

Produção de Moluscos Bivalves e Fatores de Risco Associados

Daniel Silveira Pires

Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Zootécnica – Produção Animal

Orientadores: Professor Doutor Fernando Afonso

Investigador Principal Francisco Ruano

Júri:

Presidente: Doutora Luísa Almeida Lima Falcão e Cunha, Professora Associada com Agregação do(a) Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa.

Vogais: Licenciado Francisco D'Assis Lopes Ruano, Investigador Principal do(a) Instituto Português do Mar e da Atmosfera, orientador;

Doutora Maria Manuel Pimenta Angélico, Investigadora Auxiliar do(a) Instituto Português do Mar e da Atmosfera;

Doutor Paulo José de Lemos Branco, Bolseiro de Pós-Doutoramento do(a) Fundação para a Ciência e a Tecnologia.

I. Agradecimentos

Em primeiro lugar quero agradecer aos meus orientadores, ao prof. Fernando Afonso e ao Dr. Francisco Ruano, pelo apoio demonstrado, pelos ensinamentos valiosos, disponibilidade, incentivo constante e a orientação científica prestada ao longo da realização da dissertação. Muito obrigado por me terem ajudado a evoluir enquanto pessoa e profissional, assim como pela amizade demonstrada. Agradeço também ao Dr. Telmo Nunes pela ajuda prestada com o programa estatístico, foi sem dúvida fundamental para compreender as suas funcionalidades.

Aos dirigentes e pessoal do Instituto Português do Mar e da Atmosfera (IPMA), I.P., especialmente aos do laboratório de Patologia da divisão de Aquicultura e Valorização, pela oportunidade de realizar este estágio e ajuda prestada de forma a elaborar a dissertação de mestrado. Quero agradecer também ao Sistema Nacional de Monitorização de Moluscos Bivalves, pelo financiamento das amostras usadas para a realização do trabalho prático.

À minha família, sem vocês nada disto seria possível! Pai e mãe agradeço-vos todo o investimento que fizeram na minha formação académica, pelo acompanhamento e ajuda que prestaram ao longo de toda a minha vida, o que permitiu terminar concluir esta etapa. Um obrigado não chega para vos agradecer tudo que fizeram por mim!

À família Monteiro, pelo carinho e amizade demonstrado, contribuíram em muito para o meu sucesso enquanto estudante e enquanto pessoa, agradeço-vos de coração.

E finalmente a ti Cátia, um agradecimento especial, pela pessoa maravilhosa que és e aquilo que representas para mim. Durante todos estes anos acompanhaste o meu crescimento e foste muito importante em todas estas etapas. Obrigado por tudo!

II. Resumo

A cultura de moluscos bivalves (moluscicultura) é uma atividade com elevada expressão na aquacultura portuguesa, representando 55% da produção total e a produção de amêijoas representa cerca de 24% do total produzido. A amêijoia-bia, *Ruditapes decussatus*, é a espécie de maior importância económica, mas, nos últimos anos, a sua produção diminuiu associada a diversos fatores, como a sobre-exploração e doenças como a *Perkinsiose*.

Para enfrentar a diminuição de *R. decussatus*, esta foi substituída pela amêijoia-japonesa, *Ruditapes philippinarum*, que aparentava ter maior resistência a doenças e maiores taxas de crescimento. Apesar da rápida expansão desta espécie em águas portuguesas, a amêijoia nativa continua a ser comercialmente mais importante e apreciada do que a amêijoia-japonesa pela sua qualidade.

O objetivo deste estudo foi avaliar os métodos de diagnóstico da *Perkinsiose* em duas espécies de amêijoas de locais distintos. Utilizaram-se como métodos o teste RFTM (teste referência) e a histopatologia (método complementar). As amostras foram coletadas em Outubro de 2017 e Abril de 2018 em 6 locais diferentes, com n=50 para cada local (exceto no Estuário do Tejo (2017) com n=47) correspondendo a um total de 297 espécimes examinados.

Os resultados mostraram que a amêijoia-bia tinha maior prevalência da doença, principalmente a produzida em Olhão. A amêijoia-japonesa também teve casos positivos, embora com menor nível de infeção. Este estudo sugeriu que para diagnosticar a *Perkinsiose*, o teste RFTM é eficaz, menos dispendioso e mais rápido. Mas deve ser complementado por análises histopatológicas especialmente em animais com baixa infeção.

Tendo em conta as condições ambientais nos diferentes locais, é notório que o *stress* ambiental causado por altas salinidades e temperaturas da água, a baixa concentração de oxigénio nos sedimentos, altas densidades e *stress* fisiológico devido à época de desova contribuem para aumentar a prevalência e propagação da doença.

Palavras-chave: Moluscicultura; *Ruditapes decussatus*; *Ruditapes philippinarum*; *Perkinsiose*; Diagnóstico.

III. Abstract

The culture of bivalve molluscs (molusciculture) is an activity with high expression in Portuguese aquaculture, representing 55% of the total production. The production of clams represents about 24% of the total produced. European clam, *Ruditapes decussatus*, is economically the most important species. However, in recent years its production has decreased associated with several factors such as overfishing and diseases like *Perkinsiosis*.

To face the decrease of *R. decussatus*, it was replaced by the Japanese clams, *Ruditapes philippinarum*, which appears to have greater resistance to diseases and growing rates. Despite the rapid expansion of this species in Portuguese waters, the native clam remains commercially more important and appreciated than the Japanese clam because of its quality.

The objective of this study was to evaluate methods of diagnosing *Perkinsiosis* in two species of clams from different sites. The RFTM test (reference test) and histopathology (complementary method) were used as methods. Samples were collected in October 2017 and April 2018 from 6 different sites, with an n=50 for each site (except in the Tejo Estuary (2017) with n=47) corresponding to a total of 297 specimens examined.

The results showed that the European clam had a higher prevalence of the disease, mainly those produced in Olhão. The Japanese clams also had positive cases, although, with a lower level of infection. This study suggested that to diagnose *Perkinsiosis*, the RFTM test is effective, less expensive and faster. Nonetheless, it should be complemented by histopathological analyses especially in animals with low infection.

Taking in account the environmental conditions in different sites, it is clear that the environmental stress caused by high salinities, water temperatures, low oxygen concentration in the sediments, high densities and physiological stress due to the spawning season, contribute to an increase in the prevalence and spread of the disease.

Keywords: Molusciculture; *Ruditapes decussatus*; *Ruditapes philippinarum*; *Perkinsiosis*; Diagnosis.

IV. Trabalhos apresentados em conferência Internacional

Foram apresentados 3 trabalhos sob a forma de comunicação em painel, incluídos no livro de resumos, na AQUA 2018, Montpellier, França, 25-29 Agosto.

Esta conferência foi organizada pela WAS (World Aquaculture Society) e pela EAS (European Aquaculture Society).

1. Pires, D., Grade, A., Afonso, F., Ruano, F. Prevalence of *Perkinsiosis* in the clams *Ruditapes decussatus* and *Ruditapes philippinarum* in Portugal. Aqua 2018, 25-29 August. Montpellier, France.
2. Grade, A., Pires, D., Afonso, F., Ruano, F. Presence of the Ostreid Herpesvirus in Portuguese Oyster, *Crassostrea angulata*, in Sado Estuary and in Mira River, Portugal. Aqua 2018, 25-29 August. Montpellier, France.
3. Marques, R., Pires, D., Ruano, F., Afonso, F. Studies on the behaviour of *Neocardina davidi* var red when exposed to different colored light spectrums. Aqua 2018, 25-29 August. Montpellier, France.

V. Índice

I. Agradecimentos	ii
II. Resumo	iii
III. Abstract	iv
IV. Trabalhos apresentados em conferência Internacional	v
VI. Índice de figuras	vii
VII. Índice Tabelas	viii
VIII. Lista de abreviaturas	ix
1. Introdução	10
1.1. Biologia e fisiologia dos moluscos bivalves.....	11
1.1.1. Morfologia da concha	12
1.1.2. Manto	12
1.1.3. Sistema respiratório.....	13
1.1.4. Sistema digestivo e excretor	13
1.1.5. Reprodução	14
1.2. Produção de moluscos bivalves e importância socioeconómica	15
1.2.1. Zonas de produção em Portugal.....	18
1.2.2. Técnicas de produção utilizadas para as principais espécies em Portugal	19
1.2.2.1. Ostras (<i>Crassostrea gigas</i> , <i>Crassostrea angulata</i> e <i>Ostrea edulis</i>).....	20
1.2.2.2. Berbigão (<i>Cerastoderma edule</i>).....	24
1.2.2.3. Mexilhão (<i>Mytilus sp.</i>)	25
1.2.2.4. Amêijoas (<i>Ruditapes decussatus</i> e <i>Ruditapes philippinarum</i>).....	26
1.2.2.5. Conquilha (<i>Donax trunculus</i>)	29
1.2.2.6. Produção de larvas em maternidades.....	30
1.3. Fatores de risco associados à produção.....	31
1.3.1. Microbiológicos.....	31
1.3.2. Biotoxinas (DSP, PSP e ASP)	32
1.3.3. Metais contaminantes.....	33
1.3.4. Depuração, afinação/transposição e transformação	34

1.3.5. Doenças que afetam a produção de moluscos bivalves	34
1.3.5.1. <i>Perkinsiose</i>	35
2. Materiais e Métodos	37
2.1. Amostragem	37
2.2. Métodos de diagnóstico	38
2.2.1. Histologia.....	38
2.2.2. Teste RFTM.....	43
2.3. Análise estatística.....	45
3. Resultados e discussão	45
4. Conclusões e perspectivas futuras	53
5. Referências bibliográficas	55
6. Anexos	64
6.1. Anexo I – Ficha explicativa de exame histopatológico de bivalves.....	64
6.2. Anexo II – Valores preditivos	65
6.3. Anexo III – Prevalência da doença	66
VI. Índice de figuras	
Figura 1- Morfologia interna de uma amêijoia (<i>Ruditapes decussatus</i>) (Adaptado de Auzoux-Bordenave, 1995).....	11
Figura 2- Representação esquemática dos processos fisiológicos e inter-relações que ocorrem no interior de um molusco bivalve (fonte: Labarta et al., 2004).....	14
Figura 3- Evolução da produção aquícola em Portugal (fonte: REAambiente, 2017).....	16
Figura 4- Evolução do valor da produção aquícola em Portugal (fonte: REAambiente, 2017)	17
Figura 5- Percentagem do total das espécies produzidas em Portugal (fonte: INE, 2017)....	17
Figura 6- Ostras juvenis produzidas em maternidades (fonte: Bivalvia.pt).....	22
Figura 7- Berbigão, <i>Cerastoderma edule</i> (fonte: FAO.org, 2018)	24
Figura 8- Mexilhão, <i>Mytilus sp.</i> (fonte: FAO.org, 2018).....	25
Figura 9- Exemplares de amêijoia-boia, <i>Ruditapes decussatus</i>	27
Figura 10- Exemplar de amêijoia-japonesa, <i>Ruditapes philippinarum</i>	28
Figura 11- Amêijoia-boia com os sífões separados	28
Figura 12- Amêijoia-japonesa com os sífões unidos (fonte: ciesm.org, 2018)	28

Figura 13- Conquilha, <i>Donax trunculus</i> . (fonte: José Liétor Gallego)	29
Figura 14- Fotomicrografia de larvas umboladas de <i>Ostrea edulis</i>	30
Figura 15- Viveiro de sapais para crescimento de ostras (fonte: bivalvia.pt)	31
Figura 16- Esquema do ciclo de vida do <i>Perkinsus olseni</i> . (fonte: Ruano et al., 2015)	37
Figura 17- Medição do comprimento da concha de amêijoas.....	38
Figura 18- Bloco de parafina contendo tecido de amêijoas-boas	40
Figura 19- Lâminas com cortes histológicos de amêijoas (H&E)	41
Figura 20- Fotomicrografia de tecido com granulomas, no interior dos quais se observam células parasitárias livres e encapsuladas no tecido (setas) (H&E)	42
Figura 21- Fotomicrografia de tecido do manto com granuloma, contendo células parasitárias livres e encapsuladas (setas) (H&E).....	42
Figura 22- Brânquias coradas com <i>Perkinsus olseni</i> , após 72h de incubação.....	44
Figura 23- Observação microscópica de brânquias com infecção leve de <i>Perkinsus olseni</i> ...44	
Figura 24- Observação microscópica de brânquias com infecção pesada de <i>Perkinsus olseni</i>	44
Figura 25- % de amêijoas-japonesas com diferentes níveis de infecção. Classificação adaptada de Ray (1954)	46
Figura 26- % de amêijoas-boas com diferentes níveis de infecção. Classificação adaptada de Ray (1954).....	47
Figura 27- A prevalência (%) de <i>Perkinsus olseni</i> e intensidades médias de infecção em amêijoas-japonesas e amêijoas-boas. As amostras foram analisadas após os testes RFTM, totalizando 297 amostras.	50
Figura 28- A prevalência (%) de <i>Perkinsus olseni</i> e intensidades médias de infecção em amêijoas-japonesas e amêijoas-boas. As amostras foram analisadas por Histologia, totalizando 297 amostras.....	50

VII. Índice Tabelas

Tabela 1- Nº de animais positivos pelos dois métodos de diagnóstico	45
Tabela 2- Tabela de contingência com os animais positivos e negativos para a <i>Perkinsiose</i> pelos métodos RFTM e histológicos	47
Tabela 3- Tabela com os valores estimados da Sensibilidade, Especificidade, Valor Preditivo Positivo e Valor Preditivo Negativo dos métodos de diagnóstico	49
Tabela 4- Tabela-resumo da prevalência de <i>Perkinsiose</i> em cada local amostrado, a partir dos métodos de diagnóstico utilizados e respectivos IC a 95%	51

VIII. Lista de abreviaturas

FAO - Food and Agriculture Organization

a.C - Antes de Cristo

µm – Micrómetro

cm – Centímetro

mm – Milímetros

m - Metro

UE – União Europeia

Séc. - Século

INE – Instituto Nacional de Estatística

APA- Agência Portuguesa do Ambiente

IPMA – Instituto Português do Mar e da Atmosfera

SNMB – Sistema Nacional de Monitorização de Moluscos Bivalves

°C - Grau Celsius

% - Percentagem

‰ – Permilagem

h - Horas

ETAR – Estação de Tratamento de Águas Residuais

ppm – Partes por mil

OIE – Organização Internacional das Epizootias

WAS - World Aquaculture Society

EAS - European Aquaculture Society

DGAV – Direção-Geral de Alimentação e Veterinária

DGRM – Direção-Geral de Recursos Naturais, Segurança e Serviços Marítimos.

Reg. – Regulamento

ISO - International Organization for Standardization

H&E – Hematoxilina e Eosina

IC – Intervalo de confiança

RFTM - Ray's fluid thioglycolate médium

K – Teste *kappa*

Se – Sensibilidade

Sp – Especificidade

TP – Verdadeira Prevalência

VPN - Valor Preditivo Negativo

VPP – Valor Preditivo Positivo

1. Introdução

A aquacultura desempenha um papel fundamental no que diz respeito à produção de organismos, mas inerente ao aumento e intensificação da produção, surgiram diversos impactos negativos como o aparecimento de doenças provocadas pelo não cumprimento das regras e pelo deficiente manejo (Menezes, 2000). Tendo em conta o nível de exigência imposto por parte dos consumidores, não basta produzir de forma massiva, é também necessário produzir produtos de qualidade e seguros, seguindo técnicas de produção sustentáveis que não afetem o bem-estar animal (Fróis, 2016).

Desde a Conferência Mundial da FAO sobre Aquacultura, realizada em Quioto em 1976, que se previu que este setor iria sofrer uma forte expansão, pois aumentaria a oferta de proteína barata e de qualidade, iria criar emprego e desenvolveria as zonas mais desfavorecidas. Em Portugal, nas últimas duas décadas, houve o crescimento do setor aquícola, potenciado pelos apoios públicos, assim como pelo apoio técnico e científico das instituições de investigação, no entanto este setor ainda não foi capaz de atingir níveis de produção que possibilitem complementar os produtos provenientes da captura selvagem (DGRM, 2014).

A aquacultura de moluscos bivalves (moluscicultura) é uma prática antiga, que remonta, possivelmente ao início das civilizações egípcias e chinesas. Na Europa não é certo o início desta atividade, havendo relatos de que em Itália se iniciou no ano 1 a.C. (Vilela, 1975), ainda assim outros autores fazem referência a França no séc. XIII, mas só teve verdadeira importância económica a partir do séc. XIX (Nunes, 2008). Em Portugal desenvolveu-se a partir do final desse século sobretudo com a produção extensiva tirando proveito de toda a riqueza existente na costa litoral. A partir de 1940 a moluscicultura começou a ter importância socioeconómica, principalmente pelo mercado existente entre Portugal e França da amêijoabo (*Ruditapes decussatus*) (Magalhães *et al.*, 2006).

O cultivo e apanha de moluscos bivalves são duas atividades muito importantes, logo há a necessidade de melhorar as condições de produção e as condições do meio natural envolvente, pois esta atividade está dependente de fatores externos (Gallardi, 2014; Silva *et al.*, 2008), sejam eles de ordem natural, como as variações de temperatura, a variação de alimento, biológica (biotoxinas) e agentes patogénicos (parasitas, bactérias, vírus, etc.) ou de origem antropogénica, como os contaminantes químicos (metais pesados, pesticidas), contaminantes orgânicos (contaminação fecal) e a sobre-exploração de bancos naturais (Silva *et al.*, 2008^a; Ruano, 1997). Os moluscos bivalves para além de funcionarem como indicador da qualidade do meio envolvente, funcionam também como recicladores, seja ao nível da coluna de água ou ao nível do substrato (Ruano, 2008). Estes têm a capacidade de afetar

toda a cadeia alimentar nas suas componentes planctónica e bentónica, modificando a taxa de sedimentação de partículas em suspensão, havendo assim mais disponibilidade alimentar para as diversas espécies animais que coabitam esses nichos ecológicos (Gallardi, 2014).

Esta dissertação teve como objetivo geral identificar fatores de risco associados à produção de moluscos bivalves e como objetivo específico comparar dois métodos de diagnóstico da *Perkinsiose*, em duas espécies de amêijoas, uma vez que se trata da doença que mais tem prejudicado a produção de amêijoas no nosso país. Como tal, tendo em conta a importância socioeconómica da moluscicultura e os perigos que estes produtos alimentares podem trazer para a saúde pública, é fundamental refletir sobre o que poderá ser alterado ao nível da produção de forma a reduzir estes fatores de risco.

1.1. Biologia e fisiologia dos moluscos bivalves

Os moluscos bivalves, representados na figura 1, são animais filtradores suspensívoros, que se alimentam de partículas em suspensão na coluna de água (fitoplâncton) e/ou detritos que se encontram no meio (Gosling, 2003). Estes podem ser encontrados em águas doces e salgadas, sendo a maior parte das espécies marinhas (Silva *et al.*, 2008^a). São animais sésseis que vivem fixados ou enterrados no substrato, tipicamente bentónicos, encontrando-se em zonas de entre marés (inter-tidais), normalmente em águas pouco profundas (Henriques, 1998). Durante a sua vida passam por uma fase pelágica (fase larvar) (Henriques, 1998), durante a qual são planctónicos. A duração desta fase varia consoante a temperatura, salinidade e alimento disponível. De modo geral, o período larvar para espécies de águas temperadas é de 15 a 30 dias e para espécies tropicais é geralmente inferior a 15 dias (condições ambientais favoráveis) (Gosling, 2003).

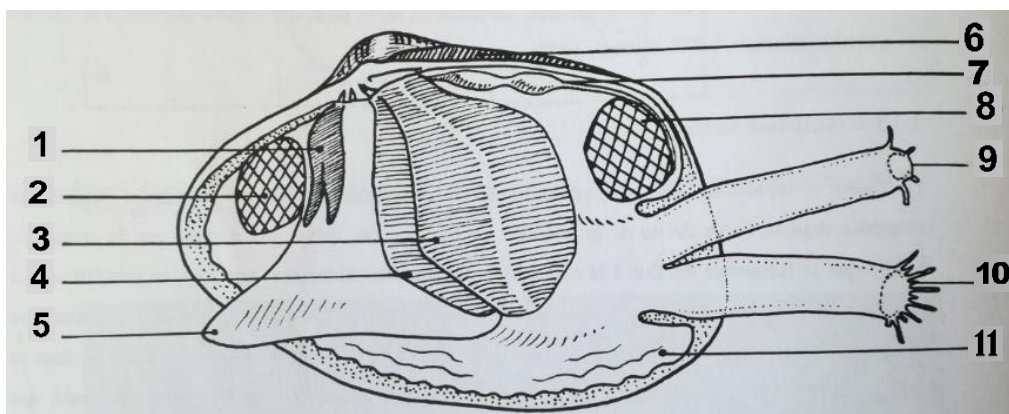


Figura 1- Morfologia interna de uma amêijoas (*Ruditapes decussatus*). 1- Palpos labiais; 2- Músculo adutor anterior; 3- Lamela branquial externa; 4- Lamela branquial interna; 5- Pé; 6- Ligamento; 7- Coração; 8- Músculo adutor posterior; 9- Sifão exalante; 10- Sifão inalante; 11- Manto (Adaptado de Auzoux-Bordenave, 1995)

Existem diversos fatores que fazem variar o crescimento dos moluscos bivalves tais como a temperatura, a oxigenação e os níveis de fitoplâncton existente. Dadas as suas características de filtração, a qualidade e a quantidade de alimento filtrado definem o resultado do seu crescimento (Sarà & Mazzola, 1997).

1.1.1. Morfologia da concha

A concha do molusco bivalve é constituída essencialmente por carbonato de cálcio. É formada por duas valvas que se juntam através de um ligamento forte, situado ao longo da linha de articulação das duas valvas (Galtsoff, 1964). A concha funciona como um exosqueleto que permite a proteção do indivíduo contra predadores ou agentes agressores externos (físicos e químicos) e onde se fixam os músculos adutores e, através destes toda a massa visceral do indivíduo. Apresenta três camadas distintas, o *periostracum* de conchiolina, uma camada de aragonite e uma camada calcária interna (Gosling, 2003).

O ligamento é um órgão com estrutura elástica não-calcificada composta por material proteico e por colagénio. Desempenha principalmente uma função mecânica, pois responde às tensões de compressão exercidas pelos músculos adutores, contraindo-se durante o fecho das valvas e quando a tensão muscular relaxa a elasticidade do ligamento força a reabertura das valvas. Este mecanismo faz com que nos animais mortos ou moribundos as valvas se encontrem sempre abertas (Galtsoff, 1964). Este ligamento não é visível da parte exterior do bivalve, daí que seja denominado por ligamento interno (Haas, 1935). Segundo Belevander & Nakahara (1969), os componentes que constituem a concha são semelhantes aos do ligamento, no entanto apresentam algumas diferenças tais como a concentração em conchiolina, o arranjo e o crescimento dos cristais minerais, tendo como possível explicação a função especializada que o ligamento desempenha.

1.1.2. Manto

O manto é uma serosa fina e transparente, composta por tecido conjuntivo e tecido muscular que envolve todos os órgãos internos e está ligado aos músculos adutores (Galtsoff, 1964), pela massa visceral e pelas brânquias (Grizel, 2003). É constituído por dois folhos (lóbulos) de tecido que envolvem o animal dentro da concha, formando a cavidade paleal (Gosling, 2003). As principais funções do manto são a formação da concha e a secreção do ligamento, mas é também um órgão sensorial com a capacidade de receber estímulos, físicos e químicos, conduzindo-os posteriormente ao sistema nervoso. É este órgão que controla o fecho e abertura das valvas (Galtsoff, 1964). Ao transmitir os estímulos nervosos possibilita que haja a proteção contra agressões, encerrando as duas valvas. Com o fecho das valvas os animais cessam a filtração e realizam um arejamento interno (anaerobiose momentânea), suportando

períodos de anoxia total (zonas inter-tidais) (Jabbour-Zahab *et al.*, 2003). O manto está também ligado à função de respiração, pois permite a troca gasosa entre a superfície dos tecidos e a água (Galtsoff, 1964).

A formação da pérola é uma reação defensiva face à presença de uma partícula estranha que se aloja entre o seu manto e a concha. O molusco bivalve acaba por encapsular essa partícula com camadas sobrepostas de nácar (substância dura constituída por carbonato de cálcio (Henriques, 1998)) formando a pérola (Gosling, 2003).

1.1.3. Sistema respiratório

As brânquias localizam-se em ambos os lados do corpo sob a forma de quatro lâminas subdivididas em lamelas branquiais (Grizel, 2003). As brânquias são o órgão envolvido não só no processo de respiração como na alimentação, já que é através da sua função que o alimento é captado da coluna de água, selecionado e direcionado para o trato digestivo (Gómez-Mendikute *et al.*, 2005).

A classe dominante das espécies de moluscos bivalves é a “Lamellibranchia”. Atualmente considera-se a classe “Eulamellibranchia” a mais avançada, uma vez que possui um sistema de filamentos branquiais com intervalos estreitos entre si, a denominada “ostia”, que permite a otimização dos mecanismos de alimentação e de respiração. Os cílios que revestem todo o epitélio branquial são responsáveis, através dos seus movimentos juntamente com a abertura e fecho ritmado das valvas da concha, por bombear a água para o interior da câmara paleal e conduzi-la através dos filamentos branquiais, seguindo posteriormente até à abertura exalante de forma a ser expelida. As brânquias têm portanto a função respiratória (troca gasosa com a hemolinfa), a função de captar alimento e também estão envolvidas na bioacumulação (Gosling, 2003).

1.1.4. Sistema digestivo e excretor

O sistema digestivo dos moluscos bivalves, ilustrado na figura 2, é adaptado para um tipo particular de alimento em suspensão na coluna de água (maioritariamente fitoplâncton) (Galtsoff, 1964). O alimento retirado da água pelas brânquias é triado através dos palpos labiais. Estes órgãos vão selecionar a componente edível do material filtrado e rejeitar para o exterior sob a forma de pseudofezes a componente não edível. As pseudofezes são assim denominadas uma vez que não sofreram a digestão (Gosling, 2003; Galtsoff, 1964). Este método de alimentação permite absorver os nutrientes e eliminar, na forma de pseudofezes, as partículas de maior dimensão ou sem interesse para a nutrição (APA, 2017).

As partículas passíveis de serem digeridas são encaminhadas para o estômago, um órgão grande e envolvido pela glândula digestiva que se abre por vários ductos e túbulos (Gosling, 2003), e através de uma estrutura de natureza proteica, o estilete cristalino, sofrem uma trituração e mistura. Com o auxílio de enzimas inicia-se o processo digestivo (Henriques, 1998; Gosling, 2003). Após o processo de maceração e mistura, o bolo alimentar é dirigido para o intestino médio e posteriormente para os ductos e túbulos da glândula digestiva onde se completa a digestão. As partículas de alimento sofrem a absorção intracelular e assimilação havendo a formação de resíduos que são levados, juntamente com o material não absorvido (Gosling, 2003; Galtsoff, 1964; Labarta *et al.*, 2004).

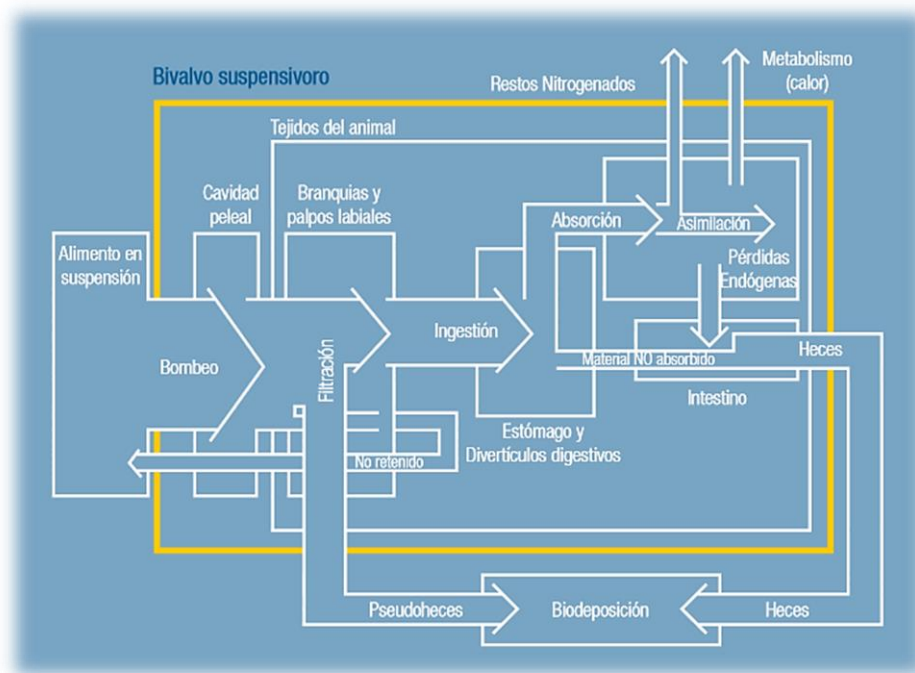


Figura 2- Representação esquemática dos processos fisiológicos e inter-relações que ocorrem no interior de um molusco bivalve (*fonte: Labarta et al., 2004*)

O sistema excretor por sua vez não é visível a olho nu. Consiste em duas partes distintas, uma localizada ao nível do pericárdio e outra inferior ao manto, formando um rim primitivo (Galtsoff, 1964). É possível afirmar que os rins e as glândulas pericárdicas são os principais órgãos excretores presentes nos moluscos bivalves, no entanto, outros órgãos estão envolvidos nesta excreção, tais como o manto e as brânquias (Gosling, 2003).

1.1.5. Reprodução

Os moluscos bivalves, na sua maioria, libertam os gametas (masculinos e femininos) para a coluna de água durante a desova onde ocorrerá a fecundação (exceção de algumas

espécies). Após a fecundação dá-se o desenvolvimento embrionário e larvar, até à fase de larva trocófora e posteriormente larva velígera (Matias, 2008), fases da vida em que o molusco bivalve é planctónico e pelágico (Magalhães *et al.*, 2006). As reservas de energia são muito importantes no período reprodutivo, pois afetam diretamente o desenvolvimento das gónadas, a qualidade dos óvulos e a viabilidade larvar. Portanto a quantidade e qualidade de alimento existente é determinante na reprodução destes animais (Anjos *et al.*, 2016).

Como referido anteriormente, há exceções relativamente ao processo reprodutivo. Existem diferenças reprodutivas entre ostras do género *Ostrea* e do género *Crassostrea*. As ostras do género *Ostrea* são larvíparas, ou seja a fertilização dos óvulos ocorre no interior da própria concha, na cavidade paleal junto das brânquias (Burrell, 1985), realizando a auto fecundação. Após um período de incubação de 8 a 10 dias, dependendo da temperatura, ocorre a libertação das larvas (têm cerca de 160 µm de tamanho) velígeras, iniciando a fase da vida planctónica antes da sua fixação (Lapegue *et al.*, 2008).

As ostras do género *Crassostrea* contrariamente são ovíparas (como a maior parte dos moluscos bivalves), pois expõem os óvulos para o exterior, onde são fecundados posteriormente (Galtsoff, 1964; Gosling, 2003; Henriques, 1998). O ciclo reprodutivo é influenciado por diversos fatores, sendo a alimentação um dos mais importantes (Anjos *et al.*, 2016).

1.2. Produção de moluscos bivalves e importância socioeconómica

Segundo a FAO (2016), aquacultura é a produção de organismos vivos, como peixes, moluscos, crustáceos, plantas, répteis, batráquios e equinodermes, durante o qual pelo menos uma fase das suas vidas é passada no meio aquático havendo a intervenção do Homem.

A aquacultura é neste momento a principal fonte de produtos aquáticos, comparativamente com os produtos provenientes da captura selvagem. A produção de peixe em aquacultura equivale a cerca de metade de todo o peixe consumido no mundo, sendo a China o maior produtor mundial (DGRM, 2018). Dado o seu contributo para a segurança alimentar, o desenvolvimento sustentável deste setor é cada vez mais importante tendo em conta o crescimento demográfico que se prevê até 2050 (Nadarajah & Flaaten, 2017).

A aquacultura desempenha um papel fundamental em todo o Mundo e cada vez mais na Europa, pois possibilita o autoaprovisionamento, diminuindo por conseguinte as importações. Com o aumento da procura deste tipo de alimentos houve a necessidade de desenvolver este setor na Europa (Lagares *et al.*, 2018). O setor aquícola apesar de estar em expansão, não

teve o crescimento esperado, por diversas razões tais como a competição que existe com o setor do turismo (zonas balneares coincidentes com as zonas de produção aquícola) (Lagares *et al.*, 2018; DGRM, 2014), a falta de recursos, a crítica gerada sobre o impacto ambiental causado, entre outras causas que têm travado a expansão mais acentuada deste setor (Kaiser & Stead, 2002; Lagares *et al.*, 2018).

Portugal, face à sua localização geográfica, apresenta todas as condições para ser de excelência no que diz respeito à aquacultura, tanto ao nível da intensiva como da tradicional (Henriques, 1998). Em Portugal, a produção aquícola, no ano de 2015 foi de 9 561 toneladas e gerou uma receita de 54,1 milhões de euros. Face ao ano de 2014 houve uma diminuição em termos de quantidade (menos 14,8%) (fig. 3), no entanto aumentou em termos de valor (4%) (fig. 4) (INE, 2017).

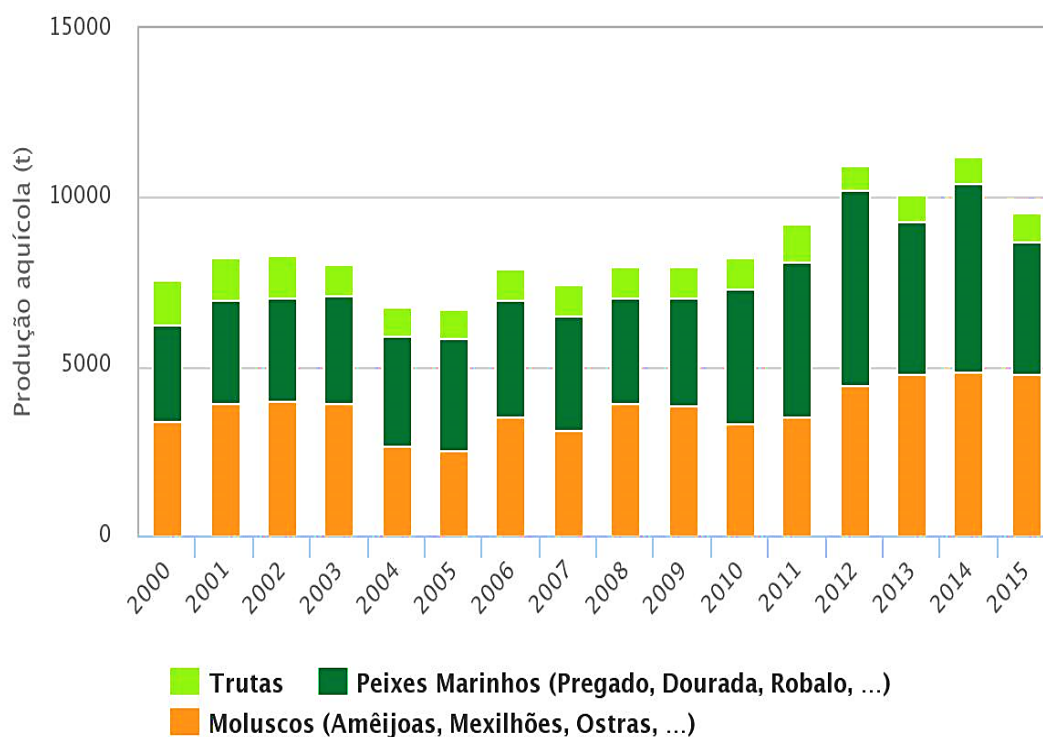


Figura 3- Evolução da produção aquícola em Portugal (fonte: REAambiente, 2017)

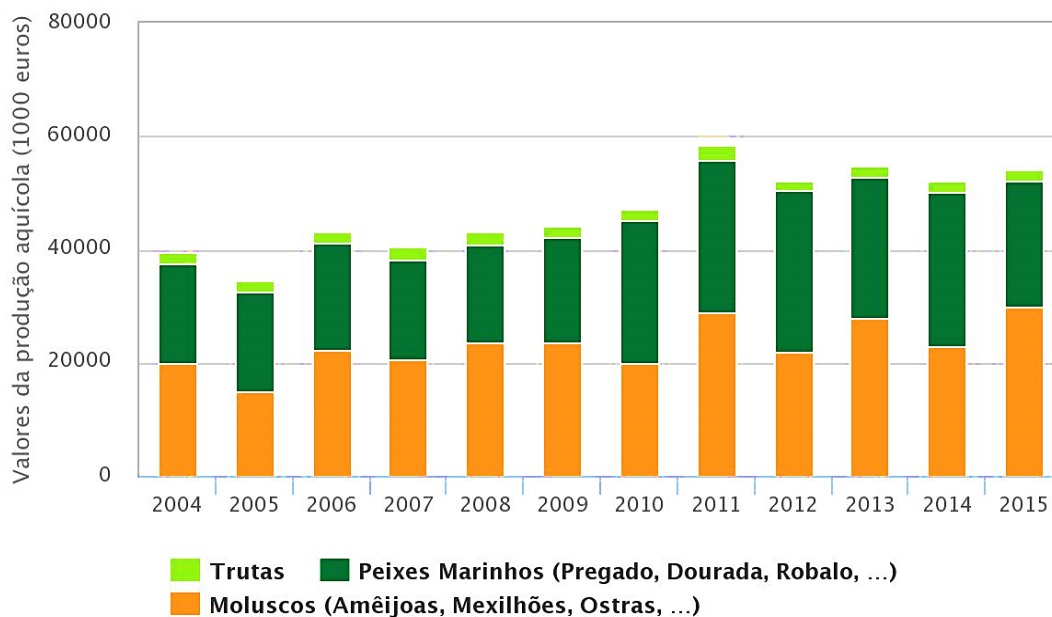


Figura 4- Evolução do valor da produção aquícola em Portugal (fonte: REAambiente, 2017)

A produção em águas salobras e marinhas é a que está mais representada, com cerca de 91% da produção total, sendo que 45% corresponde à produção de peixe (87,3% do qual é de pregado e dourada) e 55% corresponde à produção de moluscos bivalves. Do total produzido em aquacultura cerca de 24% corresponde à produção de amêijoas, ocupando uma percentagem importante como é possível verificar pela figura 5. Em relação aos estabelecimentos licenciados, no ano de 2015, cerca de 87,7% eram de viveiros de moluscos bivalves (maioria localizados na Ria Formosa), 9,6% de viveiros de peixes e 2,3% de estruturas flutuantes (para produção de moluscos bivalves) (INE, 2017).

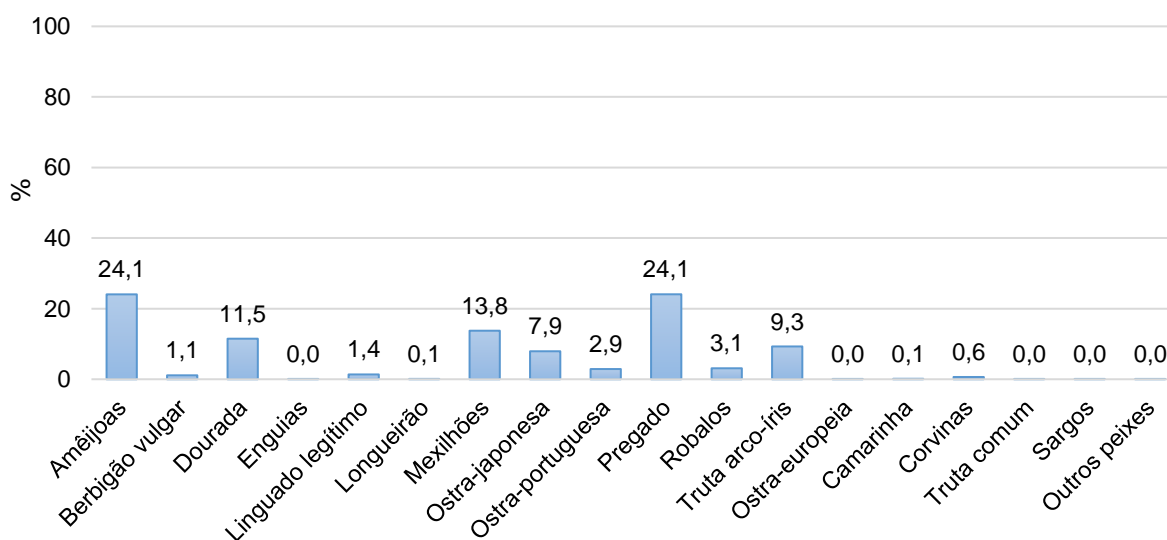


Figura 5- Percentagem do total das espécies produzidas em Portugal (fonte: INE, 2017)

A aquacultura em Portugal realiza-se maioritariamente em sistemas extensivos, no caso de águas salobras e marinhas (DGRM, 2018; INE, 2017) e em sistemas intensivos no caso de águas doces. Em relação à produção de moluscos bivalves grande parte da produção ocorre em estuários, rias e lagoas em zonas inter-tidais ou de águas profundas no caso da utilização de jangadas e “longlines” (INE, 2017).

Houve uma alteração significativa dos regimes de produção de moluscos bivalves. Inicialmente optava-se exclusivamente pela produção semi-intensiva em grandes áreas, neste momento opta-se em muitos casos pela intensificação da produção em menos área de terreno, aumentando a densidade animal. Esta opção provocou mudanças que se traduziram em taxas de crescimento reduzidas, menor qualidade dos produtos obtidos, taxas de fecundidade mais baixas e epizootias (Grizel *et al.*, 1987).

1.2.1. Zonas de produção em Portugal

A costa litoral Portuguesa apresenta uma vasta gama de ecossistemas diferentes que proporcionam nichos ecológicos específicos para determinadas espécies. Encontram-se praias rochosas (exposição ao ar, variações de temperatura e salinidade), praias arenosas (menor diversidade do que nas praias rochosas, com especial interesse para moluscos bivalves que habitam estes terrenos), estuários (zonas de crescimento e alimentação para várias espécies, servem de viveiros), lagoas (normalmente de água salobra desempenhando a mesma função dos estuários) e sapais (zonas de vegetação tolerante a salinidade elevada) (Costa, 1998). A riqueza destes ecossistemas permite adotar diferentes produções tirando proveito do que a Natureza pode oferecer.

De acordo com a legislação em vigor relativa ao controlo de salubridade dos moluscos bivalves destinados ao consumo humano (Regulamento Europeu, 2004), nomeadamente o Regulamento (CE) N.º 854/2004, do Parlamento Europeu e do Conselho, de 29 de abril, “obriga à definição e classificação de áreas de produção de moluscos bivalves vivos”, entendendo-se por zona de produção, de acordo com o Regulamento (CE) N.º 853/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 29 de abril, “qualquer parte de território marinho, lagunar ou estuarino que contém bancos naturais de moluscos bivalves ou áreas utilizadas para a cultura de moluscos bivalves, em que os moluscos bivalves vivos são colhidos” (IPMA, 2013). Os moluscos bivalves podem ser apanhados somente em zonas de produção que estejam classificadas (Pedro *et al.*, 2008^c).

De acordo com a Portaria N.º 1421/2006 de 21 de dezembro, compete ao laboratório de estado – Instituto Português do Mar e da Atmosfera (IPMA) promover e coordenar a investigação científica, o desenvolvimento tecnológico, a inovação e a prestação de serviços

no domínio do mar e da atmosfera (IPMA, 2013). Tem como missão classificar as zonas de produção dos moluscos bivalves vivos (Despacho N.º 1851/2017 de 3 de Março); realizar a monitorização das zonas de produção dos moluscos bivalves vivos e estabelecer planos de amostragem; determinar a interdição da apanha e comercialização de moluscos bivalves vivos, comunicando às entidades competentes e operadores económicos (IPMA, 2013).

A classificação das zonas de produção baseia-se na determinação do grau de contaminação fecal. Usa como indicador o nível de contaminação por *Escherichia coli*, quantificando a concentração deste microrganismo na água de suporte e na carne dos moluscos bivalves que nela habitam. O método utilizado para a quantificação de *E. coli* em moluscos bivalves é o número mais provável (NMP) segundo a ISO 16649-3:2015. Com base nessa avaliação criaram-se quatro categorias (A, B, C e proibida). A zona classificada como A apresenta um teor de *E. coli* inferior ou igual a 230 NMP/100 g, podendo os moluscos bivalves ser apanhados e comercializados para consumo humano direto, após passar por um centro de expedição. A zona classificada como B apresenta um teor de *E. coli* de 230-4600 NMP/100g, sendo que nestas zonas os moluscos bivalves podem ser apanhados no entanto destinam-se à depuração (subcapítulo 1.3.4). A zona classificada como C apresenta um teor de *E. coli* de 4600-46000 NMP/100g, podendo os moluscos bivalves ser apanhados no entanto destinam-se unicamente para transposição prolongada (dois meses (Pedro *et al.*, 2008^c; Cachola & Campos, 2006)) ou transformação. Sempre que os teores de *E. coli* estiverem acima das 46000 NMP/100g, a apanha é proibida (Reg. N.º 854/2004; Reg. N.º 2073/2005; Reg. N.º 1441/2007; Reg. N.º 1021/2008; Pedro *et al.*, 2008^b; SNMB, 2015). A apanha é proibida para comercialização e consumo, no entanto pode ser admitida por exemplo para isco (DGAV, 2014).

1.2.2. Técnicas de produção utilizadas para as principais espécies em Portugal

A produção de moluscos bivalves envolve a cultura em viveiros e a apanha no estado selvagem. A apanha no estado selvagem pode ser realizada por mariscadores credenciados ou por indivíduos não credenciados que com auxílio de utensílios próprios procuram a sua subsistência através da exploração dos bancos naturais de moluscos bivalves. Estes procedimentos têm contribuído para a sobre-exploração de alguns bancos naturais, principalmente em estuários, lagoas e rias, promovendo a venda dos moluscos bivalves muitas vezes com tamanho abaixo do permitido, pondo em causa a sobrevivência da espécie. A atividade “marisqueio”, quando não regulada, provoca a sobre-exploração que em conjugação com a degradação dos habitats e o aumento da poluição têm provocado a destruição de vários bancos naturais (Franca *et al.*, 1998).

A cultura em viveiros inicia-se normalmente com a reprodução de animais adultos ou com a captação das pós-larvas no seu estado selvagem. A produção de larvas ocorre em maternidades onde todos os parâmetros estão controlados, sendo a reprodução dos moluscos bivalves conseguida através de métodos de indução da postura, fecundação e incubação. No caso de haver captação natural as pós-larvas são apanhadas em bancos naturais e transferidas para maternidades de pré-engorda. Em ambos os casos, assim que os juvenis atingem o tamanho ideal são transferidos para viveiros ou bancos naturais onde irão crescer até atingirem o tamanho comercial (Matias, 2008).

A escolha dos locais de instalação de maternidades, de pré-engorda e até mesmo engorda, vai depender de vários fatores como o nível de salinidade, a quantidade de sedimentos e detritos orgânicos existentes, os níveis de poluentes, a temperatura da água e as espécies de moluscos bivalves que vão ser produzidas (Burrell, 1985).

As técnicas básicas para a produção de larvas em maternidades são muito semelhantes para todos os bivalves, embora hajam diferenças significativas dependendo das condições ambientais e das espécies produzidas. Os procedimentos incluem a estabulação (retenção), o acondicionamento de reprodutores de modo a completarem a gametogénese (Henriques, 1998), indução da desova, fecundação, incubação, cultura larvar (desenvolvimento larvar e metamorfose), cultura pós-larvar, criação de juvenis e a produção de microalgas (Gosling, 2003; Matias, 2008; Magalhães *et al.*, 2006; Manzi, 1985; Henriques, 1998). Apesar de todos os procedimentos serem fundamentais, segundo Manzi (1985), o sucesso da produção de larvas, consequentemente o sucesso de qualquer maternidade está dependente da quantidade e da qualidade de alimento produzido, neste caso as microalgas (Henriques, 1998; Anjos *et al.*, 2016).

Os moluscos bivalves podem ser capturados todo o ano, mas a sua condição física é ótima no Outono e no Inverno, piorando durante e após a desova (Silva *et al.*, 2008^a).

1.2.2.1. Ostras (*Crassostrea gigas*, *Crassostrea angulata* e *Ostrea edulis*)

A ostra-japonesa, *Crassostrea gigas* (Lamarck, 1835), apresenta duas valvas assimétricas, alongadas (Gosling, 2003) e habita em zonas inter-tidais, fixada a um substrato pela sua valva curva (valva esquerda) (Galtsoff, 1964). É uma espécie muito comum em estuários e é muito utilizada em ostreicultura (produção de ostras), devido à sua rapidez de crescimento e adaptação a diferentes substratos (Silva *et al.*, 2008^a). Estas ostras (*Crassostrea*) são hermafroditas protândricos ou sequenciais, isto é, os indivíduos nascem com sexos separados, podendo contudo mudar de sexo ciclicamente, dependendo dessa mudança de variados fatores. É comum que os juvenis atinjam a maturidade sexual como machos,

mudando para fêmeas mais tarde, e podendo eventualmente voltar à condição de machos, por exemplo em situação de pouco alimento (Galtsoff, 1964).

A ostra-portuguesa, *Crassostrea angulata* (Lamarck, 1835), apresenta duas valvas mais arredondadas, comparativamente à ostra-japonesa, com coloração branco-amarelada, sendo que a valva direita (superior) é mais plana. Esta espécie é nativa de Portugal e tem sido utilizada ao longo dos anos por ostreiculturas de todo o mundo (Silva *et al.*, 2008^a). É uma espécie que sobrevive num intervalo amplo de salinidades, encontrando-se principalmente em habitats estuarinos, sendo capaz de se instalar em diferentes tipos de substrato. Com o aumento da poluição destes habitats em Portugal, associada a outros fatores, houve um declínio da sua produção (Ruano, 1997).

A ostra-plana, *Ostrea edulis* (Linnaeus, 1758), é bastante distinta da ostra-japonesa e da ostra portuguesa, uma vez que se trata de outro género. Apresenta uma concha arredondada de cor cinzenta, com a valva superior completamente plana, daí o seu nome comum (Gosling, 2003). Esta é uma espécie hermafrodita podendo mudar de sexo duas vezes na mesma estação: funciona como macho na fase inicial da estação da desova, muda de seguida para fêmea, e novamente para macho durante o Outono (Galtsoff, 1964) e larvípara pois incuba os ovos antes de serem libertados para o exterior já sob a forma de larva, ao contrário do que ocorre com a ostra-japonesa e a ostra-portuguesa. É nativa da Europa, mas tem vindo a desaparecer principalmente pela doença grave, a *bonamiose* (causada pela *Bonamia ostrea*) que a tem dizimado, levando à redução da sua produção (Silva *et al.*, 2008^a; OIE, 2018^a).

Em Portugal, em finais do séc. XX, as duas ostras comerciais mais importantes eram a ostra-plana e a ostra-portuguesa (Ruano, 1997). A ostra-plana começou por ter uma importância superior, mas a partir do séc. XX foi substituída pela ostra-portuguesa. A ostra-portuguesa revelou ser uma espécie que apresenta características de maior rusticidade, pois tolera intervalos largos de condições ambientais mais severas.

A temperatura da água é um parâmetro fulcral para a produção de ostras. Ao contrário do que acontece nas águas mais a Norte de Portugal, as temperaturas que se verificam na costa portuguesa permitem que haja o crescimento durante todo o ano. Para além do crescimento a temperatura da água influencia também o ciclo reprodutivo. As correntes marítimas são igualmente essenciais pois permitem que haja alimento em suspensão, uma melhor dispersão do oxigénio dissolvido e das larvas durante a desova (Henriques, 1998).

A produção de ostras foi importante economicamente até meados da década de 1970, onde 80-90% dessa produção se destinava à exportação (Ruano, 1997). A poluição foi um fator determinante para a redução da produção de ostras em Portugal, assim como o aparecimento

de várias doenças e a sobre-exploração dos bancos naturais provocada pelo aumento da procura aliada à falta de gestão cuidada (Ruano, 1997). Outros locais no Mundo depararam-se com problemas semelhantes, como demonstrou Burrell (1985), a produção de ostras nos Estados Unidos diminuiu em determinada altura, provavelmente pela falta de larvas (sementes) no meio natural, pelos custos elevados de produção, a falta de mecanização, a poluição existente nos locais de cultivo, o aumento das importações e ainda a perda de influência nos mercados estrangeiros.

Na ostreicultura a obtenção de juvenis é uma das etapas mais importantes. O cultivo de ostras inicia-se com juvenis provenientes de bancos naturais ou de maternidades. A utilização de juvenis provenientes de maternidades (fig. 6), não é somente pelo facto das sementes nos bancos naturais escassearem é também uma forma de proteger os animais contra agentes patogénicos que se encontram no meio. Permite ainda haver juvenis prontos para a fase de pré-engorda durante todo o ano e aliado a isso é uma forma sustentável de evitar a sobre-exploração dos bancos naturais (Ruano, comunicação pessoal).



Figura 6- Ostras juvenis produzidas em maternidades (*fonte: Bivalvia.pt*)

A produção de ostras pode-se iniciar com juvenis produzidos em maternidades ou com captação natural de sementes (pós-larvas) com recurso a coletores (estruturas lisas) que servem de substrato para estas se fixarem. Esta fixação é a etapa que sucede a desova, que é normalmente entre Abril e Setembro (Matias, 2008). Alguns meses após a fixação, os coletores são recolhidos e procede-se à destronçagem das ostras. Uma vez descoladas não

têm a capacidade de voltar a fixar-se a um substrato. As ostras são então transferidas para sistemas de crescimento/engorda para atingirem o tamanho comercial (Henriques, 1998).

Utilizam-se diferentes sistemas de cultivo para a engorda das ostras, em função das condições ambientais. Os sistemas de engorda podem ser de fundo, sobrelevados ou suspensos. No cultivo de fundo a semente é colocada diretamente no sedimento ou em caixas assentes sobre o fundo. Os sistemas sobrelevados são fixos, sendo utilizadas as mesas de estilo francês. Os sistemas suspensos utilizam sistemas de flutuação (longlines ou jangadas) e todo o ciclo de produção decorre ao longo da coluna de água, permanecendo os animais permanentemente imersos.

Existem diversas vantagens e inconvenientes na utilização destes diferentes sistemas. Comparando a produção em suspensão com a produção em substrato (de fundo) ou intermédia (mesas), admite-se que no primeiro caso possam existir mais vantagens, nomeadamente um maior aproveitamento por parte dos animais nessas condições, uma vez que estão permanentemente imersos e a realizar filtração constante, no entanto com menor quantidade e qualidade de alimento disponível. Têm também mais proteção contra predadores e elementos naturais, menor colmatção por parte das algas e sedimentos (este fenómeno ocorre principalmente em produções de fundo e mesas sobrelevadas), melhor qualidade visual e organoléptica do produto final (conchas regulares, menos incidência de ampolagem, etc.) e apresenta maior facilidade no manuseio e apanha dos animais. Por outro lado, existem inconvenientes neste sistema de produção em suspensão como a diminuição da qualidade/quantidade do alimento existente (cerca de 20% do alimento das ostras é microbento, que se encontra em zonas inter-tidais, sendo um alimento muito importante para melhorar a qualidade das ostras) e menor capacidade de resistência por parte dos animais, uma vez que não são sujeitos às marés que lhe conferem rusticidade (comunicação pessoal, Ruano).

Nos estuários a engorda das ostras é feita sobretudo nas mesas sobrelevadas. Usam-se sacos de malha que contêm as ostras e estes são fixos às mesas, havendo periodicamente a sua mobilização e agitação para evitar a colmatção por algas, haver uma correta circulação de água e crescimento de conchas homogéneas. A fase final da engorda ou afinação faz-se com a diminuição da carga animal, favorecendo o aumento de peso da parte edível da ostra. Em condições ótimas, as ostras podem atingir o tamanho comercial mínimo em 9 meses, no entanto normalmente são realizados ciclos de produção de 12 a 18 meses (generalidade dos produtores Algarvios) (APA, 2017).

1.2.2.2. Berbigão (*Cerastoderma edule*)

O berbigão, *Cerastoderma edule* (Linnaeus, 1758) (fig. 7) apresenta uma concha arredondada com costelas radiais. Normalmente é de cor branca, amarelada ou acastanhada. É uma espécie unissexual, com a desova a ocorrer normalmente entre os meses de Maio a Outubro, sendo também uma espécie ovípara, com fecundação externa. Habita em substratos de areia, sendo encontrado em estuários, rias e lagoas (água salobra) (Silva *et al.*, 2008^a). Tem a capacidade de sobreviver enterrado no substrato, uma vez que possui dois sifões que se estendem até à superfície do sedimento, filtrando a água e retendo o alimento (Dabouineau & Ponsero, 2009).

A distribuição geográfica do berbigão, que se estende desde a Noruega ao Senegal (Dabouineau & Ponsero, 2009), depende de variáveis abióticas e bióticas. As abióticas estão relacionadas com as correntes marítimas, tempo de estado emerso, níveis de salinidade e pelas características dos sedimentos da qual faz parte o substrato. As variáveis bióticas estão relacionadas com a competição e predação que existe por parte de outras espécies animais, assim como a sobre-exploração humana (Kater *et al.*, 2006). Estas variáveis são referidas para o berbigão mas podem ser comuns a outros moluscos bivalves, que coabitam nesses habitats.

Segundo Jensen (1993) as taxas de crescimento das populações de berbigão são limitadas pela competição intraespecífica que possa haver nesses locais, como tal é possível afirmar que a produção e cultivo desta espécie, utilizando grandes cargas animais, não atinge o máximo rendimento. Como tal, grande parte do berbigão existente para comércio em Portugal é proveniente da apanha.

A apanha pode ser feita apeada com recurso a artes de pesca como os berbigoeiros ou com embarcações com recurso a dragas de arrasto (recorrendo a meios mecânicos instalados nas embarcações) e ganchorras (ligadas a embarcações sobredimensionadas) (Franca *et al.*, 1998).



Figura 7- Berbigão, *Cerastoderma edule*.
(fonte: FAO.org, 2018)

1.2.2.3. Mexilhão (*Mytilus sp.*)

O mexilhão, *Mytilus sp.* (Lamarck, 1819), tem uma concha simétrica e com forma triangular. Apresenta cor negra e possui um *bissus* que lhe permite fixar a diferentes tipos de substratos. É um animal unissexual e a sua fecundação é realizada no exterior. Na costa litoral portuguesa existem duas espécies que estão bem distribuídas por toda a costa e que são facilmente confundidas, dadas as suas semelhanças fenotípicas, o mexilhão-azul, *Mytilus edulis*, e o mexilhão-mediterrânico, *Mytilus galloprovincialis* (Silva *et al.*, 2008^a).

As principais diferenças fenotípicas entre estas duas espécies são descritas por Seed (1972):

- 1) A cor da borda do manto é roxa/violeta na espécie *M. galloprovincialis* e castanha-amarelada na espécie *M. edulis*;
- 2) A cicatriz do músculo adutor posterior é menor no *M. galloprovincialis* e aparenta estar mais longe da linha média do animal do que no *M. edulis*, isto pelas diferenças existentes nos perfis das conchas;
- 3) O tamanho da charneira (zona de união das valvas) é menor no *M. galloprovincialis*;
- 4) A cor geral da concha no *M. edulis* apresenta raios de coloração mais profunda enquanto que no *M. galloprovincialis* geralmente não estão presentes estes raios, apesar desta característica ser variável. As conchas de ambas as espécies após sofrerem um tratamento térmico (fervura) com soda, acabam por perder o “*periostracum*” e revelam, no caso do *M. edulis*, uma coloração azul-escura e no caso do *M. galloprovincialis* uma coloração roxa/violeta.
- 5) As conchas do *M. galloprovincialis* tendem a ser mais altas e mais planas que as de *M. edulis*, de tamanho similar e do mesmo habitat, no entanto estas características apresentam alguma variação.

Das características acima referidas, aquelas que envolvem a forma geral da concha são as menos fiáveis, uma vez que estes animais são sujeitos a diversas variações fenotípicas. Como a forma da concha é a principal característica de distinção das espécies, optou-se por tratar os mexilhões existentes na costa Portuguesa apenas por *Mytilus sp.* (fig. 8).



Figura 8- Mexilhão, *Mytilus sp.* (fonte: FAO.org, 2018)

Os mexilhões estão presentes em grandes áreas das zonas inter-tidais, desenvolvendo-se ao longo das áreas rochosas da costa oceânica, estuários e rias. A cultura de mexilhões pode ser em suspensão, com o uso de sistemas de jangadas flutuantes utilizando cordas imersas ou com “longlines”. Pode ser realizada em zonas profundas onde os terrenos de cultivo estão permanentemente submersos ou com o uso de estacas situadas nas zonas inter-tidais, onde os mexilhões acabam por não estar constantemente imersos. As estacas são colocadas no solo e os mexilhões são fixados às estacas (Matias, 2008).

Os produtores de mexilhão optam na maioria das vezes pela captação de sementes (larvas) (70% das sementes são captadas em bancos naturais utilizando coletores (Figueras, 1989)). O recrutamento destas sementes ocorre ao longo de todo o ano, principalmente entre os meses de Maio a Setembro (Cáceres-Martínez & Figueras, 1995). A produção dos mexilhões pode ser dividida em cinco etapas distintas, a primeira consiste na captação de semente. A segunda na fixação das sementes em cordas (no caso de se realizar a produção em jangadas com cordas suspensas). A terceira etapa é o desbaste, a quarta etapa o crescimento e a última etapa é a colheita dos mexilhões (Cáceres-Martínez & Figueras, 1995).

As sementes para se fixarem ao substrato (sejam cordas, estacas, etc) segregam o chamado *bissus* que lhes permite a sua fixação. A distribuição dos mexilhões deve ser correta de forma a possibilitar o fluxo de água, permitindo que haja sempre alimento em suspensão disponível para todos os animais. O desbaste/desdobra destina-se a diminuir a carga por cada cabo de produção, uniformizando os tamanhos, desta forma diminuiu-se os riscos de perdas, evitando que os mexilhões caiam, por exemplo com tempestades ou correntes marítimas fortes, favorecendo também o crescimento rápido dos mexilhões. A fase de crescimento deve ocorrer durante cerca de 14 meses. O crescimento não é homogéneo durante todo o ano, no Inverno verifica-se um crescimento mais acentuado, enquanto no Verão o crescimento é mais reduzido. Por fim a colheita dos mexilhões ocorre principalmente de Outubro a Março, pois é a altura em que a procura é superior e os mexilhões apresentam melhores características organolépticas para os consumidores (Figueras, 1989).

Em termos globais cerca de 95% dos mexilhões produzidos são provenientes de aquacultura, tendo como principais produtores a China, Europa, Chile e Nova Zelândia. O Chile e a Nova Zelândia são os principais fornecedores de mexilhões para a UE (Comissão Europeia, 2012).

1.2.2.4. Amêijoas (*Ruditapes decussatus* e *Ruditapes philippinarum*)

A amêijoia-boia, *Ruditapes decussatus* (Linnaeus, 1758), é a espécie mais importante de moluscos bivalves produzida em Portugal (90 % da produção nacional de amêijoia-boia realiza-se na Ria Formosa (Matias *et al.*, 2013)). É abundante nos litorais do oceano Atlântico e do

mar Mediterrâneo (Usero *et al.*, 2005). Esta espécie apresenta uma coloração muito variada, com bandas radiais de diferentes colorações. O seu habitat é composto essencialmente por sedimentos finos, situando-se em zonas inter-tidais (Silva *et al.*, 2008^a). É um animal unissexual, tendo como época de postura a Primavera/Verão, embora a taxa de desova seja superior no final do Verão. A sua capacidade regenerativa das gónadas e a alta taxa de desenvolvimento permite a existência de larvas em quase todos os anos (Matias *et al.*, 2013). A incubação ocorre dentro de água e a fase pelágica dura cerca de 15 dias. A amêijoa-boá (fig. 9) tem dois sífões separados desde a sua inserção. Estes sífões permitem que sobreviva enterrada em profundidade até 30 cm no substrato (c-food.pt, 2018). Nas últimas duas décadas verificou-se a diminuição da produção de amêijoa-boá, possivelmente pela pressão excessiva sobre os bancos naturais (Matias *et al.*, 2013) e doenças graves que surgiram, como a *Perkinsiose* (Ruano *et al.*, 2015; Matias *et al.*, 2013).



Figura 9- Exemplos de amêijoa-boá, *Ruditapes decussatus*.

A amêijoa-japonesa, *Ruditapes philippinarum* (Adams & Reeve, 1850), apresenta uma coloração variável em cores e padrões, podendo aproximar-se do branco, amarelo ou castanho claro, com manchas radiais distribuídas pela concha (fig. 10). A amêijoa-japonesa é nativa de toda a região do mar Amarelo, tendo sido introduzida em várias partes do mundo, acabando por se fixar permanentemente tornando-se numa espécie infestante, competindo com as espécies locais, sendo cada vez mais abundante nos estuários dos rios portugueses (IPMA, 2018^a). Neste momento a apanha excessiva e a produção irregular de amêijoa-boá levaram a grandes importações de amêijoa-japonesa, assim como ao desenvolvimento do cultivo desta espécie, apesar de não ser permitida a sua cultura ou transposição, uma vez que se trata de uma espécie exótica invasora (IPMA, 2018^a), o que contribuiu para o decréscimo da amêijoa-boá (FAO, 2018^g).



Figura 10- Exemplar de amêijoa-japonesa, *Ruditapes philippinarum*.

Muitas vezes as espécies de amêijoa-boia e de amêijoa-japonesa são confundidas pelas suas semelhanças fenotípicas, no entanto há características próprias de cada uma que são utilizadas para as distinguir. A amêijoa-japonesa apresenta os dois sífões unidos ao longo da maior parte do seu comprimento, ao contrário da amêijoa-boia que tem os sífões separados (fig. 11 e fig. 12).



Figura 11- Amêijoa-boia com os sífões separados.

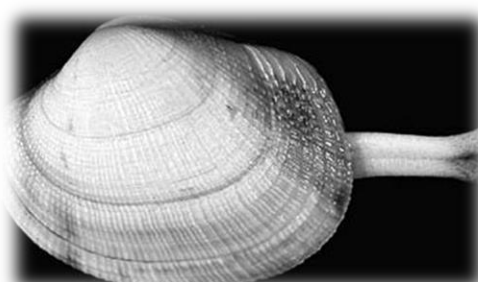


Figura 12- Amêijoa-japonesa com os sífões unidos (fonte: ciesm.org, 2018)

O cultivo de amêijoas pode começar pela captação de sementes de bancos naturais, havendo posteriormente a colocação dessas sementes em zonas inter-tidais, os chamados viveiros, onde os animais irão desenvolver-se até atingirem o tamanho comercial. Caso não se opte pela captação de sementes, procede-se à produção das mesmas em maternidades. Existem duas épocas principais para o cultivo das sementes captadas. A primeira é de Março a Maio (usando juvenis que se estabeleceram no Outono anterior) e a segunda é de Outubro a Dezembro (usando juvenis que se estabeleceram na Primavera anterior). Entre 1 ano e meio e 2 anos, dependendo do tamanho da semente utilizada, a maior parte da amêijoa atinge o tamanho mínimo legal de mercado, rondando os 25 mm, podendo atingir até 50 mm no mesmo período (Ruano, 1997). Cerca de 98% da produção Mundial pertence à China. Na União Europeia a Itália é o principal produtor seguindo-se Portugal, França e Espanha. O mercado

existente com países terceiros é reduzido e mesmo dentro da própria UE o comércio é limitado, havendo alguns fluxos entre França e Itália, para Espanha (Comissão Europeia, 2013).

A produção de amêijoas tem sido afetada em grande número por um parasita protozoário. Diversos fatores estão relacionados com a ocorrência deste parasita, como o tipo de sedimentos (sedimentos lamacentos), a ausência de barreiras físicas entre os diferentes locais de cultivo, as temperaturas acima de 12 °C durante todo o ano e salinidades superiores a 15‰. Todos estes fatores conjugados têm contribuído para o desenvolvimento deste parasita (Ruano, 1997).

1.2.2.5. Conquilha (*Donax trunculus*)

A conquilha (fig. 13), *Donax trunculus*, (Linnaeus 1758) é encontrada no mar Mediterrâneo e na costa atlântica de Portugal. Esta espécie habita geralmente zonas inter-tidais podendo variar entre alguns centímetros até vários metros de profundidade (Zeichen *et al.*, 2002; Silva *et al.*, 2008^a), atingindo uma profundidade de 6 m mas com maiores densidades animais entre 0 e 3 m de profundidade (Gaspar *et al.*, 1999). É um molusco bivalve unissexual (Gaspar *et al.*, 1999), sendo que o sexo pode ser facilmente identificado quando as gónadas estão totalmente desenvolvidas, pois apresentam diferenças em relação à cor: azul-escuro nas fêmeas e amarelo-branco nos machos (Zeichen *et al.*, 2002) e desova normalmente entre a Primavera e o Verão (Gaspar *et al.*, 1999). A conquilha exhibe uma concha brilhante e lisa com um formato triangular. Apesar de estar enterrada no sedimento, alimenta-se de partículas em suspensão, através de sifões longos (Silva *et al.*, 2008^a).

A conquilha é um molusco bivalve muito apreciado em Portugal no entanto devido à sobre-exploração tem vindo a decair o número de indivíduos, uma vez que a produção desta espécie provém apenas da apanha em bancos naturais. A declaração das capturas só passou a ser obrigatória a partir de 1998, no entanto em 1997 foi estimada uma captura de 425 toneladas, demonstrando a importância socioeconómica desta espécie (Gaspar *et al.*, 1999).



Figura 13- Conquilha, *Donax trunculus*.
(fonte: José Liétor Gallego)

1.2.2.6. Produção de larvas em maternidades

A produção de larvas em maternidade é um processo comum a diversos moluscos bivalves, no entanto existem algumas diferenças nos procedimentos específicos de cada espécie. Para a produção de larvas em maternidade, em geral, é necessário proceder à indução da gametogénese, para que as gónadas dos reprodutores se desenvolvam, seguindo-se a indução da desova dos gâmetas e posterior fecundação. A indução da desova pode ser feita através de diversos métodos, tais como choques térmicos, mecânicos, elétricos e químicos (Magalhães *et al.*, 2006; Manzi, 1985; Gosling, 2003; Matias, 2008; Helm *et al.*, 2004.). O método mais difundido e com melhores resultados é o método de indução por choques térmicos (Utting & Spencer, 1991), em que os reprodutores são sujeitos a variações de temperatura, de aproximadamente 10°C. Normalmente a fecundação dá-se ao fim das primeiras 2h e ao fim de 24 a 48h dá-se a formação das larvas trocóforas, o primeiro estágio larvar. De seguida desenvolve-se para larva velígera (larva D) e sofre transformações com o aparecimento do umbo (larva velígera umbolada), representado na figura 14, e aparecimento do pé, que permite a sua fixação ao substrato (larva pedivelígera) através de um cimento proteico, ocorrendo normalmente 22 dias após a fecundação (APA, 2017). A partir desta fase as larvas começam a perder a sua mobilidade (desaparece o aparelho locomotor, o velum) e surge o “olho”, iniciando-se então a fase da vida bentónica. As larvas passam então a designar-se pós-larvas e a partir desse momento as larvas são criadas até atingirem o tamanho ideal para que possam crescer no meio natural (fig. 15) (Henriques, 1998; Vilela, 1975; Matias, 2008; Magalhães *et al.*, 2006). As maternidades podem comercializar a larva após a fixação ou próxima do assentamento (APA, 2017).

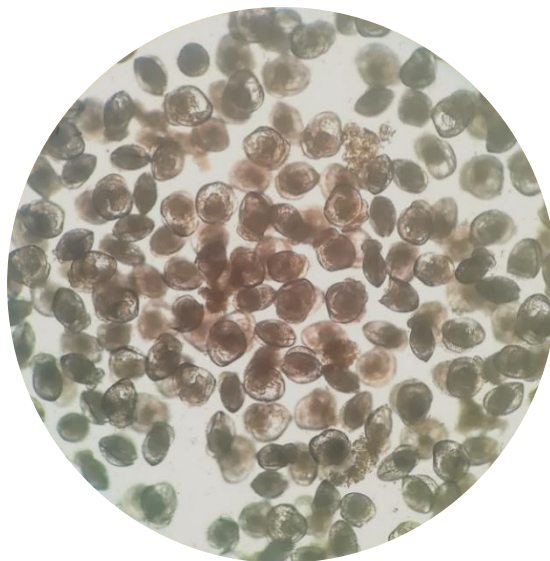


Figura 14- Fotomicrografia de larvas umboladas de *Ostrea edulis*.



Figura 15- Viveiro de sapais para crescimento de ostras (*fonte: bivalvia.pt*)

1.3. Fatores de risco associados à produção

1.3.1. Microbiológicos

A contaminação microbiológica das águas onde existe produção aquícola, na maior parte dos casos é resultado de indústrias, atividades urbanas e atividades de lazer, provocando contaminações fecais de origem pontual (ETARs, fossas, explorações animais, entre outras) e de origem difusa (descargas de veículos, lixiviação de terrenos, sarjetas, entre outros) (Pedro *et al.*, 2008^a). Os organismos microbiológicos presentes nos moluscos bivalves são diversos, havendo diferentes populações de bactérias (*Escherichia coli*, *Clostridium perfringens*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Salmonella* e *Listeria*) (Pedro & Castilho, 2008), de vírus entéricos (norovírus, calicivirus entéricos, vírus da hepatite A, outros enterovírus) (Silva, 2008^a) e de protozoários (Criptosporídios e Giárdias) (Silva, 2008^b).

Geralmente estes microrganismos não são prejudiciais para os moluscos bivalves, no entanto quando consumidos pelo Homem podem provocar uma série de doenças, daí que os níveis de microrganismos existentes das águas e nos moluscos bivalves sejam constantemente analisados. No entanto há casos em que a produção de moluscos bivalves é afetada pelas epizootias provocadas principalmente por fungos, vírus e protozoários. Nestes casos a contaminação microbiológica não só é perigosa para o Homem, como para os próprios

animais, reduzindo drasticamente a produção quando se verificam epidemias graves, como ocorreu com a ostra-portuguesa, em França nos anos 70, em que se verificou mortalidade massiva causada por um iridovirus (Grizel *et al.*, 1987) e em 2009 com a ostra-japonesa (Ruano, comunicação pessoal).

1.3.2. Biotoxinas (DSP, PSP e ASP)

As biotoxinas afetam o sistema nervoso, podendo resultar ou não em sintomas gastrointestinais e respiratórios sendo fatais em casos mais severos (Magalhães *et al.*, 2006). Têm origem em diversas microalgas e dinoflagelados que no seu metabolismo produzem estes elementos tóxicos. Os animais filtradores, como é o caso dos moluscos bivalves, ao consumirem aquelas microalgas retêm e acumulam as biotoxinas no seu interior, podendo então ser uma fonte de contaminação para o Homem (Vale, 2004; Bricelj & Shumway, 1998), aliado ao facto de serem bentónicos e consumidores primários os níveis de biotoxinas no organismo são superiores aos verificados noutros animais marinhos (Bricelj & Shumway, 1998).

Podemos distinguir as três principais intoxicações que ocorrem com o consumo de moluscos bivalves contaminados com biotoxinas, a *Paralytic Shellfish Poisoning* (PSP), a *Diarrhetic Shellfish Poisoning* (DSP) e a *Amnesic Shellfish Poisoning* (ASP).

A intoxicação PSP, é produzida por dinoflagelados (Bricelj & Shumway, 1998), caracteriza-se por apresentar um quadro clínico tipo neurológico, podendo ser fatal em casos mais severos devido a paralisias respiratórias. Em Portugal esta biotoxina tem sido produzida pelo *Gymnodinium catenatum* e ocorre mais frequentemente entre o Outono e Inverno (Vale, 2008). Os moluscos bivalves que normalmente contêm concentrações superiores destas biotoxinas são as conquilhas e os mexilhões (Magalhães *et al.*, 2006).

A intoxicação DSP apresenta exclusivamente um quadro clínico gastrointestinal, com a ocorrência de diarreia, vômitos, dores abdominais e fraqueza muscular (Vale, 2004). Não há registo de mortes provocadas por esta biotoxina. É produzida por microalgas do género *Dinophysis* e a época crítica para a existência destas biotoxinas é entre a Primavera e o Verão, sendo a intoxicação mais comum em Portugal (Vale, 2008).

A intoxicação ASP desencadeia inicialmente um quadro clínico gastrointestinal (24h após ingestão) e neurológico posteriormente (48h após ingestão), sendo este último o crítico, pois pode provocar alucinações e possíveis perdas de memória daí o nome comum usado para caracterizar esta biotoxina (Vale, 2004). É produzida por microalgas do género *Pseudo-*

nitzschia e em Portugal ainda não foram confirmados casos graves relacionados com esta intoxicação (Vale, 2008). Este tipo de biotoxina é mais comum em moluscos bivalves que habitam fundos arenosos, como as amêijoas, berbigões, entre outros (Magalhães *et al.*, 2006).

Estas biotoxinas são termoestáveis, logo o tratamento térmico não resulta para as eliminar, daí que sejam tão importantes pois assim que detetadas acima dos níveis máximos permitidos há a interdição da apanha (Vale, 2008; Magalhães *et al.*, 2006). Para além do tratamento térmico, a depuração não elimina de forma eficaz as biotoxinas, então é fundamental haver um cuidado rigoroso por parte das autoridades competentes (por ex. o IPMA) na monitorização e classificação das zonas de produção. Os moluscos bivalves são analisados com regularidade (semanal), de forma a cumprir o Regulamento (CE) N.º 854/2004 (Costa *et al.*, 2017). Sempre que os níveis de biotoxinas ultrapassem os limites determinados por lei, a apanha destes moluscos bivalves é interdita até que os valores sejam seguros para consumo, havendo o levantamento da interdição (Magalhães *et al.*, 2006).

Os limites regulamentados neste momento são (SNMB, 2015; Reg. (CE) N.º 853/2004; Reg. (EU) N.º 786/2013):

- Amnésicas (ASP): 20 mg de (Ácido domóico + Ácido Epidomóico)/kg;
- Lipofílicas (Grupo ocadaico) (DSP): 160 µg equivalentes de ácido ocadaico/kg;
- Paralisantes (PSP): 800 µg equivalentes de saxitoxina/kg.

A acumulação de biotoxinas nos organismos aquáticos depende da atividade de alimentação, do metabolismo dos organismos e da taxa de eliminação, modificando a transferência de toxinas ao longo da cadeia trófica (Costa *et al.*, 2017).

1.3.3. Metais contaminantes

Os metais contaminantes podem provocar diversos problemas nos humanos, portanto a contaminação de moluscos bivalves com determinadas concentrações de metais pesados é potencialmente perigosa, destacando-se os metais pesados chumbo, cádmio e mercúrio.

O nível máximo admissível de ingestão, por parte do homem, destes três metais pesados é reduzido, logo qualquer alteração dos níveis de acumulação por parte dos moluscos bivalves significará um perigo para a saúde pública. Atualmente, os limites impostos estão presentes no Regulamento (CE) N.º 1881/2006, tendo então como limites máximos admissíveis de mercúrio, chumbo e cádmio, respetivamente, 0,5 mg/kg, 1,5 mg/kg e 1 mg/kg (Silva, *et al.*, 2008^b; SNMB, 2015; IPMA, 2018^b).

1.3.4. Depuração, afinação/transposição e transformação

A depuração desenvolveu-se como forma de combater os focos de doenças associadas ao consumo de moluscos bivalves, sobretudo do foro gastrointestinal como as salmoneloses, e a febre tifoide (final do séc. XIX) (Lee *et al.*, 2008). Neste momento a depuração é obrigatória sempre que os moluscos bivalves são apanhados em áreas contaminadas (zonas classificadas como B) (Reg. (CE) N.º 853/2004 e Reg. (CE) N.º 854/2004). A depuração remove apenas níveis baixos de contaminação microbiana, daí que resulte apenas em moluscos bivalves apanhados em zonas classificadas como B. A eficácia da depuração em eliminar contaminantes químicos ainda não é total (Anacleto *et al.*, 2015). É recomendado que os moluscos bivalves permaneçam durante 24h-48h nos tanques de depuração, totalmente imersos em água do mar esterilizada e após a depuração devem ser realizados ensaios microbiológicos de forma a avaliar a concentração microbiológica existente nos moluscos bivalves (Pedro *et al.*, 2008^c; Lee *et al.*, 2008).

A zona de afinação/transposição é uma zona marinha, lagunar ou estuarina, delimitada por meios fixos e é utilizada exclusivamente para a depuração natural e geralmente mais prolongada dos moluscos bivalves vivos de forma a eliminarem os contaminantes que estão nos seus organismos (Reg. (CE) N.º 853/2004).

A transformação dos moluscos bivalves é um processo realizado em estabelecimentos habilitados a efetuar tratamentos térmicos autorizados, permitindo que animais provenientes de zonas C ou B sejam consumidos após um tratamento. Estes tratamentos podem ser através de esterilização em recipientes hermeticamente fechados ou tratamentos térmicos específicos definidos no Regulamento (CE) N.º 853/2004. A congelação não é considerada um tratamento, pois não assegura a eliminação de todos os microrganismos (DGAV, 2014).

1.3.5. Doenças que afetam a produção de moluscos bivalves

Diversas doenças podem ser prejudiciais à produção de moluscos bivalves e variam consoante a espécie em questão.

Em ostra-portuguesa e ostra-japonesa os principais agentes patogénicos que se verificam são os vírus, nomeadamente iridovírus (provocam a doença das brânquias que afetou a produção de ostra-portuguesa nos anos 70) e herpes vírus, por exemplo o *Ostreid herpesvirus 1 μ var* (provoca a doença estival da ostra, que afetou as populações de ostra-japonesa e de ostra-portuguesa), os fungos (a doença do pé provocada pelo *Oystracomblabe implexa*), copépodes

(lesões tecidulares provocadas pela *Mytilicola sp.*) e anelídeos (ampolagem nas conchas provocada pelas *Polydora sp.*) (Anónimo, 2016). Em ostra-plana verificam-se principalmente problemas provocados por protozoários, tais como a *Bonamia ostrea* (provoca a *bonamiose*) e a *Marteilia refringens* (provoca a *marteliose*) e vírus como o *Ostreid herpesvirus 1 μ var* (Silva *et al.*, 2008^a; OIE, 2018^a; FAO, 2018^b).

Em relação ao mexilhão, *Mytilus sp.*, os principais agentes patogénicos são protozoários, como a *Marteilia maurini* (causa infeções parasitárias) e a *Marteilia refringens* (provoca a *marteliose*) e copépodes, como a *Mytilicola intestinalis* que provoca a doença dos vermes vermelhos (FAO, 2018^d; FAO, 2018^e).

A amêijoia-japonesa e amêijoia-boia têm sido afetadas principalmente por protozoários, como o *Perkinsus olseni* (provoca a *Perkinsiose*) (Azevedo, 1989; FAO, 2018^f; FAO, 2018^g) e o *Haplosporidium tapetis* (*Minchinia tapetis*) (Vilela, 1951; FAO, 2018^f), sendo o *Perkinsus olseni* responsável pela alta mortalidade das populações de amêijoia-boia.

Todas estas doenças são determinantes para o sucesso da produção de cada um dos moluscos bivalves. Tendo em conta a importância da *Perkinsiose*, quanto ao grau de patogenicidade e mortalidade causada em amêijoia-boia, a espécie mais valorizada em moluscicultura em Portugal, decidiu-se abordar o caso prático desta doença, de forma a estudar quais os métodos de diagnóstico mais eficazes a realizar e qual o impacto desta doença nas populações de amêijoia-boia e amêijoia-japonesa.

1.3.5.1. *Perkinsiose*

Diversas doenças podem afetar as amêijoas, sendo a *Perkinsiose* a doença que mais morbidade e mortalidade tem provocado, afetando a produção em Portugal e na Europa.

A *Perkinsiose* é uma doença provocada pelo protozoário *Perkinsus olseni*, que segundo Perkins (1976), pertence à família Apicomplexa. Estudos mais recentes de análise filogenética sugerem que o género *Perkinsus* está mais próximo da família dos Dinoflagelados (Ruano *et al.*, 2015; Herrán *et al.*, 2000). Esta doença é muito comum em amêijoas e tem provocado mortalidades massivas nas populações de amêijoia-boia, contribuindo para o decréscimo da sua produção e consequentemente afetando o seu valor socioeconómico. O primeiro caso reportado de *Perkinsiose* foi provocado pelo *Perkinsus marinus* em ostras americanas (*Crassostrea virginica*) no Golfo do México (Mackin *et al.*, 1950). A segunda espécie identificada de *Perkinsus*, em Portugal foi diagnosticada inicialmente como sendo um “dermo” (*Dermocystidium marinum*) (Perkins, 1976; Azevedo, 1989; Ruano & Cachola, 1986) e mais

tarde considerou-se que seria *Perkinsus olseni* (Azevedo, 1989). Segundo Ruano *et al.*, (2015) e OIE (2016), o *Perkinsus olseni* é a única espécie de *Perkinsus* em Portugal.

Os indivíduos infetados com estes parasitas podem apresentar diversos sinais macroscópicos como tecidos de aspeto aquoso, a glândula digestiva pálida e a presença de nódulos brancos nas lamelas branquiais, manto e no pé (Ruano *et al.*, 2015), no entanto estes sinais não são específicos para a infeção por *P. olseni* (OIE, 2018^b). Ao nível celular há normalmente uma reação celular que se manifesta por infiltrações hemocitárias e hemocitose em diferentes tecidos (Ruano *et al.*, 2015; Choi *et al.*, 2005). As lesões típicas que ocorrem incluem a desorganização celular, autólise e necrose das células, tanto no interior da lesão como próxima da mesma (Azevedo, 1989).

As amêijoas como animais filtradores de baixa mobilidade, estão muito dependentes das condições ambientais, portanto quando estas condições são adversas acabam por provocar *stress* fisiológico nos animais, comprometendo os mecanismos de defesa. O uso de técnicas de produção que envolvem a manipulação intensa bem como a alta densidade de animais geralmente resulta num aumento desse *stress*. A temperatura da água e a salinidade são os principais parâmetros que influenciam a actividade fisiológica dos moluscos e o próprio ciclo de vida do *P. olseni* (Ruano *et al.*, 2015; OIE, 2018^b) (Fig. 16). O parasita tem a capacidade de permanecer em latência até que a temperatura da água e a salinidade sejam favoráveis para o seu desenvolvimento, com temperaturas acima dos 15°C e salinidades próximas de 26 ppm (Ruano, comunicação pessoal; OIE, 2018^b). A transmissão do agente faz-se entre hospedeiros através da água que veicula as formas parasitárias livres, os zoósporos, não havendo por isso agentes vetores nesta doença. Todas as etapas da vida deste parasita são infecciosas (Villalba *et al.*, 2004). A prevalência é variável dependendo das condições do hospedeiro e das condições ambientais (OIE, 2018^b). A alta prevalência deste agente patogénico em amêijoas pode ser atribuída a diversos fatores, tais como sedimentos degradados, grandes cargas animais por m², ausência de barreiras físicas entre diferentes leitos de cultura e transferências de animais portadores da doença (Ruano, 1997). A mortalidade ocorre principalmente entre o final da Primavera e o início do Outono, altura em que os moluscos bivalves desovam e apresentam menor capacidade para resistir ao agente patogénico, devido à debilidade pós-desova (Ruano *et al.*, 2015).

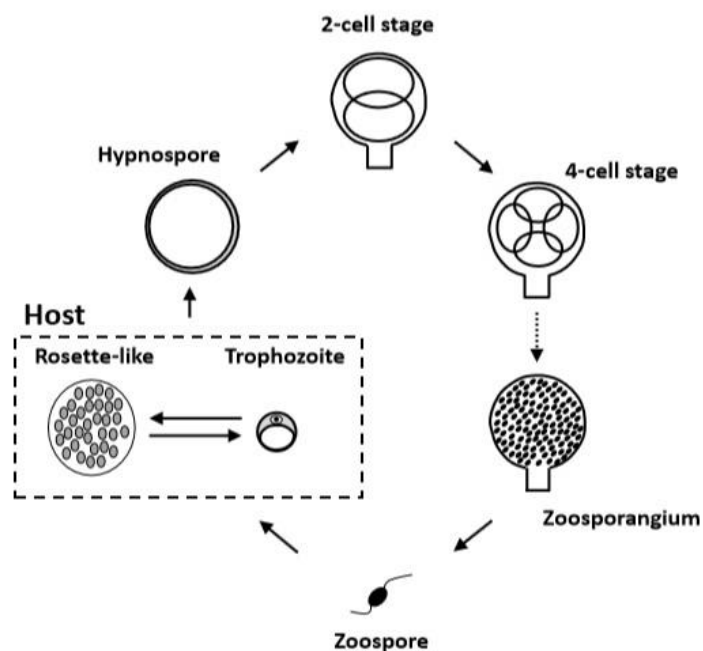


Figura 16- Esquema do ciclo de vida do *Perkinsus olseni* (fonte: Ruano et al., 2015).

Esta doença é de declaração obrigatória a nível mundial (OIE, 2015), sendo somente obrigatório todos os países informarem a OIE sobre a sua presença, pois é preponderante, devido às trocas comerciais, conhecer-se o nível sanitário existente em cada país. Contudo, não é de declaração obrigatória a nível Nacional e a nível da comunidade Europeia (DGAV, 2015), como tal os produtores não são obrigados a reportar casos positivos de *P. olseni*. O *P. marinus*, segundo a DGAV (2015) e OIE (2015), tanto a nível Nacional, como a nível da comunidade Europeia e Internacional é de declaração obrigatória dada a sua gravidade. Neste momento este parasita não está presente em Portugal (OIE, 2015).

2. Materiais e Métodos

2.1. Amostragem

O presente estudo foi realizado no IPMA, no laboratório de patologia da divisão de Aquicultura e Valorização, durante o período de Fevereiro a Setembro de 2018.

Para a realização deste trabalho utilizaram-se 6 amostras de amêijoas, provenientes de diferentes locais da costa portuguesa. A amostragem foi composta por 3 amostras de amêijoa-boia (*Ruditapes decussatus*) e 3 amostras de amêijoa-japonesa (*Ruditapes philippinarum*) com n=50 para cada (exceto a amostra de amêijoa-japonesa do estuário do tejo com n=47).

As amostras foram recolhidas durante o mês de Outubro/2017 e Abril/2018, em viveiros e bancos naturais (estado selvagem). As de amêijoa-bona foram provenientes da Ria de Alvor, Olhão e Ria de Aveiro, enquanto as de amêijoa-japonesa foram do estuário do Tejo, do estuário do Sado e da Ria de Aveiro. Todos os indivíduos tinham tamanho comercial.

Os animais vivos foram colhidos e transportados para o IPMA no âmbito do projeto SNMB (Sistema Nacional de Monitorização de bivalves). Após chegada ao laboratório procedeu-se à preparação e identificação dos indivíduos para análise.

A preparação iniciou-se com a lavagem dos animais, medição da altura das conchas (maior comprimento da concha) (fig. 17) e por fim a abertura do animal, com recolha das partes moles e rejeição das valvas. Após recolha das partes moles colheram-se as peças para histologia e partes de lamelas branquiais para os testes RFTM. A identificação de cada indivíduo foi feita com base nos códigos internos atribuídos pelo IPMA.



Figura 17- Medição do comprimento da concha de amêijoa.

2.2. Métodos de diagnóstico

2.2.1. Histologia

A histologia é o estudo microscópico das células de animais e de plantas e da forma como estes se organizam para formar tecidos (Junqueira & Carneiro, 2013). É o método padrão de diagnóstico de doenças em animais invertebrados, avaliando de forma abrangente doenças e lesões teciduais. As desvantagens deste método são várias, nomeadamente o tempo necessário para a sua realização, o equipamento especial necessário e os custos elevados associados (Howard *et al.*, 2004).

Aparelhos e utensílios usados:

- Material de dessecação (tesoura, bisturi e pinça);
- Processador automático para inclusão em parafina;
- Micrótomo;
- Lâminas e lamelas;
- Líquido de montagem “Entelan”;
- Microscópio ótico.

Reagentes utilizados:

- Fixador Davidson (Shaw & Battle, 1957);
- Parafina líquida;
- Parafina sólida;
- Álcool etílico 70%, 90% e 100%;
- *Kit* coloração Hematoxilina e Eosina;
- Xilol;
- Álcool clorídrico 1%;

Os métodos histológicos realizados neste estudo foram adaptados do protocolo de Howard *et al.*, (2004) e iniciaram-se com os tecidos cortados e devidamente identificados após recepção da amostra. Todos os processos que antecederam a histologia foram realizados de forma a provocar o mínimo de danos possíveis, para preservar todas as partes edíveis dos animais.

Processamento histológico: Fixação, inclusão, blocos, cortes, remoção da parafina (desparafinação), hidratação, coloração, desidratação, clarificação (xilol) e montagem.

Logo após a morte e corte das partes moles fixaram-se os tecidos para evitar quaisquer alterações *post-mortem*. Neste estudo utilizou-se o fixador Davidson (Shaw & Battle, 1957). Este fixador tem a capacidade de penetrar rapidamente nos tecidos prevenindo a autólise das células, permitindo também coagular proteínas, endurecer os tecidos e proteger contra as alterações estruturais (Howard *et al.*, 2004; Junqueira & Carneiro, 2013).

Após a fixação dos tecidos (mínimo 48h e máximo 10 dias) e incorporação em álcool etílico a 70% (até se iniciar o processo de desidratação) realizou-se a desidratação dos mesmos (álcool etílico a 95% durante uma noite + Álcool etílico a 100 % durante 2 horas + Xilol a 100% durante 3 horas) e posteriormente a inclusão em parafina. A parafina utilizada apresentava um ponto de fusão de 56,6°C.

Nesta fase os blocos de parafina foram identificados, representado pela figura 18, e mantidos em refrigeração para facilitar o seu corte histológico (Howard *et al.*, 2004).

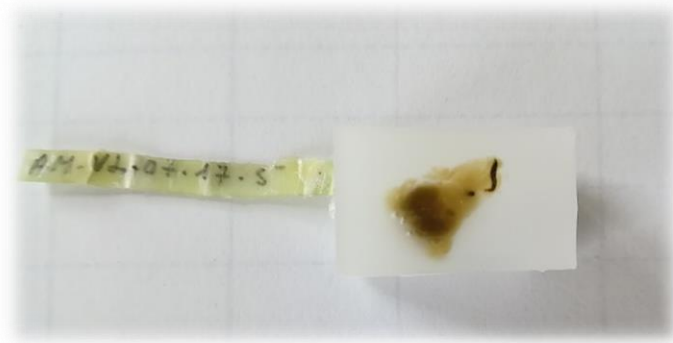


Figura 18- Bloco de parafina contendo tecido de amêijoia-boia.

Os blocos de parafina contendo os tecidos foram então seccionados num micrótomo com uma lâmina de aço. A espessura da secção cortada foi de 5 a 7 micrómetros. De seguida os cortes foram colocados a flutuar sobre a superfície de água aquecida (42°C a 45°C) e posteriormente sobre lâminas de vidro. Todas as lâminas foram registadas com o código interno atribuído a cada indivíduo de forma a manter a rastreabilidade.

Após o corte histológico realizou-se a coloração dos tecidos de forma a possibilitar a sua observação. Neste caso utilizou-se os corantes hematoxilina e eosina, sendo a combinação mais utilizada. A hematoxilina corou em azul/violeta o núcleo das células e outras estruturas ácidas. A eosina corou em cor-de-rosa o citoplasma e as fibras de colagénio (Junqueira & Carneiro, 2013). O processo de coloração dos tecidos iniciou-se após um processo de desparafinação e hidratação. Após a coloração realizou-se outro processo de desidratação e por fim a montagem das lâminas. Todo o processo está representado pelo fluxograma seguinte (adaptado de Howard *et al.*, 2004):

- 1) Imerso em xilol durante 15 minutos;
- 2) Imerso em xilol durante 15 minutos. Final do processo de desparafinação;
- 3) 6 Imersões em álcool a 100%;
- 4) 6 Imersões em álcool a 90%;
- 5) 6 Imersões em álcool a 70%;
- 6) Imerso em água destilada durante 2 minutos. Final do processo de hidratação;
- 7) Início da coloração. Imerso em Hematoxilina durante 4 minutos;
- 8) Imersões em água corrente para remover excesso de hematoxilina;
- 9) 6 Imersões em água destilada;
- 10) 2 Imersões em álcool clorídrico (1% ácido clorídrico);
- 11) 6 Imersões em água destilada;
- 12) Imerso em água morna durante 4 minutos;
- 13) 6 Imersões em água destilada;

- 14) Imerso em Eosina durante 2 minutos;
- 15) Imersões em água corrente para remover excesso de eosina. Final do processo de coloração;
- 16) 6 Imersões em água destilada;
- 17) 6 Imersões em álcool a 95%;
- 18) 6 Imersões em álcool a 95%;
- 19) 6 Imersões em álcool a 100%;
- 20) 6 Imersões em álcool a 100%. Final do processo de desidratação;
- 21) Imerso em xilol durante 5 minutos;
- 22) Imerso em xilol durante 5 minutos.
- 23) Montagem das lâminas.

Após o processo de coloração das preparações montaram-se as lamelas sobre as lâminas (fig. 19). As lâminas foram analisadas num microscópio ótico e através do programa Motic Images Plus 2.0 capturaram-se imagens dos tecidos infetados, como estão representadas nas figuras 20 e 21. Registou-se o observado nos tecidos de cada indivíduo numa ficha explicativa de exame histopatológico de bivalves (Anexo I).

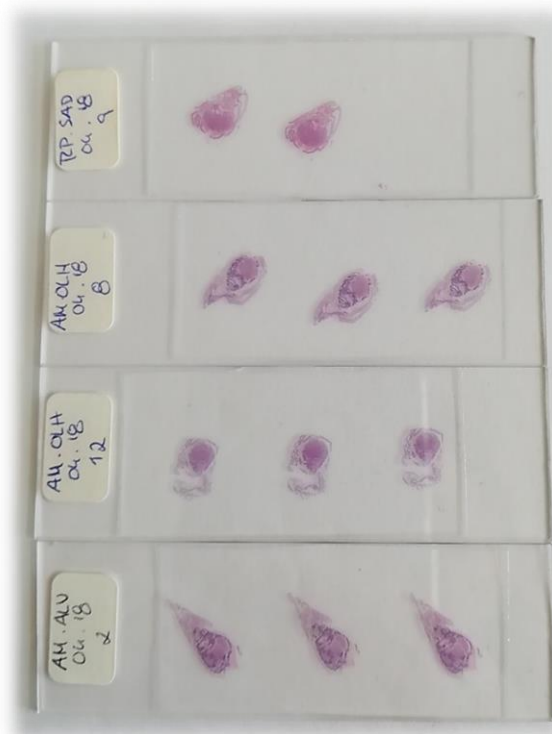


Figura 19- Lâminas com cortes histológicos (H&E).

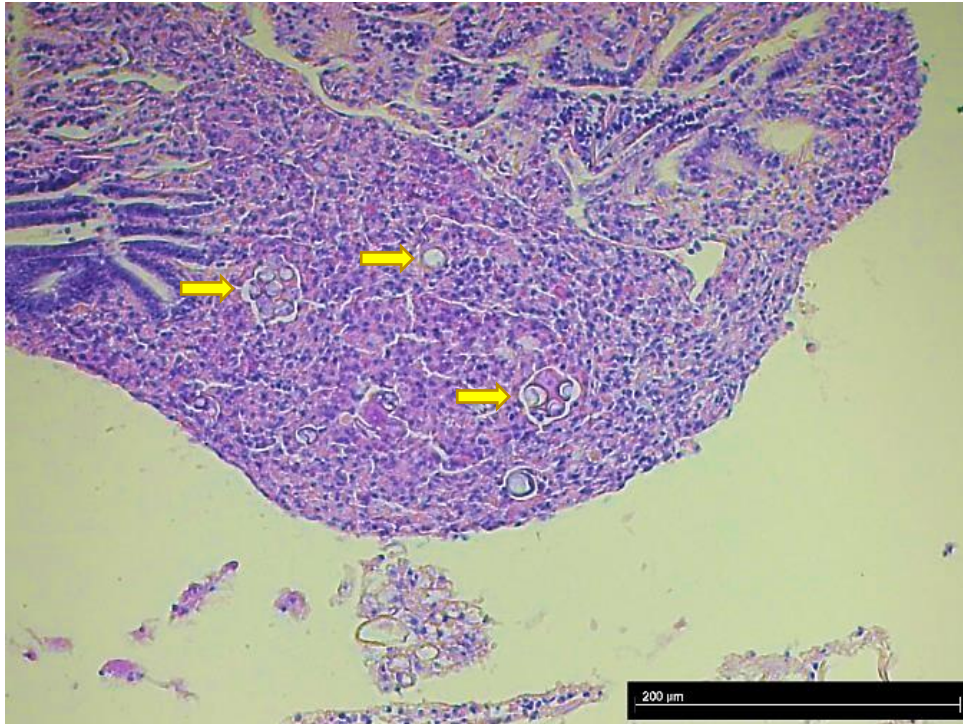


Figura 20- Fotomicrografia de tecido com granulomas, no interior dos quais se observam células parasitárias livres e encapsuladas no tecido (setas) (H&E).

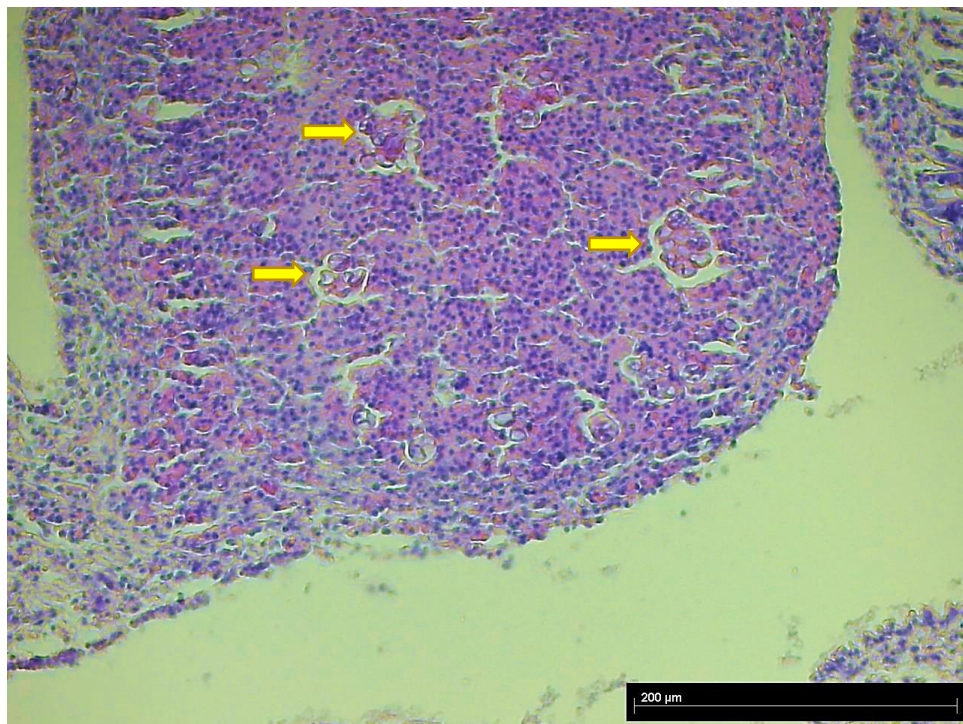


Figura 21- Fotomicrografia de tecido do manto com granuloma, contendo células parasitárias livres e encapsuladas (setas) (H&E).

2.2.2. Teste RFTM

O teste RFTM “Ray’s fluid thioglycolate medium” (Ray, 1952) é um dos mais utilizados para diagnosticar a *Perkinsiose* em moluscos bivalves (Audemard *et al.*, 2008), pela sua simplicidade, baixo custo e sensibilidade, no entanto não é específico da espécie (OIE, 2018^b). Este método permite simular o ambiente perfeito para o desenvolvimento do protozoário *Perkinsus olseni* (Perkins, 1993). Com a introdução dos tecidos dos moluscos bivalves num meio enriquecido de tioglicolato há o crescimento acelerado do parasita (Almeida *et al.*, 1999). As células de *P. olseni* nestas condições podem crescer de 2-10 µm a 50-70 µm, formando hipnosporos (Audemard *et al.*, 2008), que são facilmente identificados, através da coloração com lugol das preparações a fresco.

Aparelhos e utensílios usados:

- Material de dessecação (tesoura, bisturi e pinça);
- Tubos de ensaio;
- Lâminas e lamelas;
- Microscópio ótico;

Reagentes utilizados:

- Meio de tioglicolato com hidróxido de sódio;
- Solução de iodo (lugol);
- Nistatina.

Neste ensaio apenas se utilizou as brânquias das amêijoas, pois é o órgão onde é maior a incidência do parasita (Ruano, comunicação pessoal).

As brânquias após retiradas do corpo das amêijoas foram colocadas no meio de enriquecimento que contém tioglicolato, um antifúngico nistatina e hidróxido de sódio, permanecendo em incubação durante 72h aproximadamente, num ambiente escuro e à temperatura ambiente.

Ao fim das 72h retiraram-se as brânquias do meio, tendo sido posteriormente estendidas sobre lâminas e coradas com uma solução de iodo (lugol), tornando visíveis as células de *P.*

olseni pois adquiriram a coloração escura azulada, possibilitando a sua observação microscópica ou, em casos de infecção pesada, macroscópica (fig. 22).



Figura 22- Brânquias coradas com *Perkinsus olseni*, após 72h de incubação.

As preparações foram todas examinadas num microscópio ótico (fig.23 e fig.24) e classificadas quanto ao nível de infecção, adaptado da escala de Ray (1954):

0 – Sem células parasitárias; 1 – Infecção leve; 2 – Infecção leve-moderada; 3 – Infecção moderada; 4 – Infecção moderada-pesada; 5 – Infecção pesada.

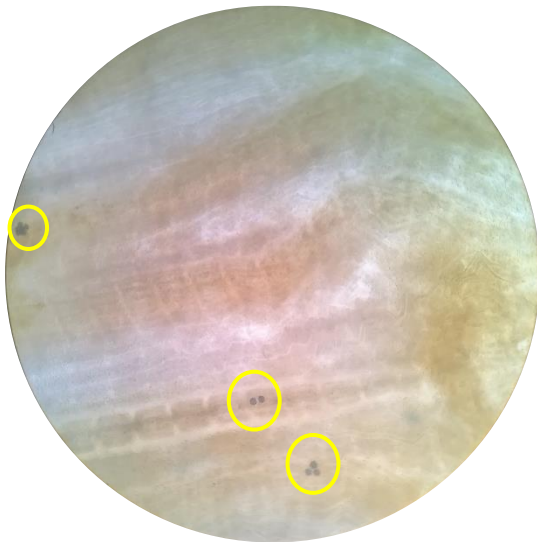


Figura 23- Observação microscópica de brânquias com infecção leve de *Perkinsus olseni*.



Figura 24- Observação microscópica de brânquias com infecção pesada de *Perkinsus olseni*.

2.3. Análise estatística

A análise estatística dos dados foi efetuada através do programa *Epitools* onde se realizou a comparação dos dois métodos de diagnóstico, a determinação da sensibilidade, especificidade, valores preditivos e concordância dos testes. Determinou-se ainda a prevalência da doença e a intensidade média de infeção em cada local. Para outros cálculos, criação de tabelas e gráficos foi utilizado o Microsoft Excel. Como suporte para a análise estatística utilizou-se o livro “Introduction to Veterinary Epidemiology”.

3. Resultados e discussão

O método experimental avaliou o impacto da *Perkinsiose* sobre as amêijoas, impacto esse avaliado pela mortalidade e lesões causadas. A comparação entre as populações de amêijoa-boia e amêijoa-japonesa tornou-se um desafio devido às diferenças nas condições experimentais empregues, como os locais de produção para ambas as espécies, a densidade animal existente e a altura do ano em que as amostras foram colhidas. Como tal, decidiu-se juntar as amostras de 2017 e 2018, para cada local de diferente espécie, uma vez que não houve os mesmos locais para as duas espécies. A tabela 1 mostra o número total de animais positivos para a *Perkinsiose* segundo dois métodos distintos de diagnóstico. Pelo método RFTM, para a amêijoa-boia, registou-se na totalidade 56 casos positivos e para a amêijoa-japonesa 23 casos positivos. No que diz respeito ao diagnóstico pelos métodos histológicos registou-se 66 casos positivos de amêijoa-boia e 51 casos positivos de amêijoa-japonesa.

Tabela 1- Nº de animais positivos pelos dois métodos de diagnóstico.

Locais	Métodos de diagnóstico		Positivos de amêijoa-boia
	RFTM	Histologia	
R. Aveiro	4	8	Positivos de amêijoa-boia
Olhão	40	43	
R. Alvor	12	15	
Locais	Métodos de diagnóstico		Positivos de amêijoa-japonesa
	RFTM	Histologia	
E. Tejo	12	23	Positivos de amêijoa-japonesa
E. Sado	4	18	
R. Aveiro	7	10	

Relativamente ao nível de infeção (fig. 25 e fig. 26) determinado através do teste RFTM, houve alguma diferença entre a intensidade de infeção verificada em amêijoa-japonesa e amêijoa-boa. Os indivíduos foram agrupados por espécie, juntando as amostras de amêijoa-boa e amêijoa-japonesa dos diferentes locais e das diferentes alturas de apanha. Para as amostras de amêijoa-japonesa, quase todos os animais positivos à *Perkinsiose* estavam com níveis de infeção leve (14%), ao contrário das amostras de amêijoa-boa que apresentaram alguma percentagem de animais com infeção moderada a pesada (cerca de 17%). Possivelmente a amêijoa-japonesa tem maior capacidade para resistir ao desenvolvimento do parasita, não atingindo níveis de infeção muito graves mas tendo em conta as variáveis externas que podem fazer variar estes resultados, não é possível concluir que a espécie *R. philippinarum* seja então menos infetada pelo *P. olseni*. Esta classificação do nível de infeção foi subjetiva uma vez que se baseia na observação dos tecidos após o teste RFTM, no entanto permitiu perceber, de certa forma, qual a gravidade da doença e a sua relação, ou não, com espécies e locais diferentes.

O desempenho dos testes de diagnóstico foi avaliado a partir do programa *Epitools*, utilizando os dados obtidos pela observação da histologia e dos testes RFTM. Estes resultados foram cruzados numa tabela de contingência (tabela 2) de forma a determinar a concordância, sensibilidade, especificidade e valores preditivos dos testes.

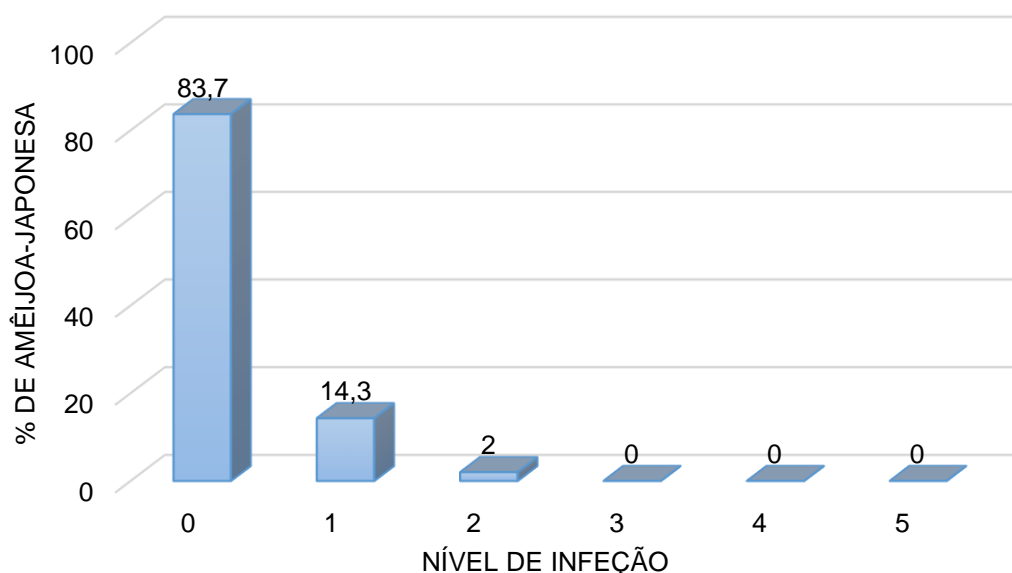


Figura 25- Percentagem de amêijoa-japonesa com diferentes níveis de infeção. Classificação adaptada de Ray (1954).

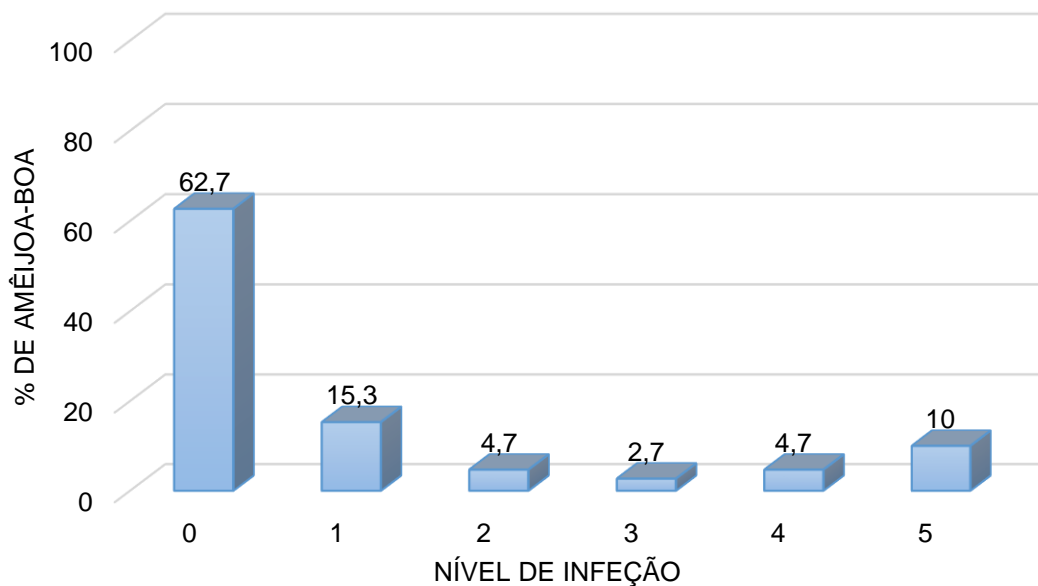


Figura 26- Percentagem de amêijoas-boas com diferentes níveis de infecção. Classificação adaptada de Ray (1954).

Tabela 2- Tabela de contingência com os animais positivos e negativos para a *Perkinsiose* pelos métodos RFTM e histológicos.

<i>Inputs</i>	RFTM +	RFTM –	Total
Histologia +	77	40	117
Histologia –	2	178	180
Total	79	218	297

Para avaliar os métodos de diagnóstico utilizou-se o teste RFTM como “*gold standard*” ou teste referência, servindo como base de comparação para o método histológico. Este teste representou “o verdadeiro estado de saúde dos animais”. Foi determinante perceber que nestes estudos não é possível afirmar com 100% de precisão qual deve ser o verdadeiro diagnóstico dos animais.

Para comparar os dois métodos de diagnóstico calculou-se o nível de concordância entre ambos e obteve-se o valor do teste $kappa (k) = 0,686$ com IC a 95% [0,6017; 0,7703]. Este valor de k permitiu quantificar a relação entre o resultado do teste de diagnóstico e o estado “verdadeiro” da doença, para uma melhor interpretação dos resultados dos testes. Segundo a classificação atribuída por Fleiss (1981), neste caso a concordância existente entre os dois métodos foi excelente, uma vez que $0,6 < k \leq 0,8$, indicando que o uso dos dois métodos foi adequado.

A sensibilidade, especificidade e os valores preditivos estão apresentados na tabela 3. A sensibilidade do diagnóstico (Se), representa a capacidade do teste avaliado em identificar corretamente os animais doentes e, portanto, dá a indicação de quantos falsos-negativos podem ser esperados, permitindo saber a probabilidade do diagnóstico de um animal ser positivo pelo teste RFTM e ser positivo pelo método histológico. Neste caso a sensibilidade foi de 0,975 com IC a 95% [0,9115; 0,9969]. Este valor de sensibilidade atribui alta confiança num resultado negativo, no entanto um resultado positivo não será tão confiável.

A especificidade do diagnóstico (Sp), por outro lado, diz respeito aos animais sem a doença e expressa a proporção de animais com resultados negativos. Representa a capacidade do teste diagnóstico em identificar corretamente os animais não infetados e dá a indicação de quantos resultados falsos-positivos podem ser esperados. Indica-nos a probabilidade de ser negativo pelo teste RFTM e ser negativo pelo método histológico. A especificidade foi de 0,817 com IC a 95% [0,7586; 0,8656].

A prevalência verdadeira (TP) expressa a proporção real de animais, dentro de uma população, que estão infetados. Na realidade, esta informação é impossível de obter, uma vez que a avaliação do estado da doença requer o uso de métodos diagnósticos. No entanto, com o cálculo da TP, Se e Sp é possível determinar os valores preditivos. A TP foi de 0,266.

Os valores preditivos (Anexo II) revelam a probabilidade de um resultado estar a expressar corretamente o verdadeiro estado da doença. O valor preditivo positivo (VPP) representa a probabilidade do resultado positivo do teste refletir a presença da doença. O VPP neste caso foi de 0,658 com IC a 95% [0,565; 0,743].

O valor preditivo negativo (VPN) representa a probabilidade do resultado negativo do teste indicar os animais que não têm a doença. O VPN foi de 0,989 com IC a 95% [0,960; 0,999].

Os resultados negativos dos testes para a *Perkinsiose* em populações de amêijoas, têm 99% de probabilidade de estarem corretos, ou seja os indivíduos amostrados negativos para a *Perkinsiose* não estavam infetados. Os valores preditivos foram interpretados para a prevalência de 26,6%, daí o cálculo do valor da TP.

Tabela 3- Tabela com os valores estimados da Sensibilidade, Especificidade, Valor Preditivo Positivo e Valor Preditivo Negativo dos métodos de diagnóstico.

Resultados	Valor estimado	IC a 95% Limite inferior	IC a 95% Limite superior
Sensibilidade	0,975	0,912	0,997
Especificidade	0,817	0,759	0,866
VPP	0,658	-	-
VPN	0,989	-	-

A prevalência média de *Perkinsus olseni* foi de 39,5 % pelos métodos histológicos e 26,6% pelos testes RFTM. A prevalência de *P. olseni*, estimada por RFTM e por histologia, foi superior em Olhão registando-se também a intensidade média de infecção mais elevada com os valores a variarem entre 2,48 e 2,58, após teste RFTM e histologia, respetivamente.

Da observação das amostras de amêijoja-japonesa do Estuário do Tejo e do Estuário do Sado, registaram-se alterações significativas quando observadas após o teste RFTM (prevalência de 25,5% no E. Tejo e 8% no E. Sado) e após o método histológico (prevalência de 48,9% no E. Tejo e 36% no E. Sado).

Os valores registados, após observação das lâminas histológicas, sugeriram que o nº de indivíduos infetados foi superior aos observados pelo teste RFTM (fig. 27 e fig. 28), havendo diversos fatores que possam ter influenciado estes resultados. O teste RFTM realizou-se com a incubação de uma porção de tecido branquial, logo um resultado do teste negativo não permite afirmar que todo o tecido branquial possa estar livre de infecção. O mesmo acontece para qualquer outro tecido corporal. A observação histológica apesar de não ser o método “*gold standard*” permite observar mais órgãos para além das brânquias, no entanto é também um método falível uma vez que o corte histológico pode não abranger toda a área corporal, comprometendo os resultados, com isso podem surgir casos de falsos-negativos. A observação histológica pode também não ser conclusiva se os agentes patogénicos estiverem num estágio prematuro dos seus desenvolvimentos, impossibilitando a observação microscópica.

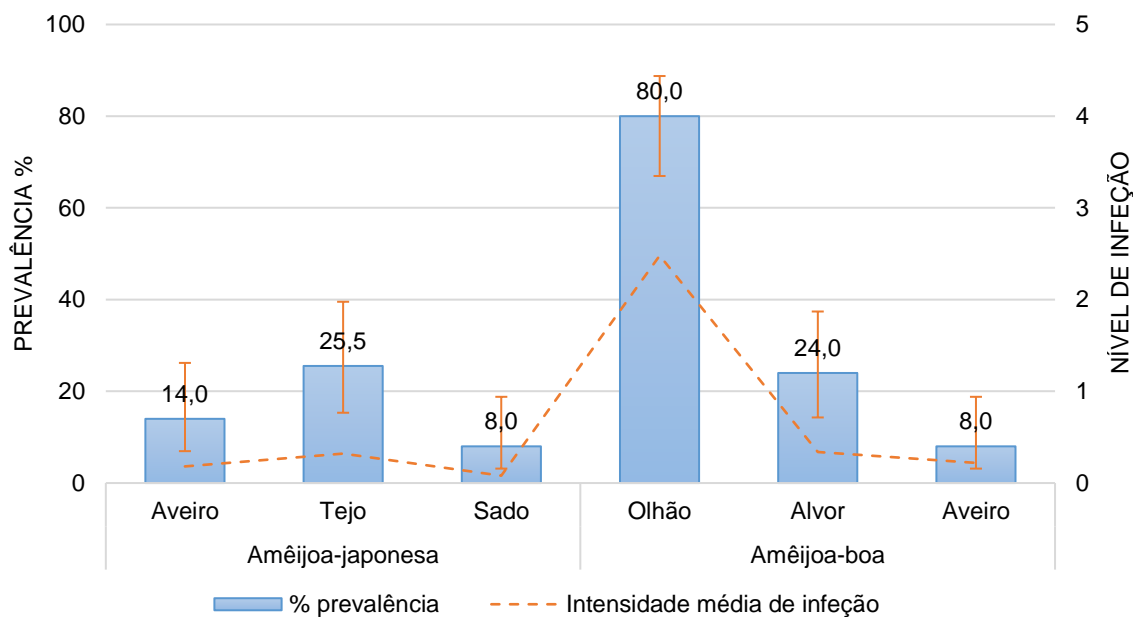


Figura 27- A prevalência (%) de *Perkinsus olseni* e intensidades médias de infecção em amêijoja-japonesa e amêijoja-boia. As amostras foram analisadas após os testes **RFTM**, totalizando 297 amostras. Em cada local foram amostrados 50 indivíduos, exceto no estuário do Tejo (n=47). Para cada local calcularam-se os IC a 95% para a prevalência.

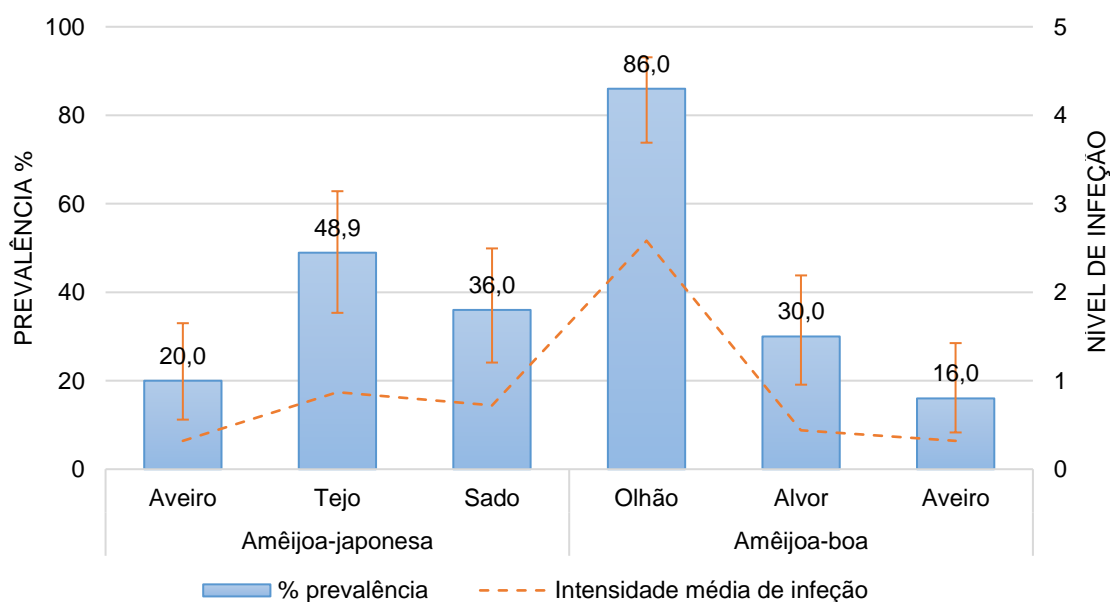


Figura 28- A prevalência (%) de *Perkinsus olseni* e intensidades médias de infecção em amêijoja-japonesa e amêijoja-boia. As amostras foram analisadas por **Histologia**, totalizando 297 amostras. Em cada local foram amostrados 50 indivíduos, exceto no estuário do Tejo (n=47). Para cada local calcularam-se os IC a 95% para a prevalência.

Os intervalos de confiança a 95% obtidos não foram os ideais, uma vez que os valores mínimos e máximos de cada intervalo se distanciaram da prevalência obtida. Isto impossibilitou afirmar com certeza qual a prevalência real em cada local estudado, no entanto sugeriu o estado epidemiológico existente.

Todos os valores registados das diferentes prevalências e respetivos IC a 95% foram agrupados na tabela 4.

Tabela 4- Tabela-resumo da prevalência de *Perkinsiose* em cada local amostrado, a partir dos métodos de diagnóstico utilizados e respetivos IC a 95% (Anexo III).

Prevalência %	IC a 95%		Métodos	Local
80	66,96	88,76	RFTM	<u>Olhão</u>
86	73,80	93,10	Histologia	
24	14,30	37,41	RFTM	<u>R. Alvor</u>
30	19,10	43,80	Histologia	
8	3,15	18,80	RFTM	<u>R. Aveiro</u>
16	8,30	28,50	Histologia	
25,5	15,30	39,50	RFTM	<u>E. Tejo</u>
48,9	35,30	62,80	Histologia	
8	3,15	18,80	RFTM	<u>E. Sado</u>
36	24,10	49,90	Histologia	
14	6,95	26,20	RFTM	<u>R. Aveiro</u>
20	11,20	33,00	Histologia	

A Histologia é usada, normalmente, para analisar situações desconhecidas à partida, uma vez que permite analisar de forma ampla e menos específica, enquanto o teste RFTM é realizado, habitualmente, à *posteriori*, pois é específico para despistar a *Perkinsiose*.

Neste contexto, os métodos histológicos tiveram um desempenho superior aos testes RFTM, no que diz respeito à deteção de animais infetados, mas analisando todos os fatores envolventes, nomeadamente os custos (a histologia é mais dispendiosa), o tempo demorado (os métodos histológicos são mais demorados) e o estado de desenvolvimento do parasita, os métodos histológicos acabam por não ser tão adequadas para este propósito. Analisando todos os resultados obtidos é possível afirmar que as técnicas utilizadas foram adequadas e devem continuar a ser utilizadas. A utilização do teste RFTM, como teste referência, foi

correta, pois possibilitou haver um diagnóstico rápido, direto, barato e fiável. Uma vez que este laboratório é o laboratório do estado de apoio ao setor, a resposta deve ser rápida e de baixo custo. A histologia deve ser realizada sempre que os resultados do teste RFTM não forem conclusivos, como complemento e como análise geral de qualquer indivíduo.

4. Conclusões e perspectivas futuras

A moluscicultura em Portugal tem cada vez mais importância socioeconómica, mas todos os fatores de risco que estão associados têm afetado essa produção. É fundamental haver um controlo mais restrito em todas as fases de produção dos diferentes moluscos bivalves. Só assim possibilitará melhorar o rendimento económico sem pôr em causa o bem-estar animal e ao mesmo tempo eliminar o risco para a saúde dos consumidores.

Os contaminantes microbiológicos, químicos (metais pesados) e biotoxinas são os que têm prejudicado mais a qualidade do produto final. As biotoxinas não são prejudiciais para os próprios animais, no entanto quando estas são consumidas pelo homem podem provocar diversos problemas. Como tal, o controlo e monitorização destes níveis de contaminantes são fundamentais para prevenir quaisquer riscos para a saúde pública.

Outros fatores de risco determinantes são as doenças, específicas ou não, das diferentes espécies de moluscos bivalves, que são provocadas em muitos casos pelo não cumprimento das regras básicas de manejo, nomeadamente o nível de carga animal nas zonas de produção, o tempo de permanência dos moluscos bivalves nessas zonas e a introdução de sementes de origem desconhecida. A melhor forma de combater os agentes patogénicos é através de medidas adequadas de biossegurança, e assegurar técnicas de diagnóstico corretas. A identificação dos agentes patogénicos deve incluir os que se encontram num estágio prematuro dos ciclos de vida, permitindo atuar e evitar a sua multiplicação e proliferação.

Relativamente ao estudo realizado, concluiu-se que as técnicas utilizadas para diagnosticar a *Perkinsiose* em amêijoas foram corretas e cada uma apresenta diferentes vantagens. A histologia é uma técnica dispendiosa, mais demorada, não específica para determinados agentes patogénicos e permite obter um exame do estado geral dos animais. O teste RFTM é uma técnica menos dispendiosa, rápida e específica. Com base nos resultados obtidos os testes RFTM não devem ser utilizados como “*gold standard*”, mas conjugando todos os fatores é o que apresenta melhores resultados com menos custos e de forma mais rápida e direta. Contudo, a histologia deve ser usada como complemento, principalmente em casos não conclusivos. Além disso, é desejável realizar mais estudos com outros métodos de diagnóstico, nomeadamente a quantificação dos agentes patogénicos por biologia molecular. Deveria também ser efetuada a incubação de mais tecidos corporais, para além das brânquias, nos testes RFTM.

Com este estudo foi possível verificar que a *Perkinsiose* tem ameaçado principalmente a amêijoas-boas. A importação de sementes de amêijoas-japonesas, como espécie exótica

invasora, pode ter contribuído para o decréscimo da amêijoa-boia. Além disso, a cultura, depuração e transposição da amêijoa-japonesa não são permitidas, e por isso deve existir mais fiscalização. Esta fiscalização deve ser realizada em zonas de produção para combater o aumento das espécies invasoras e também em zonas de depuração, transposição e transformação, para que os produtos estejam legalmente certificados para consumo. Para além do controlo e fiscalização dos operadores económicos, as autoridades devem impedir que todas as pessoas, incluindo mariscadores lúdicos, infrinjam as regras estabelecidas, nomeadamente, relativamente aos períodos de interdição da apanha e às quantidades máximas de apanha permitidas.

O sucesso da produção de moluscos bivalves só é concretizado, nomeadamente, com a utilização de medidas de biossegurança adequadas, com a aplicação de métodos de diagnóstico corretos e eficientes, com o efetivo cumprimento da legislação e com a divulgação do conhecimento para toda a população.

5. Referências bibliográficas

- Almeida, M., Berthe, F., Thébault, A., Dinis, M., 1999. Whole clam culture as a quantitative diagnostic procedure of *Perkinsus atlanticus* (Apicomplexa, Perkinsea) in clams *Ruditapes decussatus*. *Aquaculture* 177, pp. 325–332.
- Anacleto, P., Maulvault, A., Nunes, M., Carvalho, M., Rosa, R., Marques, A., 2015. Effects of depuration on metal levels and health status of bivalve molluscs. *Food Control* 47, pp. 493–501.
- Anjos, C., Baptista, T., Joaquim, S., Mendes, S., Matias, A., Moura, P., Simões, T., Matias, D., 2016. Broodstock conditioning of the Portuguese oyster (*Crassostrea angulata*, Lamarck, 1819): influence of different diets. *Aquac. Res.* 48, pp. 3859–3878.
- Anónimo, 2016. Projeto “Estado atual da ostra portuguesa (*Crassostrea angulata*) no estuário do ameaças e oportunidades para a sua exploração como recurso – CRASSOSADO” Relatório final.
- APA, 2017. Agência Portuguesa do Ambiente. Boas Práticas em Cultivo de Ostras – Algarve.
- Audemard, C., Carnegie, R., Burrenson, E.M., 2008. Shellfish tissues evaluated for *Perkinsus* spp. using the Ray’s fluid thioglycollate medium culture assay can be used for downstream molecular assays. *Dis. Aquat. Organ.* 80, pp. 235–239.
- Azevedo, C., 1989. Fine structure of *Perkinsus atlanticus* n. sp. (Apicomplexa, Perkinsea) parasite of the clam *Ruditapes decussatus* from Portugal. *J. Parasitol.* 75, pp. 627–635.
- Belevander, G., Nakahara, H., 1969. An electron microscope study of the formation of the ligament of *Mytilus edulis* and *Pinctada radiata*. *Calcif. Tissue Res.* 4, pp. 101–112.
- Bricelj, V., Shumway, S., 1998. Paralytic shellfish toxins in bivalve Molluscs: occurrence, transfer kinetics, and biotransformation. *Rev. Fish. Sci.* 6, pp. 315–383.
- Burrell, V., 1985. Oyster Culture. In Huner, J. V., Brown, E. E., (Eds) Crustacean and mollusk aquaculture in the United States, pp. 235-269.
- Cachola, R., Campos, C., 2006. Redefinição das zonas de produção de bivalves nos sistemas lagunares do algarve no âmbito do programa de monitorização microbiológica. Relatórios Científicos e Técnicos. Série Digital. INIAP
- Cáceres-Martinez, J., Figueras, A., 1995. The Mussel, Oyster, Cockle, Clam and Pectinid Fisheries in Spain. *Mar. Fish. Rev.*
- Choi, K., Park, K., Cho, M., Soudant, P., 2005. Diagnosis, pathology, and taxonomy of

- Perkinsus* sp. isolated from the manila clam *Ruditapes philippinarum* in Korea. *J. Aquac.* 18, pp. 207–214.
- Comissão Europeia, 2012. Acedido em Junho 2018, disponível em https://ec.europa.eu/fisheries/sites/fisheries/files/docs/body/mussels_es.pdf
- Comissão Europeia, 2013. A pesca e a aquicultura na europa nº 60. Acedido em Julho 2018, disponível em https://ec.europa.eu/fisheries/sites/fisheries/files/docs/body/clam_pt.pdf
- Costa, M., 1998. As Zonas Costeiras Portuguesas e a Actividade Humana, pp. 235–242.
- Costa, P., Costa, S., Braga, A., Rodrigues, S., Vale, P., 2017. Relevance and challenges in monitoring marine biotoxins in non-bivalve vectors. *Food Control* 76, pp. 24–33.
- C-food.pt, 2018. Acedido em Março 2018, disponível em <http://c-food.pt/pt/bivalves>.
- Dabouineau, L., Ponsero, A., 2009. Synthèse sur la biologie des coques *Cerastoderma edule*, pp. 1–23.
- Despacho n.º 1848/2017. *Diário da República*, 2.ª série — N.º 45 — 3 de março de 2017.
- DGAV, 2014. Controlo de Qualidade de Moluscos Bivalves Vivos - Guia de Orientação. Direção de Serviços de Segurança Alimentar, Divisão de Controlo da Cadeia Alimentar.
- DGAV, 2015. Lista das doenças de declaração obrigatória a nível Nacional, pp. 1–3.
- DGRM, 2018. Aquicultura e Salicultura. Acedido em Março de 2018, disponível em <https://www.dgrm.mm.gov.pt/web/guest/aquicultura1>.
- DGRM, 2014. Plano Estratégico para a Aquicultura Portuguesa, 2014-2020. Ministério da Agricultura e do Mar.
- FAO, 2018^a. Cultured aquatic species information programme. *Crassostrea gigas* (Lamarck, 1835). Acedido em Abril 2018, disponível em http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Crassostrea_gigas/en
- FAO, 2018^b. Cultured Aquatic Species Information Programme. *Ostrea edulis* (Linnaeus, 1758). Acedido em Junho 2018, disponível em http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Ostrea_edulis/en
- FAO, 2018^c. Species Fact Sheets. *Cerastoderma edule* (Linnaeus, 1758). Acedido em Abril 2018, disponível em <http://www.fao.org/fishery/species/3535/en>

- FAO, 2018^d. Cultured aquatic species information programme. *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819). Acedido em Abril 2018, disponível em http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Mytilus_galloprovincialis/en
- FAO, 2018^e. Cultured Aquatic Species Information Programme. *Mytilus edulis* (Linnaeus, 1758). Acedido em Junho 2018, disponível em http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Mytilus_edulis/en
- FAO, 2018^f. Cultured aquatic species information programme. *R. decussatus* (Linnaeus, 1758). Acedido em Maio 2018, disponível em http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Ruditapes_decussatus/en
- FAO, 2018^g. Cultured aquatic species information programme. *Ruditapes philippinarum* (Adams & Reeve, 1850). Acedido em Maio 2018, disponível em http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Ruditapes_philippinarum/en
- FAO, 2016. CWP Handbook of Fishery Statistical Standards. Aquaculture statistics. Acedido em Março 2018, disponível em <http://www.fao.org/fishery/cwp/handbook/j/en>
- Fleiss, J., 1981. Statistical Methods for Rates and Proportions. 1st Edition, John Wiley & Sons, London.
- Figueras, A., 1989. Mussel culture in Spain and France. *World Aquaculture* 20, pp. 8-17.
- Franca, M., Martins, R., Carneiro, M., 1998. A Pesca Artesanal Local na Costa Continental Portuguesa, pp.66-68. Lisboa: Instituto de Investigação das Pescas e do Mar.
- Fróis, F., 2016. Aquacultura Multi-trófica Integrada em Tanques de Terra.
- Gallardi, D., 2014. Effects of Bivalve Aquaculture on the Environment and Their Possible Mitigation : A Review. *Fish. Aquac.* J. 5.
- Galtsoff, P., 1964. The American Oyster. *Crassostrea Virginica* Gmelin. *Fishery Bulletin of the Fish and Wildlife Service* Vol. 64.
- Gaspar, M., Ferreira, R., Monteiro, C., 1999. Growth and reproductive cycle of *Donax trunculus* L., (Mollusca: Bivalvia) off Faro, southern Portugal. *Fish. Res.* 41, pp. 309–316.
- Gómez-Mendikute, A., Elizondo, M., Venier, P., Cajaraville, M.P., 2005. Characterization of mussel gill cells in vivo and in vitro. *Cell Tissue Res.* 321, pp. 131–140.
- Gosling, E., 2003. Bivalve Molluscs: Biology, Ecology and Culture, CEUR Workshop Proceedings.

- Grizel, H., 2003. An Atlas of Histology and Cytology of Marine Bivalve Molluscs. IFREMER.
- Grizel, H., Bachere, E., Mialhe, E., Tige, G., 1987. Solving parasite-related problems in cultured molluscs. *Int. J. of Parasit.*, pp. 301-308.
- Haas, F., 1935. Bronns Klassen und Ordnungen des Tier-Reichs, III. Bd., Abt. 3, Bivalvia, Teil 1.
- Helm, M., Bourne, N., Lovatelli, A., 2004. Hatchery culture of bivalves, A practical manual. *Food and Agriculture Organization of the United Nations*.
- Henriques, M., 1998. Manual de aquacultura: ostra, amêijoia, camarão, truta, tilápia, enguia, dourada, robalo, pregado. ICBAS, pp. 59-75.
- Herrán, R., Garrido-Ramos, M., Navas, J., Rejón, M., 2000. Molecular characterization of the ribosomal RNA gene region of *Perkinsus atlanticus*: its use in phylogenetic analysis and as a target for a molecular diagnosis. *Parasitology*, pp. 345-353.
- Howard, D., Lewis, E., Keller, B., Smith, C., 2004. Histological techniques for marine bivalve mollusks and crustaceans. *NOAA Technical Memorandum*, 5 218.
- INE, 2017. Estatísticas da Pesca 2016.
- IPMA, 2013. Plano de ação sistema nacional de monitorização de moluscos bivalves. IPMA - reports.
- IPMA, 2018^a. Amêijoia-japonesa, *Ruditapes philippinarum*. Acedido em Julho 2018, disponível em <https://www.ipma.pt/pt/bivalves/recursos/ameijoa-japonesa/>
- IPMA, 2018^b. Área Educativa, Pescas. Acedido em Março de 2018, disponível em <https://www.ipma.pt/pt/educativa/faq/pescas/index.html>
- ISO 16649-3:2015. Microbiology of the food chain - Horizontal method for the enumeration of beta-glucuronidase-positive *Escherichia coli* - Detection and most probable number technique using 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronide.
- Jabbour-Zahab, R., Blanc, F., Grizel, H., 2003. An Atlas of Histology and Cytology of Marine Bivalve Molluscs. The mantle, pp. 11-14. IFREMER.
- Jensen, K., 1993. Density dependant growth in cockles (*Cerastoderma edule*): evidence from interannual comparisons. *J. of the Mar. Biol. Ass. of the United Kingdom* 73, pp. 333-342.
- Junqueira, L., Carneiro, J., 2013. Histologia Básica. *Edi. Guanabara Koogan Ltda*. Rio de Janeiro.

- Kaiser, M., Stead, S., 2002. Uncertainties and values in European aquaculture: communication, management and policy issues in times of “changing public perceptions”. *Aquaculture International* 10, pp. 469–490.
- Kater, B., Geurts Van Kessel, A., Baars, J., 2006. Distribution of cockles *Cerastoderma edule* in the Eastern Scheldt: Habitat mapping with abiotic variables. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 318, pp. 221–227.
- Labarta, U., Fernández-Reiriz, M., Camacho, A., Corbacho, E., 2004. Bateeiros, mar, mejillón. Una perspectiva bioeconómica, pp.60-62. *Fundación Caixa Galicia*.
- Lagares, E., Ordaz, F., Hoyo, J., 2018. Innovation, environmental commitment, internationalization and sustainability: A survival analysis of Spanish marine aquaculture firms. *Ocean Coast. Manag.* 151, pp. 61–68.
- Lapegue, S., Beaumont, A., Boudry, P., Gouletquer, P., 2008. European flat oyster - *Ostrea edulis*. *Genimpact* 68–73.
- Lee, R., Lovatelli, A., Ababouch, L., 2008. Bivalve depuration: fundamental and practice aspects, FAO. *Fisheries Technical Paper*.
- Mackin, J., Owen, M., Collier, A., 1950. Preliminary Note on the occurrence of new Protistan Parasite, *Dermocystidium marinum* n. sp. in *Crassostrea virginica* (Gmelin). *Science Technical Papers*.
- Magalhães, A., Vicente, M., Pestana, R., 2006. Guia de Boas Práticas em Moluscicultura. Ed. Animação local para o desenvolvimento e criação de emprego na Ria Formosa, Olhão.
- Manzi, J., 1985. Clam Aquaculture. In Huner, J. V., Brown, E. E., (Eds) Crustacean and mollusk aquaculture in the United States, pp. 275-304. AVI Pub. Co.
- Matias, D., 2008. Produção de Bivalves. In H. A. Silva e I. Baptista (Eds), Produção, salubridade e comercialização de moluscos bivalves em Portugal, pp. 45-60. Lisboa: Publicações avulsas do IPIMAR
- Matias, D., Joaquim, S., Matias, A.M., Moura, P., de Sousa, J.T., Sobral, P., Leitão, A., 2013. The reproductive cycle of the European clam *Ruditapes decussatus* (L., 1758) in two Portuguese populations: Implications for management and aquaculture programs. *Aquaculture*, pp. 52–61 and pp. 406–407.
- Menezes, J., 2000. Manual sobre doenças de peixes ósseos. Lisboa: Publicações avulsas do IPIMAR.
- Nadarajah, S., Flaaten, O., 2017. Global aquaculture growth and institutional quality. *Mar.*

Policy 84, pp. 142–151.

Nunes, M., 2008. Introdução. In H. A. Silva e I. Baptista (Eds), *Produção, Salubridade e Comercialização de Moluscos Bivalves em Portugal*, pp. 11-17. Lisboa: Publicações avulsas do IPIMAR.

OIE, 2015. Lista de Doenças de Declaração Obrigatória a Nível Internacional, pp. 1–3.

OIE, 2016. WAHIS Interface, Animal Health Situation. Acedido em Julho 2018, disponível em http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Countryinformation/Animalsituation

OIE, 2018^a. Infection with *Bonamia ostreae*. Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals. Cap. 2.4.3.

OIE, 2018^b. Infection with *Perkinsus olseni*. Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals. Cap. 2.4.7.

Pedro, S., Castilho, M., 2008. Principais perigos associados aos bivalves. Contaminantes microbiológicos. Bactérias. In H. A. Silva e I. Baptista (Eds), *Produção, Salubridade e Comercialização de Moluscos Bivalves em Portugal*, pp. 75-77. Lisboa: Publicações avulsas do IPIMAR.

Pedro, S., Castilho, M., Silva, H., 2008^a. Principais perigos associados aos bivalves. Contaminantes microbiológicos. Generalidades. In H. A. Silva e I. Baptista (Eds), *Produção, Salubridade e Comercialização de Moluscos Bivalves em Portugal*, pp. 74-75. Lisboa: Publicações avulsas do IPIMAR.

Pedro, S., Cachola, R., Castilho, M., Sobral, M., 2008^b. Monitorização sanitária e classificação das zonas de produção. Classificação. In H. A. Silva e I. Baptista (Eds), *Produção, Salubridade e Comercialização de Moluscos Bivalves em Portugal*, pp. 109-111. Lisboa: Publicações avulsas do IPIMAR.

Pedro, S., Cachola, R., Nunes, M., 2008^c. Boas Práticas de Higiene e de Aplicação dos Princípios HACCP para os Operadores de Bivalves Vivos. Lisboa: Publicações avulsas do IPIMAR.

Perkins, F., 1976. Zoospores of the oyster pathogen, *Dermocystidium marinum* (L.). Fine structure of the conoid and other sporozoan-like organelles. *J. Parasitol.* 62, pp. 959–974.

Perkins, F., 1993. Infectious Disease of Molluscs. *Pathobiology of Marine and Estuarine Organisms*, pp. 265-268.

Portaria N.º 1421/2006 de 21 de Dezembro. *Diário da República*, 1.ª série — N.º 244 — 21

de Dezembro de 2006.

Ray, S., 1952. A culture technique for the diagnosis of infection with *Dermocystidium marinum* Mackin, Owen, and Collier in oysters. *Science* 116, pp. 360–361.

Ray, S., 1954. Biological studies of *Dermocystidium marinum*. *Rice Inst. Pam.*

Regulamento (UE) N.º 786/2013 DA COMISSÃO de 16 de agosto de 2013. *J. Of. da União Eur.* 2013.

Regulamento (CE) N.º 853/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho de 29 de Abril de 2004. *J. Of. da União Eur.* 2004.

Regulamento (CE) N.º 854/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho de 29 de Abril de 2004. *J. Of. da União Eur.* 2003.

Regulamento (CE) N.º 2073/2005 da Comissão de 15 de Novembro de 2005. *J. Of. da União Eur.* 2005.

Regulamento (CE) N.º 1441/2007 da Comissão de 5 de Dezembro de 2007 que altera o Regulamento (CE) N.º 2073/2005 relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios. *J. Of. da União Eur.* 2007.

Regulamento (CE) N.º 1021/2008 da Comissão de 17 de Outubro de 2008. *J. Of. da União Eur.* 2007.

Regulamento (CE) N.º 1881/2006 da Comissão de 19 de Dezembro de 2006 que fixa os teores máximos de certos contaminantes presentes nos géneros alimentícios. *J. Of. da União Eur.* 2006.

Ruano, F., 2008. Uma perspetiva sanitária do sector da moluscicultura em Portugal. In H. A. Silva e I. Baptista (Eds), *Produção, Salubridade e Comercialização de Moluscos Bivalves em Portugal*, pp. 62-73. Lisboa: Publicações avulsas do IPIMAR.

Ruano, F., Batista, F., Arcangeli, G., 2015. *Perkinsosis* in the clams *Ruditapes decussatus* and *Ruditapes philippinarum* in the Northeastern Atlantic and Mediterranean Sea : a review. *J. Invertebr. Pathol.*

Ruano, F., 1997. Fisheries and farming of important marine bivalves in Portugal. *NOAA Tech. Rep. NMFS*, pp. 191–200.

Ruano, F., Cachola, R., 1986. Outbreak of a severe epizootic of *Perkinsus marinus* (Levin, 78) at Ria de Faro clam's culture beds. *2nd Intern. Colloq. Pathol. Marine Aquac.*, Porto, pp. 41-42.

- Sarà, G., Mazzola, A., 1997. Effects of trophic and environmental conditions on the growth of *Crassostrea gigas* in culture. *Aquaculture* 153, pp. 81–91.
- Seed, R., 1972. Morphological variations in *Mytilus* from the French coasts in relation to the occurrence and distribution of *M. galloproyincialis* Lamarck, pp. 357–384.
- Shaw, B., Battle, H., 1957. The gross and microscopic anatomy of the digestive tract of the oyster *Crassostrea virginica* (Gmelin). *Can. J. Zoo.*
- Silva, H., 2008^a. Principais perigos associados aos bivalves. Contaminantes microbiológicos. Vírus entéricos. In H. A. Silva e I. Baptista (Eds), *Produção, Salubridade e Comercialização de Moluscos Bivalves em Portugal*, pp. 77-80. Lisboa: Publicações avulsas do IPIMAR.
- Silva, H., 2008^b. Principais perigos associados aos bivalves. Contaminantes microbiológicos. Protozoários. In H. A. Silva e I. Baptista (Eds), *Produção, Salubridade e Comercialização de Moluscos Bivalves em Portugal*, pp. 80-81. Lisboa: Publicações avulsas do IPIMAR.
- Silva, H., Costa, P., Rodrigues, S., 2008^a. Morfologia, Biologia e Ecologia dos Moluscos Bivalves. In H. A. Silva e I. Baptista (Eds), *Produção, Salubridade e Comercialização de Moluscos Bivalves em Portugal*, pp. 17-38. Lisboa: Publicações avulsas do IPIMAR.
- Silva, H., Afonso, C., Pereira, C., Martins, M., 2008^b. Contaminantes químicos. Introdução. In H. A. Silva e I. Baptista (Eds), *Produção, Salubridade e Comercialização de Moluscos Bivalves em Portugal*, pp. 95-99. Lisboa: Publicações avulsas do IPIMAR.
- SNMB, 2015. Sistema Nacional de Monitorização de Moluscos Bivalves. Limites Legais em Moluscos Bivalves. IPMA
- Usero, J., Morillo, J., Gracia, I., 2005. Heavy metal concentrations in molluscs from the Atlantic coast of southern Spain. *Chemosphere* 59, pp. 1175–1181.
- Utting, S., Spencer, B., 1991. The hatchery culture of bivalve mollusc larvae and juveniles. *Fish. Res.* 68, 31pp.
- Vale, P., 2004. Biotoxinas marinhas. *FMV, UTL. Portugal* 99, pp. 03–18.
- Vale, P., 2008. Biotoxinas marinhas. In H. A. Silva e I. Baptista (Eds), *Produção, Salubridade e Comercialização de Moluscos Bivalves em Portugal*, pp. 86-94. Lisboa: Publicações avulsas do IPIMAR.
- Vilela, H., 1951. Sporozoaires parasites de la palourde, *Tapes decussatus* (L.). *Revista da Faculdade de Ciências, Lisboa*, 1, pp. 379–386.

- Vilela, H., 1975. A respeito de ostras – Biologia – Exploração – Salubridade. Notas e Estudos da Secretaria de Estado das Pescas. *Recursos e Ambiente Aquáticos*, N.º1. Lisboa.
- Villalba, A., Reece, K., Camino, M., Casas, S., Figueras, A., 2004. *Perkinsosis* in molluscs: A review. *Aquat. Living Resour.* 17, pp. 411–432.
- Zeichen, M., Agnesi, S., Mariani, A., Maccaroni, A., Ardizzone, G., 2002. Biology and population dynamics of *Donax trunculus* L. (Bivalvia: *Donacidae*) in the South Adriatic coast (Italy). *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 54, pp. 971–982.

6. Anexos

6.1. Anexo I – Ficha explicativa de exame histopatológico de bivalves

FICHA EXPLICATIVA DE EXAME HISTOPATOLÓGICO DE BIVALVES										
Nº	Brânq. ¹	Estom. ²	Intestino	GD Tub. ³	GD Duc. ⁴	TC Vac. ⁵	S.Venos. ⁶	Manto	Gónadas	Obs. ⁷
1										
2										
3										
4										
5										
6										
7										
8										
9										
10										
11										
12										
13										
14										
15										
16										
17										
18										
19										
20										
21										
22										
23										
24										
25										
NOTAS:								CÓDIGO:		

¹Brânquias; ²Estômago; ³Túbulos da glândula digestiva; ⁴Ductos da glândula digestiva;
⁵Tecido conjuntivo vacuolar; ⁶Seios venosos; ⁷Observações.

6.2. Anexo II – Valores predictivos

Inputs

Test	TestName
Sensitivity	0.975
Specificity	0.817
Prior probability of infection	0.05

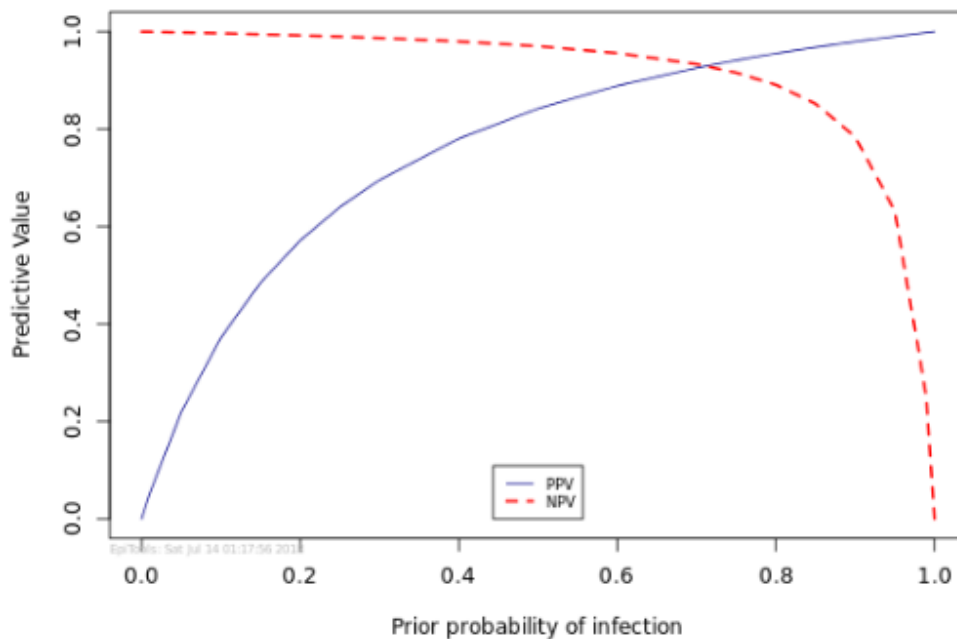
Results

The positive predictive value (PPV) for sensitivity = **0.975**, specificity = **0.817** and prior probability of infection = **0.05** is **0.219**.
 The negative predictive value (NPV) for sensitivity = **0.975**, specificity = **0.817** and prior probability of infection = **0.05** is **0.9984**.

The table and graph below summarise the positive and negative predictive values for the test for a range of prior probabilities of infection.

Prior probability of infection	Positive Predictive Value	Negative Predictive Value
0	0	1
0.01	0.05	1
0.05	0.22	1
0.1	0.37	1
0.15	0.48	0.99
0.2	0.57	0.99
0.25	0.64	0.99
0.3	0.7	0.99
0.4	0.78	0.98
0.5	0.84	0.97
0.6	0.89	0.96
0.7	0.93	0.93
0.75	0.94	0.92
0.8	0.96	0.89
0.85	0.97	0.85
0.9	0.98	0.78
0.95	0.99	0.63
0.99	1	0.25
1	1	0

Positive and Negative Predictive Values



6.3. Anexo III – Prevalência da doença

Inputs

Sample size	50
Number positive	15
Confidence level	0.95
CI method	Wilson

Results

	Number positive	Sample size	Proportion/Prevalence	Lower 95% CL	Upper 95% CL
Wilson	15	50	0.3000	0.1910	0.4375

Inputs

Sample size	50
Number positive	12
Confidence level	0.95
CI method	Wilson

Results

	Number positive	Sample size	Proportion/Prevalence	Lower 95% CL	Upper 95% CL
Wilson	12	50	0.2400	0.1430	0.3741

Inputs

Sample size	50
Number positive	43
Confidence level	0.95
CI method	Wilson

Results

	Number positive	Sample size	Proportion/Prevalence	Lower 95% CL	Upper 95% CL
Wilson	43	50	0.8600	0.7381	0.9305

Inputs

Sample size	50
Number positive	8
Confidence level	0.95
CI method	Wilson

Results

	Number positive	Sample size	Proportion/Prevalence	Lower 95% CL	Upper 95% CL
Wilson	8	50	0.1600	0.0834	0.2851

Inputs

Sample size	50
Number positive	4
Confidence level	0.95
CI method	Wilson

Results

	Number positive	Sample size	Proportion/Prevalence	Lower 95% CL	Upper 95% CL
Wilson	4	50	0.0800	0.0315	0.1884

Inputs

Sample size	50
Number positive	18
Confidence level	0.95
CI method	Wilson

Results

	Number positive	Sample size	Proportion/Prevalence	Lower 95% CL	Upper 95% CL
Wilson	18	50	0.3600	0.2414	0.4986

Inputs

Sample size	50
Number positive	4
Confidence level	0.95
CI method	Wilson

Results

	Number positive	Sample size	Proportion/Prevalence	Lower 95% CL	Upper 95% CL
Wilson	4	50	0.0800	0.0315	0.1884

Inputs

Sample size	47
Number positive	12
Confidence level	0.95
CI method	Wilson

Results

	Number positive	Sample size	Proportion/Prevalence	Lower 95% CL	Upper 95% CL
Wilson	12	47	0.2553	0.1525	0.3951

Inputs

Sample size	47
Number positive	23
Confidence level	0.95
CI method	Wilson

Results

	Number positive	Sample size	Proportion/Prevalence	Lower 95% CL	Upper 95% CL
Wilson	23	47	0.4894	0.3528	0.6276

Inputs

Sample size	50
Number positive	7
Confidence level	0.95
CI method	Wilson

Results

	Number positive	Sample size	Proportion/Prevalence	Lower 95% CL	Upper 95% CL
Wilson	7	50	0.1400	0.0695	0.2619

Inputs

Sample size	50
Number positive	10
Confidence level	0.95
CI method	Wilson

Results

	Number positive	Sample size	Proportion/Prevalence	Lower 95% CL	Upper 95% CL
Wilson	10	50	0.2000	0.1124	0.3304

Inputs

Sample size	50
Number positive	40
Confidence level	0.95
CI method	Wilson

Results

	Number positive	Sample size	Proportion/Prevalence	Lower 95% CL	Upper 95% CL
Wilson	40	50	0.8000	0.6696	0.8876