

INFECCIÓN POR *MARTEILIA REFRINGENS*

1. Ámbito de aplicación

Marteilia refringens es un protozoo parasitario perteneciente al filo Cercozoa y al orden Paramyxida (Cavalier-Smith & Chao, 1998; 2003; Feist *et al.*, 2009) que infecta el sistema digestivo de varias especies de bivalvos e induce trastornos fisiológicos y finalmente la muerte del animal (Alderman, 1979; Grizel *et al.*, 1974). A los efectos de este capítulo, la infección por *Marteilia refringens* engloba la infección por *M. refringens* según la definición de Lopez-Flores *et al.* (2004), incluidos los tipos M y O según lo definido por Le Roux *et al.* (2001). Esta definición excluye las infecciones por *M. sydneyi* (Perkins & Wolf, 1976), *M. lenghei* (Comps, 1976) y *M. christensenii* (Comps, 1983). Los casos de *Marteilia* spp. que no se identifican a nivel de especie (Berthe *et al.*, 2004; Moyer *et al.*, 1993; Norton *et al.*, 1993) deben ser remitidos al Laboratorio de referencia apropiado de la OIE.

2. Información sobre la enfermedad

2.1. Factores del agente

2.1.1. Agentes etiológicos, cepas del agente

Dos tipos de *Marteilia refringens* (Grizel *et al.*, 1974), los tipos O y M, fueron definidos por Le Roux *et al.* (2001).

2.1.2. Supervivencia fuera del hospedador

Según cuáles sean las condiciones ambientales, *M. refringens* puede sobrevivir entre varios días y 2-3 semanas fuera del hospedador (Grizel, 1985).

2.1.3. Estabilidad del agente

No hay datos disponibles.

2.1.4. Ciclo de vida

Se supone que el ciclo de vida de *M. refringens* es indirecto y puede incluir *Paracartia grani* (Audemard *et al.*, 2001; 2002), al menos en sistemas de estanque. En otras especies, incluidas otras *Acartia* spp., la ciclozoidea *Oithona* sp. y una especie indeterminada de harpaticoidea, el parásito se ha detectado mediante reacción en cadena de polimerasa (PCR) en el estuario natural del Delta del Ebro (España), pero no se ha establecido su papel en el ciclo de vida (Carrasco *et al.*, 2007).

2.2. Factores del hospedador

2.2.1. Especies hospedadoras susceptibles

Especies de ostras: *Ostrea edulis* (Grizel *et al.*, 1974); y especies de mejillones: *Mytilus* sp., incluidos *M. edulis* (Le Roux *et al.*, 2001) y *M. galloprovincialis* (López-Flores *et al.*, 2004; Novoa *et al.*, 2005; Robledo *et al.*, 1995a; Villalba *et al.*, 1993b).

Se demostró la presencia de infección por *M. refringens* en la ostra *Ostrea stentina*, las especies de almejas *Solen marginatus* (López-Flores *et al.*, 2008a) y *Chamelea gallina* (López-Flores *et al.*, 2008b) y el mejillón *Xenostrobus securis* (Pascual *et al.*, 2010).

Se observó que otras especies de *Ostrea*, como *O. chilensis*, *O. puelchana*, *O. angasi* y *O. denselamellosa* presentaban infecciones por *Marteilia* sp. cuando se desplegaban en un área infectada (Berthe *et al.*, 2004; Martin, 1993). Sin embargo, en estos casos la identificación del parásito no se realizó a nivel molecular.

Además, se observaron diferentes fases de parásitos de aspecto similar a *M. refringens*, incluidas las fases maduras, mediante el examen histológico en berberechos (*Cerastoderma edule*), especies de almejas (*Ruditapes decussatus*, *R. philippinarum*, *Tapes rhomboides*, *T. pullastra*, *Ensis minor*, *E. siliqua*) y ostras (*Crassostrea virginica*) entre otras especies de bivalvos (Berthe *et al.*, 2004; López-Flores *et al.*, 2008b). En todos estos casos, la identificación del parásito es incierta.

Por último, se ha observado que el copépodo *Paracartia grani* es susceptible a la infección por *M. refringens* y esta especie podría participar en la transmisión de los parásitos entre bivalvos (véase 2.3.1)

2.2.2. Fases susceptibles de la vida del hospedador

Se sabe que las fases juveniles y las fases de vida posteriores son susceptibles (Grizel, 1985).

2.2.3. Especies o subpoblaciones predilectas (probabilidad de detección)

Marteilia refringens suele causar una infección clínica en *O. edulis* (Grizel *et al.*, 1974) y *Ostrea* spp. (Berthe *et al.*, 2004; Grizel, 1985). En las ostras y los mejillones, la prevalencia y la intensidad de la infección son generalmente superiores en los individuos de edad igual o superior a 2 años (Audemard *et al.*, 2001; Villalba *et al.*, 1993b).

2.2.4. Órganos diana y tejidos infectados

Marteilia refringens infecta el tracto digestivo. Los plasmodios jóvenes se observan principalmente en el epitelio de los palpos labiales y del estómago (Grizel *et al.*, 1974). La esporulación se produce en los túbulos y conductos de la glándula digestiva. Se liberan propágulos a la luz del tracto digestivo que se desprenden y pasan al medio a través de las heces. (Audemard *et al.*, 2002; Berthe *et al.*, 2004).

2.2.5. Infección persistente con portadores de por vida

La infección por *M. refringens* es una enfermedad mortal en las ostras (Alderman, 1979; Audemard *et al.*, 2002; Grizel *et al.*, 1974). La muerte se produce durante el segundo año tras la infección inicial (Alderman, 1979; Grizel, 1985), de manera que la infección puede persistir durante más de 1 año y puede darse durante toda la vida. Los mejillones no suelen verse afectados de manera adversa por *M. refringens* (Berthe *et al.*, 2004), pero no se sabe si se produce la esporulación de *M. refringens* ni si los mejillones pueden ser portadores de *M. refringens* (Berthe *et al.*, 2004; Le Roux *et al.*, 2001).

2.2.6. Vectores

Se han detectado mediante PCR varias especies de zooplancton, incluidas especies de copépodos (*Acartia discaudata*, *A. clausi*, *A. italica*, *Othoia* sp., *Euterpina acutifrons*) y fases larvarias zoeales de decápodos braquiuros, así como especies que no forman parte del plancton, como *Lineus gisserensis* (Nematoda) y *Cereus pendunculatus* (Cnidaria), que podrían actuar como vectores del parásito (Audemard *et al.*, 2002; Carrasco *et al.*, 2007).

2.2.7. Animales acuáticos salvajes portadores o sospechosos de serlo

Las poblaciones salvajes de ostras, *O. edulis*, y mejillones, *Mytilus edulis* y *M. galloprovincialis*, son infectadas por *M. refringens* y podrían no mostrar signos clínicos ni mortalidad.

Se ha descrito la presencia de *Marteilia refringens* en individuos salvajes de *Solen marginatus* (López-Flores *et al.*, 2008a), *Chamelea gallina* (López-Flores *et al.*, 2008b), *Xenostrobus securis* (Pascual *et al.*, 2010) y *Ostrea stentina*, sin una repercusión clínica clara del parásito en estas especies hospedadoras.

Otras especies de bivalvos se han incluido también en la relación de posibles especies susceptibles a la infección por *M. refringens* y podrían actuar, pues, como portadores.

2.3. Patrón de la enfermedad

2.3.1. Mecanismos de transmisión

La transmisión de *M. refringens* se produce, probablemente, a través de un hospedador intermedio (Audemard *et al.*, 2002; Carrasco *et al.*, 2008b). El parásito pudo ser transmitido experimentalmente de *O. edulis* y *M. galloprovincialis* al copépodo *Paracartia grani* (Audemard *et al.*, 2002; Carrasco *et al.*, 2008b). La transmisión de *P. grani* a *O. edulis* o *M. galloprovincialis* no se ha evidenciado experimentalmente (Audemard *et al.*, 2002; Carrasco *et al.*, 2008b). En las ostras, las fases iniciales de la enfermedad tienen lugar en los epitelios del estómago, los palpos e incluso las branquias. Se cree que la infección inicial se produce a través de las corrientes de alimentación. En los mejillones, las fases iniciales se han observado en el epitelio de las branquias, el manto, el estómago y los túbulos digestivos primarios (Carrasco *et al.*, 2008a).

2.3.2. Prevalencia

La prevalencia es muy variable, de hasta un 98% en *O. edulis*. Se prevé una prevalencia superior en función del uso de determinadas prácticas de cultivo y en áreas que han tenido una exposición a la infección durante más de 1 año (Berthe *et al.*, 2004; Grizel, 1985).

2.3.3. Distribución geográfica

Se ha descrito en Albania, Croacia, España, Francia, Grecia, Italia, Marruecos, Portugal, Suecia, Túnez y el Reino Unido.

2.3.4. Mortalidad y morbilidad

La infección es mortal en las ostras: generalmente se describe una tasa de mortalidad del 50%-90% durante el verano y el otoño, y ello se asocia a la esporulación del parásito (Grizel, 1985; Grizel *et al.*, 1974). De igual modo, la morbilidad es mayor durante los períodos más cálidos. Los mejillones se ven menos afectados por la infección, pero se describieron mortalidades de hasta un 40% en las áreas afectadas (Berthe *et al.*, 2004; Villalba *et al.*, 1993b) y los mejillones que no habían tenido ningún contacto previo con la infección presentaron una mortalidad del 100% tras haberlos cultivado durante 6 meses en un área infectada (Thébault *et al.*, 1999).

2.3.5. Factores ambientales

El umbral de temperatura para la esporulación y transmisión del parásito es de 17°C. Dicha temperatura es frecuente en los estuarios o bahías, en donde la prevalencia suele ser más alta en las partes superiores de la columna de agua (Audemard *et al.*, 2001; Berthe *et al.*, 2004; Carrasco *et al.*, 2007; Grizel, 1985). La infección por *M. refringens* rara vez se observa en aguas marinas abiertas (Grizel, 1985). La salinidad elevada y la renovación del agua podría tener efectos negativos sobre el desarrollo y la transmisión de *M. refringens*, aunque estos parámetros parecen ser menos importantes que la temperatura (Audemard *et al.*, 2001).

2.4. Control y prevención

2.4.1. Vacunación

Ninguna.

2.4.2. Tratamiento con sustancias químicas

Ninguno.

2.4.3. Inmunoestimulación

Ninguna.

2.4.4. Selección genética a favor de la resistencia

Ninguna.

2.4.5. Repoblación con especies resistentes

En Europa se han realizado intentos con diferentes especies del género *Ostrea* pero todas ellas han mostrado susceptibilidad (Grizel, 1985). Las poblaciones de *Ostrea edulis* y *Mytilus edulis* que no han tenido ningún contacto previo presentan una susceptibilidad elevada a la infección. Aunque se observaron algunas fases primarias de *M. refringens* en *Crassostrea gigas* (Berthe *et al.*, 2004), esta especie parece ser resistente a la infección por el parásito.

2.4.6. Agentes bloqueantes

Ninguno.

2.4.7. Desinfección de huevos y larvas

No se dispone de datos.

2.4.8. Prácticas generales de manejo

Se ha puesto de manifiesto la eficacia del cultivo a baja densidad o de manera asociada a especies de moluscos resistentes, como *Crassostrea gigas* (Grizel, 1985).

3. Obtención de muestras

3.1. Elección de ejemplares

Deben obtenerse muestras de forma prioritaria de individuos moribundos o recién muertos (edad igual o superior a 2 años), con objeto de aumentar la probabilidad de encontrar ostras infectadas. Para la histología, solamente deben obtenerse muestras de ostras o mejillones vivos (incluidos los moribundos).

La obtención de muestras de ostras y mejillones debe organizarse una vez al año, cuando se sabe que la prevalencia es máxima. Cuando no se dispone de este tipo de datos en un ecosistema concreto, la obtención de muestras debe llevarse a cabo preferiblemente cuando la temperatura alcanza el máximo anual (Audemard *et al.*, 2001; Carrasco *et al.*, 2007).

3.2. Conservación de las muestras para su envío

Para la histología, el mejor conservante es el AFA de Davidson, pero el formol tamponado al 10% u otros fijadores estándar de histología son también aceptables. Para los análisis de reacción en cadena de polimerasa (PCR), las muestras deben conservarse en etanol al 95%-100% y no en alcohol desnaturalizado.

3.3. Combinación de varias muestras

La combinación de muestras podría ser de interés, pero no se ha evaluado su repercusión en el rendimiento de los métodos diagnósticos.

3.4. Órganos y tejidos de elección

Se utiliza un corte de 3-5 mm de grosor de tejidos que incluyan branquias y masa digestiva, para el diagnóstico de *M. refringens* mediante histología. Se prefiere el empleo de un fragmento de la glándula digestiva para algunas pruebas, incluidas las improntas y la PCR.

3.5. Muestras/tejidos que no son adecuados

No son adecuados tejidos distintos de las branquias y la masa digestiva.

4. Métodos de diagnóstico

4.1. Métodos de diagnóstico de campo

4.1.1. Signos clínicos

Los signos clínicos consisten en la presencia de moluscos muertos o moribundos, ya que los animales debilitados son especialmente susceptibles a los efectos de cualquier estrés adicional (Grizel, 1985; Grizel *et al.*, 1974). Esos signos clínicos no son específicos de la infección por *M. refringens* y podrían ser indicativos de otras infecciones.

4.1.2. Alteraciones del comportamiento

Ostras que no pueden cerrar la concha cuando se les saca del agua.

4.2. Métodos clínicos

4.2.1. Anatomopatología macroscópica

Se ha descrito la presencia de una glándula digestiva pálida, carne acuosa y fina, retracción del manto y reducción de la rapidez de crecimiento en ostras infectadas (Berthe *et al.*, 2004; Grizel, 1985; Grizel *et al.*, 1974), aunque estos signos macroscópicos no son específicos de la infección por *M. refringens*. Se ha descrito una reducción de la rapidez de crecimiento y una inhibición del desarrollo gonadal en los mejillones infectados (Villalba *et al.*, 1993a).

4.2.2. Bioquímica clínica

No se dispone de ninguna.

4.2.3. Anatomopatología microscópica

La glándula digestiva, en la que se encuentran *M. refringens* y otras especies de *Marteilia*, es un lugar en el que se produce la digestión intracelular del alimento y uno de los principales lugares de almacenamiento de reservas metabólicas (Berthe *et al.*, 2004). En las infecciones intensas, *M. refringens* reduce significativamente la absorción de la materia orgánica (Robledo *et al.*, 1995b). Las infecciones graves pueden causar también una pérdida del buen estado del animal como consecuencia de una reducción de la adquisición de energía. Además, el parásito puede interferir directamente en la alimentación y la absorción del hospedador con su simple presencia física. Se ha observado que el desarrollo de las células de almacenamiento adipogranuloso del manto de *Mytilus galloprovincialis* es inhibido en presencia de *M. refringens* (Villalba *et al.*, 1993b). Aparentemente, *M. refringens* interfiere también en el almacenamiento del glucógeno en *O. edulis* (Robert *et al.*, 1991).

Marteilia sydneyi es ligeramente diferente de *M. refringens*. Al microscopio óptico y al microscopio electrónico de transmisión, los criterios de reconocimiento se basan en la presencia o ausencia de inclusiones estriadas en los primordios de esporontes y las membranas concéntricas que rodean las esporas maduras, el número de primordios de esporangios en el plasmodio y el número de esporas en el esporangio.

4.2.4. Preparaciones húmedas

En la infección avanzada, pueden observarse esporangios maduros con gránulos refringentes en las preparaciones húmedas realizadas a partir de muestras de ostras/mejillones moribundos o de ostras/mejillones recién muertos o de heces de ostras/mejillones vivos.

4.2.5. Frotis

En la infección avanzada, pueden observarse parásitos de un tamaño que oscila entre 30 y 40 µm en las improntas de glándula digestiva de ostras/mejillones moribundos o de ostras/mejillones recién muertos.

4.2.6. Microscopía electrónica/citopatología

En la infección avanzada pueden observarse diferentes fases del parásito en los epitelios del tracto digestivo.

4.3. Métodos de detección e identificación del agente

4.3.1. Métodos directos de detección

4.3.1.1. Métodos microscópicos

4.3.1.1.1. Preparaciones húmedas

En la infección avanzada, se utilizan preparaciones húmedas.

Muestras a obtener: ostras/mejillones moribundos u ostras/mejillones recién muertos o heces de ostras/mejillones vivos.

Procedimiento técnico: chafar un fragmento de glándula digestiva o de heces sobre un portaobjetos de vidrio. A continuación se realizan las observaciones a $\times 400$ aumentos, que pueden mostrar la presencia de gránulos refringentes en los esporangios maduros.

Controles positivos/negativos: ninguno.

Niveles de validación:

- *Especificidad y sensibilidad:* desconocidas pero presumiblemente bajas;
- *Método de referencia:* no validado frente a la histología.

Interpretación de los resultados:

- Un resultado positivo es la presencia de cuerpos esféricos grandes (20–30 µm) que contienen estructuras de paredes gruesas;
- En las especies susceptibles, dentro del ámbito de distribución geográfica de la infección por *M. refringens*, un resultado positivo es indicativo de la infección por *M. refringens*;

- En otras especies, o fuera del ámbito geográfico conocido de la infección por *M. refringens*, un resultado positivo es indicativo de la infección por *Marteilia* spp., que deberá ser confirmada por el Laboratorio de Referencia de la OIE.

Disponibilidad de pruebas comerciales: no hay kits comercializados.

4.3.1.1.2. Improntas

En la infección avanzada, se preparan improntas de glándula digestiva.

Muestras a obtener: ostras/mejillones moribundos u ostras/mejillones recién muertos.

Procedimiento técnico: tras el secado de los tejidos sobre papel absorbente, se realizan varias improntas sobre un portaobjetos de vidrio. Las preparaciones se secan al aire, se fijan en metanol o en etanol absoluto, y se tiñen con el empleo de un kit de tinción sanguínea comercializado, siguiendo las instrucciones del fabricante. Tras un lavado con agua corriente y secado, se montan las preparaciones con un cubreobjetos, utilizando una resina sintética apropiada. El examen de las preparaciones se realiza primero a $\times 200$ aumentos, y luego con microscopía de inmersión en aceite a $\times 1000$ aumentos.

Controles positivos/negativos: se recomienda su empleo y pueden obtenerse solicitándolos al Laboratorio de Referencia de la OIE.

Niveles de validación:

- *Especificidad y sensibilidad:* desconocidas. Dado que la infección puede ser focal y también porque la infección afecta a tejidos diferentes en las fases inicial y avanzada, es posible que en las improntas no se detecten los niveles de infección iniciales y bajos;
- *Método de referencia:* no validado frente a la histología.

Interpretación de los resultados:

- Un resultado positivo es la observación de células de un tamaño de hasta 30–40 μm . El citoplasma adquiere una tinción basófila, mientras que la tinción del núcleo es eosinófila. Se observan halos de color pálido alrededor de gránulos grandes, intensamente teñidos (refringentes) y, en las células más grandes, disposiciones de células dentro de células (Berthe *et al.*, 2000; Berthe *et al.*, 2004; Grizel *et al.*, 1974);
- En las especies susceptibles, dentro del ámbito de distribución geográfica conocido de la infección por *M. refringens*, un resultado positivo es claramente indicativo de la infección por *M. refringens*;
- En otras especies, o fuera del ámbito de distribución geográfica conocido de la infección por *M. refringens*, un resultado positivo es indicativo de la infección por una especie de *Marteilia* que deberá ser confirmada por el Laboratorio de Referencia de la OIE.

Disponibilidad de pruebas comerciales: los kits de tinción rápida comercializados incluyen Difquick®/Hemacolor®.

4.3.1.1.3. Cortes fijados

4.3.1.1.3.1 Histología

Muestras a obtener: ostras/mejillones vivos.

Procedimiento técnico: se utilizan cortes de tejido que incluyan branquias, glándula digestiva, manto y tejido gonadal, que deben fijarse durante 24 horas en fijador de Davidson, seguido de un procesado normal para histología en parafina y tinción, por ejemplo con hematoxilina y eosina. Las observaciones se realizan a aumentos crecientes de hasta $\times 1000$ aumentos.

Controles positivos/negativos: se recomienda su empleo y pueden obtenerse solicitándolos al Laboratorio de Referencia de la OIE.

Niveles de validación:

- *Especificidad y sensibilidad:* los valores de sensibilidad y especificidad estimados para la histología son de un 70% y 99%, respectivamente (Thébault *et al.*, 2005);

- *Método de referencia:* la histología es el método de referencia, y la hibridación *in situ* ha sido covalidada con la histología.

Interpretación de los resultados:

- Un resultado positivo es la observación de células de un tamaño que va de 4 a hasta 40 µm. Los plasmodios jóvenes (mononucleados) se encuentran principalmente en el epitelio de los palpos labiales o el estómago. La esporulación comporta la división de células dentro de células y tiene lugar en los túbulos y conductos de la glándula digestiva. Aparecen gránulos refringentes en el curso de la esporulación, pero no se observan en las fases iniciales. En las fases avanzadas de la infección, se observan esporangios libres en la luz del tracto digestivo. El citoplasma adquiere una tinción basófila, mientras que la tinción del núcleo es eosinófila. Los gránulos pueden adquirir una coloración entre naranja oscuro y rojo oscuro;

Marteilia refringens difiere ligeramente de *M. sydneyi*. Los criterios de reconocimiento se basan en una falta de inclusiones estriadas en los primordios de esporantes de *M. sydneyi*, la formación de entre ocho y dieciséis primordios de esporangios en cada plasmodio, en vez de ocho en *M. refringens*, la presencia de dos esporas en cada esporangio, en vez de cuatro en *M. refringens*, y la presencia de una capa densa de membranas concéntricas alrededor de las esporas maduras de *M. sydneyi*.

- En las especies susceptibles, dentro del ámbito de distribución geográfica conocido de la infección por *M. refringens*, un resultado positivo es un dato concluyente que indica una infección por *M. refringens*;
- En otras especies o fuera del ámbito de distribución geográfica conocido de la infección por *M. refringens*, un resultado positivo, sobre todo si se observan gránulos refringentes, es indicativo de la infección por una especie de *Marteilia* que deberá ser confirmada por el Laboratorio de Referencia de la OIE.

Disponibilidad de pruebas comerciales: no hay kits comercializados.

4.3.1.1.3.2 Microscopía electrónica de transmisión

Procedimiento técnico: se utiliza un fragmento de tejido de pequeño tamaño (1–2 mm) que debe fijarse en glutaraldehído al 3% (en agua de mar filtrada [AMF] a 0,22 µm) durante 1 hora, lavarse tres veces en AMF, fijarse en ácido ósmico al 1% y lavarse de nuevo dos veces en AMF. Tras la deshidratación en baños sucesivos de etanol y dos baños de óxido de propileno, las muestras deben impregnarse de modo progresivo e incluirse en Epon. Tras la polimerización a 60°C, los bloques deben cortarse primero a 0,5–1 µm para un control de calidad y luego a 80–100 nm para el examen al microscopio electrónico. Se colocan cortes ultrafinos sobre rejillas de malla de cobre y se aplica una tinción de contraste con el empleo de acetato de uranilo y citrato de plomo.

Controles positivos: ninguno.

Niveles de validación:

- *Especificidad y sensibilidad:* la microscopía electrónica de transmisión (MET), como la histología, permite diferenciar *Marteilia refringens* de *M. sydneyi*. Los criterios de reconocimiento son los mismos que se han presentado en el apartado 4.3.1.1.3.1 Histología.

Interpretación de los resultados:

- Un resultado positivo es la presencia de parásitos en el interior de los epitelios de la glándula digestiva o el estómago. Pueden observarse diferentes fases del parásito (Longshaw *et al.*, 2001). La célula primaria presenta en su interior una única célula secundaria. Las células secundarias proceden de una serie de divisiones e incluyen ocho preesporangios. Las células terciarias contienen estos ocho preesporangios que se han dividido y contienen primordios de cuatro esporas. Los primordios de esporas se dividen internamente para producir esporas maduras. Estas están formadas por tres esporoplasmas, uno dentro de otro, y el más externo de ellos contiene haplosporas.

Disponibilidad de pruebas comerciales: no hay pruebas comercializadas.

4.3.1.2. Aislamiento e identificación del agente

4.3.1.2.1. Cultivo celular/medios artificiales

No los hay disponibles.

4.3.1.2.2. Métodos de detección de antígenos basados en anticuerpos

En la actualidad no se dispone de ellos o no se utilizan para fines diagnósticos, pero se han desarrollado y publicado anticuerpos monoclonales (Berthe *et al.*, 2004). Estos anticuerpos no muestran una reacción cruzada frente a *M. sydneyi*.

4.3.1.2.3. Técnicas moleculares

4.3.1.2.3.1. Reacción en cadena de polimerasa (PCR)

Se han desarrollado y publicado protocolos de PCR (Berthe *et al.*, 2000; Le Roux *et al.*, 1999; 2001; López-Flores *et al.*, 2004).

Se recomiendan los cebadores de PCR dirigidos a la región ITS1 (espaciador transcrito interno) (Le Roux *et al.*, 2001) ya que son capaces de amplificar únicamente la especie *M. refringens*. Sin embargo, se dispone también de algunos cebadores dirigidos a la subunidad pequeña (SSU) del complejo génico de ARNr y ello permite la amplificación de *M. refringens* y *M. sydneyi* (Grizel *et al.*, 1974; Le Roux *et al.*, 1999). Además, se ha desarrollado un análisis de PCR anidado con el empleo de cebadores dirigidos al espaciador intergénico de ADNr (López-Flores *et al.*, 2004). Se ha evaluado tan solo con *M. refringens*. Se ha demostrado que este análisis es más sensible que el análisis de PCR del TS1, pero será necesario evaluarlo con mayor detalle en cuanto a su especificidad.

Muestras a obtener: ostras/mejillones vivos u ostras/mejillones recién muertos.

Procedimiento técnico: se colocan las muestras en etanol al 95%-100% o se congelan hasta la extracción del ADN. La extracción del ADN se realiza mediante digestión con proteinasa K durante una noche a 50–55°C y extracción en fenol-cloroformo con precipitación con etanol o metodología de columna spin, utilizando kits comercializados (por ejemplo, Qiagen). La PCR se lleva a cabo en un volumen de 50 µl. Las mezclas de PCR contienen tampón (KCl 500 mM, Tris/HCl 100 mM [pH 9,0 a 25°C] y Triton® X-100 al 1%), MgCl₂ 2,5 mM, mezcla de dNTP 0,2 mM, cebadores directo e inverso a concentración 1 µM, 0,02 unidades µl⁻¹ de Taq ADN polimerasa, y 10–100 ng de ADN extraído. Tras la desnaturalización del ADN a 94°C durante 5 minutos, se realizan 30 ciclos de la siguiente forma: desnaturalización a 94°C durante 1 minuto, hibridación a 55°C durante 1 minuto y elongación a 72°C durante 1 minuto por kilo-par de bases. Se realiza un paso final de elongación de 10 minutos a 72°C. Para la detección de *M. refringens*, se realiza una PCR con cebadores dirigidos a la región ITS1 (5'-CCG-CAC-ACG-TTC-TTC-ACT-CC-3' y 5'-CTC-GCG-AGT-TTC-GAC-AGA-CG-3') (Le Roux *et al.*, 2001).

Controles positivos/negativos: son obligatorios. Los controles positivos son los siguientes: 1) PCR con cebadores específicos para ADN genómico procedente de un hospedador con una infección intensa o ADN procedente de parásitos purificados; 2) amplificación inespecífica (actina, SSU, etc.). Los controles negativos son los siguientes: 3) ausencia de reacciones con ADN diana; 4) PCR con cebadores específicos para ADN genómico procedente de hospedadores no infectados. Pueden solicitarse controles positivos al Laboratorio de Referencia de la OIE.

Niveles de validación:

- **Especificidad y sensibilidad:** valores desconocidos. No se ha producido reacción cruzada alguna con las muestras examinadas, y la especificidad se considera muy alta (Kleeman *et al.*, 2002; Le Roux *et al.*, 1999). Se espera que la técnica de PCR detecte la presencia de *M. refringens*. Dado que la infección puede ser focal y también porque la infección afecta a tejidos diferentes en las fases inicial y avanzada, la sensibilidad de la detección mediante PCR puede ser inferior al rendimiento teórico esperado de esta técnica;
- **Método de referencia:** no validado frente a la histología.

Interpretación de los resultados:

- Un resultado positivo es una amplificación de PCR positiva de la magnitud esperada, al tiempo que todos los controles negativos producen resultados negativos y todos los controles positivos tienen resultados positivos;
- En las especies susceptibles, dentro del ámbito de distribución geográfica conocido de la infección por *M. refringens*, un resultado de PCR positivo, asociado a un resultado positivo mediante histología o improntas, tiene valor confirmativo de la infección por *M. refringens*;
- En otras especies, o fuera del ámbito de distribución geográfica conocido de la infección por *M. refringens*, un resultado de PCR positivo, asociado a un resultado positivo mediante

histología o improntas, es claramente indicativo de la infección por *M. refringens*, pero es necesaria la secuenciación del producto de PCR antes de establecer un diagnóstico confirmativo.

Disponibilidad de pruebas comerciales: no hay kits comercializados.

4.3.1.2.3.2. Hibridación *in-situ* (ISH)

Se han desarrollado y publicado protocolos de ISH (Berthe *et al.*, 2000; Le Roux *et al.*, 1999).

Se recomienda una sonda dirigida a la SSU del complejo génico de ARNr, ya que ha sido validada frente a la histología (Le Roux *et al.*, 1999; Thébault *et al.*, 2004). Sin embargo, se ha observado que esta sonda muestra una reacción cruzada con *Marteilia sydneyi* y *Marteilioïdes chungmuensis* (Kleeman *et al.*, 2002). Además, se desarrolló un ensayo de ISH con el empleo de una sonda dirigida al espaciador intergénico de ADNr (López-Flores *et al.*, 2008a; 2008b). Este método ha resultado más específico que el análisis de ISH de la SSU, pero deberá ser validado de forma más completa.

Muestras a obtener: ostras/mejillones vivos u ostras/mejillones moribundos.

Procedimiento técnico: para la ISH, se fijan los moluscos en fijador de Davidson durante aproximadamente 24 horas, y luego se incluyen en parafina. Se realizan cortes de 5 µm y se colocan sobre portaobjetos con recubrimiento de aminoalquilsilano, que se mantienen durante una noche en el horno a 40°C. Se desceran los cortes mediante inmersión en xileno o su equivalente durante 10 minutos. Este paso se repite una vez y luego se elimina el disolvente mediante inmersión en dos baños sucesivos en etanol absoluto durante 10 minutos cada uno. Luego se rehidratan los cortes mediante inmersión en una serie de etanol. Los cortes se tratan con proteinasa K (100 µg ml⁻¹) en tampón TE (Tris [50 mM], EDTA [10 mM]), a 37°C durante 30 minutos. Se deshidratan las preparaciones mediante inmersión en una serie de etanol y luego se secan al aire. A continuación se incuban los cortes con 100 µl de tampón de hibridación (4 × SSC [citrato salino estándar], formamida al 50%, 1 × solución de Denhardt, 250 µg ml⁻¹ de ARNt de levadura, dextrano sulfato al 10%) con un contenido de 10 ng (1 µl de la reacción de PCR preparada como se ha descrito más arriba utilizando los cebadores CCG-GTG-CCA-GGT-ATA-TCT-CG y TTC-GGG-TGG-TCT-TGA-AAG-GC) de la sonda marcada con digoxigenina (Le Roux *et al.*, 1999). Los cortes se cubren con cubreobjetos de plástico *in-situ* y se colocan en un bloque de calentamiento a 95°C durante 5 minutos. A continuación se enfrían las preparaciones en hielo durante 1 minuto antes de una hibridación durante una noche a 42°C en cámara húmeda. Los cortes se lavan dos veces durante 5 minutos en 2 × SSC a temperatura ambiente, y una vez durante 10 minutos en 0,4 × SSC a 42°C. Los pasos de detección se realizan según lo indicado en las instrucciones del fabricante. Luego se lavan las preparaciones en agua destilada estéril (dH₂O). Se aplica una tinción de contraste a los cortes con Bismarck Brown Yellow, se lavan en dH₂O, y se aplican cubreobjetos utilizando un medio de montaje acuoso.

Controles positivos/negativos: obligatorios. Los controles positivos son los siguientes: 1) ISH en el hospedador infectado; 2) ISH inespecífica (ADNr de SSU) en muestras. Los controles negativos son los siguientes: 3) reacciones de ISH sin ninguna sonda; 4) ISH en hospedadores no infectados. Se dispone de controles positivos que pueden solicitarse al Laboratorio de Referencia de la OIE.

Niveles de validación:

- *Especificidad y sensibilidad:* 90% y 99%, respectivamente, en el caso de la ISH (Thébault *et al.*, 2005). Se prevé que este protocolo de ISH detecte *M. refringens*; sin embargo, se ha observado que esta sonda muestra una reacción cruzada con *M. sydneyi* y *Marteilioïdes chungmuensis* (Kleeman *et al.*, 2002).
- *Método de referencia:* covalidado con la histología.

Interpretación de los resultados:

- Un resultado positivo se pone de manifiesto por un marcado de color púrpura-negro de las células de *M. refringens* dentro de los tejidos diana conocidos, al tiempo que todos los controles negativos producen resultados negativos y todos los controles positivos tienen resultados positivos;
- En las especies susceptibles, dentro del ámbito de distribución geográfica conocido de la infección por *M. refringens*, un resultado de ISH positivo tiene valor confirmativo de la infección por *M. refringens*;
- En otras especies, o fuera del ámbito de distribución geográfica conocido de la infección por *M. refringens*, un resultado de ISH positivo requiere una caracterización molecular más

completa, para determinar la especie del parásito. Sin embargo, un caso de este tipo debe ser trasladado al Laboratorio de Referencia apropiado de la OIE.

Disponibilidad de la prueba: la sonda puede obtenerse solicitándola al Laboratorio de Referencia apropiado de la OIE.

4.3.1.2.3.3. Secuenciación

Se recomienda la secuenciación como uno de los pasos finales para el diagnóstico confirmativo. Las regiones diana son el ADN_r de la SSU, el ITS1 y el IGS (espaciador intergénico). Aunque se dispone de secuencias en los bancos genéticos públicos, se recomienda remitir estos casos al Laboratorio de Referencia apropiado de la OIE.

4.3.1.2.4. Purificación del agente

La purificación del agente no se emplea actualmente para fines diagnósticos, pero se han desarrollado y publicado protocolos de purificación (Miahle *et al.*, 1985; Robledo *et al.*, 1995a).

4.3.2. Métodos serológicos

No hay ninguno aplicable.

5. Idoneidad de las pruebas para cada uso previsto

A modo de ejemplo, los métodos actualmente disponibles para la vigilancia dirigida y el diagnóstico de *M. refringens* se indican en la Tabla 5.1. Las designaciones utilizadas en la Tabla indican lo siguiente: a = el método es el método recomendado por razones de disponibilidad, utilidad y especificidad y sensibilidad diagnósticas; b = el método es un método estándar con una buena sensibilidad y especificidad diagnósticas; c = el método tiene aplicación en algunas situaciones, pero el coste, la exactitud u otros factores limitan gravemente su aplicación; y d = el método no se recomienda en la actualidad para este fin. Estas designaciones son algo subjetivas ya que la idoneidad implica cuestiones de fiabilidad, sensibilidad, especificidad y utilidad. Aunque no todas las pruebas indicadas como de categoría a o b han sido objeto de una estandarización y validación formales, su carácter de uso habitual y el hecho de que se hayan utilizado ampliamente sin resultados dudosos las hacen aceptables.

Tabla 5.1. Métodos para la vigilancia y el diagnóstico dirigidos

Método	Vigilancia dirigida				Diagnóstico provisional	Diagnóstico confirmativo
	Larvas	PL	Juveniles	Adultos		
Signos macroscópicos	d	d	c	c	c	d
Preparaciones húmedas	d	d	c	c	c	d
Improntas	d	d	b	b	a	c
Histopatología	d	d	a	a	b	c
Sondas de DNA – <i>in situ</i>	d	d	d	d	d	b
PCR	a	a	a	a	a	a
Secuenciación	d	d	d	d	d	a
Microscopía electrónica de transmisión	d	d	d	d	d	b

PL = fase post-larvaria; PCR = reacción en cadena de polimerasa.

6. Prueba(s) recomendada(s) para la vigilancia dirigida destinada a declarar la ausencia de *Marteilia refringens*

Los métodos prescritos para la vigilancia dirigida destinada a declarar la ausencia de la infección, según se detalla en el *Código Acuático* son: improntas de tejido (glándula digestiva), histología o PCR.

7. Criterios de diagnóstico confirmativo

7.1. Definición de caso sospechoso

Todo resultado positivo obtenido con cualquiera de las técnicas diagnósticas debe considerarse sospechoso.

7.2. Definición de caso confirmado

En las especies susceptibles conocidas, y dentro del ámbito de distribución geográfica conocido, un caso confirmado de *M. refringens* es un resultado positivo en las improntas de tejido o en la histología, combinado con la ISH o la PCR.

En otras especies hospedadoras, o fuera del ámbito de distribución conocido de *M. refringens*, se recomienda la confirmación mediante secuenciación y la descripción mediante microscopía electrónica de transmisión.

8. Bibliografía

ALDERMAN D.J. (1979). Epizootiology of *Marteilia refringens* in Europe. *Mar. Fishery Rev.*, **41**, 67–69.

AUDEMARD C., BARNAUD A., COLLINS C.M., LE ROUX F., SAURIAU P.-G., COUSTAU C., BLACHIER P. & BERTHE F.C.J. (2001). Claire ponds as an experimental model for *Marteilia refringens* life-cycle studies: new perspectives. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **257**, 87–108.

AUDEMARD C., LE ROUX F., BARNAUD A., COLLINS C., SAUTOUR B., SAURIAU P.-G., DE MONTAUDOUIN X., COUSTAU C., COMBES C. & BERTHE F.C.J. (2002). Needle in a haystack: involvement of the copepod *Paracartia grani* in the life cycle of the oyster pathogen *Marteilia refringens*. *Parasitology*, **124** (3), 315–323.

BERTHE F.C.J., LE ROUX F., PEYRETAILLADE E., PEYRET P., RODRIGUEZ D., GOUY M. & VIVARÈS C.P. (2000). The existence of the phylum Paramyxea Desportes and Perkins, 1990 is validated by the phylogenetic analysis of the *Marteilia refringens* small subunit ribosomal RNA. *J. Euk. Microbiol.*, **47** (3), 288–293.

BERTHE F.C.J., ROUX F., ADLARD R.D. & FIGUERAS A. (2004). Marteiliosis in molluscs: A review. *Aquat. Living Resour.*, **17**, 433–448.

CARRASCO N., ARZUL I., BERTHE F.C.J. & FURONES M.D. (2008a). *In situ* hybridization detection of initial infective stages of *Marteilia refringens* (Paramyxea) in its host *Mytilus galloprovincialis*. *J. Fish Dis.* **31**, 153–157.

CARRASCO N., ARZUL I., CHOLLET B., ROBERT M., JOLY J.-P., FURONES M.D. & BERTHE F. (2008b). Comparative experimental infection of the copepod *Paracartia grani* with *Marteilia refringens* and *M. maurini*. *J. Fish Dis.* **31**, 497–504.

CARRASCO N., LOPEZ-FLORES I., ALCARAZ M., FURONES M.D., BERTHE F.C.J. & ARZUL I. (2007b) Dynamics of the parasite *Marteilia refringens* (Paramyxea) in *Mytilus galloprovincialis* and zooplankton populations in Alfacs Bay (Catalonia, Spain). *Parasitology*, **134**, 1541–1550.

COMPS M. (1976). *Marteilia lengehi* n. sp., parasite de l'huître *Crassostrea cucullata* Born. *Rev. Trav. Inst. Pêches Marit.*, **40**, 347–349.

COMPS M. (1983). Etude morphologique de *Marteilia christenseni* sp. n. parasite du lavignon *Scrobicularia piperata* P. (mollusque pélécyopode). *Rev. Trav. Inst. Pêches Marit.*, **47**, 99–104.

FEIST S.W., HINE P.M., BATEMAN K.S., GRANT D.S. & LONGSHAW M. (2009). *Paramarteilia canceri* sp. n. (Cercozoa) in the European edible crab (*Cancer pagarus*) with a proposal for the revision of the order Paramyxida Chatton, 1911. *Folia Parasitologica*, **56** (2), 73–85.

GRIZEL H. (1985). Etude des récentes épizooties de l'huître plate (*Ostrea edulis* Linné) et leur impact sur l'ostréiculture bretonne. Thèse Doctorat es Sciences, Université des Sciences et Techniques du Languedoc, Montpellier, France, 145 p.

GRIZEL H., COMPS M., BONAMI J.R., COUSSERANS F., DUTHOIT J.L., & LE PENNEC M.A. (1974). Recherche sur l'agent de la maladie de la glande digestive de *Ostrea edulis* Linne. *Sci. Pêche. Bull. Inst. Pêches marit.*, **240**, 7–29.

- KLEEMAN S.N., LE ROUX F., BERTHE F. & ADLARD R.D. (2002). Specificity of PCR and *in situ* hybridisation assays designed for detection of *Marteilia sydneyi* and *M. refringens*. *Parasitology* **125**, 131–141.
- LE ROUX F., LORENZO G., PEYRET P., AUDEMARD C., FIGUERAS A., VIVARES C., GOUY M. & BERTHE F.C.J. (2001). Molecular evidence for the existence of two species of *Marteilia* in Europe. *J. Euk. Microbiol.*, **48** (4), 449–454.
- LE ROUX F., AUDEMARD C., BARNAUD A. & BERTHE F.C.J. (1999). DNA probes as potential tools for the detection of *Marteilia refringens*. *Mar. Biotechnol.*, **1**(6), 588–597.
- LONGSHAW M., FEIST S.W., MATTHEWS A. & FIGUERAS A. (2001) Ultrastructural characterisation of *Marteilia* species (Paramyxia) from *Ostrea edulis*, *Mytilus edulis* and *Mytilus galloprovincialis*. *Dis.Aquat. Org.*, **44**, 137–142.
- LOPEZ-FLORES I., DE LA HERRAN R., GARRIDO-RAMOS, M.A., NAVAS J.I., RUIZ-REJON C., RUIZ-REJON M. (2004). The molecular diagnosis of *Marteilia refringens* and differentiation between *Marteilia* strains infecting oysters and mussels based on the rDNA IGS sequence. *Parasitology*, **129**, 411–419
- LÓPEZ-FLORES I., GARRIDO-RAMOS M.A., DE LA HERRAN R., RUIZ-REJÓN C., RUIZ-REJÓN M. & NAVAS J.I. (2008a). Identification of *Marteilia refringens* infecting the razor clam *Solen marginatus* by PCR and *in situ* hybridization. *Mol. Cell Probes*, **22**, 151–155.
- LÓPEZ-FLORES I., ROBLES F., VALENCIA J.M., GRAU A., VILLALBA A., DE LA HERRÁN R., GARRIDO-RAMOS M.A., RUIZ-REJÓN C., RUIZ-REJÓN M. & NAVAS J.I. (2008b). Detection of *Marteilia refringens* using nested PCR and *in situ* hybridisation in *Chamelea gallina* from the Balearic Islands (Spain). *Dis. Aquat. Org.*, **82**, 79–87.
- MARTIN A.G. (1993). Relance de l'huitre plate – Rapport d'avancement des travaux année 1991. Rapport Ifremer. RIDRV-93.026 RA/Trinité, pp 40.
- MIAHLE E., BACHERE E., LE BEC C. & GRIZEL H. (1985). Isolement et purification de *Marteilia* (Protozoa: Ascetospora) parasites de bivalves marins. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences de Paris* 301, Serie III, no 4, 137–142.
- MOYER M.A., BLAKE N.J. & ARNOLD W.S. (1993). An ascetosporan disease causing mass mortality in the Atlantic calico scallop, *Argopecten gibbus* (Linnaeus, 1758). *J. Shellfish Res.*, **12** (2), 305–310.
- NORTON J.H., PERKINS F.P. & LEDUA E. (1993). *Marteilia*-like infection in a giant clam, *Tridacna maxima*, in Fiji. *J. Invertebr. Pathol.*, **61**, 328–330.
- NOVOA B., POSADA D. & FIGUERAS A. (2005). Polymorphisms in the sequences of *Marteilia* internal transcribed spacer region of the ribosomal RNA genes (ITS-1) in Spain: genetic types are not related with bivalve hosts. *J. Fish Dis.*, **28** (6), 331-338.
- Pascual S., Villalba A., Abollo E., Garci M., Gonzales A.F., Nombela M., Posada D. & Guerra A. (2010). The mussel *Xenostrobus securis*: a well established alien invader in the Ria de Vigo (Spain, NE Atlantic). *Biological Invasions*, **12**, 2091–2103.
- PERKINS F.O. & WOLF P.H. (1976). Fine structure of *Marteilia sydneyi* sp. n. – *Haplosporidian* pathogen of Australian oysters. *J. Parasitol.*, **62**, 528–538.
- ROBERT R., BOREL M., PICHOT Y. & TRUT G. (1991). Growth and mortality of the european oyster *Ostrea edulis* in the Bay of Arcachon (France). *Aquatic Living Resource*, **4**, 265–274.
- ROBLEDO J.A.F., MIAHLE E. & FIGUERAS A. (1995a). Purification of several phases of the parasite *Marteilia* (Protozoa: Ascetospora) from mussels (*Mytilus galloprovincialis*). In: Techniques in Fish Immunology – 4. Immunology and pathology of aquatic invertebrates, Stolen J.C., Fletcher T.C., Smith S.A., Zelikoff J.T., Kaattari S.L., Anderson R.S., Soderhall K. & Weeks-Perkins B.A., eds. SOS Publications, Fair Haven, NJ, USA, 117–121.
- ROBLEDO J.A.F., SANTAREM M.M., GONZALEZ P. & FIGUERAS A. (1995b). Seasonal variations in the biochemical composition of the serum of *Mytilus galloprovincialis* Lmk. and its relationship to the reproductive cycle and parasitic loads. *Aquaculture*, **133**, 311–322.
- THEBAULT A., BAUD J.P., LE SAUX J.C., LE ROUX F., CHOLLET B., LE COGUIC M.J., FLEURY P.G., BERTHE F. & GERARD A. (1999). Compte rendu sur les mortalité de juillet 1999 des moules (*Mytilus edulis*) en poches dans l'Aber Benoît. Rapport IFREMER. 12 p.

THÉBAULT A., BERGMANN S., POUILLOT S., LE ROUX F. & BERTHE F.C.J. (2005). Validation of in situ hybridization and histology assays for the detection of the oyster parasite *Marteilia refringens*. *Dis. Aquat. Org.*, **65** (1), 9–16.

VILLALBA A., MOURELLE S.G., CARBALLAL M.J. & LOPEZ M.C. (1993a). Effects of infection by the protistan parasite *Marteilia refringens* on the reproduction of cultured mussels *Mytilus galloprovincialis* in Galicia (NW Spain). *Dis. Aquat. Org.*, **17**, 205–213.

VILLALBA A., MOURELLE S.G., LOPEZ M.C., CARBALLAL M.J. & AZEVEDO C. (1993b). Marteiliasis affecting cultured mussels *Mytilus galloprovincialis* of Galicia (NW. Spain). I. Etiology, phases of the infection, and temporal and spatial variability in prevalence. *Dis. Aquat. Org.*, **16**, 61–72.

*
* *

NB: Existe un Laboratorio de Referencia de la OIE para la infección por *Marteilia refringens* (véase la Tabla al final de este *Manual Acuático* o consúltese la página web de la OIE para acceder a la relación más actualizada: www.oie.int).

CAPÍTULO 2.4.5.

INFECCIÓN POR HERPESVIRUS DE LOS OSTREIDOS MICROVARIANTE 1

1. Ámbito de aplicación

A efectos de este capítulo, la infección por las microvariantes del herpesvirus de los ostreidos de tipo 1 (HVOs-1) se considera que es una infección vírica de los moluscos bivalvos causada por microvariantes del HVOs-1. Las microvariantes del HVOs-1 (herpesvirus de los ostreidos de tipo 1) son genotipos del HVOs-1 que tienen variaciones de secuencia en un locus microsatélite del ORF4 y en el ORF4 y el ORF42/43 en comparación con la secuencia de referencia (número de acceso AY509253). El término microvariante se utiliza en este capítulo para indicar la μ Var y variantes relacionadas. El término μ Var se utiliza para definir una sola variante que presenta todas las mutaciones observadas por Segarra *et al.* (2010).

Se ha observado mortalidad relacionada con microvariantes del HVOs-1 en la ostra del Pacífico (*Crassostrea gigas*) y en la ostra portuguesa (*Crassostrea angulata*)

2. Información sobre la enfermedad

2.1. Factores del agente

El HVOs-1 es el agente etiológico de una enfermedad vírica contagiosa de ostras del Pacífico (*Crassostrea gigas*), que afecta también a otras especies de bivalvos. El genoma del virus se secuenció a partir de larvas de ostras del Pacífico recogidas en Francia en 1995 (Davison *et al.*, 2005). Dado que este ejemplar fue el primero en describirse (mediante una secuenciación del genoma completo, número de acceso AY509253), puede considerarse el tipo de referencia.

2.1.1. El agente patógeno, cepas del agente

Se han purificado partículas de HVOs-1 a partir de larvas de *C. gigas* de Francia (Le Deuff & Renault, 1999) y, mediante microscopía electrónica de transmisión, se observó que tenían una envoltura icosaédrica con un núcleo electrodensito y un diámetro de aproximadamente 120 nm. La localización intranuclear de las partículas víricas, su tamaño y su ultraestructura son característicos de los miembros de *Herpesvirales*.

La estructura y la secuencia genómicas, así como la morfología de la cápside (Davison *et al.*, 2005) se han estudiado con mayor detalle para determinar la situación filogenética del HVOs-1 en relación con los herpesvirus de los vertebrados. Se secuenció todo el ADN del virus (GenBank, número de acceso AY509253) y, estructuralmente, las cápsides de HVOs-1 parecen ser similares a las de otros herpesvirus que se han estudiado (Davison *et al.*, 2005). El virus se clasificó con la denominación de *Ostreid herpesvirus 1* (HVOs-1) como primera especie conocida.

Se han hallado microvariantes en Europa, Australia, Nueva Zelanda y Asia (Dundon *et al.*, 2011; Hwang *et al.*, 2013; Jenkins *et al.*, 2013; Lynch *et al.*, 2012; Martenot *et al.*, 2011; Paul-Pont *et al.*, 2013a; 2013b; Peeler *et al.*, 2012; Renault *et al.*, 2012; Segarra *et al.*, 2010, Shimata *et al.*, 2012).

2.1.2. Supervivencia fuera del hospedador

No se conoce el tiempo de supervivencia máximo fuera del hospedador.

Schikorski *et al.* (2011a; 2011b) presentaron datos sobre la detección mediante PCR en tiempo real del ADN de la μ Var del HVOs-1 en agua de mar tras experimentos de cohabitación. El número de copias de ADN del virus en el agua en las primeras 48 horas siguientes a la inyección del virus en larvas alcanzó $1 \times 10^5 \text{ ml}^{-1}$, y llegó a un máximo de $1 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$ tras la infección de ostras en cohabitación. La cantidad de virus infecciosa no se conoce.

2.1.3. Estabilidad del agente (métodos eficaces de inactivación)

El periodo de tiempo más largo para la detección de ADN en el HVOs-1 liberado a partir de larvas maceradas e inoculado en agua de mar fue de 22 días a 4°C y de 12 días a 20°C (Vigneron *et al.*, 2004). Sin embargo, la relación entre la detección del ADN en la PCR y la infectividad del virus no se conoce. Como regla general, la supervivencia de muchos virus de animales acuáticos fuera del hospedador es máxima a temperaturas más bajas.

Como herpesvirus, el HVOs-1 podría considerarse frágil fuera de sus hospedadores. Las temperaturas altas, las sustancias químicas y la luz solar (UV) podrían destruir su envoltura lipídica, la cápside o el ADN. No obstante, se ha observado que determinadas especies de herpesvirus pueden tener distintos niveles de estabilidad frente al tratamiento de inactivación. Ciertas sales inorgánicas, como el Na₂SO₄, presentes en el agua de mar podrían estabilizar el herpesvirus (Wallis & Melnick, 1965).

2.1.4. Ciclo de vida

La transmisión es directa, de hospedador a hospedador (Le Deuff *et al.*, 1994; Schikorski *et al.*, 2011a; 2011b). Recientemente, se ha establecido la hipótesis de que el HVOs-1 se transmite por partículas vectoriales en el agua (Paul-Pont *et al.*, 2013a).

2.2. Factores del hospedador

2.2.1. Especies hospedadoras susceptibles

Se ha observado mortalidad atribuible a microvariantes de HVOs-1 (Renault *et al.*, 2012; Segarra *et al.*, 2010) en la ostra del Pacífico (*Crassostrea gigas*) y en la ostra portuguesa (*Crassostrea angulata*) (Arzul *et al.*, 2013)

2.2.2. Fases susceptibles de la vida del hospedador

Aunque el virus se puede detectar en todas las fases de la vida de las ostras, la mortalidad debida a microvariantes afecta principalmente a larvas pequeñas y a juveniles.

2.2.3. Especies o subpoblaciones predilectas (probabilidad de detección)

Crassostrea gigas y *C. angulata* sufren infecciones naturales por microvariantes. Las fases iniciales, incluidos larvas, larvas pequeñas y juveniles, parecen ser más susceptibles a la infección. El virus se detecta con mayor facilidad en animales moribundos que en animales aparentemente sanos.

2.2.4. Órganos diana y tejidos infectados

Las alteraciones asociadas a la infección en larvas pequeñas /juveniles se observan principalmente en tejidos conjuntivos de todos los órganos en los que las células de tipo fibroblástico pueden mostrar unos núcleos agrandados con cromatina perinuclear (Arzul *et al.*, 2002; Lipart & Renault, 2002; Renault *et al.*; 1995; Schikorski *et al.*, 2011a).

2.2.5. Infección persistente con portadores de por vida

Se ha demostrado que las ostras aparentemente sanas, incluidos los individuos adultos, muestran una PCR positiva para HVOs-1 (Arzul *et al.*, 2002; Moss *et al.*, 2007, Sauvage *et al.*, 2009). Pépin *et al.* (2008) observaron que el número de copias de ADN mg⁻¹ de tejido era elevado (hasta 10⁷) en las ostras procedentes de poblaciones con mortalidades anormales, y era bajo (número más bajo detectado 10¹) en poblaciones sin mortalidades anormales. Oden *et al.* (2011) propuso un umbral de número de copias víricas de 10⁴ mg⁻¹ de tejido de ostra como atribuible a mortalidad, una observación respaldada por Paul-Pont *et al.* (2013b). La determinación de los niveles de ADN vírico en las ostras mediante PCR cuantitativa en tiempo real podría ser una forma de diferenciar entre portadores mecánicos del virus y un nivel bajo de infección.

Dado que el virus (ADN, proteína o partículas) se ha detectado en tejidos de ostras adultas, incluido el tejido gonadal (Arzul *et al.*, 2002, Lipart & Renault, 2002), los individuos adultos pueden ser un origen de la infección para las larvas o los ejemplares menores de 25 mm, en especial si los animales progenitores están en situación de estrés, por ejemplo por una temperatura elevada (Le Deuff *et al.*, 1996). Sin embargo, lo que no está claro es si se produce una verdadera transmisión vertical (transmisión por los gametos) o si la transmisión es horizontal (Barbosa-Solomieu *et al.*, 2005).

2.2.6. Vectores

El ciclo de vida es directo (Schikorski *et al.*, 2011a; 2011b). En un modelo de exposición a cohabitantes en el que se utilizó agua de mar filtrada, no se requirió vector (Schikorski *et al.*, 2011a; 2011b). En un artículo reciente se establece la hipótesis de que en la columna de agua hay partículas vector que también transmiten una microvariante (Paul-Pont *et al.*, 2013a).

2.2.7. Animales acuáticos salvajes portadores o sospechosos de serlo

Recientemente se ha detectado ADN de μ Var de HVOs-1 en Francia e Irlanda en el mejillón común, *Mytilus edulis*, y en *Donax trunculus*. Sin embargo, en estos casos, no se sabe todavía si estas especies de bivalvos son susceptibles, resistentes o pueden actuar como vectores.

2.3. Patrón de la enfermedad

2.3.1. Mecanismos de transmisión

Se ha detectado ADN de HVOs-1 (μ Var) mediante PCR en tiempo real en el agua que envolvía ostras del Pacífico moribundas en condiciones de campo.

La transmisión experimental de la μ Var ha sido descrita por Schikorski *et al.* (2011a; 2011b). Larvas pequeñas pueden resultar infectadas a 22°C tras la inyección intramuscular de homogenado filtrado de ostras con infección natural, y también mediante la cohabitación de ostras inyectadas con ostras sanas. Los resultados de la detección mediante PCR en tiempo real sugieren que el virus puede entrar en la glándula digestiva y en el sistema hemolinfático, tras lo cual el virus se disemina a otros órganos.

2.3.2. Prevalencia

Las tasas de mortalidad descritas y la prevalencia de microvariantes del HVOs-1 varían considerablemente en función del lugar y del país, y dependen de varios factores, como la edad de las poblaciones afectadas (Lynch *et al.*, 2012; Martenot *et al.*, 2011; Pelar *et al.*, 2012; Renault *et al.*, 2012; Segarra *et al.*, 2010).

2.3.3. Distribución geográfica

Se han observado microvariantes relacionadas con mortalidades masivas en ostras del Pacífico en Europa (Francia, Irlanda, Italia, Países Bajos, España y el Reino Unido), Australia, Nueva Zelanda y Corea, pero se sabe que tiene se ha detectado en otras partes sin causar mortalidad en la ostra (como por ejemplo, en Japón).

2.3.4. Mortalidad y morbilidad

La infección es con frecuencia mortal para las larvas pequeñas y juveniles de *C. gigas*. La muerte suele producirse 1 semana después de la infección, durante el período anual de mayor temperatura del agua, o poco después (Friedman *et al.*, 2005; Garcia *et al.*, 2011; Renault *et al.*, 1994b). Las larvas infectadas muestran una disminución de la actividad de alimentarse y nadar, y la mortalidad puede alcanzar un 100% en unos pocos días.

2.3.5. Factores ambientales

Los brotes de mortalidad asociada a la detección por microvariantes son más frecuentes durante el verano, lo cual podría sugerir una relación entre la temperatura del agua de mar y la infección vírica. Las temperaturas elevadas del agua de mar parecen ser uno de los posibles factores inductores de la infección por HVOs-1. No obstante, no siempre que la temperatura del agua lo permite se produce mortalidad por microvariantes. En Australia, los factores de riesgo estacionales son menos exactos y los efectos de la temperatura parecen ser distintos de los de Europa (Paul-Pont *et al.*, 2013b).

Además, las condiciones causantes de estrés, y en especial las técnicas de crianza, parecen favorecer la infección por vírica. Durante el verano, si se produce transferencia de ostras, ello puede dar lugar a una transmisión del virus.

2.4. Control y prevención

2.4.1. Vacunación

No es aplicable, aunque se sabe que las ostras del Pacífico tienen capacidad de respuesta inmunitaria antivírica inducible (Green & Montagnani, 2013; Renault *et al.*, 2011).

2.4.2. Tratamiento con sustancias químicas

No es aplicable.

2.4.3. Inmunoestimulación

No es aplicable.

2.4.4. Selección genética a favor de la resistencia

Según indican datos recientes, se ha demostrado que las familias de ostras del Pacífico son menos susceptibles al HVOs-1, incluido μ Var (Degremont, 2011; Sauvage *et al.*, 2009).

2.4.5. Repoblación con especies resistentes

En Francia, se está llevando a cabo un proyecto de repoblación con ostras del Pacífico seleccionadas y los primeros resultados han mostrado menor mortalidad cuando estas ostras se sitúan en condiciones de campo (Degremont *et al.*, com. pers.). En Australia, se está llevando a cabo una repoblación con *Saccostrea glomerata* y con ostras planas.

2.4.6. Agentes bloqueantes

Ninguno

2.4.7. Desinfección de huevos y larvas

Ninguna

2.4.8. Prácticas generales de manejo

La bioseguridad puede aplicarse con éxito en instalaciones confinadas y controladas, como viveros y precriaderos, con objeto de proteger las instalaciones y el entorno de las mismas de la introducción del virus.

En condiciones de cría artificiales (vivero/precriadero de moluscos), los brotes epidémicos de HVOs-1 pueden controlarse, pues, mediante una cuarentena y medidas de higiene como la inactivación del virus mediante tratamientos como la filtración del agua y la irradiación ultravioleta (entre 3 y 30 mJ cm⁻²). Sin embargo, es necesario tener presente que la reducción de la carga vírica depende del título inicial y de la capacidad de reducción del virus que tengan las técnicas utilizadas para la inactivación.

Las ostras moribundas o muertas deben ser destruidas siempre que sea posible. El equipo utilizado en una zona infectada no debe ser enviado y utilizado en una zona no afectada sin una limpieza y desinfección adecuadas.

3. Obtención de muestras

3.1. Elección de ejemplares

Deben obtenerse muestras de individuos vivos o moribundos.

3.2. Conservación de las muestras para su envío

Para la histología, el mejor conservante es el AFA de Davidson, pero también es aceptable el uso de formalina tamponada al 10%, formalina en agua de mar al 10% o el de otros fijadores estándar de histología. Para los análisis por PCR, las muestras deben conservarse en etanol al 95%-100%, un reactivo que sea adecuado para la conservación de los ácidos nucleicos, o guardarse congeladas (-80°C).

3.3. Combinación de varias muestras

La combinación de muestras puede ser aceptable en ciertas circunstancias, pero deben tenerse en cuenta las repercusiones que tendrá en la sensibilidad y el diseño de prevalencia.

3.4. Órganos y tejidos de elección

Para la histología, se utilizan cortes de tejido realizados a través de la masa visceral, que incluyan glándula digestiva, branquia y manto. Para la PCR, lo mejor es utilizar un corte de tejido del manto una combinación de tejido de la branquia y del manto.

3.5. Muestras/tejidos que no son adecuados

Los tejidos gonadales pueden no ser fiables para los análisis de PCR debido a la presencia de inhibidores.

4. Métodos de diagnóstico

4.1. Métodos de diagnóstico de campo

4.1.1. Signos clínicos

Las infecciones producidas por microvariantes del HVOs-1 pueden causar una enfermedad aguda. Es probable que los animales mueran en el plazo de unos pocos días tras presentar signos clínicos de la enfermedad. Los signos clínicos pueden ser bivalvos muertos o moribundos, pero dichos signos no son específicos de la infección por microvariantes del HVOs-1.

4.1.2. Alteraciones del comportamiento

Los hospedadores infectados pueden mostrar una lentitud en el cierre de las valvas cuando se les perturba, pero estas alteraciones del comportamiento no son específicas de la infección por HVOs-1.

4.2. Métodos clínicos

4.2.1. Anatomopatología macroscópica

Los signos clínicos pueden ser bivalvos muertos o moribundos, pero dichos signos no son específicos de la infección por HVOs-1.

4.2.2. Bioquímica clínica

Ninguna

4.2.3. Anatomopatología microscópica

Véase el Apartado 4.2.6. Cortes fijados

4.2.4. Preparaciones húmedas

No es aplicable

4.2.5. Frotis

No es aplicable

4.2.6. Cortes fijados

Los signos más uniformes de la infección por HVOs-1 son las alteraciones nucleares, incluidas las de hipertrofia, marginación nuclear y picnosis. Las lesiones asociadas a la infección en las larvas se observan principalmente en los tejidos conjuntivos en los que las células fibroblásticas muestran un aumento de tamaño de los núcleos con cromatina perinuclear. Se han descrito también núcleos muy condensados (característica propia de la apoptosis) en otras células que se interpretaron como hemocitos. Estas anomalías celulares no se asocian a una infiltración hemocitaria masiva.

El examen histológico del animal no es de por sí suficiente para identificar un herpesvirus. Aunque las inclusiones de Cowdry tipo A (inclusiones intranucleares eosinófilas con cromatina perinuclear) son características de muchas infecciones por herpesvirus, no constituyen una característica diagnóstica de las infecciones por herpesvirus de las ostras (Arzul *et al.*, 2002). Las inclusiones de Cowdry tipo A no se han descrito nunca tras el examen histológico de ostras del Pacífico infectadas en Francia (Renault *et al.*, 1994a; 1994b). Además, no se observaron cuerpos de inclusión intranucleares, aunque sí hubo otras alteraciones celulares/nucleares, de manera asociada a las infecciones por HVOs-1 en

ostras en México (Vásquez-Yeomans *et al.*, 2010) o Estados Unidos (California) (Friedman *et al.*, 2005).

4.2.7. Microscopía electrónica/citopatología

Véase el Apartado 4.3.1.1.4.

4.3. Métodos de detección e identificación del agente

4.3.1. Métodos directos de detección

4.3.1.1. Métodos microscópicos

4.3.1.1.1. Preparaciones húmedas

No es aplicable

4.3.1.1.2. Frotis

No es aplicable

4.3.1.1.3. Cortes fijados

Muestras a obtener: ostras vivas o moribundas.

Procedimiento técnico: deben fijarse cortes de tejido que incluyan manto, glándula digestiva, branquias y músculo aductor durante 24 horas en fijadores de formaldehído al 10% como AFA de Davidson u otro fijador apropiado, seguido de un procesado normal para histología en parafina y tinción con hematoxilina y eosina. Las observaciones se realizan a aumentos crecientes de hasta x400.

Controles positivos: se recomiendan y pueden obtenerse del Laboratorio de Genética y Anatomopatología (Ifremer, La Tremblade, Francia). Los controles positivos son cortes de ostras infectadas por μ Var.

Niveles de validación:

- *Especificidad y sensibilidad:* Sea cual sea el genotipo, la especificidad es muy baja y la sensibilidad es buena para las infecciones de intensidad moderada a alta, pero es baja para las infecciones de intensidad baja.
- *Método de referencia:* ninguno

Interpretación de los resultados:

- Un resultado positivo es la presencia de anomalías celulares en los cortes de tejido: células de tipo fibroblástico que muestran núcleos agrandados con cromatina perinuclear. Se describen también núcleos muy condensados en otras células que se interpretan como hemocitos. Estas anomalías celulares no se asocian a una infiltración hemocítica masiva.
- En especies hospedadoras susceptibles, dentro del ámbito de distribución conocido del microvariantes del HVOs-1, un resultado positivo es un dato a favor del diagnóstico provisional de infección vírica, pero debe ser confirmado mediante PCR específica para la especie, hibridación *in-situ* (ISH) y/o secuenciación de ADN.

Disponibilidad de pruebas comerciales: no hay pruebas comerciales disponibles.

4.3.1.1.4. Microscopía electrónica/citopatología

La microscopía electrónica de transmisión puede utilizarse para confirmar la presencia de partículas víricas en los animales infectados.

Las muestras de tejido (con contenido de tejido conjuntivo como el del manto) para el examen mediante microscopía electrónica deben fijarse con glutaraldehído al 2,5%(vol/vol) en tampón de cacodilato 0,1 M y deben fijarse posteriormente en tetróxido de osmio al 1% (peso/vol), lavarse en tampón de cacodilato 0,1 M (3 x 10 minutos), deshidratarse en una serie gradual de etanol (70%, 1 x 10 minutos; 95%, 2 x 15 minutos; 100%, 3 x 20 minutos), lavarse en óxido de propileno (2 x 15 minutos), preinfiltrarse en óxido de propileno al 50%/resina Epon al 50% (1 hora), infiltrarse en resina Epon al 100% (1 hora) y luego incluirse en resina Epon.

La replicación del virus tiene lugar principalmente en células de tipo fibroblástico de todos los tejidos conjuntivos, especialmente los del manto, palpos labiales, branquias y glándula digestiva (Renault *et al.*, 1994b; 1995; Schikorski *et al.*, 2011a). La virogénesis se inicia en el núcleo de las células infectadas en donde se observan cápsides y nucleocápsides. A continuación, las partículas víricas atraviesan la membrana nuclear para pasar al citoplasma y se liberan partículas con envoltura en la superficie de la célula. Las cápsides intranucleares y citoplasmáticas aparecen en distintos tipos morfológicos, incluidas las cápsides electrotransparentes, las cápsides con contenido de un núcleo interior toroidal y las cápsides con contenido de un núcleo interior en forma de ladrillo.

4.3.1.2. Aislamiento e identificación del agente

4.3.1.2.1. Cultivo celular/medios artificiales

Hasta la fecha, los intentos de cultivar el virus en líneas celulares de vertebrados e invertebrados y en cultivos celulares primarios de ostra han sido infructuosos.

4.3.1.2.2. Métodos de detección del antígeno basados en anticuerpos

Se han desarrollado anticuerpos específicos (Arzul *et al.*, 2002). Sin embargo, en la actualidad no están disponibles para fines diagnósticos.

4.3.1.2.3. Técnicas moleculares

En la actualidad existen varios métodos de PCR diferentes para la detección de HVOs-1, así como métodos en tiempo real (Martenot *et al.*, 2010; Pépin *et al.*, 2008; Renault *et al.*, 2000).

Muestras a obtener. moluscos vivos o moribundos. Se obtienen larvas (100–200 mg), larvas pequeñas (100–200 mg) o fragmentos de tejido de 2–3 mm² extirpados asépticamente del manto, y se colocan en tubos de 1,5 ml, se conservan en alcohol de 95° o se guardan congelados (–80°C). Los instrumentos de disección deben pasarse por la llama entre una muestra y otra para evitar la contaminación cruzada.

4.3.1.2.3.1. Análisis de PCR convencionales

Se han utilizado con éxito análisis de PCR convencionales para la detección del ADN del HVOs-1 en bivalvos y se han diseñado pares de cebadores diferentes (véase la revisión del tema de Batista *et al.*, 2007).

Se diseñaron dos pares de cebadores (A3/A4 y A5/A6) que se utilizaron para detectar el ADN vírico en larvas de ostras del Pacífico mediante una PCR anidada (Renault *et al.*, 2000a). La especificidad de estos pares de cebadores se evaluó con el empleo de ADN de *C. gigas* así como ADN procedente de herpesvirus de vertebrados; se detectaron de forma ordinaria 500 fg de ADN del virus extraído de partículas purificadas. El análisis de PCR en un solo paso con el par de cebadores A3/A4 no solo permitió la amplificación del ADN de HVOs-1 sino también la detección de una variante de este virus (HVOs-1var) en larvas de *C. gigas* y *R. philippinarum* (Arzul *et al.*, 2001c).

Posteriormente se diseñaron otros cebadores incluidos los C2/C6. La combinación de los pares de cebadores A3/A4 y A5/A6 permitió una amplificación de PCR inferior a la de C2/C6 (21,4% frente a 32,4%) cuando se analizaron las mismas muestras de larvas (Renault & Arzul, 2001). El par de cebadores C2/C6 permitió sistemáticamente la detección de 1 fg de ADN vírico purificado (Renault *et al.*, 2004). Se ha descrito un límite de detección de 10 fg del ADN vírico purificado para los dos pares de cebadores C13/C5 y Gp3/Gp4 (Vignerón *et al.*, 2004). Una cantidad de tan solo 1 pg y 10 pg permitió amplificar de manera detectable un producto específico con los pares de cebadores C9/C10 y HVOsDPFor/HVOsDPRev, respectivamente (Webb *et al.*, 2007).

Aunque la especificidad de la PCR ha sido evaluada para algunos de los pares de cebadores utilizados para detectar el ADN del virus (véase más arriba), no se ha hecho así para todos los pares de cebadores diseñados. Además, las condiciones de amplificación que se han utilizado en los análisis de PCR con el empleo de diferentes pares de cebadores se han basado en las condiciones optimizadas para A3/A4 y A5/A6 (Renault *et al.*, 2000a). Bastista *et al.* (2007) han propuesto un esquema de procedimiento experimental para la detección del ADN de HVOs-1 mediante PCR convencional.

4.3.1.2.3.2. Análisis de PCR específico para HVOs-1 Sybr[®]Green (Pépin *et al.*, 2008)

Se colocan 50 mg de larvas/tejido de manto en 50 µl de agua doblemente destilada, utilizando un émbolo desechable. Los tejidos chafados se diluyen seis veces y se esclarecen

a 10.000 **g** durante 5 minutos. Se tratan 100 μ l del sobrenadante recuperado, utilizando un kit de ADN de tejido comercial (QIAgen – Qiamp tissue mini kit®) según el protocolo indicado por el fabricante. La elución final del ADN se realiza con 100 μ l del tampón TE. El ADN se conserva a -20°C . Antes de los experimentos de PCR, pueden medirse las concentraciones de ADN a partir de la absorbancia a 260 nm. Según la concentración total de ADN medida en las muestras, se diluyen para obtener 20 ng de ADN total por reacción de PCR.

Pueden usarse tres conjuntos de cebadores dirigidos a tres regiones del ADN vírico: ORF4, ORF88 y ORF99. Los pares de cebadores B4/B3 (Arzul *et al.*, 2001; ORF99 que codifica una proteína BIR) y C9/C10 (Barbosa-Solomieu *et al.*, 2004; ORF4) se diseñaron anteriormente para una sola PCR, mientras que el par de cebadores Gp4/Gp7 (ORF88 que codifica una proteína de membrana de clase I) se evaluó para la PCR en tiempo real. Los pares de cebadores B4/B3, C9/C10 y Gp4/Gp7 produjeron productos de PCR de 207, 197 y 85 pb, respectivamente.

B4: 5'-ACT-GGG-ATC-CGA-CTG-ACA-AC-3'

B3: 5'-GTG-GAG-GTG-GCT-GTT-GAA-AT-3'

C9: 5'-GAG-GGA-AAT-TTG-CGA-GAG-AA-3'

C10: 5'-ATC-ACC-GGC-AGA-CGT-AGG-3'

Gp4: 5'-GGC-GTC-CAA-ACT-CGA-TTA-AA-3'

Gp7: 5'-TTA-CAC-CTT-TGC-CGG-TGA-AT-3'

El par de cebadores C9/C10 produjo unos parámetros fiables para la PCR en tiempo real con ADN del HVOs-1, al igual que el par de cebadores B3/B4, que muestra unos parámetros muy similares, con un valor de *E* ligeramente inferior (96,3%). El par de cebadores Gp4/Gp7 es menos eficiente (*E* = 91,3%) y menos sensible (≥ 50 copias μl^{-1}). El par de cebadores C9/C10 parece ser el más sensible y eficiente

También puede utilizarse un par de cebadores adicional DPFor/DPRev que produce un producto de 197 pb (ORF100, ADN polimerasa).

DPFor: 5'-ATT-GAT-GAT-GTG-GAT-AAT-CTG-TG-3'

DPRev: 5'-GGT-AAA-TAC-CAT-TGG-TCT-TGT-TCC-3'

Es importante un análisis dirigido a segmentos diferentes de ADN de HVOs-1 para definir de manera más precisa los genotipos víricos. Aunque el ORF4 es un candidato interesante para describir la diversidad, puesto que se ha descrito ya un polimorfismo vírico en esta área, el ORF100 (ADN polimerasa) parece ser menos polimorfo.

Todas las reacciones de amplificación se realizan en un volumen total de 25 μ l con bandejas de 96 micropocillos. Cada pocillo (25 μ l) contiene 5 μ l de la dilución de ADN extraído (muestra) o de ADN genómico de HVOs-1 (control positivo), 12,5 μ l de Brilliant® SYBR® Green I PCR Master Mix o FullVelocity® Master Mix (Stratagene), 2,5 μ l de cada cebador diluido (concentración final 200 nM) y 2,5 μ l de agua destilada. Las condiciones de ciclo térmico son las siguientes: 1 ciclo de preincubación a 95°C durante 10 minutos; 40 ciclos de amplificación a 95°C durante 30 segundos (15 segundos con FullVelocity® Master Mix), 60°C durante 45 segundos (30 segundos con FullVelocity® Master Mix) y 72°C durante 45 segundos con Brilliant® Master Mix; y análisis de la curva de temperatura de fusión a 95°C durante 60 segundos, 60°C durante 30 segundos y 95°C durante 30 segundos. El análisis de PCR en tiempo real debe realizarse por triplicado con 5 μ l de diluciones de la muestra como plantilla de ADN o un control de ADN vírico.

La cuantificación absoluta de las copias de ADN de HVOs-1 (copias μl^{-1}) se lleva a cabo comparando los valores de CT obtenidos con la curva estándar, utilizando el programa informático Thermocycler. Cada experimento incluye un control de ADN positivo (ADN genómico de HVOs-1 para la cuantificación absoluta) y controles sin contenido (NTC, control sin plantilla consistente en agua estéril desionizada). La eficiencia de la PCR (*E*) se calcula a partir de curvas estándar como el porcentaje de las moléculas de plantilla que se dobla durante cada ciclo ($[10^{-1/\text{pendiente}} - 1] \times 100$), con la exigencia de que se encuentre en el intervalo del 95%–105% y de que el coeficiente de determinación (*R*²) sea $>0,98$. Para permitir la detección de productos inespecíficos, se aplica un protocolo de disociación (curva de fusión) tras los ciclos de amplificación. Se registra la temperatura a la que se genera fluorescencia en SYBR®Green mediante la disociación del amplicón de doble hebra.

En cuanto a la sensibilidad de la prueba, se considera que puede detectar sistemáticamente 4 copias de ADN μl^{-1} . Se estimó el intervalo dinámico para la PCR en tiempo real a partir de varios análisis de curva estándar y se obtuvo una relación lineal entre el número de copias, la

plantilla de ADN viral introducido y el valor de CT para diluciones de más de 5 log 10. Se podía cuantificar el número de copias de ADN de HVOs-1 de al menos de 10 a 5×10^6 copias μl^{-1} .

3.1.2.3.3. Análisis de PCR específico para HVOs-1 con TaqMan® (Martenot et al, 2010)

La diana fue la región B del genoma del HVOs-1, que codifica un presunto inhibidor de la apoptosis (Arzul *et al.*, 2001). Se diseñaron pares de cebadores y dos sondas TaqMan® para detectar simultáneamente el gen diana y un control interno (CI). El CI fue una secuencia sintetizada que contenía en cada extremo los cebadores directo HVOs1BF (5'-GTC-GCA-TCT-TTG-GAT-TTA-ACA-A-3') e inverso B4 (5'-ACT-GGG-ATC-CGA-CTG-ACA-AC-3'). El cebador B4 utilizado para la PCR de TaqMan fue el mismo que publicaron Pepin *et al.* (2008).

La amplificación de la región diana y el CI se realizaron con el empleo de los cebadores directos HVOs1BF y B4. Las sondas B (5'-TGC-CCC-TGT-CAT-CTT-GAG-GTA-TAG-ACA-ATC-3') y del CI (5'-ATC-GGG-GGG-GGG-GGT-TTT-TTT-TTT-ATC-G-3') se marcaron en el extremo 5' con los colorantes informadores fluorescentes TxR y FAM, respectivamente, y el extremo 3' con un desactivador apropiado (BHQI o BHQII).

La mezcla de reacción contenía 12,5 μl de la premezcla de ExTaq® 2x Takara® (Lonza, Verviers, Bélgica), 0,5 μl de cada cebador (20 μM), 0,5 μl de sondas TaqMan® (10 μM) y 9 μl de agua. Se añadieron 2 μl de muestra de ADN a 23 μl de la mezcla de reacción. La amplificación se realizó en dos fases, en las siguientes condiciones: 1 ciclo de 95°C durante 10 segundos, seguido de 40 ciclos de amplificación a 95°C durante 5 segundos, 60°C durante 20 segundos. La cuantificación del virus se llevó a cabo mediante la comparación con valores de curvas estándar.

El primer protocolo para cuantificar el HVOs-1 en ostras del Pacífico se basa en la PCR en tiempo real fue el de Sybr® Green (Pepin *et al.*, 2008). Martenot *et al.* (2010) desarrollaron un protocolo alternativo basado en la química TaqMan®. Los límites de cuantificación fueron 1.000 y 18 UG mg^{-1} para los métodos basados en Sybr® Green y en TaqMan®, respectivamente, y el segundo tiene un límite de detección de 6 UG mg^{-1} de tejido. Al comparar ambos protocolos con muestras de ADN obtenidas de 210 larvas pequeñas, se observó que el índice kappa (0,41) indica una concordancia moderada entre los protocolos, según las mediciones de Landis y Koch. Todas las muestras que fueron positivas al seguir el protocolo de referencia también lo fueron con el protocolo alternativo. De las 76 muestras que fueron negativas con el protocolo de referencia, 49 fueron positivas con el protocolo alternativo. Aunque estos resultados podrían indicar que un protocolo alternativo puede ser más sensible que el de referencia, es necesaria una validación formal. Se está desarrollando y validando un protocolo basado en la química TaqMan® para la detección muestras o variantes del virus cuyas microvariantes presenten delección en el microsátélite en sentido 5' desde el ORF4 (Pepin *et al.*, com. pers.).

4.3.1.2.3.4. Hibridación in situ específica para HVOs-1

El procedimiento de hibridación *in-situ* (ISH) descrito aquí utiliza una sonda de ADN marcada con digoxigenina (DIG) para detectar el HVOs-1 en tejido incluido en parafina y fijado con formol (Arzul *et al.*, 2002; Lipart & Renault 2002). Este análisis puede detectar cepas genéricas y microvariantes pero no permite distinguir entre genotipos.

Deben fijarse cortes de tejido que incluyan en manto, glándula digestiva, branquias y músculo aductor durante 24 horas en AFA de Davidson u otro fijador apropiado, y deben procesarse con los procedimientos estándar para el examen histológico.

Se utilizan cortes en preparaciones con silane-prep™ que se descieran en xileno (2 x 5 minutos), se tratan con etanol absoluto (2 x 5 minutos) y se secan al aire a temperatura ambiente (15 minutos). A continuación se permeabilizan los cortes con proteinasa K (100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ en agua destilada) durante 30 minutos a 37°C en cámara húmeda. La proteólisis se interrumpe mediante un solo lavado de 3 minutos en tampón de Tris 0,1 M, NaCl 0,1 M (pH 7,5) a temperatura ambiente. Los cortes se deshidratan en etanol de 95° durante 1 minuto, etanol absoluto durante 1 minuto y se secan al aire (15 minutos).

Se realiza un paso de prehibridación con un tampón de prehibridación (formamida al 50%, dextrano sulfato al 10%, 4 x SSC [Na₃citrato 0,06 M, NaCl 0,6 M, pH 7], 250 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de ARNt de levadura y Denhart al 10%) durante 30 minutos a 42°C en cámara húmeda. La solución tampón de prehibridación se sustituye por 100 μl de solución tampón de hibridación que contiene 50 μl de sonda marcada con digoxigenina (5 ng μl^{-1}) y 50 μl de tampón de hibridación (formamida al 50%,

dextrano sulfato al 10%, 4x SSC, 250 µg ml⁻¹ de ARNt de levadura y Denhart al 10%). Se cubren las preparaciones con cubreobjetos de plástico (Polylabo, Francia). Las sondas marcadas con DIG se sintetizan a partir de ADN genómico de HVOs-1 (100 pg por reacción) mediante la incorporación de digoxigenina-11-dUTP (Boehringer Mannheim, Alemania) durante la PCR convencional. Se utiliza el par de cebadores C1/C6:

C1: 5'- TTC-CCC-TCG-AGG-TAG-CTT-TT -3'

C6: 5'- GTG-CAC-GGC-TTA-CCA-TTT-TT -3'

El ADN diana y la sonda marcada con digoxigenina se desnaturalizan a 95°C durante 5 minutos y la hibridación se lleva cabo durante una noche a 42°C en cámara húmeda.

Tras la hibridación, se retiran cuidadosamente los cubreobjetos y se lavan las preparaciones durante 10 minutos en 1 x SSC (BSA al 0,2%) a 42°C. Se detectó la sonda unida de forma específica con el empleo de un anticuerpo IgG de ratón conjugado con peroxidasa para la digoxigenina (Boehringer Mannheim, Alemania) a una dilución de 1:250 en 1 x PBS (1 hora a temperatura ambiente). Se retiró el anticuerpo conjugado con peroxidasa no unido mediante seis lavados en 1 x PBS (5 minutos). Se diluyó tetrahidrocloruro de diaminobenzidina (DAB) en 1 x PBS (0,7 mg ml⁻¹). Se añadió la solución de color a los cortes de tejido (500 µl) y se realizó una incubación a temperatura ambiente en oscuridad durante 20 minutos. La reacción se interrumpió con dos lavados con 1 x PBS. Las preparaciones se tiñeron durante 20 segundos en Unna Blue (RAL, Francia) seguido de una deshidratación con etanol y un montaje en Eukitt utilizando un paso por xileno.

La tinción intracelular de color marrón oscuro específica es indicativa de la presencia de ADN vírico.

Se han analizado 30 individuos adultos de ostra del Pacífico, *Crassostrea gigas*, utilizando tres técnicas diferentes: PCR, ISH e inmunohistoquímica, para la detección del HVOs-1 en individuos asintomáticos (Arzul *et al.*, 2002). La PCR y la ISH permitieron la detección del ADN del herpesvirus en las ostras en el 93,3% y 86,6%, respectivamente, de las ostras analizadas, mientras que los anticuerpos policlonales permitieron la detección de proteínas víricas en el 76,6% de las ostras adultas analizadas.

4.3.1.2.4. Purificación del agente

El HVOs-1 puede purificarse a partir de animales infectados con el empleo de una técnica desarrollada anteriormente (Le Deuff & Renault, 1999)

4.3.2. Métodos serológicos

Ninguno aplicable

5. Idoneidad de las pruebas para cada uso previsto

En el caso de que se observe cromatina perinuclear mediante histología, debe usarse como mínimo microscopía electrónica para identificar cualquier partícula de tipo vírico presente y mostrar su localización dentro de las células. Los virus observados al ME deben describirse, por ejemplo como de tipo herpesvirus, mientras se realizan otros análisis para obtener nuevos datos que permitan la identificación del virus. Dado que herpesvirus diferentes son morfológicamente similares, un virus solamente debe describirse como HVOs-1 si se ha demostrado su identidad con este último mediante el empleo de cebadores o sondas específicas para el HVOs-1.

Para el HVOs-1, detectar la presencia de proteínas víricas intracelulares estructurales y no estructurales, ARN mensajero específico del HVOs-1, y viriones constituyen datos indicativos de una replicación, pero la detección del ADN del virus mediante la PCR sola no tiene este valor.

A título de ejemplo, los métodos actualmente disponibles para la vigilancia, la detección y el diagnóstico se detallan en la Tabla 5.1. Las denominaciones utilizadas en la Tabla indican: a = el método es el recomendado por razones de disponibilidad, utilidad y especificidad y sensibilidad de diagnóstico; b = el método es estándar, con buena sensibilidad y especificidad de diagnóstico; c = el método tiene aplicación en algunas situaciones, pero el coste, la precisión u otros factores limitan seriamente su aplicación; y d = el método no se recomienda actualmente para este fin.

Tabla 5.1. Métodos de vigilancia y diagnóstico

Método	Vigilancia dirigida			Diagnóstico provisional			Diagnóstico confirmativo		
	Larvas	Juveniles	Adultos	Larvas	Juveniles	Adultos	Larvas	Juveniles	Adultos
Signos macroscópicos	d	d	d	d	d	d	d	d	d
Bioanálisis	d	d	d	d	d	d	c	c	d
Histopatología	d	d	d	d	d	d	d	d	d
ME de transmisión	d	d	d	d	d	d	b	b	b
Pruebas basadas en anticuerpos	d	d	d	d	d	d	d	d	d
Sondas de ADN – <i>in situ</i>	c	c	c	c	c	c	b	b	b
PCR	a	a	a	a	a	a	b	b	b
qPCR	a	a	a	a	a	a	b	b	b
Secuenciación	d	d	d	d	d	d	a	a	a

ME = microscopía electrónica; PCR = reacción en cadena de la polimerasa; qPCR = PCR en tiempo real

6. Prueba/s recomendada/s para la vigilancia dirigida destinada a declarar la ausencia de infección por HVOs-1

Se recomienda la PCR y la PCR en tiempo real.

7. Criterios de diagnóstico confirmativo

7.1. Definición de caso sospechoso

Un caso sospechoso de infección por HVOs-1 microvariante es un caso de mortalidad de especies susceptibles asociada a la detección del HVOs-1 mediante PCR o PCR en tiempo real. Puede existir infección sin que haya indicios de mortalidad.

7.2. Definición de caso confirmado

Un caso de infección por microvariantes del herpesvirus de los ostreidos tipo 1 se confirma cuando la detección mediante histología, microscopía electrónica de transmisión o PCR va seguida de una secuenciación que da lugar a secuencias compatibles con la definición de microvariantes.

8. Bibliografía

ARZUL I., GARCIA C., JOLY J.-P., LUPO C., TRAVERS M.-A., FRANCOIS C., CHOLLET B. (2013). Report of the Annual Meeting and 9th Combined Technical Workshop of the National Reference Laboratories for Mollusc Diseases. Rochefort and La Tremblade, 18–21 March 2013.

ARZUL I., RENAULT T., LIPART C. & DAVISON A.J. (2001) Evidence for inter species transmission of oyster herpesvirus in marines bivalves. *J. Gen. Virol.*, **82**, 865–870.

ARZUL I., RENAULT T., THÉBAULT A. & GÉRARD A. (2002). Detection of oyster herpesvirus DNA and proteins in asymptomatic *Crassostrea gigas* adults. *Virus Res.*, **84**, 151–160.

- BARBOSA-SOLOMIEU V., DÉGREMONT L., VÁZQUEZ-JUÁREZ R., ASCENCIO-VALLE F., BOUDRY P. & RENAULT T. (2005). Ostreid herpesvirus 1 (OsHV-1) detection among three successive generations of Pacific oysters (*Crassostrea gigas*). *Virus Res.*, **107**, 47–56.
- BARBOSA-SOLOMIEU V., MIOSSEC L., VÁZQUEZ-JUÁREZ R., ASCENCIO-VALLE F. & RENAULT T. (2004). Diagnosis of Ostreid herpesvirus 1 in fixed paraffin-embedded archival samples using PCR and *in situ* hybridisation. *J. Virol. Methods*, **119**, 65–72.
- BATISTA F.M., ARZUL I., PEPIN J.F., RUANO F., FREIDMAN C., BOUDRY P. & RENAULT T. (2007) Detection of ostreid herpesvirus-1 DNA in bivalve molluscs: a critical review. *J. Virol. Methods*, **139** (1), 1–11.
- DAVISON A.J., TRUS B.L., CHENG N., STEVEN A.C., WATSON M.S., CUNNINGHAM C., LE DEUFF R.M. & RENAULT T. (2005). A novel class of herpesvirus with bivalve hosts. *J. Gen. Virol.*, **86**, 41–53.
- DEGREMONT L. (2011). Evidence of herpesvirus (OsHV-1) resistance in juvenile *Crassostrea gigas* selected for high resistance to the summer mortality phenomenon. *Aquaculture*, **317** (1–4), 94–98.
- DUNDON W.G., ARZUL I., OMNES E., ROBERT M., MAGNABOSCO C., ZAMBON M., GENNARI L., TOFFAN A., TERREGINO C., CAPUA I., & ARCANGELI G. (2011). Detection of Type 1 Ostreid Herpes variant (OsHV-1 mu var) with no associated mortality in French-origin Pacific cupped oyster *Crassostrea gigas* farmed in Italy. *Aquaculture*, **314**, (1–4), 49–52.
- FRIEDMAN C.S., ESTES R.M., STOKES N.A., BURGE C.A., HARGOVE J.S., BARBER B.J., ELSTON R.A., BURRESON E.M. & REECE K.S. (2005). Herpes virus in juvenile Pacific oysters *Crassostrea gigas* from Tomales Bay, California, coincides with summer mortality episodes. *Dis. Aquat. Org.*, **63** (1), 33–41.
- GARCIA C., THEBAULT A., DEGREMONT L., ARZUL I., MIOSSEC L., ROBERT M., CHOLLET B., FRANÇOIS C., JOLY J.-P., FERRAND S., KERDUDOU N. & RENAULT T. (2011). OsHV-1 detection and relationship with *C. gigas* spat mortality in France between 1998 and 2006. *Vet. Res.*, **42**, 73–84.
- GREEN T.J. & MONTAGNANI C. (2013). Poly I:C induces a protective antiviral immune response in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) against subsequent challenge with Ostreid herpesvirus (OsHV-1 mvar), *Fish & Shellfish Immunol.*, **35** (2), 382–388.
- HWANG J.Y., PARK J.J., YU H.J., HUR Y.B., ARZUL I., COURALEAU Y. & PARK M.A. (2013). Ostreid herpesvirus 1 infection in farmed Pacific oyster larvae *Crassostrea gigas* (Thunberg) in Korea. *J. Fish Dis.*, **36** (11), 969–972.
- JENKINS C., HICK P., GABOR M., SPIERS Z., FELL S.A., GU X.N., READ A., GO J., DOVE M., O'CONNOR W., KIRKLAND P. D. & FRANCES J. (2013). Identification and characterisation of an ostreid herpesvirus-1 microvariant (OsHV-1 mu var) in *Crassostrea gigas* (Pacific oysters) in Australia. *Dis. Aquat. Org.*, **105**, 109–126.
- LE DEUFF R.M., NICOLAS J.L., RENAULT T. & COCHENNEC N. (1994) Experimental transmission of a herpes-like virus to axenic larvae of Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.*, **14**, 69–72.
- LE DEUFF R.-M. & RENAULT T. (1999). Purification and partial genome characterization of a herpes-like virus infecting the Japanese oyster, *Crassostrea gigas*. *J. Gen. Virol.*, **80**, 1317–1322.
- LE DEUFF R.-M., RENAULT T. & GERARD A. (1996). Effects of temperature on herpes-like virus detection among hatchery-reared larval Pacific oyster *Crassostrea gigas*, *Dis. Aquat. Org.*, **24**, 149–157.
- LIPART C. & RENAULT T. (2002). Herpes-like virus detection in *Crassostrea gigas* spat using DIG-labelled probes. *J. Virol. Methods*, **101**, 1–10.
- LYNCH S.A., CARLSON J., REILLY A.O., COTTER E. & CULLOTY S.C. (2012). A previously undescribed ostreid herpes virus 1 (OsHV-1) genotype detected in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, in Ireland. *Parasitol.*, **139**, 1526–1532.
- MARTENOT C., ODEN E., TRAVAILLE E., MALAS J.P. & HOUSSIN M. (2010). Comparison of two real-time PCR methods for detection of ostreid herpesvirus 1 in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *J. Virol. Methods*, **70** (1–2), 86–99.
- MARTENOT C., ODEN E., TRAVAILLE E., MALAS J.P. & HOUSSIN M. (2011). Detection of different variants of Ostreid Herpesvirus 1 in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Virus Res.*, **160**, 25–31.

- MOSS J.A., BURRESON E.M., CORDES J.F., DUNGAN C.F., BROWN G.D., WANG A., WU X. & REECE K.S. (2007). Pathogens in *Crassostrea ariakensis* and other Asian oyster species: implications for non-native oyster introduction to Chesapeake Bay. *Dis. Aquat. Org.*, **77**, 207–223.
- ODEN E., MARTENOT C., TRAVAILLE E., MALAS J.P. & HOUSSIN M. (2011). Quantification of ostreid herpesvirus 1 (OsHV-1) in *Crassostrea gigas* by real-time PCR: Determination of a viral load threshold to prevent summer mortalities. *Aquaculture*, **317**, 27–31.
- PAUL-PONT I., DHAND N.K. & WHITTINGTON R.J. (2013a). Influence of husbandry practices on OsHV-1 associated mortality of Pacific oysters *Crassostrea gigas*. *Aquaculture*, **412–413**, 202–214.
- PAUL-PONT I., DHAND N.K., WHITTINGTON R.J. (2013b). Spatial distribution of mortality in Pacific oysters *Crassostrea gigas*: reflection on mechanisms of OsHV-1 μ Var transmission. *Dis. Aquat. Org.*, **105**, 127–138.
- PEELER J.E., REESE R.A., CHESLETT D.L., GEOGHEGAN F., POWER A. & TRUSH M.A. (2012). Investigation of mortality in Pacific oysters associated with Ostreid herpesvirus-1 μ Var in the Republic of Ireland in 2009. *Preventive Vet. Med.*, **105**, 136-143.
- PÉPIN J. F., RIOU A. & RENAULT T. (2008). Rapid and sensitive detection of ostreid herpesvirus 1 in oyster samples by real-time PCR. *J. Virol. Methods*, **149**, 269–276.
- RENAULT T. & ARZUL I. (2001). Herpes-like virus infections in hatchery-reared bivalve larvae in Europe: specific viral DNA detection by PCR. *J. Fish Dis.*, **24** (3), 161.
- RENAULT T., ARZUL I. & LIPART C. (2004). Development and use of an internal standard for oyster herpesvirus 1 detection by PCR. *J. Virol. Method*, **121**, 17–23.
- RENAULT T., COCHENNEC N., LE DEUFF R.M. & CHOLLET B. (1994a) Herpes-like virus infecting Japanese oyster (*Crassostrea gigas*) spat. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.*, **14**, 64–66.
- RENAULT T., FAURY N., BARBOSA-SOLOMIEU V. & MOREAU K. (2011). Suppression subtractive hybridisation (SSH) and real-time PCR reveal differential gene expression in the Pacific cupped oyster, *Crassostrea gigas*, challenged with Ostreid herpesvirus 1. *Dev. Comp. Immunol.*, **35**, 725–735.
- RENAULT T., LE DEUFF R.M., COCHENNEC N., CHOLLET B. & MAFFART P. (1995). Herpes-like viruses associated with high mortality levels in larvae and spat of Pacific oysters, *Crassostrea gigas*: A comparative study, the thermal effects on virus detection in hatchery-reared larvae, reproduction of the disease in axenic larvae. *Vet. Res.*, **26**, 539–543.
- RENAULT T., LE DEUFF R.-M., COCHENNEC N. & MAFFART P. (1994b). Herpesviruses associated with mortalities among Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, in France – comparative study. *Revue de Médecine Vétérinaire*, **145**, 735–742.
- RENAULT T., LE DEUFF R.-M., LIPART C. & DELSERT C. (2000). Development of a PCR procedure for the detection of a herpes-like virus infecting oysters in France. *J. Virol. Methods*, **88**, 41–50.
- RENAULT T., MOREAU P., FAURY N. PEPIN J.-F., SEGARRA A. & WEBB S. (2012). Analysis of Clinical Ostreid Herpesvirus 1 (*Malacoherpesviridae*) Specimens by Sequencing Amplified Fragments from Three Virus Genome Areas. *J. Virol.*, **86**(10), 5942-5947.
- SAUVAGE C., PEPIN J.F., LAPEGUE S., BOUDRY P. & RENAULT T. (2009). Ostreid herpes virus 1 infection in families of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, during a summer mortality outbreak: difference in viral DNA detection and quantification using real-time PCR. *Virus Res.*, **142**, 181–187.
- SCHIKORSKI D., FAURY N., PEPIN J.F., SAULNIER D., TOURBIEZ D. & RENAULT T. (2011a). Experimental ostreid herpesvirus 1 infection of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*: kinetics of virus DNA detection by q-PCR in seawater and in oyster samples. *Virus Res.*, **155** (1), 28–34.
- SCHIKORSKI D., RENAULT T., SAULNIER D., FAURY N., MOREAU P. & PEPIN J.F. (2011b). Experimental infection of Pacific oyster *Crassostrea gigas* spat by ostreid herpesvirus 1: demonstration of oyster spat susceptibility. *Vet. Res.*, **42**, 1–13.

SEGARRA A., PEPIN J.F., ARZUL I., MORGA B., FAURY N. & RENAULT T. (2010). Detection and description of a particular *Ostreid herpesvirus 1* genotype associated with massive mortality outbreaks of Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, in France in 2008. *Virus Res.*, **153**, 92–95.

SHIMAHARA Y., KURITA J., KIRYU I., NISHIOKA T., YUASA K., KAWANA M., KAMAISHI T. & OSEKO N. (2012). Surveillance of Type 1 Ostreid Herpesvirus (OsHV-1) variants in Japan. *Fish Pathol.*, **47** (4), 129–136.

VÁSQUEZ-YEOMANS R., GARCÍA-ORTEGA M. & CÁCERES-MARTÍNEZ J. (2010). Gill erosion and herpesvirus in *Crassostrea gigas* cultured in Baja California, Mexico. *Dis. Aquat. Org.*, **89**, 137–144.

VIGNERON V., SOLLIEC G., MONTANIE H. & RENAULT T. (2004). Detection of ostreid herpes virus 1 (OsHV-1) DNA in seawater by PCR: influence of water parameters in bioassays. *Dis. Aquat. Org.*, **62**, 35–44.

WALLIS C. & MELNICK J. (1965). Thermostabilization and thermosensitization of herpesvirus. *J. Bacteriol.*, **90**, 1632–1637.

WEBB S.C., FIDLER A. & RENAULT T. (2007). Primers for PCR-based detection of ostreid herpes virus-1 (OsHV-1): Application in a survey of New Zealand molluscs. *Aquaculture*, **272**, 126–139.

*
* *

INFECCIÓN POR *PERKINSUS MARINUS*

1. **Ámbito de aplicación**

Para los fines de este capítulo, la infección por *Perkinsus marinus* se considera una infección por *P. marinus*, el agente causal de la enfermedad dermo de las ostras.

2. **Información sobre la enfermedad**

2.1. **Factores del agente**

2.1.1. **El agente patógeno, cepas del agente**

El agente etiológico está representado por todas las cepas de *Perkinsus marinus*.

2.1.2. **Supervivencia fuera del hospedador**

El tiempo de supervivencia máximo fuera del hospedador no se conoce.

2.1.3. **Estabilidad del agente**

Perkinsus marinus es relativamente estable, gracias a su pared celular gruesa. Se ha observado que la desecación, cloración ($>0,3 \text{ mg ml}^{-1} = 300 \text{ ppm}$ [partes por millón]), la luz UV ($>28.000 \text{ } \mu\text{Ws cm}^{-2}$) y el agua dulce inactivan las células de *P. marinus* (Bushek *et al.*, 1997; Bushek & Howell 2000; Burreson *et al.*, 2004). La irradiación con luz UV de 4000 a 14.000 $\mu\text{Ws cm}^{-2}$ inhibirá la proliferación de *P. marinus* (Bushek & Howell, 2000).

2.1.4. **Ciclo de vida**

El ciclo de vida pasa directamente de hospedador a hospedador y todas las etapas de la vida del agente etiológico son infecciosas (Andrews, 1996; Villalba *et al.*, 2004).

2.2. **Factores del hospedador**

2.2.1. **Especies hospedadoras susceptibles**

El ostión virgínico, *Crassostrea virginica*; el ostión japonés, *C. gigas*; ostra de Suminoe, *C. ariakensis*; ostión del mangle, *C. rhizophorae*; ostión de placer, *C. corteziensis* (Andrews 1996; Calvo *et al.*, 1999; Calvo *et al.*, 2001; Villalba *et al.*, 2004; Cáceres-Martínez *et al.*, 2008); almeja de can, *Mya arenaria*; almeja báltica, *Macoma balthica* (Dungan *et al.*, 2007).

2.2.2. **Fases susceptibles de la vida del hospedador**

Todas las fases tras el asentamiento son susceptibles.

2.2.3. **Especies o subpoblaciones predilectas (probabilidad de detección)**

Crassostrea virginica es la especie más susceptible; *C. gigas* y *C. ariakensis* pueden sufrir la infección pero sus infecciones suelen ser leves (Calvo *et al.*, 1999; 2001). La prevalencia en las almejas *M. arenaria* y *M. balthica* en la naturaleza es inferior al 10% (Reece *et al.*, 2008). La infección de *C. corteziensis* por *Perkinsus marinus* requiere un mayor estudio, pero este hospedador parece tener una susceptibilidad intermedia entre la de *C. virginica* y la de las especies asiáticas *C. gigas* y *C. ariakensis* (Cáceres-Martínez *et al.*, 2008; Dungan *et al.*, 2007).

2.2.4. **Órganos diana y tejidos infectados**

Epitelio de tubo digestivo, tejido conjuntivo de todos los órganos, y hemocitos (Mackin, 1951).

2.2.5. Infección persistente con portadores de por vida

La infección por *P. marinus* suele ser mortal, y ello depende del hospedador y de las condiciones ambientales (Andrews, 1996; Burrenson & Ragone Calvo, 1996). Puede producirse una infección persistente con portadores durante toda la vida.

2.2.6. Vectores

No son necesarios vectores: el ciclo de vida es directo.

2.2.7. Animales acuáticos salvajes portadores o sospechosos de serlo

No se conoce ninguno.

2.3. Patrón de la enfermedad

2.3.1. Mecanismos de transmisión

La transmisión es directa de hospedador a hospedador. Todas las fases de la vida son infecciosas (Villalba *et al.*, 2004). Se liberan células viables por las heces del hospedador (Bushek *et al.*, 2002b) o a la muerte de este, que luego son captadas a través de los mecanismos de alimentación del hospedador.

2.3.2. Prevalencia

La prevalencia es muy variable, según la salinidad y los factores del hospedador, pero a menudo es del 100% en *C. virginica*. Se prevé que la prevalencia sea superior en los individuos con más de 1 año de exposición al agente patógeno (Andrews, 1996; Burrenson & Ragone Calvo, 1996). La prevalencia en las almejas es baja, generalmente inferior al 10%.

2.3.3. Distribución geográfica

La costa Este de Norteamérica, desde Maine (Estados Unidos) hasta Campeche (México). Introducido recientemente en la costa del Pacífico de México (Cáceres-Martínez *et al.*, 2008).

2.3.4. Mortalidad y morbilidad

La infección resulta con frecuencia mortal para *C. virginica*. La muerte suele producirse 1 o 2 años después de la infección, durante o poco después de las temperaturas del agua más cálidas del año (Burrenson & Ragone Calvo, 1996). La intensidad de la infección en las almejas es muy baja y no hay ningún indicio de mortalidad.

2.3.5. Factores ambientales

La prevalencia e intensidad de las infecciones por *P. marinus* son máximas cuando la salinidad es superior a 12 unidades prácticas de salinidad (psu). La transmisión puede producirse en condiciones de entre 9 y 12 psu, pero las infecciones se mantienen en una intensidad baja. *Perkinsus marinus* puede persistir durante periodos de tiempo prolongados en hospedadores a salinidades inferiores a 9 psu, pero la replicación es baja y no hay mortalidad del hospedador. La temperatura controla el ciclo anual de *P. marinus*, de tal manera que la máxima prevalencia e intensidad se producen 1-2 meses después de las temperaturas del agua máximas del verano, y la prevalencia e intensidad más bajas se dan 1-2 meses después de las temperaturas mínimas del invierno. Así pues, las infecciones por *P. marinus* tienen su máxima intensidad en otoño y la intensidad más baja se da al inicio de la primavera (Burrenson & Ragone Calvo, 1996).

2.4. Control y prevención

2.4.1. Vacunación

Ninguna.

2.4.2. Tratamiento con sustancias químicas

Los compuestos desinfectantes de N-halamina causan la muerte de las células de *P. marinus* en cultivo sin afectar a las larvas de las ostras (Delaney *et al.*, 2003). Se ha demostrado que con bacitracina, cicloheximida o agua dulces se reduce pero no se elimina la presencia de *P. marinus* en los hospedadores consistentes en ostras infectadas (Calvo & Burrenson, 1994; Faisal *et al.*, 1999; La Peyre *et al.*, 2003). Estos tratamientos pueden ser relevantes en la acuicultura, pero no son prácticos en el entorno natural.

2.4.3. Inmunoestimulación

Ninguna.

2.4.4. Selección genética a favor de la resistencia

La selección genética de las ostras supervivientes a epizootias ha resultado efectiva para reducir la mortalidad causada por *P. marinus* (Ragone Calvo *et al.*, 2003).

2.4.5. Repoblación con especies resistentes

Las cepas de *C. virginica* que toleran la enfermedad, obtenidas mediante selección genética, se utilizan en acuicultura en la Bahía de Chesapeake y en otros lugares (Ragone Calvo *et al.*, 2003), pero no se recomienda su empleo para restablecer las poblaciones naturales de ostras, por razones genéticas.

2.4.6. Agentes bloqueantes

Ninguno.

2.4.7. Desinfección de huevos y larvas

No se tiene conocimiento de que *Perkinsus marinus* infecte a huevos o larvas, pero podría haber células en una localización extracelular. Es posible que pueda realizarse una desinfección de huevos y larvas con el empleo de compuestos desinfectantes de N-halamina (Delaney *et al.*, 2003).

2.4.8. Prácticas generales de manejo

El cultivo en zonas en las que la salinidad es inferior a 12 psu y el uso de cepas de crecimiento rápido que toleran la enfermedad han aportado un cierto beneficio (Andrews, 1996; Burreson & Ragone Calvo, 1996).

3. Obtención de muestras

3.1. Elección de ejemplares

Deben obtenerse muestras de individuos vivos o recién muertos.

3.2. Conservación de las muestras para su envío

Para el diagnóstico con el empleo del método de cultivo de tioglicolato líquido de Ray (RFTM), las muestras deben obtenerse en fresco. Para la histología, el mejor conservante es el AFA de Davidson, pero también son aceptables el formol tamponado al 10% u otros fijadores estándar de histología. Para los análisis de reacción en cadena de polimerasa (PCR), las muestras deben conservarse en etanol al 95%-100% y no en alcohol desnaturalizado.

3.3. Combinación de varias muestras

No es aconsejable combinar las muestras de individuos jóvenes y adultos, puesto que ello reduciría la masa de tejido evaluada por individuo y por tanto la sensibilidad de la detección. Juntar larvas muy pequeñas (de cinco a diez individuos según el tamaño) o más grandes es aceptable para los análisis por PCR de todo el cuerpo, aunque esto hace que sea imposible estimar con exactitud la prevalencia del agente patógeno.

3.4. Órganos y tejidos de elección

Para el RFTM, se suelen utilizar fragmentos de branquia, manto y recto. Para la histología, se emplea un corte de 5 mm de grosor a través de la masa visceral, que incluye glándula digestiva, branquia y manto. Para la PCR, lo más apropiado es el tejido de manto o branquia.

3.5. Muestras/tejidos que no son adecuados

El tejido rectal no es fiable para los análisis de PCR debido a la presencia de inhibidores.

4. Métodos de diagnóstico

4.1. Métodos de diagnóstico de campo

4.1.1. Signos clínicos

Perkinsus marinus causa una enfermedad crónica con consunción del organismo. Los signos clínicos pueden ser bivalvos muertos o moribundos con un tejido acuoso y delgado, pero estos signos clínicos no son específicos de la infección por *P. marinus*.

4.1.2. Alteraciones del comportamiento

Los hospedadores infectados pueden mostrar una lentitud en el cierre de las valvas cuando se les perturba, pero estas alteraciones del comportamiento no son específicas de la infección por *P. marinus*.

4.2. Métodos clínicos

4.2.1. Anatomopatología macroscópica

Los signos macroscópicos son un tejido acuoso y delgado, pero dichos signos no son específicos de la infección por *P. marinus*.

4.2.2. Bioquímica clínica

Ninguna.

4.2.3. Anatomopatología microscópica

Los cortes fijados muestran lesiones multifocales grandes en el epitelio intestinal o el tejido conectivo de cualquier órgano que contenga células de *P. marinus* (Mackin, 1951). La infiltración hemocítica y la fagocitosis de células de *P. marinus* se producen en la mayor parte de las infecciones. En las infecciones de gran intensidad, el epitelio intestinal puede estar completamente destruido.

4.2.4. Preparaciones húmedas

No se recomiendan como método clínico.

4.2.5. Frotis

No se recomienda como método clínico.

4.2.7. Microscopía electrónica/citopatología

No se dispone de datos.

4.3. Métodos de detección e identificación del agente

4.3.1. Métodos directos de detección

4.3.1.1. Métodos microscópicos

4.3.1.1.1. Preparaciones húmedas

No se recomienda.

4.3.1.1.2. Frotis

Los frotis son útiles tan solo en las infecciones avanzadas.

Muestras a obtener: hospedadores vivos.

Procedimiento técnico: obtener sangre del hospedador con una aguja y jeringa introducida en el músculo aductor. Colocar una gota de hemolinfa sobre un portaobjetos de vidrio y preparar un frotis. Las observaciones se hacen a $\times 100$ – 400 aumentos tras la tinción.

Controles positivos/negativos: ninguno.

Niveles de validación:

- *Especificidad y sensibilidad*: especificidad muy baja con sensibilidad desconocida.
- *Método de referencia*: sensibilidad no validada frente a cultivo en tioglicolato líquido (análisis de carga corporal total [Fisher & Oliver, 1996]).

Interpretación de los resultados:

- La presencia de células esféricas de 2–15 µm de diámetro con una vacuola grande y núcleo excéntrico, a menudo fagocitadas por los hemocitos del hospedador, indica la presencia de *Perkinsus* sp. pero la técnica no es específica para la especie.

Disponibilidad de pruebas comerciales: se comercializan kits de tinción rápida.

4.3.1.1.3. Cortes fijados

Muestras a obtener: ostras vivas o recién muertas.

Procedimiento técnico: se utilizan cortes de tejido que incluyan la glándula digestiva, branquias y manto, que deben fijarse durante 24 horas en AFA de Davidson u otro fijador apropiado, seguido de un procesamiento normal para histología en parafina y tinción con hematoxilina y eosina. Las observaciones se realizan a aumentos crecientes, hasta llegar a $\times 400$.

Controles positivos: se recomiendan y están disponibles en el Laboratorio de Referencia de la OIE.

Niveles de validación:

- *Especificidad y sensibilidad*: la especificidad para la especie es muy baja, y la sensibilidad es buena para las infecciones de intensidad moderada a alta, pero es baja para las infecciones de baja intensidad.
- *Método de referencia*: el cultivo en tioglicolato líquido (análisis de carga corporal total) es el método de referencia, aunque no tiene especificidad para la especie. La histología es menos sensible, pero no ha sido validada formalmente frente al cultivo en tioglicolato líquido.

Interpretación de los resultados:

- Un resultado positivo es la presencia de células uninucleadas esféricas de entre 2 y 5 µm (a veces hasta 10 µm) de diámetro con una vacuola grande y un núcleo desplazado de forma excéntrica. Estas células se asocian de forma característica al intestino del hospedador o a veces al epitelio en las infecciones más leves, con una colonización de los tejidos conjuntivos que es característica de los casos más avanzados. Pueden observarse esquizontes (formas en fase de división) binucleadas de *P. marinus*, aunque no aparecen de manera fiable esquizontes de mayor tamaño con un mayor número de núcleos. Es frecuente que las células sean fagocitadas por hemocitos del hospedador. Las células de *Perkinsus marinus* muestran una tinción basófila.
- En las especies de hospedador susceptibles, dentro de la amplia gama de *P. marinus*, un resultado positivo constituye un dato indicativo de una presunción de presencia de una infección por *P. marinus*, pero debe ser confirmado mediante una PCR específica para la especie, hibridación *in-situ* (ISH) y/o secuenciación del ADN de la región ITS (espaciador transcrito interno), dada la posible presencia de *P. chesapeakei* o de especies no descritas de *Perkinsus*.

Disponibilidad de pruebas comerciales: no hay pruebas comerciales disponibles.

4.3.1.1.4. Método de cultivo de tioglicolato líquido de Ray (RFTM)

La incubación en tioglicolato se utiliza de manera habitual para la vigilancia de *P. marinus*. La técnica es sencilla, barata y muy sensible, pero no es específica para la especie. Los trofozoitos de *P. marinus* en el tejido de la ostra aumentan de tamaño cuando se cultivan durante al menos 5 días en medio de tioglicolato líquido con contenido de dextrosa, enriquecido con antibióticos (penicilina, estreptomycin) y con un compuesto antifúngico (nistatina) para reducir el crecimiento bacteriano y fúngico. Cuando se macera el tejido tras el cultivo para permitir la penetración de la solución de yodo acuosa (solución Lugol), los trofozoitos agrandados (hipnosporos o prezoosporangios en la terminología antigua) captan fácilmente la solución Lugol y pasan a ser fácilmente visibles a pocos aumentos, gracias a su coloración negra-azulada y a su forma esférica.

Muestras a obtener: moluscos vivos o recién muertos.

Procedimiento técnico:

Análisis de tejido (Ray, 1966): se extirpan muestras de tejido de una medida aproximada de 5–10 mm, dando preferencia al tejido de recto, branquias y manto de las ostras, y se colocan en tubos de ensayo que contienen medio de tioglicolato (medio de tioglicolato con contenido de dextrosa 14,6 g; NaCl, 10,0 g; agua destilada estéril (dH₂O), 485 ml). Se dispensa un total de 9,5 ml colocándolo en tubos de ensayo desechables, que se esterilizan en autoclave durante 15 minutos a una presión de 1,2 kg cm⁻². La solución esterilizada al autoclave puede conservarse en los tubos durante un periodo de hasta 3 semanas. Los instrumentos utilizados para la disección deben lavarse en etanol al 95% y pasarse por la llama entre un hospedador y otro, con objeto de prevenir la transmisión del agente. Los antifúngicos/antibióticos recomendados son los siguientes: 500 unidades ml⁻¹ de penicilina G y 500 unidades ml⁻¹ de dihidro-estreptomicina en los medios (penicilina, 3,13 g; estreptomicina, 6,55 g; 500 ml dH₂O; congelar en muestras alícuotas de 50 ml; añadir 0,5 ml a cada tubo), y 50 µl de micostatina (nistatina) por tubo. Puede utilizarse cloromicetina en lugar de penicilina/estreptomicina. El tubo se tapa con un tapón de goma espuma o con algodón. La incubación se realiza a 22–25°C durante un periodo de entre 5 y 7 días, en oscuridad. Tras la incubación, se recogen los fragmentos de tejido y se trituran con una hoja de bisturí sobre un portaobjetos de vidrio, se añade una gota de solución yodada Lugol (solución yodada Lugol madre: yoduro potásico, 6,0 g; yodo, 4,0 g; dH₂O, 100 ml. Solución yodada Lugol de trabajo: dH₂O, 30,0 ml; solución Lugol madre, 15,0 ml) y se cubre la preparación con un cubreobjetos y se deja reposar durante 10 minutos. Las preparaciones se examinan en fresco.

Análisis de carga corporal total (Fisher & Oliver, 1996): se coloca todo el hospedador, cortado en fragmentos de 2-5 mm, en medio de cultivo de tioglicolato líquido y se incuba igual que para el análisis de tejido antes descrito. La solución se centrifuga a 1500 g durante 10 minutos y se desecha el sobrenadante. Se añade NaOH 2 M (20 ml g⁻¹ de tejido) y se incuba la solución a 60°C durante 2–6 horas hasta que el tejido está digerido. La solución se lava tres veces en agua desionizada, se resuspende el precipitado en 1 ml de solución yodada Lugol de trabajo y se cuentan las células. Puede ser preciso realizar diluciones seriadas para reducir el número total de células a una cantidad manejable.

Niveles de validación:

- *Especificidad y sensibilidad:* la especificidad es baja ya que la técnica no diferencia entre las distintas especies de *Perkinsus*. La sensibilidad es alta, sobre todo para el análisis de carga corporal total (Bushek *et al.*, 1994).
- *Método de referencia:* el cultivo en tioglicolato líquido (análisis de carga corporal total) es el método de referencia. Se recomienda el análisis de tejido con cultivo en tioglicolato líquido como método de vigilancia. El método ha sido validado frente al análisis de carga corporal total (Bushek *et al.*, 1994a) y se ha observado que es menos sensible.

Interpretación de los resultados:

- Los parásitos cultivados aumentan de tamaño, pasando de 2–10 a 20–70 µm durante la incubación. Las células de *Perkinsus* spp. son esféricas y las paredes se tiñen de azul o de negro azulado con la solución yodada Lugol (Bushek *et al.*, 1994; Ray 1966).
- En las especies hospedadoras susceptibles, dentro de la gama conocida de *P. marinus*, un resultado positivo es un dato que hace presumir la presencia de una infección por *P. marinus*, pero debe ser confirmado por una PCR específica para la especie, hibridación *in-situ* (ISH) y/o secuenciación de ADN de la región del ITS (espaciador transcrito interno) debido a la posible presencia de *P. chesapeakei* o de especies no descritas de *Perkinsus*. Si no se conservan muestras paralelas para el diagnóstico molecular, puede extraerse el ADN del parásito y amplificarse mediante PCR directamente a partir de preparados de tioglicolato positivos (Audemard *et al.*, 2008).

Disponibilidad de pruebas comerciales: no hay kits comerciales disponibles.

4.3.1.2. Aislamiento e identificación del agente

4.3.1.2.1. Cultivo celular/medios artificiales

Las células de *Perkinsus marinus* pueden cultivarse con facilidad en diversos medios (por ejemplo, La Peyre *et al.*, 1993). Generalmente se realiza una inoculación del medio de cultivo con tejido de corazón, hemolinfa o branquia. Se han realizado comparaciones de diversos medios de cultivo

comercializados (Dungan & Hamilton, 1995) y se ha observado que el crecimiento tiene lugar en todos los medios, pero fue máximo en medio 1/1 DME (Dulbecco's Modified Eagle's)/Ham's F-12.

4.3.1.2.2. Métodos de detección del antígeno basados en anticuerpos

Se han desarrollado anticuerpos monoclonales y policlonales para *P. marinus*, pero no son específicos respecto a esta especie, y se ha observado que el anticuerpo policlonal tiene una reacción cruzada con algunas especies de dinoflagelados (Bushek *et al.*, 2002).

4.3.1.2.3. Técnicas moleculares

Análisis del género Perkinsus (PCR e hibridación in-situ)

Para la vigilancia con el empleo de PCR, se recomienda realizar primero los análisis de PCR para el género *Perkinsus*, y luego las muestras con resultados positivos deben ser analizadas con un análisis específico para *P. marinus*. Se sabe mucho más de la variación de la secuencia interespecie e intraespecie de la región del espaciador transcrito interno (ITS) que de la región del espaciador no transcrito (NTS) del complejo génico de ARNr de *Perkinsus* sp., gracias a las secuencias disponibles en la base de datos GenBank del Centro Nacional (Estados Unidos) de Información de Biotecnología. Así pues, se recomiendan los cebadores de PCR dirigidos a la región ITS ya que se puede estar más seguro de que detectarán diversas cepas de *P. marinus*. Para la hibridación *in-situ* (ISH), se han desarrollado sondas dirigidas al gen de la subunidad pequeña (SSU) del complejo génico de ARNr (Elston *et al.*, 2004). Además, se ha desarrollado un análisis de PCR para el género *Perkinsus* en tiempo real, destinado al uso con tejido del hospedador (Gauthier *et al.*, 2006). Se ha evaluado tan solo con *P. marinus*, *P. olsenii* y *P. chesapeakei*, y se ha demostrado que es más específico en una validación limitada frente al análisis de RFTM. Este análisis deberá ser evaluado de manera más detallada para determinar su inclusividad, pero puede ser útil para laboratorios que disponen del equipamiento necesario.

4.3.1.2.3.1. Reacción en cadena de polimerasa específica para el género Perkinsus

Muestras a obtener: moluscos vivos o recién muertos. Se extirpan 2–3 mm² de fragmentos de tejido de forma aséptica, procedentes de la branquia o el manto, y se colocan en tubos de microcentrifugación de 1,5 ml, con un contenido de etanol al 95%-100%. Los instrumentos de disección deben pasarse por la llama entre las muestras para evitar la contaminación cruzada.

Procedimiento técnico: se extrae el ADN mediante una digestión con proteinasa K durante una noche a 56°C y la metodología de columna spin con el empleo de kits comerciales. Los cebadores de PCR específicos para el género *Perkinsus* recomendados son los de Audemard *et al.*, (2004). El cebador directo PerkITS-85 (5'-CCG-CTT-TGT-TTG-GAT-CCC-3') y el cebador inverso PerkITS-750 (5'-ACA-TCA-GGC-CTT-CTA-ATG-ATG-3') van dirigidos a la región ITS del complejo génico de ARNr. Dichos cebadores amplifican un producto de 703 pb y pueden utilizarse para detectar ADN de cualquier especie conocida, y posiblemente también desconocida, de *Perkinsus*, excepto *P. qugwadi*. Cada reacción de PCR contiene lo siguiente: Tris/HCl 20 mM (pH 8,4), KCl 50 mM, MgCl₂ 1,5 mM, una concentración de 0,2 mM de cada dNTP, cada cebador a concentración 0,1 μM, 0,025 U μl⁻¹ de Taq polimerasa, 0,05 mg ml⁻¹ de BSA (albúmina de suero bovino) y 0,5 μl de ADN genómico (10–50 ng total). Las condiciones de amplificación son una desnaturalización inicial a 95°C durante 4 minutos seguido de 40 ciclos de 95°C durante 1 minuto, 55°C durante un 1 minuto, 72°C durante 1 minuto, con una elongación final a 72°C durante 10 minutos. Tras la amplificación, 4 μl del producto de PCR se visualizan en un gel de agarosa al 2%.

Controles positivos/negativos: son obligatorios. El control positivo es el ADN genómico procedente de un molusco infectado por cualquier especie de *Perkinsus* sp. excepto *P. qugwadi*. Los controles negativos son o bien análisis de ADN sin cebador o análisis realizados con moluscos no infectados.

Niveles de validación:

- Especificidad y sensibilidad: los cebadores de PCR para el género *Perkinsus* se han estudiado para determinar su inclusividad frente a todas las especies conocidas de *Perkinsus*, y se ha evaluado su especificidad frente a diversos haplosporidios y frente a dinoflagelados parasitarios y no parasitarios (Reece & Dungan, 2005). No se ha comparado su sensibilidad con la del RFTM.

Interpretación de los resultados:

- Un resultado positivo es la presencia de una banda del tamaño apropiado (703 pb) en un gel de agarosa, al tiempo que todos los controles negativos muestran un resultado negativo y todos los controles positivos muestran un control positivo.

4.3.1.2.3.2. Hibridación in-situ específica para el género *Perkinsus*

Muestras a obtener: seguir el procedimiento indicado antes para "cortes fijos" (4.3.1.1.3), excepto porque los cortes de tejido deben colocarse en portaobjetos de vidrio con carga eléctrica positiva o en portaobjetos recubiertos de 3-aminopropil-trietoxilano, sin tinción. Desparafinar los cortes en xileno durante 10 minutos, luego volver a hidratar en una serie de alcohol. Lavar los cortes dos veces durante 5 minutos en solución salina tamponada con fosfato (PBS).

Procedimiento técnico: se ha desarrollado una sonda de ADN específica dirigida al gen de ARNr de subunidad pequeña, para el género *Perkinsus* (Elston *et al.*, 2004): Perksp700DIG (5'-CGC-ACA-GTT-AAG-TRC-GTG-RGC-ACG-3'). La sonda debe tener una marca de digoxigenina en el extremo 5'.

Los cortes de tejido se tratan con 125 µg ml⁻¹ de pronasa en PBS, a 37°C durante 30 minutos. La reacción se detiene entonces mediante el lavado de los cortes en PBS con glicina al 0,2% durante 5 minutos. A continuación, se colocan los cortes en 2x SSC (citrato en solución salina estándar; 20x SSC = NaCl 3 M; Na 0,3 M-citrato; pH 7,0) durante 10 minutos.

Se prehibridan los cortes durante 1 hora a 42°C en solución de prehibridación (4x SSC, formamida al 50%, 5x solución de Denhardt, 0,5 mg ml⁻¹ de ARNt de levadura y 0,5 mg ml⁻¹ de ADN de espermatozoides de salmón desnaturalizado por calor) en una cámara húmeda.

A continuación se sustituye la solución de prehibridación por tampón de prehibridación con un contenido de 7 ng µl⁻¹ de la sonda para el género *Perkinsus* marcada con digoxigenina. Se cubren los cortes con cubreobjetos de plástico para hibridación *in-situ* y se colocan en un calentador a 90°C durante 12 minutos. A continuación se enfrían las preparaciones en hielo durante 1 minuto antes de la hibridación durante una noche a 42°C en cámara húmeda.

Se lavan los cortes dos veces durante 5 minutos cada uno en 2x SSC a temperatura ambiente, dos veces durante 5 minutos cada una en 1x SSC a temperatura ambiente, y dos veces durante 10 minutos cada una en 0,5x SSC a 42°C. A continuación se colocan los cortes en Tampón 1 (Tris 100 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM) durante 1–2 minutos.

Se colocan los cortes en Tampón 1 (véase más arriba) con un suplemento de Triton X-100 al 0,3% y suero de carnero al 2% durante 30 minutos. El anticuerpo conjugado con fosfatasa alcalina antidigoxigenina se diluye a 1/500 (o según lo indicado por las recomendaciones del fabricante) en Tampón 1 con un suplemento de Triton X-100 al 0,3% y suero de carnero al 1%, y luego se aplica a los cortes de tejido. Se cubren los cortes con cubreobjetos de hibridación *in-situ* y se incuban durante 3 horas a temperatura ambiente en cámara húmeda.

Se lavan las preparaciones dos veces en Tampón 1 durante 5 minutos cada una, y luego dos veces en Tampón 2 (Tris 100 mM, pH 9,5, NaCl 100 mM, MgCl₂ 50 mM) durante 5 minutos cada una. A continuación se colocan en solución de revelado de color (337,5 µg ml⁻¹ de nitroazul de tetrazolio, 175 µg ml⁻¹ de sal de 5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato p-toluidina, 240 µg ml⁻¹ de levamisol en Tampón 2) durante 2 horas en oscuridad. La reacción de color se interrumpe mediante un lavado en tampón TE (Tris 10 mM, pH 8,0, EDTA [ácido etileno diamino tetraacético] 1 mM).

A continuación se lavan las preparaciones en agua destilada estéril (dH₂O). Se aplica a los cortes una tinción de contraste con Bismarck Brown Y, se lavan en dH₂O, y se aplican cubreobjetos con el empleo de un medio de montaje acuoso.

Controles positivos/negativos: son obligatorios. Los controles positivos son cortes de tejido procedentes de un molusco infectado por cualquier especie de *Perkinsus*. Los controles negativos son o bien análisis sin ninguna sonda o bien análisis con ostras no infectadas.

Niveles de validación:

- **Especificidad y sensibilidad:** la sonda de ADN del género *Perkinsus* se ha evaluado para determinar su especificidad frente a diversas especies de *Perkinsus*, haplosporidios y

dinoflagelados parasitarios (Elston *et al.*, 2004). La sensibilidad es superior a la de la histología en parafina, pero no se ha comparado la sonda con el RFTM.

Interpretación de los resultados

- Un resultado positivo es la presencia de un marcado de color púrpura-negro de las células del parásito, al tiempo que todos los controles negativos muestran un resultado negativo y todos los controles positivos tienen un resultado positivo (Elston *et al.*, 2004).

Análisis de *Perkinsus marinus* (PCR e hibridación in-situ)

4.3.1.2.3.3. *Reacción en cadena de polimerasa específica para Perkinsus marinus*

Se han desarrollado cebadores de PCR dirigidos a la región NRS y a la región ITS del complejo génico de ARNr para *P. marinus*. Aunque los cebadores dirigidos a la región NTS han mostrado una buena especificidad de especie, es poco lo que se sabe sobre la variación intraespecie para la región NTS y existe un riesgo de resultados falsamente negativos. La variación de la secuencia de la región ITS ha sido caracterizada de forma más amplia (véase la base de datos GenBank) y los cebadores dirigidos a la región ITS han sido evaluados más ampliamente en cuanto a su especificidad. Por estas razones, se recomiendan los cebadores dirigidos a la región ITS (Audemard *et al.*, 2004). Se presenta aquí la versión más reciente del análisis de ITS específico para *P. marinus* recomendado. Se recomienda realizar primero una vigilancia con el análisis del género *Perkinsus*, y luego el análisis específico. Además, se ha desarrollado un análisis de PCR en tiempo real para *P. marinus* en tejido del hospedador (Gauthier *et al.*, 2006). Se ha evaluado tan solo con *P. marinus*, *P. olseni* y *P. chesapeakei*, y se ha observado que es más sensible en una validación limitada frente al análisis de RFTM. Este método de análisis deberá ser evaluado de manera más detallada respecto a su especificidad con el empleo de todas las especies conocidas de *Perkinsus*, pero puede ser útil para los laboratorios que disponen del equipamiento necesario.

Muestras a obtener: moluscos vivos o recién muertos. Se extirpan fragmentos de tejido de 2–3 mm² de forma aséptica, procedentes de branquia y manto, y se colocan en tubos de microcentrifugación de 1,5 ml con un contenido de etanol al 95%-100%. Los instrumentos de disección deben pasarse por la llama entre una y otra muestra para evitar la contaminación cruzada.

Procedimientos técnicos: se extrae el ADN mediante digestión con proteinasa K durante una noche a 56°C y con la metodología de columna spin, utilizando kits disponibles comercialmente. Se han desarrollado cebadores para PCR dirigidos a la región ITS del complejo génico de ARNr de *P. marinus* (Audemard *et al.*, 2004): cebador directo PmarITS-70F (5'-CTT-TTG-YTW-GAG-WGT-TGC-GAG-ATG-3') y cebador inverso PmarITS600R (5'-CGA-GTT-TGC-GAG-TAC-CTC-KAG-AG-3'). El tamaño del producto amplificado es de 509 pb. Las mezclas de reacción de PCR contienen tampón de PCR a una concentración de Tris/HCl 20 mM (pH 8,4), KCl 50 mM, MgCl₂ 1,5 mM, una concentración de 0,2 mM de cada dNTP, cada cebador a una concentración de 0,1 μM, 0,025 U μl⁻¹ de Taq polimerasa, 0,05 mg ml⁻¹ de BSA y 0,5 μl de ADN genómico (~10–50 ng) en un volumen total de 25 μl. Las amplificaciones se realizan con una desnaturalización inicial de 95°C durante 4 minutos seguida de 40 ciclos de: 94°C durante 1 minuto, 57°C durante 1 minuto, 65°C durante 3 minutos, con un paso de elongación final de 65°C durante 10 minutos.

Se aplica una electroforesis en geles de agarosa al 2% (en 1× TAE o TBE) a los productos de PCR, se tiñen con bromuro de etidio y se visualizan con el empleo de luz UV.

Controles positivos/negativos: son obligatorios. Los controles positivos consisten en ADN procedente de células de *P. marinus* purificadas, o de ADN genómico procedente de hospedadores con una infección intensa. Los controles negativos son reacciones de ADN no dirigidas.

Niveles de validación:

- **Especificidad y sensibilidad:** los cebadores para la región ITS han sido evaluados respecto a su especificidad frente a *P. olseni*, *P. chesapeakei*, *P. andrewsi* y *P. mediterraneus*, así como para diversas especies de dinoflagelados (Audemard *et al.*, 2004). La sensibilidad es alta y permite detectar una sola célula de *P. marinus* en 30 mg de tejido de ostra, pero los errores de submuestreo en las infecciones leves localizadas pueden dar lugar a resultados falsamente negativos.
- **Método de referencia:** el análisis de PCR de la ITS no ha sido validado frente al análisis de RFTM.

Interpretación de los resultados:

- Un resultado positivo es un producto de amplificación de PCR del tamaño apropiado (509 pb), al tiempo que todos los controles negativos muestran un resultado negativo y todos los controles positivos tienen un resultado positivo.

Disponibilidad de pruebas comerciales: no disponible comercialmente.

Además, se ha desarrollado un análisis de PCR-polimorfismo de longitud de fragmento de restricción (RFLP) que puede ser útil para diagnósticos específicos de *P. marinus* (Abollo *et al.*, 2006), aunque no se ha evaluado su especificidad frente a todas las especies conocidas de *Perkinsus*.

4.3.1.2.3.4. Hibridación in-situ específica para *Perkinsus marinus*

Muestras a obtener: seguir el procedimiento indicado antes para "cortes fijos" (4.3.1.1.3), excepto porque los cortes de tejido deben colocarse en portaobjetos de vidrio con carga eléctrica positiva o en portaobjetos recubiertos de 3-aminopropil-trietoxilano, sin tinción. Desparafinar los cortes en xileno durante 10 minutos, luego rehidratar en una serie de alcohol. Lavar los cortes dos veces durante 5 minutos en PBS.

Procedimientos técnicos: se ha desarrollado una sonda de DNA dirigida a la LSU del gen de ARNr de *P. marinus* (Moss *et al.*, 2006) (PmarLSU-181DIG 5'-GAC-AAA-CGG-CGA-ACG-ACT-C-3'). La sonda debe tener una marca de digoxigenina en su extremo. Los procedimientos de ISH son los mismos que los que se han presentado antes para la sonda del género *Perkinsus*.

Controles positivos/negativos: son obligatorios. Los controles positivos son cortes de tejido procedentes de *C. virginica* infectada por *P. marinus*. Los controles negativos son o bien análisis sin ninguna sonda o bien análisis con ostras no infectadas.

Niveles de validación:

- *Especificidad y sensibilidad:* la sonda de ADN de *P. marinus* ha sido evaluada respecto a su especificidad frente a diversas especies de *Perkinsus* (Moss *et al.*, 2006). La sensibilidad es superior a la de la histología en parafina, pero no se ha comparado la sonda con el método RFTM.

Interpretación de los resultados

- Un resultado positivo es la presencia de un marcado de color púrpura-negro de las células del parásito, al tiempo que todos los controles negativos muestran un resultado negativo y todos los controles positivos tienen un resultado positivo.

4.3.1.2.4. Purificación del agente

Perkinsus marinus puede ser purificado mediante el desarrollo de cultivos clonales.

4.3.2. Métodos serológicos

Ninguno aplicable.

5. Idoneidad de las pruebas para cada uso previsto

Los métodos actualmente disponibles para la vigilancia dirigida y el diagnóstico de *Perkinsus marinus* se indican en la Tabla 5.1. Las designaciones utilizadas en la Tabla indican lo siguiente: a = el método es el método recomendado por razones de disponibilidad, utilidad y especificidad y sensibilidad diagnósticas; b = el método es un método estándar con una buena sensibilidad y especificidad diagnósticas; c = el método tiene aplicación en algunas situaciones, pero el coste, la exactitud u otros factores limitan gravemente su aplicación; y d = el método no se recomienda en la actualidad para este fin. Estas designaciones son algo subjetivas ya que la idoneidad implica cuestiones de fiabilidad, sensibilidad, especificidad y utilidad. Aunque no todas las pruebas indicadas como de categoría a o b han sido objeto de una estandarización y validación formales, su carácter de uso habitual y el hecho de que se hayan utilizado ampliamente sin resultados dudosos las hacen aceptables.

Tabla 5.1. Métodos para la vigilancia y el diagnóstico dirigidos

Método	Vigilancia dirigida			Diagnóstico provisional	Diagnóstico confirmativo
	Ejemplares para siembra	Juveniles	Adultos		
Signos macroscópicos	d	d	d	d	d
Frotis de hemolinfa	d	c	c	c	d
Histopatología	b	b	b	b	d
RFTM, análisis de tejido*	d	a	a	b	d
RFTM, análisis corporal total*	d	c	c	c	d
PCR	a	b	b	a ¹	b ¹
Sondas de ADN – <i>in situ</i>	d	b	b	b	a
Secuenciación	d	d	d	d	b ¹

RFTM = método de cultivo en tioglicolato líquido de Ray; *la técnica no es específica para la especie, pero puede usarse de manera fiable en hospedadores/zonas en las que solamente hay una especie de *Perkinsus* presente o predominante; ¹debe usarse solamente si las infecciones se visualizan mediante frotis, RFTM o histología; PCR = reacción en cadena de polimerasa.

6. Prueba(s) recomendada(s) para la vigilancia dirigida destinada a declarar la ausencia de infección por *Perkinsus marinus*

Deben usarse análisis de PCR en combinación con análisis de RFTM en tejido o de carga corporal total para la vigilancia dirigida destinada a declarar la ausencia de infección por *P. marinus*.

7. Criterios de diagnóstico confirmativo

7.1. Definición de caso sospechoso

En especies con una susceptibilidad conocida, dentro del ámbito geográfico conocido de *P. marinus*, un caso sospechoso de infección por *P. marinus* es un resultado positivo mediante uno de los siguientes métodos: frotis de hemolinfa, histología, cultivo en tioglicolato líquido o PCR. En otras especies hospedadoras, o fuera del ámbito geográfico conocido de *P. marinus*, un caso sospechoso es un resultado positivo mediante PCR. Estos casos deben trasladarse al Laboratorio de Referencia de la OIE para su confirmación.

7.2. Definición de caso confirmado

Un caso confirmado de *P. marinus* es un resultado positivo mediante frotis de hemolinfa, histología o cultivo en tioglicolato líquido combinado con un resultado positivo con PCR o ISH. Se recomienda la secuenciación de la región ITS como paso final para un diagnóstico confirmativo.

8. Bibliografía

ABOLLO E., CASAS S.M., CESCHIA G. & VILLALBA A. (2006). Differential diagnosis of *Perkinsus* species by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism assay. *Mol. Cell. Probes*, **20**, 323–329.

ANDREWS J.D. (1996). History of *Perkinsus marinus*, a pathogen of oysters in Chesapeake Bay 1950–1984. *J. Shellfish Res.*, **15**, 13–16.

AUDEMARD C., CARNEGIE R.B. & BURRESON 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. Org.*, **800**, 235–239.

AUDEMARD C., REECE K.S. & BURRESON E.M. (2004). Real-time PCR for the detection and quantification of the protistan parasite *Perkinsus marinus* in environmental waters. *Appl. Environ. Microbiol.*, **70**, 6611–6618.

BURRESON E.M. & RAGONE CALVO L.M. (1996). Epizootiology of *Perkinsus marinus* disease of oysters in Chesapeake Bay, with emphasis on data since 1985. *J. Shellfish Res.*, **15**, 17–34.

BURRESON E.M., RAGONE CALVO L.M., LA PEYRE J.F., COUNTS F. & PAYNTER K.T. JR. (1994). Acute osmotic tolerance of cultured cells of the oyster pathogen *Perkinsus marinus* (Apicomplexa: Perkinsida). *Comp. Biochem. Physiol.* **109A**, 575–582.

BUSHEK D., DUNGAN C.F. & LEWITUS A.J. (2002a). Serological affinities of the oyster pathogen *Perkinsus marinus* (Apicomplexa) with some dinoflagellates (Dinophyceae). *J. Euk. Microbiol.*, **49**, 11–16.

BUSHEK D., FORD S.E. & ALLEN S.K. (1994). Evaluation of methods using Ray's fluid thioglycollate medium for diagnosis of *Perkinsus marinus* infection in the eastern oyster, *Crassostrea virginica*. *Ann. Rev. Fish Dis.*, **4**, 201–217.

BUSHEK D., FORD S.E. & CHINTALA M.M. (2002b). Comparison of in vitro-cultured and wild-type *Perkinsus marinus*. III. Fecal elimination and its role in transmission. *Dis. Aquat. Org.*, **51**, 217–225.

BUSHEK D., HOLLEY R. & KELLY M. (1997). Treatment of *Perkinsus marinus*-contaminated materials. *J. Shellfish Res.*, **16**, 330.

BUSHEK D. & HOWELL T.L. (2000). The effect of UV irradiation on *Perkinsus marinus* and its potential use to reduce transmission via shellfish effluents. Northeastern Regional Aquaculture Center (NRAC) Publication No. 00-008. North Dartmouth, Massachusetts, USA, 4p.

CÁCERES-MARTÍNEZ J., VÁSQUEZ-YEOMANS R., PADILLA-LARDIZÁBAL G., & DEL RÍO PORTILLA M.A. (2008). *Perkinsus marinus* in pleasure oyster *Crassostrea corteziensis* from Nayarit, Pacific coast of México. *J. Invert. Pathol.*, **99**, 66–73.

CALVO G.W. & BURRESON E.M. (1994). *In vitro* and *in vivo* effects of eight chemotherapeutants on the oyster parasite *Perkinsus marinus* (Mackin, Owen, and Collier). *J. Shellfish Res.*, **13**, 101–107.

CALVO G.W., LUCKENBACH M.W., ALLEN S.K. & BURRESON E.M. (1999). A comparative field study of *Crassostrea gigas* (Thunberg 1793) and *Crassostrea virginica* (Gmelin 1791) in relation to salinity in Virginia. *J. Shellfish Res.*, **18**, 465–474.

CALVO G.W., LUCKENBACH M.W., ALLEN S.K. & BURRESON E.M. (2001). A comparative field study of *Crassostrea ariakensis* (Fujita 1913) and *Crassostrea virginica* (Gmelin 1791) in relation to salinity in Virginia. *J. Shellfish Res.*, **20**, 221–229.

CASAS S.M., VILLALBA A. & REECE K.S. (2002). Study of the perkinsosis of the carpet shell clam *Tapes decussatus* in Galicia (NW Spain). I. Identification of the etiological agent and *in vitro* modulation of zoosporulation by temperature and salinity. *Dis. Aquat. Org.*, **50**, 51–65.

DELANEY M.A., BRADY Y.J. WORLEY S.D. & HUELS K.L. (2003). The effectiveness of N-Halamine disinfectant compounds on *Perkinsus marinus*, a parasite of the eastern oyster *Crassostrea virginica*. *J. Shellfish Res.*, **22**, 91–94.

DUNGAN C.F. & HAMILTON R.M. (1995). Use of a tetrazolium-based cell proliferation assay to measure effects of *in vitro* conditions on *Perkinsus marinus* (Apicomplexan) proliferation. *J. Euk. Microbiol.*, **42**, 379–388.

DUNGAN C.F., REECE K.S., HAMILTON R.M., STOKES N.A. & BURRESON E.M. (2007). Experimental cross-infections by *Perkinsus marinus* and *P. chesapeaki* in three sympatric species of Chesapeake Bay oysters and clams. *Dis. Aquat. Org.*, **76**, 67–75.

ELSTON R.A., DUNGAN C.F., MEYERS T.R. & REECE K.S. (2004). *Perkinsus* sp. infection risk for manila clams, *Venerupis philippinarum* (A. Adams and Reeve, 1850) on the Pacific coast of North and Central America. *J. Shellfish Res.*, **23**, 101–105.

FAISAL M., LA PEYRE J.F. & ELSAYED E.E. (1999). Bacitracin inhibits the oyster pathogen *Perkinsus marinus* *in vitro* and *in vivo*. *J. Aquat. Anim. Health*, **11**, 130–138.

FISHER W.S. & OLIVER L.M. (1996). A whole-oyster procedure for diagnosis of *Perkinsus marinus* disease using Ray's fluid thioglycollate culture medium. *J. Shellfish Res.*, **15**, 109–117.

- GAUTHIER J.D., MILLER C.R., & WILBUR A.E. (2006). TaqMan® MGB real-time PCR approach to quantification of *Perkinsus marinus* and *Perkinsus* spp. in oysters. *J. Shellfish Res.*, **25**, 619-624.
- LA PEYRE J.F., FAISAL M. & BURRESON E.M. (1993). In vitro propagation of the protozoan *Perkinsus marinus*, a pathogen of the eastern oyster, *Crassostrea virginica*. *J. Euk. Microbiol.*, **40**, 304–310.
- LA PEYRE M.K., NICKENS A.D., VOLETY A. K., TOLLEY G.S., LA PEYRE J.F. (2003). Environmental significance of freshets in reducing *Perkinsus marinus* infection in eastern oysters *Crassostrea virginica*: potential management applications. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **248**, 165–176.
- MACKIN J.G. (1951). Histopathology of infection of *Crassostrea virginica* Gmelin by *Dermocystidium marinum* Mackin, Owen and Collier. *Bull. Marine Sci. Gulf Caribb.*, **1**, 72–87.
- MOSS J.A., BURRESON E.M. & REECE K.S. (2006). Advanced *Perkinsus marinus* infections in *Crassostrea ariakensis* maintained under laboratory conditions. *J. Shellfish Res.*, **25**, 65–72.
- RAGONE CALVO L.M., CALVO G.W. & BURRESON E.M. (2003). Dual disease resistance in a selectively bred eastern oyster, *Crassostrea virginica*, strain tested in Chesapeake Bay. *Aquaculture*, **220**, 69–87.
- RAY S.M. (1966). A review of the culture method of detecting *Dermocystidium marinum* with suggested modifications and precautions. *Proc. Natl Shellfish Assoc.*, **54**, 55–69.
- REECE K. & DUNGAN C. (2005). Chapter 5.2. *Perkinsus* sp. infections of marine molluscs. In: Fish Health Section Blue Book, suggested procedures for the detection and identification of certain finfish and shellfish pathogens. Published in CD format by American Fisheries Society, Bethesda, Maryland, USA.
- REECE K.S., DUNGAN C.F., & BURRESON E.M. (2008). Molecular epizootiology of *Perkinsus marinus* and *P. chesapeaki* infections among wild oysters and clams in Chesapeake Bay, USA. *Dis. Aquat. Org.* **82**, 237–248.
- VILLALBA A., REECE K.S., ORDAS M.C., CASAS S.M. & FIGUERAS A. (2004). Perkinsosis in molluscs: a review. *Aquat. Living Resour.*, **17**, 411–432.

*
* *

NB: Existe un Laboratorio de Referencia de la OIE para la Infección por *Perkinsus marinus* (puede consultarse en la Tabla del final de este *Manual Acuático* o en la página web de la OIE: www.oie.int).

INFECCIÓN POR *PERKINSUS OLSENI*

1. Ámbito de aplicación

A efectos de este capítulo, la infección por *Perkinsus olseni* se considera que es una infección por *P. olseni*. *Perkinsus atlanticus* se considera un sinónimo inicial.

2. Información sobre la enfermedad

2.1. Factores del agente

2.1.1. El agente patógeno, cepas del agente

El agente etiológico es *Perkinsus olseni*.

2.1.2. Supervivencia fuera del hospedador

El tiempo de supervivencia máximo fuera del hospedador no se conoce, pero es como mínimo de varios meses para los prezoosporangios, o hipnosporos (Casas *et al.*, 2002b).

2.1.3. Estabilidad del agente

Perkinsus olseni es relativamente estable gracias a su pared celular gruesa. Las células aisladas de *P. olseni* fueron destruidas por el agua dulce en un plazo de 10 minutos a temperatura ambiente y por 0,006 mg ml⁻¹ = 6 ppm (partes por millón) de cloro en un plazo de 30 minutos (Goggin *et al.*, 1990). Las células de *Perkinsus olseni* en los tejidos del hospedador fueron mucho más resistentes a estos tratamientos. Se ha observado que la luz UV (>28.000 µWs cm⁻²) inactiva los trofozoitos de *P. marinus* (Bushek & Howell, 2000) y que 60.000 µWs cm⁻² de luz UV causan la muerte de los hipnosporos de *P. olseni* (Lester & Hayward, 2005).

2.1.4. Ciclo de vida

El ciclo de vida es directo de hospedador a hospedador y todas las fases de la vida son infecciosas (Villalba *et al.*, 2004).

2.2. Factores del hospedador

2.2.1. Especies hospedadoras susceptibles

Perkinsus olseni tiene una gama de hospedadores extraordinariamente amplia. Entre los hospedadores conocidos se encuentran las almejas *Anadara trapezia*, *Austrovenus stutchburyi*, *Ruditapes decussatus*, *R. philippinarum*, *Tridacna maxima*, *T. crocea*, *Protothaca jedoensis* y *Pitar rostrata* (Goggin & Lester, 1995; Villalba *et al.*, 2004; Cremonte *et al.*, 2005; Park *et al.*, 2006; Sheppard & Phillips, 2008); las ostras *Crassostrea gigas*, *C. ariakensis* y *C. sikamea* (Villalba *et al.*, 2004); las ostras perlíferas *Pinctada margaritifera*, *P. martensii* y *P. fucata* (Goggin & Lester, 1995; Sanil *et al.*, 2010); los abulones *Haliotis rubra*, *H. laevigata*, *H. scalaris* y *H. cyclobates* (Goggin & Lester, 1995). Otras especies de bivalvos y gasterópodos podrían ser también susceptibles a este parásito, sobre todo dentro del ámbito geográfico conocido. Los miembros de las familias Arcidae, Malleidae, Isognomonidae, Chamidae y Veneridae son especialmente susceptibles, y la obtención de muestras selectiva pueden revelar la presencia de *P. olseni* cuando solamente se producen infecciones leves en otras familias en el mismo hábitat.

2.2.2. Fases susceptibles de la vida del hospedador

Todas las fases tras el asentamiento son susceptibles.

2.2.3. Especies o subpoblaciones predilectas (probabilidad de detección)

Existe una amplia gama de hospedadores, y la susceptibilidad varía (véase el apartado 2.2.1 más arriba); la intensidad de la infección aumenta con la edad del hospedador.

2.2.4. Órganos diana y tejidos infectados

El tejido conjuntivo de todos los órganos y los hemocitos.

2.2.5. Infección persistente con portadores de por vida

La infección por *P. olseni* puede ser mortal en función de las condiciones ambientales y del hospedador. Puede producirse una infección persistente en individuos portadores durante toda la vida.

2.2.6. Vectores

No se requiere ninguno ya que el ciclo de vida es directo de hospedador a hospedador.

2.2.7. Animales acuáticos salvajes portadores o sospechosos de serlo

No se conoce ninguno. Lester & Hayward (2005) examinaron 32 especies de moluscos no abulones en la Isla Taylor del Sur de Australia utilizando el método de cultivo en tioglicolato líquido de Ray (RFTM) y no encontraron infecciones. La prevalencia de *P. olseni* en el abulón (*H. rubra*) en esa zona osciló entre el 26% y el 56% en tres muestras diferentes.

2.3. Patrón de la enfermedad

2.3.1. Mecanismos de transmisión

La transmisión es directa de hospedador a hospedador (Villalba *et al.*, 2004) y todas las fases del ciclo de vida son infecciosas.

2.3.2. Prevalencia

La prevalencia es muy variable en función del hospedador y de las condiciones ambientales, pero a menudo es del 100%, según lo determinado por la histología o la reacción en cadena de polimerasa (PCR). Se prevé que la prevalencia sea superior en los individuos con más de 1 año de exposición al patógeno.

2.3.3. Distribución geográfica

Tiene una amplia distribución en el Océano Pacífico tropical, Australia, North Island de Nueva Zelanda, Vietnam, Corea (República de), Japón, China (República Popular de), Portugal, España, Francia, Italia y Uruguay (Goggin & Lester, 1995; Villalba *et al.*, 2004; Cremonte *et al.*, 2005). Recientemente se ha observado en la India (Sanil *et al.*, 2010). La especie de *Perkinsus* descrita en Tailandia en la almeja *Paphia undulata* es casi con seguridad *P. olseni* según lo indicado por las secuencias de ADN de las regiones del espaciador transcrito interno (ITS) del parásito. No se conoce la presencia de *Perkinsus olseni* en Norteamérica.

2.3.4. Mortalidad y morbilidad

Las infecciones en las almejas hospedadoras pueden ser mortales, según cuáles sean las condiciones ambientales y la muerte puede producirse 1 o 2 años después de la infección. Las infecciones en abulones en Australia parecen no causar mortalidad, a pesar de que la prevalencia puede ser alta (Lester & Hayward, 2005).

2.3.5. Factores ambientales

El ciclo anual de *P. olseni* está controlado por la temperatura. En *R. decussatus* en España, la intensidad de la infección por *P. olseni* alcanzó un máximo en primavera, al aumentar la temperatura hasta alrededor de 15°C, continuó siendo elevada durante el verano y comienzos de otoño, en que las temperaturas fueron de 19–21°C, y luego disminuyó durante el invierno y comienzo de la primavera, coincidiendo con las temperaturas de 9–10°C (Villalba *et al.*, 2005). La máxima mortalidad del hospedador se produjo al inicio del otoño, durante un periodo de temperatura máxima anual. La tolerancia de *P. olseni* a la salinidad no se conoce bien. La salinidad se mantuvo por encima de 15 unidades prácticas de salinidad (psu) durante el estudio realizado en España. Los estudios de laboratorio en los que se ha utilizado *P. olseni* procedente de piscifactoría (La Peyre *et al.*, 2006) sugieren que *P. olseni* tiene un crecimiento óptimo a 25 psu pero no tolera una salinidad inferior a 15 psu.

2.4. Control y prevención

2.4.1. Vacunación

Ninguna.

2.4.2. Tratamiento con sustancias químicas

La ciclohexamida, la pirimetamina, la desferoxamina (DFO) y el 2, 2-bipiridilo inhiben *P. olseni in vitro*, y la DFO inhibe *P. olseni in vivo*. (Elandalloussi *et al.*, 2005). Los compuestos desinfectantes de N-halamina son eficaces frente a las células de *P. marinus* de cultivo en agua de mar (Delaney *et al.*, 2003), y se ha observado que la bacitracina reduce, pero no elimina *P. marinus* en las ostras hospedadores infectadas (Faisal *et al.*, 1999). Estos compuestos pueden ser eficaces también frente a *P. olseni*, pero no se ha realizado ningún estudio comparativo.

2.4.3. Inmunoestimulación

Ninguna.

2.4.4. Selección genética a favor de la resistencia

Ninguna para *P. olseni*, si bien una selección genética ha mostrado cierta efectividad para *P. marinus*.

2.4.5. Repoblación con especies resistentes

Ninguna.

2.4.6. Agentes bloqueantes

Ninguno.

2.4.7. Desinfección de huevos y larvas

No se tiene conocimiento de que *Perkinsus olseni* infecte los huevos o las larvas de sus hospedadores, pero puede haber células del parásito intracelulares. Los compuestos desinfectantes de N-halamina han sido efectivos frente a *P. marinus* sin causar ningún efecto aparente sobre las larvas de ostras (Delaney *et al.*, 2003) y estos compuestos pueden ser útiles también frente a *P. olseni*.

2.4.8. Prácticas generales de manejo

Una baja densidad de población puede reducir la transmisión del patógeno

3. Obtención de muestras

3.1. Elección de ejemplares

Deben obtenerse muestras de individuos vivos o recién muertos.

3.2. Conservación de las muestras para su envío

Para el diagnóstico con el empleo del RFTM, las muestras deben ser recientes. Para la histología, el mejor conservante es el AFA de Davidson, pero también son aceptables el formol tamponado al 10% u otros fijadores estándar para histología. Para los análisis de PCR, las muestras deben conservarse en etanol al 95%-100% y no en alcohol desnaturalizado.

3.3. Combinación de varias muestras

La combinación de larvas muy pequeñas (5-10 según el tamaño) es aceptable para los análisis de PCR.

3.4. Órganos y tejidos de elección

Para el RFTM con bivalvos, se suelen utilizar fragmentos de branquia, manto y recto. En los abulones, se cultivan cortes de tejido que incluyen branquia, manto y pie. Para la histología, se emplea un corte de 5 mm de grosor realizado a través de la masa visceral, que incluye glándula digestiva, branquia y manto. Para la PCR, lo mejor es utilizar tejido de manto o branquia

3.5. Muestras/tejidos que no son adecuados

El tejido rectal no es fiable para los análisis de PCR debido a la presencia de inhibidores.

4. Métodos de diagnóstico

4.1. Métodos de diagnóstico de campo

4.1.1. Signos clínicos

Los signos clínicos son moluscos muertos o moribundos, pero estos signos clínicos no son específicos para la infección por *P. olseni*.

4.1.2. Alteraciones del comportamiento

Algunos bivalvos individuales con infecciones en una fase avanzada pueden mostrar un cierre lento de las valvas, pero estas alteraciones no son específicas para *P. olseni*.

4.2. Métodos clínicos

4.2.1. Anatomopatología macroscópica

Los signos macroscópicos son una glándula digestiva pálida, un tejido acuoso y delgado, y la presencia de nódulos en el manto y las branquias de algunos hospedadores, aunque estos signos no son específicos para la infección por *P. olseni*.

4.2.2. Bioquímica clínica

No se dispone de datos.

4.2.3. Anatomopatología microscópica

Los cortes fijados muestran lesiones multifocales grandes en el tejido conjuntivo que contiene células de *P. olseni*. Se produce una infiltración hemocítica (hemocitosis) en la mayoría de las infecciones. En las almejas hospedadoras, las células de *P. olseni* están con frecuencia encapsuladas por una capa gruesa de material eosinófilo procedente de la desgranulación de los hemocitos (Villalba *et al.*, 2004).

4.2.4. Preparaciones húmedas

No se recomienda como método clínico.

4.2.5. Frotis

No se recomienda como método clínico.

4.2.6. Microscopía electrónica/citopatología

Los datos ultraestructurales ponen de manifiesto que la lisis de los hemocitos y la coalescencia de los gránulos metacromáticos dan lugar al nódulo que encapsula los trofozoitos (Sagrista *et al.*, 1995).

4.3. Métodos de detección e identificación del agente

4.3.1. Métodos directos de detección

4.3.1.1. Métodos microscópicos

4.3.1.1.1. Preparaciones húmedas

No recomendado.

4.3.1.1.2. Frotis

Los frotis son útiles únicamente en las infecciones avanzadas.

Muestras a obtener: hospedadores vivos.

Procedimiento técnico: obtener sangre del hospedador con una aguja y jeringa introducidas en el músculo aductor de ostras y almejas, o en el seno cefálico de los abulones. Colocar una gota de

hemolinfa sobre un portaobjetos de vidrio y realizar un frotis. Las observaciones se realizan a $\times 100$ – 400 aumentos tras una tinción de Giemsa.

Controles positivos/negativos: ninguno.

Niveles de validación:

- Especificidad y sensibilidad: especificidad muy baja, con una sensibilidad desconocida.
- Método de referencia: sensibilidad no validada frente al cultivo en tioglicolato líquido (análisis de carga corporal total [Fisher & Oliver, 1996]).

Interpretación de los resultados:

- La presencia de células esféricas, mononucleares, de 5–15 μm de diámetro, con una vacuola grande y núcleo excéntrico indica la presencia de *Perkinsus* sp., pero la técnica no es específica para la especie.

Disponibilidad de pruebas comerciales: se comercializan kits de tinción rápida.

4.3.1.1.3. Cortes fijados

Muestras a obtener: moluscos vivos o recién muertos.

Procedimiento técnico: se utilizan cortes de tejido que incluyan glándula digestiva, branquias y manto, que deben fijarse durante 24 horas en AFA de Davidson u otro fijador histológico estándar, seguido de un procesamiento normal para histología en parafina y una tinción con hematoxilina y eosina. Las observaciones se realizan a aumentos crecientes de hasta $\times 400$.

Controles positivos: se recomienda su empleo y pueden obtenerse del Laboratorio de Referencia de la OIE según el hospedador de que se trate.

Niveles de validación:

- *Especificidad y sensibilidad:* la especificidad de especie es muy baja y la sensibilidad es buena para las infecciones de moderadas a intensas, pero es baja para las infecciones de baja intensidad.
- *Método de referencia:* el cultivo en tioglicolato líquido (análisis de carga corporal total [Fisher & Oliver, 1996]) es el método de referencia, aunque no es específico para la especie. La histología no ha sido validada formalmente frente al cultivo en tioglicolato líquido, aunque un estudio reciente ha observado que la histología es menos sensible (Balseiro *et al.* 2010).

Interpretación de los resultados:

- Un resultado positivo es la presencia de células esféricas mononucleadas, de un diámetro que va de aproximadamente 5 a 15 μm , con una gran vacuola y un núcleo desplazado excéntricamente que muestra un nucléolo prominente. Los esquizontes (formas en proceso de división) multinucleados acompañan con frecuencia a los trofozoitos mononucleares. Las células pueden ser fagocitadas por los hemocitos del hospedador. Las células de *Perkinsus olseni* muestran una leve tinción basófila.
- En las especies hospedadoras susceptibles, en una zona en la que solamente conoce la presencia de *P. olseni*, un resultado positivo es un dato que hace presumir la presencia de una infección por *P. olseni*, pero debe ser confirmado mediante hibridación *in-situ* (ISH) o secuenciación de ADN, debido a la posible presencia de otras especies de *Perkinsus*.

Disponibilidad de pruebas comerciales: no hay pruebas comerciales disponibles.

4.3.1.1.4. Método de cultivo en tioglicolato líquido de Ray (RFTM)

La incubación en tioglicolato se emplea de forma habitual para la vigilancia de *P. olseni*. La técnica es sencilla, barata y muy sensible, pero no es específica para la especie. Los trofozoitos de *P. olseni* en el tejido del hospedador aumentan de tamaño cuando se cultivan durante al menos 5 días en medio de tioglicolato líquido con contenido de dextrosa y con suplementos de antibióticos (penicilina, estreptomycin) y un compuesto antifúngico (nistatina) con objeto de reducir el crecimiento bacteriano y fúngico. Cuando se macera el tejido tras el cultivo para permitir la penetración de la solución acuosa de yodo (solución Lugol), los trofozoitos agrandados (hipnospores o prezoosporangios en la terminología antigua) captan con facilidad la solución Lugol y pasan a ser fácilmente visibles a pocos aumentos, debido a su coloración generalmente negra-azulada y su forma esférica.

Muestras a obtener: moluscos vivos o recién muertos.

Procedimiento técnico:

Análisis de tejido (Ray, 1966): se extirpan muestras de tejido de una medida aproximada de 5–10 mm, dando preferencia al tejido de recto, branquia y manto de ostras y almejas, y a los músculos aductor o del pie o al manto de los abulones, y se colocan en tubos de ensayo con un contenido de medio de tioglicolato (medio de tioglicolato con contenido de dextrosa, 14,6 g; NaCl, 10,0 g; agua destilada estéril (dH₂O), 485 ml). Se dispensa un total de 9,5 ml en tubos de ensayo desechables, que se esterilizan en autoclave durante 15 minutos a una presión de 1,2 kg cm⁻². La solución esterilizada al autoclave puede conservarse en los tubos durante un periodo de hasta 3 semanas. Los instrumentos de disección deben lavarse con etanol al 95% y pasarse por la llama entre un hospedador y otro, con objeto de prevenir la transmisión del agente. Los antifúngicos/antibióticos recomendados son los siguientes: 500 unidades ml⁻¹ de penicilina G y 500 unidades ml⁻¹ de dihidroestreptomicina en los medios (penicilina, 3,13 g; estreptomicina, 6,55 g; 500 ml de dH₂O; congelar en muestras alícuotas de 50 ml; añadir 0,5 ml a cada tubo), y 50 µl de micostatina (nistatina) por tubo. Puede utilizarse cloromicetina en lugar de penicilina/estreptomicina. El tubo se tapa con un tapón de goma espuma o con algodón. La incubación se realiza a 22–25°C durante un periodo de entre 5 y 7 días, en oscuridad. Tras la incubación, se recogen los fragmentos de tejido y se trituran con una hoja de bisturí sobre un portaobjetos de vidrio, se añade una gota de solución yodada Lugol (solución yodada Lugol madre: yoduro potásico, 6,0 g; yodo, 4,0 g; dH₂O, 100 ml. Solución yodada Lugol de trabajo: dH₂O, 30,0 ml; solución Lugol madre, 15,0 ml) y se cubre la preparación con un cubreobjetos y se deja reposar durante 10 minutos. Las preparaciones se examinan en fresco.

Análisis de carga corporal total (Fisher & Oliver, 1996): se coloca todo el hospedador, cortado en fragmentos de 2-5 mm, en medio de cultivo de tioglicolato líquido y se incuba igual que para el análisis de tejido antes descrito. Si los organismos hospedadores son demasiado grandes para utilizar todo el hospedador, pueden usarse tejidos seleccionados. La solución se centrifuga a 1500 g durante 10 minutos y se desecha el sobrenadante. Se añade NaOH 2 M (20 ml g⁻¹ de tejido) y se incuba la solución a 60°C durante 2–6 horas hasta que el tejido está digerido. La solución se lava tres veces en agua desionizada, se resuspende el precipitado en 1 ml de solución yodada Lugol de trabajo y se cuentan las células. Puede ser preciso realizar diluciones seriadas para reducir el número total de células a una cantidad manejable.

Niveles de validación:

- *Especificidad y sensibilidad:* la especificidad es baja ya que la técnica no diferencia entre las distintas especies de *Perkinsus*. La sensibilidad es alta, sobre todo para el análisis de carga corporal total (Bushek *et al.*, 1994).
- *Método de referencia:* el cultivo en tioglicolato líquido (análisis de tejido) es el método de vigilancia recomendado. El análisis de tejido no ha sido validado frente al análisis de carga corporal total para *P. olseni*, pero para *P. marinus* el análisis de tejido ha resultado menos sensible (Bushek *et al.*, 1994). En un reciente estudio en el que se comparó el análisis de tejido de RFTM con la histología y con un análisis de PCR recientemente diseñado, se observó que el análisis de RFTM era el más sensible de los tres (Balseiro *et al.*, 2010).

Interpretación de los resultados:

- Los parásitos cultivados aumentan de tamaño pasando de 5–15 a 50–70 µm durante la incubación. Las células de *Perkinsus* spp. son esféricas y las paredes se tiñen generalmente de azul o negro-azulado con la solución yodada Lugol (Ray, 1966).
- En las especies hospedadores susceptibles, dentro de la gama conocida de *P. olseni*, un resultado positivo es un dato que hace presumir la presencia de una infección por *P. olseni*, pero debe ser confirmado mediante una PCR específica para la especie, hibridación *in-situ* (ISH) y/o secuenciación de ADN de la región del ITS (espaciador transcrito interno), debido a la posible presencia de otras especies de *Perkinsus*. Si no se conservan muestras paralelas para el diagnóstico molecular, puede extraerse el ADN del parásito y amplificarse mediante PCR directamente a partir de preparados de tioglicolato positivos (Audemard *et al.*, 2008).

Disponibilidad de pruebas comerciales: no hay kits comerciales disponibles.

4.3.1.2. Aislamiento e identificación del agente

4.3.1.2.1. Cultivo celular/medios artificiales

Las células de *Perkinsus* spp. se cultivan con facilidad en diversos medios (Casas *et al.*, 2002a; Dungan & Hamilton, 1995; La Peyre *et al.*, 1993). Se suele inocular en el medio de cultivo de tejido de corazón, hemolinfa o branquias. Se han realizado comparaciones de los medios comercializados para el cultivo de *P. marinus*, pero no de *P. olseni* (Dungan & Hamilton, 1995). La cepa de *P. marinus* utilizada proliferó con mayor rapidez en el medio 1:1 DME/Ham's F-12.

4.3.1.2.2. Métodos de detección del antígeno basados en anticuerpos

Se han desarrollado anticuerpos policlonales para un componente de la pared celular de *P. olseni* (Montes *et al.*, 2002), pero se unen también a *P. marinus*. No se ha desarrollado ningún análisis diagnóstico con el uso de estos anticuerpos.

4.3.1.2.3. Técnicas moleculares

Análisis del género *Perkinsus* (PCR e hibridación in-situ)

Para la vigilancia con el empleo de PCR, se recomienda realizar primero los análisis de PCR para el género *Perkinsus*, y luego las muestras con resultados positivos deben ser analizadas con un análisis específico para *P. olseni*. Se sabe mucho más de la variación de secuencia interespecies e intraespecie de la región del ITS que de la región del espaciador no transcrito (NTS) del complejo génico de ARNr de *Perkinsus* sp., gracias a las secuencias disponibles en la base de datos GenBank del Centro Nacional (Estados Unidos) de Información de Biotecnología. Así pues, se recomiendan los cebadores de PCR dirigidos a la región ITS ya que se puede estar más seguro de que detectarán diversas cepas de *P. olseni*. Para la hibridación *in-situ* (ISH), se han desarrollado sondas dirigidas al gen de la subunidad pequeña (SSU) del complejo génico de ARNr (Elston *et al.*, 2004). Además, se ha desarrollado un análisis de PCR para el género *Perkinsus* en tiempo real, destinado al uso con tejido del hospedador (Gauthier *et al.*, 2006). Se ha evaluado tan solo con *P. marinus*, *P. olseni* y *P. chesapeakei*, y se ha demostrado que es más sensible en una validación limitada frente al análisis de RFTM. Este análisis deberá ser evaluado de manera más detallada para determinar su especificidad, pero puede ser útil para laboratorios que disponen del equipamiento necesario.

4.3.1.2.3.1. Reacción en cadena de polimerasa específica para el género *Perkinsus*

Muestras a obtener: moluscos vivos o recién muertos. Se extirpan 2–3 mm² de fragmentos de tejido de forma aséptica, procedentes de la branquia o el manto, y se colocan en tubos de microcentrifugación de 1,5 ml, con un contenido de etanol al 95%-100%. Los instrumentos de disección deben pasarse por la llama entre las muestras para evitar la contaminación cruzada.

Procedimiento técnico: se extrae el ADN mediante una digestión con proteinasa K durante una noche a 56°C y la metodología de columna spin con el empleo de kits comerciales. Los cebadores de PCR específicos para el género *Perkinsus* recomendados son los de Audemard *et al.*, (2004). El cebador directo PerKITs-85 (5'-CCG-CTT-TGT-TTG-GAT-CCC-3') y el cebador inverso PerKITs-750 (5'-ACA-TCA-GGC-CTT-CTA-ATG-ATG-3') van dirigidos a la región ITS del complejo génico de ARNr. Dichos cebadores amplifican un producto de 703 pb y pueden utilizarse para detectar ADN de cualquier especie conocida, y posiblemente también desconocida, de *Perkinsus*, excepto *P. qugwadi*. Cada reacción de PCR contiene lo siguiente: Tris/HCl 20 mM (pH 8,4), KCl 50 mM, MgCl₂ 1,5 mM, una concentración de 0,2 mM de cada dNTP, cada cebador a concentración 0,1 μM, 0,025 U μl⁻¹ de Taq polimerasa, 0,05 mg ml⁻¹ de BSA (albúmina de suero bovino) y 0,5 μl de ADN genómico (10–50 ng total). Las condiciones de amplificación son una desnaturalización inicial a 95°C durante 4 minutos seguido de 40 ciclos de 95°C durante 1 minuto, 55°C durante un 1 minuto, 72°C durante 1 minuto, con una elongación final a 72°C durante 10 minutos. Tras la amplificación, 4 μl del producto de PCR se visualizan en un gel de agarosa al 2%.

Controles positivos/negativos: son obligatorios. El control positivo es el ADN genómico procedente de un molusco infectado por cualquier especie de *Perkinsus* (excepto *P. qugwadi*). Los controles negativos son análisis sin ADN o bien análisis con moluscos no infectados.

Niveles de validación:

- **Especificidad y sensibilidad:** los cebadores de PCR para el género *Perkinsus* se han evaluado respecto a su inclusividad frente a todas las especies conocidas de *Perkinsus*, y se ha estudiado

su especificidad frente a diversos haplosporidios y dinoflagelados parasitarios y no parasitarios (Reece & Dungan, 2005). No se ha comparado su sensibilidad con la del RFTM.

Interpretación de los resultados

- Un resultado positivo es la presencia de una banda del tamaño apropiado (703 pb) en un gel de agarosa, al tiempo que todos los controles negativos muestran un resultado negativo y todos los controles positivos tienen un resultado positivo.

4.3.1.2.3.2. Hibridación in-situ específica para el género *Perkinsus*

Muestras a obtener: seguir el procedimiento indicado antes para "cortes fijos" (4.3.1.1.3), excepto porque los cortes de tejido deben colocarse en portaobjetos de vidrio con carga eléctrica positiva o en portaobjetos recubiertos de 3-aminopropil-trietoxilano, sin tinción. Desparafinar los cortes en xileno durante 10 minutos, luego volver a hidratar en una serie de alcohol. Lavar los cortes dos veces durante 5 minutos en solución salina tamponada con fosfato (PBS).

Procedimiento técnico: se ha desarrollado una sonda de ADN específica dirigida al gen de ARNr de subunidad pequeña, para el género *Perkinsus* (Elston *et al.*, 2004): Perksp700DIG (5'-CGC-ACA-GTT-AAG-TRC-GTG-RGC-ACG-3'). La sonda debe tener una marca de digoxigenina en el extremo 5'.

Los cortes de tejido se tratan con 125 µg ml⁻¹ de pronasa en PBS, a 37°C durante 30 minutos. La reacción se detiene entonces mediante el lavado de los cortes en PBS con glicina al 0,2% durante 5 minutos. A continuación, se colocan los cortes en 2x SSC (citrato en solución salina estándar; 20x SSC = NaCl 3 M; Na-citrato 0,3 M; pH 7,0) durante 10 minutos.

Se prehibridan los cortes durante 1 hora a 42°C en solución de prehibridación (4x SSC, formamida al 50%, 5x solución de Denhardt, 0,5 mg ml⁻¹ de ARNt de levadura y 0,5 mg ml⁻¹ de ADN de espermatozoides de salmón desnaturalizado por calor) en una cámara húmeda.

A continuación se sustituye la solución de prehibridación por tampón de prehibridación con un contenido de 7 ng µl⁻¹ de la sonda para el género *Perkinsus* marcada con digoxigenina. Se cubren los cortes con cubreobjetos de plástico para hibridación *in-situ* y se colocan en un calentador a 90°C durante 12 minutos. A continuación se enfrían las preparaciones en hielo durante 1 minuto antes de la hibridación durante una noche a 42°C en cámara húmeda.

Se lavan los cortes dos veces durante 5 minutos cada uno en 2x SSC a temperatura ambiente, dos veces durante 5 minutos cada una en 1x SSC a temperatura ambiente, y dos veces durante 10 minutos cada una en 0,5x SSC a 42°C. A continuación se colocan los cortes en Tampón 1 (Tris 100 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM) durante 1–2 minutos.

Se colocan los cortes en Tampón 1 (véase más arriba) con un suplemento de Triton X-100 al 0,3% y suero de carnero al 2% durante 30 minutos. El anticuerpo conjugado con fosfatasa alcalina antidigoxigenina se diluye a 1/500 (o según lo indicado por las recomendaciones del fabricante) en Tampón 1 con un suplemento de Triton X-100 al 0,3% y suero de carnero al 1%, y luego se aplica a los cortes de tejido. Se cubren los cortes con cubreobjetos de hibridación *in-situ* y se incuban durante 3 horas a temperatura ambiente en cámara húmeda.

Se lavan las preparaciones dos veces en Tampón 1 durante 5 minutos cada una, y luego dos veces en Tampón 2 (Tris 100 mM, pH 9,5, NaCl 100 mM, MgCl₂ 50 mM) durante 5 minutos cada una. A continuación se colocan en solución de revelado de color (337,5 µg ml⁻¹ de nitroazul de tetrazolio, 175 µg ml⁻¹ de sal de 5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato p-toluidina, 240 µg ml⁻¹ de levamisol en Tampón 2) durante 2 horas en oscuridad. La reacción de color se interrumpe mediante un lavado en tampón TE (Tris 10 mM, pH 8,0, EDTA [ácido etileno diamino tetraacético] 1 mM).

A continuación se lavan las preparaciones en agua destilada estéril (dH₂O). Se aplica a los cortes una tinción de contraste con Bismarck Brown Y, se lavan en dH₂O, y se aplican cubreobjetos con el empleo de un medio de montaje acuoso.

Controles positivos/negativos: son obligatorios. Los controles positivos son cortes de tejido procedentes de un molusco infectado por cualquier especie de *Perkinsus*. Los controles negativos son o bien análisis sin ninguna sonda o bien análisis con ostras no infectadas.

Niveles de validación:

- **Especificidad y sensibilidad:** la sonda de ADN del género *Perkinsus* se ha evaluado para determinar su especificidad frente a diversas especies de *Perkinsus*, haplosporidios y dinoflagelados parasitarios (Elston *et al.*, 2004). La sensibilidad es superior a la de la histología en parafina, pero no se ha comparado la sonda con el RFTM.

Interpretación de los resultados

- Un resultado positivo es la presencia de un marcado de color púrpura-negro de las células del parásito, al tiempo que todos los controles negativos muestran un resultado negativo y todos los controles positivos tienen un resultado positivo.

Análisis de *Perkinsus olseni* (PCR e hibridación in-situ)

4.3.1.2.3.3. Reacción en cadena de polimerasa específica para *Perkinsus olseni*

Se han desarrollado cebadores de PCR dirigidos a la región NTS y a la región ITS del complejo génico de ARNr para *P. olseni*. Aunque los cebadores dirigidos a la región NTS han mostrado una buena especificidad para la especie, es poco lo que se sabe de la variación existente dentro de la especie para la región NTS y existe un riesgo de resultados falsamente negativos. La variación de la secuencia en la región ITS se ha caracterizado más ampliamente (véase la base de datos GenBank) y se ha estudiado de manera más detallada la especificidad de los cebadores dirigidos a la región ITS. Por estas razones, se recomiendan los cebadores dirigidos a la región ITS. Se presenta aquí la versión más reciente del análisis de ITS específico para *P. olseni* recomendado. Se recomienda que se realice primero una vigilancia con el empleo del análisis de ITS para el género *Perkinsus*, y luego el análisis específico. Se ha desarrollado un análisis de PCR-polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) que puede ser útil para diagnósticos específicos de *P. olseni* (Abollo *et al.*, 2006), aunque no se ha evaluado su especificidad frente a todas las especies conocidas de *Perkinsus*.

Muestras a obtener: moluscos vivos o recién muertos. Se extirpan fragmentos de tejido de 2–3 mm² de forma aséptica, procedentes de branquia y manto, y se colocan en tubos de microcentrifugación de 1,5 ml con un contenido de etanol al 95%-100%. Los instrumentos de disección deben pasarse por la llama entre las distintas muestras para prevenir la contaminación cruzada.

Procedimientos técnicos: se extrae el ADN mediante digestión con proteinasa K durante una noche a 56°C y la metodología de columna spin con el empleo de kits comerciales. Se han desarrollado cebadores dirigidos a la región ITS del complejo génico de ARNr de *P. olseni* (Moss *et al.*, 2006): cebador directo PolsITS-140F (5'-GAC-CGC-CTT-AAC-GGG-CCG-TGT-T-3') y cebador inverso PolsITS-600R (5'-GGR-CTT-GCG-AGC-ATC-CAA-AG-3'). El tamaño del producto amplificado es de aproximadamente 450 pb. Las mezclas para la reacción de PCR contienen tampón de PCR a una concentración de Tris/HCl 20 mM (pH 8,4), KCl 50 mM, MgCl₂ 1,5 mM, una concentración 0,2 mM de cada dNTP, cada cebador a una concentración 0,1 µM, 0,025 U µl⁻¹ de *Taq* polimerasa, 0,05 mg ml⁻¹ de BSA y 0,5 µl de ADN genómico (~10–50 ng) en un volumen total de 25 µl. Las amplificaciones se realizan con una desnaturalización inicial de 95°C durante 4 minutos seguida de 40 ciclos de: 94°C durante 1 minuto, 62°C durante 1 minuto, 65°C durante 3 minutos, con un paso final de elongación de 65°C durante 10 minutos.

Se aplica una electroforesis en geles de agarosa al 2% (en 1× TAE o TBE) a los productos de PCR, se tiñen con bromuro de etidio y se visualizan con el empleo de luz UV.

Controles positivos/negativos: son obligatorios. Los controles positivos consisten en ADN procedente de células de *P. olseni* purificadas o en ADN genómico de hospedadores con una infección intensa. Los controles negativos son reacciones de ADN no dirigidas.

Niveles de validación:

- **Especificidad y sensibilidad:** se ha evaluado la especificidad de cebadores de la región ITS frente a *P. marinus*, *P. chesapeakei*, *P. mediterraneus* y *P. honshuensis* (Moss, 2007; Moss *et al.*, 2006). La sensibilidad es alta y permite detectar una célula de *P. olseni* en 30 mg de tejido de ostra, pero los errores de submuestreo en las infecciones leves localizadas pueden dar lugar a resultados falsamente negativos
- **Método de referencia:** el análisis de PCR de la ITS para *P. olseni* ha sido validado de manera limitada frente al RFTM (análisis de tejido) y se ha observado que es más sensible (Moss, 2007).

Interpretación de los resultados:

- Un resultado positivo es un producto de amplificación de PCR del tamaño apropiado (455 pb), al tiempo que todos los controles negativos producen un resultado negativo y todos los controles positivos tienen un resultado positivo.

Disponibilidad de pruebas comerciales: no disponible comercialmente.

4.3.1.2.3.4. Hibridación in-situ específica para *Perkinsus olseni*

Muestras a obtener: seguir el procedimiento indicado antes para "cortes fijos" (4.3.1.1.3), excepto porque los cortes de tejido deben colocarse en portaobjetos de vidrio con carga eléctrica positiva o en portaobjetos recubiertos de 3-aminopropil-trietoxilano, sin tinción. Desparafinar los cortes en xileno durante 10 minutos, luego rehidratar en una serie de alcohol. Lavar los cortes dos veces durante 5 minutos en PBS.

Procedimientos técnicos: se ha desarrollado una sonda de ADN dirigida a la LSU del gen de ARNr de *P. olseni* (Moss *et al.*, 2006) (PolsLSU-464DIG 5'-CTC-ACA-AGT-GCC-AAA-CAA-CTG-3'). La sonda debe tener una marca de digoxigenina en su extremo. Los procedimientos de ISH son los mismos que los que se han presentado antes para la sonda del género *Perkinsus*.

Controles positivos/negativos: son obligatorios. Los controles positivos son cortes de tejido procedentes de cualquier hospedador susceptible infectado por *P. olseni*. Los controles negativos son análisis sin ninguna sonda o bien análisis con ostras no infectadas.

Niveles de validación:

- *Especificidad y sensibilidad:* se ha evaluado la sonda de ADN de *P. olseni* respecto a la especificidad frente a diversas especies de *Perkinsus* (Moss, 2007; Moss *et al.*, 2006), incluidas *P. marinus*, *P. chesapeakei*, *P. mediterraneus* y *P. honshuensis*. La sensibilidad es superior a la de la histología en parafina pero la sonda no se ha comparado con el RFTM.

Interpretación de los resultados

- Un resultado positivo es la presencia de un marcado de color púrpura-negro de las células del parásito, al tiempo que todos los controles negativos producen resultados negativos y todos los controles positivos tienen resultados positivos.

4.3.1.2.4. Purificación del agente

Perkinsus olseni puede purificarse mediante el desarrollo de cultivos clonales.

4.3.2. Métodos serológicos

Ninguno aplicable.

5. Idoneidad de las pruebas para cada uso previsto

Los métodos actualmente disponibles para la vigilancia dirigida y el diagnóstico de *Perkinsus olseni* se indican en la Tabla 5.1. Las designaciones utilizadas en la Tabla indican lo siguiente: a = el método es el método recomendado por razones de disponibilidad, utilidad y especificidad y sensibilidad diagnósticas; b = el método es un método estándar con una buena sensibilidad y especificidad diagnósticas; c = el método tiene aplicación en algunas situaciones, pero el coste, la exactitud u otros factores limitan gravemente su aplicación; y d = el método no se recomienda en la actualidad para este fin. Estas designaciones son algo subjetivas ya que la idoneidad implica cuestiones de fiabilidad, sensibilidad, especificidad y utilidad. Aunque no todas las pruebas indicadas como de categoría a o b han sido objeto de una estandarización y validación formales, su carácter de uso habitual y el hecho de que se hayan utilizado ampliamente sin resultados dudosos las hacen aceptables.

Tabla 5.1. Métodos para la vigilancia y el diagnóstico dirigidos

Método	Vigilancia dirigida			Diagnóstico provisional	Diagnóstico confirmativo
	Ejemplares para siembra	Juveniles	Adultos		
Signos macroscópicos	d	d	d	d	d
Frotis de hemolinfa	d	c	c	c	d
Histopatología	b	b	b	b	d
RFTM, análisis de tejido*	d	a	a	b	d
RFTM, análisis corporal total*	d	c	c	c	d
PCR	a	b	b	a ¹	b ¹
Sondas de ADN – <i>in situ</i>	d	b	b	b	a
Secuenciación	d	d	d	d	b ¹

RFTM = método de cultivo en tioglicolato líquido de Ray; *la técnica no es específica para la especie, pero puede usarse de manera fiable en hospedadores/zonas en las que solamente hay una especie de *Perkinsus* presente o predominante; ¹debe usarse solamente si las infecciones se visualizan mediante frotis, RFTM o histología; PCR = reacción en cadena de polimerasa.

6. Prueba(s) recomendada(s) para la vigilancia dirigida destinada a declarar la ausencia de infección por *Perkinsus olseni*

Deben usarse análisis de PCR en combinación con análisis de tejido de RFTM o, si es posible, análisis de carga corporal total para la vigilancia dirigida, destinada a declarar la ausencia de infección por *P. olseni*.

7. Criterios de diagnóstico confirmativo

7.1. Definición de caso sospechoso

En especies con una susceptibilidad conocida, dentro del ámbito geográfico conocido de *P. olseni*, un caso sospechoso de infección por *P. olseni* es un resultado positivo mediante uno de los siguientes métodos: frotis de hemolinfa, histología, cultivo en tioglicolato líquido o PCR. En otras especies hospedadoras, o fuera del ámbito geográfico conocido de *P. olseni*, un caso sospechoso es un resultado positivo mediante PCR. Estos casos deben trasladarse al Laboratorio de Referencia de la OIE para su confirmación.

7.2. Definición de caso confirmado

Un caso confirmado de *P. olseni* es un resultado positivo mediante frotis de hemolinfa, histología o cultivo en tioglicolato líquido combinado con un resultado positivo con PCR o ISH. Se recomienda la secuenciación de la región ITS como paso final para un diagnóstico confirmativo.

8. Bibliografía

ABOLLO E., CASAS S.M., CESCHIA G. & VILLALBA A. (2006). Differential diagnosis of *Perkinsus* species by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism assay. *Mol. Cell. Probes*, **20**, 323-329.

AUDEMARD C., CARNEGIE R.B. & BURRESON 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. Org.*, **800**, 235–239.

AUDEMARD C., REECE K.S., & BURRESON E.M. (2004). Real-time PCR for the detection and quantification of the protistan parasite *Perkinsus marinus* in environmental waters. *Appl. Environ. Microbiol.*, **70**, 6611–6618.

BALSEIRO P., MONTES J., FERNÁNDEZ CONCHAS R., NOVOA B. & FIGUERAS A. (2010). Comparison of diagnostic techniques to detect the clam pathogen *Perkinsus olseni*. *Dis. Aquat. Org.*, **90**, 143–151.

BUSHEK D., FORD S.E. & ALLEN S.K. (1994). Evaluation of methods using Ray's fluid thioglycollate medium for diagnosis of *Perkinsus marinus* infection in the eastern oyster, *Crassostrea virginica*. *Ann. Rev. Fish Dis.*, **4**, 201–217.

BUSHEK D. & HOWELL T.L. (2000). The effect of UV irradiation on *Perkinsus marinus* and its potential use to reduce transmission via shellfish effluents. Northeastern Regional Aquaculture Center (NRAC) Publication No. 00-008. North Dartmouth, Massachusetts, USA, 4p.

CASAS S.M., LA PEYRE J.F., REECE K.S., AZEVEDO C. & VILLALBA A. (2002a). Continuous *in vitro* culture of the carpet shell clam *Tapes decussatus* protozoan parasite *Perkinsus atlanticus*. *Dis. Aquat. Org.*, **52**, 217–231.

CASAS S.M., VILLALBA A. & REECE K.S. (2002b). Study of the perkinsosis of the carpet shell clam *Tapes decussatus* in Galicia (NW Spain). I. Identification of the etiological agent and *in vitro* modulation of zoosporulation by temperature and salinity. *Dis. Aquat. Org.*, **50**, 51–65.

CREMONTE F., BALSEIRO P. & FIGUERAS A. (2005). Occurrence of *Perkinsus olseni* (Protozoa: Apicomplexa) and other parasites in the venerid commercial clam *Pitar rostrata* from Uruguay, southwestern Atlantic coast. *Dis. Aquat. Org.*, **64**, 85–90.

DELANEY M.A., BRADY Y.J. WORLEY S.D. & HUELS K.L. (2003). The effectiveness of N-halamine disinfectant compounds on *Perkinsus marinus*, a parasite of the eastern oyster *Crassostrea virginica*. *J. Shellfish Res.*, **22**, 91–94.

DUNGAN, C.F. & HAMILTON R.M. (1995). Use of a tetrazolium-based cell proliferation assay to measure effects of *in vitro* conditions on *Perkinsus marinus* (Apicomplexan) proliferation. *J. Eukaryot. Microbiol.*, **42**, 379–388.

ELANDALLOUSSI, L.M., LEITE R.B., RODRIGUES P.M., AFONSO R., NUNES P.A. & CANCELA M.L. (2005). Effect of antiprotozoal drugs on the proliferation of the bivalve parasite *Perkinsus olseni*. *Aquaculture*, **243**, 9–17.

ELSTON R.A., DUNGAN C.F., MEYERS T.R. & REECE K.S. (2004). *Perkinsus* sp. infection risk for manila clams, *Venerupis philippinarum* (A. Adams and Reeve, 1850) on the Pacific coast of North and Central America. *J. Shellfish Res.*, **23**, 101–105.

FAISAL M., LA PEYRE J.F. & ELSAYED E.E. (1999). Bacitracin inhibits the oyster pathogen *Perkinsus marinus* *in vitro* and *in vivo*. *J. Aquat. Anim. Health*, **11**, 130–138.

FISHER W.S. & OLIVER L.M. (1996). A whole-oyster procedure for diagnosis of *Perkinsus marinus* disease using Ray's fluid thioglycollate culture medium. *J. Shellfish Res.*, **15**, 109–117.

GAUTHIER J.D., MILLER C.R. & WILBUR A.E. (2006). TaqMan® MGB real-time PCR approach to quantification of *Perkinsus marinus* and *Perkinsus* spp. in oysters. *J. Shellfish Res.*, **25**, 619–624.

GOGGIN C.L. & LESTER R.J.G. (1995). *Perkinsus*, a protistan parasite of abalone in Australia: a review. *Aust. J. Mar. Freshwater Res.*, **46**, 639–646.

GOGGIN C.L., SEWELL K.B. AND LESTER R.J.G. (1990). Tolerances of *Perkinsus* spp. (Protozoa, Apicomplexa) to temperature, chlorine and salinity. *J. Shellfish Res.*, **9**, 145–148.

LA PEYRE M., CASAS S. LA PEYRE J. (2006). Salinity effects on viability, metabolic activity and proliferation of three *Perkinsus* species. *Dis. Aquat. Org.*, **71**, 59–74.

LA PEYRE J.F., FAISAL M. & BURRESON E.M. (1993). *In vitro* propagation of the protozoan *Perkinsus marinus*, a pathogen of the eastern oyster, *Crassostrea virginica*. *J. Eukaryot. Microbiol.*, **40**, 304–310.

LESTER R.J.G., & HAYWARD C.J. (2005). Control of *Perkinsus* disease in abalone. Fisheries Research and Development Corporation Project 2000/151 Final Report. University of Queensland, Brisbane. 50 p.

MONTES J.F., DURFORT M., LLADO, A. & GARCIA VALERO J. (2002). Characterization and immunolocalization of a main proteinaceous component of the cell wall of the protozoan parasite *Perkinsus atlanticus*. *Parasitology*, **124**, 477–484.

- MOSS J.A. (2007). Characterization of exotic pathogens associated with the suminoe oyster, *Crassostrea ariakensis*. Ph.D. Dissertation. Virginia Institute of Marine Science, College of William and Mary, Gloucester Point, Virginia, USA. 230p.
- MOSS J.A., BURRESON E.M. & REECE K.S. (2006). Advanced *Perkinus marinus* infections in *Crassostrea ariakensis* maintained under laboratory conditions. *J. Shellfish Res.*, **25**, 65–72.
- PARK K.I., NGO T.T., CHOI S.D., CHO M. & CHOI K.S. (2006). Occurrence of *Perkinsus olseni* in the Venus clam *Protothaca jodoensis* in Korean waters. *J. Invertebr. Parasitol.*, **93**, 81–87.
- RAY S.M. (1966). A review of the culture method of detecting *Dermocystidium marinum* with suggested modifications and precautions. *Proc. Natl. Shellfish Assoc.*, **54**, 55–69.
- REECE K. & DUNGAN C. (2005). Chapter 5.2. *Perkinsus* sp. infections of marine molluscs. In: Fish Health Section Blue Book, suggested procedures for the detection and identification of certain finfish and shellfish pathogens. Published in CD format by American Fisheries Society, Bethesda, Maryland, USA.
- SAGRISTA E., DURFORT M. & AZEVEDO C. (1995). *Perkinsus* sp. (Phylum Apicomplexa) in Mediterranean clam *Ruditapes semidecussatus*: ultrastructural observations of the cellular response of the host. *Aquaculture* **132**, 153–160.
- SANIL N.K., VIJAYAN K.K., KRIPA V. & MOHAMED K.S. (2010). Occurrence of the protozoan parasite, *Perkinsus olseni* in the wild and farmed pearl oyster, *Pinctada fucata* (Gould) from the Southeast coast of India. *Aquaculture*, **299**, 8–14.
- SHEPPARD B.J. & PHILLIPS A.C. (2008). *Perkinsus olseni* detected in Vietnamese aquacultured reef clams *Tridacna crocea* imported to the USA, following a mortality event. *Dis. Aquat. Org.*, **79**, 229–235.
- VILLALBA A., CASAS S.M., LÓPEZ C., & CARBALLAL M.J. (2005). Study of perkinsosis in the carpet shell clam *Tapes decussatus* in Galicia (NW Spain). II. Temporal pattern of disease dynamics and association with clam mortality. *Dis. Aquat. Org.*, **65**, 257–267.
- VILLALBA A., REECE K.S., ORDAS M.C., CASA S.M. & FIGUERAS A. (2004). Perkinsosis in molluscs: a review. *Aquat. Living Resour.*, **17**, 411–432.

*
* *

NB: Existe un Laboratorio de Referencia de la OIE para la Infección por *Perkinsus olseni* (puede consultarse en la Tabla del final de este *Manual Acuático* o en la página web de la OIE: www.oie.int).

INFECCIÓN POR *XENOHALIOTIS CALIFORNIENSIS*

1. **Ámbito de aplicación**

Las infecciones intracitoplásmicas por *Xenohaliothis californiensis*, una bacteria de tipo rickettsia, en los epitelios gastrointestinales, causan una enfermedad (denominada síndrome de marchitamiento [Haaker *et al.*, 1992]) en abulones tanto en estado salvaje como de piscifactoría, *Haliothis* spp. (Vetigastropoda: Mollusca [Friedman *et al.*, 2000]). Los signos macroscópicos de la enfermedad incluyen atrofia del pie, glándula digestiva moteada, anorexia, debilidad y letargia (Balseiro *et al.*, 2006; Friedman *et al.*, 2000; Gardner *et al.*, 1995).

2. **Información sobre la enfermedad**

2.1. **Factores del agente**

2.1.1. **El agente patógeno, cepas del agente**

Xenohaliothis californiensis es una bacteria intracelular de la familia Anaplasmataceae (Dumler *et al.*, 2001) y está estrechamente relacionada con miembros de los géneros *Ehrlichia*, *Anaplasma* y *Cowdria* (Friedman *et al.*, 2000). La enfermedad causada por esta bacteria se denomina síndrome de marchitamiento (Friedman *et al.*, 2002; Haaker *et al.*, 1992) y puede designarse más apropiadamente como rickettsiosis del abulón. No existe información sobre la presencia de cepas distintas de esta bacteria; sin embargo, observaciones recientes han puesto de manifiesto que algunas *X. californiensis* pueden ser infectadas por un bacteriófago (Friedman & Crosson, datos no publicados). La bacteria, que es dimórfica, de forma bacilar a esférica, mide una media de 332 × 1550 nm en la forma bacilar y una media de 1405 nm en el morfotipo esférico. La bacteria se reproduce en el interior de vacuolas intracitoplásmicas de un diámetro de 14–56 µm dentro de los epitelios gastrointestinales (Friedman *et al.*, 2000).

2.1.2. **Supervivencia fuera del hospedador**

Aunque se cree que *X. californiensis* es un microorganismo intracelular obligado, la bacteria puede sobrevivir fuera del hospedador durante un periodo de tiempo indeterminado, según indican los estudios de transmisión por el agua (Balseiro *et al.*, 2006; Braid *et al.*, 2005; Friedman *et al.*, 2002; Friedman *et al.*, 2007; Rosenblum *et al.*, 2008).

2.1.3. **Estabilidad del agente**

Según indica la descontaminación obtenida con éxito en el laboratorio, esta bacteria es inactivada con facilidad mediante la inmersión en lejía a concentración <10%. Además, la exposición del agua de mar con contenido de la bacteria a >10 mg litro⁻¹ [ppm] de hipoclorito cálcico y la desinfección del equipamiento en un baño de yodo rebajado al 1% en agua dulce durante 1 hora son métodos de desinfección eficaces según indica el uso de dichos métodos en un laboratorio marino con flujo de agua de mar y la ausencia de detección de este patógeno en poblaciones de abulones adyacentes (Friedman & Finley, 2003; Friedman, observación personal).

2.1.4. **Ciclo de vida**

La bacteria se divide mediante fisión binaria (Friedman *et al.*, 2000) y tiene una transmisión horizontal directa (Braid *et al.*, 2005; Friedman *et al.*, 2002; Moore *et al.*, 2001b). Aunque no es habitual observarla en abulones de piscifactoría hasta que están en condiciones de extracción (tamaño máximo >2,5 cm), el examen mediante reacción en cadena de polimerasa (PCR) de abulones de 6 semanas de edad expuestos sugirió que los abulones de 1-2 mm pueden ser infectados (Moore *et al.*, observaciones no publicadas).

2.2. Factores del hospedador

2.2.1. Especies hospedadoras susceptibles

Xenohaliotis californiensis infecta a los miembros del género *Haliotis* y se han observado infecciones naturales en el abulón negro (*H. cracherodii*), el abulón blanco (*H. sorenseni*), el abulón colorado (*H. rufescens*), el abulón amarillo (*H. corrugata*), el abulón verde (*H. fulgens*), el abulón pequeño (*H. diversicolor supertexta*) (Wetchateng, 2008; Wetchateng *et al.*, 2010), el abulón de Europa (*H. tuberculata*) (Balseiro *et al.*, 2006) en instalaciones naturales y en piscifactoría, así como en el abulón plano (*H. wallalensis*) y el abulón japonés (*H. discus-hannai*) en pruebas de laboratorio (Friedman, observaciones no publicadas). No se han estudiado otras especies de abulones. La temperatura es importante tanto para la transmisión del patógeno como para la expresión de la enfermedad (Braid *et al.*, 2005; Friedman *et al.*, 1997; Raimondi *et al.*, 2002; Rosenblum *et al.*, 2008).

2.2.2. Fases susceptibles de la vida del hospedador

Aunque se ha demostrado que todas las fases postlarvianas son susceptibles a la infección por *X. californiensis*, la enfermedad clínica se observa típicamente en animales de edad > 1 año en los abulones de piscifactoría (Friedman, observaciones no publicadas) y en los abulones de todos los tamaños en las poblaciones salvajes analizadas hasta la fecha (por ejemplo, Balseiro *et al.*, 2006; Braid *et al.*, 2005; Friedman *et al.*, 1997; Haaker *et al.*, 1992; Steinbeck *et al.*, 1992; Van Blaricom *et al.*, 1993; 2011).

2.2.3. Especies o subpoblaciones predilectas (probabilidad de detección)

La probabilidad de detección aumenta a medida que se incrementa el tamaño del abulón. Los animales de un tamaño inferior a 10 mm tienen una menor probabilidad de detección con el empleo de histología, pero la probabilidad de detección en ellos es igual con el empleo de PCR (Friedman *et al.*, 2007; Moore *et al.*, 2011).

2.2.4. Órganos diana y tejidos infectados

Xenohaliotis californiensis infecta las células epiteliales gastrointestinales del esófago posterior, la glándula digestiva y, en menor medida, el intestino (Friedman *et al.*, 2000).

2.2.5. Infección persistente con portadores de por vida

Las infecciones pueden persistir durante periodos de tiempo prolongados sin que se produzca una enfermedad clínica cuando el hospedador se mantiene en una temperatura del agua baja (como por ejemplo 15°C para los abulones rojos), y la exposición a temperaturas del agua de mar elevadas (como por ejemplo >17°C para los abulones rojos, negros y blancos) provoca habitualmente la enfermedad clínica (Friedman & Finley, 2003; Moore *et al.*, 2000; Steinbeck *et al.*, 1992). La variación de las temperaturas del agua de mar, con una temperatura inferior (como por ejemplo 16,5°C para el abulón rojo) puede exacerbar las pérdidas (Moore *et al.*, 2011). Algunos datos recientes sugieren que algunas especies, en especial las que viven en aguas más cálidas, pueden albergar la bacteria sin desarrollar una enfermedad clínica (Wetchateng, 2008; Wetchateng *et al.*, 2010).

2.2.6. Vectores

Aunque no se ha identificado ningún hospedador alternativo, distinto de los haliotidis, se ha sugerido que algunos ascidios coloniales pueden concentrar la bacteria (según indican los datos de PCR). Así pues, existe la posibilidad de que estas especies actúen como vectores para la bacteria, pero está justificada la realización de nuevas investigaciones sobre posibles vectores (J.D. Moore, observación no publicada).

2.2.7. Animales acuáticos salvajes portadores o sospechosos de serlo

Ninguno.

2.3. Patrón de la enfermedad

La enfermedad (síndrome de marchitamiento) se produce a temperaturas del agua elevadas (~18°C y superiores) en abulones con infecciones moderadas o graves (Friedman *et al.*, 2000; 2002; Moore *et al.*, 2000). El periodo de incubación del síndrome de marchitamiento es prolongado y oscila habitualmente entre 3 y 7 meses (Balseiro *et al.*, 2006; Braid *et al.*, 2005; Friedman *et al.*, 1997; 2002; Moore *et al.*, 2000; 2001b). La enfermedad clínica se caracteriza por alteraciones morfológicas en la glándula digestiva, que pueden diferir en las distintas especies y que pueden incluir una degeneración (atrofia de túbulos, aumento de tejidos conjuntivos e inflamación) y/o metaplasia de los túbulos digestivos. La metaplasia supone la sustitución de los

fondos de saco terminales secretores/absorbentes (acini) por conductos de absorción/transporte de apariencia similar al esófago posterior. Estos cambios morfológicos se acompañan de anorexia, y consumo de las reservas de glucógeno seguido de uso del músculo del pie como fuente de energía, y la muerte (Balseiro *et al.*, 2006; Braid *et al.*, 2005; Friedman *et al.*, 1997; 2007; Kismohandaka *et al.*, 1995; Moore *et al.*, 2000; 2001b). El pie de los abulones afectados contiene escasos haces musculares y menos organizados, un abundante tejido conectivo y más células serosas que los individuos no afectados (Friedman *et al.*, 2007; Moore *et al.*, 2000; Van Blaricom *et al.*, 1993). Los abulones supervivientes parecen quedar infectados, incluso en ambientes de baja temperatura del agua, como en el norte de California (Friedman & Finley, 2003).

2.3.1. Mecanismos de transmisión

La transmisión de *X. californiensis* es horizontal y se supone que a través de la ruta oral-fecal. La exposición de los abulones a agua de mar que contiene material infeccioso es suficiente para que se produzca la transmisión de la bacteria, y no es necesario ningún contacto directo con los animales (Balseiro *et al.*, 2006; Braid *et al.*, 2005; Friedman *et al.*, 2002; Moore *et al.*, 2000; 2001b). Se ha observado que las temperaturas inferiores a 13°C limitan la transmisión de la bacteria (es decir, hacen que la transmisión sea inferior al 1%) en comparación con los abulones mantenidos a una temperatura de ~18°C (transmisión del 72%–94%) (Braid *et al.*, 2005).

2.3.2. Prevalencia

Tabla 2.1. Variación en la prevalencia de *Xenohaliotis californiensis* en diversas especies y localizaciones

Especie	Prevalencia por PCR		Prevalencia por histología		Referencias
	Salvaje	De piscifactoría	Salvaje	De piscifactoría	
<i>Haliotis rufescens</i>	ND	0–100%	1–75% ¹	0–100% ²	Friedman & Finley, 2003; Moore <i>et al.</i> , 2000; Friedman, observaciones no publicadas.
<i>Haliotis cracherodii</i>	ND	NA	74–98%	NA	Friedman & Finley, 2003
<i>Haliotis sorenseni</i>	0	0–100%	0	0–100%	Friedman <i>et al.</i> , 2007; Moore <i>et al.</i> , observaciones no publicadas
<i>Haliotis fulgens</i>	ND	ND	44–100%	ND	Moore <i>et al.</i> , 2009; Tinajero <i>et al.</i> , 2002
<i>Haliotis corrugate</i>	ND	ND	62–63%	ND	Tinajero <i>et al.</i> , 2002
<i>Haliotis walallensis</i>	NA	NA	0	NA	J.D. Moore, observaciones no publicadas
<i>Haliotis discus-hannai</i>	ND	0	0	0	C.S. Friedman, observaciones no publicadas
<i>Haliotis diversicolor supertexta</i>	ND	61%	ND	53%	Wetchateng, 2008; Wetchateng <i>et al.</i> , 2010 ³
<i>Haliotis tuberculata</i>	ND	ND	0%	14,5–52%	Balseiro <i>et al.</i> , 2006

¹Se han observado prevalencias del 1–17% en el norte de California y hasta del 75% en el sur y centro de California.

²Los abulones mayores suelen tener una mayor prevalencia de infección.

³Solamente se obtuvieron muestras de 36 animales de una sola granja de Tailandia. ND = no hay datos; NA = no aplicable.

2.3.3. Distribución geográfica

Xenohaliotis californiensis se da a lo largo de la costa del sudoeste de Norteamérica en California (Estados Unidos) y en Baja California (México). Sin embargo, como se han transportado abulones infectados a Chile, China (República Popular de), España, Islandia Irlanda, Israel, Japón, Tailandia, Taipei chino y posiblemente otros países, se sospecha que el ámbito geográfico del agente etiológico es amplio en los lugares en los que se produce el abulón rojo de California, *Haliotis rufescens*, o las áreas en las que las especies autóctonas han estado en contacto con abulones rojos (por ejemplo, Wetchateng, 2008).

2.3.4. Mortalidad y morbilidad

La susceptibilidad varía según la especie, puesto que se sabe que la bacteria causa la enfermedad en el abulón negro (mortalidad de hasta un 99%; Moore *et al.*, 2009), blanco (mortalidad de hasta un 100%; Friedman & McCormick, observaciones no publicadas), rojo (mortalidad de hasta un 35%; Moore *et al.*, 2000; 2001b), rosado (también llamado amarillo) y verde (también llamado azul) (Tinajero *et al.*, 2002). A diferencia de lo que ocurre con otras especies de abulón estudiadas hasta la fecha, la magnitud de la mortalidad de los abulones rosados y verdes no está bien documentada. Sin embargo, en Baja California (México), hasta un 100% de los abulones verdes (azules) y un 63% de los rosados (amarillos) pueden estar infectados, y hasta un 43% de los abulones verdes y un 71% de los rosados presentan signos microscópicos de la enfermedad (degeneración o metaplasia de la glándula digestiva; Tinajero *et al.*, 2002). El periodo de incubación varía con la temperatura, pero es característico que haya un periodo prolongado de 3-7 meses antes de que aparezcan las manifestaciones. Es característico que la muerte se produzca 1-2,5 meses después de la aparición de los signos clínicos visibles (Friedman *et al.*, 1997). *Xenohalotis californiensis* se ha observado recientemente, mediante datos histológicos y moleculares, en varios países de Asia, incluida China (República Popular de), Taipei chino y Tailandia (Wetchateng, 2008; Wetchateng *et al.*, 2010). La prevalencia no ha sido bien documentada, pero hasta un 61% de los individuos de *H. diversicolor supertexta* presentaron la infección en una granja de Tailandia; sin embargo, al igual que en el abulón de Europa, *H. tuberculata*, no hubo ningún abulón que mostrara signos clínicos del síndrome de marchitamiento (Balseiro *et al.*, 2006; Van Blaricom *et al.*, 2011).

2.3.5. Factores ambientales

La enfermedad (síndrome de marchitamiento) se produce a temperaturas del agua elevadas (~18–25°C) en los abulones con infecciones moderadas o graves (Braid *et al.*, 2005; Friedman *et al.*, 2000; 2002; Moore *et al.*, 2000; 2011; Rosenblum *et al.*, 2008). La transmisión del parásito se ve potenciada en los abulones alimentados (94%) en comparación con los que no reciben alimento (72%) (Balseiro *et al.*, 2006; Braid *et al.*, 2005). Se han observado infecciones subclínicas en *H. diversicolor supertexta* criado a 27–29°C (Van Blaricom *et al.*, 2011). Dado que los abulones son especies marinas obligadas, no se han investigado las tolerancias de salinidad del organismo de tipo rickettsia (OTR).

2.4. Control y prevención

La prevención más eficaz es la evitación del patógeno. En el caso de que se produzca la infección, mantener los abulones a una temperatura $\leq 15^{\circ}\text{C}$ puede reducir la transmisión de los OTR y la ulterior transmisión de la enfermedad (Braid *et al.*, 2005). La aplicación de oxitetraciclina (véase el Apartado 2.4.2 más adelante) reduce las pérdidas.

2.4.1. Vacunación

La vacunación no es una opción viable para el control de la infección por *X. californiensis*.

2.4.2. Tratamiento con sustancias químicas

La reducción de las densidades y la aplicación de una dieta medicada con oxitetraciclina pueden reducir las pérdidas (Friedman *et al.*, 2003; 2007; Rosenblum *et al.*, 2008). La administración oral de TM-100 al 12%-19% (90–100 mg kg⁻¹) en una dieta medicada, durante 10 o 20 días, proporciona una protección frente a la reinfección bacteriana durante varios meses. Algunos datos recientes sugieren que una única administración oral diaria de TM-100 al 12% puede reducir la prevalencia de las infecciones bacterianas del 80% al 10% y la intensidad media de la infección de 1,4 a 0,1 en una escala de 0–3 (Friedman *et al.*, 2000; 2007). Teniendo en cuenta las observaciones realizadas con oxitetraciclina en abulones no medicados que han recibido agua de mar procedente de animales tratados, se cree que la administración del fármaco o el agua de mar que lo contenga o la absorción pueden ser la vía clave de la captación de este producto terapéutico (Friedman *et al.*, datos no publicados)

2.4.3. Inmunoestimulación

No existen datos sobre la inmunoestimulación como medida de control para esta enfermedad.

2.4.4. Selección genética a favor de la resistencia

Está aumentando el interés por la selección de abulones resistentes, en especial con vistas a la restauración. Se ha continuado la recogida del abulón negro salvaje a lo largo de las Chanel Islands de California desde 2002 y algunas de las muestras recogidas sobreviven, lo cual sugiere que estos individuos pueden ser más resistentes a esta enfermedad producida por una rickettsia (Tinajero *et al.*, 2002). Estudios recientes de laboratorio han puesto de manifiesto un aumento de la resistencia a la

enfermedad en los animales descendientes de abulones negros que sobrevivieron a la infección por *X. californiensis* en comparación con los procedentes de poblaciones seleccionadas sin la enfermedad (Friedman *et al.* datos no publicados).

2.4.5. Repoblación con especies resistentes

En la actualidad no existen datos al respecto, y es preciso tener en cuenta las ventajas comparativas de la producción de especies alternativas.

2.4.6. Agentes bloqueantes

No existen datos.

2.4.7. Desinfección de huevos y larvas

No se ha realizado ningún intento de desinfección de los huevos y las larvas. Las larvas de abulón no se alimentan, y es improbable que se produzca una transmisión antes del asentamiento y la metamorfosis, después de la cual se inicia la alimentación (Moore & Friedman, datos no publicados).

2.4.8. Prácticas generales de manejo

Las prácticas de manejo para reducir los problemas causados por *X. californiensis* son las habituales para cualquier enfermedad bacteriana e incluyen la compra de ejemplares para siembra inspeccionados (carentes de signos de infección), el mantenimiento por separado de familias o grupos (es decir, evitar un enriquecimiento o mezcla de grupos distintos), el lavado de las manos y el equipo con agua dulce o agua yodada y el secado entre los usos. Si es posible, se recomienda el aislamiento de los grupos infectados. Si se emplea un tratamiento con oxitetraciclina, la aplicación terapéutica siguiendo las directrices federales (por ejemplo las de la FDA-CVM¹ en los Estados Unidos o las de la EMEA² en Europa) antes de la estación de agua más cálida puede reducir las pérdidas y la infección. Habitualmente, es necesaria una sola aplicación durante el segundo o tercer años de crecimiento durante un ciclo de cultivo típico de 3-4 años.

3. Obtención de muestras

3.1. Elección de ejemplares

Para la obtención de muestras ordinaria, se recomienda una selección aleatoria o al azar de los individuos, y el número óptimo de muestras obtenidas variará según el tamaño de la población y el nivel de detección deseado (por ejemplo, $n=60$ para una población de más de 2000 individuos). Para optimizar la detección (obtención de muestras dirigida), se recomienda la selección de abulones que muestren el signo clínico de reducción de peso (atrofia del músculo del pie). Si es posible, las muestras de animales deben obtenerse tras la exposición a un periodo (por ejemplo, 30 días) de agua cálida (por ejemplo, temperatura $>18^{\circ}\text{C}$).

3.2. Conservación de las muestras para su envío

Las muestras deben colocarse en etanol no desnaturalizado al 80%-95% (1:9 [vol/vol] de tejido:etanol) y conservarse a temperatura de entre 4°C y 20°C . También pueden congelarse las muestras de forma rápida en nitrógeno líquido y conservarse a -80°C hasta el momento del análisis. Las muestras conservadas en etanol deben enviarse al laboratorio en hielo, aplicando las directrices nacionales o internacionales para el envío de productos inflamables, según sea aplicable. Las muestras congeladas deben enviarse en hielo seco, según las normas de envío nacionales o internacionales, según sea aplicable.

3.3. Combinación de varias muestras

Lo ideal es extirpar y conservar las muestras de manera individual. Si se desea combinarlas como medida de ahorro de costes, se recomienda combinar las muestras ($n=5$ /combinación) para la extracción del ADN y los posteriores análisis de PCR. Con objeto de tener en cuenta la posible dilución del ADN buscado como consecuencia de la combinación de muestras, las reacciones de PCR deben realizarse por triplicado.

1 Food and Drug Administration de Estados Unidos – Center for Veterinary Medicine.

2 Agencia Europea del Medicamento.

3.4. Órganos y tejidos de elección

El mejor tejido a estudiar es el del esófago posterior, seguido del tejido del complejo glándula digestiva/intestino.

3.5. Muestras/tejidos que no son adecuados

Los tejidos no digestivos no contienen ADN de rickettsia y debe evitarse su empleo.

4. Métodos de diagnóstico

Los signos macroscópicos de la enfermedad, cuando se dan, consisten en atrofia del pie, glándula digestiva moteada, anorexia, debilidad y letargia. Obsérvese que los animales pueden presentar una infección preclínica durante el periodo de incubación, en las especies más resistentes a la enfermedad o en los animales que se mantienen a una temperatura del agua $\leq 15^{\circ}\text{C}$. La enfermedad se caracteriza por la presencia de inclusiones bacterianas intracitoplásmicas en el esófago posterior, el intestino y los epitelios de absorción/transporte de la glándula digestiva, mientras que las infecciones moderadas o avanzadas se asocian de forma característica a alteraciones degenerativas o metaplásicas en la glándula digestiva, seguido de la atrofia del músculo del pie en las especies susceptibles.

4.1. Métodos de diagnóstico de campo

4.1.1. Signos clínicos

Los abulones infectados por *X. californiensis* pueden presentar una infección subclínica durante el periodo anterior a que la enfermedad se haga patente o a temperaturas del agua $\leq 15^{\circ}\text{C}$. Los individuos infectados pueden presentar una consunción (atrofia) entre leve y grave, si las condiciones de temperatura del agua lo permiten.

4.1.2. Alteraciones del comportamiento

Durante una epidemia, los abulones afectados se cuelgan a menudo de substratos horizontales (en vez de hacerlo de substratos verticales o invertidos) y tienen un aspecto débil (se pueden separar fácilmente del substrato con la mano) y marchito (atrofiado) (Haaker *et al.*, 1992). Los abulones de piscifactoría mostrarán también anorexia. Además, la presencia de un número anormalmente alto de conchas nuevas puede indicar también enfermedad.

4.2. Métodos clínicos

4.2.1. Anatomopatología macroscópica

La caracterización clínica de la enfermedad producida por *X. californiensis* se basa en una combinación de alteraciones morfológicas de los tejidos con la presencia del agente etiológico. Las alteraciones morfológicas consisten en una atrofia del músculo del pie, que es visible a nivel macroscópico y microscópico (histología). Como consecuencia directa del catabolismo del pie, los abulones infectados excretan unas cantidades de amonio sustancialmente mayores que las que se producen en los individuos no afectados (Kismohandaka *et al.*, 1995). Si se identifican abulones moribundos, la observación de una glándula digestiva moteada (de color marrón oscuro con pequeños focos de tejido de color bronce), indicativa de alteraciones metaplásicas, es un dato que hace presumir la presencia de esta enfermedad (Friedman *et al.*, 2000).

4.2.2. Bioquímica clínica

Puede utilizarse un análisis estándar de glucógeno (Balseiro *et al.*, 2006) para evaluar la posible presencia de una pérdida de glucógeno en la glándula digestiva y el músculo del pie. Sin embargo, una disminución del glucógeno está relacionada con la anorexia y la incapacidad de digerir el alimento y, por tanto, no es específica de esta enfermedad (es decir, sus efectos son similares a los de la falta de alimentación [Balseiro *et al.*, 2006]).

4.2.3. Anatomopatología microscópica

Presencia de inclusiones bacterianas intracitoplásmicas ovales y basófilas en los epitelios digestivos (esófago posterior, conductos de transporte y epitelios metaplásicos de la glándula digestiva o el intestino). Las alteraciones metaplásicas en la glándula digestiva que incluyen la transformación de los fondos de saco (acini) secretores terminales en epitelios de absorción/transporte, están amplificadas en

los abulones infectados por *X. californiensis* (Balseiro *et al.*, 2006; Braid *et al.*, 2005; Friedman *et al.*, 2002; Moore *et al.*, 2000; 2001b). Aunque la metaplasia se ha observado en todas las especies afectadas examinadas hasta la fecha, la respuesta a la infección puede variar entre distintos hospedadores. Así por ejemplo, el abulón rojo y el abulón blanco responden habitualmente con una alteración metaplásica (Balseiro *et al.*, 2006; Braid *et al.*, 2005; Moore *et al.*, 2000), mientras que el abulón negro responde generalmente con una combinación de metaplasia, degeneración del túbulo digestivo e inflamación (Friedman *et al.*, 1997; 2002). Los individuos afectados contienen menos glucógeno del pie y una cantidad de haces musculares inferior a la de los individuos no afectados (Balseiro *et al.*, 2006; Braid *et al.*, 2005; Gardner *et al.*, 1995). En algunos abulones puede observarse un aumento de las células serosas en el músculo del pie (Van Blaricom *et al.*, 1993), pero estos signos no son patognomónicos de esta enfermedad. Los abulones blancos juveniles pueden mostrar una aparente metaplasia digestiva sin presencia de *X. californiensis* (Friedman *et al.*, 2007). Así pues, la presencia de *X. californiensis* en epitelios digestivos, conjuntamente con las alteraciones morfológicas descritas indica la presencia del síndrome clínico de marchitamiento.

4.2.4. Preparaciones húmedas

Aunque no se recomienda, las inclusiones citoplasmáticas pueden observarse mediante contraste de fase o iluminación DIC de tejidos del esófago posterior; la morfología de los tejidos digestivos hace que las preparaciones húmedas sean difíciles de interpretar.

4.2.5. Frotis

Pueden usarse frotis teñidos de epitelios digestivos para observar las inclusiones bacterianas. Sin embargo, el examen de pequeños fragmentos del esófago posterior que han sido desecados sobre un portaobjetos y teñidos con fluorocromo de ADN puede ser más fácil de interpretar que los frotis teñidos.

4.2.6. Cortes fijados

No aplicable.

4.2.7 Microscopía electrónica/citopatología

La microscopía electrónica de transmisión (MET) puede utilizarse para confirmar la presencia de OTR. Sin embargo, esto no tiene valor confirmativo respecto a la presencia de este agente, dada la falta de unas características morfológicas distintivas. Si se emplea, la MET mostrará la presencia de colonias intracelulares de procariontes de forma bacilar y ricos en ribosomas, con paredes celulares trilaminares, dentro de vacuolas rodeadas por membrana, en el citoplasma de las células epiteliales gastrointestinales. La bacteria dimórfica, con una forma bacilar o esférica, mide una media de 332×1550 nm en la forma bacilar y una media de 1405 nm en el monotipo esférico. La bacteria se reproduce dentro de vacuolas intracitoplásmicas de un diámetro de 14–56 μ m (Friedman *et al.*, 2000).

4.3. Métodos de detección e identificación del agente

4.3.1. Métodos directos de detección

En los apartados siguientes se describen varios métodos para identificar y observar la presencia de *X. californiensis* en muestras de tejido o en ADN extraído.

4.3.1.1. Métodos microscópicos

4.3.1.1.1. Preparaciones húmedas

Los tejidos (esófago posterior) pueden extirparse, colocarse sobre un portaobjetos y examinarse con el empleo de microscopía de contraste de interferencia diferencial (DIC) o de contraste de fase a $\times 200$ o $\times 400$ aumentos tras haberlos aplastado con un cubreobjetos. Se aprecian inclusiones de rickettsias e inclusiones esféricas claras en el interior de los epitelios esofágicos. No se recomienda el uso de este método puesto que las inclusiones pueden ser difíciles de identificar.

4.3.1.1.2. Frotis

Pueden usarse improntas de tejido para detectar intensidades moderadas o altas de infección por *X. californiensis*. Sin embargo, la histología es más sensible que las improntas de tejido.

- a) *Método de tinción*: Obtener un corte del esófago posterior y colocarlo sobre el portaobjetos. Fijar el frotis en metanol y teñirlo con Giemsa modificado. Secar y observar mediante microscopía de inmersión en aceite para identificar inclusiones de rickettsias o colocar un cubreobjetos y examinar a $\times 200$ – 400 aumentos.

- b) *Método fluorescente*: Obtener un corte del esófago posterior, trocearlo y colocarlo sobre un portaobjetos, secar con un secador de cabello durante ~20 minutos. Tefir los portaobjetos con un colorante fluorescente para ácido nucleico, como yoduro de propidio o Hoechst 33258 (Haaker *et al.*, 1992). Incubar en oscuridad durante 3 minutos y examinar mediante epifluorescencia a $\times 200$ aumentos. Las inclusiones bacterianas se diferencian de los núcleos del hospedador por su tamaño y frecuencia. Sin embargo, si se van a conservar portaobjetos de muestra para un futuro examen, deben secarse por completo y guardarse desecados hasta la tinción.

Las inclusiones del parásito, de un diámetro de 14–56 μm , aparecen dispersas por entre los núcleos más pequeños del hospedador. Un tiempo de observación de 5 minutos por portaobjetos es suficiente a $\times 200$ aumentos (Moore *et al.*, 2001a). Este método es menos sensible que la histología y no permite diferenciar la morfología bacteriana. Es mejor utilizarlo como método de examen rápido dentro del ámbito conocido de esta enfermedad.

Estas pruebas no han sido validadas y no se comercializan.

4.3.1.1.3. Cortes fijados

Histología

El procedimiento histológico se detalla en el Capítulo 2.4.0 de este *Manual Acuático*. Retirar la concha y obtener varios cortes transversales de 3-5 mm que contengan esófago posterior, glándula digestiva y músculo del pie. Colocar el tejido obtenido en soluciones de Davidson o Carson (véase el Capítulo 2.4.0 de este *Manual Acuático*) durante 24 horas y procesarlo para histología ordinaria en parafina. Los cortes transversales se manejan con mayor facilidad cuando se colocan en casetes antes de la fijación. La proporción no debe ser superior a un volumen de tejido por diez volúmenes de fijador.

Los cortes de 3–5 μm desparafinados deben tefirse con hematoxilina y eosina y observarse al microscopio óptico para identificar inclusiones de bacterias (vacuolas intracitoplásmicas basófilas oblongas, de 14–56 μm de diámetro [Friedman *et al.*, 2000]) en el esófago posterior y al glándula digestiva, y alteraciones morfológicas en la glándula digestiva y el pie. Se recomienda examinar los cortes a $\times 200$ o $\times 400$ aumentos.

Xenohalotis californiensis puede ser morfológicamente similar a otras bacterias marinas de tipo rickettsia. En los abulones de California, se han observado hasta tres bacterias intracitoplásmicas morfológicamente distintas (Friedman *et al.*, datos no publicados). El diagnóstico definitivo de la bacteria puede incluir el uso de herramientas moleculares (por ejemplo, hibridación *in-situ* [ISH]). Un diagnóstico definitivo de síndrome de marchitamiento mediante histología debe incluir la presencia de la bacteria y de alteraciones morfológicas en la glándula digestiva, metaplasia y/o degeneración, y puede incluir las alteraciones del músculo del pie.

Cuando se han observado pérdidas dentro del ámbito geográfico conocido del síndrome de marchitamiento, la visualización de focos bacterianos intracelulares en el interior de los epitelios digestivos, mediante el examen histológico, puede considerarse un método confirmativo y se toma como método de referencia para esta enfermedad. Sin embargo, se recomienda la confirmación con el empleo de histología combinada con PCR y análisis de secuencia o ISH, para verificar la identificación de la bacteria de tipo rickettsia en especies de abulón que anteriormente no se supiera que eran susceptibles a la bacteria, así como cuando se produce la infección en una nueva localización geográfica.

La prueba no ha sido validada formalmente. Sin embargo, la histología se ha considerado una prueba confirmativa para la presencia de *X. californiensis*.

Examen mediante microscopía electrónica de transmisión

Los procedimientos de la microscopía electrónica de transmisión se describen en el Capítulo 2.4.0 de este *Manual Acuático*. Se observan procariotas de forma bacilar y ricos en ribosomas, con paredes celulares trilaminares, acumulados en colonias intracelulares dentro de vacuolas envueltas por membrana, en el citoplasma de las células epiteliales gastrointestinales. La bacteria dimórfica, de una forma bacilar o esférica, mide una media de 332 \times 1550 nm en la forma de bacilo y una media de 1405 nm en el morfotipo esférico. La bacteria se reproduce en el interior de las vacuolas intracitoplásmicas de 14–56 μm de diámetro (Friedman *et al.*, 2000). Esta prueba no ha sido validada formalmente.

4.3.1.2. Aislamiento e identificación del agente

La propagación de *X. californiensis* a través de cultivo celular (dada la falta de líneas celulares derivadas de moluscos marinos) y en medios artificiales no ha sido posible hasta la fecha.

4.3.1.2.1. Cultivo celular/medios artificiales

No se ha desarrollado ninguno.

4.3.1.2.2. Métodos de detección del antígeno basados en anticuerpos

No se ha desarrollado ninguno.

4.3.1.2.3. Técnicas moleculares

4.3.1.2.3.1. Reacción en cadena de polimerasa

Una amplificación de PCR positiva aporta tan solo un diagnóstico provisional, puesto que detecta el ADN y no necesariamente un patógeno viable. Deben usarse otras técnicas, preferiblemente histología e ISH, para visualizar el patógeno. Cuando se emplea de manera combinada con la histología, la PCR puede usarse con fines de confirmación. Se recomienda el examen de la secuencia amplificada cuando se examina una nueva especie hospedadora o una nueva área geográfica. Las secuencias deben concordar con la secuencia conocida de ADN_r de 16S de esta bacteria (GenBank, acceso AF133090; [Andree *et al.*, 2000]).

Las muestras para la PCR deben obtenerse del esófago posterior o la glándula digestiva y deben procesarse con el empleo del método de extracción clásico en fenol-cloroformo o con los kits de extracción de ADN comerciales diseñados para eliminar los inhibidores (por ejemplo, kits de extracción de ADN de deposiciones o del suelo), que están presentes en la glándula digestiva de los abulones. Se recomienda el tejido del esófago posterior ya que las infecciones son uniformemente más intensas que en el tejido de la glándula digestiva. Debe incluirse siempre en la PCR una reacción de control positiva, que debe consistir en ADN genómico extraído de un individuo con una infección conocida o en el uso de un plásmido que contenga una inserción del producto amplificado. Si se va a utilizar un plásmido como control positivo, se recomienda añadir una inserción de ~100 pb al fragmento clonado, con objeto de reducir la posibilidad de contaminación cruzada del ADN plasmídico aerosolizado. Además, en situaciones en las que hay un número bajo de copias del ADN diana, este plásmido puede competir con la diana y desplazarla. Debe incluirse también un control negativo, consistente en una mezcla de referencia sin la adición de la plantilla, en cada PCR. Todas las reacciones deben realizarse por duplicado. La observación de una banda de 160 pb en muestras de tejido y reacciones de control positivas, así como la ausencia de bandas en las reacciones de control negativas, caracterizan la obtención de una prueba satisfactoria. La sensibilidad y especificidad de esta prueba están en proceso de evaluación formal por parte del Laboratorio de Referencia de la OIE (Friedman *et al.*, datos no publicados.). En la actualidad la prueba no se comercializa.

Los cebadores de PCR desarrollados para la detección de *X. californiensis* amplifican específicamente un segmento de 160 pb del patógeno de tipo *Rickettsia*. Los cebadores se designan actualmente como: RA 5-1 (5'-GTT-GAA-CGT-GCC-TTC-AGT-TTA-C-3') y RA 3-6 (5'-ACT-TGG-ACT-CAT-TCA-AAA-GCG-GA-3'). Van dirigidos al ADN ribosómico de subunidad pequeña y se ha observado que son sensibles y específicos para este patógeno (Andree *et al.*, 2000). La amplificación de PCR se realiza en un volumen de reacción estándar de 20 µl con un contenido de 1 × tampón de PCR, MgCl₂ 1,5 mM, 400 ng ml⁻¹ de BSA, una concentración 200 µM de los diversos dNTP, una concentración 0,5 µM de cada cebador, 1,6 unidades de Taq polimerasa, y 100 ng de ADN plantilla. Los ciclos de las mezclas de reacción se realizan en un ciclador térmico. El programa para la reacción de amplificación es el siguiente: desnaturalización inicial a 95°C durante 5 minutos, 40 ciclos a 95°C durante 1 minuto, 62°C durante 30 segundos y 72°C durante 30 segundos, y una extensión final a 72°C durante 10 minutos. Se verifica en una muestra alícuota de cada reacción de PCR para detectar el producto de amplificación de 160 pares de bases mediante electroforesis en gel de agarosa y tinción con bromuro de etidio.

La prueba ha sido validada con una especificidad y sensibilidad diagnósticas de 1,0 (Friedman *et al.*, datos no publicados). No está comercializada.

4.3.1.2.3.2. Análisis de secuencia

Es necesario un análisis del ADN amplificado para confirmar la identidad de secuencia con la bacteria que se pretende identificar (GenBank Accession AF133090). Esto puede conseguirse mediante una clonación estándar y secuenciación de múltiples clones tras la amplificación mediante PCR del ADN de la muestra. (Nota. Se recomienda una secuenciación tanto directa como inversa.) También puede utilizarse una secuenciación directa de los productos de PCR.

4.3.1.2.3.3 Hibridación *in-situ*

La ISH es el método de elección para confirmar la identificación ya que permite visualizar una sonda específica hibridada con el organismo diana. Sin embargo, las sondas de ADN deben ser evaluadas de forma exhaustiva respecto a su especificidad y deben ser validadas en estudios comparativos antes de poder utilizarlas para una identificación confirmativa.

Se ha desarrollado una ISH para detectar procariotas de tipo rickettsia en cortes de tejido (Antonio *et al.*, 2000). Se hibridan sondas de oligonucleótidos marcadas específicas con el ARN ribosómico de subunidad pequeña de la bacteria. Esta hibridación es detectada por un anticuerpo conjugado que reconoce las sondas marcadas. Se añade el substrato para el anticuerpo conjugado, y ello causa una reacción colorimétrica que permite la visualización de las hibridaciones de ADN de sonda-parásito. Aunque este método no ha sido validado formalmente, las pruebas realizadas para evaluar su especificidad con el empleo de varios organismos de tipo rickettsia en peces y bivalvos sugirieron que la prueba era específica para *X. californiensis* (Antonio *et al.*, 2000).

El procedimiento de la ISH se lleva a cabo de la siguiente forma. Deben incluirse controles positivos (tejidos infectados conocidos) y negativos (no infectados o infectados por una bacteria diferente) en el procedimiento. La sonda se elabora mediante PCR con el empleo de un kit de síntesis de sonda PCR DIG Probe Synthesis Kit. Antes de utilizar la sonda marcada con DIG, se desnaturaliza la sonda a 95°C durante 3 minutos y se coloca inmediatamente en hielo durante ~30 minutos, con objeto de separar el ADN de doble hebra. Se mantiene a -20°C o -80°C hasta el momento del uso. Las secuencias de las sondas designadas como RA 5-1, RA 3-6, RA 3-8 y RA 5-6 (Antonio *et al.*, 2000) son, respectivamente, las siguientes: 5'-GTT-GAA-CGT-GCC-TTC-AGT-TTA-C-3', 5'-ACT-TGG-ACT-CAT-TCA-AAA-GCG-GA-3', 5'-CCA-CTG-TGA-GTG-GTT-ATC-TCC-TG-3' y 5'-GAA-GCA-ATA-TTG-TGA-GAT-AAA-GCA-3'.

- i) Tras retirar la concha, se obtiene un corte transversal (3–5 mm) de tal manera que contenga esófago posterior, glándula digestiva y músculo del pie, y se coloca en fijador AFA de Davidson (glicerina [10%], formol [20%], etanol al 95% [30%], dH₂O [30%], ácido acético glacial [10%]) durante 24–48 horas, y a continuación se transfiere a etanol al 70% hasta el procesamiento mediante procedimientos histológicos (paso ii). La proporción no debe ser superior a 1 volumen de tejido por 10 volúmenes de fijador.
- ii) Las muestras se incluyen luego en parafina con métodos histológicos convencionales. Se obtienen cortes a 5–6 µm y se colocan en portaobjetos con carga eléctrica positiva o recubiertos con 3-aminopropil-trietoxilano. A continuación se secan los cortes histológicos durante una noche en un horno a 40°C. Nota. El paso de secado puede omitirse si se emplean portaobjetos con carga eléctrica positiva.
- iii) Se desparafinan los cortes mediante inmersión en xileno u otro agente de eliminación menos tóxico, durante 10 minutos. Se elimina el disolvente mediante inmersión en dos baños sucesivos en alcohol absoluto, durante 10 minutos cada uno y se rehidrata con inmersión en una serie de etanol. Luego se lavan los cortes dos veces durante 5 minutos en tampón Tris (pH 7,2; Tris/HCl 0,2 M, CaCl 2,0 mM).
- iv) Los cortes se tratan con proteinasa K, 50 µg ml⁻¹ en tampón Tris, a 37°C durante 45 minutos. Este reacción se interrumpe entonces mediante el lavado de los cortes en PBS tres veces durante 10 minutos cada una.
- v) Los cortes se prehibridan durante 10 minutos a 1 hora a 37°C en tampón de prehibridación (4 × SSC, formamida al 50%).
- vi) A continuación se elimina la solución de prehibridación mediante lavado en 2× SSC y se seca brevemente antes de la sustitución por tampón de prehibridación que contiene las sondas marcadas con digoxigenina (1:373, sonda:tampón [vol:vol]). Los cortes pueden desnaturalizarse* colocándolos en un calentador a 100°C durante 10 minutos y luego se cubren con cubreobjetos de plástico de ISH. A continuación se hibridan las preparaciones durante una noche a 53°C en cámara húmeda. *Este paso puede omitirse si se desea.
- vii) Se retiran cuidadosamente los cubreobjetos mediante la inmersión de las preparaciones durante 5-10 minutos en 2× SSC a temperatura ambiente. Se lavan los cortes dos veces durante 15 minutos en 2 × SSC a 40°C, tres veces durante 15 minutos en 1 × SSC a 40°C, y una vez durante 15 minutos en 0,5 × SSC a 40°C. Los cortes se colocan entonces en Tampón 1 (Tris/HCl 100 mM, NaCl 10 mM, pH 7,5) durante 10 minutos.

Se colocan los cortes en Tampón 1 (véase el paso vii) con un suplemento de Triton X-100 al 0,3% y suero de carnero al 2% durante 1 hora a temperatura ambiente (no dejar que los cortes se sequen).

El anticuerpo conjugado con fosfatasa alcalina anti-digoxigenina se diluye a 1:1000 (o según las recomendaciones del fabricante) en Tampón 1 con un suplemento de Triton X-100 al 0,3% y suero de carnero al 1% y se aplica a los cortes de tejido. Los cortes se cubren con cubreobjetos de ISH y se incuban durante 2 horas a temperatura ambiente en la cámara húmeda.

- x) Se lavan las preparaciones dos veces en Tampón 1 durante 10 minutos cada una (véase el paso vii) y dos veces en Tampón 2 (Tris-HCl 100 mM, NaCl 100 mM, MgCl₂ 50 mM, pH 9,5) durante 10 minutos. Se aplica la solución de revelado de color (añadir 45 µl de nitroazul de tetrazolio, 35 µl de sal de 5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato p-toluidina [BCIP] a 10 ml de Tampón 2) durante 30 minutos a 1 hora en cámara húmeda en oscuridad.
- xi) A continuación se lavan las preparaciones 3× en agua destilada estéril (dH₂O). Se aplica a los cortes una tinción de contraste con Bismarck Brown Y durante 3 minutos, se lavan en dH₂O, y luego en etanol al 70%, seguido de un breve lavado en etanol al 100% antes del secado al aire, y se aplican cubreobjetos utilizando un medio de montaje. La presencia del patógeno se pone de manifiesto en el marcado de color púrpura-negro de las células parasitarias.

Esta prueba no ha sido validada formalmente y no se comercializa.

4.3.1.2.4. Purificación del agente

No se ha desarrollado ninguna hasta la fecha.

5. Idoneidad de las pruebas para cada uso previsto

Los métodos actualmente disponibles para la vigilancia dirigida y el diagnóstico de *X. californiensis* se indican en la Tabla 5.1. Las designaciones utilizadas en la Tabla indican lo siguiente: a = el método es el método recomendado por razones de disponibilidad, utilidad y especificidad y sensibilidad diagnósticas; b = el método es un método estándar con una buena sensibilidad y especificidad diagnósticas; c = el método tiene aplicación en algunas situaciones, pero el coste, la exactitud u otros factores limitan gravemente su aplicación; y d = el método no se recomienda en la actualidad para este fin. Estas designaciones son algo subjetivas ya que la idoneidad implica cuestiones de fiabilidad, sensibilidad, especificidad y utilidad. Aunque no todas las pruebas indicadas como de categoría a o b han sido objeto de una estandarización y validación formales, su carácter de uso habitual y el hecho de que se hayan utilizado ampliamente sin resultados dudosos las hacen aceptables.

Tabla 5.1. Métodos para la vigilancia y el diagnóstico dirigidos

Método	Vigilancia dirigida			Diagnóstico provisional	Diagnóstico confirmativo
	Larvas	Juveniles	Adultos		
Signos macroscópicos	d	c	c	c	d
Bioanálisis	d	d	c	c	c(a) ¹
Impronta de tejido – tinción de Giemsa	d	c	c	b	b(c) ²
Histopatología	d	b	b	a	a ³
ME de transmisión	d	d	d	b	c
Sondas de ADN – <i>in situ</i>	d	c	c	a	a
PCR	d	a	a	a	c(a) ⁴
Secuenciación de ADNr de SSU	d	d	d	a	a

¹Para disponer de una reserva de genitores valiosa, es posible utilizar una reacción en cadena de polimerasa (PCR) de heces como primera prueba de selección y, si es negativa, utilizar luego el método de bioanálisis en combinación con histología (véase el Apartado 6). ²Las improntas de tejido deben usarse en combinación con PCR y posiblemente secuenciación para confirmar el agente. ³En los casos nuevos, como una nueva localización geográfica, se recomienda la PCR y la secuenciación para confirmar la identidad de la bacteria. ⁴La PCR sola no tiene valor confirmativo pero cuando se emplea en combinación con la histología, puede considerarse confirmativa. ME = microscopía electrónica; ADNr de SSU = ADN ribosómico de subunidad pequeña.

6. Prueba(s) recomendada(s) para la vigilancia dirigida destinada a declarar la ausencia de infección por *Xenohalotis californiensis*

Los métodos para la vigilancia dirigida destinada a declarar la ausencia de *X. californiensis* son la histología en combinación con PCR y análisis de secuencia, o mediante ISH. Dado el carácter crónico de la enfermedad y la influencia de la temperatura, se recomienda que los animales de precriadero y de engorde hasta la talla comercial sean examinados durante la estación de agua cálida de la zona. Los abulones mantenidos en aguas frías pueden tener la infección de forma crónica sin mostrar signo alguno de enfermedad. Se recomienda también realizar exámenes de PCR de heces o utilizar un bioanálisis de los abulones más pequeños (por ejemplo de 1–4 cm) mezclados con la reserva de genitores durante al menos 6 semanas a >17°C.

7. Criterios de diagnóstico confirmativo

Según lo indicado en el *Código Acuático*, todos los casos observados en otras especies deben ser trasladados de inmediato al Laboratorio de Referencia de la OIE apropiado para su confirmación, tanto si el caso presenta signos clínicos asociados como si no.

7.1. Definición de caso sospechoso

Un caso sospechoso de infección por *X. californiensis* y enfermedad clínica asociada (síndrome de marchitamiento) puede incluir la observación de signos clínicos macroscópicos (debilidad, letargia, anorexia, atrofia del pie y glándula digestiva moteada) y de mortalidad, de manera asociada a unas condiciones de agua cálida, sobre todo dentro del ámbito geográfico conocido de esta enfermedad. En los abulones de piscifactoría, la anorexia puede ser el primer signo de la enfermedad. Estos signos clínicos, combinados con la observación microscópica de una atrofia del músculo del pie, cuerpos de inclusión en los epitelios gastrointestinales o una PCR (sin confirmación de secuencia) representan también un caso sospechoso.

7.2. Definición de caso confirmado

La confirmación de la infección por *X. californiensis* se basa en la observación del agente con el empleo de histología y PCR con análisis de secuencia o ISH. Los signos macroscópicos y las improntas de tejido por sí solos no pueden utilizarse por sí solos para un diagnóstico confirmativo y deben respaldarse con histología, ISH o PCR con análisis de secuencia.

La confirmación del síndrome de marchitamiento se basa tanto en la presencia del agente como en la presencia de signos microscópicos de la enfermedad. Como mínimo, la infección por *X. californiensis* debe acompañarse de una metaplasia o degeneración de la glándula digestiva, evidenciada en el examen histológico, para que se pueda diagnosticar un síndrome de marchitamiento clínico.

8. Bibliografía

ANDREE K.B., FRIEDMAN C.S., MOORE J.D. & HEDRICK R.P. (2000). A polymerase chain reaction for detection of genomic DNA of a Rickettsiales-like prokaryote associated with Withering Syndrome in Black Abalone (*Haliotis cracherodii*). *J. Shellfish Res.*, **19**, 213–218.

ANTONIO D.B., ANDREE K.B., MOORE J.D., FRIEDMAN C.S. & HEDRICK R.P. (2000). Detection of Rickettsiales-like prokaryotes (RLPs) by *in situ* hybridization in black abalone *Haliotis cracherodii* with withering syndrome. *J. Invertebr. Pathol.*, **75**, 180–182.

BALSEIRO P., ARANGUREN R., GESTAL C., NOVOA B. & FIGUERAS A. (2006). *Candidatus Xenohalotis californiensis* and *Haplosporidium montforti* associated with mortalities of abalone *Haliotis tuberculata* cultured in Europe. *Aquaculture*, **258**, 63–72.

BRAID B.A., MOORE J.D., ROBBINS T.T., HEDRICK R.P., TJEERDEMA R.S. & FRIEDMAN C.S. (2005). Health and survival of red abalone, *Haliotis rufescens*, under varying temperature, food supply and exposure to the agent of withering syndrome. *J. Invertebr. Pathol.*, **89**, 219–231.

DUMLER J.S., BARBET A.F., BEKKER C.P.J., DASCH G.A., PALMER G.H., RAY S.C., RIKIHISA Y. & RURANGIRWA F.R. (2001). Reorganization of general in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and 'HGE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. *Int. J. System. Evol. Microbiol.*, **51**, 2145–2165.

- FRIEDMAN C.S., ANDREE K.B., BEAUCHAMP K.A., MOORE J.D., ROBBINS T.T., SHIELDS J.D. & HEDRICK R.P. (2000). "Candidatus *Xenohaliotis californiensis*" a newly described pathogen of abalone, *Haliotis* spp., along the west coast of North America. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **50**, 847–855.
- FRIEDMAN C.S., BIGGS W., SHIELDS J.D. & HEDRICK R.P. (2002). Transmission of withering syndrome in black abalone, *Haliotis cracherodii* Leach. *J. Shellfish Res.*, **21** (2), 817–824.
- FRIEDMAN C.S. & FINLEY C.A. (2003). Evidence for an anthropogenic introduction of "Candidatus *Xenohaliotis californiensis*", the etiological agent of withering syndrome, into northern California abalone populations via conservation efforts. *Can. J. Fish Aquat. Sci.*, **60**, 1424–1431.
- FRIEDMAN C.S., THOMSON M., CHUN C., HAAKER P.L. & HEDRICK, R.P. (1997). Withering syndrome of the black abalone, *Haliotis cracherodii* (Leach): Water temperature, food availability, and parasites as possible causes. *J. Shellfish Res.*, **16**, 403–411.
- FRIEDMAN C.S., TREVELYAN G., MULDER E.P. & FIELDS R. (2003). Development of an oral administration of oxytetracycline to control losses due to withering syndrome in cultured red abalone *Haliotis rufescens*. *Aquaculture*, **224** (1–4), 1–23.
- FRIEDMAN C.S., SCOTT B.B., STRENGE R.E. & MCCORMICK T.B. (2007). Oxytetracycline as a tool to manage and prevent losses of the endangered white abalone, *Haliotis sorenseni*, due to withering syndrome. *J. Shellfish Res.*, **26** (3), 877–885.
- GARDNER G.R., HARSHBARGER J.C., LAKE J., SAWYER T.K., PRICE K.L., STEPHENSON M.D., HAAKER P.L. & TOGSTAD H.A. (1995). Association of prokaryotes with symptomatic appearance of withering syndrome in black abalone *Haliotis cracherodii*. *J. Invertebr. Pathol.*, **66**, 111–120.
- HAAKER P.L., PARKER D.O., TOGSTAD H., RICHARDS D.V., DAVIS G.E. & FRIEDMAN C.S. (1992). Mass mortality and withering syndrome in black abalone *Haliotis cracherodii*, in California. *In: Abalone of the World*, Shepard S.A., Tegner M.J. & Guzman del Proo S.A., eds, Blackwell Scientific, Oxford, UK, 214–224.
- KISMOHANDAKA G., ROBERTS W., HEDRICK R.P. & FRIEDMAN C.S. (1995). Physiological alterations of the black abalone, *Haliotis cracherodii* Leach, with withering syndrome. *J. Shellfish Res.*, **14** (1), 269–270.
- MOORE J.D., CHERR G.N. & FRIEDMAN C.S. (2001a). Detection of "Candidatus *Xenohaliotis californiensis*" (Rickettsiales-like prokaryote) inclusions in tissue squashes of abalone (*Haliotis* spp.) gastrointestinal epithelium using a nucleic acid fluorochrome. *Dis. Aquat. Org.*, **46**, 147–152.
- MOORE J.D., JUHASZ C.I., ROBBINS T.T. & VILCHIS I. (2009). Green abalone, *Haliotis fulgens*, infected with the agent of withering syndrome do not express disease signs under a temperature regime permissive for red abalone, *Haliotis rufescens*. *Marine Biol.*, **156**, 2325–2330.
- MOORE J.D., MARSHMAN B.C. & CHUN C.C. (2011). Health and survival of red abalone *Haliotis rufescens* from San Miguel Island, California, USA, in a laboratory simulation of La Niña and El Niño conditions. *J. Aquat. Anim. Health*, **23** (2), 78–84.
- MOORE J.D., ROBBINS T.T. & FRIEDMAN C.S. (2000). Withering syndrome in farmed red abalone *Haliotis rufescens*: Thermal induction and association with a gastrointestinal rickettsia-like prokaryote. *J. Aquat. Anim. Health*, **12**, 26–34.
- MOORE J.D., ROBBINS T.T., HEDRICK R.P. & FRIEDMAN C.S. (2001b) Transmission of the Rickettsiales-like prokaryote "Candidatus *Xenohaliotis californiensis*" and its role in withering syndrome of California abalone *Haliotis* spp. *J. Shellfish Res.*, **20** (2), 867–874.
- RAIMONDI P.T., WILSON C.M., AMBROSE R.F., ENGLE J.M. & MINCHINTON T.E. (2002). Continued declines of black abalone along the coast of California: Are mass mortalities related to El Niño events? *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **242**, 143–152.
- ROSENBLUM E.S., JUHASZ C., FRIEDMAN C.S., ROBBINS T.T., CRAIGMILL A., TJEERDEMA R.S. & MOORE J.D. (2008). Oxytetracycline as a treatment for abalone withering syndrome Part II: Efficacy, pharmacokinetics, and long term resistance to re-infection at elevated sea water temperatures. *Aquaculture*, **277** (3–4), 138–148.
- STEINBECK J.R., GROFF J.M., FRIEDMAN C.S., MCDOWELL T. & HEDRICK R.P. (1992). Investigations into mortality among populations of the California black abalone, *Haliotis cracherodii*, on the central coast of California, USA. *In: Abalone of the World*, Shepard S.A., Tegner M.J. & Guzman del Proo S.A., eds. Blackwell Scientific, Oxford, UK, 203–213.

TINAJERO M.D.C.A., CACERES-MARTINEZ J., & AVILES J.G.G. (2002) Histopathological evaluation of the yellow abalone *Haliotis corrugata* and the blue abalone *Haliotis fulgens* from Baja California, Mexico. *J. Shellfish Res.*, **21** (2), 825–830.

VAN BLARICOM G.R., RUEDIGER J.L., FRIEDMAN C.S., WOODARD D.D. & HEDRICK R.P. (1993). Discovery withering syndrome among black abalone populations at San Nicolas Island, California *J. Shellfish Res.*, **12** (2), 185–188.

VAN BLARICOM G.R., FRIEDMAN C.S. & NEUMAN M.J. (2011). Dynamics of endangered black abalone populations at San Nicolas Island, Naval Base Ventura County, California. *Nat. Selections* (US Department of Defense, Legacy Natural Resource Management Program), (*in press*).

WETCHATENG T. (2008). *Rickettsia*-like organism (RLO) infection in the abalone *Haliotis diversicolor supertexta*: Histopathology, diagnosis and treatment. PhD. Dissertation, Mahidol University, Bangkok, Thailand, 49 pp.

WETCHATENG T., FRIEDMAN C.S., WIGHT N.A., LEE P.-Y., TENG P.H., SRIURAIRATTANA S., WONGPRASERT K. & WITHYACHUMNARNKUL B. (2010). Withering syndrome in abalone *Haliotis diversicolor supertexta*. *Dis. Aquat. Org.*, **90** (1), 69–76.

*
* *

NB: Existe un Laboratorio de Referencia de la OIE para la infección por *Xenohalotis californiensis* (puede consultarse en la Tabla del final de este *Manual Acuático* o en la página web de la OIE: www.oie.int).

CAPÍTULO 2.4.8.

INFECCIÓN POR *MIKROCYTOS MACKINI*

1. **Ámbito de aplicación**

A efectos de este capítulo, la infección por *Mikrocytos mackini* se considera que es una infección por *Mikrocytos mackini*, el agente causal de la enfermedad de la Isla de Denman en las ostras.

2. **Información sobre la enfermedad**

2.1. **Factores del agente**

Protozoos de filiación taxonómica desconocida. Los análisis filogenéticos sugirieron que *M. mackini* puede ser un eucariota basal, pero casi con seguridad no está directamente relacionado con otros taxones de protistas conocidos (Carnegie *et al.*, 2003).

2.1.1. **El agente patógeno, cepas del agente**

No se conocen cepas (Carnegie *et al.*, 2003; Farley *et al.*, 1988) y hay una ausencia total de variación genética dentro de *Mikrocytos mackini* en toda la gama de ITS1-5.8S-ITS2 en el ADNr de más de 70 muestras recogidas en todo su ámbito de distribución (Abbott *et al.*, 2011).

2.1.2. **Supervivencia fuera del hospedador**

Desconocida. Sin embargo, se produce una transmisión directa entre las ostras a través de la columna de agua (Bower, 1988; Hervio *et al.*, 1996; Quayle, 1982).

2.1.3. **Estabilidad del agente**

Desconocida. Sin embargo, se produce una transmisión directa entre las ostras a través de la columna de agua (Bower, 1988; Hervio *et al.*, 1996; Quayle, 1982).

2.1.4. **Ciclo de vida**

El ciclo de vida es directo de hospedador a hospedador.

2.2. **Factores del hospedador**

Infeccioso para todas las especies de ostras expuestas artificialmente en el laboratorio o de forma natural.

2.2.1. **Especies hospedadoras susceptibles**

El ostión japonés (*Crassostrea gigas*), el ostión virgínico (*Crassostrea virginica*), la ostra europea (*Ostrea edulis*) y la ostra plegata (*Ostrea lurida*) son susceptibles a la infección (Bower *et al.*, 1997). Al menos dos especies de almejas, la almeja panopea (*Panope abrupta*) y la almeja de Manila (*Venerupis [=Tapes, =Ruditapes] philippinarum*), son resistentes a la infección (Bower *et al.*, 2005; y Meyer *et al.*, 2008, respectivamente).

2.2.2. **Fases susceptibles de la vida del hospedador**

Todas las fases de la vida de las ostras después del asentamiento son susceptibles a la infección (Bower *et al.*, 2005). La susceptibilidad de las larvas no se conoce.

2.2.3. **Especies o subpoblaciones predilectas (probabilidad de detección)**

Todas las especies susceptibles mantenidas a una temperatura inferior a 10°C durante al menos 3 meses son vulnerables a la enfermedad (Bower *et al.*, 1997; Hervio *et al.*, 1996). *Crassostrea virginica*, *Ostrea edulis* y *Ostrea lurida* parecen ser más susceptibles a la infección y la enfermedad que *Crassostrea gigas* (Bower *et al.*, 1997).

2.2.4. Órganos diana y tejidos infectados

Mikrocytos mackini suele encontrarse en el citoplasma de las células del tejido conjuntivo vesicular de todos los órganos, y en las fibras del músculo aductor, pero se ha observado también en hemocitos y en el epitelio de la glándula digestiva (Hine *et al.*, 2001; Meyer *et al.*, 2005).

2.2.5. Infección persistente con portadores de por vida

La infección puede ser mortal dependiendo de las condiciones ambientales y del hospedador (Bower, 1988; 2001; Bower & Meyer, 1999). Se producen infecciones subclínicas pero no se conoce la persistencia de la infección durante varios años ni la existencia de portadores durante toda la vida (Bower *et al.*, 1994a).

2.2.6. Vectores

No son necesarios vectores para la transmisión de la infección.

2.2.7. Animales acuáticos salvajes portadores o sospechosos de serlo

No aplicable.

2.3. Patrón de la enfermedad

2.3.1. Mecanismos de transmisión

La transmisión es directa de hospedador a hospedador (Hervio *et al.*, 1996). Las células viables de *M. mackini* liberadas al morir el hospedador son adquiridas probablemente por el siguiente hospedador a través de mecanismos de alimentación. Las células de *Mikrocytos mackini* que se encuentran en los hemocitos pueden salir también de su hospedador vivo por diapedesis, a través del tracto intestinal y las branquias.

2.3.2. Prevalencia

Durante los años sesenta del siglo XX, se atribuyeron a *M. mackini* cifras de mortalidad de hasta un 40% en la primavera (Abril y Mayo), en niveles intermareales bajas, en los individuos de *C. gigas* de edad avanzada (3+ años) cultivados sobre un sustrato de playa. Más recientemente, en individuos de *C. gigas* (2 años de edad) procedentes de una instalación de cultivo suspendido, se observó una mortalidad del 10% con las infecciones intensas por *M. mackini* durante la primavera. Hasta un 35% de las ostras de esta población infectada presentaban lesiones sintomáticas (pústulas verdes amarillentas) y una vez recolectada, la población afectada fue rechazada por el elaborador comercial. Esto fue un hecho poco habitual, puesto que esta enfermedad no suele tener repercusiones en las ostras de cultivos intensivos que son recolectadas en un plazo no superior a 3 años. Los experimentos de exposición en el laboratorio indicaron que la enfermedad es exacerbada por las temperaturas frías, lo cual sugiere que las repercusiones de *M. mackini* pueden ser más graves si es introducido inadvertidamente en lugares más fríos. Además, en el laboratorio, las ostras juveniles (ejemplares para siembra) son susceptibles a la infección, que causa una alta mortalidad (Bower *et al.*, 2005). No se conocen las repercusiones de *M. mackini* en los juveniles durante el cultivo comercial, pero se prevé que sea desdeñable si la siembra se realiza después de finalizado el periodo de transmisión natural que tiene lugar en la primavera (Quayle, 1982).

2.3.3. Distribución geográfica

En la costa Oeste de Canadá, *M. mackini* parece tener una distribución ubicua en todo el Estrecho de Georgia y estar limitado a otras localidades específicas en la zona de la isla de Vancouver. Este parásito se ha detectado también en ostras de áreas adyacentes del Estado de Washington (Estados Unidos), sin que se haya detectado una mortalidad asociada (Abbott *et al.*, 2001).

2.3.4. Mortalidad y morbilidad

La infección puede ser mortal si las temperaturas ambientales son favorables, como se indica más adelante. Sin embargo, alrededor de la mitad de las ostras expuestas parecen ser resistentes a la infección o la enfermedad resultante.

2.3.5. Factores ambientales

Las temperaturas frías de menos de 10°C durante 3–4 meses parecen ser un requisito necesario para que se desarrolle la enfermedad (Bower & Meyer, 1999; Hervio *et al.*, 1996). Las ostras expuestas experimentalmente y mantenidas a una temperatura de 15°C durante 3 meses no desarrollaron la

enfermedad hasta que fueron trasladadas y mantenidas a 10°C durante otros 4 meses. El hecho de que la enfermedad aparezca anualmente tan solo durante la primavera (Marzo a Junio) podría explicarse por el requisito de una temperatura fría para el desarrollo de la enfermedad.

2.4. Control y prevención

El sector de la acuicultura puede utilizar técnicas de gestión para evitar las consecuencias de la infección por *M. mackini* (Bower, 1988).

2.4.1. Vacunación

No aplicable.

2.4.2. Tratamiento con sustancias químicas

No aplicable.

2.4.3. Inmunoestimulación

No aplicable.

2.4.4. Selección genética a favor de la resistencia

No aplicable.

2.4.5. Repoblación con especies resistentes

No aplicable.

2.4.6. Agentes bloqueantes

No aplicable.

2.4.7. Desinfección de huevos y larvas

No aplicable.

2.4.8. Prácticas generales de manejo

Recolectar las ostras de un tamaño adecuado para el mercado en un plazo no superior a 3 años desde la siembra y antes del mes de Febrero del tercer año de engorde. Las ostras juveniles (ejemplares para siembra) no deben desplegarse a niveles de marea baja ni en zonas adyacentes a cultivos en suspensión infectados antes del mes de Junio (Bower, 1988; Quayle, 1982).

3. Obtención de muestras

3.1. Elección de ejemplares

Deben obtenerse muestras de ostras vivas o recién muertas.

En primavera, se seleccionan ostras de edad avanzada (3+ años) de niveles intermareales bajos. La obtención de muestras se centra en lugares en los que ha habido una mortalidad reciente. Se extraen las ostras de la concha y se seleccionan los ejemplares que tienen lesiones pequeñas (ulceraciones, abscesos, pústulas generalmente de color verde pero que pueden ser de color amarillo-marrón o incoloras, y de un diámetro de hasta 5 mm) en el tejido conjuntivo vesicular del cuerpo, el manto y los palpos labiales, y/o en el músculo aductor (véanse las imágenes de las lesiones en http://www.pac.dfo-mpo.gc.ca/sci/shelldis/pages/mikmacoy_e.htm).

3.2. Conservación de las muestras para su envío

Para la histología, el mejor conservante es la solución de Davidson, pero también son aceptables el formol tamponado al 10% u otros fijadores estándar de histología. Para los análisis de reacción en cadena de polimerasa (PCR), las muestras deben conservarse y almacenarse en etanol no desnaturalizado al 95% hasta la extracción del ADN, utilizando un kit comercial (por ejemplo DNeasy Kit; QIAGEN).

3.3. Combinación de varias muestras

La combinación de lesiones procedentes de la misma ostra es aceptable para la PCR y la histología.

3.4. Órganos y tejidos de elección

Es importante que cualquier lesión observada en los palpos labiales, el manto, la pared corporal o el músculo aductor se conserve tanto para la histología como para la PCR. Se recomienda la extirpación y bisección de lesiones representativas, fijando la mitad para histología y la otra para PCR.

Para la histología, en ausencia de lesiones (o además de ellas), se utiliza un corte transversal (aproximadamente 3 mm de grosor) realizado a través de la parte anterior de la masa visceral y que incluya los palpos labiales, el manto, la glándula digestiva y el estómago. El tejido conjuntivo vesicular (TCV) es el mejor para visualizar *M. mackini* en el examen histopatológico.

Para la PCR, en ausencia de lesiones (o además de ellas), se obtiene un corte transversal (de aproximadamente 3 mm de grosor) a través de la parte media de la masa visceral. De este corte, se extirpan uno o varios fragmentos de tejido (aproximadamente 25 mg de peso total) de una zona próxima a la base de las branquias que incluya: TCV, gónada, glándula digestiva y branquia.

3.5. Muestras/tejidos que no son adecuados

La presencia de *Mikrocytos mackini* asociada al tracto digestivo no es evidente en el examen histológico ordinario de cortes teñidos con hematoxilina y eosina. Generalmente es necesaria una hibridación *in situ* para ver el parásito en estos tejidos. Además, es casi imposible detectar *M. mackini* mediante histopatología en tejidos de ostras con una infección natural que no se asocia a lesiones de infiltración hemocítica.

4. Métodos de diagnóstico

4.1. Métodos de diagnóstico de campo

4.1.1. Signos clínicos

Lesiones focales pequeñas (ulceraciones, abscesos, pústulas, generalmente de color verde pero que pueden ser también de color amarillo-marrón o incoloras) de hasta 5 mm de diámetro, observadas en los tejidos blandos y a menudo con cicatrices marrones en la concha, adyacentes a abscesos en la superficie del manto. Aparte de las lesiones, las ostras infectadas suelen estar en buen estado hasta el momento de la muerte. Estos signos clínicos no son específicos de la infección por *M. mackini*.

4.1.2. Alteraciones del comportamiento

Hay ostras moribundas o débiles (que cierran herméticamente con lentitud las valvas) en las poblaciones afectadas durante la primavera o cuando se las tiene en tanques mantenidos a una temperatura <10°C. Estas alteraciones del comportamiento no son específicas de la infección por *M. mackini*.

4.2. Métodos clínicos

4.2.1. Anatomopatología macroscópica

Se producen lesiones focales pequeñas de infiltración hemocítica intensa (ulceraciones, abscesos, pústulas generalmente de color verde pero que pueden ser también de color amarillo-marrón o incoloras) de hasta 5 mm de diámetro en la pared corporal, el músculo aductor o en las superficies de los palpos labiales o el manto (Bower, 2005). Estos signos macroscópicos no son específicos de la infección por *M. mackini*.

4.2.2. Bioquímica clínica

No aplicable.

4.2.3. Anatomopatología microscópica

Acumulación (infiltración) de numerosos hemocitos en la proximidad de una infección focal.

4.2.4. Preparaciones húmedas

No aplicable.

4.2.5. Frotis

Las improntas tisulares de lesiones teñidas con un colorante de tipo Giemsa y examinadas mediante microscopía óptica a 1000x aumentos (inmersión en aceite) pueden mostrar la presencia de *M. mackini* liberado por las células del hospedador.

4.2.6. Cortes fijados

Los focos de infiltración hemocítica en el manto, los palpos labiales y el músculo aductor pueden indicar la localización de *M. mackini* en el citoplasma de las células adyacentes de tejido conjuntivo vesicular y de miofibrocitos. Puede producirse una necrosis del tejido en el centro de la lesión (Bower *et al.*, 1994b). En las infecciones de gran intensidad inducidas en el laboratorio, puede no haber infiltración hemocítica.

4.2.7. Microscopía electrónica/citopatología

La íntima relación de *M. mackini* con los orgánulos de la célula del hospedador sugiere que este parásito es capaz de obtener energía directamente a partir de las mitocondrias de la célula del hospedador (Hine *et al.*, 2001).

4.3. Métodos de detección e identificación del agente

4.3.1. Métodos directos de detección

El pequeño tamaño de *M. mackini* (2 a 3 µm de diámetro) hace imposible observarlo sin la ayuda de una ampliación a gran aumento (aproximadamente 1000x).

4.3.1.1. Métodos microscópicos

Al microscopio óptico, *M. mackini* tiene un aspecto morfológicamente similar al de *Bonamia* sp. excepto por su presencia en el citoplasma de las células del tejido conjuntivo vesicular y los miocitos, en los que no se encuentra *Bonamia* sp. En la microscopía electrónica, puede utilizarse la ultraestructura morfológica para diferenciar *M. mackini* de otros protozoos conocidos. Sin embargo, son necesarias infecciones muy intensas para poder utilizar este instrumento.

4.3.1.1.1. Preparaciones húmedas

No aplicable.

4.3.1.1.2. Frotis

Muestras a obtener: hospedadores vivos con lesiones.

Procedimiento técnico: se extirpa una lesión y se corta por la mitad con un bisturí. Se aplica el lado del tejido de la lesión sobre un papel absorbente para eliminar el exceso de líquido. Se tocan con el tejido varias áreas de un portaobjetos de vidrio limpio y se seca al aire. Las observaciones se realizan a ×1000 aumentos (inmersión en aceite) tras una tinción con colorantes de tipo Wright–Giemsa o con un kit de tinción comercial para células sanguíneas (por ejemplo, Hemacolor®, EMD Chemicals Inc.) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Controles positivos: se dispone de improntas de tejido procedentes de ostras infectadas que proporciona el Laboratorio de Referencia de la OIE. Sin embargo, es importante señalar que *M. mackini* en improntas de tejido es prácticamente imposible de diferenciar de *Bonamia* sp en este material.

Niveles de validación: Este análisis no ha sido validado formalmente.

Especificidad y sensibilidad: la especificidad es muy baja porque *M. mackini* se parece a otras microcélulas en las improntas de tejido; la sensibilidad puede ser mejor que la de la histología ordinaria, pero solamente cuando hay lesiones (Carnegie *et al.*, 2003).

Interpretación de los resultados: presencia de microcélulas pequeñas (pueden estar distorsionadas hasta un diámetro de alrededor de 4 µm) que suelen observarse fuera de las células del hospedador. El parásito, generalmente de 2-3 µm de diámetro tiene un citoplasma de color azul claro (basófilo) y

un núcleo pequeño rojo (eosinófilo) (los colores pueden ser diferentes según la tinción utilizada). La técnica no es específica para la especie.

4.3.1.1.3. Cortes fijados

Muestras a obtener: ostras vivas o recién muertas.

Procedimiento técnico: los cortes de tejido que incluyan lesiones deben fijarse durante aproximadamente 24 horas en solución de Davidson o en formol tamponado al 10%, seguido de un procesamiento normal para histología en parafina y tinción con hematoxilina y eosina. Las observaciones se hacen con aumentos crecientes hasta llegar a $\times 1000$.

Controles positivos: se dispone de cortes histológicos (teñidos y con cubreobjetos o cortes en parafina sin teñir en un portaobjetos de vidrio) que proporciona el Laboratorio de Referencia de la OIE. Se recomienda la referencia frecuente a las preparaciones de control positivas mientras se realiza la búsqueda de *M. mackini* dado el carácter críptico y el pequeño tamaño de este parásito.

Niveles de validación: este análisis no ha sido validado de manera formal.

Especificidad y sensibilidad: la especificidad de especie es muy baja para las microcélulas observadas en los hemocitos, pero es alta cuando estas microcélulas se encuentran dentro del citoplasma de células de tejido conjuntivo vesicular; la sensibilidad es buena para las infecciones de intensidad moderada o alta, sobre todo cuando se examina el tejido conjuntivo procedente de la proximidad inmediata a las lesiones, pero es baja para los tejidos situados a distancia de las lesiones y para las infecciones de intensidad baja.

Método de referencia: en la actualidad, la histopatología de las lesiones en las ostras se considera el análisis de elección para detectar y diagnosticar las infecciones por *M. mackini*.

Interpretación de los resultados:

- Un resultado positivo es la presencia de microcélulas esféricas de alrededor de 2–3 μm de diámetro en el interior del citoplasma de células de tejido conjuntivo vesicular y/o miocitos, generalmente en células del hospedador inmediatamente adyacentes a una infiltración hemocítica intensa focal.
- En las especies hospedadoras susceptibles, dentro del ámbito de distribución conocido de *M. mackini*, un resultado positivo es un signo de infección por *M. mackini*. Fuera del ámbito de distribución conocido, un resultado positivo debe confirmarse mediante secuenciación del ADN del gen de ARN ribosómico de subunidad pequeña (ADNr de SSU) y la comparación de la secuencia con el fragmento de 1457 pb de *M. mackini* publicado en GenBank. (Número de acceso AF477623, URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&val=30515676>). Si la secuencia de ADNr de SSU sugiere la presencia de *M. mackini*, se recomienda secuenciar el ADNr de ITS1-5.8S-ITS2 con el empleo de los métodos de Abbott *et al.* (2001) para determinar de manera fiable si es genéticamente idéntico a *M. mackini* dentro del margen actualmente descrito (GenBank # HM563060.1; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/HM563060.1>).

4.3.1.2. Aislamiento e identificación del agente

No se ha realizado un aislamiento puro de *M. mackini*. Sin embargo, se están desarrollando otros procedimientos de identificación además de la microscopía óptica.

4.3.1.2.1. Cultivo celular/medios artificiales

No aplicable.

4.3.1.2.2. Métodos de detección del antígeno basados en anticuerpos (IFAT, ELISA, etc.)

No aplicable. Se han producido anticuerpos monoclonales, pero no se ha desarrollado con ellos un análisis diagnóstico inmunológico.

4.3.1.2.3. Técnicas moleculares (PCR, ISH, secuenciación, etc.)

4.3.1.2.3.1 Análisis de PCR de la región de ADNr de SSU

Se han desarrollado pares de cebadores dirigidos a la región SSU para *M. mackini*. Estos cebadores son 5'-AGA-TGG-TTA-ATG-AGC-CTC-C-3' y 5'-GCG-AGG-TGC-CAC-AAG-GC-3' y amplifican un producto de 546 pb (Carnegie *et al.*, 2003). Las muestras deben diluirse en ddH₂O estéril o en tampón Tris/EDTA (TE) estéril (pH 7,0–7,2) hasta una concentración de entre 10 y 40 ng/μl antes de realizar el análisis. La mezcla de reacción de PCR contiene los siguientes ingredientes a concentraciones finales: Tris/HCl 20 mM (pH 8,4); KCl 50 mM; MgCl₂ 1,25 mM; una concentración 200 μM de cada uno de los siguientes: dATP, dCTP, dGTP y dTTP; una concentración 0,05 μM de cada cebador; y 0,05 unidades/μl y 1,5 μl de ADN plantilla en un volumen total de 15 μl. Los parámetros de los ciclos empiezan con una desnaturalización inicial a 95°C durante 10 minutos, seguido de 40 ciclos a 95°C durante 1 minuto, 60,5°C durante 1 minuto y 72°C durante 1 minuto, y terminan con una extensión final a 72°C durante 10 minutos. Los productos pueden analizarse mediante electroforesis en geles de agarosa al 1,5% con un contenido de 2,0 μl de 5000X SybrGreen o 0,1 μg/ml de bromuro de etidio y pueden visualizarse mediante exposición a luz UV.

Controles positivos/negativos: son obligatorios. Los controles positivos son el ADN genómico procedente de hospedadores con una infección intensa que proporciona el Laboratorio de Referencia de la OIE. Los controles negativos son el ADN genómico procedente de hospedadores no infectados o de reacciones sin ADN plantilla.

Niveles de validación: este análisis no ha sido validado formalmente.

Especificidad y sensibilidad: el análisis de la región de ADNr de SSU detectó de tres a cuatro veces más infecciones por *M. mackini* en 1056 ostras salvajes procedentes de la isla Denman de la Columbia Británica, en comparación con la histopatología estándar (Carnegie *et al.*, 2003). Sin embargo, posteriormente se ha demostrado que este método es problemático, ya que no diferencia entre *M. mackini* y una especie de *Mikrocytos* genéticamente diferente, que se ha detectado en múltiples localizaciones geográficas dispersas (Abbott *et al.*, 2001).

Interpretación de los resultados: un resultado positivo es un amplicón de PCR del tamaño apropiado, al tiempo que todos los controles negativos producen resultados negativos y todos los controles positivos tienen resultados positivos.

4.3.1.2.3.2 Análisis por qPCR TaqMan en ADNr de ITS2-28S

Recientemente se ha desarrollado un análisis diagnóstico de qPCR en tiempo real, con el empleo de cebadores y sonda en ADNr de ITS2-28S en *M. mackini*, que no muestra una reacción cruzada con *Mikrocytos* sp. La validación en el laboratorio de este análisis ha mostrado que es muy específico y sensible para la detección de *M. mackini*. En la actualidad se está realizando una validación diagnóstica formal del análisis de qPCR.

4.3.1.2.3.3 Hibridación in-situ (ISH)

Muestras a obtener: seguir el procedimiento para los cortes fijados (4.3.1.1.3) descrito más arriba, excepto porque los cortes de tejido deben colocarse en portaobjetos con carga eléctrica positiva o portaobjetos recubiertos con aminoalquilsilano.

Procedimiento técnico: se desparafinan los cortes de tejido, se rehidratan y luego se hibridan con sondas oligonucleótidas marcadas. Las sondas marcadas con 5' Oregon Green muestran una intensa hibridación respecto a *M. mackini* (Carnegie *et al.*, 2003). Sin embargo, la orientación del tejido del hospedador resulta difícil cuando se emplea esta sonda fluorescente. La hibridación con la sonda MACKINI-1 (5'-AGC-CCA-CAG-CCT-TCA-C-3') con un extremo 3' marcado con digoxigenina y una tinción de contraste con Bismark Brown Y al 0,5% en etanol al 30% (Meyer *et al.*, 2005) pone de manifiesto la localización del parásito en el interior de los tejidos del hospedador.

Controles positivos/negativos: son obligatorios. Los controles positivos son cortes de tejido procedentes de una ostra infectada por *M. mackini*. Los controles negativos son análisis sin sonda o análisis realizados con ostras no infectadas.

Niveles de validación: esta técnica no ha sido validada formalmente.

Especificidad y sensibilidad: la sonda MACKINI-1 mostró una hibridación intensa respecto a *M. mackini*, pero no evidenció hibridación respecto a los tejidos de ostras o respecto a los demás parásitos de estos hospedadores y una bacteria que se estudiaron: *Bonamia ostreae* en *O. edulis*; *Perkinsus qugwadi* en *Patinopectin yessoensis*; *Trichodina* sp. en *C. gigas*; un protista de tipo amebiano en *Protothaca staminea*; *Hematodinium* sp en *Chionoecetes tanneri*; SPP (un protista parásito de filiación taxonómica incierta) en *Pandalus platyceros*; y *Nocardia crassostreae* en *C. gigas* (Meyer *et al.*, 2005). Esa sonda con un marcaje con digoxigenina fue considerablemente más sensible en la detección de infecciones, en comparación con los cortes histológicos estándar teñidos con hematoxilina y eosina. La infección pudo detectarse a menos aumentos (x100 en comparación con x1000) y en tejido con tinción basófila, como la glándula digestiva, el epitelio digestivo y el tejido gonadal (Meyer *et al.*, 2005).

Interpretación de los resultados: Un resultado positivo es la presencia de un marcaje de color azul-negro de las células del parásito (tamaño y localización en el tejido apropiados) al tiempo que todos los controles negativos producen resultados negativos y todos los controles positivos tienen resultados positivos.

4.3.1.2.4. Purificación del agente

No se ha obtenido un aislamiento de *M. mackini* sin contaminación de núcleos de la célula hospedadora. Sin embargo, se ha descrito una técnica de filtración que concentra este parásito (Joly *et al.*, 2001).

4.3.2. Métodos serológicos

Se desarrollaron anticuerpos monoclonales e hibridomas criopreservados hace unos 15 años. La especificidad de los anticuerpos monoclonales no ha sido validada plenamente y no se han desarrollado como prueba diagnóstica.

5. Idoneidad de las pruebas para cada uso previsto

Los métodos actualmente disponibles para la vigilancia dirigida y el diagnóstico de *Mikrocytos mackini* se indican en la Tabla 5.1. Las designaciones utilizadas en la Tabla indican lo siguiente: a = el método es el método recomendado por razones de disponibilidad, utilidad y especificidad y sensibilidad diagnósticas; b = el método es un método estándar con una buena sensibilidad y especificidad diagnósticas; c = el método tiene aplicación en algunas situaciones, pero el coste, la exactitud u otros factores limitan gravemente su aplicación; y d = el método no se recomienda en la actualidad para este fin. Estas designaciones son algo subjetivas ya que la idoneidad implica cuestiones de fiabilidad, sensibilidad, especificidad y utilidad. Aunque no todas las pruebas indicadas como de categoría a o b han sido objeto de una estandarización y validación formales, su carácter de uso habitual y el hecho de que se hayan utilizado ampliamente sin resultados dudosos las hacen aceptables.

Tabla 5.1. Métodos para la vigilancia y el diagnóstico dirigidos

Método	Vigilancia dirigida		Diagnóstico provisional	Diagnóstico confirmativo
	Juveniles	Adultos		
Signos macroscópicos	d	c	c	d
Frotis (improntas de tejido)*	c	c	c	d
Histopatología	c	a	b	b
ME de transmisión	d	d	d	b
Sondas de ADN – <i>in situ</i>	c	c	c	a
PCR	b	b	b	b
Secuenciación	d	d	d	a ¹

ME = microscopía electrónica; PCR = reacción en cadena de polimerasa. *La técnica no es específica para la especie, pero puede utilizarse en áreas y hospedadores susceptibles y durante la primavera del año en el que se ha evidenciado la enfermedad causada por *M. mackini*. ¹Solamente se utiliza en combinación con un resultado positivo en la PCR.

6. Prueba(s) recomendada(s) para la vigilancia dirigida destinada a declarar la ausencia de infección por *M. mackini*

Deben usarse la histopatología y los análisis de PCR para una vigilancia dirigida destinada a declarar la ausencia de infección por *M. mackini*. Deben obtenerse ostras de edad 2+ años procedentes de niveles intermareales bajos o de cultivos en suspensión durante la primavera del año y debe buscarse la posible presencia de cualquier lesión.

7.1. Definición de caso sospechoso

En las especies que se sabe que son susceptibles dentro del ámbito de distribución geográfica de *M. mackini* durante la primavera del año, un caso sospechoso de infección por *M. mackini* se caracteriza por presentar signos macroscópicos de la enfermedad, en combinación con un resultado positivo en las improntas del tejido en las lesiones.

En otras especies hospedadoras o fuera del ámbito de distribución conocido de *M. mackini*, un caso sospechoso es un resultado positivo en la histología o la PCR.

7.2. Definición de caso confirmado

En las especies que se sabe que son susceptibles dentro del ámbito de distribución geográfica de *M. mackini* durante la primavera del año, un caso confirmado es un resultado positivo en uno de los siguientes métodos: histología, PCR o ISH.

En otras especies hospedadoras o fuera del ámbito de distribución conocido de *M. mackini*, un caso confirmado es un resultado positivo en la histología o la PCR combinado con un resultado positivo de la hibridación *in-situ*, la microscopía electrónica o una homología con las secuencias de ADN_r publicadas (Abbott *et al.*, 2011; Carnegie *et al.*, 2003). Se recomienda la secuenciación de las regiones SSU y/o ITS1-5.8S-ITS2 como paso final para un diagnóstico confirmativo de *M. mackini*.

8. Bibliografía

- ABBOTT C.L., GILMORE S.R., LOWE G., MEYER G. & BOWER S. (2011). Sequence homogeneity of internal transcribed spacer rDNA in *Mikrocytos mackini* and detection of *Mikrocytos* sp. in a new location. *Dis. Aquat. Org.*, **93**, 243–250.
- BOWER S.M. (1988). Circumvention of mortalities caused by Denman Island oyster disease during mariculture of Pacific oysters. *Am. Fish. Soc. (Special Publication)*, **18**, 246–248.
- BOWER S.M. (2001). Hazards and risk management of *Mikrocytos mackini* in oysters. In: Proceedings of the OIE International Conference on Risk Analysis in Aquatic Animal Health, Rodgers C.J., ed. World Organisation for Animal Health (OIE), Paris, France, 164–166.
- BOWER S.M. (2005). Synopsis of Infectious Diseases and Parasites of Commercially Exploited Shellfish: *Mikrocytos mackini* (Denman Island Disease) of Oysters.
URL: http://www.pac.dfo-mpo.gc.ca/sci/shelldis/pages/mikmacoy_e.htm.
- BOWER S.M., BATE K. & MEYER G.R. (2005). Susceptibility of juvenile *Crassostrea gigas* and resistance of *Panope abrupta* to *Mikrocytos mackini*. *J. Invertebr. Pathol.*, **88**, 95–99.
- BOWER S.M., CARNEGIE R.B., GOH B., JONES S.R.M., LOWE G.J. & MAK M.W.S. (2004). Preferential PCR amplification of parasitic protistan small subunit rDNA from metazoan tissues. *J. Eukaryotic Microbiol.*, **51**, 325–332.
- BOWER S.M., HERVIO D. & McGLADDERY S.E. (1994a). Potential for the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, to serve as a reservoir host and carrier of oyster pathogens. *ICES Council Meeting Papers*, Copenhagen, Denmark, ICES-CM-1994/F:30.
- BOWER S.M., HERVIO D. & MEYER G.R. (1997). Infectivity of *Mikrocytos mackini*, the causative agent of Denman Island disease in Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, to various species of oysters. *Dis. Aquat. Org.*, **29**, 111–116.
- BOWER S.M., McGLADDERY S.E. & PRICE I.M. (1994b). Synopsis of infectious diseases and parasites of commercially exploited shellfish. *Ann. Rev. Fish Dis.*, **4**, 1–199.
For update see URL: http://www.pac.dfo-mpo.gc.ca/sci/shelldis/title_e.htm.

BOWER S.M. & MEYER G.R. (1999). Effects of cold water on limiting or exacerbating some oyster diseases. *J. Shellfish Res.*, **18**, 296 (Abstract).

BOWER S.M. & MEYER G.R. (2002). Morphology and ultrastructure of a protistan pathogen in the haemolymph of shrimp (*Pandalus* spp.) in the northeastern Pacific Ocean. *Can. J. Zool.*, **80**, 1055–1068.

CARNEGIE R.B., MEYER G.R., BLACKBOURN J., COCHENNEC-LAUREAU N., BERTHE F.C.J. & BOWER S.M. (2003). Molecular detection of the oyster parasite *Mikrocytos mackini* and a preliminary phylogenetic analysis. *Dis. Aquat. Org.*, **54**, 219–227.

COMMITTEE ON THE STATUS OF ENDANGERED WILDLIFE IN CANADA (2004). Canadian Wildlife Service, Ottawa, Canada. http://www.sararegistry.gc.ca/species/showDocument_e.cfm?id=591

FARLEY C.A., WOLF P.H. & ELSTON R.A. (1988). A long-term study of 'microcell' disease with a description of a new genus, *Mikrocytos* (g. n.), and two new species, *Mikrocytos mackini* (sp. n.) and *Mikrocytos roughleyi* (sp. n.). *Fishery Bull.*, **86**, 581–593.

HERVIO D., BOWER S.M. & MEYER G.R. (1996). Detection, isolation and experimental transmission of *Mikrocytos mackini*, a microcell parasite of Pacific oysters *Crassostrea gigas* (Thunberg). *J. Invertebr. Pathol.*, **67**, 72–79.

HINE P.M., BOWER S.M., MEYER G.R., COCHENNEC-LAUREAU N. & BERTHE F.C.J. (2001). Ultrastructure of *Mikrocytos mackini*, the cause of Denman Island disease in oysters *Crassostrea* spp. and *Ostrea* spp. in British Columbia, Canada. *Dis. Aquat. Org.*, **45**, 215–227.

JOLY J.-P., BOWER S.M. & MEYER G.R. (2001). A simple technique to concentrate the protozoan *Mikrocytos mackini*, causative agent of Denman Island disease in oysters. *J. Parasitol.*, **87**, 432–434.

MEYER G.R., BOWER S.M. & CARNEGIE R.B. (2005). Sensitivity of a digoxigenin-labelled DNA probe in detecting *Mikrocytos mackini*, causative agent of Denman Island disease (mikrocytosis) in oysters. *J. Invertebr. Pathol.*, **88**, 89–94.

MEYER G.R., BOWER S.M., LOWE G. & DAVIES S. (2008). Resistance of the Manila clam (*Venerupis philippinarum*) to infection with *Mikrocytos mackini*. *J. Invertebr. Pathol.*, **98**, 54–57.

QUAYLE D.B. (1982). Denman Island oyster disease 1960–1980. *British Columbia Shellfish Mariculture Newsletter*, **2**, 1–5, (Victoria, Canada).

*
* *

PART 3

OIE EXPERTISE

LIST OF OIE REFERENCE LABORATORIES AND COLLABORATING CENTRES FOR DISEASES OF AMPHIBIANS, CRUSTACEANS, FISH AND MOLLUSCS

LISTED DISEASES OF AMPHIBIANS

Infection with ranavirus	<p>Dr N. Moody Australian Animal Health Laboratory, CSIRO Livestock Industries P.O. Bag 24 (Ryrie Street), Geelong, Victoria 3220, AUSTRALIA Tel.: (61-3) 52.27.00.00, Fax: (61-3) 52.27.55.55 E-mail: nick.moody@csiro.au</p> <p>Prof. R. Whittington Faculty of Veterinary Science, University of Sydney, Private Bag 3 Camden NSW 2570, AUSTRALIA Tel.: (61-2) 93.51.16.19, Fax: (61-2) 93.51.16.18 E-mail: richardw@camden.usyd.edu.au</p>
--------------------------	--

LISTED DISEASES OF CRUSTACEANS

Crayfish plague (<i>Aphanomyces astaci</i>)	<p>Dr S. Viljamaa-Dirks Finnish Food Safety Authority, Evira Kuopio, Neulaniementie 4 FIN-70210 Kuopio, FINLAND Tel.: (358) 2077.24962, Fax: (358) 2077 24970 E-mail: satu.viljamaa-dirks@evira.fi</p> <p>Dr B. Oidtmann The Centre for Environment, Fisheries & Aquaculture Science (Cefas) Barrack Road, The Nothe, Weymouth, Dorset DT4 8UB, UNITED KINGDOM Tel.: (44-1305) 20.66.61, Fax: (44-1305) 20.66.01 E-mail: birgit.oidtmann@cefas.co.uk</p>
Infectious hypodermal and haematopoietic necrosis	<p>Dr J. Huang Maricultural Organism Disease Control and Molecular Pathology Laboratory, Yellow Sea Fisheries Research Institute (YSFRI), Chinese Academy of Fishery Sciences #106 Nanjing Road, Qingdao, Shandong Province 266071, CHINA (PEOPLE'S REPUBLIC OF) Tel.: (86-532) 85.82.30.62 ext. 802, Fax: (86-532) 85.81.15.14; E-mail: huangjie@ysfri.ac.cn; aqudis@public.qd.sd.cn Web site: www.ysfri.ac.cn</p> <p>Prof. D. Lightner Aquaculture Pathology Laboratory, Department of Veterinary Science and Microbiology, University of Arizona, 1117 E. Lowell, Building 90, Tucson AZ 85721, UNITED STATES OF AMERICA Tel.: (1-520) 621.84.14, Fax: (1-520) 621.48.99 E-mail: dvl@u.arizona.edu</p>
Infectious myonecrosis	<p>Prof. D. Lightner Aquaculture Pathology Laboratory, Department of Veterinary Science and Microbiology, University of Arizona, 1117 E. Lowell, Building 90, Tucson AZ 85721, UNITED STATES OF AMERICA Tel.: (1-520) 621.84.14, Fax: (1-520) 621.48.99 E-mail: dvl@u.arizona.edu</p>
Necrotising hepatopancreatitis	Awaiting receipt of application

Taura syndrome	<p>Prof. D. Lightner Aquaculture Pathology Laboratory, Department of Veterinary Science and Microbiology, University of Arizona, 1117 E. Lowell, Building 90, Tucson AZ 85721, UNITED STATES OF AMERICA Tel.: (1-520) 621.84.14, Fax: (1-520) 621.48.99 E-mail: dvl@u.arizona.edu</p>
White spot disease	<p>Dr J. Huang Maricultural Organism Disease Control and Molecular Pathology Laboratory, Yellow Sea Fisheries Research Institute (YSFRI), Chinese Academy of Fishery Sciences #106 Nanjing Road, Qingdao, Shandong Province 266071, CHINA (PEOPLE'S REPUBLIC OF) Tel.: (86-532) 85.82.30.62 ext. 802, Fax: (86-532) 85.81.15.14; E-mail: huangjie@ysfri.ac.cn; aqudis@public.qd.sd.cn Web site: www.ysfri.ac.cn</p> <p>Dr G. Lo College of Bioscience and Biotechnology, National Cheng Kung University, No.1, University Road, Tainan City 701 CHINESE TAIPEI Tel: +886-6 275.75.75 ext. 31010, Fax: +886-6 208.36.63 Email: gracelow@mail.ncku.edu.tw</p> <p>Prof. D. Lightner Aquaculture Pathology Laboratory, Department of Veterinary Science and Microbiology, University of Arizona, 1117 E. Lowell, Building 90, Tucson AZ 85721, UNITED STATES OF AMERICA Tel.: (1-520) 621.84.14, Fax: (1-520) 621.48.99 E-mail: dvl@u.arizona.edu</p>
White tail disease	<p>Dr A. Sait Sahul Hameed Aquaculture Biotechnology Division, Department of Zoology, C. Abdul Hakeem College, Melvisharam-632 509, Vellore Dt. Tamil Nadu, INDIA Tel.: (91-4172) 269.487, Fax: (91-4172) 269.487 E-mail: cah_sahul@hotmail.com</p>
Yellow head disease	<p>Dr P. Walker Australia Animal Health Laboratory (AAHL), CSIRO Livestock Industries Private Bag 24, Geelong, VIC 3220, AUSTRALIA Tel.: (61-3) 52.27.54.65, Fax: (61-3) 52.27.55.55 E-mail: peter.walker@csiro.au</p>

DELISTED DISEASES OF CRUSTACEANS

Spherical baculovirus (<i>Penaeus monodon</i> -type baculovirus); Tetrahedral baculovirus (<i>Baculovirus penaei</i>)	<p>Prof. D. Lightner Aquaculture Pathology Laboratory, Department of Veterinary Science and Microbiology, University of Arizona, 1117 E. Lowell, Building 90, Tucson AZ 85721, UNITED STATES OF AMERICA Tel.: (1-520) 621.84.14, Fax: (1-520) 621.48.99 E-mail: dvl@u.arizona.edu</p>
---	--

LISTED DISEASES OF FISH

Epizootic haematopoietic necrosis	<p>Dr N. Moody Australian Animal Health Laboratory, CSIRO Livestock Industries P.O. Bag 24 (Ryrie Street), Geelong, Victoria 3220, AUSTRALIA Tel.: (61-3) 52.27.00.00, Fax: (61-3) 52.27.55.55 E-mail: nick.moody@csiro.au</p> <p>Prof. R. Whittington Faculty of Veterinary Science, University of Sydney, Private Bag 3 Camden NSW 2570, AUSTRALIA Tel.: (61-2) 93.51.16.19, Fax: (61-2) 93.51.16.18 E-mail: richardw@camden.usyd.edu.au</p>
Infection with <i>Aphanomyces invadans</i> (Epizootic ulcerative syndrome)	<p>Dr V. Panyawachira Inland Aquatic Animal Health Research Institute (AAHRI), Inland Fisheries Research and Development Bureau, Department of Fisheries, Paholyothin Road, Jatuchak, Bangkok 10900, THAILAND Tel.: (66-2) 579.41.22, Fax: (66-2) 561.39.93 E-mail: ninee43@hotmail.com</p>
Infection with <i>Gyrodactylus salaris</i>	<p>Dr H. Hansen National Veterinary Institute, Section for Parasitology P.O. Box 750 Sentrum, 0106 Oslo, NORWAY Tel.: (47) 23.21.61.10 E-mail: haaken.hansen@vetinst.no</p>
Infection with salmonid alphavirus	<p>Dr T. Taksdal National Veterinary Institute, Section for Parasitology P.O. Box 750 Sentrum, 0106 Oslo, NORWAY Tel.: (47) 23.21.60.00, Fax: (47) 23.21.60.01 E-mail: postmottak@vetinst.no</p>
Infectious haematopoietic necrosis	<p>Dr J. Winton Western Fisheries Research Center, 6505 N.E. 65th Street, Seattle Washington 98115, UNITED STATES OF AMERICA Tel.: (1-206) 526.65.87, Fax: (1-206) 526.66.54 E-mail: jim_winton@usgs.gov</p>
Infection with infectious salmon anaemia virus	<p>Dr S.H. Marshall González Aquaculture Pathology Laboratory, Genetic and Molecular Immunology Laboratory of the Pontifical Catholic University of Valparaíso, Avenida Universidad, 330 Valparaíso, CHILE Tel.: (56-32) 227.48.28 E-mail: diagnostico@ucv.cl</p> <p>Dr K. Falk National Veterinary Institute, P.O. Box 750 Sentrum, 0106 Oslo NORWAY Tel.: (47-23) 21.60.00, Fax: (47-23) 21.63.01 E-mail: knut.falk@vetinst.no</p>
Koi herpesvirus disease	<p>Dr K. Yuasa National Research Institute of Aquaculture, Fisheries Research Agency, 422-1 Nakatsuhamura, Minamiise-cho, Watarai, Mie 516-0193, JAPAN Tel.: (81-599) 66.1830, Fax: (81-599) 66.1962 E-mail: khv-lab@fra.affrc.go.jp</p> <p>Dr K. Way The Centre for Environment, Fisheries & Aquaculture Science (Cefas) Barrack Road, The Nothe, Weymouth, Dorset DT4 8UB, UNITED KINGDOM Tel.: (44-1305) 20.66.39, Fax: (44-1305) 20.66.01 E-mail: keith.way@cefasc.co.uk</p>

Red sea bream iridoviral disease	<p>Dr K. Nakajima National Research Institute of Fisheries Science, Fisheries Research Agency, Fukuura 2-12-4, Kanazawa-ku, Yokohama-shi, Kanagawa 236-8048, JAPAN Tel.: (81-45) 788.76.15, Fax: (81-45) 788.50.01 E-mail: RSIV-lab@fra.affrc.go.jp</p>
Spring viraemia of carp	<p>Dr Hong Liu Shenzhen Exit & Entry Inspection and Quarantine Bureau, AQSIQ, 2049 Heping Road, Shenzhen, 518001, CHINA (PEOPLE'S REPUBLIC OF) Tel.: (86-755) 25.58.84.10, Fax: (86-755) 25.58.86.30 E-mail: liuhong@szciq.gov.cn</p> <p>Dr D. Stone The Centre for Environment, Fisheries & Aquaculture Science (Cefas) Barrack Road, The Nothe, Weymouth, Dorset DT4 8UB, UNITED KINGDOM Tel.: (44-1305) 20.66.42, Fax: (44-1305) 20.66.01 E-mail: david.stone@cefas.co.uk</p>
Viral haemorrhagic septicaemia	<p>Dr N.J. Olesen National Veterinary Institute, Technical University of Denmark (DTU) Hangovej 2, DK-8200 Aarhus N, DENMARK Tel.: (45) 72.34.68.31, Fax: (45) 72.34.69.01 E-mail: njol@vet.dtu.dk</p>

DELISTED DISEASES OF FISH

Bacterial kidney disease (<i>Renibacterium salmoninarum</i>)	<p>Dr J. Winton Western Fisheries Research Center, 6505 N.E. 65th Street, Seattle Washington 98115, UNITED STATES OF AMERICA Tel.: (1-206) 526.65.87, Fax: (1-206) 526.66.54 E-mail: jim_winton@usgs.gov</p>
Channel catfish virus disease and Enteric septicaemia of catfish (<i>Edwardsiella ictaluri</i>)	<p>Dr L.A. Hanson Fish Diagnostic Laboratory, College of Veterinary Medicine, Mississippi State University, P.O. Box 6100, Spring Street, Mississippi 39762 UNITED STATES OF AMERICA Tel.: (1-662) 325.1202, Fax: (1-662) 325.1031 E-mail: hanson@cvm.msstate.edu</p>
<i>Oncorhynchus masou</i> virus disease	<p>Dr M. Yoshimizu Laboratory of Biotechnology and Microbiology, Graduate School of Fisheries Sciences, Hokkaido University, 3-1-1 Minato-cho, Hakodate, Hokkaido 041-8611, JAPAN Tel./Fax: (81-138) 40.88.10 E-mail: yosimizu@fish.hokudai.ac.jp</p>
Viral encephalopathy and retinopathy	<p>Dr G. Cattoli Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Dipartimento di Ittiopatologia, Via Romea 14/A, 35020 Legnaro PD, ITALY Tel.: (39-049) 808.42.48, Fax: (39-049) 808.43.92 E-mail: gcattoli@izsvenezie.it</p> <p>Dr T. Nakai Laboratory of Fish Disease, Graduate School of Biosphere Science, Hiroshima University, Higashi-Hiroshima 739-8528, JAPAN Tel.: (81-82) 424.7947, Fax: (81-82) 424.7977 E-mail: nakait@hiroshima-u.ac.jp</p>

LISTED DISEASES OF MOLLUSCS

<p>Infection with abalone herpesvirus</p>	<p>Dr Mark Crane Australian Animal Health Laboratory (AAHL), CSIRO Livestock Industries, 5 Portarlington Road, East Geelong, Victoria 3220, AUSTRALIA Tel.: (61-3) 52.27.51.18, Fax: (61-3) 52.27.55.55 E-mail: mark.crane@csiro.au</p> <p>Prof. Pen Heng Chang School of Veterinary Medicine, National Taiwan University 1, Sec.4, Roosevelt Road, Taipei 106, CHINESE TAIPEI Tel.: (886-2) 33.66.12.96, Fax: (886-2) 23.66.14.75 E-mail: penheng@ntu.edu.tw</p>
<p>Infection with: <i>Bonamia exitiosa</i>; <i>Bonamia ostreae</i>; <i>Marteilia refringens</i></p>	<p>Dr I. Arzul IFREMER, Laboratoire de Génétique Aquaculture et Pathologie BP 133, 17390 La Tremblade, FRANCE Tel.: 33 (0)5 46.76.26.10, Fax: 33 (0)5 46.76.26.11 E-mail: isabelle.arzul@ifremer.fr</p>
<p>Infection with: <i>Perkinsus marinus</i>; <i>Perkinsus olseni</i></p>	<p>Dr R. Carnegie Shellfish Pathology Laboratory, Department of Environmental and Aquatic Animal Health, Virginia Institute of Marine Science, P.O. Box 1346 (regular mail) or Route 1208 Greate Road (courier), Gloucester Point, VA 23062 UNITED STATES OF AMERICA Tel.: (1-804) 684.77.13 E-mail: carnegie@vims.edu</p>
<p>Infection with <i>Xenohaliotis californiensis</i></p>	<p>Prof. C. Friedman Friedman Shellfish Health Laboratory, School of Aquatic and Fishery Sciences, University of Washington, Box 355020, Seattle, Washington WA 98195, UNITED STATES OF AMERICA Tel.: (1-206) 543.95.19 (office), (1-206) 543.54.43 (laboratory), Fax: (1.206) 616.86.89 E-mail: carolynf@uw.edu</p>

DELISTED DISEASES OF MOLLUSCS

<p>Infection with: <i>Bonamia roughleyi</i>; <i>Marteilia sydneyi</i></p>	<p>Dr I. Arzul IFREMER, Laboratoire de Génétique Aquaculture et Pathologie BP 133, 17390 La Tremblade, FRANCE Tel.: 33 (0)5 46.76.26.10, Fax: 33 (0)5 46.76.26.11 E-mail: isabelle.arzul@ifremer.fr</p>
<p>Infection with: <i>Haplosporidium costale</i>; <i>Haplosporidium nelsoni</i></p>	<p>Dr R. Carnegie Shellfish Pathology Laboratory, Department of Environmental and Aquatic Animal Health, Virginia Institute of Marine Science, P.O. Box 1346 (regular mail) or Route 1208 Greate Road (courier), Gloucester Point, VA 23062 UNITED STATES OF AMERICA Tel.: (1-804) 684.77.13 E-mail: carnegie@vims.edu</p>
<p>Infection with <i>Mikrocytos mackini</i></p>	<p>Dr G. Meyer Pacific Biological Station, Aquatic Animal Health Section, 3190 Hammond Bay Road, Nanaimo, British Columbia V9T 6N7, CANADA Tel.: (1-250) 756.70.34, Fax: (1-250) 756.70.53 E-mail: Gary.Meyer@dfo-mpo.gc.ca</p>

COLLABORATING CENTRES

<p>Information on Aquatic Animal Diseases</p>	<p>The Centre for Environment, Fisheries & Aquaculture Science (Cefas) Barrack Road, The Nothe, Weymouth, Dorset DT4 8UB, UNITED KINGDOM Tel.: (44.1305) 20.66.25, Fax: (44.1305) 20.66.01 E-mail: stephen.feist@cefas.co.uk; Web: http://www.cefas.defra.gov.uk/our-science/animal-health-and-food-safety/aquatic-animal-disease/oie-collaborating-centre-for-information-on-aquatic-animal-diseases.aspx</p>
<p>Epidemiology and Risk Assessment of Aquatic Animal Diseases</p>	<p>National Veterinary Institute, Department for Epidemiology, P.O. Box 750, Sentrum, 0106 Oslo, NORWAY Tel: (47-23) 21.63.65, Fax: (47-23) 21.60.01 E-mail: edgar.brun@vetinst.no E-mail2: ebrun25@gmail.com</p> <p>This bi-national OIE Collaborating Centre includes participation from:</p> <p style="padding-left: 40px;">Centre for Aquatic Health Science, Atlantic Veterinary College (AVC), University of Prince Edward Island, Department of Health Management, 550 University Avenue, Charlottetown, PE C1A 4P3, CANADA Tel.: (1-902) 566.07.28, Fax: (1-902) 566.08.23 E-mail: lhammell@upei.ca Web: http://www.eraaad.org</p>