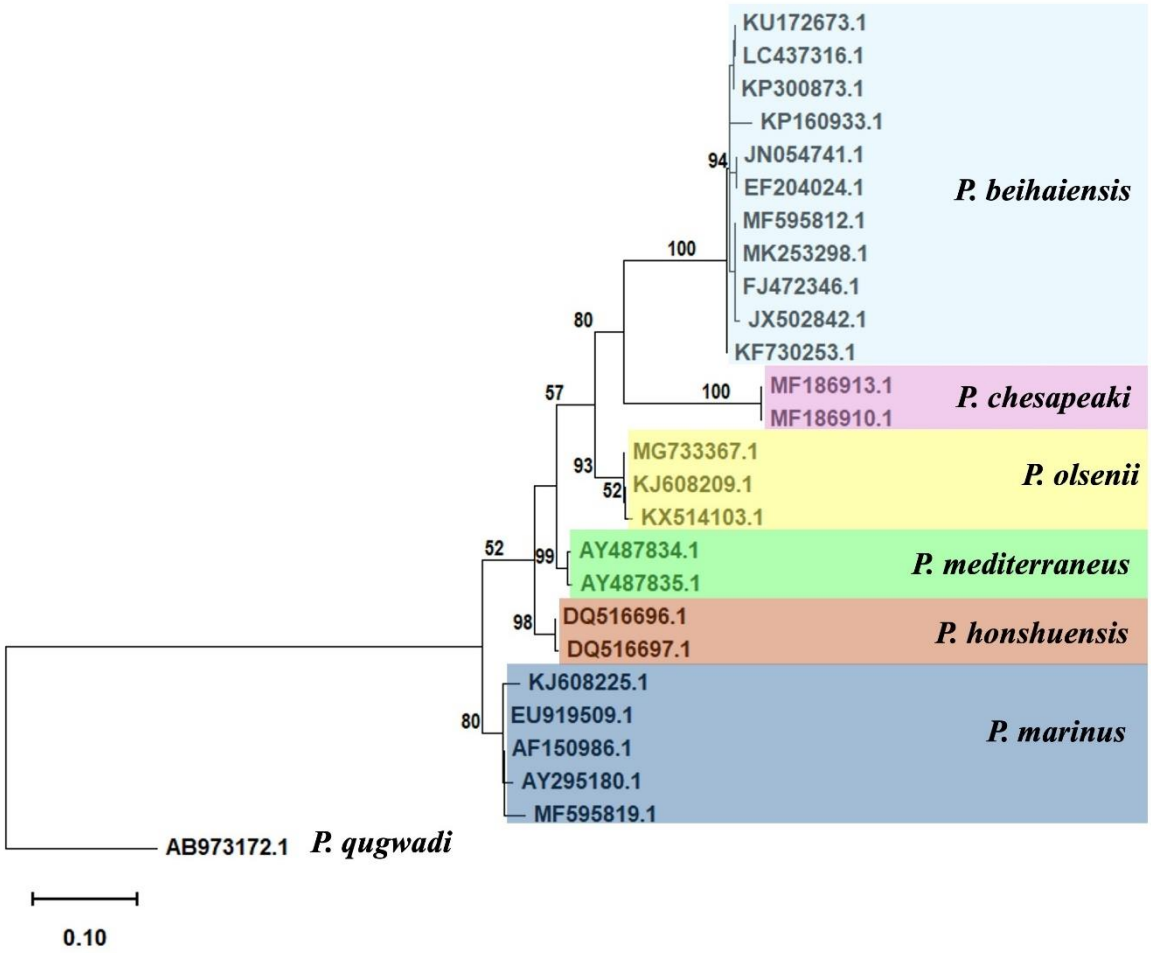
A concordância entre os métodos diagnósticos foi avaliada por meio da comparação dos resultados qualitativos obtidos pelos métodos de referência (RFTM e PCR-RFLP) com os dos ensaios de qPCRs (*P. beihaiensis* e *P. marinus*).

5 RESULTADOS

5.1. Análise filogenética da região ITS2 de *Perkinsus* spp..

A partir do alinhamento das 73 sequências selecionadas, foi construída a árvore filogenética (Figura 5). A análise permitiu a classificação das relações evolutivas, bem como a distinção molecular entre as 7 espécies de *Perkinsus*, fundamental para a seleção das regiões-alvo dos iniciadores.

Figura 7 — Árvore filogenética de máxima verossimilhança inferida a partir da análise do ITS2 de 73 *Perkinsus* spp.



Nota: Os números nos nós dos ramos indicam o suporte de *bootstrap* (apenas valores maiores que 50% são mostrados). Barra: 0,20 substituições de nucleotídeos por sítio.
Fonte: Elaborada pelo autor (2026).

5.2. Desenvolvimento das qPCRs e o efeito inibitório dos tecidos dos hospedeiros

Os pares de iniciadores desenvolvidos foram projetados para amplificar um fragmento na região ITS2 do DNA ribossomal com comprimentos de 160 pb para *P. beihaiensis* e 141 pb para *P. marinus* (Quadro 3, Figura 6). Todas as amostras apresentaram qualidade de DNA adequada (integridade ou amplificação do 16S (dados não mostrados).

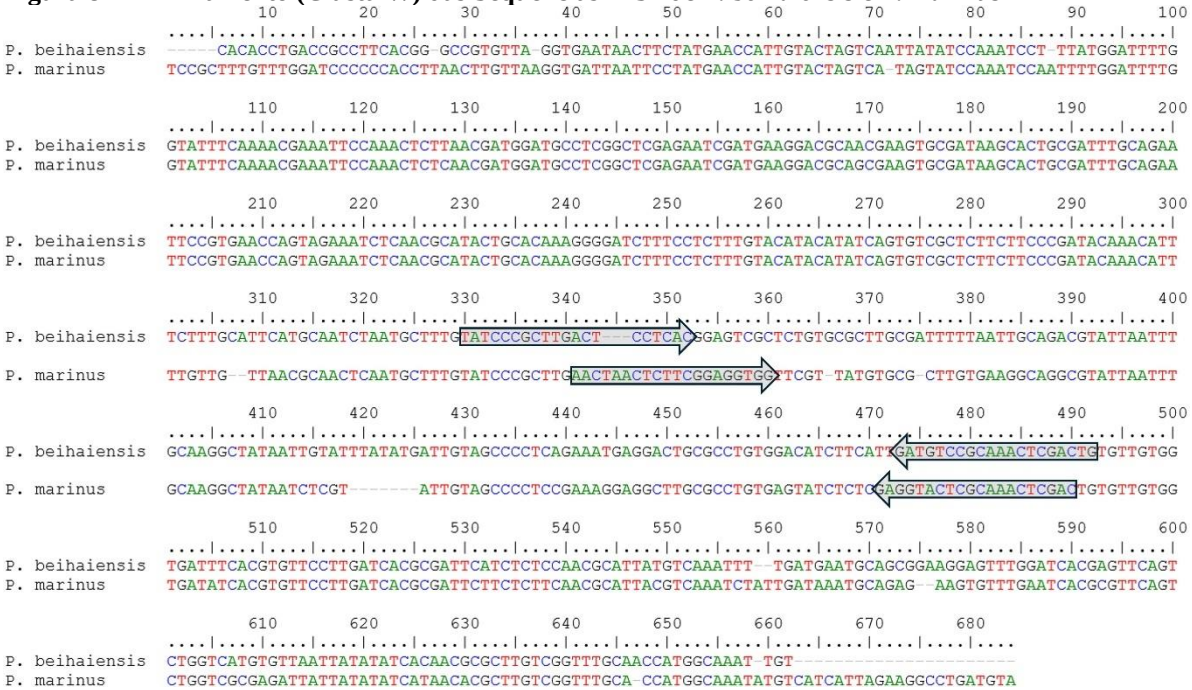
A análise *in sílico*, por meio do Primer-BLAST (NCBI), confirmou a especificidade dos iniciadores para cada espécie, não sendo observada amplificação cruzada com outras sequências depositadas em bancos de dados (Apêndice B).

Quadro 3 — Sequências dos primers desenhados para ensaios de qPCR

Nome	Sequencias (5'-3')	CG (%)	Tm	Self compl.	Self 3' compl.
Pbei-ITS2q-Fw	TATCCCGCTTGACTCCTCAC	55	58.9	3.00	0.00
Pbei-ITS2q-Rv	CAGTCGAGTTTGCGGACATC	55	59.3	4.00	2.00
Pmar-ITS2q-Fw	AACTAACTCTTCGGAGGTGG	50	56.6	4.00	2.00
Pmar-ITS2q-Rv	GTCGAGTTTGCGAGTACCTC	55	58.4	4.00	4.00

Nota: Características obtidas *in silico* no Primer-BLAST (NCBI). Pbei: *P. beihaiensis*; Pmar: *P. marinus*; Fw: sentido direto; Rv: sentido reverso.
Fonte: Elaborado pelo autor (2026).

Figura 8 — Alinhamento (ClustalW) das Sequências ITS2 de *P. beihaiensis* e *P. marinus*

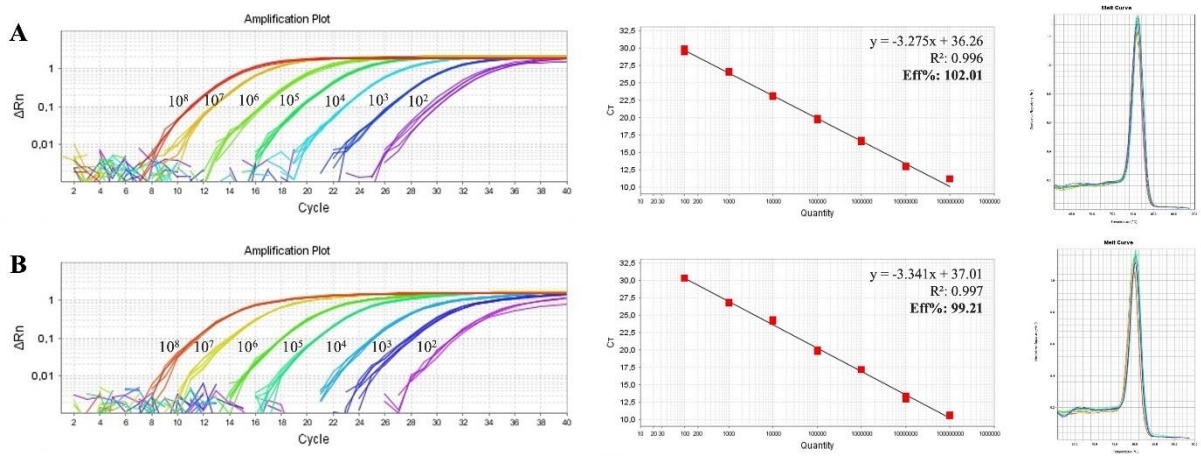


Nota: Sequências ITS2 de *P. beihaiensis* (KP160933) e *P. marinus* (MF595819) (Bioedit v. 5.0.9). As regiões de anelamento dos *primers* estão indicadas pelas setas.
Fonte: Elaborada pelo autor (2026).

A eficiência média para cada par de iniciadores, determinada a partir de curvas padrão obtidas por meio de diluições seriadas dos plasmídeos, realizadas em nove ensaios independentes (n = 9), foi de 98% (± 4,9%, variação de 90 a 107%) para *P. beihaiensis* e 102% (± 5,1%, variação de 93 a 109%) para *P. marinus*.

A avaliação do efeito inibitório dos tecidos dos hospedeiros de diferentes espécies de bivalves, realizada tanto em mistura quanto separadamente, não resultou em alteração nos valores de Ct obtidos na amplificação das diluições da curva padrão (Figura 7).

Figura 9 — Eficiência dos *primers* em reações de qPCR



Nota: As amplificações correspondem à curva padrão de diluições de plasmídeos de *P. marinus* e *P. beihaiensis* (10^8–10^2) com e sem DNA genômico (100 ng) de uma ostra não infectada. **A.** Teste dos iniciadores de *P. marinus*. **B.** Teste dos iniciadores de *P. beihaiensis*. Da esquerda para a direita: gráfico de amplificação, curva padrão e pico de *melting*.
Fonte: Elaborada pelo autor (2026).

5.3. Sensibilidade analítica (Ase)

A faixa de linearidade observada em ambos os ensaios de qPCR variou de 10^8 a 10^2 cópias/µL. Os valores de Ct apresentaram forte correlação com as diluições da curva padrão (R^2 = 0,99 em ambos os qPCRs). Todos os poços em triplicata, abrangendo as sete diluições nas nove corridas de qPCR (n = 27), apresentaram amplificação, indicando que o LoD é de 10^2 cópias/µL. O coeficiente de variação obtido para cada diluição e o LoD são apresentados na Tabela 1. Para *P. beihaiensis*, a menor diluição do plasmídeo com pelo menos 95% de resultados positivos foi de 50 cópias, enquanto, para *P. marinus*, foi de 10 cópias, ambas com um Ct médio de 34. Assim, o Ct de corte foi de 34 e foi utilizado nas análises subsequentes.

Tabela 1 — Sensibilidade analítica (ASe), repetibilidade dos ensaios de qPCR determinadas pelo coeficiente de variação (CV, %) dos valores de Ct para as diluições da curva padrão (10^8 a 10^2 cópias) e Limite de Detecção (LoD)

	Análises de repetibilidade							**Análises de LoD**			
	P. beihaiensis										
Diluições de plasmídeos	**10^8**	**10^7**	**10^6**	**10^5**	**10^4**	**10^3**	**10^2**	**50**	**10^1**	**5**	**10^0**
Resultados positivos (%)	100	100	100	100	100	100	100	**100**	79	76	0
Ct Médio	12.2	14.8	19.2	22.5	25.7	29.0	32.4	**34.0**	35.7	36.2	-
CV (%)	7.4	8.3	5.0	5.8	2.6	2.4	2.9	2.4	1.8	2.4	
N	27	27	27	27	27	27	27	24	24	21	9
	P. marinus										
Diluições de plasmídeos	**10^8**	**10^7**	**10^6**	**10^5**	**10^4**	**10^3**	**10^2**	**50**	**10^1**	**5**	**10^0**
Resultados positivos (%)	100	100	100	100	100	100	100	Nd	**100**	57	44
Ct Médio	10.9	13.2	16.6	20.7	23.2	26.8	30.1		**34.1**	34.7	36
CV (%)	5.6	1.7	0.9	3.0	0.6	0.7	1.4		3.4	1.8	-
N	27	27	27	27	27	27	27		15	23	9

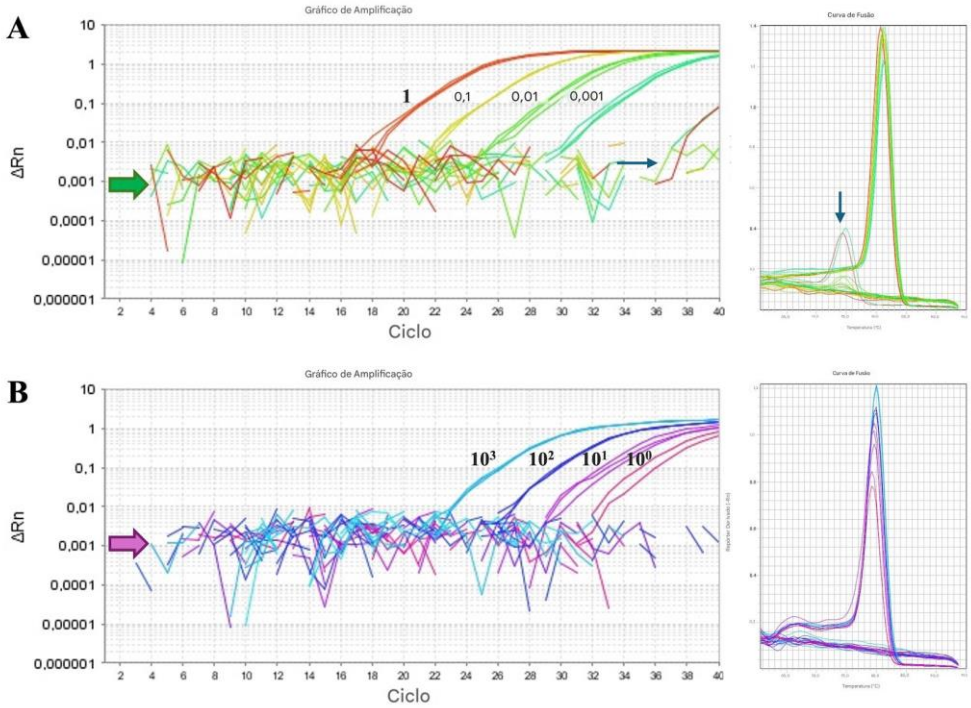
O **LoD** está destacado em negrito. **Nd**: não realizado. **N**: número de réplicas (poços).
Fonte: Elaborada pelo autor (2026).

5.4. Especificidade analítica (ASp)

Além da análise *in silico*, a reatividade cruzada foi testada experimentalmente com DNAg das espécies não-alvo mais próximas (*P. chesapeaki* e *P. olsenii*) e do parasita protozoário intracelular *B. ostreae*. Nenhuma das amostras de DNAg produziu amplificações em nenhuma das concentrações testadas (1, 0,1, 0,01 e 0,001 ng) nos ensaios de qPCRs de *P. beihaiensis* ou *P. marinus* (Figura 8).

Ambos os ensaios de qPCR confirmaram a especificidade, uma vez que amplificaram corretamente seus respectivos alvos. Para a qPCR de *P. marinus*, todas as diluições (1, 0,1, 0,01 e 0,001 ng) do alvo foram detectadas e quantificadas, com valores de Ct de 21, 25, 28 e 33, correspondentes a 40.999, 2.874, 225 e 12 cópias, respectivamente. Para a qPCR de *P. beihaiensis*, duas (10^3 e 10^2) das três diluições do alvo resultaram em valores de Ct (28 e 32) abaixo do limite de corte estabelecido (34) e, portanto, foram consideradas válidas; correspondendo a 4.160 e 267 cópias do parasita, respectivamente (Figura 8).

Figura 10 — Teste de especificidade e sensibilidade

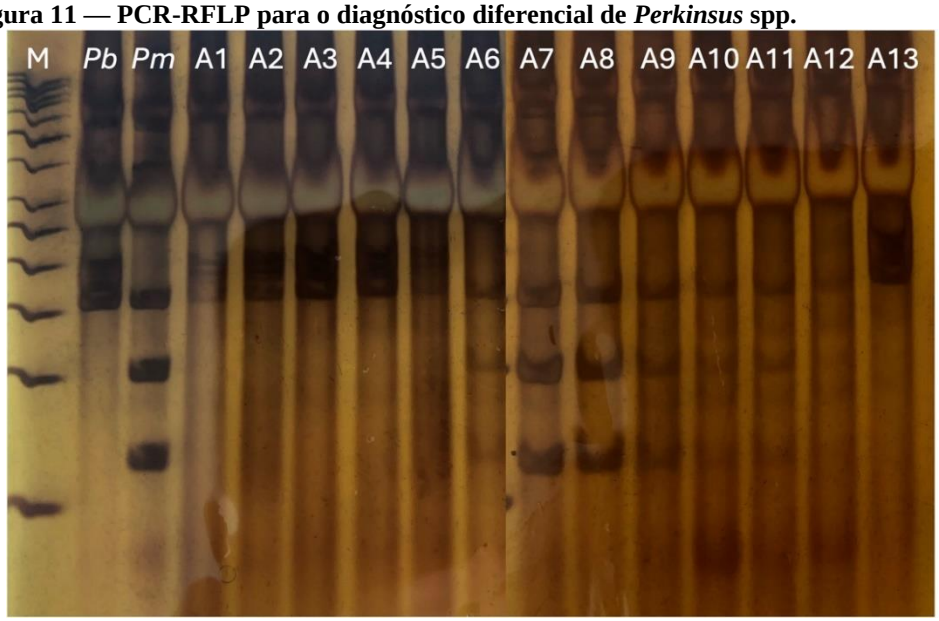


Nota: As amplificações correspondem a diluições do DNA genômico de *P. marinus* (**A**) ou a cópias de *P. beihaiensis* (**B**). As setas grandes indicam o ruído de fundo decorrente da ausência de amplificação do DNA genômico de outras espécies de *Perkinsus*. As setas finas indicam dímeros.
Fonte: Elaborada pelo autor (2026).

5.5. Validação das duas qPCRs em amostras de bivalves

Os dois ensaios de qPCR desenvolvidos foram aplicados a 100 espécimes de bivalves, incluindo amostras não infectadas e infectadas por *Perkinsus* spp. em diferentes condições (Apêndice C e Tabela 2). Os padrões de restrição obtidos por PCR-RFLP estão apresentados na Figura 11.

Figura 11 — PCR-RFLP para o diagnóstico diferencial de *Perkinsus* spp.



Nota: Padrões de fragmentação dos produtos de PCR da região ITS do rDNA dos controles, *P. marinus* (**Pm**) e *P. beihaiensis* (**Pb**) e das ostras infectadas (**A**) após digestão com a endonuclease HinfI. **M**: marcador de tamanho molecular de 100 pb. As amostras A1–5 e 13 apresentaram o padrão de fragmentação de *P. beihaiensis*, enquanto as demais apresentaram o padrão de fragmentação de *P. marinus*. Coloração nitrato de prata.
Fonte: Elaborada pelo autor (2026).

Entre as amostras negativas para PCR e RFTM, apenas 1 foi detectada como infectada pelos ensaios de qPCR, o que corresponde a 97,5% de concordância. Essa amostra apresentava baixa carga parasitária, com apenas 85 cópias de *P. beihaiensis*. Entre as 53 amostras positivas para RFTM e PCR-RFLP, 46 com infecção única, 6 com infecção dupla e 1 com infecção tripla, foram confirmadas como portadoras das espécies de parasitas previamente identificadas (*P. beihaiensis* e/ou *P. marinus*) (Apêndice C, Tabela 2).

No entanto, em 3 amostras previamente identificadas com infecção única por *P. marinus* e em 1 amostra com infecção única por *P. olsenii*, os parasitas *P. beihaiensis* (62, 94 e 134 cópias) e *P. marinus* (290 cópias) também foram detectados (Tabela 2).

Entre as 3 únicas amostras positivas para RFTM, mas negativas para PCR, 1 apresentou infecção por *P. beihaiensis,* com 749 cópias detectadas. Finalmente, entre as 4 amostras positivas para RFTM e PCR, 3 estavam infectadas por *P. beihaiensis* e 1 por *P. marinus*.

A variação de cópias por 100 ng de DNAg em espécimes infectados por *P. beihaiensis* foi de 58 (Ct 33,9) a 55.846 (Ct 22,9), com média de 9.928 cópias, enquanto, em espécimes infectados por *P. marinus*, foi de 139 (Ct 33,5) a 5.577.813 (Ct 17,7), com média de 246.507 cópias.

Tabela 2 — Concordância (n, %) entre as técnicas de diagnóstico para *Perkinsus* spp.

RFTM	PCR	N	RFLP	Concordância n (%)	*Perkinsus* spp. n (cópias*)
neg	neg	40	Nd (Bivalves não-infectados)	39 (97.5)	*P. beihaiensis* – 1 (85)
pos	neg	3	Nd (PCR negativa)	2 (66.7)	*P. beihaiensis* – 1 (749)
pos	pos	4	Nd	4 (100)	*P. beihaiensis* – 3 (236; 267; 1,220) *P. marinus* – 1 (43,189)
pos	pos	19	Infecção única: ***P. beihaiensis***	19 (100)	-
pos	pos	21	Infecção única: ***P. marinus***	21 (100)	*P. beihaiensis* – 3 (62; 94; 134)
pos	pos	2	Infecção única: ***P. olsenii***		*P. marinus* – 1 (290)
pos	pos	4	Infecção única: ***P. chesapeaki***		-
pos	pos	4	Co-infecção: ***P. marinus*/ *P. beihaiensis***	4 (100)	-
pos	pos	2	Co-infecção: ***P. marinus*/ *P. olsenii***	2 (100)	-
pos	pos	1	Co-infecção: ***P. marinus*/ *P. beihaiensis* / *P. olsenii***	1 (100)	-

Nota: A concordância é determinada quando os resultados de **RFTM** ou **PCR** (ITS) foram negativos (**neg**) ou positivos (**pos**) ou quando espécies de *Perkinsus* identificadas (**RFLP**) coincidiram com os resultados dos ensaios de qPCR. **N**: número de amostras por categoria. Espécies de *Perkinsus* detectadas por ensaios de qPCR quando a concordância não foi de 100% ou quando espécies adicionais de *Perkinsus* foram detectadas. *Número de cópias por 100 ng de DNA genômico. **Nd**: não realizado.
Fonte: Elaborada pelo autor (2026).

6 DISCUSSÃO

A PCR em tempo real facilita a detecção e a quantificação precisas de sequências-alvo de parasitas, melhorando, assim, a compreensão do processo infeccioso, seu impacto nos hospedeiros e a dinâmica hospedeiro-parasita. De fato, a qPCR consolidou-se como um método de diagnóstico eficiente para a detecção e o monitoramento de parasitas relevantes que afetam bivalves, especialmente em estudos que envolvem a ocorrência de mais de uma espécie de parasita no mesmo hospedeiro ou local (Batchelor *et al.*, 2023; Canier *et al.*, 2020; Itoïz *et al.*, 2024; Marquis *et al.*, 2020; Moloney *et al.*, 2023; Piesz *et al.*, 2022; Travis *et al.*, 2021; Xie *et al.*, 2013). Atualmente, devido a fatores como o intenso transporte marítimo, o aquecimento global, as mudanças climáticas, entre outros, a dispersão e o estabelecimento de parasitas em novas áreas e hospedeiros são preocupações significativas (Costello *et al.*, 2021). Assim, o uso de ferramentas de diagnóstico específicas, como a qPCR, é essencial para a detecção de parasitas emergentes e de coinfecções.

Os protozoários do gênero *Perkinsus* figuram entre os parasitas de bivalves mais relevantes e mais extensivamente estudados. Apresentam distribuição geográfica abrangente nas Américas (Da Silva *et al.*, 2024; Dungan; Reece, 2020) e encontram-se em processo de expansão na Ásia (Kim *et al.*, 2024b). *P. marinus* demonstra potencial para infectar novos hospedeiros mesmo fora de sua área geográfica nativa (García-Ulloa *et al.*, 2023; Yisrael *et al.*, 2024).

Métodos moleculares já foram desenvolvidos para diagnosticar *P. marinus* (Tabela 1). Neste sentido, Audemard *et al*. (2004) projetaram um par de iniciadores específicos para *P. marinus* e utilizaram em um ensaio de qPCR; no entanto, o produto amplificado tem tamanho relativamente grande (509 pb), não sendo ideal para ensaios de qPCR, que normalmente requerem um produto de tamanho menor, entre 80 e 150 pb. As qPCRs baseadas em sondas de hidrólise foram desenvolvidas para *P. marinus* (Faveri; Smolowitz; Roberts, 2009; Gauthier; Miller; Wilbur, 2006). No entanto, na época, a espécie *P. beihaiensis* ainda não havia sido descrita (Moss *et al.*, 2008), portanto, os *primers* não consideraram essa nova espécie. O alinhamento desses *primers* às sequências ITS2 das sete espécies de *Perkinsus* mostrou que tanto o *primer forward* quanto o *reverse*, ou a sonda desenhada, hibridizam com mais de uma espécie de *Perkinsus* (ver detalhes na Quadro 1), o que pode causar dificuldades no diagnóstico de casos de coinfecção, embora ainda precise ser testado.

A qPCR baseada em sonda de hidrólise para *P. marinus*, desenvolvida mais recentemente, buscou fornecer um gene-alvo alternativo, uma proteína hipotética do parasita (Kim *et al*., 2024a). No entanto, a WOAH recomenda, para distinguir entre as espécies, o uso de sequências amplamente disponíveis no GenBank, como o cluster do gene rRNA, incluindo as regiões do espaçador transcrito interno (ITS). Como a análise *in silico* para testar a especificidade do *primer* é impossível para a proteína hipotética desconhecida (Kim *et al*., 2024a) devido à falta de genomas disponíveis para algumas espécies de *Perkinsus*, como *P. honshuensis*, *P. mediterraneus* e *P. beihaiensis*, o referido ensaio da qPCR pode não oferecer especificidade e confiabilidade suficientes para estudos da infecção por *Perkinsus* spp. em locais/hospedeiros onde mais de uma espécie ocorre simultaneamente, pelo menos não atualmente, sem uma descrição completa da proteína-alvo em todas as espécies de *Perkinsus*.

É importante notar que *P. beihaiensis* já está disseminada na Ásia e em novos hospedeiros (Itoh *et al.*, 2019; Ye *et al.*, 2022; Zhai *et al.*, 2024), onde outras espécies de *Perkinsus* são endêmicas, como *P. olsenii* e *P. honshuensis* (Choi; Park, 2010; Dungan; Reece, 2006; Kang *et al.*, 2016). No Brasil, *P. marinus*, *P. beihaiensis*, *P. chesapeaki* e *P. olsenii* ocorrem em hospedeiros da mesma área, isoladamente ou em coinfecção (ver a revisão de Da Silva *et al*., 2024).

O novo ensaio de qPCR específico para *P. marinus*, desenvolvido neste trabalho, é capaz de discriminar essa espécie de todas as demais do gênero *Perkinsus*. O ensaio foi projetado com base em um alinhamento de todas as sete espécies de *Perkinsus* (73 sequências) e testado *in silico* contra diversos táxons, o que demonstra sua especificidade. Os resultados experimentais foram obtidos com DNAg de *P. chesapeaki*, *P. olsenii*, *P. beihaiensis* e *B. ostreae*, corroborando os resultados *in silico*. O ensaio foi concebido para permitir o desenvolvimento futuro de um ensaio multiplex baseado em sondas de hidrólise, ou seja, a sequência de nucleotídeos flanqueada pelos iniciadores possui tamanho e variabilidade suficientes para o desenvolvimento de sondas capazes de discriminar a maioria das espécies de *Perkinsus*.

Um ensaio TaqMan certamente aumentará a robustez do diagnóstico aqui desenvolvido, principalmente por possibilitar a detecção simultânea; entretanto, nem todos os países/governos dispõem de recursos para implementá-lo devido ao seu alto custo. Portanto, a qPCR baseada em SybrGreen (*singlex*), desenvolvida neste trabalho, pode ser aplicada individualmente para diferentes finalidades. O limite de detecção dos iniciadores de *P. marinus* projetados neste

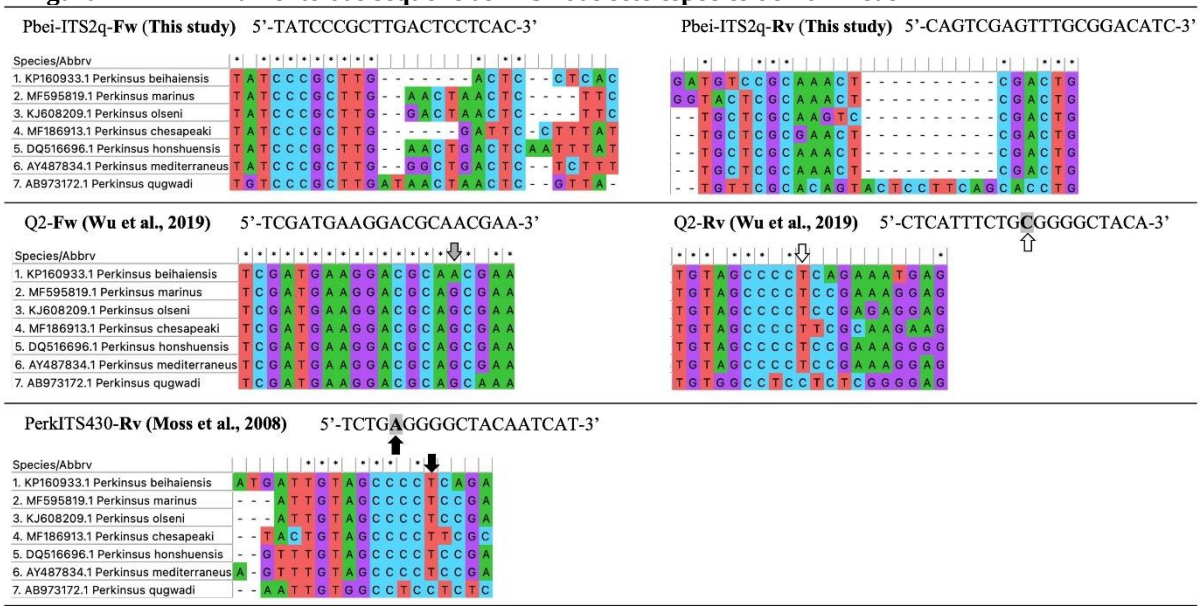
estudo foi definido em 10 cópias, corroborado pela análise de qPCR de diluições de DNAg do isolado de *P. marinus*, na qual a menor diluição (0,001 ng) foi amplificada com Ct de 33, o que corresponde a 12 cópias.

Em relação a *P. beihaiensis*, um ensaio de qPCR foi desenvolvido por Moss *et al*. (2008) quando a espécie foi descrita. No entanto, os autores desenvolveram apenas o *reverse* (PerkITS-430R), específico para a nova espécie, e utilizaram o *forward* gênero-específico, descrito por Casas *et al*. (2002). Consequentemente, ele não distingue entre *P. marinus* e *P. olsenii* e pode não diferenciar entre *P. mediterraneus* e *P. honshuensis* (Figura 9). Além disso, o produto amplificado de 449 pb, é considerado muito grande para utilização em qPCR. Esse par de iniciadores foi utilizado para detectar *P. beihaiensis* em mexilhões (*Mytilus galloprovincialis*) do Japão e em ostras (*C. madrasensis*) da Índia (Itoh *et al.*, 2019; Sanil *et al.*, 2012). No entanto, a maioria dos estudos que visam confirmar a infecção por *P. beihaiensis* utilizou iniciadores específicos para o gênero *Perkinsus* (Casas *et al*., 2002) seguidos de sequenciamento (Cui *et al.*, 2018; Gao *et al.*, 2024; Sabry *et al.*, 2009; Zhai *et al.*, 2024).

Mais recentemente, Wu *et al*. (2019b) desenvolveram um novo par de iniciadores (Q2-F/Q2-R) para ensaio de qPCR, com o *primer forward* (Q2-F) localizado antes do *primer forward* desenvolvido neste estudo e em uma região altamente conservada, diferindo das outras espécies de *Perkinsus* por apenas 1 nucleotídeo (Figura 9). O *reverse* (Q2-R) está localizado próximo ao *reverse* PerkITS430-R, com o qual compartilha 14 nucleotídeos e, portanto, apresenta a mesma ausência de especificidade comentada anteriormente. De fato, o *reverse* difere em apenas 2 nucleotídeos de *P. marinus*, *P. olsenii* e *P. mediterraneus*, em 3 de *P. honshuensis* e em 5 de *P. chesapeaki* (Figura 9).

Ye *et al*. (2022) estudaram a diversidade e distribuição de *Perkinsus* spp. ao longo da costa da China, utilizando PCR convencional com os iniciadores específicos do gênero (Casas *et al.*, 2002), seguida de sequenciamento e da aplicação utilizando os iniciadores Q2-F/Q2-R apenas nas amostras positivas a fim de confirmar a infecção por *P. beihaiensis*. Contudo, Q2-F/Q2-R apresenta fragilidades, como o grande tamanho do produto amplificado (291 pb) e a ausência de testes de especificidade em outras espécies de *Perkinsus*. Além disso, um pequeno erro na sequência do *primer* Q2-R foi identificado durante o alinhamento: o décimo primeiro nucleotídeo (C) deveria ser A para se alinhar ao T na sequência do DNAg de *P. beihaiensis* (Tabela 1, Figura 9).

Figura 12 — Alinhamento das sequências ITS2 das sete espécies de *Perkinsus*



Nota: A figura mostra a região de hibridização do *primer* de *P. beihaiensis*. Os nomes dos *primers*, as referências e a sequência são exibidas no topo de cada alinhamento. As setas brancas indicam um erro no tipo de nucleotídeo (**C**). As setas pretas indicam o nucleotídeo correto (**A**). A seta cinza indica o único nucleotídeo que difere entre as cinco espécies de *Perkinsus*.
Fonte: Elaborada pelo autor (2026).

O ensaio de qPCR específico para *P. beihaiensis* foi testado *in silico* contra múltiplos táxons e experimentalmente contra DNAg de *P. chesapeaki*, *P. olsenii*, *P. marinus* e *B. ostreae*, com resultados negativos, o que demonstra sua especificidade. Por outro lado, o limite de detecção dos iniciadores para *P. beihaiensis* foi definido em 50 cópias, e os resultados da análise de qPCR na menor diluição (100 cópias) corroboram esse valor (Ct = 32; 267 cópias).

Os dois ensaios da qPCR foram validados com amostras de diferentes espécies de bivalves e com cargas parasitárias variáveis, desde muito baixas (nível 1 da RFTM) até infecções avançadas (nível 4 da RFTM). Até o momento, apenas um estudo aplicou um ensaio de qPCR para avaliar *Perkinsus* em um bivalve brasileiro (Rocha *et al.*, 2023). Os autores utilizaram os iniciadores de Audemard *et al*. (2004), que detectaram *P. marinus* em ostras (*Crassostrea* sp.) da lagoa de Guaraíras, onde também foi detectado *P. beihaiensis* (GenBank: OR754311) (Da Silva *et al.*, 2024).

Ambos os ensaios de qPCR desenvolvidos neste estudo apresentaram alta especificidade e sensibilidade, confirmando 39 dos 40 casos negativos pelos métodos RFTM e PCR. A ostra *C. gasar*, proveniente do estado do Pará, apresentou apenas 85 cópias de *P. beihaiensis*, evidenciando a capacidade do ensaio de detectar níveis muito baixos de infecção. Todos os

casos positivos de infecção por *P. marinus* e *P. beihaiensis* foram confirmados. Nenhum produto inespecífico foi amplificado quando os ensaios de qPCR foram aplicados a uma amostra infectada por uma espécie não-alvo de *Perkinsus*, independentemente de se tratar de infecção única (*P. chesapeaki*), dupla (*P. marinus* e *P. olsenii*) ou tripla (*P. marinus*, *P. beihaiensis* e *P. olsenii*).

Os três casos de ostras infectadas apenas por *P. marinus* (da Paraíba) e um caso de ostra infectada apenas por *P. olsenii* (de Sergipe), nos quais os ensaios de qPCR detectaram *P. beihaiensis* (<134 cópias) e *P. marinus* (290 cópias) (Tabela 2), demonstram a alta sensibilidade dos qPCRs e visto que essas três espécies de *Perkinsus* ocorrem nesses locais (Da Silva *et al*., 2024), também a ausência de amplificação inespecífica.

A técnica RFLP não detectou *Perkinsus* spp. Devido à baixa quantidade de DNAg dos parasitas no tecido dos hospedeiros, detectável apenas nas qPCRs. De fato, a abundância de *P. marinus* nessas amostras foi muito alta (>100.000 cópias), o que permitiu o sucesso do RFLP e a detecção exclusiva de *P. marinus* (Apêndice C). Ríos *et al*. (2020) também relataram que a qPCR foi mais sensível do que o PCR no diagnóstico de *P. olsenii*.

7 CONCLUSÃO

Em conclusão, ambos os ensaios de qPCR desenvolvidos neste estudo demonstraram alta sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade na detecção e na quantificação de *P. beihaiensis* e *P. marinus*. Os resultados indicam sua adequação para o uso em estudos de monitoramento da prevalência e da intensidade da infecção, incluindo cenários de infecção única ou múltipla, inicial ou avançada. Isso elucidará como cada espécie de parasita se prolifera em seu hospedeiro e se estabelece, contribuindo para a compreensão da relação hospedeiro-parasita (suscetibilidade) e do impacto real da perkinsiose em populações de bivalves em todo o mundo.

REFERÊNCIAS

ABSHER, T. M. **Populações naturais de ostras do gênero *Crassostrea* do litoral do Paraná: desenvolvimento larval, recrutamento e crescimento.** 1989. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 1989.

AIDAR, M.; LINE, S. R. P. A simple and cost-effective protocol for DNA isolation from buccal epithelial cells. **Brazilian Dental Journal**, v. 18, n. 2, p. 148–152, 2007. Disponível em: https://doi.org/10.1590/S0103-64402007000200012. Acesso em: 12 dez. 2025.

AUDEMARD, C.; REECE, K. S.; BURRESON, E. M. Real-Time PCR for Detection and Quantification of the Protistan Parasite *Perkinsus marinus* in Environmental Waters. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 11, p. 6611–6618, 2004. Disponível em: https://doi.org/10.1128/AEM.70.11.6611-6618.2004. Acesso em: 18 fev. 2025.

AZEVEDO, C. Fine Structure of *Perkinsus atlanticus* n. sp. (Apicomplexa, Perkinsea) Parasite of the Clam *Ruditapes decussatus* from Portugal. **The Journal of Parasitology**, v. 75, n. 4, p. 627, 1989. Disponível em: https://doi.org/10.2307/3282915. Acesso em: 23 nov. 2025.

BATCHELOR, S. *et al.* Assessment of Infection Prevalence and Intensity of Disease-Causing Parasitic Protozoans *Perkinsus marinus* and *Haplosporidium nelsoni* in Georgia Oysters. **Microorganisms**, v. 11, n. 7, p. 1808, 2023. Disponível em: https://doi.org/10.3390/microorganisms11071808. Acesso em: 21 jan. 2026.

BOEHS, G.; LUZ, M. dos S. A.; DE ANDRADE, V. R. D. Molecular identification of cryptic species of oysters (genus *Crassostrea* Sacco, 1897) in the northeast Atlantic coast of Brazil. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 45, n. 2, 2019. Disponível em: https://doi.org/10.20950/1678-2305.2019.45.2.446. Acesso em: 07 nov. 2025.

BOGEMA, D. R. *et al.* Draft genomes of *Perkinsus olseni* and *Perkinsus chesapeaki* reveal polyploidy and regional differences in heterozygosity. **Genomics**, v. 113, n. 1, p. 677–688, 2021. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2020.09.064. Acesso em: 13 jan. 2026.

BOWER, S. M.; BLACKBOURN, J.; MEYER, G. R. Distribution, prevalence, and pathogenicity of the protozoan *Perkinsus qugwadi* in Japanese scallops, *Patinopecten yessoensis*, cultured in British Columbia, Canada. **Canadian Journal of Zoology**, v. 76, n. 5, p. 954–959, 1998. Disponível em: <https://doi.org/10.1139/z98-009>. Acesso em: 03 dez. 2025.

BRASIL. Ministério da Pesca e Aquicultura. **Relatório Anual de Produção – RAP**. Brasília: *[s. n.]*, 2024. Disponível em: https://www.gov.br/mpa/pt-br/Central_Conteudos/arquivos-docs-ppts/boletim-da-aquicultura_24_web.pdf. Acesso em: 5 mar. 2025.

BRASIL. Ministério da Pesca e Aquicultura. **Boletim da Aquicultura em Águas da União – 2024**. Brasília, DF: *[s. n.]*, 2025. Disponível em: https://www.gov.br/mpa/pt-br/assuntos/aquicultura/aquicultura-em-aguas-da-uniao/boletim-da-aquicultura_digitalv2-compactado.pdf. Acesso em: 15 fev. 2026.

BUSHEK, D.; FORD, S.; CHINTALA, M. Comparison of in vitro-cultured and wild-type Perkinsus marinus. III. Fecal elimination and its role in transmission. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 51, p. 217–225, 2002. Disponível em: https://doi.org/10.3354/dao051217. Acesso em: 29 nov. 2025.

CÁCERES-MARTÍNEZ, J. *et al.* Perkinsus marinus in pleasure oyster *Crassostrea corteziensis* from Nayarit, Pacific coast of México. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 99, n. 1, p. 66–73, 2008. Disponível em: https://doi.org/10.1016/J.JIP.2008.03.005. Acesso em: 2 dez. 2025.

CANIER, L. *et al.* A new multiplex real-time PCR assay to improve the diagnosis of shellfish regulated parasites of the genus *Marteilia* and *Bonamia*. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 183, p. 105126, 2020. Disponível em: https://doi.org/10.1016/J.PREVETMED.2020.105126. Acesso em: 18 nov. 2025.

CARELLA, F. *et al.* The endoparasite *Perkinsus olseni* affecting the Mediterranean mussels (*Mytilus galloprovincialis*) in the Italian and Spanish waters: A new possible threat for mussel aquaculture and wild animal population. **Frontiers in Marine Science**, v. 10, 2023. Disponível em: https://doi.org/10.3389/FMARS.2023.1116837/FULL. Acesso em: 18 fev. 2025.

CASAS, S. *et al. Perkinsus mediterraneus* n. sp., a protistan parasite of the European flat oyster *Ostrea edulis* from the Balearic Islands, Mediterranean Sea. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 58, p. 231–244, 2004. Disponível em: < https://doi.org/10.3354/dao>. Acesso em: 04 dez. 2025.

CASAS, S. M. *et al.* Continuous in vitro culture of the carpet shell clam *Tapes decussatus* protozoan parasite Perkinsus atlanticus. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 52, n. 3, p. 217–231, 2002. Disponível em: https://doi.org/10.3354/DAO052217. Acesso em: 27 fev. 2025.

CASAS, S.; VILLALBA, A.; REECE, K. Study of perkinsosis in the carpet shell clam *Tapes decussatus* in Galicia (NW Spain). I. Identification of the aetiological agent and in vitro modulation of zoosporulation by temperature and salinity. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 50, p. 51–65, 2002. Disponível em: https://doi.org/10.3354/dao050051. Acesso em: 27 nov. 2025.

CHOI, K. S. *et al.* The energetic cost of *Perkinsus marinus* parasitism in oysters: quantification of the thioglycollate method. **Journal of Shellfish Research**, v. 8, n. 1, p. 125–131, 1989. Disponível em: http://hdl.handle.net/1969.3/19281. Acesso em: 18 nov. 2025.

CHOI, K.-S.; PARK, K.-I. Review on the protozoan parasite *Perkinsus olseni* (Lester and Davis 1981) infection in Asian waters. *In*: ISHIMATSU, A.; MACHIDA, M. (orgs.). **Coastal Environmental and Ecosystem Issues of the East China Sea**. Tokio, Japão: Terrapub, 2010. p. 269–281. *E-book*. Disponível em: http://hdl.handle.net/10069/23516. Acesso em: 18 nov. 2025.

CHU, F.-L. E.; GREENE, K. H. Effect of temperature and salinity on in vitro culture of the oyster pathogen, *Perkinsus marinus* (Apicomplexa: Perkinsea). **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 53, n. 2, p. 260–268, 1989. Disponível em: https://doi.org/10.1016/0022-2011(89)90016-5. Acesso em: 13 jan. 2026.

COSS, C. A.; ROBLEDO, J. A. F.; VASTA, G. R. Fine structure of clonally propagated in vitro life stages of a *Perkinsus* sp. isolated from the baltic clam macoma balthica. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 48, n. 1, p. 38–51, 2001. Disponível em: https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2001.tb00414.x. Acesso em: 12 nov. 2025.

COSTELLO, K. E. *et al.* The Importance of Marine Bivalves in Invasive Host–Parasite Introductions. **Frontiers in Marine Science**, v. 8, 2021. Disponível em: https://doi.org/10.3389/FMARS.2021.609248/FULL. Acesso em: 18 fev. 2025.

CREMONTE, F.; BALSEIRO, P.; FIGUERAS, A. Occurrence of *Perkinsus olseni* (Protozoa: Apicomplexa) and other parasites in the venerid commercial clam *Pitar rostrata* from Uruguay, southwestern Atlantic coast. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 64, p. 85–90, 2005. Disponível em: https://doi.org/10.3354/dao064085. Acesso em: 19 jan. 2026.

CUI, Y. Y. *et al.* Seasonal occurrence of *Perkinsus* spp. and tissue distribution of *P. olseni* in clam (*Soletellina acuta*) from coastal waters of Wuchuan County, southern China. **Aquaculture**, v. 492, p. 300–305, 2018. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.04.030. Acesso em: 1 mar. 2026.

DA SILVA, P. M. *et al.* First report of the protozoan parasite *Perkinsus marinus* in South America, infecting mangrove oysters *Crassostrea rhizophorae* from the Paraíba River (NE, Brazil). **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 113, n. 1, p. 96–103, 2013. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.jip.2013.02.002. Acesso em: 21 jan. 2026.

DA SILVA, P. M. *et al. Perkinsus* spp. Occurrence in South America: A review. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 204, p. 108108, 2024. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.jip.2024.108108. Acesso em: 18 fev. 2025.

_____. Two *Perkinsus* spp. infect Crassostrea gasar oysters from cultured and wild populations of the Rio São Francisco estuary, Sergipe, northeastern Brazil. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 119, p. 62–71, 2014. Disponível em: https://doi.org/10.1016/J.JIP.2014.04.005. Acesso em: 18 nov. 2025.

DE SOUZA, R. V.; SILVA, B. C. da; NOVAES, A. L. A aquicultura de Santa Catarina em números. **Documentos**, *[S. l.]*, n. 354, 2022. Disponível em: https://publicacoes.epagri.sc.gov.br/DOC/article/view/1532. Acesso em: 18 nov. 2025.

DUNGAN, C. F.; BUSHEK, D. Development and applications of Ray's fluid thioglycollate media for detection and manipulation of *Perkinsus* spp. pathogens of marine molluscs. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 131, p. 68–82, 2015. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.jip.2015.05.004. Acesso em: 16 mar. 2026.

DUNGAN, C. F.; REECE, K. S. In Vitro Propagation of Two *Perkinsus* spp. Parasites from Japanese Manila Clams *Venerupis philippinarum* and Description of *Perkinsus honshuensis* n. sp. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 53, n. 5, p. 316–326, 2006. Disponível em: https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2006.00120.x. Acesso em: 1 mar. 2026.

DUNGAN, C. F.; REECE, K. S. 5.2.1 *Perkinsus* spp. infections of marine molluscs. *In*: AFS-FHS (American Fisheries Society-Fish Health Section). **FHS Blue Book: Suggested**

procedures for the detection and identification of certain finfish and shellfish pathogens. Bethesda, Maryland, 2020. p. 1–24. Disponível em: https://www.researchgate.net/profile/Christopher-Dungan/publication/343190923_Chapter_521_Perkinsus_spp_Infections_of_Marine_Molluscs_2020/links/6064a4e245851534986e30ec/Chapter-521-Perkinsus-spp-Infections-of-Marine-Molluscs-2020.pdf. Acesso em: 18 mar. 2026.

DUNGAN, C. *et al.* Two epizootic diseases in Chesapeake Bay commercial clams, *Mya arenaria* and *Tagelus plebeius*. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 50, p. 67–78, 2002. Disponível em: https://doi.org/10.3354/dao. Acesso em: 07 jan. 2026.

EPAGRI – Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina. **Síntese Anual da Agricultura de Santa Catarina 2024**. Florianópolis, SC, Brasil: *[s. n.]*, 2025. Disponível em: https://docweb.epagri.sc.gov.br/website_cepa/publicacoes/Sintese_2024.pdf?utm_source=chatgpt.com. Acesso em: 18 nov. 2025.

ESCALANTE, A. A.; AYALA, F. J. Evolutionary origin of Plasmodium and other Apicomplexa based on rRNA genes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 92, n. 13, p. 5793–5797, 1995. Disponível em: https://doi.org/10.1073/pnas.92.13.5793. Acesso em: 15 dez. 2025.

ESCOBEDO-FREGOSO, C.; RAMIREZ-SALCEDO, J.; VÁZQUEZ-JUÁREZ, R. Host Response when *Perkinsus marinus* Infection Intensities Increase in the Oyster *Crassostrea corteziensis*. **Journal of Shellfish Research**, v. 36, n. 3, p. 717–727, 2017. Disponível em: https://doi.org/10.2983/035.036.0321. Acesso em: 18 mar. 2026.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. **The State of World Fisheries and Aquaculture 2024**. Blue Transformation in action. Rome.: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2024. Disponível em: https://doi.org/10.4060/cd0683en. Acesso em: 5 mar. 2025.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Fishery and Aquaculture Statistics – Yearbook 2022**. *[S. l.]*: FAO, 2025. *E-book*. Disponível em: https://doi.org/10.4060/cd4312en. Acesso em: 8 mar. 2025.

FAVERI, J. De; SMOLOWITZ, R. M.; ROBERTS, S. B. Development and Validation of a Real-Time Quantitative PCR Assay for the Detection and Quantification of *Perkinsus marinus* in the Eastern Oyster, *Crassostrea virginica*. **Journal of Shellfish Research**, v. 28, n. 3, p. 459–464, 2009. Disponível em: https://doi.org/10.2983/035.028.0306. Acesso em: 4 mar. 2025.

FONG, D. *et al.* Small subunit ribosomal RNA gene sequence of the oyster parasite *Perkinsus marinus*. **Molecular Marine Biology and Biotechnology**, v. 2, n. 6, p. 346–350, 1993. Disponível em: https://europepmc.org/article/med/8193669. Acesso em: 23 jan. 2025.

FUERTES, V. N. B.; WATANABE, Y.; ITOH, N. Differences in phagosome acidification of Manila clam hemocytes in response to two *Perkinsus* species with contrasting proliferation dynamics in the host: *P. olseni* and *P. mediterraneus*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 207, p. 108216, 2024. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.jip.2024.108216. Acesso em: 19 jan. 2026.

GAO, J. *et al*. Survey on *Perkinsus* species in two economic mussels (*Mytilus coruscus* and *M. galloprovincialis*) along the coast of the East China Sea and the Yellow Sea. **Parasitology Research**, v. 123, n. 7, p. 265, 2024. Disponível em: https://doi.org/10.1007/s00436-024-08287-x. Acesso em: 14 dez. 2025.

GARCÍA-ULLOA, M. *et al*. A new bivalve host record for the exotic parasite *Perkinsus marinus* in the Gulf of California. **BioInvasions Records**, v. 12, n. 2, p. 393–401, 2023. Disponível em: https://doi.org/10.3391/bir.2023.12.2.04. Acesso em: 22 jan. 2026.

GAUTHIER, J. D.; MILLER, C. R.; WILBUR, A. E. TaqMan® MGB real-time PCR approach to quantification of Perkinsus marinus and Perkinsus spp. in oysters. **Journal of Shellfish**, v. 25, p. 619–624, 2006. Disponível em: https://doi.org/https://doi.org/10.2983/0730-8000(2006)25[619:TMRPAT]2.0.CO. Acesso em: 18 fev. 2025.

GOGGIN, C. L.; BARKER, S. C. Phylogenetic position of the genus *Perkinsus* (Protista, Apicomplexa) based on small subunit ribosomal RNA. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 60, n. 1, p. 65–70, 1993. Disponível em: https://doi.org/10.1016/0166-6851(93)90029-W. Acesso em: 18 nov. 2025.

GOGGIN, C.; LESTER, R. *Perkinsus*, a protistan parasite of abalone in Australia: A review. **Marine and Freshwater Research**, v. 46, n. 3, p. 639–646, 1995. Disponível em: https://doi.org/10.1071/MF9950639. Acesso em: 18 fev. 2025.

GUO, X.; FORD, S. E. Infectious diseases of marine molluscs and host responses as revealed by genomic tools. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 371, n. 1689, p. 20150206, 2016. Disponível em: https://doi.org/10.1098/rstb.2015.0206. Acesso em: 18 fev. 2025.

HAMAGUCHI, M. *et al*. *Perkinsus* Protozoan Infecton in Short-necked Clam *Tapes* (=*Ruditapes*) *philippinarum* in Japan. **Fish Pathology**, v. 33, n. 5, p. 473–480, 1998. Disponível em: https://doi.org/10.3147/jsfp.33.473. Aceso em: 01 mar. 2026.

HEID, C. A. *et al*. Real time quantitative PCR. **Genome Research**, v. 6, n. 10, p. 986–994, 1996. Disponível em: https://doi.org/10.1101/GR.6.10.986. Acesso em: 4 mar. 2025.

IGNACIO, B. L. *et al*. Genetic evidence of the presence of two species of *Crassostrea* (Bivalvia: Ostreidae) on the coast of Brazil. **Marine Biology**, v. 136, n. 6, p. 987–991, 2000. Disponível em: https://doi.org/10.1007/s002270000252. Acesso em: 17 dez. 2025.

ITOH, N. *et al*. First discovery of *Perkinsus beihaiensis* in Mediterranean mussels (*Mytilus galloprovincialis*) in Tokyo Bay, Japan. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 166, p. 107226, 2019. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.jip.2019.107226. Acesso em: 1 mar. 2026.

ITOÏZ, S. *et al.* Co-infection of two eukaryotic pathogens within clam populations in Arcachon Bay. **Frontiers in Microbiology**, v. 14, p. 1250947, 2024. Disponível em: https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1250947. Acesso em: 11 dez. 2025.

ITOÏZ, S. *et al*. Development of duplex TaqMan-based real-time PCR assay for the simultaneous detection of *Perkinsus olseni* and *P. chesapeaki* in host Manila clam tissue samples. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 184, p. 107603, 2021. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.jip.2021.107603. Acesso em: 09 jan. 2026.

KANG, H. *et al*. First report of *Perkinsus honshuensis* in the variegated carpet shell clam *Ruditapes variegatus* in Korea. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 122, n. 1, p. 35–41, 2016. Disponível em: https://doi.org/10.3354/dao03063. Acesso em: 09 jan. 2026.

KESSING, B. *et al*. **The Simple Fool's Guide to PCR**. Honolulu: Department of Zoology, University of Hawaii, 1989.

KIM, S. H. *et al*. A highly sensitive and specific real-time quantitative polymerase chain reaction assay for *Perkinsus marinus* detection in oysters. **Scientific Reports**, v. 14, n. 1, 2024 a. Disponível em: https://doi.org/10.1038/s41598-024-76822-y. Acesso em: 22 nov. 2025.

KIM, S.-H. *et al*. First report of *Perkinsus marinus* occurrence associated with wild Pacific oysters *Crassostrea gigas* from the west coast of Korea. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 204, p. 108119, 2024 b. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.jip.2024.108119. Acesso em: 11 jan. 2026.

LA PEYRE, J. F.; FAISAL, M. Improved Method for the Initiation of Continuous Cultures of the Oyster Pathogen *Perkinsus marinus* (Apicomplexa). **Transactions of the American Fisheries Society**, v. 124, n. 1, p. 144–146, 1995. Disponível em: https://doi.org/10.1577/1548-8659(1995)124<0144:IMFTIO>2.3.CO;2. Acesso em 21 nov. 2025.

LESTER, R. J. G.; DAVIS, G. H. G. A new *Perkinsus* species (Apicomplexa, Perkinsea) from the abalone *Haliotis ruber*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 37, n. 2, p. 181–187, 1981. Disponível em: https://doi.org/10.1016/0022-2011(81)90073-2. Acesso em: 24 fev. 2025.

LEVINE, N. D. *Perkinsus* gen. n. and Other New Taxa in the Protozoan Phylum Apicomplexa. **The Journal of Parasitology**, v. 64, n. 3, p. 549, 1978. Disponível em: https://doi.org/10.2307/3279807. Acesso em: 03 out. 2025.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2−ΔΔCT Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402–408, 2001. Disponível em: https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262. Acesso em: 18 fev. 2025.

LOPES, G. R. *et al*. de. Growth of *Crassostrea gasar* cultured in marine and estuary environments in Brazilian waters. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 48, n. 8, p. 975–982, 2013. Disponível em: https://doi.org/10.1590/S0100-204X2013000800024. Acesso em: 29 nov. 2025.

LUNA, M.; LLORENTE, I.; LUNA, L. A conceptual framework for risk management in aquaculture. **Marine Policy**, v. 147, p. 105377, 2023. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.marpol.2022.105377. Acesso em: 18 fev. 2025.
MACKIN, J. G.; OWEN, H. M.; COLLIER, A. Preliminary note on the occurrence of a new protistan parasite, *Dermocystidium marinum* n. sp. in *Crassostrea virginica* (Gmelin). **Science**, v. 111, n. 2883, p. 328–329, 1950. Disponível em: https://doi.org/10.1126/SCIENCE.111.2883.328. Acesso em: 24 fev. 2025.

MARQUIS, N. D. *et al*. A qPCR-Based Survey of *Haplosporidium nelsoni* and *Perkinsus* spp. in the Eastern Oyster, *Crassostrea virginica* in Maine, USA. **Pathogens**, v. 9, n. 4, p. 256, 2020. Disponível em: https://doi.org/10.3390/pathogens9040256. Acesso em: 14 out. 2025.

MOLONEY, B. *et al*. Ostreid herpesvirus-1 microvariant surveillance in Pacific oysters (*Magallana gigas*, Thunberg, 1793) in Australia in 2011. **Australian Veterinary Journal**, v. 101, n. 9, p. 345-355, 2023. Disponível em: https://doi.org/10.1111/avj.13265. Acesso em: 07 dez. 2025.

MOSS, J. A. *et al*. Description of *Perkinsus beihaiensis* n. sp., a new *Perkinsus* sp. Parasite in Oysters of Southern China. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 55, n. 2, p. 117–130, 2008. Disponível em: https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2008.00314.x. Acesso em: 22 mar. 2025.

NORÉN, F.; MOESTRUP, Ø.; REHNSTAM-HOLM, A. S. *Parvilucifera infectans* norén et moestrup gen. et sp. nov. (perkinsozoa phylum nov.): a parasitic flagellate capable of killing toxic microalgae. **European Journal of Protistology**, v. 35, n. 3, p. 233–254, 1999. Disponível em: https://doi.org/10.1016/S0932-4739(99)80001-7. Acesso em: 18 nov. 2025.

PARK, K. II. *et al*. Isolation and identification of *Perkinsus olseni* from feces and marine sediment using immunological and molecular techniques. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 105, n. 3, p. 261–269, 2010. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.jip.2010.07.006. Acesso em: 05 dez. 2025.

PERKINS, F. O. The structure of *Perkinsus marinus* (Mackin, Owen and Collier, 1950) Levine, 1978 with comments on taxonomy and phylogeny. **Journal of Shellfish Research**, v. 15, n. 1, p. 67–87, 1996. Disponível em: https://core.ac.uk/download/pdf/235399205.pdf. Acesso em: 24 fev. 2025.

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 29, n. 9, p. 45e–445, 2001. Disponível em: https://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45. 19 jan. 2026.

PIESZ, J. *et al*. Development of a multiplex qPCR for the quantification of three protozoan parasites of the eastern oyster *Crassostrea virginica*. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 151, p. 111–121, 2022. Disponível em: https://doi.org/10.3354/dao03694. Acesso em: 08 jan. 2026.

QUEIROGA, F. R. *et al*. Parasites infecting the cultured oyster *Crassostrea gasar* (Adanson, 1757) in Northeast Brazil. **Parasitology**, v. 142, n. 6, p. 756–766, 2015. Disponível em: https://doi.org/10.1017/S0031182014001863. Acesso em: 24 nov. 2025.

RAY, S. M. A culture technique for the diagnosis of infections with *Dermocystidium marinum* Mackin, Owen, and Collier in oysters. **Science**, v. 116, n. 3014, p. 360–361, 1952. Disponível em: https://doi.org/10.1126/SCIENCE.116.3014.360. Acesso em: 18 fev. 2025.

REECE, K.; DUNGAN, C.; BURRESON, E. Molecular epizootiology of *Perkinsus marinus* and *P. chesapeaki* infections among wild oysters and clams in Chesapeake Bay, USA. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 82, p. 237–248, 2008. Disponível em: https://doi.org/10.3354/dao01997. Acesso em: 4 mar. 2025.

REECE, K. S. *et al*. Phylogenetic Analysis of *Perkinsus* Based on Actin Gene Sequences. **The Journal of Parasitology**, v. 83, n. 3, p. 417, 1997. Disponível em: https://doi.org/10.2307/3284403. Acesso em: 07 out. 2025.

REGAN, T. *et al*. Non-invasive detection method for *Bonamia ostreae* infected *Ostrea edulis*. **Aquaculture**, v. 599, p. 742153, 2025. Disponível em: https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2025.742153. Acesso em: 18 nov. 2025.

RÍOS, R. *et al*. Development and validation of a specific real-time PCR assay for the detection of the parasite *Perkinsus olseni*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 169, p. 107301, 2020. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.jip.2019.107301. Acesso em: 18 fev. 2025.

ROCHA, C. S. da; *et al*. First record of *Perkinsus marinus* infecting *Crassostrea* sp. in Rio Grande do Norte, Brazil, using real-time PCR. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 198, p. 107917, 2023. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.jip.2023.107917. Acesso em: 18 fev. 2025.

SABRY, R. C. *et al*. Parasitological survey of mangrove oyster, *Crassostrea rhizophorae*, in the Pacoti River Estuary, Ceará State, Brazil. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 112, n. 1, p. 24–32, 2013. Disponível em: https://doi.org/10.1016/J.JIP.2012.10.004. Acesso em: 4 mar. 2025.

SABRY, R. *et al*. First report of *Perkinsus* sp. infecting mangrove oysters *Crassostrea rhizophorae* from the Brazilian coast. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 88, n. 1, p. 13–23, 2009. Disponível em: https://doi.org/10.3354/dao02136. Acesso em: 22 jan. 2026.

SALDARRIAGA, J. F. *et al*. Multiple protein phylogenies show that *Oxyrrhis marina* and *Perkinsus marinus* are early branches of the dinoflagellate lineage. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 53, n. 1, p. 355–365, 2003. Disponível em: https://doi.org/10.1099/ijs.0.02328-0. Acesso em: 11 jan. 2026.

SANIL, N.; SUJA, G.; LIJO, J.; VIJAYAN, K. First report of *Perkinsus beihaiensis* in *Crassostrea madrasensis* from the Indian subcontinent. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 98, n. 3, p. 209–220, 2012. Disponível em: https://doi.org/10.3354/dao02440. Acesso em: 20 dez. 2025.

SOUDANT, P.; E. CHU, F.-L.; VOLETY, A. Host–parasite interactions: Marine bivalve molluscs and protozoan parasites, *Perkinsus* species. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.

114, n. 2, p. 196–216, 2013. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.jip.2013.06.001. Acesso em: 14 jan. 2026.
SPRAGUE, V. Protozoa. *In*: GALTSOFF, P. S. (org.). **Gulf of Mexico: Its Origin, Waters, and Marine Life**. Washington, D.C.: U.S. Government Printing Office, 1954. v. 55, p. 243–256.

SUNILA, I.; HAMILTON, R. M.; DUNCAN, C. F. Ultrastructural Characteristics of the In Vitro Cell Cycle of the Protozoan Pathogen of Oysters, *Perkinsus marinus*. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 48, n. 3, p. 348–361, 2001. Disponível em: https://doi.org/10.1111/J.1550-7408.2001.TB00324.X. Acesso em: 27 fev. 2025.

SUPLICY, F. M. (Org.). **Manual do cultivo de ostras**. Florianópolis: Epagri, 2022. *E-book*. Disponível em: https://docweb.epagri.sc.gov.br/website_epagri/Cedap/Livro/6_Livro_maricultura_ostra_sistema_de_cultivo.pdf. Acesso em: 18 nov. 2025.

TAKAHASHI, M. *et al*. Development of a PCR-RFLP Method for Differentiation of *Perkinsus olseni* and *P. honshuensis* in the Manila Clam *Ruditapes philippinarum*. **Fish Pathology**, v. 44, n. 4, p. 185–188, 2009. Disponível em: https://doi.org/10.3147/jsfp.44.185. Acesso em: 4 mar. 2025.

TAMURA, K.; STECHER, G.; KUMAR, S. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. **Molecular Biology and Evolution**, v. 38, n. 7, p. 3022–3027, 2021. Disponível em: https://doi.org/10.1093/molbev/msab120. Acesso em: 10 fev. 2026.

TRAVIS, B. A. *et al*. Novel diagnostic tests for the putative agent of bacterial gill disease in Pacific razor clams (*Siliqua patula*). **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 178, p. 107519, 2021. Disponível em: https://doi.org/10.1016/J.JIP.2020.107519. Acesso em: 18 nov. 2025.

UMEDA, K.; YOSHINAGA, T. Development of real-time PCR assays for discrimination and quantification of two *Perkinsus* spp. in the Manila clam *Ruditapes philippinarum*. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 99, n. 3, p. 215–225, 2012. Disponível em: https://doi.org/10.3354/dao02476. Acesso em: 06 fev. 2026.

URIARTE, I.; RUPP, G.; ABARCA, A. Producción de juveniles de pectínidos iberoamericanos bajo condiciones controladas. *In*: **Los Moluscos Pectínidos de Iberoamérica: Ciencia y Acuicultura**. Mexico: Editorial Acribia, 2002. p. 147–171. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/285425016_Produccion_de_juveniles_de_pectinidos_Iberoamericanos_bajo_condiciones_controladas. Acesso em: 02 dez. 2025.

VALENTI, W. C. *et al*. O. Aquaculture in Brazil: past, present and future. **Aquaculture Reports**, v. 19, p. 100611, 2021. Disponível em: https://doi.org/10.1016/J.AQREP.2021.100611. Acesso em: 18 nov. 2025.

VÁZQUEZ, N.; ITOH, N.; CREMONTE, F. First record of *Perkinsus olseni* in cultured mussels (*Mytilus chilensis*) in the Beagle Channel, Southwestern Atlantic Ocean. **Aquaculture**, v. 550, p. 737893, 2022. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.737893. Acesso em: 09 jan. 2025.

VILLALBA, A. *et al*. Perkinsosis en moluscos. *In*: FIGUERAS, A.; NOVOA, B. (orgs.). **Enfermedades de Moluscos Bivalvos de Interes en Acuicultura**. *[S. l.]*: Fundación Observatorio Español de Acuicultura, 2011. p. 541. *E-book*. Disponível em: https://doi.org/http://hdl.handle.net/10261/303598. Acesso em: 18 fev. 2025.

VILLALBA, A. *et al*. Perkinsosis in molluscs: A review. **Aquatic Living Resources**, v. 17, n. 4, p. 411–432, 2004. Disponível em: https://doi.org/10.1051/alr:2004050. Acesso em: 24 fev. 2025.

VIVIER, E. Réflexions et suggestions à propos de la systématique des sporozoaires: création d'une classe des Hematozoa. **Protistologica**, v. 18, p. 449–457, 1982. Disponível em: http://pascal-francis.inist.fr/vibad/index.php?action=getRecordDetail&idt=PASCALZOOLINEINRA83X0270553.. Acesso em: 18 nov. 2025.

WOAH – WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH. Infection with *Perkinsus marinus*. *In*: **WOAH Aquatic Manual 2024**. *[S. l.: s. n.]*. *E-book*. Disponível em: https://www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Health_standards/aahm/current/2.4.05_P_MARINUS.pdf. Acesso em: 18 fev. 2025.

WU, L. *et al*. Utilization of recombinase polymerase amplification combined with a lateral flow strip for detection of *Perkinsus beihaiensis* in the oyster *Crassostrea hongkongensis*. **Parasites & Vectors**, v. 12, n. 1, p. 360, 2019 a. Disponível em: https://doi.org/10.1186/s13071-019-3624-3. Acesso em: 16 fev. 2026.

XIE, Z. *et al*. A duplex quantitative real-time PCR assay for the detection of *Haplosporidium* and *Perkinsus* species in shellfish. **Parasitology Research**, v. 112, n. 4, p. 1597–1606, 2013. Disponível em: https://doi.org/10.1007/S00436-013-3315-5. Acesso em: 18 fev. 2026.

YE, J. *et al*. Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. **BMC Bioinformatics**, v. 13, n. 1, p. 134, 2012. Disponível em: https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-134. Acesso em: 09 fev. 2026.

YE, L. *et al*. Diversity and distribution of *Perkinsus* spp. along the coast of China: Implications for widespread transmission of *Perkinsus* spp. in mollusks. **Frontiers in Marine Science**, v. 9, 2022. Disponível em: https://doi.org/10.3389/fmars.2022.989261. Acesso em: 26 jan. 2026.

YISRAEL, L. *et al*. Expanding the phylogeography and connectivity of *Perkinsus* species across North and Central America. **Diversity and Distributions**, v. 30, n. 3, 2024. Disponível em: https://doi.org/10.1111/ddi.13807. Acesso em: 25 fev. 2026.

ZANNELLA, C. *et al*. Microbial diseases of bivalve mollusks: infections, immunology and antimicrobial defense. **Marine drugs**, v. 15, n. 6, p. 182, 2017. Disponível em: https://doi.org/10.3390/md15060182. Acesso em: 18 fev. 2025.

ZHAI, J. Y. *et al*. First record of *Perkinsus beihaiensis* in cultured mussels *Mytilus coruscus* in the East China Sea. **Parasitology**, v. 151, n. 10, p. 1104–1107, 2024. Disponível em: https://doi.org/10.1017/S0031182024000702. Acesso em: 17 jan. 2026.

APÊNCIDE A — SEQUÊNCIAS ITS2 DE *PERKINSUS* SPP. (73) USADAS PARA PROJETAR MANUALMENTE PRIMERS ESPECÍFICOS PARA QPCR DE *P. MARINUS* E *P. BEIHAIENSIS* APÓS ALINHAMENTO E ANÁLISE FILOGENÉTICA.

Acesso	Espécies	País	Espécies Hospedeiras	Referência
KP300873	*P. beihaiensis*	BRA-BA	*Crassostrea rhizophorae*	(Luz; Boehs, 2016)
OR725421	*P. beihaiensis*	BRA-BA	*Crassostrea rhizophorae*	(Brandão *et al*., 2013)
FJ472346	*P. beihaiensis*	BRA-CE	*Crassostrea rhizophorae*	(Sabry *et al*., 2009)
JX502842	*P. beihaiensis*	BRA-CE	*Crassostrea rhizophorae*	(Sabry *et al*., 2013)
KF730253	*P. beihaiensis*	BRA-CE	*Anomalocardia brasiliana*	(Ferreira *et al*., 2015)
KP160933	*P. beihaiensis*	BRA-PB	*Crassostrea gasar*	(Queiroga *et al*., 2015)
OR754363	*P. beihaiensis*	BRA-PB	*Crassostrea gasar*	da Silva; Faria, (2023)*
OR754308	*P. beihaiensis*	BRA-RN	*Crassostrea gasar*	(da Silva *et al*., 2024)
OR754307	*P. beihaiensis*	BRA-RN	*Crassostrea rhizophorae*	(da Silva *et al*., 2024)
MK253298	*P. beihaiensis*	BRA-SC	*Crassostrea gasar*	(Luz Cunha *et al*., 2019)
MK253299	*P. beihaiensis*	BRA-SC	*Crassostrea gasar*	(Luz Cunha *et al*., 2019)
MF595812	*P. beihaiensis*	BRA-SE	*Crassostrea gasar*	(Scardua *et al*., 2017)
EF204024	*P. beihaiensis*	CHI	*Crassostrea ariakensis*	(Moss *et al*., 2008)
MT908881	*P. beihaiensis*	CHI	*Crassostrea gigas*	(Ye *et al*., 2022)
OR192847	*P. beihaiensis*	CHI	*Mytilus coruscus*	(Zhai *et al*., 2024)
EF204068	*P. beihaiensis*	CHI	*Austrovenus stutchburyi*	(Dungan *et al*., 2007)
JN054741	*P. beihaiensis*	IND	*Crassostrea madrasensis*	Sanil *et al*. (2011)*
LC437316	*P. beihaiensis*	JAP	*Mytilus galloprovincialis*	(Itoh *et al*., 2019)
OM238131	*P. beihaiensis*	JAP	*Mytilus galloprovincialis*	(Liu *et al*., 2022)
KU172673	*P. beihaiensis*	PAN	*Saccostrea palmula*	(Pagenkoop Lohan *et al*., 2016)
MF186913	*P. chesapeaki*	AUS	*Anadara trapezi*	(Reece *et al*., 2017)
KM983407	*P. chesapeaki*	AUS	*Anadara trapezi*	(Dang *et al*., 2015)

KU678212	*P. chesapeaki*	BRA-CE	*Crassostrea rhizophorae*	(Dantas Neto *et al*., 2016)
KU678214	*P. chesapeaki*	BRA-CE	*Crassostrea rhizophorae*	(Dantas Neto *et al*., 2016)
KU678215	*P. chesapeaki*	BRA-CE	*Crassostrea rhizophorae*	(Dantas Neto *et al*., 2016)
JQ669646	*P. chesapeaki*	FRA	*Ruditapes philippinarum*	(Arzul *et al*., 2012)
KU172670	*P. chesapeaki*	PAN	*Crassostrea columbiensis*	Hill-Spanik, *et al*., (2015)*
KF314812	*P. chesapeaki*	SPA	*Cerastoderma edule*	(Carrasco *et al*., 2014)
AF102171	*P. chesapeaki*	USA	*Macoma balthica*	(Dungan *et al*., 2002)
AY876305	*P. chesapeaki*	USA	*Macoma balthica*	(Burreson *et al*., 2005)
DQ516696	*P. honshuensis*	JAP	*Ruditapes philippinarum*	(Dungan; Reece, 2006)
DQ516697	*P. honshuensis*	JAP	*Ruditapes philippinarum*	(Dungan; Reece, 2006)
DQ516698	*P. honshuensis*	JAP	*Ruditapes philippinarum*	(Dungan; Reece, 2006)
KC812378	*P. honshuensis*	KOR	*Ruditapes variegatus*	(Kang *et al*., 2016)
KC812379	*P. honshuensis*	KOR	*Ruditapes variegatus*	(Kang *et al*., 2016)
KC812380	*P. honshuensis*	KOR	*Ruditapes variegatus*	(Kang *et al*., 2016)
JX144344	*P. marinus*	BRA-PB	*Crassostrea rhizophorae*	(da Silva *et al*., 2013)
KP160921	*P. marinus*	BRA-PB	*Crassostrea gasar*	(Queiroga *et al*., 2015)
OR754362	*P. marinus*	BRA-PB	*Crassostrea gasar*	da Silva; Faria, (2023)*
KT692955	*P. marinus*	BRA-PB	*Crassostrea rhizophorae*	(Queiroga *et al*., 2016)
MK253300	*P. marinus*	BRA-SC	*Crassostrea gigas*	(Luz Cunha *et al*., 2019)
KJ608225	*P. marinus*	BRA-SE	*Crassostrea gasar*	(da Silva *et al*., 2014)
MF595819	*P. marinus*	BRA-SE	*Crassostrea rhizophorae*	(Scardua *et al*., 2017)
OR936656	*P. marinus*	KOR	*Crassostrea gigas*	(Kim *et al*., 2024)
OR936657	*P. marinus*	KOR	*Crassostrea gigas*	(Kim *et al*., 2024)
KJ458987	*P. marinus*	MEX	*Crassostrea corteziensis*	Escobedo-Fregoso; Vazquez-Juarez, (2014)*

GQ861511	*P. marinus*	MEX	*Crassostrea gigas*	(Enríquez-Espinoza *et al*., 2010)
JQ266239	*P. marinus*	MEX	*Crassostrea corteziensis*	(Escobedo-Fregoso *et al*., 2015)
KU172664	*P. marinus*	PAN	*Crassostrea virginica*	(Pagenkoop Lohan *et al*., 2016)
KU172669	*P. marinus*	PAN	*Crassostrea columbiensis*	(Pagenkoop Lohan *et al*., 2016)
AF150986	*P. marinus*	USA	*Crassostrea virginica*	Brown *et al*. (1999)*
DQ370475	*P. marinus*	USA	*Crassostrea virginica*	(Abollo *et al*., 2006)
EF204008	*P. marinus*	USA	*Crassostrea virginica*	(Moss *et al*., 2007)
EU919509	*P. marinus*	USA	*Crassostrea virginica*	(Reece *et al*., 2008)
AY295181	*P. marinus*	USA	*Crassostrea virginica*	(Brown *et al*., 2004)
AY295195	*P. marinus*	USA	*Crassostrea virginica*	(Brown *et al*., 2004)
KJ701587	*P. mediterraneus*	ITA	*Ostrea edulis*	(Ramilo *et al*., 2015)
AY487834	*P. mediterraneus*	SPA	*Ostrea edulis*	(Casas *et al*., 2004)
AY487835	*P. mediterraneus*	SPA	*Ostrea edulis*	(Casas *et al*., 2004)
KJ569360	*P. mediterraneus*	SPA	*Chamelea gallina*	(Valencia *et al*., 2014)
KJ569343	*P. mediterraneus*	SPA	*Ostrea edulis*	(Valencia *et al*., 2014)
KJ701584	*P. mediterraneus*	SPA	*Ostrea edulis*	(Ramilo *et al*., 2015)
KP160932	*P. olsenii*	BRA-PB	*Crassostrea gasar*	(Queiroga *et al*., 2015)
KJ608209	*P. olsenii*	BRA-SE	*Crassostrea gasar*	(da Silva *et al*., 2014)
KJ608205	*P. olsenii*	BRA-SE	*Crassostrea gasar*	(da Silva *et al*., 2014)
MG733367	*P. olsenii*	IND	*Paphia malabarica*	(Shamal *et al*., 2018)
DQ516705	*P. olsenii*	JAP	*Ruditapes philippinarum*	(Dungan; Reece, 2006)
KX514103	*P. olsenii*	KOR	*Ruditapes philippinarum*	Cho *et al*., (2016)*
AY820757	*P. olsenii*	KOR	*Protothaca jedoensis*	(Park *et al*., 2006)
KU172656	*P. olsenii*	PAN	*Isognomon* sp.	(Pagenkoop Lohan *et al*., 2016)
AF441210	*P. olsenii*	SPA	*Ruditapes decussatus*	(Casas *et al*., 2002)

AY435092	*P. olsenii*	URU	*Pitar rostrata*	(Cremonte *et al*., 2005)
AB973172	*P. qugwadi*	CAN	*Patinopecten yessoensis*	(Itoh *et al*., 2013)

Fonte: Elaborado pelo autor (2026).

* Envio direto.

AUS: Austrália; BRA: Brasil (Estados: BA: Bahia, CE: Ceará, PB: Paraíba, RN: Rio Grande do Norte, SC: Santa Catarina, SE: Sergipe); CAN: Canadá; CHI: China; FRA: França; IND: Índia; ITA: Itália; JAP: Japão; KOR: Coréia do Sul; MEX: México; PAN: Panamá; SPA: Espanha; URU: Uruguai, USA: Estados Unidos da América. Número de acesso do GenBank.

REFERÊCIAS

ABOLLO, E. *et al*. Differential diagnosis of *Perkinsus* species by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism assay. **Molecular and Cellular Probes**, v. 20, p. 323–329, 2006.

ARZUL, I. *et al*. One *Perkinsus* species may hide another: characterization of *Perkinsus* species present in clam production areas of France. **Parasitology,** v. 139, p. 1757–1771, 2012.

BRANDÃO, R. P. *et al*. *Perkinsus* sp. infecting oyster *Crassostrea rhizophorae* (Guilding, 1828) on the coast of Bahia, Brazil. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 112, p. 138–141, 2013.

BROWN, G. D.; HUDSON, K. L.; REECE, K. S. Multiple polymorphic sites at the ITS and ATAN loci in cultured isolates of *Perkinsus marinus*. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 51, p. 312–320, 2004.

BURRESON, E. M.; REECE, K. S.; DUNGAN, C. F. Molecular, morphological, and experimental evidence support the synonymy of *Perkinsus chesapeaki* and *Perkinsus andrewsi*. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 52, p. 258–270, 2005.

CARRASCO, N. *et al*. *Perkinsus chesapeaki* observed in a new host, the European common edible cockle *Cerastoderma edule*, in the Spanish Mediterranean coast. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 117, p. 56–60, 2014.

CASAS, S. *et al*. *Perkinsus mediterraneus* n. sp., a protistan parasite of the European flat oyster *Ostrea edulis* from the Balearic Islands, Mediterranean Sea. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 58, p. 231–244, 2004.

APÊNCIDE B — RESULTADOS OBTIDOS NO PRIMER-BLAST (NCBI).

TaxID	Filo/spp.	Número de mismatches	Produtos nos moldes alvo	GenBank	Tamanho do produto (bp)
			***P. beihaiensis*: Pbei-ITS2q-Fw/Rv**		
31276	***Perkinsus marinus***		Nenhuma sequência correspondente		
32597	*Perkinsus olsenii*		Nenhuma sequência correspondente		
259652	*Perkinsus mediterraneus*		Nenhuma sequência correspondente		
386307	*Perkinsus honshuensis*		Nenhuma sequência correspondente		
103982	*Parvilucifera*		Nenhuma sequência correspondente		
5794	Apicomplexa		Nenhuma sequência correspondente		
2864	Dinoflagellates		Montagem do genoma de *Symbiodinium*	OZ125778.1	2727
		Fw: 5, Rv: 4	*pilosum*, cromossomos: 51	OZ125800.1	222
		Rv: 5, Rv: 4	63		
			Montagem do genoma de *Symbiodinium*	OZ257263.1	56
			tridacnidarum, cromossomos:	OZ257333.1	350
		Fw: 4, Rv: 5	1		
		Fw: 5, Rv: 5	71		
31291	Haplosporidians		Nenhuma sequência correspondente		
33674	Thraustochytridae		Nenhuma sequência correspondente		
			***P. marinus*: Pmar-ITS2q-Fw/Rv**		
1074429	***Perkinsus beihaiensis***		Nenhuma sequência correspondente		
32597	*Perkinsus olsenii*		Nenhuma sequência correspondente		
259652	*Perkinsus mediterraneus*		Nenhuma sequência correspondente		
386307	*Perkinsus honshuensis*		Nenhuma sequência correspondente		
103982	*Parvilucifera*		Nenhuma sequência correspondente		

5794	Apicomplexa		Nenhuma sequência correspondente		
2864	Dinoflagellates		Montagem do genoma de *Symbiodinium*	OZ125766.1	605
		Rv: 4 and 5	*pilosum*, cromossomos: 29	OZ125760.1	158
		Fw: 5	23	OZ125794.1	533
		Fw: 5	57		
31291	Haplosporidians		Nenhuma sequência correspondente		
33674	Thraustochytridae		Nenhuma sequência correspondente		

Fonte: Elaborado pelo autor (2026).

Os pares de *primers* foram comparados com o banco de dados de nucleotídeos não redundantes (nt) e restritos a espécies de Perkinsus e alguns filos relacionados. Alvos com menos de seis incompatibilidades para os primers (Fw e Rv) são descritos. Maio de 2025.

APÊNCIDE C — AMOSTRAS UTILIZADAS PARA A VALIDAÇÃO DOS ENSAIOS DE qPCR DE *P. marinus* E *P. beihaiensis.*

						P. marinus		***P. beihaiensis***	
Estado	**Código do animal**	**n**	**Bivalve sp.**	**RFTM**	**RFLP-PCR**	**Qtd**	**Ct**	**Qtd**	**Ct**
RJ	NN-AR 05-06	2	*N. nodosus*	0	ITS-	0	-	0	-
PB	MF-MA 02	1	*M. falcata*	0	ITS-	0	-	0	-
PB	CR-MA 41, 76	2	*C. rhizophorae*	0	ITS-	0	-	0	-
PB	CB-MA 37, 50	2	*C. gasar*	0	ITS-	0	-	0	-
RN	CB-d-GU 01-05, 07, 09, 11-15	12	*C. gasar*	0	ITS-	0	-	0	-
RN	CB-GU 22, 31-32, 34-40	10	*C. gasar*	0	ITS-	0	-	0	-
PA	CB-PA 09	1	*C. gasar*	Nd	ITS-	0	-	**85**	**33.4**
SC	CB-SC 01-09	9	*C. gasar*	Nd	ITS-	0	-	0	-
SC	MG-SC 01	1	*M. gigas*	Nd	ITS-	0	-	0	-
RN	CB-GU 25-26	2	*C. gasar*	1	ITS-	0	-	0	-
RN	CB-GU 21	1	*C. gasar*	2	ITS-	0	-	749	30.2
RN	CB-d-GU 08	1	*C. gasar*	2	ITS+	0	-	1,220	29.5
RN	CB-GU 45	1	*C. gasar*	2	ITS+	0	-	236	31.9
RN	CB-GU 58	1	*C. gasar*	2	ITS+	0	-	267	31.7
PB	CB-MA 733	1	*C. gasar*	4	ITS+	43,189	25.0	0	-
RN	CB-JE 04	1	*C. gasar*	2	*P. beihaiensis* (OR754309)	0	-	3,001	28.2
RN	CB-d-GU 37	1	*C. gasar*	3	*P. beihaiensis* (OR754311)	0	-	7,365	26.9
RN	CR-JE 08	1	*C. rhizophorae*	3	*P. beihaiensis* (OR754307)	0	-	4,482	27.6
PB	CR-MA 27	1	*C. rhizophorae*	3	*P. beihaiensis*	0	-	3,503	28.0
BA	CR-BA I-v-10	1	*C. rhizophorae*	3	*P. beihaiensis* (OR725421)	0	-	12,324	26.1
BA	CR-BA II-v-19	1	*C. rhizophorae*	3	*P. beihaiensis* (OR725422)	0	-	2,851	28.3

BA	CR-BA III-v-45	1	*C. rhizophorae*	4	*P. beihaiensis* (OR725423)	0	-	5,405	27.3
BA	CR-BA I-i-49	1	*C. rhizophorae*	4	*P. beihaiensis* (OR725424)	0	-	144	32.6
PB	CB-MA 551	1	*C. gasar*	3	*P. beihaiensis*	0	-	7,834	26.3
PB	CB-MA 16	1	*C. gasar*	4	*P. beihaiensis*	0	-	17,223	25.7
PB	CB-MA 457	1	*C. gasar*	4	*P. beihaiensis*	0	-	10,611	25.7
PB	CB-MA 479	1	*C. gasar*	4	*P. beihaiensis*	0	-	18,712	24.7
PB	CB-MA 495	1	*C. gasar*	4	*P. beihaiensis*	0	-	41,469	23.4
PB	CB-MA 527	1	*C. gasar*	4	*P. beihaiensis* (OR754363)	0	-	7,170	26.9
PB	CB-MA 539	1	*C. gasar*	4	*P. beihaiensis*	0	-	35,368	23,8
PB	CB-MA 569	1	*C. gasar*	4	*P. beihaiensis*	0	-	55,846	22.9
PB	CB-MA 631	1	*C. gasar*	4	*P. beihaiensis*	0	-	9,528	26.5
PB	CB-MA 633	1	*C. gasar*	4	*P. beihaiensis*	0	-	28,386	24.9
PB	CB-MA 715	1	*C. gasar*	4	*P. beihaiensis*	0	-	29,004	24.0
SE	CR-BG 505	1	*C. rhizophorae*	3	*P. marinus*	5,577,813	17.7	**94**	**33.2**
PB	CR-MA 02	1	*C. rhizophorae*	4	*P. marinus*	8,633	26.1	0	-
SE	CB-BG 498	1	*C. gasar*	3	*P. marinus*	438,292	21.6	0	-
SE	CB-BG 870	1	*C. gasar*	4	*P. marinus* (MF595817)	891,771	20.5	**62**	**33.8**
PB	CB-MA 604	1	*C. gasar*	3	*P. marinus*	745	27.3	0	-
PB	CB-MA 681	1	*C. gasar*	3	*P. marinus*	713	27.4	0	-
PB	CB-MA 728	1	*C. gasar*	3	*P. marinus*	920	27.0	0	-
PB	CB-MA 803	1	*C. gasar*	3	*P. marinus*	217	29.1	0	-
PB	CB-MA 805	1	*C. gasar*	3	*P. marinus*	1,883	29.7	0	-
PB	CB-MA 21	1	*C. gasar*	4	*P. marinus*	27,302	25.0	0	-
PB	CB-MA 403	1	*C. gasar*	4	*P. marinus*	22,353	26.0	0	-
PB	CB-MA 436	1	*C. gasar*	4	*P. marinus*	31,337	25.5	0	-
PB	CB-MA 531	1	*C. gasar*	4	*P. marinus*	4,449	24.8	0	-
PB	CB-MA 538	1	*C. gasar*	4	*P. marinus*	5,193	24.5	0	-

PB	CB-MA 543	1	*C. gasar*	4	*P. marinus*	6,324	24.3	0	-
PB	CB-MA 680	1	*C. gasar*	4	*P. marinus*	2,001	25.9	0	-
PB	CB-MA 698	1	*C. gasar*	4	*P. marinus*	32,736	21.9	0	-
PB	CB-MA 723	1	*C. gasar*	4	*P. marinus*	266	28.8	0	-
PB	CB-MA 725	1	*C. gasar*	4	*P. marinus*	6,612	27.9	0	-
PB	CB-MA 763	1	*C. gasar*	4	*P. marinus*	103,592	20.3	**134**	**32.9**
PB	CB-MA 793	1	*C. gasar*	4	*P. marinus*	9,725	27.3	0	-
SE	CB-BG 73	1	*C. rhizophorae*	4	*P. olsenii*	0	-	0	-
SE	CB-BG 56	1	*C. gasar*	4	*P. olsenii* (KJ608213)	**290**	**32.6**	0	-
CE	CR-CE 272-019, 081, 087, 132	4	*C. rhizophorae*	1	*P. chesapeaki* (KU-678212-15)	0	-	0	-
PB	CB-MA 17	1	*C. gasar*	3	*P. marinus / P. beihaiensis*	139	32.5	3,891	27.9
PB	CB-MA 494	1	*C. gasar*	4	*P. marinus / P. beihaiensis*	943	27.0	2,473	28.1
PB	CR-MA 01	1	*C. rhizophorae*	4	*P. marinus / P. beihaiensis*	16,257	25.6	8,102	26.8
SE	CR-BG 756	1	*C. rhizophorae*	1	*P. marinus / P. beihaiensis* (MF595809)	18,482	26.3	92	33.2
SE	CB-BG 44	1	*C. gasar*	4	*P. marinus / P. olsenii*	4,424	28.5	0	-
SE	CB-BG 65	1	*C. gasar*	4	*P. marinus* (KJ608229) / *P. olsenii* (KJ608245)	13,645	26.8	0	-
SE	CR-BG 948	1	*C. rhizophorae*	4	*P. marinus* (MF595819)/*P. olsenii*/*P. beihaiensis*	124,973	23.4	58	33.9

Fonte: Elaborado pelo autor (2026).

As amostras foram previamente testadas para infecção por *Perkinsus* spp. por RFTM, PCR (ITS) seguido de RFLP e/ou sequenciamento. Os resultados de qPCR são expressos como o número de cópias por 100 ng de DNA genômico (Qtd.), e o valor de corte de Ct foi 34. Bivalves não infectados (n = 40), bivalves infectados (n = 60). Origem dos bivalves (Estados): SC: Santa Catarina; RJ: Rio de Janeiro; PA: Pará; BA: Bahia; RN: Rio Grande do Norte; PB: Paraíba; SE: Sergipe. Nd: não realizado. ITS-: Sem amplificação por PCR. ITS+: Amplificação por PCR. Números de acesso do GenBank foram fornecidos para algumas amostras. -: Ct indeterminado ou >34. Os resultados inesperados estão destacados em negrito (ver texto para detalhes). n: número de espécimes.

ANEXO A — PRIMEIRA PÁGINA DO ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA JOURNAL OF INVERTEBRATE PATHOLOGY

Journal of Invertebrate Pathology 216 (2026) 108530

Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Invertebrate Pathology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jip

Development of two quantitative real-time PCRs for the detection of *Perkinsus beihaiensis* and *P. marinus*

Kamila dos Santos Bezerra, Natanael Dantas Farias, Sofia Lucena de Oliveira Coutinho, Darlânia Santos da Silva, Patricia Mirella da Silva *

Laboratory of Immunology and Pathology of Marine Invertebrates (LABIPI), Department of Molecular Biology, Federal University of Paraíba (UFPB), CEP 58051-900 João Pessoa, Paraíba, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
Bivalves
Coinfection
Diagnosis
Surveillance

ABSTRACT

Oyster production is an expanding aquaculture activity worldwide. Protozoan parasites such as *Perkinsus* spp. affects bivalve populations in the Americas, Europe, and Asia, causing mass mortality in both cultured and wild populations. Their impact contributed to the depletion of natural resources, resulting in significant economic losses. A recent concern is the rapid spread of *Perkinsus* into regions far from their natural geographical areas, posing a threat to native mollusk populations. Since 2008, *Perkinsus* spp. has been detected among bivalves from Brazil. Two species (*P. olsenii* and *P. chesapeaki*) were sporadically observed. In contrast, two others (*P. marinus* and *P. beihaiensis*) are frequently detected in oyster populations, reaching high infection intensities and prevalences depending on the populations and species (*Crassostrea gasar, C. rhizophorae,* and *Magallana gigas*). Diagnosis based on molecular techniques, such as qPCR, has been developed to detect protozoan parasites, including *Perkinsus* spp.. However, the qPCRs developed for the diagnosis of *P. marinus* and *P. beihaiensis* have limitations; because they were not designed to distinguish among the seven species within the genus, they are neither fully specific nor validated. Considering the spread of *Perkinsus* spp. over the continents, prompted by several factors (environmental or anthropogenic), there is an urgent need to accurately detect *Perkinsus* species infecting hosts in areas of co-occurrence or coinfection. In the present study, we developed two species-specific qPCRs for the detection of these protozoan parasites *P. marinus* and *P. beihaiensis* that are spreading worldwide.

1. Introduction

Mariculture is a significant economic and social activity worldwide, among which, mollusk production stands out. According to the FAO, it increased by 15.6 % from 2020 to 2022, representing 20 % (approximately 19 million metric tons) of total marine and coastal aquaculture; and oysters were by far the most cultivated group (7 million metric tons) (FAO, 2024).

In Brazil, bivalve farming began in the 1970 s with the introduction of *Magallana gigas* spat production in a hatchery supported by scientific research (Suplicy, 2022). Afterwards, progress was made to produce other native bivalves' species, such as the scallop *Nodipecten nodosus*, the brown mussel *Perna perna*, and more recently, the native oysters *Crassostrea gasar* and *C. rhizophorae* (de Souza et al., 2022; Suplicy, 2022; Valenti et al., 2021). Although national bivalve production is still low (9,000 metric tons), oyster farming is expanding. It is now supported by two hatcheries strategically located in the country's Southern and Northeastern regions.

Worldwide, oyster farming has suffered irreparable economic losses due to mortalities caused by infectious diseases. The most important pathogens affecting mollusks include viruses, bacteria, and protozoa (Arzul et al., 2017; Smolowitz, 2013; Travers et al., 2015). Protozoan parasites, such as *Perkinsus marinus* and *Haplosporidium nelsoni* or *Bonamia ostreae* and *Marteilia refringens*, decimated wild and farmed populations of oysters *Crassostrea virginica* (Andrews, 1988; Burreson and Ragone-Calvo, 1996) and *Ostrea edulis*, in the United States and Europe, in the 1960 s and 1970 s, respectively (Pouvreau et al., 2023). Because protozoan parasites remain a significant threat to bivalve production worldwide, the most harmful ones are listed by the World Organization for Animal Health (WOAH) as compulsory notification. The list includes *P. marinus* and *P. olsenii*.

A recent review of *Perkinsus* spp. occurrence in South America

* Corresponding author.
E-mail addresses: kamilasantoss13@gmail.com (K. dos Santos Bezerra), natan.cbio@gmail.com (N.D. Farias), sofiacoutinho1@hotmail.com (S.L. de Oliveira Coutinho), darlaniasantosdasilva@gmail.com (D.S. da Silva), mirella_dasilva@hotmail.com, p.mirella.dasilva@dbm.ufpb.br (P.M. da Silva).

https://doi.org/10.1016/j.jip.2026.108530
Received 18 July 2025; Received in revised form 30 December 2025; Accepted 8 January 2026
Available online 11 January 2026
0022-2011/© 2026 Published by Elsevier Inc.