

Enfermedades de moluscos bivalvos de interés en Acuicultura



**ANTONIO FIGUERAS
BEATRIZ NOVOA**
(Coordinadores)

Enfermedades de moluscos bivalvos de interés en Acuicultura



**ANTONIO FIGUERAS
BEATRIZ NOVOA**
(Coordinadores)

**FUNDACIÓN OBSERVATORIO ESPAÑOL DE ACUICULTURA
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS
MINISTERIO DE MEDIO AMBIENTE Y MEDIO RURAL Y MARINO**

MADRID, 2011

Reservados todos los derechos por la legislación en materia de Propiedad Intelectual. Ni la totalidad ni parte de este libro, incluido el diseño de la cubierta, puede reproducirse, almacenarse, o transmitirse en manera alguna por ningún medio ya sea electrónico, químico, mecánico, óptico, informático, de grabación o de fotocopia, sin permiso previo por escrito de la editotial.

Las noticias, los asertos y las opiniones contenidos en esta obra son de la exclusiva responsabilidad del autor o autores. La editorial, por su parte, sólo se hace responsable del interés científico de sus publicaciones.

Catálogo general de publicaciones oficiales:

<http://publicacionesoficiales.boe.es/>

Catálogo general de publicaciones de la Fundación OESA:

<http://www.fundacionoesa.es/publicaciones>

Serie:

**Publicaciones Científicas y Tecnológicas
de la Fundación Observatorio Español de Acuicultura**



© Consejo Superior de Investigaciones Científicas
© Fundación Observatorio Español de Acuicultura
© Antonio Figueras
Beatriz Novoa
(Coordinadores)

e-ISBN: 978-84-00-09288-7

e-NIPO: 472-11-084-2

Depósito Legal: M-28557-2011

Diseño y maquetación: DiScript Preimpresión, S. L.

AGRADECIMIENTOS

En este libro hemos intentado recoger los resultados de investigación sobre las enfermedades de moluscos bivalvos fruto del trabajo desarrollado a lo largo de más de 20 años. Sería interminable nombrar a todos los que nos han ayudado a lo largo de estos años.

A todos los investigadores que han trabajado en este tema y que han apoyado con su investigación el desarrollo de este sector. Especialmente a los que desarrollaron su tarea investigadora de forma directa o indirecta (Frank Perkins, Harold Haskin, Susan Ford, Gene Burreson, Henri Grizel, J.R. Bonami, Michel Comps, Manuel Gutierrez, Antonio Figueras Montfort, Elisa Polanco y tantos otros) en los primeros años con muy pocos medios, escaso sueldo y bajo reconocimiento social. También a todo el personal del Instituto de Investigaciones Marinas que nos han ayudado en el desarrollo de estos trabajos, especialmente a los miembros de nuestro grupo. Nos sentimos orgullosos de compartir con ellos muchas horas de trabajo y de contribuir, aunque sea durante unos años, a su formación.

A la Fundación Observatorio Español de Acuicultura (FOESA) a Juan Espinosa que durante muchos años bregó por sacar adelante el Observatorio Español de Acuicultura, ahora Fundación, y a su Director Gerente actual, Javier Remiro, por su apoyo. Igualmente, a la Ministra de Medio Ambiente, Medio Rural y Medio Marino y a la Secretaría General de Pesca y a su Secretaria General por apoyar la Fundación. No puedo olvidar a Ignacio Gandarías y José Luis González por su apoyo en los inicios de la Fundación y al Presidente del CSIC, Rafael Rodrigo por designarme como representante del Consejo en el Patronato de la misma. Una mención especial a Laura Poisa por su ayuda en la revisión de los manuscritos.



En particular quiero agradecer a mi padre, Antonio Figueras Montfort, su tarea pionera en el estudio de las enfermedades del mejillón gallego y el haberme inculcado el afán por trabajar ordenada y constantemente.

También agradezco a mi familia su paciencia y cariño continuos.

Antonio Figueras

A mi padre

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	3
1. INTRODUCCIÓN A LAS ENFERMEDADES DE MOLUSCOS BIVALVOS	13
1. INTRODUCCIÓN	16
2. ALGUNOS PUNTOS A CONSIDERAR	26
3. ALGUNA INVESTIGACIÓN INNOVADORA	27
4. REFERENCIAS	29
2. ENFERMEDADES NEOPLÁSICAS EN MOLUSCOS DE INTERÉS COMERCIAL	33
1. INTRODUCCIÓN	36
2. DIAGNOSIS	39
2.1. Características de las células neoplásicas	39
2.2. Diagnóstico mediante histología y hemocitología	44
2.3. Diagnóstico mediante anticuerpos	46
2.4. Diagnóstico mediante citometría de flujo	47
3. EPIDEMIOLOGÍA	47
3.1. Especies afectadas, prevalencia y mortalidad	48
3.2. Variaciones estacionales. Factores ambientales	49
3.3. Relación con la talla/edad y con el sexo	50
3.4. Efectos subletales: condición fisiológica y gonadal	52
4. ONTOGENIA Y ETIOLOGÍA	53
4.1. Ontogenia	53
4.2. Etiología	54
4.2.1. Virus	55
4.2.2. Contaminación ambiental	57
4.2.3. Biotoxinas	58
4.2.4. Oncogenes y oncoproteínas	59



5. PERSPECTIVAS	60
6. REFERENCIAS	61
3. VIRUS EN MOLUSCOS	71
1. INTRODUCCIÓN	74
2. VIRUS CON GENOMA RNA	76
2.1. Birnavirus	76
2.2. Retrovirus	77
2.3. Reovirus	78
2.4. Picornavirus	78
3. VIRUS CON GENOMA DNA	79
3.1. Herpesvirus	79
3.2. Iridovirus	81
3.3. Papovavirus	82
4. ACTIVIDAD ANTIVIRAL EN MOLUSCOS BIVALVOS	84
5. REFERENCIAS	84
4. ENFERMEDADES BACTERIANAS DE MOLUSCOS BIVALVOS	93
1. INTRODUCCIÓN	96
2. BACTERIAS PATÓGENAS DE LARVAS DE BIVALVOS	97
2.1. Cultivo de bivalvos en criadero. Problemática general	97
2.2. Patógenos oportunistas	99
2.3. Relación bacterias-mortalidades	99
2.4. Vibriosis	102
2.4.1. Nuevas especies patógenas de bivalvos	107
2.5. Enfermedades producidas por representantes del Género Pseudomonas ..	114
2.6. Enfermedades producidas por otros géneros bacterianos	118
3. ENFERMEDADES DE JUVENILES Y ADULTOS	119
3.1. Vibriosis	119
3.1.1. Enfermedad del anillo marrón	119
3.1.2. Mortalidad de verano	121
3.2. Enfermedad Juvenil de la ostra	123
3.3. Infecciones por procariotas de tipo Rickettsia	125



3.4. Nocardiosis.....	128
3.5. Otras enfermedades de etiología bacteriana.....	129
4. DIAGNÓSTICO DE ENFERMEDADES BACTERIANAS	130
5. CONSIDERACIONES FINALES	133
6. REFERENCIAS	134
5. LA ENFERMEDAD DEL ANILLO MARRÓN	147
1. INTRODUCCIÓN	150
2. CARACTERIZACIÓN DEL AGENTE ETIOLÓGICO DE LA ENFERMEDAD DEL ANILLO MARRÓN	153
2.1. Métodos de detección.....	153
2.2. Caracterización de <i>V. tapetis</i>	154
2.2.1. Características fenotípicas	154
2.2.2. Características genotípicas	155
3. PATOLOGÍA ASOCIADA A LA ENFERMEDAD DEL ANILLO MARRÓN	159
3.1. Descripción macroscópica	159
3.2. Estudios histológicos	161
4. INTERACCIÓN HOSPEDADOR-PATÓGENO	166
4.1. Patogenicidad de <i>V. tapetis</i>	166
4.2. Mecanismos de defensa del hospedador.....	170
5. PREVENCIÓN Y CONTROL DE LA ENFERMEDAD	172
6. REFERENCIAS	174
6. PERKINSOSIS EN MOLUSCOS	181
1. INTRODUCCIÓN	185
2. CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS Y CICLO DE VIDA	186
3. POSICIÓN TAXONÓMICA	191
4. ESPECIES INCLUIDAS EN EL GÉNERO <i>PERKINSUS</i>	192
5. MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO	196
5.1. Incubación en caldo de tioglicolato.....	196
5.2. Métodos moleculares.....	198
6. ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS. DINÁMICA DE LA INFECCIÓN POR <i>PERKINSUS SPP</i>	200



6.1. Influencia de factores ambientales	200
6.2. Influencia de factores estresantes	204
6.3. Influencia de la edad	205
6.4. Modelos predictivos	205
7. CULTIVO <i>IN VITRO</i> DEL PARÁSITO	206
8. INTERACCIÓN HOSPEDADOR-PARÁSITO	207
8.1. Perkinsosis y el sistema inmunitario del hospedador	209
8.1.1. Hemograma	209
8.1.2. Actividad fagocítica	209
8.1.3. Lectinas	209
8.1.4. Producción de especies reactivas de oxígeno	210
8.1.5. Producción de óxido nítrico	210
8.1.6. Apoptosis	211
8.1.7. Polipéptido anti-Perkinsus	211
8.1.8. Actividad citocida en el plasma	212
8.1.9. Lisozima	212
8.1.10. Fenoloxidasas	212
8.1.11. Actividad antiproteasa en el plasma	213
8.1.12. Genes implicados en la respuesta inmunitaria	213
8.2. Supervivencia del parásito en el hospedador y factores de virulencia	214
8.2.1. Actividad antioxidante	214
8.2.2. Secreción de proteasas	215
8.2.3. Aspectos del metabolismo	216
8.2.4. Genes del parásito implicados en virulencia	216
8.3. Efectos de la enfermedad en la fisiología del hospedador	217
9. REFERENCIAS	218
7. MARTEILIOSIS EN MOLUSCOS	243
1. INTRODUCCIÓN	246
2. TAXONOMÍA DEL PHYLUM PARAMYXEA	247
2.1. Clase Marteiliidea	249
2.1.1. <i>Marteilia</i>	249
2.1.2. <i>Paramarteilia</i>	252
2.1.3. <i>Marteilioides</i>	253
2.2. Clase Paramyxidea	253



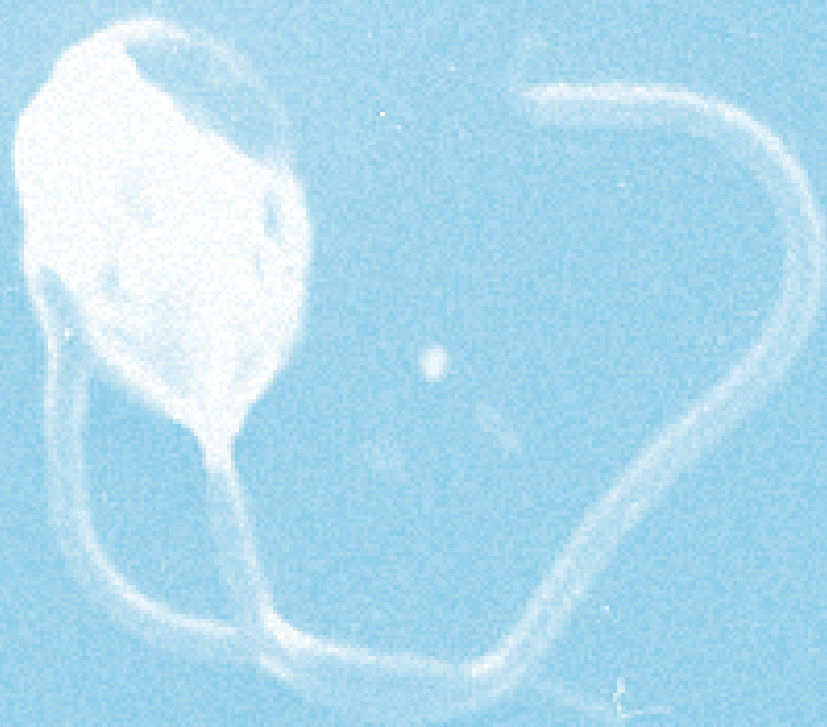
3. PATOGENIA	254
4. CICLO DE VIDA.....	259
5. DIAGNÓSTICO.....	263
6. MÉTODOS DE CONTROL	268
7. CONCLUSIÓN	271
8. REFERENCIAS	272
8. ENFERMEDADES CAUSADAS POR PARÁSITOS DEL GRUPO HAPLOSPORIDIA.....	283
1. INTRODUCCIÓN	287
2. FILOGENIA DE LOS HAPLOSPORIDIOS	288
3. TAXONES INCLUIDOS EN EL FILO HAPLOSPORIDIA	289
4. DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA Y RANGO DEL HOSPEDADOR	298
5. CICLOS DE VIDA Y TRANSMISIÓN	300
6. EPIDEMIOLOGÍA	304
7. INTERACCIÓN HOSPEDADOR-PARÁSITO	307
8. MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO	310
9. REFERENCIAS	314
9. ENFERMEDADES DE MOLUSCOS BIVALVOS DE INTERÉS COMERCIAL CAUSADAS POR METAZOOS.....	331
1. INTRODUCCIÓN	336
2. ORGANISMOS EXCAVADORES	337
2.1. Esponjas	337
2.2. Poliquetos	340
2.3. Moluscos bivalvos	345
3. HELMINTOS PARÁSITOS	346
3.1. Turbelarios	346
3.2. Céstodes larvales	353
3.3. Trematodos digeneos	358
3.4. Nematodos larvales	369



4. OTROS ORGANISMOS PARÁSITOS O HABITANTES DE LA CAVIDAD DEL MANTO	374
4.1. Moluscos gasterópodos	374
4.2. Copépodos	375
4.3. Cangrejos brachiuros	378
4.4. Nemertinos	381
5. AGRADECIMIENTOS	384
6. REFERENCIAS	385
10. RESPUESTA INMUNE DE MOLUSCOS	397
1. INTRODUCCIÓN	400
2. EL HEMOCITO	400
2.1. Funciones inmunes de los hemocitos	402
3. COMPONENTES DEL SISTEMA INMUNE DE LOS MOLUSCOS	411
3.1. Lisozima	411
3.2. Lectinas, hemaglutininas y opsoninas	412
3.3. Hemolisinas	414
3.4. Sistema de complemento	414
3.5. Receptores Toll-like (TLRs)	416
3.6. Sistema profenol-oxidasa (proPO)	417
3.7. Proteasas e inhibidores de proteasas	418
3.8. Péptidos antimicrobianos (AMPs)	419
4. GENÓMICA DE LA RESPUESTA INMUNE EN LOS MOLUSCOS	422
5. REFERENCIAS	425
11. SEÑALIZACIÓN CELULAR EN MOLUSCOS	443
1. INTRODUCCIÓN	447
2. CITOQUINAS EN LA RESPUESTA INMUNE	450
2.1. Estructura del receptor de citoquinas y transducción de señales	451
2.2. Mecanismos moleculares de transmisión de señales mediadas por IL-2	453
3. REGULACIÓN INTRACELULAR DE LAS RESPUESTAS CELULARES	457
3.1. Corticotropinas y estrógenos	457
3.2. Factores de crecimiento	459
3.2.1. Factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF)	459

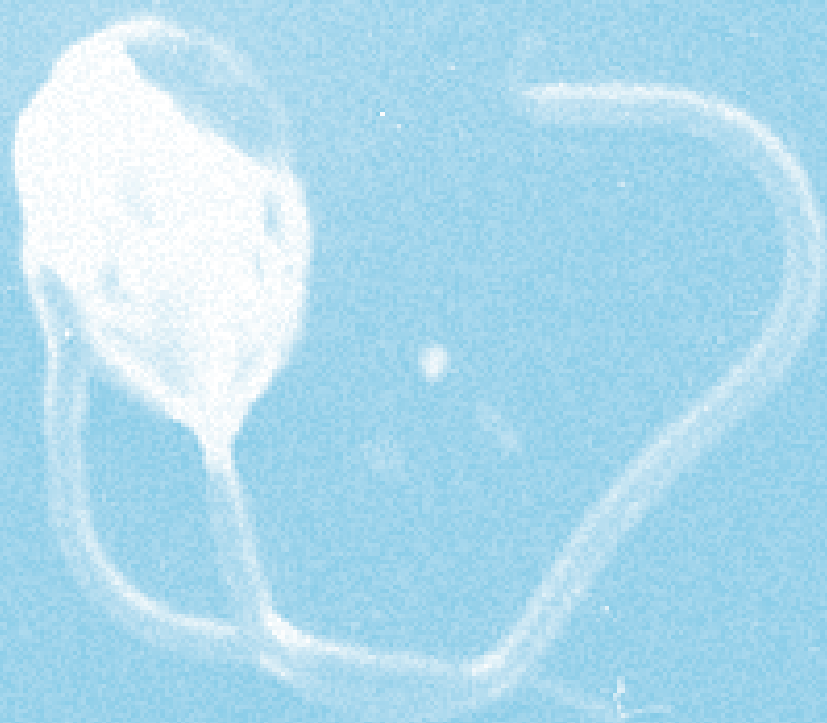


3.2.2. Factor de crecimiento transformante β (TGF- β) y factor de crecimiento epidérmico (EGF).....	462
3.3. Lipopolisacáridos bacterianos.....	463
4. REFERENCIAS	470
12. PROBIÓTICOS EN CULTIVOS LARVIARIOS DE MOLUSCOS BIVALVOS EN CRIADERO	481
1. INTRODUCCIÓN	484
2. MÉTODOS CLÁSICOS DE CONTROL DE PATÓGENOS	485
2.1. Tratamiento del agua.....	485
2.2. Quimioterapia	487
3. PROBIÓTICOS.....	491
3.1. Definición.....	491
3.2. Modos de acción.....	494
3.3. Aplicación de probióticos al cultivo de moluscos.....	497
3.4. Fijación larvaria y metamorfosis.....	502
4. CONSIDERACIONES FINALES	505
5. AGRADECIMIENTOS	507
6. REFERENCIAS	507
13. ESTRATEGIAS DE LUCHA FRENTE A ENFERMEDADES DE MOLUSCOS BIVALVOS.....	513
1. INTRODUCCIÓN	516
2. ACCIONES PARA IMPEDIR QUE UNA ENFERMEDAD INFECCIOSA LLEGUE A UNA ZONA NO AFECTADA	517
3. ACCIONES PARA MINIMIZAR LOS EFECTOS DE UNA ENFERMEDAD AUN EN PRESENCIA DEL AGENTE INFECCIOSO	518
3.1. Cambios en los procedimientos de gestión y cultivo	519
3.2. Aumento de la tolerancia	523
4. MEDIDAS TERAPÉUTICAS	530
5. ERRADICACIÓN DE ENFERMEDADES	531
6. REFERENCIAS	532



1

INTRODUCCIÓN A LAS ENFERMEDADES DE MOLUSCOS BIVALVOS



INTRODUCCIÓN A LAS ENFERMEDADES DE MOLUSCOS BIVALVOS

Figueras A.

Instituto Investigaciones Marinas. IIM-CSIC.
Eduardo Cabello 6, 36208 Vigo, España

Resumen

La investigación en enfermedades de moluscos ha estado enfocada principalmente a los estudios de la morfología del patógeno y su ultraestructura, los efectos de factores ambientales sobre los patógenos y su infectividad y en el desarrollo de técnicas de diagnóstico basadas en la inmunología y en biología molecular. Recientemente, se han puesto a punto reacciones en cadena de la polimerasa (PCRs) específicas para los patógenos más importantes de moluscos que tienen una mayor eficacia en la detección de los mismos que las tradicionales técnicas de citología e histología.

Aunque en los últimos años se ha incrementando el esfuerzo en los estudios de enfermedades de bivalvos, quedan por resolver una serie de asuntos tales como la validación de los nuevos métodos de diagnóstico, la patogenicidad de los nuevos posibles patógenos identificados, las tasas reales de mortalidad en los cultivos de moluscos, programas de selección de resistencia o el efecto de los patógenos en el sistema inmune de los bivalvos. La investigación multidisciplinar transnacional puede ayudar a resolver muchas de estas cuestiones todavía por resolver.



Abstract

Research on bivalve diseases has been mostly focused on pathogen morphology and ultrastructure, effect of external factors on pathogens or infectivity, and on the development of immune and molecular diagnostic techniques. Recently, specific PCRs have been set up for the most important bivalve pathogens being more sensitive than traditional techniques such as histology.

Although in the last years an increased effort has been done on bivalve pathology studies, a series of subjects remain to be tackled such as the validation of new diagnostic methods, the pathogenicity of the newly identified organisms, the real mortality data on bivalve culture, disease resistance selection programmes or the effect of pathogens on bivalves immune system. Transnational research actions involving multidisciplinary research groups will facilitate to answer many questions still not solved in bivalve pathology.

1. INTRODUCCIÓN

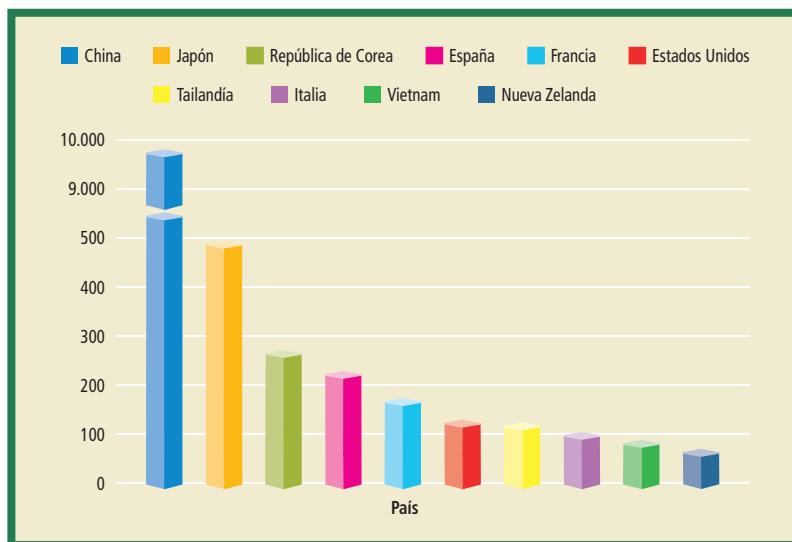
La producción de la acuicultura mundial ha alcanzado recientemente cifras muy elevadas (51,7 millones de toneladas) y un 27% (14,1 millones toneladas) de esta producción pertenece al cultivo de moluscos bivalvos (FAO, 2006). Con respecto a la acuicultura europea, la producción de moluscos bivalvos constituye un 35,7% (745.433 Tm). En términos de importancia económica la producción de Acuicultura de la Unión Europea representa un total de 4.428.167 miles of USD (FAO, 2001) de los cuales un 17,7% corresponde a los bivalvos (FAO, 2001).

El sector productor de los moluscos bivalvos español es uno de los más importantes en la Unión Europea y tiene una gran tradición histórica e importancia económica y social. España produce alrededor de 260.000 toneladas de moluscos bivalvos a lo largo de todo el territorio nacional situándose como en el 4º país con mayor a nivel mundial en el cultivo de moluscos detrás de China, Japón y Corea según datos de la FAO del 2006 (Fig. 1).

En la siguiente tabla se detallan las especies de moluscos bivalvos más importantes cultivadas en España en el 2007.



FIGURA 1. Principales productores mundiales de moluscos en el año 2006. La producción se mide en miles de toneladas. Los datos fueron obtenidos en la base de datos de cantidades de producción de acuicultura. *FAO Fishstat (F.A.O. Fisheries Department, 2006).*



Galicia es la Comunidad Autónoma con mayor importancia, ya que en dicha comunidad se concentra el 90% del total de la producción nacional de moluscos bivalvos basado principalmente en el cultivo de mejillón, *M. galloprovincialis*. En la Unión Europea, España es líder en la producción tanto de ostra plana, *Ostrea edulis*, como de mejillón, *M. galloprovincialis* y *M. edulis*, con un 32% y un 42% respectivamente de la producción europea.

Uno de los principales retos a los que se enfrenta la producción de moluscos bivalvos es la prevención y el control de las enfermedades. Aunque los cultivos extensivos, aquellos que mantienen una baja densidad de organismos en el cultivo, son menos susceptibles a las enfermedades, en ocasiones éstas se producen. Pero sobre todo los cultivos intensivos, con elevadas densidades de organismos, que en principio están orientados a generar un mayor beneficio económico, están mucho más expuestos a la aparición y desarrollo de diferentes enfermedades como consecuencia del aumento en las densidades y el estrés generado que facilita la transmisión del agente patógeno.

TABLA 1.

Producción de moluscos Bivalvos en todo el territorio Nacional en 2007.

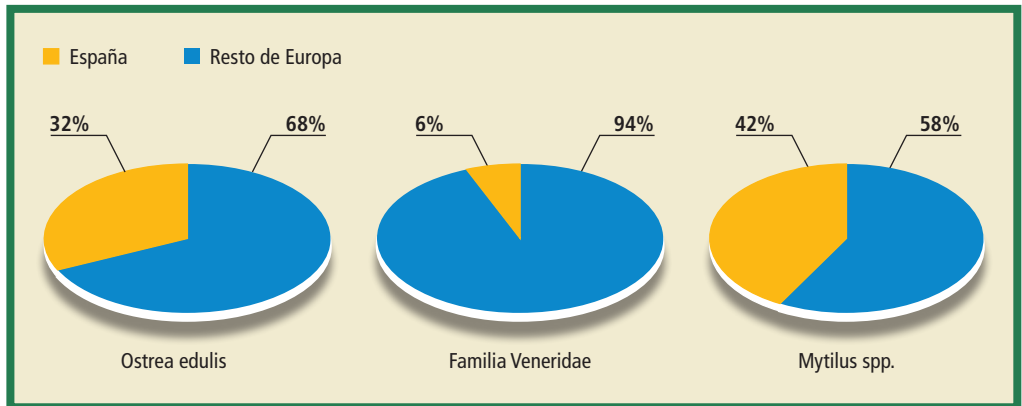
Especies de moluscos	Toneladas
Mejillones <i>Mytilus galloprovincialis</i> <i>Mytilus edulis</i>	247.229,49 t
Berberechos <i>Cerastoderma edule</i> <i>Acanthocardia taculeata</i>	4.784,04 t
Almejas <i>Ruditapes philippinarum</i> <i>Venerupis pullastra</i> <i>Ruditapes decussatus</i> <i>Donax trunculus</i> <i>V. Rhomboides</i> <i>Spisula solida</i> <i>Dosinia exoleta</i> <i>V. Aurea</i> <i>Chamelea gallina</i>	4.346,04 t
Ostras <i>Ostrea edulis</i> <i>Crassostrea gigas</i>	287,24 t
Solénidos	246,8 t
Otros	43 t
Producción total de bivalvos	256.936,61 t

El control de las enfermedades en las explotaciones acuícolas es obviamente crítico, ya que de poco sirve una especie de buen crecimiento o alto valor comercial si esta especie se muere o desarrolla malformaciones como consecuencia de una enfermedad que limite su comercialización. Estas enfermedades en ocasiones pueden producir pérdidas recurrentes, debido a condiciones ambientales estacionales o a la superación de un umbral de estrés en los hospedadores. Conocer el desarrollo de la enfermedad, así como un rápido diagnóstico de la misma es vital en la producción acuícola.

La identificación y estudio del desarrollo de la enfermedad puede ayudar a controlar la dispersión de la misma, limitando las pérdidas debidas a mortalidad o morbilidad puesto que en determinadas situaciones, el desarrollo de una enfermedad que no mata al hospedador



FIGURA 2. Porcentaje de la producción europea del año 2006 perteneciente a España de ostra plana, mejillón y almejas. Los datos fueron obtenidos en la base de datos de producción de acuicultura FAO *Fishstat* (F.A.O. Fisheries Department, 2006)



puede originar la pérdida de valor comercial del mismo como consecuencia de las malformaciones producidas.

En ocasiones, la aparición de una enfermedad en un cultivo es posterior a la importación de animales procedentes de otro lugar del mundo, bien como consecuencia de intentos de restaurar un cultivo disminuido por una enfermedad o bien como consecuencia de introducir una especie nueva de elevado interés comercial y rápido crecimiento que mejore las características biológicas de las especies autóctonas. Un claro ejemplo de este último suceso es la introducción del parásito *Perkinsus olseni* en las costas gallegas junto con ejemplares de almeja japonesa, *Ruditapes phillipinarum*, de valor comercial algo menor que la autóctona almeja fina, *Ruditapes decussatus*, pero de mayor resistencia y superior tasa de crecimiento, o la introducción del patógeno *Candidatus xenohaliotis californiensis* mediante la importación de semillas de oreja de mar, *Haliotis tuberculata*, de hatcheries irlandesas. Este patógeno era considerado hasta este momento como exótico a la Unión Europea.

La mayoría de las enfermedades de moluscos de declaración obligatoria para la Unión Europea son enfermedades causadas por protozoos. En muchos casos, los protozoos presentan un ciclo de vida complejo con múltiples hospedadores intermediarios (en el caso de que el parásito necesite tal hospedador para completar su ciclo de



vida), o reservorio (si simplemente se mantiene en dicho organismo sin desarrollarse).

En Europa, la producción de ostra plana (*O. edulis*) ha caído desde los años 60 por las sucesivas epidemias de *Marteilia refringens* y *Bonamia ostreae*. La producción total de ostra plana en Europa pasó de prácticamente 99.914 Tm en la primera mitad de la década de los 70, justo antes de que se presentara el problema de la marteiliasis, hasta 38.843 Tm en la segunda mitad de los años 90 (F.A.O Fisheries Department, 2003).

En cuanto a la producción de almejas en Europa, se puede apreciar una estabilización en el crecimiento de la producción en la Península Ibérica, que podría estar influenciado por la presencia del patógeno *P. olseni* asociado a mortalidades de almeja fina en Portugal y España a finales de los años 80. En cuanto a la producción europea de las dos principales especies de mejillón no se ha visto por el momento afectada por ninguna mortalidad de importancia, ya que si bien *M. refringens* está presente en mejillones cultivados en Galicia, su presencia en esta especie no está asociada a mortalidades.

Debido a todo lo anterior, la Unión Europea ha promulgado varias Decisiones y Directivas encaminadas a incrementar el control sobre la extensión de las enfermedades, la última en 2006 (2006/88/CEE) que recopilan toda la información sobre este tema, establece una normativa para el control de estas enfermedades, y enumera una serie de enfermedades como de «declaración obligatoria» presentes en el territorio de la Unión Europea (Anexo V Parte II), entre las que están, *Bonamia ostreae* y *Marteilia refringens* (que afectan a mejillón y ostra) y otras enfermedades ausentes en el territorio Europeo (Anexo V Parte I) entre las que se encuentra *Mikrocytos mackini* (que afecta a ostras en la costa Oeste de EEUU), *Perkinsus marinus* (que afecta a ostras en la costa este de EEUU y México) y *Bonamia exitiosa* (que afecta a ostras de Australia y Nueva Zelanda). Aunque recientemente se ha detectado la presencia de este patógeno en ostra plana, *Ostrea edulis* cultivada en Galicia (ABOLLO *et al.*, 2008) y Francia (ARZUL, comunicación personal).

Esta normativa indica que la mayor causa de dispersión de patógenos es el movimiento de stocks, tanto de semilla para cría, como de introducción de nuevas especies, y presenta una política de zoni-



ficación estricta basado en la presencia o ausencia de estas enfermedades, que limita el flujo comercial y condiciona las importaciones y exportaciones.

Con el fin de controlar la presencia de los distintos patógenos de declaración obligatoria presentes en el territorio de la Unión Europea se llevan a cabo programas de monitoreo basados en diversas técnicas de diagnóstico aprobadas por la OIE y la UE.

Las enfermedades de moluscos se han estudiado tradicionalmente empleando técnicas citológicas e histológicas que han sido muy útiles para detectar posibles organismos patógenos, especialmente parásitos protozoos, asociados a mortalidades o alteraciones en la calidad de las poblaciones cultivadas pero también para detectar lesiones y la interacción de los patógenos con el sistema inmune. Las técnicas histológicas se han utilizado para describir algunos patógenos asociados a mortalidades o enfermedades. Al principio de los estudios de enfermedades de moluscos se aplicó muchas veces el criterio de «presunción de culpabilidad», si un organismo extraño se encontraba en los tejidos de un animal o grupo de animales «enfermos» era sin duda la causa de las mortalidades. Este fue el caso de las graves mortalidades de mejillón (*Mytilus edulis*) detectadas en Holanda en la década de los 50 y atribuidas al copépodo *Mytilicola intestinalis* (KORRINGA, 1951).

Debemos señalar algunos avances importantes en el desarrollo de estos estudios. En la década de los 80, se comenzaron a utilizar técnicas y reactivos inmunológicos dando la oportunidad de introducir el uso de anticuerpos monoclonales y técnicas como el ELISA (Enzyme Linked Immunoassay) o el IFA (Indirect Fluorescent Assay) para detectar por ejemplo parásitos protozoos como el *Haplosporidium nelsoni* (MSX) o *Bonamia ostreae*. En los 90 se comenzaron a aplicar al estudio de estas enfermedades, técnicas muy sensibles de biología molecular tales como la Hibridación *in situ*, la reacción en cadena de la polimerasa y la secuenciación de ADN, principalmente de gen 18s ribosómico y de la región ITS.

En Europa se han llevado a cabo estudios de seguimiento de prevalencias e intensidades de *Marteilia* y *Bonamia* para intentar controlar su expansión. Teniendo en cuenta que en la Unión Europea la produc-



ción de ostra plana, en comparación con la de mejillón, almeja y ostra japonesa, es casi residual este esfuerzo europeo colectivo es cuando menos sorprendente.

Aunque en los últimos años, se han descrito diversos patógenos en moluscos sin conocer su impacto real en la producción, la investigación en los patógenos principales se ha centrado en descripciones morfológicas y estudios ultraestructurales (prevalencias, nuevos hospedadores, patogénesis) o en el efecto de factores ambientales sobre la prevalencia e intensidad de estos patógenos o en su infectividad.

El género *Bonamia* agrupa a protozoos parásitos que infectan a varias especies de ostra. La fase de su ciclo de vida que se desarrolla dentro de las ostras se caracteriza por células uninucleadas de pequeño tamaño (se les denomina microcélulas) que viven y se multiplican dentro de los hemocitos del hospedador, lo que conduce a la ruptura de la células hospedadora, y las células del parásito liberadas son fagocitadas por nuevos hemocitos, repitiéndose el ciclo.

B. ostreae, es el patógeno causante de la bonamiosis en la ostra plana, *O. edulis*, y otras especies de ostras (*O. puelchana*, *O. angasi*, *O. chilensis*, *O. denselamellosa*), responsable de importantes mortalidades en la costa atlántica europea. Este parásito se observa también en ambas costas en Norteamérica, de donde se cree que es originario.

Aunque no se conoce el ciclo de vida fuera del hospedador, la enfermedad se transmite de unas ostras a otras mediante cohabitación o por inoculación del patógeno purificado sin necesidad de la presencia de un hospedador intermediario. *Bonamia ostreae* se observa al microscopio como una inclusión citoplasmática con un diámetro que oscila entre 1 y 3 μm . Es posible distinguir en estas inclusiones el propio núcleo y citoplasma del parásito, perfectamente diferenciado del citoplasma del hospedador.

Además se han llevado a cabo serios esfuerzos en el desarrollo de técnicas de diagnóstico basadas en biología molecular. Distintos grupos han diseñado PCRs específicas para el diagnóstico de *Bonamia ostreae* (COCHENNEC *et al.*, 2000; CARNEGIE *et al.*, 2000) y tal como se esperaba todos están de acuerdo en que estas técnicas son más sensibles que la histología pero muchas de ellas no han sido aceptadas por los organismos internacionales tales como la Unión Europea y la Oficina



Internacional de Epizootías. Existen técnicas de diagnóstico molecular para la detección de otros patógenos de moluscos como diversas especies de *Bonamia* (HINE *et al.*, 2001), *Marteilia* (LE ROUX *et al.*, 1999, KLEEMAN and ADLARD, 2000, KLEEMAN *et al.*, 2002), *Perkinsus* (MARSH *et al.*, 1995; ROBLEDÓ *et al.*, 1998, 2000), haplosporidians (STOKES and BURRESON, 1995; STOKES *et al.*, 1995), etc.

M. refringens es un parásito protozoo que parasita la ostra plana, *O. edulis*, y mejillón *Mytilus* spp. *M. refringens* se aisló por primera vez en la ostra plana de la Bretaña Francesa (Aber Wrach). Como consecuencia de las transferencias de ostra plana de unas zonas a otras, también se encuentra *M. refringens* en la zona intermareal del litoral atlántico de Francia, en Marruecos (laguna de Nador), España (costa mediterránea y atlántica) e Italia.

Este parásito causa la enfermedad conocida como enfermedad de la glándula digestiva o de Aber. *M. refringens* parasita la glándula digestiva de la ostra induciendo una decoloración de la misma y una reducción de la cantidad de glucógeno presente en las ostras afectadas. Las ostras parasitadas aparecen emaciadas con la consiguiente reducción del crecimiento y con episodios de mortalidad. La parasitosis va acompañada de cambios histopatológicos que afectan a las células del epitelio del estómago y de los túbulos digestivos que muchas veces experimentan cambios necróticos. Todos estos efectos se observan en ostra plana, porque en el caso del mejillón, la presencia de *M. refringens* no está vinculada a mortalidades tal y como se comentaba anteriormente.

Hay que destacar la presencia de *M. maurini* en mejillones *M. galloprovincialis* y *M. edulis*, solapándose su distribución con la de *M. refringens* en Europa, si bien se cree que podría ser una especie sinónima o una variedad de esta última. Las distintas especies de *Marteilia* no se distinguen morfológicamente mediante microscopía óptica.

Además, diferentes *Marteilia* spp. han sido descritas en otros hospedadores como *Cerastoderma edule*, *Venerupis pullastra*, *Venerupis rhomboides* y *Ruditapes decussatus* tanto en Francia como en Galicia, *Argopecten gibbus* de La Florida (EE.UU.), *Tridacna maxima* en Fiji, *Ruditapes philippinarum* en Japón y *Solen marginatus* en Galicia.



La enfermedad se transmite naturalmente entre las ostras cultivadas. La infección tiene lugar durante el verano cuando la temperatura del agua está en torno a los 17 °C. El modo de infección y el ciclo de vida del parásito aún no se conoce con certeza todavía, aunque se ha demostrado que el copépodo *Paracartia grani* es un hospedador intermediario. Recientemente también se ha detectado mediante análisis de PCR la presencia del parásito *M. refringens* en distintas especies de zooplancton, aunque no se sabe todavía si son hospedadores intermediarios o simplemente especies que sirven como reservorio del patógeno.

Sobre *Marteilia* se han realizado importantes esfuerzos en el desarrollo de técnicas inmunológicas y moleculares para diagnosticar el parásito, identificando los tipos de parásitos presentes en mejillones y ostra en distintos lugares de Europa y aplicando estas nuevas metodologías para el estudio del ciclo de vida de *Marteilia*.

Sin embargo, quedan varias cuestiones pendientes: ¿hay dos especies de *Marteilia* en Europa, una parasitando mejillones y otra la ostra plana? ¿Debería ser la *Marteilia* que aparece en el mejillón, sin causar mortalidades, una enfermedad de declaración obligatoria? ¿Cual es el huesped intermediario?

No existen características ultraestructurales que permitan separar *Marteilia maurini* (descrita originalmente en mejillones) y *M. refringens* (descrita originalmente en ostra plana) (LONGSHAW *et al.*, 2001). La secuencia de la subunidad pequeña del RNA ribosómico (18S SSU rRNA) es idéntica en todos los aislados de *Marteilia* estudiados (BERTHE *et al.*, 2000). Sin embargo, la región interna espaciadora transcrita del cluster de genes ribosómicos (ITS-1) que evoluciona más rápidamente que la SSU rRNA revela un posible polimorfismo. Este hecho se determinó fácilmente mediante análisis de RFLP (restriction fragment length polymorphism) de un fragmento de esta región ITS, y se detectaron dos perfiles: el tipo «o» que correspondería a *M. refringens* presente en ostra plana y el tipo «M» que correspondería *M. maurini* presente en mejillón (LE ROUX *et al.*, 2001). Estudios posteriores llevados a cabo en España mostraron que aunque había dos linajes evolutivos diferentes que más o menos se correspondían de forma estricta con los tipos «M» y «O», era evidente que en base a estudios filogenéticos algunos



tipos «O» habían mutado a «M» y viceversa. Además se encontraron *Marteilia* tipo «O» en mejillones y tipo «M» en ostras lo que sugiere que probablemente haya habido varias transmisiones de *Marteilia* entre especies de mejillón y ostra.

Las técnicas moleculares han permitido aclarar más cuestiones. Como, por ejemplo, la presencia de patógenos exóticos como el *Haplosporidium nelsoni* (MSX), algunas especies de *Perkinsus*, o de *Bonamia* que tradicionalmente no se encontraban en Europa. Por ejemplo *B. exitiosa* tenía la consideración de enfermedad exótica para la Unión Europea, pues no se había detectado en Europa. La enfermedad de *B. exitiosa* es responsable de mortandades masivas de ostras en el Hemisferio sur (Nueva Zelanda).

B. exitiosa afecta de manera natural a ostras, *O. chilensis* y *O. angasi*. Sin embargo, se detectó la presencia de dicho patógeno en ostras, *O. edulis*, en Septiembre de 2007 (ABOLLO *et al.*, 2008). Durante los exámenes histológicos de las ostras analizadas se observaron dos tipos de microcélulas: el tipo más pequeño que mostraba el núcleo en posición periférica y un citoplasma muy escaso correspondiente a *B. ostreae* y el tipo más grande que mostraba el núcleo en posición central, a veces subcentral pero raramente periférico, y mayor cantidad de citoplasma que el tipo anterior correspondiente a *B. exitiosa*.

De la misma forma *H. nelsoni* fue detectado, aunque con prevalencia muy baja en *Crasostrea gigas* cultivada en Europa (RENAULT *et al.*, 2000) y se ha determinado por la identidad de sus secuencias de ADN que *Perkinsus olseni* (parásito de la oreja de mar en Australia) es el mismo parásito que *P. atlanticus* detectado en varias especies de almeja en Europa.

Las especies del género *Perkinsus* son parásitos de gran cantidad de grupos de moluscos en todo el planeta.

P. olseni (= *P. atlanticus*) es probablemente la especie que afecta a un mayor rango de hospedadores. Se ha descrito *P. olseni*, en multitud de especies de moluscos como orejas de mar (*H. rubra* y *H. laevigata*), almejas (*Anadara trapezia*, *Austrovenus stutchburyi*, *Tapes* spp., *Venerupis pullastra*), ostras (*C. gigas*, *C. ariakensis*, *C. sikamea*), etc.

La enfermedad se transmite de una manera directa sin la necesidad de hospedadores intermediarios. El ciclo de vida de *P. olseni* pasa por



tres estadios distintos (trofozoositos, hipnosporas y zoosporas). Los tres estadios se ha comprobado que son infectivos.

En los últimos años también se ha llevado a cabo estudios sobre la susceptibilidad/resistencia de especies de moluscos hacia los patógenos más virulentos y sobre ciclos de vida de algunos de estos patógenos.

Por ejemplo, *Crassostrea gigas*, *Mytilus edulis*, *M. edulis*, *Ruditapes decussatus*, *R. philippinarum* no son ni vectores ni huéspedes intermediarios de *Bonamia ostreae*. El copépodo *Paracartia granii* puede actuar como un huésped intermediario en el ciclo de vida de *Marteilia refringens* (AUDEMARD *et al.*, 2002) aunque se deben llevar a cabo más esfuerzos en estos estudios sobre los ciclos de vida que pueden permitir controlar la expansión de estos patógenos.

No podemos olvidar mencionar la investigación realizada sobre programas de selección de ostras resistentes a *Bonamia* (LAUNEY *et al.*, 2001).

2. ALGUNOS PUNTOS A CONSIDERAR

Aunque en los últimos años se han conseguido avances extremadamente críticos en el estudio de las enfermedades de moluscos, en mi opinión, se deben llevar a cabo más esfuerzos en los siguientes temas.

Nuevos métodos de diagnóstico: ¿Deben los métodos de diagnóstico basados en técnicas de biología molecular utilizados rutinariamente en el seguimiento de la presencia de patógenos? Los métodos tradicionales como la histología son estáticos y consumen mucho tiempo pero, a cambio ofrecen una visión de conjunto, permiten determinar la interacción del patógeno con el hospedador y permite detectar nuevos patógenos. Las técnicas moleculares son rápidas, específicas y sensibles pero necesitan ser validadas para determinar la existencia de falsos positivos y negativos y correlacionar los resultados con los obtenidos con las técnicas tradicionales.

Patogenicidad de posibles nuevos patógenos. Muchas veces es muy difícil confirmar la implicación de un determinado patógeno en una enfermedad o mortalidad. En muchos casos no se ha conseguido la transmisión de estos parásitos protozoos debido a su complejo ciclo de vida. Pero al menos en patógenos cultivables como las bacterias,



«patógenos fáciles», fáciles de detectar y de cultivar, su patogenicidad debería ser evaluada. Podrían ser modelos interesantes para detectar genes involucrados en la resitencia y en la respuesta inmune. El hecho de que los especialistas en patología de moluscos hayan concentrado sus esfuerzos en el estudio de patógenos protozoos nos debería hacer reflexionar sobre si hemos minusvalorado otros patógenos como los virus, difíciles de detectar principalmente porque no se han establecido cultivos permanentes de líneas celulares y porque el empleo de la microscopía electrónica de transmisión es costoso y tedioso. Es realmente sospechoso que se hayan detectado tan pocos patógenos virales relacionados con mortalidades y enfermedades en moluscos.

Mortalidad. ¿Conocemos realmente las tasas de mortalidad en los bancos naturales/explotados/cultivados o en las instalaciones de cultivos como las bateas de mejillón en Galicia o los bouchots en Francia? ¿Qué entendemos por mortalidad anormal? En mi opinión esta es una de las cuestiones más urgentes a definir y no puede establecerse de forma universal para todas las especies, técnicas de cultivo y criaderos. Los criterios que diferencian mortalidad anormal y mortalidad no explicada deben ser definidos. Es urgente un acuerdo entre expertos que ayuden a establecer estos criterios para los distintas especies y tipos de cultivo.

Efecto de los patógenos en el sistema inmune de los bivalvos. ¿Cómo luchan los bivalvos contra los distintos patógenos?. En los últimos años, con la excepción de Perkinsus, se han llevado a cabo muy pocos estudios sobre la interacción de los patógenos de moluscos y su sistema inmune. Una serie de factores puede afectar la respuesta inmune como los factores ambientales (estrés, fluctuaciones en la salinidad, temperatura, alimento disponible), contaminación, factores genéticos, etc. Y también es cierto que algunos patógenos, sin causar mortalidades elevadas pueden modular la respuesta inmune de los moluscos haciéndolos más susceptibles a patógenos oportunistas.

3. ALGUNA INVESTIGACIÓN INNOVADORA

En moluscos bivalvos se han descrito varios péptidos antimicrobianos y se ha caracterizado su estructura bioquímica y su actividad bio-



lógica. En *Mytilus edulis* y *M. galloprovincialis* se identificaron péptidos antimicrobianos purificados del suero y mediante extracción ácida de las organelas de los hemocitos (CHARLET *et al.*, 1996; MITTA *et al.*, 1999, 2000a; YANG *et al.*, 2000). Algunos de ellos fueron purificados y se diseñaron sondas de ADN que permitieron identificar la expresión del gen responsable de su síntesis en los hemocitos (MITTA *et al.*, 2000 a, b, c). Estos péptidos, purificados, sintéticos o recombinantes podrían utilizarse en la prevención y tratamiento de enfermedades microbianas debido a su amplio espectro de actividad frente a bacterias Gram-negativas y Gram-positivas, hongos y protozoos.

Técnicas como mRNA differential display (mRNA-DD) o las librerías basadas en la técnica de la Suppression Subtractive Hybridisation (SSH) ayudarán en la detección de genes involucrados en la respuesta inmune de moluscos. Esto podría ayudar a descubrir «genes interesantes» inducidos por la infección que podrían estar relacionados con la infección o empleados como «marcadores moleculares de interés» para seleccionar líneas de moluscos con características interesantes para la acuicultura. En la actualidad están en marcha diversos proyectos sobre este aspecto utilizando diversos modelos de patógenos y especies de moluscos.

Recientemente se han incorporado a estos estudios herramientas de genómica tales como los microarrays de cDNA en (*Mytilus galloprovincialis*) y ostra (*Crassostrea gigas*, *C. virginica* and *Ostrea edulis*). De hecho el microarray de mejillón (VENIER *et al.*, 2006) incluye 1.714 sondas de mejillón (76% singletons y aproximadamente un 50% de los transcritos han sido anotados) e incluyen controles no relacionados con la especie. El microarray de ostra contiene 4.460 clones de *C. virginica*, y 2.320 de *C. gigas*, e incluye 17 secuencias control que no pertenecen a ostra (JENNY *et al.*, 2007). Se pueden conseguir en los laboratorios originales o preparar uno en base a las secuencias disponibles en las bases de datos utilizando la nueva tecnología de oligos. Estos microarrays pueden utilizarse para investigar los perfiles génicos o las firmas moleculares asociadas a diversas condiciones experimentales tales como efectos de la dieta, empleo de probióticos, inmunoestimulantes o infecciones experimentales.

En ambos casos, (péptidos antimicrobianos y genes recientemente descubiertos que se han relacionado con la defensa contra las infe-



ciones) podemos hacernos más preguntas: ¿se pueden utilizar como criterios cuantitativos en procesos de selección? ¿Cuál es su papel en la defensa contra las infecciones? ¿Podrían utilizarse los moluscos como productores de moléculas de interés?

Es evidente que el futuro de este campo de la investigación está en una interesante encrucijada. Ahora, más que nunca es necesaria desarrollar investigación multidisciplinar transnacional, involucrando a tanto grupos que trabajen en estos aspectos como sea posible.

4. REFERENCIAS

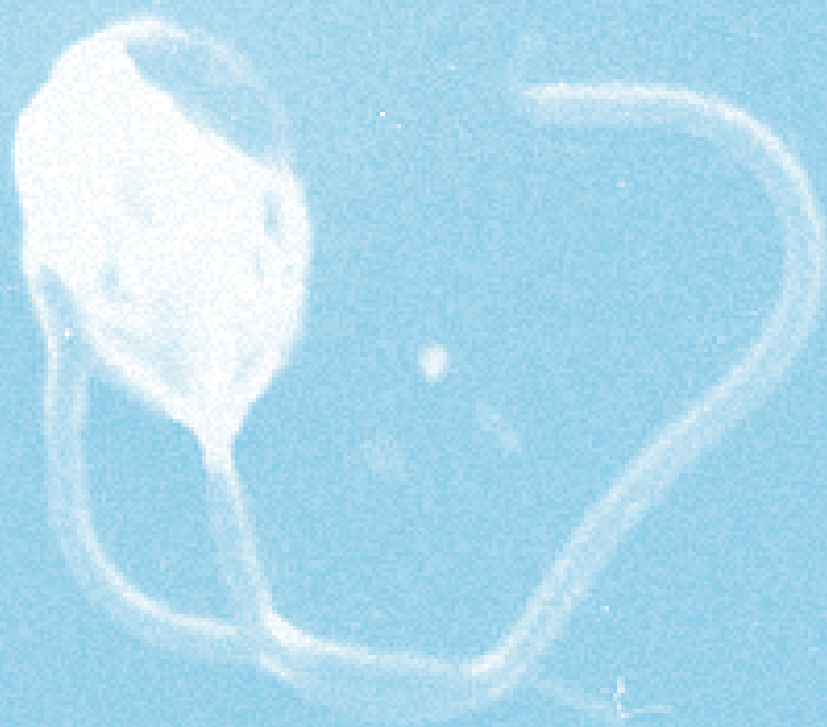
- ABOLLO, E., A. RAMILO, S. M. CASAS, P. COMESAÑA, A. CAO, M. J. CARBALLAL and A. VILLALBA, (2008) First detection of the protozoan parasite *Bonamia exitiosa* (Haplosporidia) infecting flat oyster *Ostrea edulis* grown in European waters. *Aquaculture* **274**: 201-207.
- AUDEMARD, C., R. F. LE, A. BARNAUD, C. COLLINS, B. SAUTOUR, P. G. SAURIA, M. X. DE, C. COUSTAU, C. COMBES and F. BERTHE, (2002) Needle in a haystack: involvement of the copepod *Paracartia grani* in the life-cycle of the oyster pathogen *Marteilia refringens*. *Parasitology* **124**: 315-23.
- BERTHE, F. C. J., F. LE ROUX, E. PEYRETAILLADE, P. PEYRET, D. RODRIGUEZ, M. GOUY and C. P. VIVARES, (2000) Phylogenetic analysis of the small subunit ribosomal RNA of *Marteilia refringens* validates the existence of Phylum Paramixea (DESPORTES and PERKINS, 1990). *The Journal of Eukaryotic Microbiology* **47**: 288-293.
- CARNEGIE, R. B., B. J. BARBER, S. C. CULLOTY, A. FIGUERAS and D. L. DISTEL, (2000) Development of a PCR assay for detection of the oyster pathogen *Bonamia ostreae* and support for its inclusion in the *Haplosporidia*. *Diseases of Aquatic Organisms* **42**: 199-206.
- CHARLET, M., S. CHERNYSH, H. PHILIPPE, C. HETRU, J. A. HOFFMANN and P. BULET, (1996) Innate immunity. Isolation of several cysteine-rich antimicrobial peptides from the blood of a mollusc, *Mytilus edulis*. *Journal of Biological Chemistry* **271**: 21808-21813.
- COCHENNEC, N., F. LE ROUX, F. BERTHE and A. GERARD, (2000) Detection of *Bonamia ostreae* based on small subunit ribosomal probe. *Journal of Invertebrate Pathology* **76**: 26-32.
- HINE, P. M., N. COCHENNEC-LAUREAU and F. C. BERTHE, (2001) *Bonamia exitiosus* n. sp. (Haplosporidia) infecting flat oysters *Ostrea chilensis* in New Zealand. *Diseases of Aquatic Organisms* **47(1)**: 63-72.



- KLEEMAN, S. N. and R. D. ADLARD, (2000) Molecular detection of *Marteilia sydneyi*, pathogen of Sydney rock oysters. *Diseases of Aquatic Organisms* **40** (2):137-46.
- KLEEMAN, S. N., F. LE ROUX, F. BERTHE, and R. D. ADLARD, (2002) Specificity of PCR and in situ hybridization assays designed for detection of *Marteilia sydneyi* and *M. refringens*. *Parasitology* **125**: 131-141.
- KORRINGA, P. (1951) De aanval van de parasite *Mytilicola intestinalis* op de Zeeuwse mossel-cultuur. *Visserijnieuws* **7**: 1-7.
- JENNY M. J., R. W. CHAPMAN, A. MANCIA, Y. A. CHEN, D. J. MCKILLEN, H. F. TRENT, P. LANG, J. ESCOUBAS, E. BACHERE, V. BUOLO, Z. J. LIU, P. S. GROSS, C. CUNNINGHAM, P. M. CUPIT, A. TANGUY, X. GUO, D. MORAGA, I. BOUTET, A. HUVET, S. DE GUISE, J. S. ALMEIDA, G. W. WARR, (2007) "A cDNA Microarray for *Crassostrea virginica* and *C. gigas*". *Marine Biotechnology* (NY).
- LAUNEY, S., M. BARRE, A. GERARD and Y. NACIRI-GRAVEN, (2001) Population bottleneck and effective size in *Bonamia ostreae*-resistant populations of *Ostrea edulis* as inferred by microsatellite markers. *Genetic Research* **78**(3): 259-270.
- LE ROUX, F., C. AUDEMARD, A. BARNAUD and F. BERTHE, (1999) DNA Probes as potential tools for the detection of *Marteilia refringens*. *Marine Biotechnology* **1**(6): 588-597.
- LE ROUX, F., G. LORENZO, P. PEYRET, C. AUDEMARD, A. FIGUERAS, C. VIVARES, M. GOUY and F. BERTHE, (2001) Molecular evidence for the existence of two species of *Marteilia* in Europe. *The Journal of Eukaryotic Microbiology* **48**: 449-454.
- LONGSHAW, M., S. W. FEIST, R. A. MATTHEWS and A. FIGUERAS, (2001) Ultrastructural characterisation of *Marteilia* species (Paramyxia) from *Ostrea edulis*, *Mytilus edulis* and *Mytilus galloprovincialis* in Europe. *Diseases of Aquatic Organisms* **44**: 137-142.
- MARSH, A. G., J. D. GAUTHIER, G. R. VASTA, (1995) A semiquantitative PCR assay for assessing *Perkinsus marinus* infections in the eastern oyster, *Crassostrea virginica*. *Journal of Parasitology* **81**(4): 577-583.
- MITTA, G., F. HUBERT, T. NOEL and P. ROCH, (1999) Myticin, a novel cysteine-rich antimicrobial peptide isolated from haemocytes and plasma of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *European Journal of Biochemistry* **265** (1): 71-78.
- MITTA, G., F. HUBERT, E. A. DYRYNDA, P. BOUDRY and P. ROCH, (2000a) Mytilin B and MGD2, two antimicrobial peptides of marine mussels: gene structure and expression analysis. *Developmental and Comparative Immunology* **24** (4): 381-393.

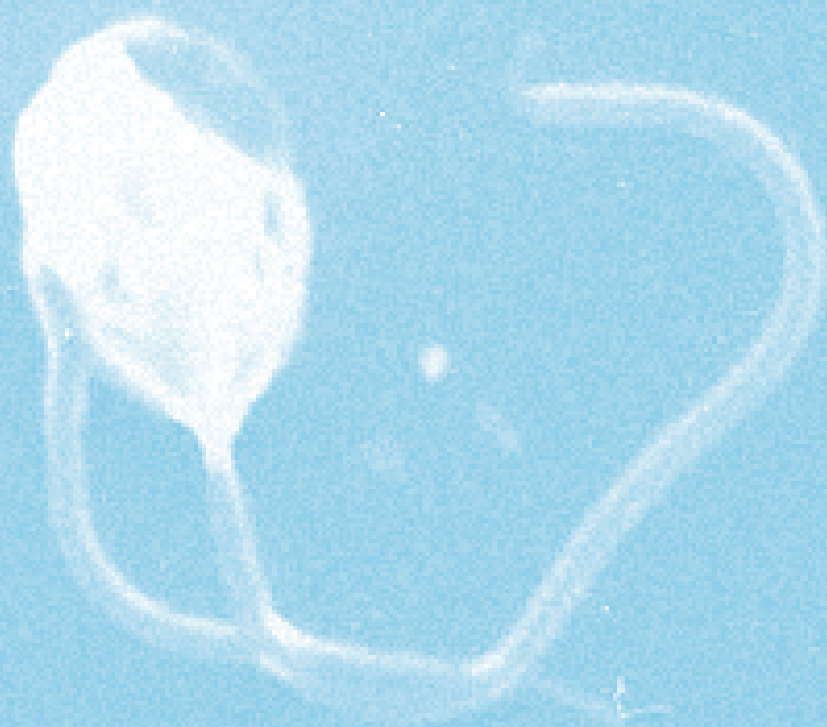


- MITTA, G., F. VANDENBULCKE, F. HUBERT, M. SALZET and P. ROCH, (2000b) Involvement of mytilins in mussel antimicrobial defense. *Journal of Biological Chemistry* **275** (17): 12954-12962.
- MITTA, G., F. VANDENBULCKE, T. NOEL, B. ROMESTAND, J. C. BEAUVILLAIN, M. SALZET, and P. ROCH, (2000c) Differential distribution and defence involvement of antimicrobial peptides in mussel. *Journal of Cell Science* **113**: 2759-2769.
- NOVOA, B., D. POSADA, and A. FIGUERAS, (2004) Polymorphisms in the sequences of *Marteilia* internal transcribed spacer region of the ribosomal RNA genes (ITS-1) in Spain. *Submitted for publication*.
- RENAULT, T., N. A. STOKES, B. CHOLLET, N. COCHENNEC, F. BERTHE, A. GERARD and E. M. BURRESON, (2000) Haplosporidiosis in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* from the French Atlantic coast. *Diseases of Aquatic Organisms* **42**: 207-214.
- ROBLEDO, J. A., C. A. COSS and G. R. VASTA, (2000). Characterization of the ribosomal RNA locus of *Perkinsus atlanticus* and development of a polymerase chain reaction-based diagnostic assay. *Journal of Parasitology* **86** (5): 972-978.
- ROBLEDO, J. A., J. D. GAUTHIER, C. A. COSS, A. C. WRIGHT and G. R. VASTA, (1998) Species-specificity and sensitivity of a PCR-based assay for *Perkinsus marinus* in the eastern oyster, *Crassostrea virginica*: a comparison with the fluid thioglycollate assay. *Journal of Parasitology* **84** (6): 1237-1244.
- STOKES, N. A. and E. M. BURRESON, (1995) A sensitive and specific DNA probe for the oyster pathogen *Haplosporidium nelsoni*. *The Journal of Eukaryotic Microbiology* **42**(4): 350-357.
- STOKES, N. A., M. E. SIDDALL and E. M. BURRESON, (1995) Small subunit ribosomal RNA gene sequence of *Minchinia teredinis* (Haplosporidia: Haplosporidiidae) and a specific DNA probe and PCR primers for its detection. *Journal of Invertebrate Pathology* **65**(3): 300-308.
- VENIER P., C. DE PITTA, A. PALLAVICINI, F. MARSANO, L. VAROTTO, C. ROMUALDI, F. DONDERO, A. VIARENGO, G. LANFRANCHI, (2006) Development of mussel mRNA profiling: Can gene expression trends reveal coastal water pollution? *Mutation Research* **602**(1-2): 121-134.
- YANG, Y. S., G. MITTA, A. CHAVANIEU, B. CALAS, J. F. SÁNCHEZ, P. ROCH, and A. AMUELAS, (2000) Solution structure and activity of the synthetic four-disulfide bond Mediterranean mussel defensin (MGD-1). *Biochemistry* **39**(47): 14436-47.



2

ENFERMEDADES NEOPLÁSICAS EN MOLUSCOS DE INTERÉS COMERCIAL



ENFERMEDADES NEOPLÁSICAS EN MOLUSCOS DE INTERÉS COMERCIAL

Carballal M. J., Iglesias D. y Díaz S.

Centro de Investigacións Mariñas (CIMA). Consellería do Mar.
Pedras de Corón s/n. Vilanova de Arousa, Pontevedra

Resumen

Se han descrito dos tipos de neoplasias epidémicas en los bivalvos marinos de interés comercial: neoplasia diseminada y neoplasia gonadal. La primera consiste en la proliferación de células anormales de origen desconocido que circulan en los tejidos de varios órganos, la segunda consiste en una proliferación de células germinales indiferenciadas. Las neoplasias de bivalvos se ajustan a los criterios de tumores malignos: estructura atípica (células indiferenciadas y pleomórficas), crecimiento rápido e invasivo, abundancia de figuras mitóticas, metástasis, y crecimiento progresivo que resulta en la muerte del individuo afectado. La enfermedad se detecta mediante histología, y en el caso de neoplasias diseminadas también se detecta mediante análisis de frotis de hemolinfa. Para prevenir diagnósticos erróneos se han desarrollado anticuerpos específicos para células neoplásicas que facilitan el reconocimiento de la neoplasia mediante criterios colorimétricos. Basándose en la medida del contenido anormal de ADN de las células neoplásicas mediante citometría de flujo se pueden realizar estimas cuantitativas muy precisas de la proporción de células neoplásicas circulantes. En algunas especies y poblaciones las alteraciones neoplásicas afectan a muy pocos individuos, por el contrario en otras alcanzan niveles epidémicos. En algunas poblaciones parecen detectarse



patrones de variación estacional de la prevalencia, lo que parece estar ligado al efecto de ciertas variables ambientales sobre el curso de la enfermedad. Sobre el origen de la neoplasia de bivalvos hay varias hipótesis, los estudios más recientes señalan un origen multifactorial de las enfermedades neoplásicas, contemplándose como factores implicados: transformaciones carcinogénicas, virus, contaminantes de distinta naturaleza y supresión inmunológica. No obstante, hasta el momento, no han podido aclararse las relaciones existentes entre los mismos.

Abstract

Two types of epidemic neoplastic diseases have been described in marine bivalves of commercial interest: disseminated neoplasia and gonadal neoplasia. The first involves the proliferation of abnormal cells with unknown origin infiltrating the connective tissue of various organs, the second consist in a proliferation of undifferentiated germinal cells. The bivalve neoplasias fit the criteria of malignant tumours: pleomorphic and undifferentiated cells, rapid and invasive growth, abundance of mitotic figures, metastasis and progressive growth resulting in the death of the affected individual. The disease is detected by histology and also by hemolymph smears in disseminated neoplasia. Specific antibodies for neoplastic cells have been developed and used for improving diagnosis. Another diagnosis technique is based in the measure of DNA abnormal contain of neoplastic cells by flow cytometry. In some of the species and populations the neoplastic disorders affected only a few individuals, and in others get epidemic levels. There are several hypothesis of bivalve neoplastic origin. The most recent studies indicated a multifactor origin of these diseases, with several factors implicated: genetic alterations, virus, contaminants and immune depression.

1. INTRODUCCIÓN

La neoplasia es una alteración del crecimiento caracterizada por la proliferación excesiva y anormal de células, de manera independiente del patrón normal de crecimiento definido por los mecanismos reguladores del organismo, y que persiste aún después de finalizado el estímulo que originó el crecimiento (SPARKS 1985). Desde finales de



los años 60 han sido numerosas las citas de dos tipos principales de neoplasia que afectan a moluscos bivalvos marinos a lo largo de todo el mundo: neoplasia diseminada y neoplasia gonadal (ELSTON *et al.* 1992; LANDSBERG 1996; BARBER 2004). La neoplasia diseminada consiste en la proliferación de células anormales de origen desconocido que circulan en los tejidos. La neoplasia gonadal consiste en una proliferación de células germinales indiferenciadas (BARBER 2004). Se han documentado también otros tipos de neoplasia –como la neoplasia branquial descrita en *Macoma balthica* (CHRISTENSEN *et al.* 1974; FARLEY 1976)– que debido a su alta capacidad invasiva fueron frecuentemente confundidos con la neoplasia diseminada (LANDSBERG 1996). El primer registro de neoplasia diseminada en bivalvos fue descrito por FARLEY en 1969a, en las ostras *Crassostrea virginica* y *Crassostrea gigas*, posteriormente se ha descrito en más de 15 especies de bivalvos marinos de 4 continentes y de todos los océanos excepto el Antártico (PETERS 1988) (Fig. 1). En algunas especies y poblaciones la enfermedad se detecta en muy pocos individuos, por el contrario en otras alcanza niveles epidémicos. Las especies más afectadas son *Mytilus trossulus*, *Cerastoderma edule* y *Mya arenaria*. Hay numerosos estudios de neoplasia en estas especies que registran prevalencias altas (20 a 60%) de neoplasia diseminada asociadas con mortandades importantes (ELSTON *et al.* 1992). En Galicia (NW España), se registraron niveles epidémicos de neoplasia en ostra plana *Ostrea edulis* (ALDERMAN *et al.* 1977; DA SILVA 2005a) y en el berberecho *Cerastoderma edule* (VILLALBA *et al.* 2001; CARBALLAL *et al.* 2001; IGLESIAS 2006), que fueron asociados con mortandades. Recientemente, se ha descrito una neoplasia diseminada que afecta a la almeja bicuda *Paphia aurea* y que también alcanza niveles epidémicos (IGLESIAS *et al.* 2007).

La neoplasia gonadal o germinoma fue descrita por primera vez en la almeja *Mercenaria mercenaria* por YEVICH y BARRY (1969), y posteriormente en *Mya arenaria* (BROWN *et al.* 1977). Es, en estas dos especies, donde alcanza niveles epidémicos aunque se ha descrito en 14 especies de bivalvos (PETERS *et al.* 1994). Posteriormente, se han descrito neoplasias gonadales en mejillones *Mytilus galloprovincialis* (ALONSO *et al.* 2001) y navajas *Ensis arcuatus* (DARRIBA *et al.* 2006) de las rías gallegas (Fig. 1).

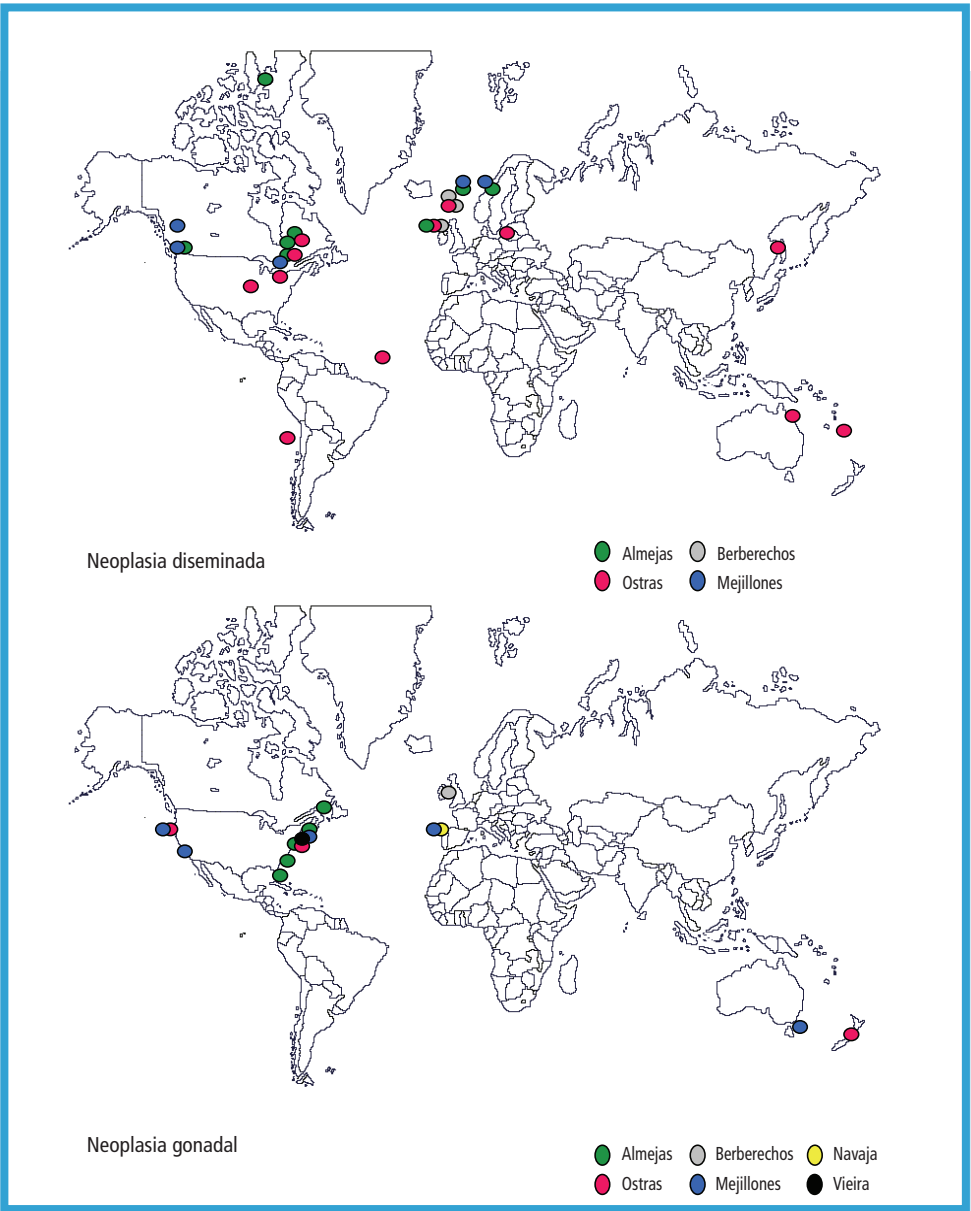


FIGURA 1.

Distribución geográfica de las enfermedades neoplásicas que afectan a los moluscos bivalvos.



2. DIAGNOSIS

2.1. Características de las células neoplásicas

Las neoplasias diseminadas que se han descrito en almejas, ostras y mejillones presentan características citológicas y patológicas similares (ELSTON *et al.* 1992). Las células neoplásicas son redondeadas u ovaladas, de tamaño grande y con una relación núcleo citoplasma elevada, con núcleos de contorno irregular que contienen nucléolos patentes y con una alta frecuencia de figuras mitóticas. Estas células proliferan en los espacios abiertos del sistema vascular, siendo muy evidentes en los vasos de la hemolinfa y los espacios del tejido conjuntivo de diferentes órganos del manto y la masa visceral (Fig. 2-3). En preparaciones húmedas las células neoplásicas muestran ausencia de pseudópodos (PETERS 1988; ELSTON *et al.* 1992). Sus características ultraestructurales son también similares en las diferentes especies de bivalvos afectadas. Las células neoplásicas son anaplásicas y con características parecidas a las de las células tumorales de vertebrados. Los núcleos son grandes y polimórficos y contienen uno o más nucléolos; en los citoplasmas se observan mitocondrias generalmente hinchadas, vesículas y estructuras multivesiculares que se asemejan a vainas de mielina y en algunos

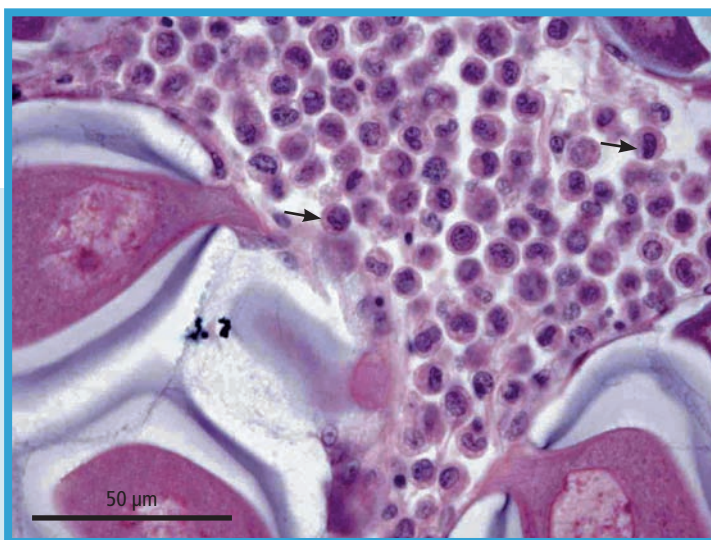


FIGURA 2.
Sección histológica de berberecho, *Cerastoderma edule*, en la que se observa la proliferación de células neoplásicas (flechas) en el tejido conjuntivo de la gónada.

casos aparatos de Golgi alterados (Fig. 4) (FARLEY 1976; MIX *et al.* 1979; AUFFRET y PODER 1986). Se ha descrito la existencia de dos tipos morfológicos de células neoplásicas en varias especies de moluscos bivalvos: *M. edulis* (LOWE y MOORE 1978; MOORE *et al.* 1991), *M. arenaria* (BROWN *et al.* 1979), *Ostreola conchaphila* (MIX 1975) y *Cerastoderma edule* (CARBALLAL *et al.* 2001). Esto puede responder a la existencia de diferentes estadios de desarrollo celular dentro de una misma línea de células neoplásicas o bien a la existencia de líneas celulares diferentes (ELSTON *et al.* 1992).

FIGURA 3.
Sección histológica de
berberecho, *Cerastoderma*
edule, en la que se observa
la proliferación de células
neoplásicas (flechas) en los
filamentos branquiales.

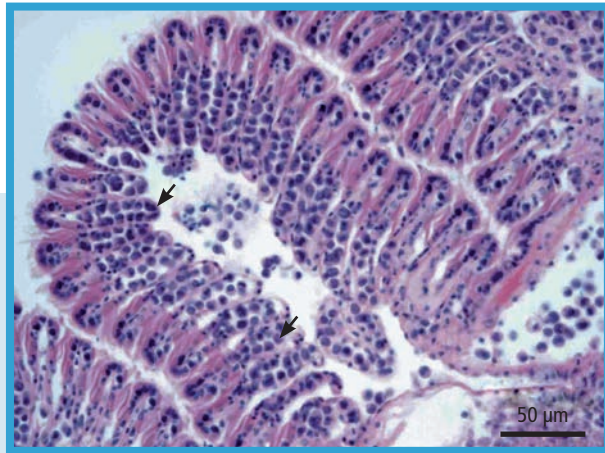
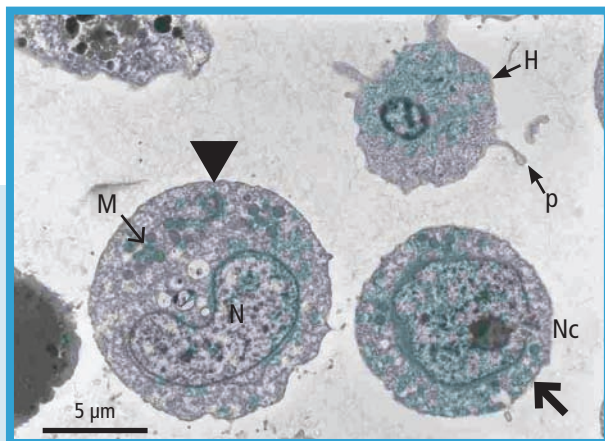


FIGURA 4.
Imagen de microscopía
electrónica de transmisión
de hemocitos y células
neoplásicas de berberecho
Cerastoderma edule.





Las neoplasias gonadales son los segundos tumores más diagnosticados en moluscos bivalvos (Mix, 1986) (Fig. 5). Se clasifican en 3 tipos en función de sus características histológicas. El tipo mayoritario tiene su origen en las células germinales; los otros dos tipos son muy escasos y tienen su origen en el estroma o en el estroma y las células germinales a la vez (PETERS *et al.* 1994). Los tumores de la gónada se han detectado muy raras veces en ostras *Crassostrea virginica*, almejas *Arctica islandica*, vieiras *Argopecten irradians* y mejillones *Mytilus edulis* (FARLEY 1976; HARSHBARGER *et al.* 1979; GARDNER *et al.* 1991; PETERS *et al.* 1994). Por el contrario, se han detectado epidemias de germinomas en almejas *Mercenaria* spp. y *Mya arenaria* (PETERS *et al.* 1994). Los tumores de *Mercenaria* spp. se caracterizan por el reemplazamiento del epitelio germinal normal por grandes células poliédricas que contienen núcleos vesiculares y un citoplasma rosado. Muchas de estas células tienen cromatina marginal y un nucleolo acidófilo y prominente (HESSELMAN *et al.* 1988). Los germinomas observados en *Mya arenaria* consisten en células indiferenciadas pequeñas y basófilas que proliferan y no maduran, su núcleo es excéntrico y el nucleolo es difícil de distinguir entre los abundantes acúmulos de cromatina (BROWN *et al.* 1977). En ambas especies, las células neoplásicas aparecen inicialmen-

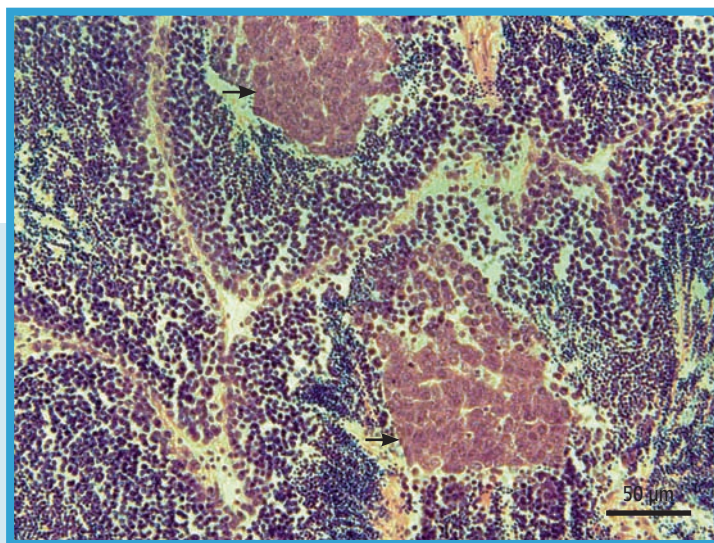


FIGURA 5.

Sección histológica de la gónada de la navaja, *Ensis arcuatus*. Células neoplásicas (flechas) dentro del folículo de un macho (Fotografía de la Dra. Carmen López).



te en pequeños focos en uno o más folículos gonadales, se multiplican y llenan la mayoría o todos los folículos, y pueden invadir el tejido conectivo interfolicular, la pared del cuerpo, la cámara epibranquial y los conductos genitales (BARBER 2004). En las neoplasias gonadales también se observan células en mitosis aunque no tan frecuentemente como en las neoplasias diseminadas (BARRY y YEVICH 1972; HESSELMAN *et al.* 1988). Todas estas características hacen que los germinomas se consideren malignos. HESSELMAN *et al.* (1988) estudian las características ultraestructurales de las células neoplásicas de *Mercenaria* spp., y las describen como células con características inmaduras como la escasa presencia de retículo endoplásmico rugoso y aparatos de Golgi. Destacan la presencia de desmosomas en la membrana celular y la extrema marginación de la cromatina en la mayoría de estas células, lo que piensan puede ser un estado terminal ya que muchas de ellas están en cariólisis. Las inclusiones rojizas intranucleares observadas en microscopía óptica que en un principio se pensaron que podrían ser inclusiones virales (FARLEY 1978) fueron identificadas como una sustancia granular aureolada dentro del núcleo, sin observarse partículas virales ni en el núcleo ni en el citoplasma.

Una característica general de las células neoplásicas de moluscos bivalvos es un aumento de la actividad mitótica y un incremento del contenido de ADN nuclear. Basándose en la cuantificación de ácido desoxirribonucleico se han desarrollado protocolos para la diagnosis de esta alteración celular. LOWE y MOORE (1978) fueron los primeros en cuantificar el ADN de células neoplásicas de *Mytilus edulis*. Encontraron dos tipos de células neoplásicas según su contenido de ADN. El grupo mayoritario de las células atípicas poseía 3,8–4,3 veces el contenido de ADN de una célula diploide de un mejillón sano; en el segundo tipo el contenido de ADN era de 6,8–7,1 veces mayor que el diploide. Estas variaciones de ploidía se correspondían con variaciones morfológicas. En estudios sucesivos de contenido de ADN de *Mytilus* sp. neoplásicos se detectaron individuos triploides (3n) (BOWER 1989). ELSTON *et al.* (1990) en *Mytilus edulis* describen un patrón de desarrollo de la enfermedad donde sugieren la aparición de una población de células hiperdiploides ($>2n$) a intensidades bajas de la enfermedad y que, con el progreso de la enfermedad, sustituirán a las células nor-



males apareciendo también células pentaploides (5n). En las etapas avanzadas de la enfermedad disminuye el número de células hiperdiploide ($>2n$), aumentando las células pentaploides (5n) y apareciendo también células decaploides (10n). Se observó que el aumento secuencial de contenido de ADN se correspondía con cambios morfológicos celulares. En un estudio detallado de 79 mejillones neoplásicos se describen dos tipos de neoplasia diseminada con diferentes niveles de ploidía para la fase G_0/G_1 del ciclo celular. Un tipo «A» con células pentaploides (5n) y un tipo «B» con células tetraploides (4n) y sus correspondientes ploidías de la fase G_2/M (10n y 8n respectivamente). Un 66% de los mejillones neoplásicos eran del tipo «A», mientras que sólo un 29% eran de tipo «B». El 5% restante correspondía a mejillones que presentaban ambas ploidías. ELSTON *et al.* (1990) tan solo habían detectado la neoplasia de mayor prevalencia.

FISHER y FORD (1988), en un artículo sobre investigación de patologías en bivalvos mediante citometría de flujo, recogen datos de un estudio no publicado de Fisher sobre el contenido de ADN de las células neoplásicas de *Mya arenaria*. Determinan que las células neoplásicas de la almeja son aneuploides, tienen mayor cantidad de ADN que los hemocitos pero no en un múltiplo exacto del contenido diploide. RENO *et al.* (1994) determinan que la ploidía de estas células neoplásicas es superior a triploide (3n) pero inferior a tetraploide (4n). SMOLARZ *et al.* (2005 a,b) detectaron que las células neoplásicas de *Macoma balthica* son hipodiploides y al igual que en las células normales se detecta su fase G_2/M del ciclo celular. Los autores definieron tres etapas de neoplasia a partir de dos parámetros: porcentaje de células en fase G_2/M y el ratio entre la media de valores de fluorescencia de las dos poblaciones celulares.

COLLINS (1998) cuantifica el ADN de berberechos neoplásicos *Cerastoderma edule*, de Irlanda y distingue células: hipodiploides ($<2n$), hiperdiploides ($>2n$), triploides (3n), tetraploides (4n), pentaploides (5n), hexaploides (6n) y en número menos significativo; octaploides (8n), decaploides (10n), dodecaploides (12n), pentadecaploide (15n) y heptadecaploide (17n). Las células neoplásicas más frecuentes eran las pentaploides (5n). Collins expone un desarrollo de la enfermedad similar al descrito por ELSTON *et al.* (1990) en mejillones. DA SILVA *et al.* (2005b) utilizando la



técnica puesta a punto por COLLINS (1998) analiza berberechos neoplásicos de Galicia obteniendo valores de ploidía similares a los encontrados en berberechos de Irlanda. Los berberechos diagnosticados con una intensidad baja de neoplasia eran hipodiploides ($<2n$) o hiperdiploides ($>2n$), mientras que en los berberechos con elevada intensidad de neoplasia se detectaron células triploides ($3n$) y pentaploides ($5n$). En estudios posteriores de berberechos gallegos se detectaron poblaciones significativas de células neoplásicas tetraploides ($4n$), heptaploides ($7n$) y octaploides ($8n$) además de las descritas anteriormente (DÍAZ *et al.* 2005).

Le Grand *et al.* (2010) estudian berberechos neoplásicos de Arca-chon y registran valores de ploidia entre $1.6n$ y $9.6n$.

2.2. Diagnóstico mediante histología y hemocitología

La neoplasia diseminada no resulta reconocible mediante un examen externo de los especímenes (FARLEY 1969a; BROWN *et al.* 1977). Las primeras citas sobre moluscos bivalvos afectados por neoplasia corresponden a diagnósticos efectuados mediante el análisis de cortes histológicos realizados a partir de tejidos fijados del organismo (FARLEY 1969a, b; YEVICH y BARSZCZ 1976). La histología proporciona un marco de referencia para comparar los tejidos afectados con respecto a los sanos; además las células anormales en circulación pueden ser estudiadas en el contexto de los tejidos circundantes (grado de desarrollo gonadal, presencia de otros parásitos y patologías). Esta técnica también proporciona información de la progresión de la enfermedad (gravedad, intensidad) en relación con los distintos tejidos. Destaca, por ejemplo, la escala de intensidad de neoplasia propuesta por MIX (1983) para mejillones, que asigna 4 niveles de severidad de la enfermedad basándose en el número de células neoplásicas observadas y los tejidos y órganos afectados. El examen de preparaciones histológicas permite también la observación de procesos tales como la remisión de la enfermedad, caracterizado por la destrucción de las células neoplásicas y la formación de una matriz constituida por material fibroso extracelular y hemocitos (ELSTON *et al.* 1988a; IGLESIAS 2006). Las principales desventajas de la histología son su precio relativamente elevado y el tiempo consumido en su procesamiento. Este método es todavía el principal método de diagnóstico de la neoplasia diseminada, aunque se han desarrollado técnicas clínicas no



letales que permiten un seguimiento de la evolución temporal de la enfermedad (PETERS 1988). Entre estas técnicas destacan las basadas en el examen directo de la hemolinfa y sus componentes celulares, denominadas inicialmente «histocitológicas» por FARLEY *et al.* (1986), y «hemocitológicas» en revisiones posteriores (PETERS 1988; ELSTON *et al.* 1992) (Fig. 6). La intensidad de la enfermedad en el caso de estas técnicas se puede cuantificar, por ejemplo, en niveles definidos basándose en el número de células neoplásicas contabilizadas por mililitro de hemolinfa (COOPER *et al.* 1982b) o en la proporción de células neoplásicas con respecto al número de hemocitos normales (FARLEY *et al.* 1986; BARBER 1990; BROUSSEAU y BAGLIVO 1991a, b). Existe cierto desacuerdo en cuanto a qué técnica es más precisa a la hora de detectar la neoplasia. COOPER *et al.* (1982b) encuentran que la hemocitología revela sólo entre un 61 y un 71% de los casos de nivel 1 (ligeros) diagnosticados mediante histología, mientras que FARLEY *et al.* (1986) describen la hemocitología como más sensible que la histología detectando casos tempranos. En la práctica la sensibilidad del examen histológico y hemocitológico es función de la proporción de tejido y de hemolinfa examinado (ELSTON *et al.* 1992; BARBER 2004).

En lo que respecta a la neoplasia gonadal, el diagnóstico de la enfermedad depende del análisis histopatológico de los tejidos de los

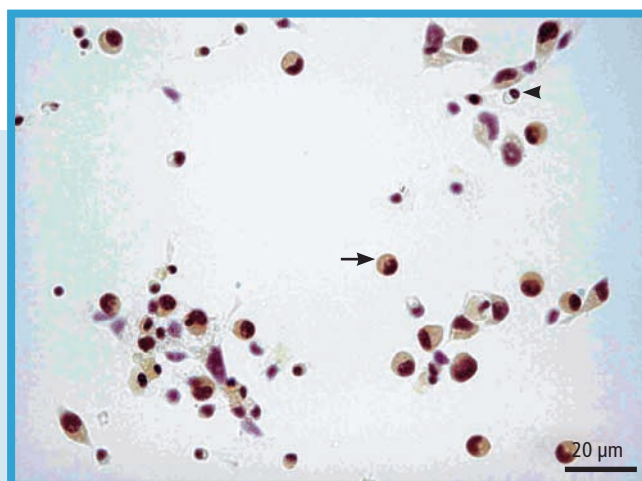


FIGURA 6.

Frotis de células de hemolinfa de berberecho, *Cerastoderma edule*, realizado mediante adhesión celular sobre portaobjetos tratados con poli-L-lisina y tinción con el reactivo de Schiff. Hemocitos (◄); células neoplásicas (flecha).



moluscos, ya que el hecho de que este tipo de alteración afecte a las células germinales y no se evidencie en el sistema circulatorio determina que las técnicas hemocitológicas no resulten válidas (BARBER 2004). Para el caso de *Mya arenaria* se ha definido una escala que diferencia 3 niveles de severidad de la enfermedad basada en el porcentaje de folículos gonadales afectados, a la desorganización tisular producida y a la apreciación de invasividad en nuevos tejidos (BARBER 1996; BARBER *et al.* 2002). Para *Mercenaria* spp. la gravedad de la neoplasia gonadal se clasifica en 4 niveles según el porcentaje de folículos que contienen células neoplásicas (BERT *et al.* 1993).

2.3. Diagnóstico mediante anticuerpos

Normalmente cuando la neoplasia diseminada es muy intensa la diagnosis mediante métodos basados en la morfología celular resulta sencilla, siendo mucho más compleja en estadios iniciales de desarrollo de la enfermedad, ya que implica la identificación de células raras distribuidas focalmente y que aún no presentan las características típicas de anaplasia celular propias de las células neoplásicas (SMOLOWITZ *et al.* 1989). Así, diagnósticos falso-negativos debido a estas células pueden tener lugar con cualquiera de las técnicas basadas en la morfología celular (ELSTON *et al.* 1992). Para solucionar estos casos de diagnosis compleja se implementó el desarrollo de anticuerpos específicos para células neoplásicas, normalmente unidos a técnicas de inmunohistoquímica que permiten criterios de diagnóstico colorimétricos. REINISCH *et al.* (1983) desarrollaron los primeros anticuerpos monoclonales específicos de células neoplásicas de *Mya arenaria*, conseguidos mediante la inoculación de hemolinfa de almejas diagnosticadas con una alta intensidad de neoplasia diseminada en ratones. Estos anticuerpos detectan antígenos en la superficie de las células neoplásicas que no se encuentran en los hemocitos. En 1986, SMOLOWITZ y REINISCH desarrollan otro anticuerpo específico de células neoplásicas de *Mya arenaria* y MIOSKY *et al.* (1989) describen un nuevo anticuerpo monoclonal para las células circulantes anómalas de este bivalvo, IEII. Estos autores realizaron electroforesis e inmunodetección y detectaron que el anticuerpo IEII reaccionaba específicamente con una proteína de 200 kDa de la membrana celular. A partir de este anticuerpo monoclonal se realizó un clon, el 1E10, que



fue utilizado por BARKER *et al.* (1997), MCGLADDERY *et al.* (2001) y STEPHENS *et al.* (2001) para la diagnosis de almejas *Mya arenaria* neoplásicas. Para complementar la diagnosis de almejas neoplásicas STEPHENS *et al.* (2001) utilizan otro anticuerpo monoclonal complementario, 2A4 específico para hemocitos normales (WHITE *et al.* 1993).

NÖEL *et al.* (1991) crea anticuerpos monoclonales específicos para células neoplásicas de *Mytilus*. Al obtener una fuerte reacción con *Mytilus edulis* y *Mytilus trossulus* de Estados Unidos y no obtener reacción con mejillones de la costa atlántica Europea, excepto con un individuo original de la costa Francesa (Marennes-Oléron), plantea la hipótesis de al menos dos posibles orígenes de la neoplasia en mejillones. El anticuerpo monoclonal 1E10 generado con células neoplásicas de *Mya arenaria* se probó mediante microscopía confocal con hemolinfa de *Mytilus edulis* y *Mytilus trossulus* procedentes de Canadá, obteniéndose reacciones específicas con las células neoplásicas de los mejillones (ST-JEAN *et al.* 2005). Esto confirma la existencia de un antígeno común y específico de células neoplásicas de *Mytilus edulis*, *Mytilus trossulus* y *Mya arenaria* del norte de América.

2.4. Diagnosis mediante citometría de flujo

Otra técnica diagnóstica de neoplasia se basa en la medida del contenido de ADN en muestras de hemolinfa mediante citometría de flujo. Puesto que la dotación de ADN en las células neoplásicas es claramente superior a la de los hemocitos normales (LOWE y MOORE 1978), la citometría de flujo proporciona estimas cuantitativas muy precisas de la proporción de células normales y neoplásicas (ELSTON *et al.* 1990; ELSTON *et al.* 1992; SMOLARZ *et al.* 2005a, b; DÍAZ *et al.* 2005; DA SILVA *et al.* 2005b). Entre los inconvenientes de esta técnica se encuentra el elevado coste de los equipos y que la sensibilidad del método es menor que las técnicas histológicas y hemocitológicas en casos de bajos niveles de intensidad de neoplasia (MOORE *et al.* 1991).

3. EPIDEMIOLOGÍA

La epidemiología se centra en el proceso de la enfermedad a nivel poblacional. Los estudios epidemiológicos contemplan la distribución,



abundancia e incidencia de las enfermedades; así como otros aspectos relacionados con la extensión de las mismas, como son la influencia de los factores ambientales y las interacciones entre agente causal y hospedador (KINNE 1980). Los resultados de este tipo de estudios son fundamentales en el desarrollo de métodos para el control y la prevención de enfermedades en el ámbito de la maricultura (McVICAR 1990).

3.1. Especies afectadas, prevalencia y mortalidad

Como ya se mencionó anteriormente, a escala mundial se han descrito casos de neoplasia diseminada en al menos 15 especies de moluscos bivalvos. La comparación de los datos de prevalencia entre diferentes citas es difícil debido a que no existe una estandarización en los procedimientos de diagnóstico (ELSTON *et al.* 1992); sin embargo, ELSTON *et al.* (1992) establecen una prevalencia mínima del 5% para que se considere que la neoplasia diseminada alcanza niveles epidémicos en la población.

Aunque el establecimiento de relaciones causa-efecto entre la detección de signos de enfermedad y mortalidad en poblaciones naturales de moluscos bivalvos resulta muy difícil, existen estudios que responsabilizan a las enfermedades de tipo neoplásico de originar mortalidad en especies de moluscos de interés comercial (ELSTON *et al.* 1992; BARBER 2004). Desde el momento en que la neoplasia diseminada puede causar mortalidad, son de prever impactos potenciales sobre las poblaciones de bivalvos que presentan prevalencias elevadas de la enfermedad (BARBER 1990). De entre las especies de moluscos bivalvos, que presentan habitualmente niveles epidémicos de neoplasia diseminada, cabe destacar por su importancia comercial: las almejas *Mya arenaria* y *Macoma balthica*, habiéndose descrito prevalencias y tasas de mortalidad elevadas en ambas especies (ELSTON *et al.* 1992; PEKKARINEN 1993; BARBER 2004; SMOLARZ *et al.* 2005b, c); berberechos *Cerastoderma edule*, con prevalencias altas de neoplasia diseminada en poblaciones de la Bretaña francesa (PODER y AUFFRET 1986), del sur de Irlanda (TWOMEY y MULCAHY 1988a) y, más recientemente, en la práctica totalidad de los bancos más productivos de la costa gallega (CARBALLAL *et al.* 2001); mejillones *Mytilus trossulus* de la Columbia Británica y de



Yaquina Bay, en Oregón, Estados Unidos (ELSTON *et al.* 1992); y ostra plana *Ostrea edulis* cultivada en la costa gallega (ALDERMAN *et al.* 1977).

3.2. Variaciones estacionales. Factores ambientales

En la mayor parte de los estudios epidemiológicos realizados se han documentado variaciones estacionales en la prevalencia de la neoplasia diseminada. Sin embargo, debido a la enorme variabilidad existente en las condiciones ambientales entre distintas zonas geográficas, resulta muy difícil, sino imposible, obtener correlaciones extrapolables a nivel general. Así, para el caso de *Mya arenaria* parece existir un cierto patrón común en el que la enfermedad puede ocurrir durante todo el año pero alcanzando prevalencias mayores durante los meses fríos (desde octubre hasta abril). Como *Mya arenaria* desova en primavera y otoño, los máximos de prevalencia invernales podrían estar asociados a un incremento en la supervivencia de los individuos afectados ya que el invierno constituye un período de reducido estrés térmico y reproductivo. En el caso de *Mytilus trossulus*, MIX (1983) describió un incremento en la prevalencia de neoplasia diseminada en Yaquina Bay (Oregón) en el período final de otoño-invierno. Este patrón fue consistente durante 5 años de seguimiento, destacando además que la enfermedad no desapareció de la población en ningún momento del año. COSSON-MANNEVY *et al.* (1984) estudiando tres poblaciones de *M. trossulus* del sur de la Isla de Vancouver, encontraron que existían diferencias en los máximos de prevalencia entre diferentes localizaciones, de manera que el máximo se dio en junio en una de las poblaciones y en diciembre en las otras dos. En el berberecho *Cerastoderma edule* se detectan prevalencias elevadas de neoplasia durante todos los meses del año, aunque parece existir un patrón que determina la existencia de un máximo de prevalencia en la primavera tardía-inicio de verano, probablemente relacionado con el debilitamiento asociado a la liberación de los gametos, y otro pico a finales de otoño-inicio del invierno (TWOMEY y MULCAHY 1988a; IGLESIAS, 2006). Las prevalencias mayores de neoplasia en la ostra plana *Ostrea edulis* se han descrito en los meses más cálidos del año: de junio a septiembre, en el caso de Galicia (ALDERMAN *et al.* 1977) y de julio a octubre en la Bretaña francesa (BALOUET *et al.* 1986).

Las variaciones de la prevalencia de neoplasia, en los patrones estacionales observados por diferentes autores, pueden ser explicadas por la combinación de factores como la adquisición de la enfermedad por nuevos individuos, la remisión en ciertos animales y, fundamentalmente, por la muerte de los organismos afectados (COOPER *et al.* 1982a; TWOMEY y MULCAHY 1988a; BARBER 1990; ELSTON *et al.* 1992). La correlación entre las variables ambientales y la dinámica temporal de la prevalencia de la enfermedad vendrá dada por la influencia de dichas variables en las tres posibles vías de evolución de la enfermedad. Entre los diferentes factores ambientales sugeridos en la bibliografía destacan: la temperatura, que podría influir en la disponibilidad y/o actividad de un agente etiológico (como podría ser un virus), así como sobre la capacidad de defensa del hospedador (TWOMEY y MULCAHY 1988a; BARBER 1990); la salinidad, de tal forma que valores extremadamente bajos de salinidad parece que pueden constituir un factor adicional de estrés y ejercer un papel indirecto en el incremento de la prevalencia (MIX 1983; BARBER 1990); y las elevadas densidades de población que, junto con tasas bajas de hidrodinamismo (circulación de agua), se han relacionado con prevalencias elevadas de neoplasia, lo que refuerza la hipótesis de un agente infeccioso como agente causal de la neoplasia (BROOKS y ELSTON 1991). A nivel fisiológico los fenómenos reproductivos asociados a la síntesis y la liberación de gametos constituyen importantes factores de debilitamiento en moluscos bivalvos; en este sentido se han registrado incrementos importantes en la prevalencia de neoplasia diseminada de forma coincidente con el período de puesta (COOPER *et al.* 1982a; BALOUET *et al.* 1986; TWOMEY y MULCAHY 1988a; IGLESIAS 2006).

3.3. Relación con la talla/edad y con el sexo

Con respecto al desarrollo de neoplasia diseminada en función de la clase de talla/edad, resulta difícil establecer un patrón general común para especies y zonas geográficas diferentes. A modo de ejemplo, en el caso de berberechos *Cerastoderma edule* de Galicia, la prevalencia de la enfermedad fue claramente mayor en los individuos adultos (1-2 años de edad) de talla comercial que en los berberechos juveniles correspondientes a reclutamientos recientes (IGLESIAS 2006).



En berberechos de Irlanda, TWOMEY y MULCAHY (1988a) describen una mayor prevalencia de neoplasia diseminada entre berberechos de talla menor (en especial machos) con respecto a berberechos mayores. Cabe puntualizar, sin embargo, que el rango de tallas que dichos autores consideraban como pequeños estaba entre 28 y 30 mm; talla que en Galicia es la mínima de explotación comercial y que se considera ya adulta. BALOUET *et al.* (1986), en un estudio de 6 años de seguimiento de neoplasia diseminada en ostras *Ostrea edulis* de la Bretaña francesa, describen una prevalencia mayor de la enfermedad en ostras de más de 30 meses de edad y concluyen que el proceso de envejecimiento está relacionado con un incremento en la prevalencia de la enfermedad. BOWER (1989) llega a la misma conclusión en base a estudios de la prevalencia de neoplasia en *Mytilus edulis* de la Columbia Británica en Canadá. Sin embargo, BROOKS y ELSTON (1991) citan una mayor susceptibilidad a la neoplasia en mejillones *Mytilus edulis* del primer año de vida, comparados con mejillones de 2-3 años de edad. ELSTON *et al.* (1992) en su revisión sobre neoplasia diseminada consideran la relación entre neoplasia y senescencia más hipotética que conclusiva y argumentan que existen abundantes observaciones en el medio natural que apoyan el rechazo de dicha hipótesis.

En *Mya arenaria* algunos autores (COOPER *et al.* 1982a; APPELDOORN *et al.* 1984) describen una mayor prevalencia de neoplasia en *M. arenaria* adultas que en almejas juveniles. WEINBERG *et al.* (1997) encuentran igualmente una menor prevalencia de neoplasia en las clases de talla de *M. arenaria* de menor tamaño, así como una menor mortalidad en dicho grupo con respecto a almejas de talla mayor. Otros autores citan las mayores prevalencias de neoplasia diseminada entre almejas *M. arenaria* de rangos de talla/edad concretos (LEAVITT *et al.* 1990 ; POTTS 1996). Éstas parecen sufrir una mortalidad diferencial en función de la talla, lo que puede alterar la distribución de tallas en las poblaciones naturales de *M. arenaria* afectadas. En el caso de neoplasia gonadal de *M. arenaria* de zonas afectadas por vertidos de hidrocarburos no se encuentra relación entre la edad y la susceptibilidad a la neoplasia (YEVICH y BARSZCZ, 1977).

En lo que se refiere a la incidencia de la neoplasia diseminada en función del sexo, BROWN *et al.* (1979) examinan la relación existente

entre sexo y susceptibilidad a neoplasia en *Mya arenaria* sin encontrar diferencias significativas entre machos y hembras. COSSON-MANNEVY *et al.* (1984) tampoco encuentran asociación alguna entre la caracterización sexual y la susceptibilidad a una neoplasia hemocitaria de *Mytilus edulis*. TWOMEY y MULCAHY (1988a) establecen para una neoplasia diseminada en berberechos de Irlanda una mayor incidencia en hembras que en machos, si bien la diferencia se situó muy cerca del límite de significación estadística. En el caso de berberechos de Galicia, IGLESIAS (2006) encuentra que la neoplasia diseminada afecta por igual a machos y hembras, siendo significativamente mayor el porcentaje de individuos afectados por la neoplasia entre aquellos de sexo indeterminado. BROUSSEAU y BAGLIVO (1994) encuentran para tres poblaciones distintas de *Mya arenaria* una menor prevalencia de neoplasia diseminada en hembras que en machos. POTTS (1996) no encuentra diferencias entre machos y hembras en la prevalencia de una neoplasia hemocitaria que afecta a *Mya arenaria* de Chesapeake Bay.

En relación a la incidencia de la neoplasia gonadal en función del sexo parece que, tanto en *Mya arenaria* como en *Mercenaria* spp., normalmente la prevalencia es mayor en hembras que en machos (BARBER 2004).

3.4. Efectos subletales: condición fisiológica y gonadal

Los índices de condición pueden ser utilizados para evaluar disminuciones en la condición fisiológica (FARLEY 1977). En este aspecto, varios trabajos han documentado disminuciones progresivas en el peso seco de los tejidos y en el índice de condición conforme se incrementaba la severidad de neoplasia diseminada en almejas *Mya arenaria* afectadas (BROWN *et al.* 1979; APPELDOORN *et al.* 1984; LEAVITT *et al.* 1990). Estos resultados concordaban con observaciones previas que citaban una apariencia acuosa y demacrada de los tejidos (FARLEY y SPARKS 1969), una recesión del manto y una coloración pálida de la glándula digestiva (FARLEY 1969b) en bivalvos con estados avanzados de neoplasia. El daño estructural de los órganos, producido por la progresión de la neoplasia cuando ésta alcanza niveles de intensidad elevados, provoca una interrupción en el funcionamiento normal de los mismos y un perjuicio en los procesos metabólicos asociados (LEAVITT *et al.* 1990).



Con respecto al impacto de la neoplasia en el desarrollo gameto-génico, FARLEY (1969b) destacaba que la gametogénesis en mejillones *Mytilus edulis* de Yaquina Bay, Oregón, se detenía en individuos afectados por niveles «extensivos» de diseminación de células atípicas, mientras que en mejillones con lesiones localizadas la gametogénesis no resultaba afectada. COSSON-MANNEVY *et al.* (1984), por el contrario, no encuentran un efecto claro de la neoplasia sobre el desarrollo gonadal de *Mytilus edulis* de Vancouver, Canadá. ELSTON *et al.* (1992) describen neoplasia asociada con un retraso de la gametogénesis, en *Mytilus edulis* de la costa oeste de los Estados Unidos, durante períodos de bajo suministro de alimento en el medioambiente pero no durante momentos de alimento abundante. Esto sugiere que el reparto energético favorece a las células neoplásicas sobre los gametos cuando el alimento es un factor limitante. Se han descrito casos de disminución en el índice de condición gonadal en individuos juveniles de *Crassostrea virginica* afectados por neoplasia diseminada (FORD *et al.* 1997) así como una disminución en la fecundidad de una población de *Mya arenaria* afectada por altas prevalencias de una neoplasia gonadal (BARBER 1996). IGLESIAS (2006) encuentra que un porcentaje elevado de berberechos *Cerastoderma edule* de Galicia afectados por neoplasias diseminadas intensas presentaban sus gónadas en reposo o reabsorción en comparación con individuos sanos.

4. ONTOGENIA Y ETIOLOGÍA

4.1. Ontogenia

Los tejidos de los que se derivan las neoplasias diseminadas de bivalvos son desconocidos o bien no hay suficientes pruebas que demuestren su origen. La mayoría de estos tumores han sido considerados sarcomas (neoplasia derivada del mesodermo) y dentro de esta clasificación se han considerado como tejidos de origen: células indiferenciadas del mesénquima, células primarias hematopoyéticas y células rediferenciadas del tejido vesicular conjuntivo. El epitelio primordial vascular y gonadal también se han propuesto como lugar de origen (ELSTON *et al.* 1992). El hecho de que la mayoría de las neopla-

sias diseminadas en sus estados iniciales se detecten en la hemolinfa, y la similitud de características de estas células con los hemocitos, hace que la mayoría de los investigadores piense que el origen es hemocitario. Sin embargo, la confirmación de esta hipótesis es difícil debido a la falta de conocimiento de la hematopoyesis de bivalvos. Por otra parte, varios experimentos apoyan el origen hemocitario. Mix (1975) inyecta ostras *Ostrea lurida* con timidina tritiada y encuentra que el porcentaje de células marcadas era mayor en las ostras neoplásicas que en las sanas y además se observaban células marcadas en el tejido conjuntivo que rodea la mayoría de los órganos. Estudios realizados con anticuerpos producidos de células neoplásicas en *Mya arenaria* (SMOLOWITZ *et al.* 1989) demostraron que estos reaccionaban con células neoplásicas, hemocitos y células del tejido conjuntivo. Similarmente, anticuerpos producidos a partir de la hemolinfa de *Mytilus trossulus* neoplásicos reaccionan con hemocitos y células neoplásicas lo que sugiere la presencia de antígenos comunes (NÖEL *et al.* 1991; ELSTON *et al.* 1992), aunque podría ser que ambas estuvieran contenidas en el inóculo inicial (BARBER *et al.* 2004). Por otra parte, la neoplasia observada en *Macoma balthica* podría originarse en el epitelio branquial (CHRISTENSEN *et al.* 1974). En *Cerastoderma edule* de Galicia (NW España) también se han observado células neoplásicas en el epitelio de la branquia que coexisten con neoplasias diseminadas típicas (CARBALLAL *et al.* 2001). Estos resultados sugieren que podría existir varios tejidos de origen.

En la mayoría de las neoplasias gonadales el tejido de origen es el epitelio germinal como se ha descrito en numerosos tumores en fase inicial que son únicamente detectados en los folículos. En muy pocos casos el origen es en el estroma o en el estroma y epitelio germinal simultáneamente (PETERS *et al.* 1994).

4.2. Etiología

Se han propuesto varias hipótesis para explicar la etiología de las enfermedades neoplásicas de bivalvos. Algunos estudios muestran asociación de las neoplasias con contaminantes antropogénicos (hidrocarburos aromáticos, fuel oil, metales pesados, herbicidas...) y biotoxinas (BARBER 2004). Otros estudios señalan las alteraciones genéticas como causa de las neoplasias (BERT *et al.* 1993; KELLEY *et al.*



2001; BUTLER *et al.* 2004; ST-JEAN *et al.* 2005), algunas de ellas inducidas por tóxicos ambientales (VAN BENEDEN 1994). Por otra parte, varios estudios señalan el origen viral de esta enfermedad. La relación entre virus, transformaciones carcinogénicas y supresión inmunológica en el desarrollo de neoplasias en moluscos bivalvos no ha podido ser claramente establecida por el momento (ELSTON *et al.* 1992). Sin embargo, actualmente, en cuanto a la etiología de la neoplasia la hipótesis más aceptada es que ésta se debe a un agente infeccioso, cuya actividad y desarrollo posterior de la neoplasia resultante puede estar modificada por diferentes factores de estrés (BARBER 2004).

4.2.1. Virus

La hipótesis de la implicación de un agente infeccioso en la etiología de la neoplasia diseminada tomó fuerza cuando se constató la transmisión entre individuos (BROWN 1980; TWOMEY y MULCAHY 1988b; ELSTON *et al.* 1988b; KENT *et al.* 1991; McLAUGHLIN 1994; COLLINS y MULCAHY 2003; DÍAZ 2005) y la súbita aparición de niveles elevados de prevalencia y mortalidad en poblaciones previamente libres de neoplasia (FARLEY *et al.* 1986; McGLADDERY *et al.* 2001), hecho que parece indicar un posible efecto contagioso en el medio natural (BARBER 2004).

La transmisión de la neoplasia diseminada se ha constatado tanto en condiciones experimentales como en el medio natural. Así, en el caso de *Mya arenaria* (BROWN 1980), *Mytilus edulis* (ELSTON *et al.* 1988b) y *Cerastoderma edule* (DÍAZ *et al.* 2007), se comprobó la transmisión de la neoplasia, entre individuos afectados e individuos sanos de la misma especie, mediante experimentos de cohabitación en tanques. Otros estudios consiguieron transmitir la neoplasia mediante inoculación de hemolinfa de individuos enfermos a sanos en *Mytilus edulis* (ELSTON *et al.* 1988a), en *Cerastoderma edule* (TWOMEY y MULCAHY 1988b; COLLINS y MULCAHY 2003; DÍAZ *et al.* 2007) y en *Mya arenaria* (McGLADDERY *et al.* 2001). Estudios realizados por SUNILA (1992) demuestran que el suero de la hemolinfa que contiene células neoplásicas actúa como factor de crecimiento y posibilita una transmisión más eficiente de la neoplasia (SUNILA 1992). La neoplasia diseminada también se logró transmitir mediante la adición de un homogenizado de tejidos de almejas *Mya arenaria* neoplásicas al agua de tanques donde se encontraban alme-

jas sanas (McGLADDERY *et al.* 2001). Los experimentos realizados para transmitir la neoplasia entre especies diferentes de moluscos sugieren que la neoplasia diseminada podría ser debida a un agente infeccioso específico, al no transmitirse desde los mejillones *Mytilus trossulus* a las almejas (*Mya arenaria*), u ostras (*Ostrea edulis* y *Ostreola conchaphila*) pero sí entre ellos (66% de transmisión positiva) bajo las mismas condiciones (KENT *et al.* 1991).

Aparte de las experiencias de laboratorio, también se comprobó la transmisión de neoplasia diseminada en el hábitat natural al diagnosticar la alteración neoplásica en almejas *Mya arenaria* que habían sido trasladadas de una zona libre de la enfermedad a otra con prevalencias altas de la misma (BROUSSEAU y BAGLIVO 1991a). En el caso de neoplasia gonadal, el único estudio de transmisión del que se tiene constancia fue realizado por BARBER *et al.* (2002) en *Mya arenaria*. Estos investigadores intentaron transmitir la enfermedad trasladando almejas *Mya arenaria* procedentes de una zona libre de neoplasia gonadal a otra donde la enfermedad alcanzaba niveles epidémicos. Transcurridos seis meses desde el traslado no detectaron la enfermedad en las almejas introducidas, por lo que concluyeron que no existe un agente infeccioso implicado en la neoplasia gonadal o bien que el tiempo de estudio no fue suficiente para transmitir la enfermedad.

El hecho de que se confirmase la transmisión de neoplasia diseminada mediante la inoculación de células neoplásicas en individuos sanos transcurridos períodos de tiempo muy cortos, hizo que se cuestionase si las células neoplásicas observadas eran resultado de la transformación de las células del receptor o de la proliferación de las células transplantadas. Para descartar la posibilidad de la posible división de las células anómalas, se realizaron experimentos de inoculación de homogenizados de células neoplásicas, consiguiéndose igualmente la transmisión de neoplasia en mejillones *Mytilus edulis* (ELSTON *et al.* 1988b). Para demostrar que el contagio se debía a la implicación de un virus se realizaron experiencias en las que se inocularon filtrados de homogenizados de células neoplásicas a individuos sanos. Para la preparación de los filtrados se emplearon filtros con un diámetro de poro tal que permitía el paso de virus pero no de bacterias, protistas o las propias células neoplásicas. Con este procedimiento fue posible



la transmisión de neoplasia en *Mytilus trossulus* (KENT *et al.* 1991) y en *Cerastoderma edule* (COLLINS y MULCAHY 2003).

El éxito de estos estudios hizo que cobrase fuerza la hipótesis de una etiología viral de la neoplasia. Hasta el momento, mediante la observación ultraestructural de células neoplásicas no se ha tenido constancia real de la presencia de partículas virales en el núcleo de estas células (HARSHBARGER *et al.* 1979; ELSTON *et al.* 1992; BARBER, 2004). En el caso de *Mya arenaria* se ha responsabilizado a un retrovirus aislado a partir de almejas afectadas por neoplasia de provocar la enfermedad (OPRANDY *et al.* 1981). Estos autores inocularon en almejas sanas virus purificados aislados a partir de almejas afectadas por neoplasia, desarrollándose –en los dos meses siguientes– tumores en la mayor parte de las almejas inyectadas. A partir de estas almejas se aislaron de nuevo virus, que fueron inoculados a su vez en almejas sanas. La mayor parte de éstas desarrollaron neoplasia, cumpliéndose así los postulados de Koch. OPRANDY y CHANG (1983) también consiguen la inducción de replicación viral y de la neoplasia en almejas usando como inductor 5-bromodeoxiuridina. La ausencia de repetibilidad de los resultados, en intentos posteriores realizados por otros investigadores, ha puesto en entredicho estos estudios (ELSTON *et al.* 1992). Otras evidencias a favor de la hipótesis de la etiología viral las aportan estudios como el de SUNILA (1994) que aísla un virus en ovocitos de *M. arenaria* con neoplasia diseminada y logra la transmisión de neoplasia mediante la inyección de ovocitos a almejas sanas. La detección de actividad transcriptasa inversa en células neoplásicas de *Mya arenaria* (MEDINA *et al.* 1993; HOUSE *et al.* 1998) y de *Cerastoderma edule* (ROMALDE *et al.* 2007) y no en células procedentes de organismos sanos, constituye una prueba favorable a la implicación de retrovirus en el desarrollo de neoplasia diseminada.

4.2.2. Contaminación ambiental

Debido a que no se ha determinado de forma concluyente la implicación de un agente causal de naturaleza infecciosa en todas las neoplasias de bivalvos y a que se han detectado estas enfermedades en individuos procedentes de ambientes contaminados, han surgido hipótesis centradas en la idea de que varios compuestos contaminan-



tes pueden iniciar el desarrollo de neoplasia diseminada (BARBER 2004). Así, existen informes relativos a bivalvos de zonas contaminadas por hidrocarburos, pesticidas y/o metales pesados en los que se han detectado prevalencias elevadas de neoplasia (BROWN 1980; REINISCH *et al.* 1984; FARLEY *et al.* 1991). Sin embargo, también se encuentran trabajos en los que se compara la prevalencia de neoplasia en bivalvos de zonas contaminadas frente a zonas control y no se detectan diferencias significativas (BROWN *et al.* 1977; BALOUET *et al.* 1986; SMOLOWITZ y LEAVITT 1996; TWOMEY 1994; KRISHNAKUMAR *et al.* 1999). MIX (1986) en una extensa revisión acerca de las enfermedades cancerosas en animales acuáticos y su asociación con contaminantes ambientales concluye que existen muy pocas evidencias que soporten la idea de la contaminación como etiología de la neoplasia. Además la realización de estudios de campo tienen serias limitaciones a la hora de establecer relaciones causales debido al enorme número de variables no cuantificables existentes en los ambientes naturales. Los resultados de experiencias de laboratorio, realizadas en este sentido, tampoco justifican esta etiología y más bien sugieren que algunos contaminantes pueden actuar como factores de estrés que favorecen el desarrollo de la enfermedad causada por un agente infeccioso (probablemente de origen viral) (BARBER 2004).

En el caso de la neoplasia gonadal, también se sugirió que pudiese estar causada por agentes contaminantes con efectos carcinogénicos. Sin embargo dicha asociación no ha podido ser establecida y más bien se baraja la hipótesis de una influencia indirecta, basándose en que ciertos contaminantes ambientales podrían facilitar el desarrollo de la enfermedad originando alteraciones a nivel de procesos de regulación hormonal de la reproducción (BARBER 2004).

4.2.3. Biotoxinas

LANDSBERG (1996), basándose en la coincidencia en cuanto a distribución geográfica de poblaciones de *Mytilus* sp. y *Mya arenaria* afectadas por neoplasia y eventos tóxicos originados por dinoflagelados, plantea la hipótesis de que los efectos subletales de las toxinas en los bivalvos favoreciesen la susceptibilidad a la neoplasia. No existen, sin embargo, datos experimentales que sustenten esta idea. Este mismo autor plan-



tea que existe una asociación espacial entre la distribución general de poblaciones de almejas *Mya arenaria* afectadas por germinomas y los blooms del dinoflagelado tóxico *Alexandrium* spp. Cuando el análisis se realiza a menor escala, sobre la base de datos correspondientes a redes de control de biotoxinas, no se demuestra la correlación entre la neoplasia y la concentración de saxitoxinas (BARBER 2004).

4.2.4. Oncogenes y oncoproteínas

Los estudios recientes de las neoplasias que afectan a los moluscos están basados en alteraciones genéticas que se producen al detectarse estas enfermedades. Las mutaciones del gen p53 son las más estudiadas debido a su función reguladora del ciclo celular y de la apoptosis y a su alta frecuencia de mutación en cánceres humanos. Se ha secuenciado el gen p53 en *Mytilus edulis* (MUTTRAY *et al.* 2005; CIOCAN y ROTCHEL 2005), *Mytilus trossolus* (MUTTRAY *et al.* 2005), *Spisula solidissima* (COX *et al.* 2003), *Crassostrea rhizophorae* (Genbank Accession Number AY442309) y *Crassostrea gigas* (Genbank Accession Number AM236465). En células neoplásicas de *Mya arenaria* se ha detectado una transversión de citosina a guanina en el final del exon 6 (BARKER *et al.* 1997). Se han descrito mutaciones en la proteína transcrita por dicho gen, p53, en almejas *Mya arenaria* neoplásicas (BARKER *et al.* 1997) y berberechos, *Cerastoderma edule* (DÍAZ *et al.* 2010). Otras proteínas de estudio son las que pertenecen a la familia de la p53 como p63 y p73, de las que se registran mayores niveles en individuos neoplásicos, *Mya arenaria* (STEPHENS *et al.* 2001) y *Mytilus edulis* (ST-JEAN *et al.* 2005). Una ruta de degradación de proteínas, entre ellas la p53, es mediante la ubiquitinización. Para activar la proteína *ubiquin* son necesarias una serie de enzimas: E1, E2, E3... Se ha secuenciado parcialmente el ADN_c de la proteína E3, reguladora del ciclo celular, de *Mya arenaria* (KELLEY y VAN BENEDEN 2000).

Otros genes supresores de tumores que se han estudiado son los protooncogenes *c-myc* y *ras* (ELSTON *et al.* 1990) que codifican una gran variedad de rutas de transmisión de señales celulares que controlan diferentes fenómenos como la integridad del citoesqueleto, la proliferación celular, la diferenciación celular, la apoptosis... Se ha clonado el gen *ras* en *Mytilus edulis* (CIOCAN y ROTCHELL 2005) y *Mytilus trossulus*



(CIOCAN *et al.* 2006) detectándose una sobreexpresión del mismo que podría contribuir al desarrollo de la neoplasia.

5. PERSPECTIVAS

Los estudios más recientes señalan un origen multifactorial de las enfermedades neoplásicas, contemplándose como factores implicados: transformaciones carcinogénicas, virus, contaminantes de distinta naturaleza y supresión inmunológica. No obstante, hasta el momento, no han podido aclararse las relaciones existentes entre los mismos.

Debido al gran desconocimiento de los cambios producidos en el ciclo celular de las células implicadas en los desarrollos neoplásicos, actualmente los esfuerzos investigadores se están centrando en el estudio de las modificaciones producidas a nivel genético y proteico. Así, los trabajos más recientes sobre neoplasias que afectan a los moluscos pretenden detectar alteraciones genéticas y proteínas modificadas que se producen al desarrollarse estas enfermedades. La identificación y clonación de los genes implicados en los procesos tumorales abren una vía al desarrollo de técnicas de diagnóstico más sensibles que las disponibles actualmente. Este tipo de herramientas diagnósticas permitirían la detección temprana de la enfermedad e incluso la caracterización de aquellos individuos potencialmente sensibles de desarrollarla. Esta información resulta fundamental para implementar medidas de gestión sanitaria, dirigidas a evitar la expansión de estas enfermedades y/o a seleccionar poblaciones resistentes a las mismas.

Otro aspecto esencial para facilitar el estudio de éste y otro tipo de alteraciones patológicas en moluscos es el desarrollo de líneas celulares. El cultivo y mantenimiento de líneas celulares de hemocitos proporcionaría mucha información sobre su origen (hematopoyesis) y sobre su posible transformación en células neoplásicas –hipótesis planteada en varios trabajos para explicar el origen de las neoplasias diseminadas–. Por otra parte, la existencia de líneas celulares de moluscos permitiría la realización de experiencias dirigidas a determinar el papel de los virus en el desarrollo de las alteraciones neoplásicas. Con el cultivo de células neoplásicas se facilitaría también la obtención de estas células para su estudio, lo cual constituye en la actualidad un serio factor limitante.



Varios estudios plantean que los contaminantes ambientales pueden estar implicados en el desarrollo de neoplasias. Sin embargo, las evidencias actuales no permiten llegar a conclusiones firmes. La revisión de la bibliografía al respecto sugiere que es necesario dedicar mayores esfuerzos a intentar determinar la relación entre contaminación ambiental y neoplasia. Gran parte de los estudios realizados se han basado en el establecimiento de relaciones circunstanciales entre la aparición de neoplasia y la existencia de niveles elevados de ciertos elementos contaminantes en el medio natural. Sin embargo, debido al gran número de variables existentes en el ambiente es difícil el establecimiento de relaciones causa-efecto. En el futuro, se debería poner más énfasis en el desarrollo de ensayos de laboratorio con un diseño experimental robusto y empleando las técnicas de cultivo y mantenimiento de los moluscos más avanzadas para evitar factores de estrés no contemplados en el diseño. Este aspecto tiene especial interés de cara al desarrollo de medidas de profilaxis y, si cabe, de concienciación ambiental.

6. REFERENCIAS

- ALDERMAN, D. J., P. VAN BANNING y A. PÉREZ-COLOMER, 1977 Two european oyster (*Ostrea edulis*) mortalities associated with an abnormal haemocytic condition. *Aquaculture* **10**: 335-340.
- ALONSO, A., P. SUAREZ, C. ALVAREZ, F. SAN JUAN y P. MOLIST, 2001 Structural study of a possible neoplasia detected in *Mytilus galloprovincialis* collected from the Ria of Vigo (NW Spain). *Dis. Aquat. Org.* **47**: 73-79.
- APPELDORN, R. S., C. W. BROWN, R. S. BROWN, P. W. CHANG , K. R. COOPER *et al.*, 1984 *Field and laboratory studies to define the occurrence of neoplasia in Soft-shell Clams , Mya arenaria*. American Petroleum Institute, Washington, D.C.
- AUFFRET, M. y M. PODER, 1986 Sarcomatous lesion in the cockle *Cerastoderma edule*. II. Electron microscopical study. *Aquaculture* **58**: 9-15.
- BALOUET, G., M. PODER, A. CAHOUR y M. AUFFRET, 1986 Proliferative hemocytic condition in european flat oysters (*Ostrea edulis*) from Breton coasts: A 6-year survey. *J. Invertebr. Pathol.* **48**: 208 - 215.
- BARBER, B. J., 1990 Seasonal prevalence and intensity and disease progression of neoplasia in soft-shell clams, *Mya arenaria*, from the Shrewsbury river,



- New Jersey., pp. 377-386 in *Pathology in Marine Science*. Academic Press, Gloucester Point.
- BARBER, B. J., 1996 Effects of gonadal neoplasms on oogenesis in softshell clams, *Mya arenaria*. *J. Invertebr. Pathol.* **67**: 161 -168.
- BARBER, B. J., 2004 Neoplastic diseases of commercially important marine bivalves. *Aquat. Living Resour.* **17**: 17.
- BARBER, B. J., G. S. MACCALLUM, ROBINSON, S. M. C. y S. MCGLADDERY, 2002 Occurrence and lack of transmissibility of gonadal neoplasia in softshell clams, *Mya arenaria*, in Maine (USA) and Atlantic Canada. *Aquat. Living Resour.* **15**: 319-326.
- BARKER, C. M., R. J. CALVERT, C. W. WALKER y C. L. REINISCH, 1997 Detection of mutant p53 in clam leukemia cells. *Exp. Cell Res.* **232**.
- BARRY, M. M. y P. P. YEVICH, 1972 Incidence of gonadal cancer in the quahog. *Oncology* **26**: 87-96.
- BERT, T. M., D. M. HESSELMAN, W. S. ARNOLD, W. S. MOORE, H. CRUZ-LÓPEZ *et al.*, 1993 High frequency of gonadal neoplasia in a hard clam (*Mercenaria spp.*) hybrid zone. *Mar. Biol.* **117**: 97-104.
- BOWER, S. M., 1989 The summer mortality syndrome and haemocytic neoplasia in the blue mussels (*Mytilus edulis*) from British Columbia. Canadian special publication of Fisheries and Aquatic Sciences: 1703.
- BROOKS, K. M. y R. A. ELSTON, 1991 Epizootiology of hemic neoplasia in *Mytilus trossulus* within Washington State. *J. Shellfish Res.* **10**: 233-236.
- BROUSSEAU, D. J. y J. A. BAGLIVO, 1991a Disease progression and mortality in neoplastic *Mya arenaria* in the field. *Mar. Biol.* **110**: 249 - 252.
- BROUSSEAU, D. J. y J. A. BAGLIVO, 1991b Field and laboratory comparisons of mortality in normal and neoplastic *Mya arenaria*. *J. Invertebr. Pathol.* **57**: 59-65.
- BROUSSEAU, D. J. y J. A. BAGLIVO, 1994 Notes on epizootiological aspects (sex and age) of disseminated neoplasia in *Mya arenaria* from Long Island Sound. *J. Invertebr. Pathol.* **63**: 214-216.
- BROWN, R. S., 1980. The value of the multidisciplinary approach to research on marine pollution effects as evidenced in a three-year study to determine the etiology and pathogenesis of neoplasia in the soft-shell clam, *Mya arenaria*. *Rapp. P.-v. Réun. Cons. int. Explor. Mer* **179**: 125-128.
- BROWN, R. S., R. E. WOLKE, C. W. BROWN y S. B. SAILA (Editors), 1979 *Hydrocarbon pollution and the prevalence of neoplasia in New England soft-shell clams (Mya arenaria)*. National Research Council, National Academic Press, Washington, D. C.



- BROWN, R. S., R. E. WOLKE, S. SAILA y C. W. BROWN, 1977 Prevalence of neoplasia in 10 New England populations of the soft-shell clam (*Mya arenaria*). *Annals New York Academy of Sciences* **298**: 522-534.
- BUTLER, R. A., M. L. KELLEY, K. E. OLBERDING, G. R. GARDNER y R. J. VAN BENEDEN, 2004 Aryl hydrocarbon receptor (AhR)-independent effects of 2,3,7,8-tatrehlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) on softshell clam (*Mya arenaria*) reproductive tissue. *Com. Biochem. Physiol.* **138**.
- CARBALLAL, M. J., D. IGLESIAS, J. SANTAMARINA, B. FERRO-SOTO y A. VILLALBA, 2001 Parasites and pathologic conditions of the cockle *Cerastoderma edule* populations of the coast of Galicia (NW Spain). *J. Invertebr. Pathol.* **78**: 87-97.
- CIOCAN, C. M., J. D. MOORE y J. M. ROTCHELL, 2006 The role of ras gene in the development of haemic neoplasia in *Mytilus trossulus*. *Mar. Environ. Res.* **62**: 147-150.
- CIOCAN, C. M. y J. M. ROTCHELL, 2005 Conservation of cancer genes in the marine invertebrate *Mytilus edulis*. *Environ. Sci. Technol.* **39**: 3029-3033.
- COLLINS, C., 1998 Studies on a Neoplasm of the Cockle, *Cerastoderma edule* (Linnaeus). Tesis doctoral. National University of Ireland, Cork. pp. 159.
- COLLINS, C. M. y M. F. MULCAHY, 2003 Cell - free transmission of a haemic neoplasm in the cockle *Cerastoderma edule*. *Dis. Aquat. Org.* **54**: 61-67.
- COOPER, K. R., R. S. BROWN y P. W. CHANG, 1982a The course and mortality of a hematopoietic neoplasm in the soft-shell clam, *Mya arenaria*. *J. Invertebr. Pathol.* **39**: 149-157.
- COOPER, K. R., R. S. BROWN y P. W. CHANG, 1982b Accuracy of Blood Cytological screening techniques for the diagnosis of a possible hematopoietic neoplasm in the bivalve mollusc, *Mya arenaria*. *J. Invertebr. Pathol.* **39**: 281-289.
- COSSON-MANNEVY, M. A., C. S. WONG y W. J. CRETNEY, 1984 Putative neoplastic disorders in mussels (*Mytilus edulis*) from southern Vancouver Islands waters, British Columbia. *J. Invertebr. Pathol.* **44**: 151-160.
- COX, R. L., R. E. STEPHENS y C. L. REINISCH, 2003 p63/73 homologues in surf clam: novel signling motifs and implications for control of expression *Gene* **320**: 49-58.
- CHRISTENSEN, D. J., C. A. FARLEY y F. G. KERN, 1974 Epizootic Neoplasms in the Clam *Macoma balthica* (L.) From Chesapeake Bay. *J. Natl. Cancer Inst.* **52**: 1739-1749.
- DA SILVA, P. M., J. FUENTES y A. VILLALBA, 2005a Disseminated neoplasia in oysters, *Ostrea edulis*, cultured in Galicia (NW Spain). *J. Shellfish. Res.* **24(2)**: 649.



- DA SILVA, P. M., P. SOUDANT, M. J. CARBALLAL, C. LAMBERT y A. VILLALBA, 2005b Flow cytometric DNA content analysis of neoplastic cells in haemolymph of the cockle *Cerastoderma edule*. *Dis. Aquat. Org.* **67**: 133-139.
- DARRIBA, S., D. IGLESIAS, J. C. HARSHBARGER y C. LÓPEZ, 2006 Germinoma in razor clam *Ensis arcuatus* (Jeffreys, 1865) in Galicia (NW Spain). *J. Invertebr. Pathol.* **93**: 140-142.
- DÍAZ, S., 2005 Estudio de la neoplasia diseminada y otras alteraciones patológicas y parásitos que afectan a las poblaciones de berberecho, *Cerastoderma edule*, de Galicia. Diploma de Estudios Avanzados, Universidad de Santiago de Compostela pp. 68
- DÍAZ, S., P. SOUDANT, P. M. D. SILVA, M. J. CARBALLAL, C. LAMBERT *et al.*, 2005 Flow cytometric DNA content analyses of normal haemocytes and neoplastic cells in the haemolymph of the cockle *Cerastoderma edule*, pp. 207 in *EAFP 12th International Conference*, edited by E. A. O. F. PATHOLOGIST, Copenhagen.
- DÍAZ, S., A. VILLALBA y M. J. CARBALLAL, 2007 Transmisión de neoplasia diseminada entre berberechos, *Cerastoderma edule*, pp. 1013-1016 in *XI Congreso Nacional de Acuicultura*, edited by A. CERVÍÑO EIROA, A. GUERRA DÍAZ y C. PÉREZ ACOSTA, Vigo.
- DÍAZ, S., A. CAO, A. VILLALBA Y M. J. CARBALLAL, 2010 Expression of mutant protein p53 and Hsp70 chaperons in cockles *Cerastoderma edule* affected by neoplasia. *Dis. Aquat. Org.* **90**: 219-226.
- ELSTON, R. A., A. S. DRUM, S. K. ALLEN y J. R., 1990 Progressive development of circulating polyploid cells in *Mytilus* with hemic neoplasia. *Dis. Aquat. Org.* **8**: 51-59.
- ELSTON, R. A., M. L. KENT y A. S. DRUM, 1988a Progression, lethality and remission of hemic neoplasia in the bay mussel *Mytilus edulis*. *Dis. Aquat. Org.* **4**: 135 - 142.
- ELSTON, R. A., M. L. KENT y A. S. DRUM, 1988b Transmission of hemic neoplasia in the bay mussel, *Mytilus edulis*, using whole cells and cell homogenate. *Dev. Comp. Immunol.* **12**: 719 - 727.
- ELSTON, R. A., J. D. MOORE y K. M. BROOKS, 1992 Disseminated neoplasia of bivalve molluscs. *Rev. Aquat. Sci.* **6**: 405-466.
- FARLEY, C. A., 1969a Probable neoplastic disease of the hematopoietic system in oysters, *Crassostrea virginica* and *Crassostrea gigas*. National Cancer Institute. Monographs. **31**: 541-555.
- FARLEY, C. A., 1969b Sarcomatoid proliferative disease in a wild population of blue mussel (*Mytilus edulis*). *J. Natl. Cancer Inst.* **43**: 509-516.



- FARLEY, C. A., 1977 Neoplasm in estuaries molluscs and approaches to ascertain causes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **298**: 225-232.
- FARLEY, C. A., 1978 Viruses and virus like lesions in marine molluscs *Mar. Fish. Rev* **40**: 18-20.
- FARLEY, C. A., S. V. OTTO y C. L. REINISCH, 1986 New occurrence of epizootic sarcoma in Chesapeake Bay soft shell clams, *Mya arenaria*. *Fish. Bull.* **84**.
- FARLEY, C. A., D. L. PLUTSCHAK y R. F. SCOTT, 1991 Epizootiology and distribution of transmissible sarcoma Maryland soft shell clams, *Mya arenaria*, 1984-1988. *Environ. Health. Perspect.* **90**: 35-41.
- FISHER, W. S. y S. E. FORD, 1988 Flow Cytometry: A tool for cell research in bivalve pathology. *Am. Fish. Soc.* **18**: 286-291.
- FORD, S. E., R. D. BARBER y E. MARKS, 1997 Disseminated neoplasia in juvenile eastern oysters *Crassostrea virginica*, and its relationship to the reproductive cycle. *Dis. Aquat. Org.* **28**: 73-77.
- GARDNER, G. R., P. P. YEVICH, J. HURST, P. THAYER, S. BENYI *et al.*, 1991 Germinomas and teratoid siphon anomalies in softshell clams, *Mya arenaria*, environmentally exposed to herbicides. *Environ. Health Perspect.* **90**: 43 - 51.
- HARSHBARGER, J. C., S. V. OTTO y CHANG, S. C. 1979 Proliferative disorders in *Crassostrea virginica* and *Mya arenaria* from Cheasapeake Bay and intranuclear virus-like inclusions in *Mya arenaria* with germinomas from a Maine oil spill site. *Haliotis* **8**: 243-248.
- HESSSELMAN, D. M., N. J. BLAKE y E. C. PETERS, 1988 Gonadal neoplasm in hard shell clams *Mercenaria spp.*, from Indian River, Florida: occurrence, prevalence, and histopathology. *J. Invertebr. Pathol.* **52**: 436-446.
- HOUSE, M. L., C. H. KIM y P. W. RENO, 1998 Soft shell clams *Mya arenaria* with disseminated neoplasia demonstrate reverse transcriptase activity. *Dis. Aquatic Org.* **34**: 187-192.
- IGLESIAS, D., 2006 Estudio patológico de las poblaciones de berberecho *Cerastoderma edule* (L.) de Galicia. Tesis doctoral Universidad de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela. pp. 266.
- IGLESIAS, D., M. J. CARBALLAL y A. VILLALBA, 2007 An epizootic proliferative disorder detected in a natural population of the clam, *Venerupis aurea* in Galicia (NW Spain). pp. 231 en *13th Conference of EAFP*. Diseases of fish and shellfish, Grado.
- KELLEY, M. L. y R. J. VAN BENEDEN, 2000 Identification of an E3 ubiquitin-protein ligase in the softshell clam (*Mya arenaria*). *Mar. Environ. Res.* **50**: 289-293.
- KELLEY, M. L., P. WINGE, J. D. HEANEY, R. E. STEPHENS, J. H. FARELL *et al.*, 2001 Expression of homologues for p53 and p73 in the softshell clam (*Mya arenaria*), a naturally-occurring model for human cancer. *Oncogene* **20**: 748-758.



- KENT, M. L., R. A. ELSTON, M. T. WILKINSON y A. S. DRUM, 1991 Failure of transmission of hemic neoplasia of bay mussels, *Mytilus trossulus*, to other bivalve species. *J. Invertebr. Pathol.* **57**: 435-436.
- KINNE, O., 1980 Diseases of marine animals: general aspects., pp. 13-73 en *Diseases of Marine Animals*, edited by O. KINNE, New York.
- KRISHNAKUMAR, P. K., E. CASILLAS, R. G. SNIDER, A. N. KAGLEY y U. VARANASI, 1999 Environmental contaminants and the prevalence of hemic neoplasia (leukemia) in the common mussel (*Mytilus edulis* Complex) from Puget Sound, Washington, USA. *J. Invertebr. Pathol.* **73**: 135-146.
- LANDSBERG, J. H., 1996 Neoplasia and biotoxins in bivalves: is there a connection? *J. Shellfish Res.* **15**(2): 203-230.
- LE GRAND, F., E. KRAFFE, X. DE MONTAUDOIN, A. VILLALBA, Y. MARTY Y P. SOUDANT, 2010 Prevalence, intensity, and aneuploidy patterns of disseminated neoplasia in cockles (*Cerastoderma edule*) from Arcachon Bay: Seasonal variation and position in sediment. *J. Invertebr. Pathol.* **104**: 110-118.
- LEAVITT, D. F., J. M. CAPUZZO, R. M. SMOLOWITZ, D. L. MIOSKY y B. A. LANCASTER, 1990 Hematopoietic neoplasia in *Mya arenaria*: prevalence and indices of physiological condition. *Mar. Biol.* **105**: 313-321.
- LOWE, D. M. y M. N. MOORE, 1978 Cytology and Quantitative Cytochemistry of a Proliferative Atypical Hemocytic Condition in *Mytilus edulis* (Bivalvia, Mollusca). *J. Natl. Cancer Inst.* **60**: 1455-1459.
- MCGLADDERY, S. E., C. L. REINISCH, G. S. MACCALLUM, R. E. STEPHENS, C. L. WALKER *et al.*, 2001 Haemic neoplasia in soft-shell clams (*Mya arenaria*): recent outbreaks in Atlantic Canada and discovery of a p53 gene homologue associated with the condition. *Bull. Aquacul. Assoc.* **101-3**.
- MCLAUGHLIN, S. M. 1994. Transmission studies of sarcoma in the softshell, *Mya arenaria*. En: *Invertebrate Neoplasia: Initiation and Promotion Mechanisms*. Rosenfield, A., Kern, F.G. & Keller, B.J. (Eds.). U.S. Department of Commerce, Woods Hole, MA. pp. 21-22.
- MCVICAR, A. H. 1990. Epidemiology/Epizootiology: A basis for control of disease in mariculture. En: *Pathology in Marine Science*. Perkins, F.O. & Cheng, T.C. (Eds.). Academic Press, INC, Gloucester Point, Virginia. pp. 397-404.
- MEDINA, D. J., G. E. PAQUETTE, E. C. SADASIV y P. W. CHANG, 1993 Isolation of infectious particles having reverse transcriptase activity and producing hematopoietic neoplasia in *Mya arenaria*. *J. Shellfish. Res.* **12**(1): 112-113.
- MIOSKY, D. L., R. M. SMOLOWITZ y C. L. REINISCH, 1989 Leukemia cell specific protein of the bivalve mollusc *Mya arenaria*. *J. Invertebr. Pathol.* **53**: 32-40.



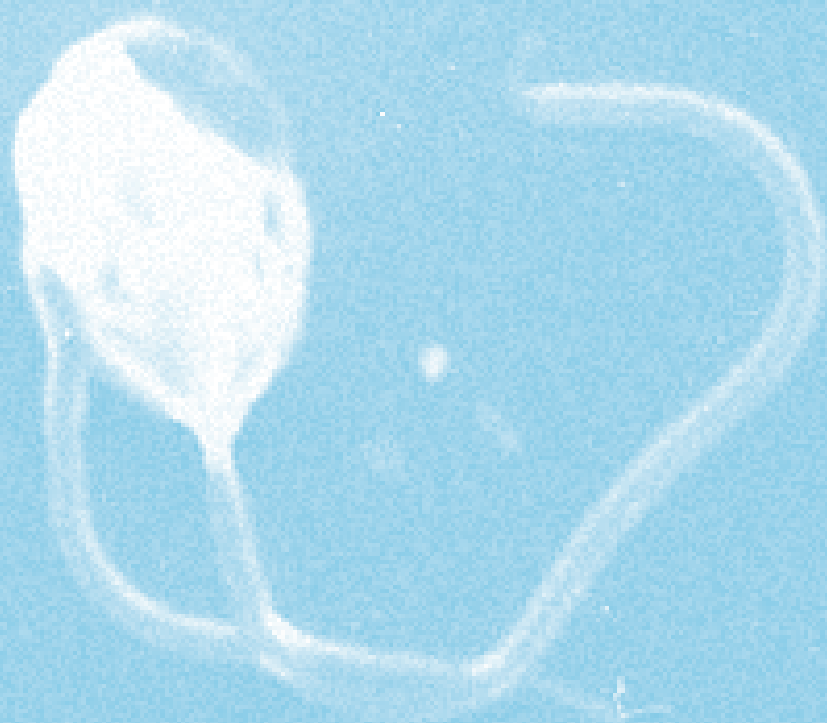
- MIX, M. C., 1975 Proliferative characteristics of atypical cells in native oysters (*Ostrea lurida*) from Yaquina Bay, Oregon. J. Invertebr. Pathol. **26**: 289-298.
- MIX, M. C., 1982. Cellular proliferative disorders in bay mussels (*Mytilus edulis*) from Oregon estuaries. Proc. Int. Colloq. Invert. Pathol. **3**: 266-267.
- MIX, M. C., 1983 Haemic neoplasms of bay mussels, *Mytilus edulis* L., from Oregon: occurrence, prevalence, seasonality and histopathological progression. J. Fish Dis. **6**: 239 - 248.
- MIX, M. C., 1986 Cancerous diseases in aquatic animals and their association with environmental pollutants: A critical literature review. Mar. Environ. Res. **20**: 1-141.
- MIX, M., J. W. HAWKES y A. K. SPARKS, 1979 Observations on the ultrastructure of large cells associated with putative neoplastic disorders of mussels, *Mytilus edulis*, from Yaquina Bay, Oregon. J. Invertebr. Pathol. **34**: 41-56.
- MOORE, J. D., R. A. ELSTON, A. S. DRUM y M. T. WILKINSON, 1991 Alternate pathogenesis of systemic neoplasia in the bivalve mollusc *Mytilus*. J. Invertebr. Pathol. **58**: 231 -243.
- MUTTRAY, A. F., R. L. COX, S. ST-JEAN, P. VAN POPPELEN, C. L. REINISCH *et al.*, 2005 Identification and phylogenetic comparison of *p53* in two distinct mussel species (*Mytilus*). Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol. **140** (2): 237-250.
- NOËL, D., V. BOULO, D. CHAGOT, E. MIALBE, F. POLUCCI *et al.*, 1991 Preparation and characterization of monoclonal antibodies against neoplastic hemocytes of *Mytilus edulis* (Bivalvia). Diseases of Aquatic Organisms **10**: 51-88.
- OPRANDY, J. J. y P. W. CHANG, 1983 5 - Bromodeoxyuridine Induction of Hematopoietic Neoplasia and Retrovirus Activation in the Soft-Shell Clam, *Mya arenaria*. J. Invertebr. Pathol. **42**: 196 - 206.
- OPRANDY, J. J., P. W. CHANG, A. D. PRONOVOST, K. R. COOPER, R. S. BROWN *et al.*, 1981 Isolation of a viral Agent Causing Hematopoietic Neoplasia in the soft-shell clam, *Mya arenaria*. J. Invertebr. Pathol. **38**: 38 - 45.
- PEKKARINEN, M., 1993 Neoplastic diseases in the Baltic *Macoma balthica* (Bivalvia) of the Finnish Coast. J. Invertebr. Pathol. **61**: 138-146.
- PETERS, E. C., 1988 Recent Investigations on the disseminated sarcomas of marine bivalve molluscs. Am. Fish. Soc. Special Publ. **18**: 74-92.
- PETERS, E. C., P. P. YÉVICH, J. C. HARSHBARGER y G. E. ZAROOGIAN, 1994 Comparative histopathology of gonadal neoplasms in marine bivalve molluscs. Dis. Aquat. Org. **20**: 59-76.
- PODER, M. y M. AUFFRET, 1986 Sarcomatus lesion in the cockle *Cerastoderma edule* L. Morphology and population survey in Brittany, France. Aquaculture **58**: 1-8.



- POTTS, M.-S., 1996 Effects of hematopoietic neoplasia on reproduction and population size distribution in soft-shell clam. National Shellfisheries Association.
- REINISCH, C. L., A. M. CHARLES y A. M. STONE, 1984 Epizootic neoplasia in soft shell clams collected from New Bedford Harbor. *Hazard Waste* **1**: 73-81.
- REINISCH, C. L., A. M. CHARLES y J. TROUTNER, 1983 Unique antigens on neoplastic cells of the soft shell clam *Mya arenaria*. *Dev. Comp. Immunol.* **7**: 33-39.
- RENO, P. W., M. HOUSE y A. ILLINGWORTH, 1994 Flow cytometric and chromosome analysis of softshell clams, *Mya arenaria*, with disseminated neoplasia. *J. Invertebr. Pathol.* **64**: 163-172.
- ROMALDE, J. L., M. L. VILARIÑO, R. BEAZ, J. M. RODRÍGUEZ, S. DÍAZ *et al.*, 2007 Evidence of retroviral etiology for disseminated neoplasia in cockles (*Cerastoderma edule*). *J. Invertebr. Pathol.* **94**: 95-1001.
- SMOLARZ, K., T. RENAULT, P. SOLETCNIK y M. WOLOWICZ, 2005a Neoplasia detection in *Macoma balthica* from the Gulf of Gdansk: comparison of flow cytometry, histology and chromosome analysis. *Dis. Aquat. Org.* **65**: 187-195.
- SMOLARZ, K., T. RENAULT, P. SOLETCNIK y M. WOLOWICZ, 2005b Survey for neoplasia in *Macoma balthica* from the Gulf of Gdansk by flow cytometry. *Dis. Aquat. Org.* **66**: 41-46.
- SMOLARZ, K., C. THIRIOT-QUIÉVREUX y M. WOLOWICZ, 2005c Recent trends in the prevalence of neoplasia in the Baltic clam *Macoma balthica* (L.) from the Gulf of Gdansk (Baltic Sea). *Oceanologia* **47**: 61-74.
- SMOLOWITZ, R. y D. LEAVITT, 1996 Neoplasia and other pollution associated lesions in *Mya arenaria* from Boston Harbor. *J. Shellfish Res.* **15**: 520.
- SMOLOWITZ, R. M., D. MIOSKY y C. L. REINISCH, 1989 Ontogeny of leukemic cells of the soft shell clam. *J. Invertebr. Pathol.* **53**: 41-51.
- SMOLOWITZ, R. M. y C. L. REINISCH 1986 Indirect peroxidase staining using monoclonal antibodies specific for *Mya arenaria* neoplastic cells. *J. Invertebr. Pathol.* **48**: 139-145.
- SPARKS, A. K. (Editor), 1985 *Synopsis of Invertebrate Pathology. Exclusive of Insects*. Elsevier, Amsterdam.
- STEPHENS, R. E., C. W. WALKER y C. L. REINISCH, 2001 Multiple protein differences distinguish clam leukemia cells from normal haemocytes: evidence for the involvement of p53 homologues. *Comparative biochemistry an physiology, toxicology and pharmacology* **129**: 329-338.
- ST-JEAN, S. D., R. E. STEPHENS, S. C. COURTENAY y C. L. REINISCH, 2005 Detecting p53 family proteins in haemocytic leukemia cells of *Mytilus edulis* from Pictou Harbour, Nova Scotia, Canada. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **62**.

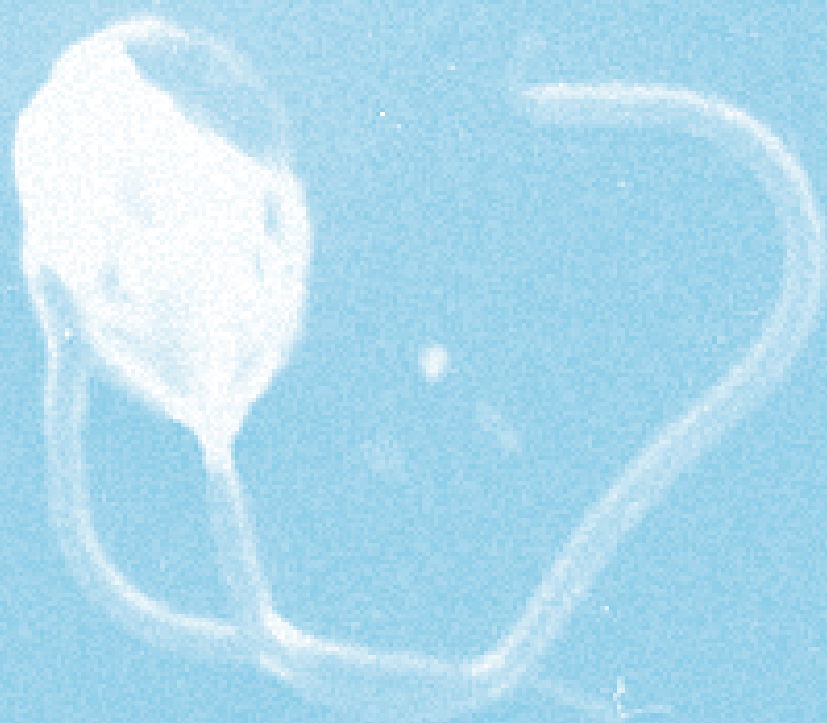


- SUNILA, I., 1992. Serum-cell interactions in transmission of sarcoma in the soft-shell clam, *Mya arenaria* L. Comp. Biochem. Physiol. A **102**: 727-730.
- SUNILA, I., 1994 Viral transmission and tumour promotion of sarcoma in the softshell, *Mya arenaria*, pp. 3-5 in *Invertebrate neoplasia: Initiation and promotion mechanisms*, edited by A. ROSENGELD, F. G. KERN y B. J. KELLER. U.S. Department of Commerce, Woods Hole, M.A.
- TWOMEY, E., 1994 Distribution of sarcoma in the cockle, *Cerastoderma edule*, around the Irish Coast, 1982-91: Implications for pollution etiology. En: Rosengield A., Kern, F. G., Keller, B. J. (Eds), *Invertebrate Neoplasia: Initiation and Promotion Mechanisms*. U.S. Department of Commerce, Woods Hole, MA, pp. 3-5.
- TWOMEY, E., y M. F. MULCAHY, 1988a Epizootiological aspects of a sarcoma in the cockle *Cerastoderma edule*. Dis. Aquat. Org. **5**: 225-238.
- TWOMEY, E. y M. F. MULCAHY, 1988b Transmission of a sarcoma in the cockle *Cerastoderma edule* (Bivalvia; Mollusca) using cell transplants. Dev. Comp. Immunol. **12**: 195-200.
- VAN BENEDEN, R. J., 1994 Molecular analysis of bivalve tumours: models for environmental/genetic interactions. Environmental Health Perspectives **102**: 3-5.
- VILLALBA, A., CARBALLAL, M. J. y LÓPEZ, C. 2001 Disseminated neoplasia and large foci indicating heavy haemocytic infiltration in cockles *Cerastoderma edule* from Galicia (NW Spain). Dis. Aquat. Org. **46**: 213-216.
- WEINBERG, J.R., LEAVITT, D.F., LANCASTER, B.A., McDOWELL y CAPUZZO, J. 1997 Experimental Field Studies with *Mya arenaria* (Bivalvia) on the Induction and Effect of Hematopoietic Neoplasia. Journal of Inv. Pathol. **69**: 183-194.
- WHITE, M. K., D. MIOSKY, D. A. FLESSAS y C. L. REINISCH, 1993 The expression of an adhesion-related protein by clam hemocytes. Journal of Invertebrate Pathology **61**: 253-259.
- YEVICH, P. P. y M. M. BARRY, 1969 Ovarian tumours in the quahog *Mercenaria mercenaria*. J. Invertebr. Pathol. **14**: 266-267.
- YEVICH, P.P. y BARSZCZ, C.A. 1976 Gonadal and hematopoietic neoplasms in *Mya arenaria*. Mar. Fish. Rev. **38**: 42-43.
- YEVICH, P.P. y BARSZCZ, C.A. 1977 Neoplasia in Soft-Shell clams (*Mya arenaria*) collected from oil-impacted sites. Ann. NY Acad. Sci. **298**: 409-426.



3

VIRUS EN MOLUSCOS



VIRUS EN MOLUSCOS

Novoa B. y Figueras A.

Instituto Investigaciones Marinas. IIM-CSIC.
Eduardo Cabello 6, 36208 Vigo, España

Resumen

Los bivalvos son organismos filtradores que pueden acumular patógenos, entre ellos virus, y no sólo aquellos que les afectan a estos animales sino también a muchos otros organismos. Las condiciones en las que se realiza el cultivo de los bivalvos provocan que éstos estén sometidos a un mayor estrés que aumenta el riesgo de infección. Los patógenos virales han causado mortalidades masivas ya que son altamente infecciosos y fácilmente transmisibles, sin embargo, las mortalidades causadas por éstos agentes son las más desconocidas debido a la falta de herramientas para su estudio, fundamentalmente, la ausencia de líneas celulares. En los últimos años, con el avance de las técnicas de biología molecular (PCR, hibridación *in situ*, PCR a tiempo real, etc.) se ha conseguido avanzar en el diagnóstico de las enfermedades virales en los bivalvos. Se han detectado infecciones con etiología viral causadas por virus de los grupos de Birnavirus, Reovirus, Picornavirus, Retrovirus, Herpesvirus, Iridovirus y Papovavirus.

Abstract

Bivalves are filter feeding animals that can concentrate pathogens, including viruses. The conditions under which bivalves culture are carried out with increased stress could increment infection. Mass mortalities have been the consequence of the viral pathogens action since they are highly infectious and easily transmitted; however, these mortalities are the most unknown in bivalves due to lack of tools for their study, primarily, the absence of



cell lines. In recent years, with the advance of molecular biology techniques (PCR, in situ hybridization, real-time PCR, etc.) a great progress has been reached in the diagnosis of viral diseases in bivalves. Viral infections, by Birnavirus, Reovirus, Picornavirus, Retroviruses, Herpesvirus, Iridovirus and Papovavirus, have been detected.

1. INTRODUCCIÓN

Según la FAO, se producen anualmente en el mundo 1.500.000 toneladas de moluscos bivalvos, de las cuales casi un 40% se producen en Europa. España se sitúa como segundo productor de estos organismos después de China con unas 300.000 toneladas anuales.

Los bivalvos son animales filtradores que pueden acumular virus, no solo propios, sino también de otros animales (MEYERS 1984). Es posible que muchos de estos virus ni siquiera repliquen en los moluscos y simplemente sean reservorios de virus de vertebrados que llegan a su hospedador definitivo mediante la ingestión del molusco (LEES 2000; POTASMAN *et al.* 2002; NISHIDA *et al.* 2003).

Las condiciones en las que se lleva a cabo el cultivo es otra de las causas por las que los moluscos están sometidos a estrés que conlleva una mayor susceptibilidad a infecciones. Los patógenos virales han causado mortalidades masivas, ya que normalmente son altamente infecciosos y fácilmente transmisibles. El control de estas enfermedades pasa por un diagnóstico eficaz y un manejo adecuado de los stocks que permitan una mejora de las condiciones en las que se cultivan estos animales y al mismo tiempo, una sostenibilidad y una falta de agresividad con el medio ambiente.

Se han registrado mortalidades en bivalvos producidas por protozoos, bacterias y virus, siendo éstas las más desconocidas debido a la falta de herramientas para su estudio. La ausencia de líneas celulares es una de las mayores limitaciones para diagnosticar adecuadamente una infección viral (FIGUERAS y NOVOA 2004). De hecho, las enfermedades de bivalvos se han estudiado tradicionalmente mediante técnicas histológicas que son muy útiles para detectar patógenos, fundamentalmente parásitos protozoos, asociados a mortalidades o a pérdidas de calidad de los stocks cultivados. Además esta técnica permite estu-



diar las lesiones y la interacción entre el patógeno y los mecanismos del sistema inmune del hospedador. De esta forma se han llevado a cabo estudios epidemiológicos y se han descrito patógenos asociados con mortalidades. Sin embargo, hay que señalar que se suele atribuir la causa de las mortalidades a aquello que se ve y es posible que las infecciones virales no se diagnostiquen por la falta de métodos de detección. La microscopía electrónica permite la visualización de virus, sin embargo es una técnica costosa en tiempo y dinero, por lo que no se suele emplear para llevar a cabo estudios epidemiológicos de rutina.

En los últimos años, con el avance de las técnicas de biología molecular como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la hibridación *in situ*, la PCR a tiempo real, etc., se ha conseguido profundizar en la patogénesis y, sobre todo, en el diagnóstico de las enfermedades virales en estos animales.

A pesar de la falta de herramientas de diagnóstico, se han descrito episodios de mortalidades en diferentes especies de moluscos asociados a la presencia de virus. Así, ya en los años 70, se detectaron mortalidades masivas en ostras portuguesas (*Crassostrea angulata*), que se asociaron a infecciones por iridovirus (COMPS *et al.* 1976; COMPS y BONAMI 1977; COMPS y DUTHOIT 1979).

TABLA 1.

Características de los virus encontrados en moluscos bivalvos.

Tipo de virus	Morfología	Tamaño (diámetro) nm
Virus RNA de cadena doble		
– Birnavirus	Icosaédrico	60
– Reovirus	Icosaédrico	50-80
Virus RNA de cadena sencilla		
– Picornavirus	Icosaédrico	27- 30
– Retrovirus	Icosaédrico	100
Virus DNA de cadena doble		
– Herpesvirus	Pleiomórfico Icosaédrico, envuelto	150-200
– Iridovirus	Icosaédrico	190-200
– Papovavirus	Icosaédrico	40-50



Se han detectado otras infecciones con etiología viral causadas por virus de las familias *Herpesviridae*, *Papovaviridae*, *Togaviridae*, *Retroviridae*, *Reoviridae*, *Birnaviridae* y *Picornaviridae* (FARLEY *et al.* 1972; FARLEY 1976; FARLEY 1978; OPANDRI *et al.* 1981; MEYERS 1979; BOWER 2001, RASMUSSEN 1986; RENAULT y NOVOA 2004).

En este capítulo intentaremos resumir los últimos avances en el estudio de los distintos virus que afectan a los moluscos bivalvos en cultivo.

2. VIRUS CON GENOMA RNA

2.1. Birnavirus

Los birnavirus infectan a especies tan diferentes como vertebrados, moluscos, insectos y rotíferos (DELMAS *et al.* 2005). Esta familia incluye virus con un genoma RNA de doble hebra bisegmentado que se clasifican en cuatro géneros: avibirnavirus (especie tipo: infectious bursal disease virus [IBDV]), entomobirnavirus (especie tipo: Drosophila X virus [DXV]), aquabirnavirus (especie tipo: infectious pancreatic necrosis virus [IPNV]) and blosnavirus (especie tipo: blotched snakehead virus [BSNV]).

Han sido detectados en Europa (HILL 1976), en Taiwán (Lo *et al.* 1988) y en Canadá (BOWER 2001). También se les han asociado con episodios de mortalidad en ostras cultivadas en Japón (SUZUKI *et al.* 1998). Estos virus se han llamado birnavirus marinos, ya que tienen características distintas del virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV) de salmónidos. El virus de *Tellina* 1 (TV-1) fue aislado del bivalvo marino *Tellina tenuis* (HILL 1976) y más tarde incluido en la familia Birnaviridae (BROWN 1986; DOBOS *et al.* 1979). Se realizaron ensayos de neutralización cruzada y se comprobó que los cuatro géneros de birnavirus eran antigénicamente distintos del TV-1 (DOBOS *et al.* 1979; HILL y WAY 1995; JOHN y RICHARDS 1999). Este hecho fue corroborado recientemente por NOBIRON *et al.* (2008) quienes estudiaron la secuencia genómica del virus y lo separaron definitivamente de otros birnavirus acuáticos.

Aunque la patogenicidad de estos virus en bivalvos no parece ser elevada, en situaciones de estrés puede provocar mortalidades eleva-



das como ha sucedido en almeja (*Meretrix lusoria*) (CHOU *et al.* 1994, 1998) o en ostra perlífera (*P. fucata*) (SUZUKI *et al.* 1997, 1998).

Se han aislado birnavirus de moluscos aparentemente sanos por lo que se ha sugerido que los bivalvos pueden actuar como reservorios (RIVAS *et al.* 1993). De hecho, recientemente, se han aislado birnavirus de mejillones, sedimentos y agua en las proximidades de granjas de salmón infectados por estos virus (GREGORY *et al.* 2007). En estudios llevados a cabo en ostra perlífera (*Pinctada fucata*) se determinó que los virus podían persistir en los hemocitos durante el verano para después, en invierno, extenderse y pasar a las células parenquimales (KITAMURA *et al.* 2000).

2.2. Retrovirus

Los retrovirus son importantes agentes causantes de enfermedades en animales y en el hombre (COFFIN *et al.* 1997). Todos ellos poseen una enzima esencial para la replicación que es la reverso transcriptasa que es una polimerasa capaz de transcribir el RNA genómico viral a una doble hebra de DNA que se integra en el genoma del hospedador como un provirus. Se ha demostrado que la actividad retrotranscriptasa existe en neoplasias diseminadas de varios moluscos como en *Mya arenaria* (OPRANDY *et al.* 1981) donde se pudo reproducir la enfermedad en almejas sanas, y en berberecho *Cerastoderma edule* en España (ROMALDE *et al.* 2007). Se han publicado evidencias de una posible etiología viral por varios autores. En primer lugar la neoplasia se transmite entre individuos en diferentes especies como mejillón, *Mya arenaria* y berberecho (COLLINS y MULCAHY 2003; ELSTON *et al.* 1988; KENT *et al.* 1991; SUNILA 1994, TWOMEY y MULCAHY 1988) indicando que un agente infeccioso podría estar involucrado. Estos autores publicaron la inducción de la replicación viral y de la neoplasia en almejas con 5-bromodeoxyuridine, un inductor de la expresión de partículas retrovirales en cultivos celulares de mamíferos (OPRANDY y CHANG 1983). Unos años más tarde, SUNILA (1994) aisló un virus icosaédrico a partir de *Mya arenaria* con neoplasia. Sin embargo, hay que señalar que otros autores no encontraron patógenos similares en mejillones o berberechos con los mismos síntomas (AUFFRET y PODER 1986; ELSTON *et al.* 1992). En estudios recientes se ha podido llevar a cabo un seguimiento



de la neoplasia en *Mya arenaria* midiendo el porcentaje de células tetraploides y se encontró una correlación entre la reverso transcriptasa y el porcentaje de estas células circulantes en la hemolinfa de la almeja (ABOELKHAIR *et al.* 2009).

2.3. Reovirus

Se ha descrito un virus similar a los reovirus (l3p2) en *C. virginica* capaz de replicar y de ser aislado en líneas celulares de peces. El virus tenía unos 79 nm de diámetro y no era neutralizado con un anticuerpo frente al virus de *Tellina* (birnavirus), por lo que MEYERS (1979) lo clasificó como reovirus. Análisis genéticos posteriores indicaron que el virus pertenecía al nuevo género Aquareovirus descrito por LUPIANI *et al.* (1993). Con respecto a su patogenicidad, existe controversia, ya que es posible que los virus detectados sean apatogénicos para los bivalvos y simplemente estos animales actúen como reservorios. CHOU *et al.* (1994) proporcionaron evidencias de que los reovirus inducían mortalidades en los bivalvos, sin embargo no se aisló el virus ni se llevaron a cabo estudios sobre las lesiones que producían. Por lo tanto, la infectividad de estos virus permanece todavía hoy en día como hipotética aunque está claro que algunos de estos virus no infectan a los moluscos (MEYERS 1980).

2.4. Picornavirus

Existen bastantes publicaciones sobre la detección de partículas virales similares a picornavirus en moluscos bivalvos, sin embargo, en ningún caso se llevó a cabo un aislamiento de los virus en línea celular y simplemente han sido visualizados mediante microscopía electrónica o con tinciones de ácidos nucleicos, por lo que faltan evidencias de que los virus detectados sean la causa de las mortalidades de los bivalvos. En 1986, RASMUSSEN detectó partículas virales de unos 27 nm de diámetro en *Mytilus edulis* en Dinamarca. Las partículas se encontraban en vesículas formando estructuras paracristalinas o individualmente y se asociaron a granulocitomas. Más adelante se publicó la presencia de picornavirus en otro mejillón, *Perna canaliculus*, que sufría mortalidades en Nueva Zelanda (JONES *et al.* 1996). Estaba



asociada a hemocitosis extensiva y necrosis de las células intersticiales, basales y las del epitelio de los túbulos digestivos. El estudio ultraestructural reveló el retículo endoplasmático muy modificado y asociado a partículas similares a virus envueltas que medían de 25 a 45 nm de diámetro. Se detectaron también en *M. galloprovincialis* de la misma zona. Más adelante, en 1999, COMPS *et al.* detectaron partículas similares a virus en la ostra perlífera *Pinctada margaritifera* en la Polinesia francesa. Se visualizaron en granulocitomas asociados a necrosis focales y se sugirió que podría tratarse de un picornavirus.

En el año 2000, NOVOA y FIGUERAS publicaron la descripción del primer virus que afectaba a la almeja fina asociado a mortalidades. Las partículas virales se encontraban en el citoplasma de células del tejido conectivo y tenían un aspecto similar a los picornavirus ya que eran icosaédricos y con un diámetro de unos 27-35 nm. En la misma zona (Galicia) se detectaron partículas similares unos años después en otra especie de molusco, el berberecho (*Cerastoderma edule*) (CARBALLAL *et al.* 2003) e incluso en *Urastoma cyprinae* que es un parásito turbelario que infecta las branquias de varios moluscos bivalvos marinos (CRESPO-GONZÁLEZ *et al.* 2008).

3. VIRUS CON GENOMA DNA

3.1. Herpesvirus

A pesar de que no se ha conseguido la replicación de los herpesvirus que afectan a moluscos bivalvos en cultivos primarios o en líneas celulares de peces, la posibilidad de obtener un purificado de virus después de aplicar gradientes de sacarosa (LE DEUFF y RENAULT 1999) ha permitido estudiar a fondo a estos virus y desarrollar técnicas de diagnóstico basadas en la biología molecular (RENAULT y NOVOA 2004). De hecho, son los virus de moluscos más estudiados y son los únicos virus de moluscos de los que se ha secuenciado su genoma (DAVISON *et al.* 2005).

Los herpesvirus tienen una forma circular o poligonal y se replican en el núcleo de las células infectadas. Se observan además, grupos de virus envueltos en el citoplasma dentro de vesículas. Cuando se liberan



al espacio extracelular los virus son envueltos y miden unos 100-180 nm de diámetro. Su genoma presenta una estructura general similar a la de los herpesvirus de mamíferos (como el herpes simplex o el citomegalovirus) (DAVIDSON *et al.* 2005).

Los herpesvirus afectan a *Crassostrea virginica* tal como publica FARLEY *et al.*, en 1972, lo cual supuso la primera descripción de estos virus en bivalvos. También se han asociado a mortalidades de larvas de *C. gigas* en Nueva Zelanda (HINE *et al.* 1992) y en Estados Unidos (BURGE *et al.* 2006). Desde que se publicaron estas detecciones, los herpesvirus se han asociado a mortalidades esporádicas de juveniles de distintas especies de ostra en Francia (RENAULT *et al.* 2000; 1994 a, b; COMPS y COCHENNEC 1993). Se han descrito en *Ostrea angasi* en Australia (HINE y THORNE 1997), en *Tiostrea chilensis* en Nueva Zelanda (HINE 1997; HINE *et al.* 1998) y en larvas de *Ruditapes philippinarum* y *Pecten maximus* en Francia (RENAULT 1998, ARZUL y RENAULT 2002). Recientemente, en un estudio patológico llevado a cabo en *C. ariakensis* y otras especies de ostras en Asia, se pudo constatar la presencia de tres tipos genéticos distintos de herpesvirus (MOSS *et al.* 2007).

Las larvas afectadas por infecciones de herpesvirus suelen mostrar una reducción en su capacidad de alimentarse y de nadar. Además muestran lesiones en el velo y en el manto. En juveniles, las elevadas mortalidades se producen en cortos períodos de tiempo y la manifestación más notable de la enfermedad es la presencia de núcleos anormales en los tejidos conectivos de manto, palpos labiales, branquias y glándula digestiva, aunque estas modificaciones no están asociadas a grandes reacciones inflamatorias (RENAULT *et al.* 1994 a, b; RENAULT *et al.* 2000). Los adultos no son tan susceptibles a las infecciones por herpesvirus, sin embargo se ha apuntado la posibilidad de que actúen como portadores asintomáticos del virus ya que se ha detectado su presencia en ostras adultas (ARZUL *et al.* 2002).

Ha sido posible demostrar la patogenicidad de estos virus mediante infecciones experimentales poniendo en contacto larvas de ostra infectadas con larvas libres de la enfermedad (LE DEUFF *et al.* 1996). Sin embargo, hasta ahora no ha sido posible reproducir la enfermedad mediante infecciones experimentales en adultos y solo los juveniles sometidos a estrés mostraron mortalidades (RENAULT y NOVOA 2004).



Recientemente se ha controlado la mortalidad de tres familias de ostras cultivadas en las mismas condiciones y se cuantificó la carga viral del herpesvirus OsHV-1 mediante PCR en tiempo real en individuos vivos y muertos durante y después de los eventos de mortalidad. El nivel de infección estuvo correlacionado con la mortalidad en las distintas familias. Además, los resultados confirman que existe una elevada base genética que explica la resistencia de la ostra frente a la mortalidad de verano atribuida a estos herpesvirus (SAUVAGE *et al.* 2009). Esto ha sido también observado cuando se estudiaron varias familias de ostras de distintos orígenes y se comprobó que no todas las familias estaban infectadas lo que podría sugerir de nuevo una influencia paterna (DA SILVA *et al.* 2008).

Se han desarrollado técnicas de biología molecular, como PCRs e hibridaciones *in situ* para detectar a los virus en los tejidos infectados de los bivalvos (RENAULT y NOVOA 2004; BATISTA *et al.* 2006). Estos métodos rápidos de diagnóstico han permitido llevar a cabo estudios epizootiológicos amplios en Europa. Recientemente, se ha puesto a punto una PCR a tiempo real para la detección de este patógeno que permite una sensibilidad mucho mayor y que probablemente consiga detectar el virus en ostras asintomáticas profundizando en aspectos no conocidos de la cinética de la infección (PEPIN *et al.* 2008).

3.2. Iridovirus

Los iridovirus son de forma icosaédrica con un diámetro de unos 300 nm. Constan de un centro electrodensito de unos 190 nm de diámetro que está rodeado de una zona clara seguida por una zona densa de unos 45 nm de grosor. Se ensamblan en el citoplasma.

Los iridovirus se han asociado a mortalidades de moluscos bivalvos en diferentes países. Se han descrito varias patologías principales. En Francia, se describió la llamada «enfermedad de las branquias» causada por el GNV (*gill necrosis virus* asociada a mortalidades masivas en *Crassostrea angulata* (COMPS *et al.* 1976; COMPS 1978, 1980). También se describieron brotes de esta enfermedad en *C. gigas* (COMPS y BONAMI 1977). Otra de las enfermedades que se ha relacionado con los iridovirus es la enfermedad del velo de las larvas, OVVD (*oyster velar virus disease*), que afectó a larvas de la ostra del Pacífico en la costa



oeste de Norteamérica (ELSTON 1979; ELSTON y WILKINSON 1985). Por último, en 1970, se produjeron mortalidades importantes en *C. angulata* de Francia en las que se observaron virus similares a iridovirus en los hemocitos. Se le llamó HIV (*hemocyte infection virus*). A pesar de que en todos estos episodios se han descrito virus identificados como iridovirus, todavía no existen suficientes avances en la caracterización molecular y datos definitivos de infecciones experimentales.

En la enfermedad de las branquias de *C. angulata* es característica la aparición de varios puntos amarillos en las branquias y los palpos labiales, los cuales aumentan su tamaño haciendo que el tejido se ponga de color marrón llegando a producirse perforaciones en el tejido. En estados avanzados de la infección, se puede llegar a producir una destrucción completa de los filamentos branquiales. Los síntomas son similares en *C. gigas* pero más leves, demostrando que esta especie es un poco más resistente a la enfermedad. Se han descrito brotes de enfermedad similares en los que no se detectaban síntomas externos aparentes, sin embargo a nivel histológico se observaba una degeneración del tejido conectivo y la presencia de células atípicas que parecían ser hemocitos infectados (COMPS y BONAMI 1977).

Con respecto a la enfermedad del velo de las larvas, OVVD, fue descrita por primera vez en ostras de la costa oeste de Norteamérica (ELSTON 1979; ELSTON y WILKINSON 1985). El virus se asoció a mortalidades ocasionales de larvas. Los animales afectados por esta enfermedad son menos activos y presentan un desprendimiento de las células del velo (ELSTON y WILKINSON 1985). Es en estas células del epitelio del velo donde se observan partículas virales de unos 228 ± 7 nm de diámetro con simetría icosaédrica. Los viriones forman además cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos de unos 1.2 ± 2.4 μ m de diámetro, primero sin un núcleo definido y después desarrollando partículas completas, que constan de un núcleo interno denso separado de la cápside. El contenido de DNA de los cuerpos de inclusión se detectó mediante tinción con naranja de acridina (ELSTON 1997).

3.3. Papovavirus

Los papovavirus son virus no envueltos de unos 40- 55 nm de diámetro con replicación intranuclear. No se han podido asociar por el



momento a mortalidades de bivalvos. Inicialmente la familia Papovaviridae estaba formada por dos géneros: Papillomavirus y Polyomavirus. Sin embargo, hoy en día se consideran como dos familias separadas: Papillomaviridae y Polyomaviridae.

Los papillomavirus, ahora considerados como una nueva familia (GARCÍA *et al.*, 2006), fueron responsables de la hipertrofia gametocítica viral (VGH), que fue descrita por primera vez en 1973 en adultos de *C. virginica* en Maine (Estados Unidos) por FARLEY (1976). Se han descrito virus similares a los papovavirus en epitelio gonadal de varios bivalvos, especialmente de ostras, asociados a hipertrofia de los gametocitos (ELSTON 1997; MCGLADDERY 1999; DONG *et al.* 2004). Así, se han detectado en *C. virginica* en Canadá (MCGLADDERY y STEPHENSON 1994) y en Estados Unidos (MEYERS 1981; FARLEY 1985; WINSTEAD y COURTNEY 2003). Además, también se han detectado papovavirus en *C. gigas* recientemente en Korea. Así, CHOI *et al.* (2004) detectaron la presencia de virus similares a papovavirus en tejidos gonadales. En este caso, aunque se observaron muchas mitocondrias y células espermáticas alrededor del cuerpo de inclusión, no se detectó ninguna reacción del hospedador tal como una infiltración hemocitaria. También se ha publicado la detección de papovavirus en *C. gigas* en Francia (GARCÍA *et al.* 2006) donde se observó que tanto los gametos masculinos como los femeninos estaban hipertrofiados y presentaban inclusiones basofílicas en el núcleo. Estudios de microscopía electrónica de transmisión revelaron que estas inclusiones presentaban partículas virales similares de las de los Papillomavirus o Polioma-virus (los dos grupos de Papovavirus). La frecuencia y la intensidad de infección fueron bajas y no se detectó una reacción del hospedador con lo que se sospecha que las partículas virales tenían un débil impacto en la ostra. Recientemente, se han detectado estos virus en *C. hongkongensis* en Asia (MOSS *et al.*, 2007) y en *C. gigas* en la costa de Alemania (WATERMANN *et al.* (2008) e Irlanda (CHESLETT *et al.* 2009). En este caso, aunque la infección se asoció con la presencia de mortalidades, no se detectó una reacción del bivalvo frente a la misma.

Aunque el impacto que estos virus tienen en las distintas especies de bivalvos parece bajo, no debemos olvidar las características oncogénicas de otros miembros de las familias Papillomaviridae y Polyomaviridae (VAN REGENMORTEL *et al.*, 2000). Por ejemplo, en *Mya arenaria* se



ha sospechado que estos virus estaban relacionados con la neoplasia gonadal (HARSHBARGER *et al.* 1979). Además del posible impacto patogénico se ha señalado la posibilidad de emplear estos virus en el desarrollo de líneas celulares de moluscos (GARCÍA *et al.* 2006).

4. ACTIVIDAD ANTIVIRAL EN MOLUSCOS BIVALVOS

A pesar de que no se han descrito moléculas similares a interferón en invertebrados, se han publicado varios trabajos sobre actividad antiviral de los extractos de distintas partes de su cuerpo, por ejemplo, en bivalvos, se encontró una actividad neutralizante de la hemolinfa de *Mya arenaria* frente al colifago T3 (BACHERE *et al.* 1990). Recientemente, se detectó que la hemolinfa de *C. gigas* inhibía la replicación del herpes simplex tipo 1 y de IPNV (OLICARD *et al.* 2005). Además, se ha descrito que los péptidos antimicrobianos presentes en los moluscos bivalvos, como son la mitilina o defensina de mejillón, presentan actividad antiviral (ROCH *et al.* 2004).

5. REFERENCIAS

- ABOELKHAIR, M., A. SIAH, K. F. CLARK, P. MCKENNA, J. PARISEAU, S. J. GREENWOOD, F. C. BERTHE y A. CEPICA, 2009 Reverse transcriptase activity associated with haemic neoplasia in the soft-shell clam *Mya arenaria*. *Dis. Aquat. Organ.* **84**: 57-63.
- ARZUL, I. y T. RENAULT, 2002 Herpèsvirus et bivalves marins. *Virologie* **6**: 169-174
- ARZUL, I., T. RENAULT, A. THÉBAULT y G. GÉRARD, 2002 Detection of oyster herpesvirus DNA and proteins in asymptomatic *Crassostrea gigas* adults. *Virus Res.* **84**: 151-160.
- AUFFRET, M. y M. PODER, 1986 Sarcomatous lesion in the cockle *Cerastoderma edule*. II. Electron microscopy study. *Aquaculture* **58**: 9-15.
- BACHERE, E., D. HERVIO, E. MIALHE y H. GRIZEL, 1990 Evidence of neutralizing activity against T3 coliphage in oyster *Crassostrea gigas* hemolymph. *Dev. Comp. Immunol.* **14**: 261-268.
- BATISTA, F. M., I. ARZUL, J. F. PEPIN, F. RUANO, C. S. FRIEDMAN, P. BOUDRY y T. RENAULT, 2006 Detection of ostreid herpesvirus 1 DNA by PCR in bivalve molluscs: a critical review. *J. Virol Methods.* **139**:1-11.



- BOWER, S. M., 2001 Synopsis of infectious diseases and parasites of commercially exploited shellfish: Assorted viruses detected in oysters and of unknown significance. ULR: http://www-sci.pac.dfo-mpo.gc.ca/shelldis/assortvirusoy_e.htm.
- BROWN, F., 1986 The classification and nomenclature of viruses: summary of results of meetings of the International Committee on Taxonomy of Viruses in Sendai, September 1984. *Intervirology* **25**: 140.
- BURGE, C. A., F. J. GRIFFIN y C. S. FRIEDMAN, 2006 Mortality and herpesvirus infections of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* in Tomales Bay, California, USA. *Dis. Aquat. Organ.* **72**: 31-43.
- CARBALLAL M. J., A. VILLALBA, D. IGLESIAS y P. M. HINE, 2003 Virus like particles associated with large foci of heavy hemocytic infiltration in cockles *Cerastoderma edule* from Galicia (NW Spain). *J. Invertebr. Pathol.* **84**: 234-237.
- CHESLETT, D., F. MCKIERNAN, C. HICKEY y E. COLLINS, 2009 Viral gametocytic hypertrophy of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* in Ireland. *Dis. Aquat. Organ.* **83**:181-5.
- CHOI, D. L., N. S. LEE, H. J. CHOI, M. A. PARK, S. E. MCGLADDERY y M. S. PARK, 2004 Viral gametocytic hypertrophy caused by a papova-like virus infection in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* in Korea. *Dis. Aquat. Organ.* **59**: 205-209.
- CHOU, H. Y., H. J. LI y C. F. LO, 1994 Pathogenicity of a birnavirus to hard clam (*Meretrix lusoria*) and effect of temperature stress on its virulence. *Fish Pathol.* **29**: 171-175.
- CHOU, H. Y., S. J. CHANG, H. Y. LEE y Y. C. CHIOU, 1998 Preliminary evidence for the effect of heavy metal cations on the susceptibility of hard clam (*Meretrix lusoria*) to clam birnavirus infection. *Fish Pathol.* **33**: 213-219.
- COFFIN, J., S. HUGHES y H. VARMUS, 1997 Retroviruses, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- COLLINS, C. M. y M. F. MULCAHY, 2003 Cell-free transmission of a haemic neoplasm in the cockle *Cerastoderma edule*. *Dis. Aquat. Organ.* **54**: 61-67.
- COMPS, M., 1978 Evolution des recherches et études récentes en pathologie des huîtres. *Oceanol. Acta* **1**, 255-262.
- COMPS, M., 1980 Les infections virales associées aux épizooties des huîtres du genre *Crassostrea*. International Council for the Exploration of the Sea. Spec. Meeting on Diseases of Commercially Important Marine Fish and Shellfish, Copenhagen No. 6.
- COMPS, M. y N. COCHENNEC, 1993 A herpes-like virus from the European oyster *Ostrea edulis* L. *J. Invertebr. Pathol.* **62**: 201-203.
- COMPS, M. y J. L. DUTHOIT, 1979 Infections virales chez les huîtres *Crassostrea angulata* (Lmk) et *C. gigas* (Th.). *Haliotis* **8**: 301-308.



- COMPS, M., J. R. BONAMI, C. VAGO y A. CAMPILLO, 1976 Une virose de l'huître portugaise (*Crassostrea angulata* Lmk). C. R. Hebd. Séanc. Acad. Sci. D **282**: 1991-1993.
- COMPS, M. y J. R. BONAMI, 1977 Infection virale associée à des mortalités chez l'huître *Crassostrea angulata* Th. C. R. Acad. Sci. D **285**: 1139-1140.
- COMPS, M., C. HERBAUT y A. FOUGEROSSE, 1999 Virus-like particles in pearl oyster *Pinctada margaritifera*. Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol. **19**: 85-88.
- CRESPO-GONZÁLEZ, C., H. RODRÍGUEZ-DOMÍNGUEZ, M. SOTO-BÚA, P. SEGADE, R. IGLESIAS, C. ARIAS-FERNÁNDEZ y J. M. GARCÍA-ESTÉVEZ, 2008 Virus-like particles in *Urastoma cyprinae*, a turbellarian parasite of *Mytilus galloprovincialis*. Dis. Aquat. Organ. **79**: 83-6.
- DA SILVA, P. M., T. RENAULT, J. FUENTES y A. VILLALBA, 2008 Herpesvirus infection in European flat oysters *Ostrea edulis* obtained from brood stocks of various geographic origins and grown in Galicia (NW Spain). Dis. Aquat. Organ. **78**: 181-188.
- DAVISON, A. J., B. L. TRUS, N. CHENG, A. C. STEVEN, M. S. WATSON, C. CUNNINGHAM, R.-M. LE DEUFF y T. RENAULT, 2005 A novel class of herpesvirus with bivalve hosts. J. Gen. Virol. **86**: 41-53.
- DELMAS, B., F. S. B. KIBENGE, J. C. LEONG, E. MUNDT, V. N. VAKHARIA y J. L. WU, 2005 Birnaviridae, In: Fauquet, Mayo, Maniloff, Desselberger, Ball (Eds.), Virus Taxonomy, 8th edn. Elsevier Ac. Press, London, pp. 561-569.
- DOBOS, P., B. J. HILL, R. HALLETT, D. T. KELLS, H. BECHT y D. TENINGES, 1979 Biophysical and biochemical characterization of five animal viruses with bisegmented double-stranded RNA genomes. J. Virol. **32**: 593-605.
- DONG, L.C., N. S. LEE, J. C. HEE, M. A. PARK, S. P. MI y S. E. MCGLADDERY, 2004 Viral gametocytic hypertrophy caused by a papova-like virus infection in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* in Korea. Dis. Aquat. Organ. **59**: 205-209.
- ELSTON, R. A., 1979 Virus-like particles associated with lesions in larval Pacific oysters (*C. gigas*). J. Invertebr. Pathol. **33**: 71-74.
- ELSTON, R., 1997 Bivalve mollusc viruses. World J. Microbiol. Biotechnol. **13**: 393-403.
- ELSTON, R. y M. T. WILKINSON, 1985 Pathology, management and diagnosis of oyster velar virus disease (OVVD). Aquaculture **48**: 189-210.
- ELSTON, R. A., M. L. KENT y A. S. DRUM, 1988 Transmission of hemic neoplasia in the bay mussel, *Mytilus edulis*, using whole cells and cell homogenate, Dev. Comp. Immunol. **12**: 719-727.
- ELSTON, R. A., J. D. MOORE y K. BROOKS, 1992 Disseminated neoplasia of bivalve molluscs. Rev. Aquat. Sci. **6**: 405-466.



- FARLEY, C. A., 1976 Ultrastructural observations on epizootic neoplasia and lytic virus infection in bivalve mollusks. *Prog. Exp. Tumor Res.* **20**: 283-294.
- FARLEY, C. A., 1978 Viruses and virus-like lesions in marine molluscs. *Mar. Fish. Rev.* **40**: 18-20.
- FARLEY, C. A., 1985 Viral gametocyte hypertrophy in oysters. In: Sindermann CJ (ed) Identification leaflets for diseases and parasites of fish and shellfish, No 25. ICES, Copenhagen, p 5.
- FARLEY, C. A., W. G. BANFIELD, J. R. G. KASNIC y W.S. FOSTER, 1972 Oyster herpes-type virus. *Science, Wash. DC* **178**: 759-760.
- FIGUERAS, A. y B. NOVOA, 2004 What has been going on in Europe in bivalve pathology? *Bull. Eur. Fish Pathol.* **24**: 16- 21.
- GARCIA, C., M. ROBERT, I. ARZUL, B. CHOLLET, J. P. JOLY, L. MIOSSEC, T. COMTET y F. BERTHE, 2006 Viral gametocytic hypertrophy of *Crassostrea gigas* in France: from occasional records to disease emergence? *Dis. Aquat. Organ.* **70**: 193-199.
- GREGORY, A., L. A. MUNRO, I. S. WALLACE, N. BAIN y R. S. RAYNARD, 2007 Detection of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) from the environment in the vicinity of IPNV-infected Atlantic salmon farms in Scotland. *J. Fish Dis.* **30**: 621-30.
- HARSHBARGER, J. C., S. V. OTTO y S. C. CHANG, 1979 Proliferative disorders in *Crassostrea virginica* and *Mya arenaria* from the Chesapeake Bay and intranuclear virus-like inclusions in *Mya arenaria* with germinomas from a Maine oil spill site. *Haliotis* **8**: 243-248.
- HILL, B. J. y K. WAY, 1995 Serological classification of infectious pancreatic necrosis (IPN) virus and other aquatic birnaviruses. *Annu. Rev. Fish Dis.* **5**: 55-77.
- HILL, B. J., 1976 Properties of a virus isolated from the bi-valve mollusk *Tellina tenuis*. In: Pagn, L.A. (Ed.), *Wildlife Diseases*. Plenum Press, New York, pp. 445-452.
- HINE, P. M., WESNEY, B. y B. E. HAY, 1992 Herpesvirus associated with mortalities among hatchery-reared larval Pacific oysters, *Crassostrea gigas*. *Dis. Aquat. Organ.* **12**: 135-142.
- HINE P. M. y T. THORNE, 1997 Replication of herpes-like viruses in haemocytes of adult flat oysters *Ostrea angasi* (Sowerby 1871): an ultrastructural study. *Dis. Aquat. Organ.* **29**: 197-204.
- HINE, P. M., 1997 Trends in research on diseases of bivalve molluscs. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.* **17**: 181-183.
- HINE, P. M., B. WESNEY y P. BESANT, 1998 Replication of herpes-like viruses in larvae of the flat oyster *Tiostrea chilensis* at ambient temperatures. *Dis. Aquat. Organ.* **32**: 161-171.



- JONES, J. B., P. D. SCOTTI, S. C. DEARING y B. WESNEY, 1996 Virus like particles associated with marine mussel mortalities in New Zealand. *Dis. Aquat. Organ.* **25**: 143-149.
- JOHN, K. R. y R. H. RICHARDS, 1999 Characteristics of a new birnavirus associated with a warm-water fish cell line, *J. Gen. Virol.* **80**: 2061-2065.
- KENT, M. L., M. T. WILKINSON, A. S. DRUM y R. A. ELSTON, 1991 Failure of transmission of hemic neoplasia of bay mussels, *Mytilus trossulus*, to other bivalve species. *J. Invertebr. Pathol.* **57**: 435-436.
- KITAMURA, S., S. JUNG y S. SUZUKI, 2000 Seasonal change of infective state of marine birnavirus in Japanese pearl oyster *Pinctada fucata*. *Arch. Virol.* **145**: 2003-2014.
- LE DEUFF, R.-M. y T. RENAULT, 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., T. RENAULT y A. GÉRARD, 1996 Effects of temperature on herpes-like virus detection among hatchery-reared larval Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Dis. Aquat. Organ.* **24**: 149-157.
- LEES, D., 2000 Viruses and bivalve shellfish. *Int. J. Food Microbiol.* **59**: 81-116.
- LO, C. F., Y. W. HONG, S. Y. HUANG y C. H. WANG, 1988 The characteristics of the virus isolated from the gill of clam, *Meretrix lusoria*. *Fish Pathol.* **23**: 147-154.
- LUPIANI, B., F. M. HETRICK y S. K. SAMAL, 1993 Genetic analysis of Aquareoviruses using RNA±RNA blot hybridization. *Virology* **197**: 475-479.
- MCGLADDERY, S. E., 1999 Shellfish diseases (bacterial, viral and fungal). In *Fish diseases and disorders. Vol. 3. Viral bacterial and fungal infections* (ed. P.T.K.Woo and D.W. Bruno), pp. 723-842. Wallingford: CABI Publishing.
- MCGLADDERY, S. E. y M. F. STEPHENSON, 1994 A viral infection of the gonads of eastern oyster (*Crassostrea virginica*) from Atlantic Canada. *Bull. Aquac. Assoc. Can.* **94**: 84-86.
- MEYERS, T. R., 1979 A reo-like virus isolated from juvenile American oysters (*Crassostrea virginica*). *J. Gen. Virol.* **46**: 203-212.
- MEYERS, T. R., 1980 Experimental pathogenicity of reovirus 13p2 for juvenile American oysters *Crassostrea virginica* (Gmelin) and bluegill fingerlings *Lepomis macrochirus* (Rafinesque). *J. Fish Dis.* **3**: 187-201.
- MEYERS, T. R., 1981 Endemic diseases of cultured shellfish of Long Island, New York: adult and juveniles American oysters (*Crassostrea virginica*) and hard clams (*Mercenaria mercenaria*). *Aquaculture* **22**: 305-330.
- MEYERS, T. R., 1984 Marine bivalve mollusks as reservoirs of viral finfish pathogens: significance to marine and anadromous finfish aquaculture. *Mar. Fish. Rev.* **46**: 14-17.



- MOSS, J. A., E. M. BURRESON, J. F. CORDES, C. F. DUNGAN, G. D. BROWN, A. WANG, X. WU y K. S. REECE, 2007 Pathogens in *Crassostrea ariakensis* and other Asian oyster species: implications for non-native oyster introduction to Chesapeake Bay. *Dis. Aquat. Organ.* **77**: 207-223.
- NISHIDA, T., H. KIMURA, M. SAITOH, M. SHINOHARA, M. KATO, S. FUKUDA, T. MUNEMURA, T. MIKAMI, A. KAWAMOTO, M. AKIYAMA, Y. KATO, K. NISHI, K. KOZAWA y O. NISHIO, 2003 Detection, quantitation, and phylogenetic analysis of noroviruses in Japanese oysters. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 5782-5786.
- NOBIRON, I., M. GALLOUX, C. HENRY, C. TORHY, P. BOUDINOT, N. LEJAL, B. DA COSTA y B. DELMAS, 2008 Genome and polypeptides characterization of Tellina virus 1 reveals a fifth genetic cluster in the Birnaviridae family. *Virology* **371**: 350-361.
- NOVOA, B. y A. FIGUERAS, 2000 Virus-like particles associated with mortalities of the carpet-shell clam *Ruditapes decussatus*. *Dis. Aquat. Organ.* **39**: 147-149.
- OLICARD, C., T. RENAULT, C. TORHY, A. BENMANSOUR y N. BOURGOUNGON, 2005 Putative antiviral activity in hemolymph from adult Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Antiviral Res.* **66**: 147-152.
- OPRANDY, J. J. y P. W. CHANG, 1983 5-Bromodeoxyuridine induction of hematopoietic neoplasia in the soft-shell clam, *Mya arenaria*. *J. Invertebr. Pathol.* **42**: 196-206.
- OPRANDY, J. J., P. M. CHANG, A. D. PRONOVOST, K. R. COOPER, R. S. BROWN y V. J. YATES, 1981 Isolation of viral agent causing hemopoietic neoplasia in the soft shell clam, *Mya arenaria*. *J. Invertebr. Pathol.* **38**: 45-51.
- PEPIN, J. F., A. RIOU y T. RENAULT, 2008 Rapid and sensitive detection of ostreid herpesvirus 1 in oyster samples by real-time PCR. *J. Virol. Methods* **149**: 269-76.
- POTASMAN, I., A. PAZ y M. ODEH, 2002 Infectious outbreaks associated with bivalve shellfish consumption: A worldwide prespective. *Clin. Infect. Dis.* **35**: 921-928.
- RASMUSSEN, L. P. D., 1986 Virus-associated granulocytomas in the marine mussel, *Mytilus edulis*, from three sites in Denmark. *J. Invertebr. Pathol.* **48**: 117-123.
- RENAULT, T., 1998 Infections herpétiques chez les invertébrés : détection de virus de type herpès chez les mollusques bivalves marins. *Virologie* **2**: 401-403.
- RENAULT, T. y B. NOVOA, 2004 Viruses infecting bivalve molluscs. *Aquat. Living Resour.* **17**: 397-409.
- RENAULT, T., N. COCHENNEC, R.-M. LE DEUFF y B. CHOLLET, 1994a Herpes-like virus infecting Japanese oyster (*C. gigas*) spat. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.* **14**: 64-66.

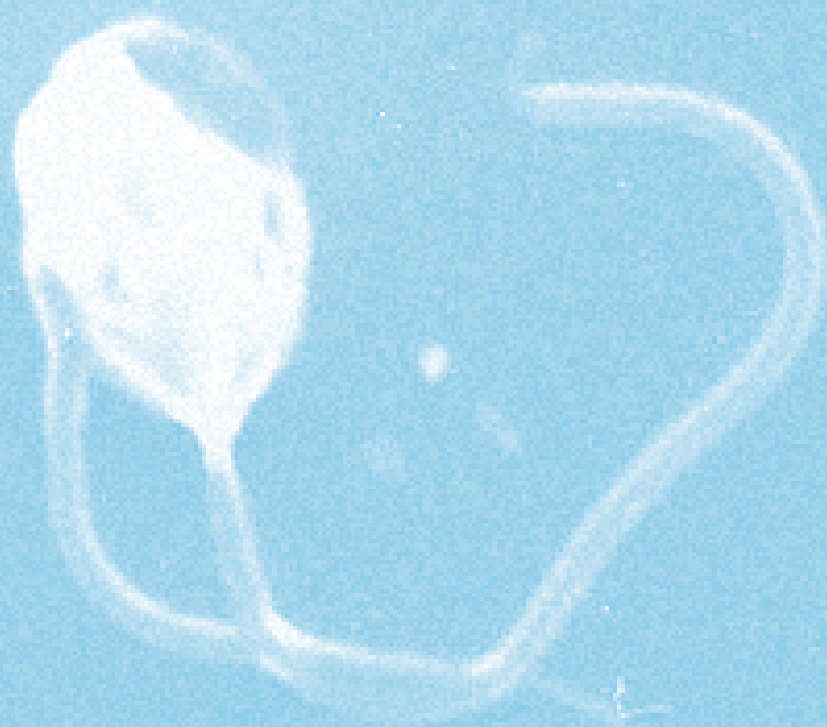


- RENAULT, T., R.-M. LE DEUFF, N. COCHENNEC y P. MAFFART, 1994b Herpesviruses associated with mortalities among Pacific oyster, *C. gigas*, in France - Comparative study. *Rev. Med. Vet.* **145**: 735-742.
- RENAULT, T., R.-M. LE DEUFF, B. CHOLLET, N. COCHENNEC y A. GÉRARD, 2000 Concomitant herpes-like virus infections in hatchery reared larvae and nursery-cultured spat *Crassostrea gigas*, *Ostrea edulis*. *Dis. Aquat. Organ.* **42**: 173-183.
- RIVAS, C. C., C. P. CEPEDA, C. P. DOPAZO, B. NOVOA, M. NOYA y J. L. BARJA, 1993 Marine environment as reservoir for birnaviruses from poikilothermic animals. *Aquaculture* **115**: 183-194.
- ROCH, P. H., A. BESCHIN y E. BERNARD, 2004 Anti-protozoa and antiviral activities of non-cytotoxic truncated and variant analogues of mussel defensin. *eCAM*, **1**: 167-174.
- ROMALDE, J. L., M. L. VILARIÑO, R. BEAZ, J. M. RODRÍGUEZ, S. DÍAZ, A. VILLALBA y M. J. CARBALLAL, 2007 Evidence of retroviral etiology for disseminated neoplasia in cockles (*Cerastoderma edule*). *J. Inv. Pathol.* **94**: 95-101.
- SAUVAGE, C., J. F. PÉPIN, S. LAPÈGUE, P. BOUDRY y T. RENAULT, 2009 Ostreid herpes virus 1 infection in families of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, during a summer mortality outbreak: differences in viral DNA detection and quantification using real-time PCR. *Virus Res.* **142**: 181-187.
- SUNILA, I., 1994 Viral transmission and tumor promotion of sarcoma in the softshell, *Mya arenaria*. In: A. Rosenfield, F.G. Kern and B.J. Keller, Editors, *Invertebrate Neoplasia: Initiation and Promotion Mechanisms*, U.S. Department of Commerce, Woods Hole, MA pp. 11-13.
- SUZUKI, S., N. HOSONO y R. KUSUDA, 1997 Detection of aquatic birnavirus gene from marine fish using a combination of reverse transcription, nested PCR. *J. Mar. Biotechnol.* **5**: 205-209.
- SUZUKI, S., M. KAMAKURA y R. KUSUDA, 1998 Isolation of birnavirus from Japanese Pearl oyster *Pinctada fucata*. *Fish. Sci.* **64**: 342-343.
- TWOMEY E. y M. F. MULCAHY, 1988 Transmission of a sarcoma in the cockle *Cerastoderma edule* (Bivalvia; Mollusca) using cell transplants, *Dev. Comp. Immunol.* **12**: 195-200.
- VAN REGENMORTEL, H. V., C. M. FAUQUET, D. H. L. BISHOP, E. B. CARSTENS, y col., 2000 Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses. Seventh report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Academic Press, San Diego, CA, 241-251.
- WATERMANN, B. T., M. HERLYN, B. DAEHNE, S. BERGMANN, M. MEEM- KEMN y H. KOLODZEY, 2008 Pathology and mass mortality of Pacific oysters, *Crassostrea*



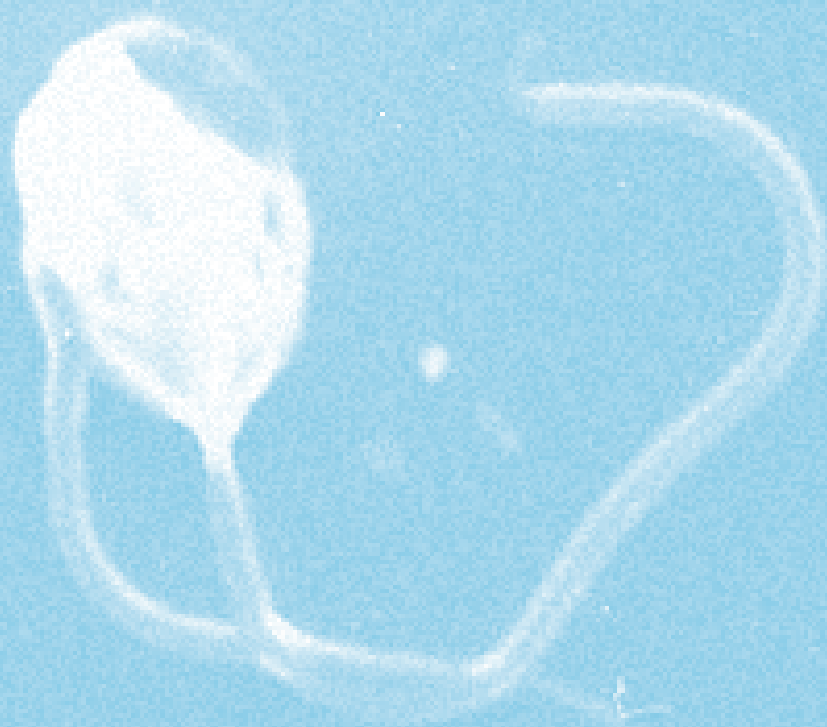
gigas (Thunberg), in 2005 at the East Frisian coast, Germany. J. Fish Dis. **31**: 621-630.

WINSTEAD, J. T. y L. A. COURTNEY, 2003 Ovacystis-like condition in the eastern oyster *Crassostrea virginica* from the northeastern Gulf of Mexico. Dis. Aquat. Organ. **53**: 89-90.



4

ENFERMEDADES BACTERIANAS DE MOLUSCOS BIVALVOS



ENFERMEDADES BACTERIANAS DE MOLUSCOS BIVALVOS

Romalde J. L. y Prado S.

Departamento de Microbiología y Parasitología.
Facultad de Biología-Centro de Investigaciones Biológicas (CIBUS).
Universidad de Santiago de Compostela. 15782 Santiago de Compostela

Resumen

Uno de los problemas de la acuicultura de moluscos bivalvos son los repetidos episodios de mortalidad, que merman gravemente a la producción. Estos brotes de enfermedad afectan tanto a las fases larvarias y post-larvarias en criaderos, como a los juveniles y adultos cultivados en medio natural. En el caso de los criaderos, las mortalidades masivas suponen la pérdida completa de los lotes de producción, con graves implicaciones económicas. En la mayoría de los casos, los estudios han demostrado que se trata de patologías bacterianas, destacando de entre los agentes responsables los miembros del género *Vibrio*. En lo que se refiere a las fases cultivadas en el mar, aunque inicialmente se prestó atención sólo a las patologías causadas por protozoos parásitos, en los últimos años se han descubierto diferentes enfermedades de origen bacteriano que afectan a la supervivencia de los cultivos.

En este capítulo se revisan los conocimientos actuales sobre el tema, detallando los principales patógenos bacterianos que afectan tanto a las fases larvarias y post-larvarias cultivadas en criadero, como a los juveniles y adultos cultivados en medio natural. Se describen los signos característicos de las enfermedades causadas por las diferentes especies bacterianas, el rango de hospedadores susceptibles y su distribución geográfica. Además, se incluye un apartado que analiza los



métodos de detección empleados, prestando especial atención a los nuevos métodos moleculares de identificación, que implican un gran avance en el estudio y control de las enfermedades de origen bacteriano que afectan a los cultivos de bivalvos.

Abstract

*One of the main problems in aquaculture of molluscan bivalves is the repetitive episodes of mortality, which seriously reduce the production. These outbreaks of disease affect larval and post-larval stages in hatcheries, as well as juvenile and adults cultured in natural environment. In the case of hatcheries, the massive mortalities involve the complete loss of the stocks of production, with serious economic consequences. In most of the cases, the studies have demonstrated that the problems are caused by bacterial pathologies, being the main etiological agents members of genus *Vibrio*. In relation to the stages cultured in the sea, despite of the initial attention only to the pathologies caused by parasitic protozoa, in the last years diseases with bacterial origin, affecting cultures survival, have been discovered.*

In this chapter, the actual knowledge about this subject is reviewed, detailing the main bacterial pathogens affecting larval and post-larval stages cultured in hatchery, as well as juveniles and adults cultured in natural environment. The characteristic signs of the diseases caused by the different bacterial species are described, as well as their host range and geographical distribution. Besides, a section with the analysis of the methods of detection is included, with special attention to the new molecular methods for identification, which imply a great advance in the study and control of bacterial disease affecting to bivalve cultures.

1. INTRODUCCIÓN

La acuicultura de moluscos ha pasado de ser una industria tradicional, centrada en economías familiares, a constituirse como una industria moderna, en algunos casos altamente tecnificada, con empresas competitivas y con un creciente grado de diversificación. Su contribución al desarrollo económico de muchas regiones costeras es incuestionable (PAZÓ 1987; GUERRA et al. 1993). El impacto sobre este



sector de brotes severos de enfermedades es tal que, en muchas ocasiones, ha limitado la producción en un área determinada, así como el comercio entre distintas zonas geográficas. Estos brotes pueden producirse, en ocasiones, debido a movimientos de stocks infectados, siendo un problema habitualmente asociado al cultivo de moluscos. Las enfermedades, ya sean bacterianas, virales o parasitarias, pueden afectar en diferentes estadios, de larva a adulto, independientemente de la técnica de cultivo utilizada.

Hasta hace relativamente poco tiempo, la mayoría de las enfermedades de bivalvos descritas se debían a protozoos, como *Bonamia*, *Haplosporidium*, *Marteilia* y *Perkinsus* (ampliamente tratados en otros capítulos), y en menor medida a hongos y virus (LAUCKNER 1983; SINDERMANN 1990; BOWER *et al.* 1994; MCGLADDERY 1999; PAILLARD *et al.* 2004). A lo largo de este capítulo se revisarán las principales enfermedades bacterianas de los bivalvos marinos, tanto de estadios larvarios, como de juveniles y adultos, incluyendo la sintomatología característica de cada una de ellas, su etiología y patogenicidad del agente causal, así como aspectos de su patogénesis. Por último, se analizarán los últimos avances en el desarrollo de métodos moleculares de identificación, rápidos y fiables, y su utilidad e importancia en la prevención y control de enfermedades de bivalvos con etiología bacteriana.

2. BACTERIAS PATÓGENAS DE LARVAS DE BIVALVOS

2.1. Cultivo de bivalvos en criadero. Problemática general

Los criaderos son actualmente la principal fuente de semilla para la acuicultura de muchos moluscos bivalvos de valor económico, entre los que se encuentran diferentes especies de ostras, almejas o pectínidos. La obtención de semilla mediante puesta inducida ha sido estudiada desde el punto de vista técnico para establecer las condiciones bajo las que se debe realizar. Así, la influencia de factores como la salinidad, la temperatura, la densidad de los cultivos, los tiempos de acondicionamiento, la alimentación... han sido objeto de numerosos trabajos. Sin



embargo, hay un gran desconocimiento de los problemas patológicos asociados, a diferencia de acuiculturas como las de peces o crustáceos, debido en buena medida a la falta de estudios sistemáticos.

Los episodios de altas mortalidades se dan a menudo en estas instalaciones, sin que se busquen en muchos casos los agentes causantes. Suelen traducirse en pérdidas de lotes de producción completos, con la consiguiente implicación económica y falta de regularidad en el suministro de semilla. Las epizootias de consecuencias fatales están ampliamente recogidas en la bibliografía, como episodios intermitentes que dificultan este tipo de cultivos (TUBIASH *et al.* 1965, 1975; BROWN y LOSEE 1978; DISALVO *et al.* 1978; PRIEUR y CARVAL 1979; ELSTON y LEIBOVITZ 1980; BROWN 1981a; GARLAND *et al.* 1983; ELSTON 1984; SUGUMAR *et al.* 1998; PRADO *et al.* 2005).

Las condiciones óptimas de cultivo de bivalvos (densidad, temperatura, carga de materia orgánica, concentración de nutrientes inorgánicos, etc.) favorecen el crecimiento y proliferación de bacterias y la acumulación de sus metabolitos (MURCHELANO *et al.* 1975; TUBIASH 1975; PRIEUR y CARVAL 1979; ELSTON 1984; BROWN y TETTELACH 1988; ARAYA *et al.* 1999). El desarrollo de la enfermedad en muchas ocasiones se desencadena por un aumento de la susceptibilidad de las larvas a las infecciones debido a factores de estrés externos, como variaciones en la calidad del alimento o del agua, contaminación por exceso de restos orgánicos, etc. Estos factores facilitan el crecimiento selectivo de bacterias que pueden resultar patógenas para los cultivos al superar el umbral crítico de concentración en la población larvaria (DISALVO *et al.* 1978; TUBIASH y OTTO 1986). Además, una fase característica del desarrollo larvario de bivalvos, como es la fijación, conlleva la deposición temporal en el fondo del tanque y la exposición de las larvas a altas concentraciones de bacterias patógenas, asociadas a las superficies, a larvas muertas y moribundas, y a los detritos depositados allí (DISALVO *et al.* 1978; SUTTON y GARRICK 1993).

Por tanto, los criaderos son capaces de obtener larvas de bivalvos en condiciones controladas, pero con mucha frecuencia, cultivos alimentados correctamente y con un crecimiento normal mueren sin causa aparente, convirtiendo la producción comercial en una realidad errática. Aunque son muchas las variables que pueden influir, la implicación



de poblaciones bacterianas en estas mortalidades repentinas y catastróficas es un hecho demostrado que precisa ser tenido en cuenta.

2.2. Patógenos oportunistas

Los agentes responsables de las mortalidades masivas en cultivos larvarios de bivalvos en criadero forman parte en muchas ocasiones de la microbiota normal. Los potenciales patógenos bacterianos están ampliamente distribuidos como saprófitos o comensales de organismos marinos (TUBIAH *et al.* 1965) y no asociados exclusivamente a individuos enfermos. Estas bacterias son tolerables a ciertos niveles, si otros factores como los medioambientales son favorables (JEFFRIES 1982).

ELSTON (1984) define «patógeno oportunista» como «microorganismo de vida libre, pero que requiere condiciones favorables para proliferar, en el sistema o asociado al hospedador, y causar enfermedad. Frecuentemente causan infecciones secundarias, que siguen al estrés causado por factores menos aparentes como la densidad larvaria, la temperatura, la tensión de oxígeno...». Son numerosas las referencias en la bibliografía a este término en relación con episodios de mortalidades (TUBIAH y OTTO 1986; SUGUMAR *et al.* 1998; PRADO *et al.* 2005).

2.3. Relación bacterias-mortalidades

La asociación entre bacterias y problemas de crecimiento y mortalidades en criaderos de bivalvos está ampliamente documentada, desde que WALNE (1956) establece que las poblaciones bacterianas en cultivos larvarios pueden ser 100 veces mayores que en el mar y ese mismo año DAVIS y CHANLEY (1956) demuestran que las mortalidades larvarias se reducen a veces con el uso de antibióticos. Posteriormente, WALNE (1958) aporta la primera evidencia del efecto patógeno de bacterias en larvas de bivalvos, relacionando estas con los problemas de crecimiento de larvas de ostra. Sugiere dos posibles modos de interacción bacterias-larvas. Uno sería el de bacterias patógenas, causando directas de enfermedades, mientras el otro correspondería a aquellas que, siendo componentes habituales del agua de mar, dañaran de alguna forma a las larvas, bien uniéndose a la concha o a los tejidos y

multiplicándose, bien por liberación de metabolitos al medio. En 1959, GUILLARD demuestra por primera vez la relación entre mortalidades en larvas de *Mercenaria mercenaria* y aislados bacterianos concretos.

TUBIASH *et al.* (1965) describen por primera vez los síntomas clínicos de una enfermedad que denominan «necrosis bacilar», causada por una vibriosis experimental en larvas de diferentes especies de bivalvos. Este término aparece referido en numerosos estudios posteriores (BROWN y LOSEE 1978; DISALVO *et al.* 1978; LODEIROS *et al.* 1987; SÁINZ *et al.* 1998; LUNA-GONZÁLEZ *et al.* 2002).

ELSTON y LEIBOVITZ (1980) describen tres tipos de patogénesis (I, II y III), basándose en sus experimentos con larvas de *Crassostrea virginica* inoculadas con dos *Vibrio* sp., que cursan con diferentes signos y afectan a distintos estadios del desarrollo larvario.

Otros muchos estudios han confirmado esta relación entre bacterias y enfermedad en diversas especies de moluscos bivalvos, incluyendo ostras (*Ostrea* y *Crassostrea*), almejas (*Mercenaria* y *Ruditapes*), pectínidos (*Aequipecten*, *Argopecten*, *Pecten*, *Nodipecten*, *Chlamys* y *Eu-vola*), mejillones (*Mytilus*), berberecho (*Cerastoderma*), y otras especies como *Teredo navalis*, *Tridacna gigas* o *Atrina maura*.

TABLA 1.

Resumen de la bibliografía publicada sobre patologías larvarias de moluscos bivalvos causadas por bacterias del género *Vibrio*. *Abreviaturas de los géneros: A = *Argopecten*, Ae = *Aequipecten*, C = *Crassostrea*, M = *Mercenaria*, My = *Mytilus*, N = *Nodipecten*, O = *Ostrea*, P = *Pecten*, R = *Ruditapes*.

Autor	Año	Hospedador*	Especie bacteriana	Efecto
Guillard	1959	M. mercenaria	Vibrio sp.	Gránulos y anomalías en el velo Mortalidad
Tubiash et al.	1965	M. mercenaria C. virginica O. edulis Ae. irradians Teredo navalis	V. tubiashii V. alginolyticus Vibrio sp.	Mortalidad
Brown	1973	C. virginica	Vibrio sp.	Mortalidad
		C. virginica	Vibrio sp.	Problemas de crecimiento Mortalidad

(Continúa)



TABLA 1. (Continuación)

Autor	Año	Hospedador*	Especie bacteriana	Efecto
Brown y Losee	1978	<i>C. virginica</i>	<i>V. anguillarum</i> -like	Mortalidad Efecto teratogénico
DiSalvo <i>et al.</i>	1978	<i>O. edulis</i> <i>C. gigas</i>	<i>V. anguillarum</i> -like	Mortalidad
Elston y Leibovitz	1980	<i>C. virginica</i>	<i>Vibrio</i> sp.	Mortalidad Disfunción velar
Brown	1981a	<i>C. virginica</i>	<i>V. anguillarum</i> -like	Mortalidad
Jeffries	1982	<i>C. gigas</i> <i>O. edulis</i>	<i>V. alginolyticus</i> <i>V. splendidus</i>	Mortalidad
Brown	1983	<i>C. virginica</i>	<i>Vibrio</i> sp.	Mortalidad
Garland <i>et al.</i>	1983	<i>C. gigas</i>	<i>Vibrio</i> spp.	Mortalidad
Brown y Roland	1984	<i>C. virginica</i> <i>M. mercenaria</i>	<i>Vibrio</i> sp.	Malformación Mortalidad
Tubiash y Otto	1986	<i>C. virginica</i> <i>M. mercenaria</i> <i>O. edulis</i> <i>Ae. irradians</i> <i>Teredo navalis</i>	<i>V. anguillarum</i> <i>V. alginolyticus</i>	Mortalidad
Lodeiros <i>et al.</i>	1987	<i>O. edulis</i>	<i>Vibrio</i> sp.	Mortalidad
Brown y Tettelbach	1988	<i>M. mercenaria</i> <i>C. virginica</i>	<i>V. anguillarum</i> -like	Mortalidad
Sutton y Garrick	1993	<i>Tridacna gigas</i>	<i>Vibrio</i> spp.	Mortalidad
Riquelme <i>et al.</i>	1995	<i>A. purpuratus</i>	<i>V. anguillarum</i> (VAR)	Inhibición de la natación Mortalidad
Nicolas <i>et al.</i>	1996	<i>P. maximus</i>	gr. <i>V. splendidus</i> <i>Vibrio</i> sp. (<i>V. pectenicida</i>)	Mortalidad
		<i>C. gigas</i>	gr. <i>V. splendidus</i>	Mortalidad
Riquelme <i>et al.</i>	1996	<i>A. purpuratus</i>	<i>V. alginolyticus</i>	Mortalidad
Sáinz <i>et al.</i>	1998	<i>A. ventricosus</i>	<i>V. alginolyticus</i>	Mortalidad
Sugumar <i>et al.</i>	1998	<i>C. virginica</i>	<i>V. splendidus</i> II	Mortalidad
Luna-González <i>et al.</i>	2002	<i>A. ventricosus</i> <i>N. subnudosus</i> <i>C. gigas</i> <i>Atrina maura</i>	<i>V. alginolyticus</i>	Mortalidad

(Continúa)

TABLA 1. (Continuación)

Autor	Año	Hospedador*	Especie bacteriana	Efecto
Anguiano-Beltrán et al.	2004	<i>My. galloprovincialis</i>	<i>V. alginolyticus</i>	Subletal
Estes et al.	2004	<i>C. gigas</i>	<i>Vibrio</i> spp.	Mortalidad
Gómez-León et al.	2005	<i>R. decussatus</i>	<i>V. splendidus</i> II <i>V. alginolyticus</i>	Mortalidad
Prado et al.	2005	<i>O. edulis</i>	<i>V. neptunius</i> <i>V. ostreicida</i> <i>Vibrio</i> spp.	Mortalidad

2.4. Vibriosis

El género *Vibrio* incluye a muchos de los principales patógenos de la acuicultura marina, tanto de peces como de crustáceos y moluscos.

El historial de su relación con los problemas en cultivos larvarios de bivalvos comienza con la descripción de la enfermedad observada por GUILLARD (1959) en la especie *M. mercenaria*, causada por la inoculación ($10^6/\text{ml}$) de un aislado obtenido de larvas moribundas. Los signos que observa son la distensión y el desprendimiento del velo, y la aparición de estrías en el cuerpo, para terminar con mortalidades por encima del 70%. Un dato curioso es que los inóculos de esta misma bacteria filtrados o sometidos a tratamiento térmico no causan mortalidad, pero sí un menor crecimiento y el cese de la alimentación. Como mecanismo de acción sugiere la necesidad del contacto o la invasión por la bacteria activa, más que una acción mediada por exotoxinas, ya que se aprecian bacterias vivas alrededor de las larvas moribundas, y que el filtrado o la bacteria muerta no causan mortalidades. Pero los problemas de crecimiento que se observan en estos dos últimos casos, hacen que el autor no descarte el efecto negativo de metabolitos bacterianos, al menos cuando se acumulan grandes cantidades. Demuestra además que la patogenicidad es independiente de la temperatura y del medio en que se cultive la bacteria.

TUBIAH et al. (1965) establecen por vez primera la secuencia de signos de la enfermedad causada por tres aislados bacterianos pertenecientes al género *Vibrio*, obtenidos de larvas moribundas de *M.*



mercenaria y *Crassostrea virginica*, inoculándolas en el agua de cultivos larvarios (10^6 /ml) de *M. mercenaria*, *C. virginica*, *Ostrea edulis*, *Aequipecten irradians* y *Teredo navalis*.

Acuña el término «necrosis bacilar» para denominar la enfermedad, cuyos primeros signos se manifiestan a las 4-5 horas, con reducción de la movilidad y tendencia a permanecer quiescentes con el velo extendido. Aparecen grupos puntuales de bacterias en los márgenes de las larvas, con aspecto de enjambres, lo que lleva a los autores a denominar el fenómeno como «swarming» bacteriano. A las 8 horas hay muerte con necrosis granular. Se ven velos desprendidos que mantienen la actividad ciliar. Pueden proliferar ciliados carroñeros, como invasores secundarios.

No establecen la ruta de infección, pero apuntan que las pocas larvas malformadas que aparecen son las últimas en mostrar signos de enfermedad y las que más sobreviven. Como estos individuos anormales raramente se alimentan, postulan que quizá la invasión inicial sea a través del tracto digestivo.

Ensayos de inoculación masiva de adultos con las mismas bacterias demuestran que estos no son susceptibles, ni siquiera a especies bacterianas que son patógenas para fases larvarias (*M. mercenaria* y *C. virginica*). En esta misma línea se desarrolla un trabajo posterior con adultos de *C. virginica* (TUBIASH 1974) que confirma la marcada resistencia de los adultos a los patógenos larvarios.

Los aislados causantes de la necrosis bacilar se caracterizaron posteriormente (TUBIASH *et al.* 1970), identificándose como *V. alginolyticus*, *Vibrio* sp. y la nueva especie *V. tubiashii* (HADA *et al.* 1984).

Nuevos ensayos (TUBIASH y OTTO 1986) realizados con las mismas especies larvarias y cepas de *V. anguillarum* y *V. alginolyticus* aisladas de larvas de *M. mercenaria* y *C. virginica* enfermas, rindieron resultados idénticos a los explicados anteriormente, con el mismo desarrollo de la enfermedad.

BROWN (1973) realiza un estudio con embriones y larvas de diferentes edades (2 días y 2 semanas, respectivamente) de *C. virginica*, inoculando aislados obtenidos de larvas de *C. virginica* y *M. mercenaria*, así como de materia particulada presente en el agua de mar. Como resultado algunas cepas, pertenecientes al género *Vibrio*, causan



problemas de desarrollo (protusión del velo o formación incompleta de la concha) o mortalidades en los embriones. En ocasiones observa que las larvas continúan creciendo hasta que son invadidas por las bacterias y mueren, mientras en otras hay un retraso del crecimiento y los individuos aparecen más claros, debido a que no se alimentan. En general, hay una mayor susceptibilidad de los embriones, que se justifica por la protección que la concha da a las larvas o por una mayor tolerancia de estas a las bacterias. Coincide con TUBIASH *et al.* (1965) en la aparición de protozoos ciliados invadiendo los tejidos necrosados, oportunistas que proliferan a expensas de las larvas debilitadas, pero no observa «swarming» bacteriano. Aunque el mecanismo de infección no parece claro, la inocuidad de los inóculos filtrados o tratados térmicamente apunta a una invasión bacteriana directa, más que a la actuación de toxinas.

Estudia también una enfermedad en un criadero de *C. virginica*, que muestra los primeros signos a los diez días de cultivos, sin retraso de crecimiento previo, y causa el colapso total en sólo una semana (BROWN y LOSEE 1978). También observa «swarming» y la presencia de ciliados entre las larvas moribundas. Aíslan una bacteria *V. anguillarum*-like, presente en el agua pero en números muy bajos, que utilizan para ensayos de inoculación. En este caso, tanto las células como el filtrado resultan tóxicos, pero no el inóculo tratado térmicamente, lo que indicaría una toxina proteínica. Nuevos estudios con diferentes *Vibrio* sp. (BROWN 1983; BROWN y ROLAND 1984) apuntan también a un mecanismo de infección sin necesidad de invasión bacteriana, mediado por exotoxinas que se acumulan en las larvas por la alimentación.

La enfermedad sigue la progresión descrita para la necrosis bacilar, con algún retraso en la secuencia de signos de enfermedad que se puede achacar a la utilización de concentraciones menores. No hay sin embargo «swarming», por lo que no parece que se facilite el ataque de otras bacterias, ni que sea necesaria una invasión masiva para la necrosis. La bacteria se une al velo, deformándolo o incluso haciendo que se desprenda, y una vez que penetra en la larva se multiplica rápidamente. A dosis altas se alcanzan desarrollos anormales de hasta el 56.8%, quizá por permitir la acumulación de algún metabolito potencialmente teratogénico.



La aparición de los primeros signos al cabo de 10 días de cultivo estaría justificada por la presencia del agente responsable a baja concentración inicial. A esta presencia a baja concentración, más que a su ausencia, puede ser debido también el que no se aísle el patógeno del agua de cultivo; mientras que la escasa recuperación del agua de larvas infectadas parece una consecuencia de la invasión de las larvas (BROWN 1981a; BROWN y TETTELACH 1988).

Con los mismos signos de la necrosis bacilar refieren DISALVO *et al.* (1978) la enfermedad sufrida por larvas de *O. edulis* y *C. gigas*. Los ensayos realizados con un aislado *V. anguillarum*-like en larvas de ostra plana confirman su patogenicidad. Describe el fenómeno de «spotting», la aparición de gran número de larvas agregadas en el fondo de los tanques, que beneficia a las bacterias ya que los detritos (heces, comida sedimentada) pueden estimular su crecimiento y promover la infección. Una toxina inhibidora de la natación podría ser la responsable.

En 1980, ELSTON y LEIBOVITZ detallan minuciosamente tres tipos de patogénesis, basándose en experimentos realizados con larvas de *C. virginica* inoculadas con dos *Vibrio* sp. aislados de epizootias larvares.

La patogénesis tipo I afecta a todos los estadios. La patogenicidad resulta directamente de la capacidad de las células bacterianas de unirse al periostraco larvario y al interior de la concha. Las células bacterianas crecen a lo largo de la concha, invaden el tejido del manto adyacente como vía de entrada, se expanden a lo largo del manto y penetran la cavidad visceral. El proceso llega a ser irreversible en un estadio temprano porque la reparación de los daños del manto periférico especializado en la formación de la concha no es posible.

Las larvas, sedentarias, se exponen a niveles bacterianos elevados asociados al sustrato y apenas se alimentan. Algunas extienden el velo parcial y periódicamente. Las pocas larvas activas muestran anomalías en el velo (pérdida de las células del anillo ciliar preoral, grados variables de deformidad velar). Las larvas (3-5 días) contienen formas libres esféricas en el interior del área periférica de la cavidad del manto. La disrupción del manto e infección de la cavidad visceral altera las funciones reguladoras asociadas, llevando a la muerte.



La patogénesis tipo II se puede ver en el estadio de larva velíger temprana. Las larvas continúan activas, mostrando daños progresivos en el velo, consistentes en la pérdida de la textura normal de la cubierta celular y el redondeamiento y pérdida de las células ciliadas. Se mueven con los pocos cilios que conservan, que no son haces de cilios (cirri) del anillo ciliar principal sino cilios individuales. Como resultado los patrones natatorios son anormales: velocidad, movimientos erráticos y giros en círculos de diámetro más pequeño de lo normal. El músculo retractor se suelta y el velo permanece extendido (las larvas parecen incapaces de retraerlo). A medida que la enfermedad progresa, se ven cada vez más velos separados o fragmentos. Se observan también animales sedentarios con restos de velo no funcional.

La disfunción velar implica una pérdida de movilidad, de actividad alimenticia y problemas en los niveles de intercambio respiratorio y de metabolitos. Como la larva continúa activa, la falta de nutrientes es un factor clave. Afecta principalmente a estadios jóvenes, con menores reservas nutritivas.

La patogénesis Tipo III se corresponde con el estadio de velíger tardía. Estas larvas responden inicial y rápidamente a la presencia de bacterias con una reducción de la movilidad y la alimentación, llegando a la inactividad, con los consiguientes problemas en la toma de nutrientes, intercambio respiratorio y balance metabólico. Las larvas sedentarias extienden los cilios velares entre las valvas, pero raramente el velo. Se detecta una atrofia visceral progresiva y extensiva. Los tejidos de las larvas inactivas no reciben suministro nutritivo y van degenerando hasta convertirse en masas irreconocibles. Parece que las bacterias se unen a la capa superficial del tracto digestivo, lo que origina la pérdida de células absorbentes. Los componentes bacterianos son absorbidos en pequeñas cantidades y ocasionan alteraciones intracelulares tóxicas que llevan al desprendimiento de las células. La posterior invasión bacteriana se caracteriza por lesiones puntuales en órganos del tracto digestivo (i.e., la invasión bacteriana de los tejidos no ocurre hasta el final del proceso de la enfermedad, como infección local en el tejido de la glándula digestiva).

Los trabajos comentados hasta aquí aportan la mayor parte de los conocimientos que aún hoy en día se tienen sobre el papel del que es



sin duda el género bacteriano más importante en relación con las mortalidades larvarias en criadero. Estudios posteriores han confirmado lo ya observado por estos autores, incluyendo otras especies del género *Vibrio* en la lista de patógenos de larvas de bivalvos.

La especie *V. anguillarum*, además de lo ya detallado con anterioridad, ha resultado patógena también para *A. purpuratus* (RIQUELME *et al.* 1995).

La especie *V. alginolyticus* ha sido identificada como responsable de mortalidades en larvas de *C. gigas* y patógena también para *O. edulis* (JEFFRIES 1982), *Tridacna tropical* (SUTTON y GARRICK 1993), *A. purpuratus* (RIQUELME *et al.* 1996) *A. ventricosus* (SÁINZ *et al.* 1998), *Notidipeten subnodosus*, *Atrina maura* (LUNA-GONZÁLEZ *et al.* 2002), y *Ruditapes decussatus* (GÓMEZ-LEÓN *et al.* 2005). En los experimentos realizados con huevos de *Mytilus galloprovincialis* se observa un efecto subletal, no hay mortalidades masivas pero se ve afectado el desarrollo normal, llevando a mortalidades en la fase siguiente del desarrollo (ANGUIANO-BELTRÁN *et al.* 2004).

El grupo constituido por *V. splendidus* y aislados semejantes ha sido descrito también como patógeno de *C. gigas*, *O. edulis* (JEFFRIES 1982), *Tridacna tropical* (SUTTON y GARRICK 1993), *Pecten maximus* (NICOLAS *et al.* 1996), *C. virginica* (SUGUMAR *et al.* 1998) y *R. decussatus* (GÓMEZ-LEÓN *et al.* 2005).

Ocasionalmente se ha descrito la patogenicidad de otras especies, como es el caso de los estudios de SUTTON y GARRICK (1993) con larvas de *Tridacna gigas*, un pectínido tropical, que describen como patógenos aislados similares a *V. orientalis*, *V. campbellii*, *V. metschnikovii* y *V. harveyi*.

Otros *Vibrio* sp., miembros del género sin adscribir a ninguna especie, han sido identificados como responsables de mortalidades en *C. virginica* (BROWN, 1973, 1983), *C. gigas* (GARLAND *et al.* 1983; ESTES *et al.* 2004) u *O. edulis* (LODEIROS *et al.* 1987; PRADO *et al.* 2005).

2.4.1. Nuevas especies patógenas de bivalvos

Vibrio pectenica

NICOLAS *et al.* (1996) observan en cultivos larvarios de *Pecten maximus*, mantenidos sin hacer uso del cloranfenicol, la aparición



sistemática de mortalidades en la tercera semana, precedidas de una ralentización del crecimiento, mientras los cultivos con antibiótico se mantienen vivos. Con los aislados obtenidos de ejemplares enfermos realizan experimentos de patogenicidad larvaria. La cepa A365, entre otras, causa elevadas mortalidades en *P. maximus*, repentinamente a las 48 horas de exposición, y se recupera como dominante de las larvas y el agua de cultivo. En ensayos con larvas de *C. gigas*, las mortalidades causadas por esta misma cepa no llegan al 40% al cabo de 6 días.

Refieren un redondeamiento de los hemocitos de *P. maximus* por exposición a esta bacteria, mucho más rápido que al ser expuestos a otros vibrios patógenos. De la misma manera, los hemocitos de otros bivalvos tienen una respuesta más débil enfrentados a la cepa A365. Esta especificidad puede ser debida a diferentes factores de virulencia (por ejemplo, factores de unión) o a toxinas.

El mecanismo de infección puede ser invasivo, ya que se observa una colonización de las larvas antes de que aparezca el brote. También puede deberse a una toxina termoestable, apoyándose en la rápida deposición de las larvas en el sustrato cuando son expuestas a la bacteria. Y puede ser una endotoxina que, al ser fagocitada la bacteria por los hemocitos, cause el redondeamiento de estos. Sin embargo, las mortalidades progresivas no pueden explicarse por la actuación de toxinas, ya que la presencia masiva de vibrios en el agua implicaría una gran cantidad de toxinas, que no se correspondería con el efecto gradual. Por tanto, parece tratarse de un mecanismo combinado, invasivo y por toxinas. La infección comenzaría con la invasión bacteriana, hasta alcanzar un número elevado en el interior de la larva. Las enzimas digestivas lisarían entonces las células bacterianas, liberando las toxinas, que interrumpirían el tránsito en el digestivo y degradarían los tejidos. El mecanismo descrito se corresponde con la patogénesis de tipo III (ELSTON y LEIBOVITZ 1980).

Esta cepa A365, junto con otros cuatro aislados del mismo origen, se incluye posteriormente en la descripción de la nueva especie, *V. pectenica* (LAMBERT *et al.* 1998). Es interesante destacar entre sus características el hecho de que no crece en el medio TCBS, selectivo para vibrios y utilizado rutinariamente para su detección.



Profundizando en los mecanismos de patogenicidad de *V. pectenica*, establecen la inhibición específica de la quimioluminiscencia de hemocitos de adultos de *P. maximus*, mientras que esa inhibición es sólo parcial en ensayos con *C. gigas* (LAMBERT & Nicholas 1998). La reducción de la actividad quimioluminiscente resulta tanto de la exposición a las células bacterianas (toxina específica) como a extractos citoplasmáticos (toxina inespecífica), en este último caso en menor medida (LAMBERT *et al.* 2001).

La patogenicidad de *V. pectenica* podría por tanto estar relacionada con su capacidad para matar hemocitos. Sería así capaz de interferir con otras células fagocíticas de la glándula digestiva y allí, mediante endotoxinas, conseguir una disrupción de los sistemas de defensa y digestivo de las larvas.

El hecho de que las células vivas tengan mayor actividad que los extractos citoplasmáticos puede deberse a que sólo algunos de los factores tóxicos estén en el citoplasma, mientras que otras moléculas activas pueden encontrarse, bien en formas menos activas o precursores, bien unidas a la membrana. Hay que considerar además el propio proceso de obtención del extracto.

En cuanto al modo de acción de las toxinas, puede estar relacionado con la actuación sobre algún paso del metabolismo del estallido respiratorio, o con una actividad citotóxica suficientemente intensa como para provocar la muerte del hemocito.

Consiguen purificar una toxina, a la que llaman VHKT («vibrio hemocyte-killer toxin»), termoestable, resistente al ácido y proteasas, e hidrosoluble (LAMBERT *et al.* 2001). Su caracterización muestra que es diferente a otras descritas anteriormente para otras especies del género *Vibrio*, pero similar a la «toxina vibriostática» descrita por NOTTAGE *et al.* (1989). Sin embargo, experimentos preliminares muestran que existen diferencias, sugiriendo que se trata de una nueva toxina.

Finalmente realizan estudios de inmunohistoquímica de larvas infectadas por baño con *V. pectenica* (SANDLUND *et al.* 2006). Según los resultados, no se ven células bacterianas, a pesar del elevado grado de tinción, que puede ser debido a productos bacterianos extracelulares parcialmente disueltos. El pequeño tamaño de las larvas hace muy difícil la observación de la degeneración tisular y la necrosis.

Vibrio neptunius

La especie *Vibrio neptunius* (THOMPSON *et al.* 2003) se crea para englobar una serie de aislados dominantes en la microbiota asociada a un sistema de cultivo de rotífero (*Brachionus plicatilis*) en recirculación, junto con otros procedentes del digestivo de larvas de rodaballo (*Scophthalmus maximus*) y de larvas del bivalvo *Nodipecten nodosus*.

PRADO *et al.* (2005) demuestran la patogenicidad de esta especie para cultivos larvarios de bivalvos. En un criadero se venían registrando problemas de mortalidades en cultivos larvarios y post-larvarios de ostra plana. Se hace un seguimiento de un lote de larvas desde el momento en que se empieza a apreciar un retraso en el crecimiento, al cabo de dos semanas de cultivo. Los recuentos en el medio TCBS (selectivo para vibrios) de las muestras procesadas son mínimos. En la población que crece en el medio Agar Marino (AM, para bacterias marinas heterótrofas) predomina claramente una colonia pigmentada verde (tipo *Pseudomonas*), apareciendo también en pequeño número una colonia gris-crema. Las mortalidades comienzan cuatro días después, próxima ya la fijación, siendo más acusadas en las larvas «pequeñas» ($\approx 150\mu\text{m}$), individuos de menor desarrollo que en muchas ocasiones no alcanzan la fijación. Se observa un cambio en la población bacteriana asociada a las larvas, desaparece la colonia pigmentada verde y pasa a ser predominante la colonia gris-crema (también en TCBS), correspondiente al aislado 145.98.

Los experimentos de laboratorio realizados con la cepa 145.98 en cultivos larvarios de *O. edulis* demuestran su patogenicidad. En 48 horas, las mortalidades alcanzan valores medios de 98,6%, frente a la supervivencia de los controles por encima del 90%. Este período de tiempo tiene importancia, ya que es el mínimo que se suelen mantener las larvas en circuito cerrado, en un mismo tanque sin cambio de agua.

La edad de las larvas no influye en los resultados, idénticos para los dos lotes utilizados en los ensayos (6 y 15 días respectivamente). Otros autores mantienen que la resistencia a la enfermedad podría incrementarse con la edad, por una mayor tolerancia o por el crecimiento de la concha (BROWN 1973; ELSTON 1984), lo que se corresponde con lo observado en el criadero. La falta de diferencias en laboratorio puede estar justificada por los elevados inóculos bacterianos emplea-



dos en los experimentos ($\approx 10^5$ ufc/ml), si se comparan con los niveles iniciales a los que suelen estar los patógenos en los cultivos.

Los signos de la enfermedad observados en los experimentos se corresponden con la necrosis bacilar y la vibriosis tipo I. Comienza con una reducción de la movilidad, las larvas dejan de nadar o lo hacen siguiendo patrones anormales en círculo. Aparecen larvas depositadas en el fondo de los recipientes, con las valvas cerradas pero movimiento interno. En el pico de la infección se puede apreciar el fenómeno de «swarming» bacteriano en el interior y alrededor de las larvas moribundas (Fig. 1). Aparecen también velos deformados en larvas activas e incluso fragmentos que continúan en movimiento. En algunos casos se pueden ver protozoos ciliados carroñeros (Fig. 2).

La evolución de los problemas en el criadero, con la aparición de las primeras mortalidades en semilla pequeña y posteriormente en fases larvarias, parece sugerir una posible transmisión del patógeno entre los diferentes compartimentos. Se descarta la transmisión vertical (LO-DEIROS *et al.* 1987; RIQUELME *et al.* 1995), por ensayos de patogenicidad con aislados de los reproductores del criadero, y el fitoplancton como vía de entrada del patógeno, ya que no hubo crecimiento en TCBS, pero no se puede demostrar otro tipo de transmisión.

La cepa patógena se detecta inicialmente en bajo número, pero una vez que penetra en las larvas se multiplica rápidamente, para pasar a ser predominante al tiempo que se registran mortalidades en el culti-

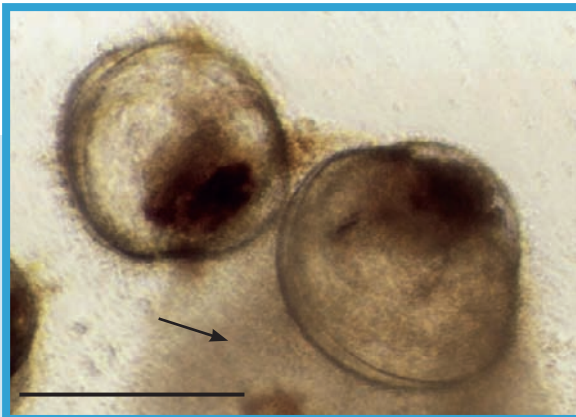
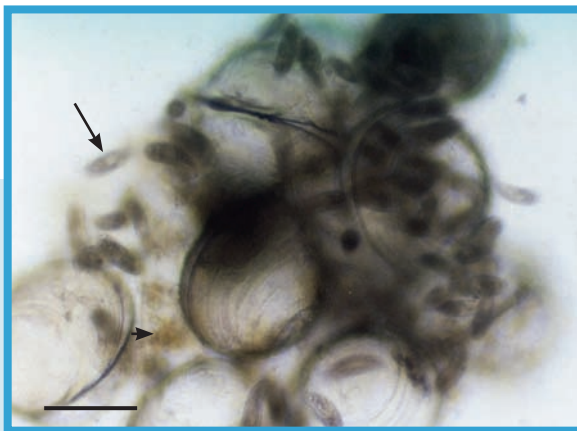


FIGURA 1.

Detalle de los signos de enfermedad en larvas infectadas experimentalmente: «swarming» bacteriano alrededor de las larvas. La flecha señala los acúmulos de células bacterianas. Barra = 200 μ m.

FIGURA 2.

Larvas de ostra plana ya muertas, rodeadas de protozoos carroñeros (flecha). La punta de flecha señala los restos de las larvas ya atacadas previamente por bacterias. Barra = 100µm.



vo. Se trata por tanto de la proliferación de un patógeno oportunista con graves consecuencias para la producción, como ya se ha descrito en otros casos (BROWN y LOSEE 1978; DISALVO *et al.* 1978; JEFFRIES 1982).

Vibrio ostreicida

Esta nueva especie del género *Vibrio*, *V. ostreicida* (PRADO *et al.* 2008), ha sido aislada en relación con mortalidades de semilla pequeña de ostra plana ($\approx 500\mu\text{m}$) en «nursery» (PRADO *et al.* 2005; PRADO 2006). Estos episodios eran continuos, detectándose el inicio de los problemas por la apariencia de la semilla como una masa clara en el fondo de los tambores. Unas primeras muestras de semilla muerta muestran que la microbiota asociada está constituida por vibrios en su práctica totalidad, como se deduce del crecimiento en los medios AM y TCBS ($\approx 10^3$ ufc/semilla en ambos). La comparación de ejemplares con signos iniciales de enfermedad con otros sanos permite establecer que los vibrios están presentes en ostras moribundas o muertas, pero no en individuos sanos, en los que ni siquiera se detectan.

La aparición sistemática de problemas al llegar los cultivos a la «nursery», y una vez descartadas otras fuentes como el fitoplancton, llevan a pensar en los propios tanques como reservorio de bacterias. La cepa 203 aparece en todas las muestras de los tambores del interior del tanque sembradas en el medio AM. Los ensayos de patogenicidad



realizados en laboratorio con larvas de ostra plana demuestran que esta cepa causa la mortalidad del 86,4% de los cultivos en las primeras 24 horas, alcanzando el 98,5% en el siguiente día, siendo el único de todos los aislados relacionados con estos problemas que ocasiona mortalidades por encima del 5%.

El desarrollo de la enfermedad es similar al descrito para la necrosis bacilar. En este caso, además, se aprecia claramente el fenómeno de «spotting» ya descrito por otros autores (DISALVO *et al.* 1978; NOTTA-GE y BIRKBECK 1987; ESTES *et al.* 2004), con las larvas aglutinadas en el fondo del recipiente (Fig. 3).

El aislamiento del patógeno de la superficie de los tambores que contienen las ostras justifica la aparición de problemas al llegar los cultivos a la «nursery». Su persistencia, causando mortalidades sucesivamente en los diferentes lotes, es probable que se deba a la formación de «biopelículas». Las biopelículas, comunidades de microorganismos unidos a una superficie, tienen ventajas ecológicas para los componentes que las forman. Estas estructuras favorecen la supervivencia en los cambios de agua, al mantenerse las bacterias adheridas en un ambiente húmedo con bajos niveles de oxígeno (ELSTON *et al.* 1982; ELSTON 1984). Confieren protección frente a cambios bruscos del medio, principalmente por la producción de exopolisacáridos, que adsorben compuestos orgánicos disueltos, favorecen la disponibilidad de nutrientes y la cooperación metabólica (OPHIR y GUTNICK 1994;

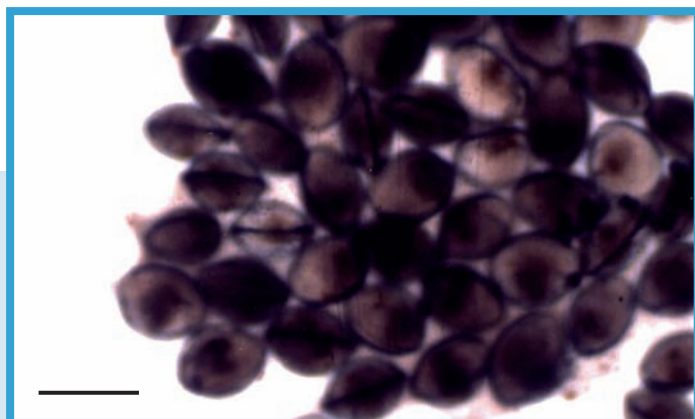


FIGURA 3.
Detalle de la
acumulación de
larvas en el fondo
de los recipientes o
«spotting».
Barra = 200 μm .

DAVEY y O'TOOLE 2000). Facilitan la incorporación de nuevos genes, favoreciendo la aparición de nuevos patógenos por adquisición de resistencia a antibióticos, factores de virulencia y/o capacidades de supervivencia medioambiental, como una mayor resistencia a la lejía y los detergentes (WATNICK *et al.* 2000). Impiden el acceso físico de agentes antimicrobianos y, además, cepas sensibles a un antibiótico pueden formar biopelícula en su presencia (KARUNASAGAR *et al.* 1996)

Por todo ello, la limpieza de los tanques es un punto de control de la persistencia de los patógenos en el sistema (ELSTON 1984). Es preciso un tratamiento mecánico de las superficies (incluyendo también las tuberías de los circuitos de agua) y su esterilización, con muestreos regulares de control (ELSTON *et al.* 1982). *Vibrio ostreicida* se aísla en todas las muestras de tambores en números bajos, demostrándose una vez más que se trata de un patógeno oportunista, que prolifera cuando las condiciones son favorables.

2.5. Enfermedades producidas por representantes del Género *Pseudomonas*

El género *Pseudomonas* ha sido descrito, en algunos casos, como patógeno de larvas de bivalvos, en la mayoría de las ocasiones aislados obtenidos junto con miembros del género *Vibrio* causantes de problemas en los cultivos larvarios.

Ya en 1959, GUILLARD habla de un aislado patógeno para larvas de *M. mercenaria*, obtenido de larvas moribundas junto con un aislado de *Vibrio* del que ya se ha hablado en el apartado anterior. La enfermedad causada en laboratorio por la *Pseudomonas* sp. precisa de inóculos mayores (10^7 /ml) y cursa con signos diferentes a la vibriosis, apareciendo las larvas con el cuerpo granulado y en desintegración, y el velo rasgado y sin cilios. El hipotético mecanismo de infección sin embargo parece ser igual al descrito para el *Vibrio* sp.

HELM y SMITH (1971) describen una enfermedad en *O. edulis* que como primer signo manifiesta un cese de la natación, seguido por la extensión del velo con movimientos anormales y necrosis. Identifican el patógeno como una pseudomonas del grupo IV.



BROWN (1973) recoge un nuevo caso con diferentes aislados de ambos géneros que causan desarrollo anormal o mortalidades en larvas de *C. virginica*. No hay diferencia entre las enfermedades ocasionadas por uno u otro tipo de bacteria.

En trabajos posteriores (BROWN 1974) estudia el fenómeno de coloración rosa que aparece en los recipientes de cultivos embrionarios y larvarios de *M. mercenaria* y *C. virginica*. El aislado mayoritario asociado a estas manchas rosas resulta ser una cepa de *Pseudomonas* sp. que crece en colonias pigmentadas en rojo. Los experimentos realizados demuestran que esta bacteria es capaz de producir la coloración rosa en recipientes de polietileno, tanto por inóculo de su cultivo líquido como de las células lavadas, pero no cuando el material es polipropileno.

TABLA 2.

Resumen de la bibliografía publicada sobre patologías larvarias de moluscos bivalvos causadas por bacterias del género *Pseudomonas*.

Autor	Año	Hospedador	Especie bacteriana	Efecto
Guillard	1959	<i>M. mercenaria</i>	<i>Pseudomonas</i> sp.	Gránulos y anomalías en el velo mortalidad
Helm y Smith	1971	<i>O. edulis</i>	<i>Pseudomonas</i> spp.	Cese de natación extensión del velo Mortalidad
Brown	1973	<i>C. virginica</i>	<i>Pseudomonas</i> sp.	Mortalidad
		<i>C. virginica</i>	<i>Pseudomonas</i> sp.	Problemas de crecimiento Mortalidad
Brown	1974	<i>M. mercenaria</i>	<i>Pseudomonas</i> sp.	Problemas de desarrollo mortalidad
Brown	1981b	<i>M. mercenaria</i> <i>C. virginica</i>	<i>Pseudomonas</i> sp.	Retraso crecimiento Formación anormal de la concha Mortalidad
Brown	1983	<i>C. virginica</i>	<i>Pseudomonas</i> sp.	Mortalidad
Lodeiros et al.	1987	<i>O. edulis</i>	<i>Pseudomonas</i> sp.	Mortalidad
Lodeiros et al.	1992	<i>Euvola ziczac</i>	<i>Pseudomonas</i> sp.	Mortalidad
Sutton y Garrick	1993	<i>T. gigas</i>	<i>Pseudomonas</i> sp.	Mortalidad
Riquelme et al.	1995	<i>A. purpuratus</i>	<i>Pseudomonas</i> sp.	Inhibición de la natación mortalidad



En cuanto a la importancia del fenómeno para los cultivos, el factor crítico no es la aparición de la mancha en sí, sino el número de células bacterianas. Así, el desarrollo de embriones de *M. mercenaria* inoculados con hasta 10^3 células bacterianas por mililitro no se ve alterado, pero sí aparecen problemas graves cuando las concentraciones superan este valor. Los inóculos con filtrados de los cultivos líquidos o inactivados por calor no tienen efecto patógeno alguno.

La cepa es también patógena para *C. virginica* (BROWN 1981b), según se desprende de los experimentos llevados a cabo con huevos fertilizados de esta especie. Realiza ensayos con la cepa salvaje, con pigmento rojo, y mutantes sin pigmento y con pigmento amarillo o rosa, demostrando la implicación de esta sustancia. Mientras el mutante blanco no tiene efectos negativos, las cepas pigmentadas son responsables de retrasos en el crecimiento y formación anormal de la concha, en mayor o menor grado. Las larvas expuestas al mutante rosa presentan la línea media cóncava, en lugar de recta. En presencia del mutante amarillo y la cepa roja, el retraso del crecimiento y la formación de la concha son evidentes, de forma más acusada con la cepa salvaje. Los resultados obtenidos con la exposición directa al pigmento son muy similares.

La virulencia de esta *Pseudomonas* sp. está relacionada y varía con la pigmentación, no siendo esencial la invasión bacteriana (BROWN 1983), ya que se obtienen los mismos efectos utilizando células lavadas sonicadas que células sin lavar en crecimiento activo. Es interesante el resultado de los experimentos realizados con el mutante blanco junto con el extracto del pigmento, que hace que la cepa se vuelva invasiva y se observe «swarming» bacteriano alrededor de las larvas. Estos datos sugieren que la mortalidad puede ocurrir sin invasión bacteriana, siendo las bacterias invasivas sólo cuando las larvas están ya debilitadas.

Se obtienen también aislados patógenos del género *Pseudomonas* de muestras tomadas en un criadero de *O. edulis* en Galicia (LODEIROS *et al.* 1987). Los autores calculan el valor de patogenicidad asociando valores numéricos a los diferentes signos de la enfermedad causada, en función de las alteraciones de la actividad vital de las larvas, en las valvas y el efecto necrótico. Según los resultados obtenidos en los



experimentos de patogenicidad con larvas de ostra plana, dos cepas de *Pseudomonas* sp. y una de *Ps. aeruginosa* resultan letales para los cultivos. En todos los casos, la enfermedad cursa con los signos descritos para la necrosis bacilar y la patogénesis tipo I. Los aislados proceden de larvas de ostra, y en el caso concreto de *Ps. aeruginosa* se aísla durante un episodio de mortalidades en el criadero. El hecho de que *Pseudomonas* sea el género predominante en la microbiota asociada a los reproductores, junto con el aumento en los contenidos de vibrios en reproductores acondicionados en el criadero, especialmente en las gónadas, hace pensar en una posible transmisión vertical de los patógenos.

Se aísla también una cepa de *Pseudomonas* sp. como predominante en una epizootia en cultivos larvarios de vieira tropical, *Euvola ziczac*, junto con vibrios del tipo *V. anguillarum* y *V. alginolyticus* (LODEIROS *et al.* 1992). Los ensayos en laboratorio demuestran que la mortalidad larvaria se debe a la invasión bacteriana y en menor medida a la acción de endotoxinas, pero no a exotoxinas. Por tanto, parece que la acción invasiva esté relacionada con mecanismos patógenos debidos a una endotoxina ligada a la pared bacteriana.

El aislamiento de esta cepa de *Pseudomonas* sp. patógena, junto con miembros del género *Vibrio*, sugiere para los autores la posibilidad de una actuación conjunta o secuencial de *Vibrio* y *Pseudomonas*. Dado que el mayor número de estudios se refiere a patógenos pertenecientes al género *Vibrio*, éstos parecen actuar como agentes iniciadores de la enfermedad, favoreciendo la invasión secundaria por bacterias con alta capacidad de metabolización de sustratos, como es el caso de esta cepa de *Pseudomonas*.

Aislados patógenos de este género se obtienen también de larvas moribundas de *Tridacna gigas* (SUTTON y GARRICK 1993), clasificados dentro de un grupo constituido por los géneros *Pseudomonas*, *Alteromonas* y *Alcaligenes*.

De la gónada de reproductores de otro Pectínido, *Argopecten purpuratus*, se aíslan también cepas del género *Pseudomonas* que en mayor o menor grado son responsables de la sedimentación larvaria por cese de la actividad natatoria (RIQUELME *et al.* 1995). Su origen, junto con el estudio comparado de la composición de las poblaciones bacte-



rianas de reproductores y de los primeros estadios del desarrollo, lleva a pensar a los autores en una transmisión vertical de posibles patógenos.

2.6. Enfermedades producidas por otros géneros bacterianos

En busca de los agentes responsables de los episodios de mortalidades registrados en un criadero de *C. gigas*, GARLAND *et al.* (1983) aíslan dos cepas del género *Alteromonas* que resultan patógenas para las larvas. La enfermedad cursa con los signos ya descritos en casos anteriores: pérdida de la movilidad larvaria, anormalidades en la estructura y función velares, y alteraciones en los órganos internos hasta su necrosis total, con la consiguiente mortalidad larvaria.

El género *Moraxella* se ha descrito puntualmente como patógeno para larvas de *Tridacna gigas*, concretamente un aislado de larvas moribundas (SUTTON y GARRICK 1993). También dos aislados obtenidos de gónada de reproductores de *A. purpuratus* en criadero inhiben de forma drástica la natación larvaria, causando la deposición de las larvas en el fondo de los recipientes (RIQUELME *et al.* 1995).

El grupo formado por los géneros *Aeromonas* – *Plesiomonas* incluye aislados patógenos obtenidos de larvas moribundas de *T. gigas*, de hecho el único punto del criadero donde se aíslan (SUTTON y GARRICK 1993). La patogenicidad de un aislado de la especie *Aeromonas hydrophila* ha sido demostrada para larvas de *A. purpuratus* (RIQUELME *et al.* 1996). Como en el caso anteriormente mencionado, se aísla únicamente en larvas depositadas en el fondo de los tanques, moribundas, y prácticamente en cultivo puro, mientras en el resto de los compartimentos del criadero predomina los aislados del género *Vibrio*, concretamente de la especie *V. alginolyticus*, también patógenos. La proliferación en ese punto determinado del criadero parece justificada por la combinación de las condiciones de temperatura (elevada en estos cultivos) y acumulación de materia orgánica en los fondos con depósitos larvarios, que favorece el crecimiento rápido de *Aeromonas*. Por otro lado, el mecanismo de infección responde a la condición de patógeno oportunista secundario, con capacidad de invasión de las larvas cuando ya están moribundas por efecto de las toxinas producidas por *V. alginolyticus*.



TABLA 3.

Resumen de la bibliografía publicada sobre patologías larvarias de moluscos bivalvos causadas por bacterias de géneros diferentes a *Vibrio* y *Pseudomonas*.

Autor	Año	Hospedador	Especie bacteriana	Efecto
Garland <i>et al.</i>	1983	<i>C. gigas</i>	<i>Alteromonas</i> spp.	Mortalidad
Sutton y Garrick	1993	<i>T. gigas</i>	<i>Aeromonas</i> - <i>Plesiomonas</i> <i>Moraxella</i> sp.	Mortalidad
Riquelme <i>et al.</i>	1995	<i>A. purpuratus</i>	<i>Moraxella</i> sp.	Inhibición de la natación Mortalidad
Riquelme <i>et al.</i>	1996	<i>A. purpuratus</i>	<i>A. hydrophila</i>	Mortalidad

3. ENFERMEDADES DE JUVENILES Y ADULTOS

3.1. Vibriosis

La mayoría de las enfermedades de etiología bacteriana en moluscos bivalvos adultos están producidas por bacterias Gram negativas, y particularmente pertenecientes al género *Vibrio* (Tabla 4).

Desde la primera descripción de mortalidades de mejillón (*Mytilus californianus*) adulto ocasionadas por bacterias de ZOBELL y FELTHAM (1938), se han descrito casos de mortalidades de diferentes especies de bivalvos, incluyendo almejas (*Mya arenaria*, *M. mercenaria*, *Ruditapes philippinarum*), ostra (*Crassostrea gigas*, *C. virginica*, *C. sikamea*), vieira (*Pecten maximus*) o mejillón (*M. edulis*), producidas por diferentes especies de *Vibrio* como *V. tubiashii*, *V. alginolyticus* o *V. splendidus* entre otros (TUBIASH *et al.* 1965; TUBIASH 1974; ELSTON *et al.* 1982, 1999; NOTTAGE y BIRKBECK 1990; LAMBERT *et al.* 1999; GAY *et al.* 2004 a,b). Todas estas especies bacterianas han sido ya tratadas con anterioridad en este capítulo.

3.1.1. Enfermedad del anillo marrón

La enfermedad del anillo marrón (BRD, del inglés Brown Ring Disease), causada por *V. tapetis*, fue la primera enfermedad de etiología bacteriana demostrada en almejas adultas (*Ruditapes philippinarum* y *R. decussatus*) (BORREGO *et al.* 1996). La enfermedad, caracterizada

TABLA 4.

Resumen de la bibliografía publicada sobre la relación existente entre las bacterias y patologías de moluscos bivalvos en fases no larvarias.

Autor	Año	Estadio	Hospedador	Especie bacteriana	Efecto
Zobell y Feltham	1938	Adultos	<i>Mytilus californianus</i>	Bacterias + peptona no tóxica	Mortalidad
Takeuchi <i>et al.</i>	1957	Adultos	<i>C. gigas</i>	<i>Achromobacter</i> sp.	Mortalidad
Takeuchi <i>et al.</i>	1965	Adultos	<i>M. mercenaria</i> <i>C. virginica</i> <i>M. edulis</i> <i>Mya arenaria</i>	<i>V. tubiashii</i> <i>V. alginolyticus</i> <i>Vibrio</i> sp.	—
Tubiash	1974	Adultos	<i>C. virginica</i>	<i>V. tubiashii</i> <i>V. alginolyticus</i> <i>Vibrio</i> sp. <i>Ps. enalia</i>	—
Lipp <i>et al.</i>	1976	Adultos	<i>C. gigas</i>	<i>Vibrio</i> spp.	«Mortalidad de verano»
Elston <i>et al.</i>	1982	Juvenil	<i>O. edulis</i> <i>C. virginica</i> <i>M. mercenaria</i>	<i>Vibrio</i> spp.	Anomalías concha
Gulka <i>et al.</i>	1983	Adultos	<i>Placopecten magellanicus</i>	<i>Rickettsia</i>	Mortalidad?
Dungan y Elston	1988	Juvenil	<i>C. gigas</i>	<i>Cytophaga-like</i>	Degradación del ligamento Mortalidad
LeGall <i>et al.</i>	1988	Adulto	<i>P. maximus</i>	<i>Rickettsia</i>	Mortalidad
Dungan <i>et al.</i>	1989	Juvenil	<i>C. gigas</i>	<i>Cytophaga-like</i>	Degradación del ligamento
Nottage y Birkbeck	1990	Adultos	<i>M. edulis</i>	<i>V. alginolyticus</i>	Hemocitos muertos
Friedman y Hedrick	1991	Adultos	<i>C. gigas</i>	<i>Nocardia crassostreae</i>	Mortalidad (PON)
Borrego <i>et al.</i>	1996	Adultos	<i>R. phillipinarum</i> <i>R. decussatus</i>	<i>V. tapetis</i>	Mortalidad (BRD)
Boettcher <i>et al.</i>	1999	Juvenil	<i>C. virginica</i>	<i>Roseovarius crassostreae</i>	Mortalidad (JOD)
Elston <i>et al.</i>	1999	Juvenil	<i>C. gigas</i> <i>C. sikamea</i>	?	Morbilidad Mortalidad

(Continúa)



TABLA 4. (Continuación)

Autor	Año	Estadio	Hospedador	Especie bacteriana	Efecto
Lambert <i>et al.</i>	1999	Adultos	<i>P. maximus</i>	gr. <i>V. splendidus</i>	Depósito marrón Licuefacción muscular Inversión sexual
Villalba <i>et al.</i>	1999	Adultos	<i>Venerupis rhomboides</i>	<i>Rickettsia</i>	Mortalidad?
Wu y Pan	1999	Adultos	<i>Pinctada maxima</i>	<i>Rickettsia</i>	Mortalidad?
Lacoste <i>et al.</i>	2001	Juvenil	<i>C. gigas</i>	<i>V. splendidus</i>	«Mortalidad de verano»? Reducción de la respuesta al estrés
Gay <i>et al.</i>	2004a	Adultos	<i>C. gigas</i> <i>R. philippinarum</i>	gr. <i>V. splendidus</i>	«Mortalidad de verano»?
		Semilla	<i>C. gigas</i>	gr. <i>V. splendidus</i>	Mortalidad
Gay <i>et al.</i>	2004b	Juvenil	<i>C. gigas</i>	<i>Vibrio</i> spp.	Debilitamiento músculo aductor
Sun y Wu	2004	Adulto	<i>C. ariakensis</i>	<i>Rickettsia</i>	Mortalidad?
Labreuche <i>et al.</i>	2006a	Adulto	<i>C. gigas</i>	<i>V. aestuarianus</i> <i>V. splendidus</i>	«Mortalidad de verano»
Labreuche <i>et al.</i>	2006b	Adulto	<i>C. gigas</i>	<i>V. aestuarianus</i> <i>V. splendidus</i>	«Mortalidad de verano»
Garnier <i>et al.</i>	2007	Adulto	<i>C. gigas</i>	<i>Vibrio</i> spp.	«Mortalidad de verano»

por perturbaciones en el proceso de calcificación y la aparición de un depósito marrón en la cara interna de las valvas del molusco, es objeto de un capítulo independiente en este libro, y a él nos remitimos para una mayor información.

3.1.2. Mortalidad de verano

En cuanto al fenómeno denominado mortalidad de verano de la ostra del Pacífico (*Crassostrea gigas*), es un hecho bien conocido que las poblaciones juveniles de esta especie sufren de modo regular mortalidades significativas durante los meses cálidos (T^a del agua $\geq 18^{\circ}\text{C}$), siendo motivo de gran preocupación para los productores de este bivalvo por las importantes pérdidas económicas que ocasiona.



Este fenómeno, descrito en diferentes países como Japón, USA, Brasil o Francia (LYPOWSKY y CHEW 1972; MEYERS *et al.* 1990; MORI *et al.* 1965), se ha asociado a condiciones de estrés como bajo contenido de oxígeno disuelto, algas nocivas, contaminantes o sustancias tóxicas en el sedimento (CHENEY *et al.* 2000; LYPOWSKY y CHEW 1972; MORI *et al.* 1965; SOLECHNIK *et al.* 1999). En general, se descartaba la hipótesis de una etiología microbiana ya que, aunque se habían observado en ocasiones tejidos colonizados por virus o bacterias, como herpes virus o *V. splendidus* (RENAULT *et al.* 1994, 1995; LACOSTE *et al.* 2001; WAECHTER *et al.* 2002; LE ROUX *et al.* 2002), ninguno de ellos pudo ser relacionado sistemáticamente con la aparición de epizootias en los cultivos (LABREUCHE *et al.* 2006a).

La primera evidencia de la relación entre la mortalidad de verano y un agente infeccioso la obtuvieron LIPP *et al.* (1976), cuando observaron que la hemolinfa de ostras moribundas contenía consistentemente un carga elevada de vibrios, los cuales provocaban mortalidad en ostra infectada experimentalmente. Posteriormente, LACOSTE *et al.* (2001) y GAY *et al.* (2004a, b) atribuyeron la causa de la enfermedad, al menos en Francia, a una infección por *V. splendidus*. Por su parte, WAECHTER *et al.* (2002) aislaron una cepa de *V. chagasii*, anteriormente clasificado como *V. splendidus* tipo II, reproduciendo la enfermedad experimentalmente. Parecía claro que diferentes especies del género *Vibrio*, concretamente del grupo de *V. splendidus*, podrían estar involucradas en la mortalidad de verano de *C. gigas*, sin embargo nunca se estudió de modo sistemático la prevalencia de estas especies bacterianas en ostras afectadas por la enfermedad.

En 2007, GARNIER *et al.* publican los resultados de un estudio de tres años en Francia en el que investigan la posible etiología bacteriana de la enfermedad, analizando las poblaciones de bacterias presentes en la hemolinfa de ostras moribundas en comparación con las de ostras sanas. Las primeras diferencias observadas fueron en la carga bacteriana de la hemolinfa, siendo mucho mayor en ostras enfermas que en ostras sanas. El estudio fenotípico y molecular de estas poblaciones, mediante técnicas de secuenciación y restricción del gen *gyrB*, mostró que pertenecían a un número limitado de especies bacterianas, principalmente *V. aestuarianus*, *V. splendidus*, *V. natriegens*, *V.*



parahaemolyticus y *Pseudoalteromonas* sp., siendo *V. aestuarianus* la especie aislada más frecuentemente (56%). Con una prevalencia menor (25%) aparecía *V. splendidus*. Además, los aislados de ambas especies resultaron ser patógenos para la ostra, demostrándose para *V. aestuarianus* la producción de factores extracelulares con actividad inmunosupresora sobre las funciones de los hemocitos (desregulación del metabolismo oxidativo de los hemocitos) y letales para los animales a bajas concentraciones (3,3 µg/g) (LABREUCHE *et al.* 2006a,b).

En función de todos estos resultados la teoría más aceptada hoy en día es, que la mortalidad de verano de la ostra *C. gigas* es el resultado de interacciones más o menos complejas entre el estado fisiológico y/o genético del hospedador, factores ambientales y uno o más agentes infecciosos que actúan más como oportunistas que como verdaderos patógenos (LABREUCHE *et al.* 2006b).

3.2. Enfermedad Juvenil de la ostra

La enfermedad juvenil de la ostra (JOD, del inglés Juvenile Oyster Disease) fue detectada por primera vez en poblaciones cultivadas de *Crassostrea virginica* en la costa nororiental de los Estados Unidos de América a finales de la década de 1980 (BRICELJ *et al.* 1992). La enfermedad afecta principalmente a ostras inferiores a 25mm de altura de concha, y puede llegar a causar mortalidades del 90% de la producción anual (BRICELJ *et al.* 1992; DAVIS y BARBER 1994). Las mortalidades suelen comenzar entre 1 y 2 semanas después de la aparición de los primeros síntomas, aunque la intensidad de los mismos, así como la progresión de la enfermedad varían en función del tamaño de la ostra y su condición metabólica (BRICELJ *et al.* 1992; DAVIS y BARBER 1994). En las áreas afectadas, la enfermedad presenta frecuencia anual, apareciendo generalmente cuando la temperatura del agua alcanza los 20 °C (BRICELJ *et al.* 1992; DAVIS y BARBER 1994; FORD y BORRERO 2001).

Los principales signos de la JOD son cese del crecimiento, bordes irregulares de las valvas y un ahuecamiento exagerado de la valva inferior seguido de un depósito de capas sucesivas de conchiolina en la superficie interna de las valvas alrededor de la periferia del manto (BRICELJ *et al.* 1992; FORD y BORRERO 2001). Si el animal sobrevive



a la enfermedad, puede observarse la retracción del manto. Además del depósito de conchiolina, se han observado otras respuestas patológicas en la región extrapalial, incluyendo cambios en el recuento de hemocitos en hemolinfa y líquido intervalvar (PAILLARD *et al.* 1996), o lesiones en la superficie del manto (BRICELJ *et al.* 1992; FORD y BORRERO 2001).

La naturaleza transmisible de la enfermedad se demostró en experimentos de cohabitación con ostras afectadas y mediante inoculaciones de extractos de ostras enfermas o de filtrados de agua que contenía ostras afectadas (LEWIS *et al.* 1996; PAILLARD *et al.* 1996). La etiología de la JOD fue, sin embargo, más difícil de demostrar. Tras sugerirse que podría estar causada por bacterias o parásitos observados ocasionalmente en las lesiones de la ostra o en las capas de conchiolina (BOARDMAN 2005), en 1997 se confirmó la primera opción, ya que el empleo de agentes antibacterianos retrasaban y reducían la mortalidad de la enfermedad (BOETTCHER *et al.* 1999). Posteriores estudios revelaron que las ostras afectadas por JOD estaban fuertemente colonizadas por una nueva especie de alfa-proteobacteria dentro de la rama de *Roseobacter* (BOETTCHER *et al.* 1999), que ha sido caracterizada y designada como *Roseovarius crassostreae* (BOETTCHER *et al.* 2005). La inoculación experimental de ostras con esta bacteria resultó en un desarrollo de signos clínicos y mortalidades similares a las producidas por la JOD (BOETTCHER *et al.* 2000; MALOY *et al.* 2007), demostrándose la etiología de la enfermedad. De hecho se ha propuesto un cambio en el nombre de la enfermedad, que pasaría a denominarse «*Roseovarius* oyster disease (ROD)» para evitar confusiones con otras enfermedades de ostras en estadio juvenil (MALOY *et al.* 2007).

Se han llevado a cabo algunos estudios de patogénesis, concretamente sobre la localización y naturaleza de las interacciones entre *R. crassostreae* y *C. virginica*, observándose, tanto por microscopía electrónica como por métodos moleculares y de cultivo, que la localización primaria del patógeno es en la cara interna de las valvas y los depósitos de conchiolina (BOARDMAN *et al.* 2008), más que el manto o el fluido palial. Además, las células bacterianas estaban adheridas por los polos, lo que es consistente con la expresión de fimbrias polares por la bacteria (BOARDMAN *et al.* 2008). Estas observaciones se ajustan al proceso



patológico observado en infecciones naturales y se ha sugerido que dicha localización, quizá en forma de biopelícula, podría ayudar a la bacteria a evitar ciertos mecanismos de defensa del hospedador como la acción de hemocitos.

En cuanto a diagnóstico, se ha desarrollado un protocolo de PCR para detección de *R. crasostreae* directamente a partir de tejidos de ostra (MALOY *et al.* 2005), basado en la amplificación de la región ITS (internal transcriber spacer) entre los genes 16S y 23S rRNA, con una confirmación posterior por restricción del amplicón. El método tiene una gran especificidad y sensibilidad (10 células bacterianas/ostra), y podría ser de gran utilidad, no sólo en el establecimiento y mejora de métodos preventivos de la enfermedad, sino también en estudios epizootiológicos y de patogénesis de la JOD.

3.3. Infecciones por procariotas de tipo *Rickettsia*

La presencia de procariotas intracelulares ha sido descrita en diversos invertebrados marinos (HARSHBARGER & Chang 1977; BUCHANAN 1978; OTTO *et al.* 1979; MEYERS 1981; COMPS 1983; GULKA *et al.* 1983; MORRISON y SHUM 1983; ELSTON y PEACOCK 1984; ELSTON 1986; MIALHE *et al.* 1987; HINE y DIGGLES 2002), sugiriéndose en algunos casos una asociación con mortalidades (GULKA *et al.* 1983). Sin embargo, durante mucho tiempo ha sido objeto de controversia si estas infecciones producían algún daño significativo en el hospedador (ELSTON 1986).

En marzo de 1987 ocurrió una mortalidad masiva (aprox. 40%) de vieira (*Pecten maximus*) en St. Brieuc, una localidad situada en el norte de Bretaña (Francia). El estudio anatómico-patológico subsecuente reveló la presencia de una infección bacteriana en las células endoteliales de las branquias (LE GALL *et al.* 1988). Las bacterias aparecían formando colonias intracelulares basófilas, con tamaño variable, pudiendo llegar incluso a obstruir espacios sanguíneos. En ocasiones, los microorganismos aparecían libres, posiblemente en fase de dispersión de la infección (LE GALL *et al.* 1988). Pese a que, en este trabajo, no pudieron demostrarse los postulados de Koch, y por tanto la patogenicidad de estos microorganismos, los autores sugerían que la intensidad de la infección apoyaba la hipótesis de que la funcionalidad de las branquias



estaba comprometida (LE GALL *et al.* 1988). Algunos años más tarde, se consiguió purificar el microorganismo mediante centrifugaciones diferenciales en gradientes de sacarosa y renografin (LE GALL y MIALHE 1992), realizándose estudios de caracterización de los mismos. Así, se demostró que presentaban diferentes actividades enzimáticas, algunas de las cuales, como la catalasa o la fosfatasa ácida, podían relacionarse con la patogenidad de estos procariotas intracelulares. Por otro lado, los estudios de microscopía electrónica demostraron su relación con el grupo *Rickettsia*, al permitir dilucidar algunas de sus características estructurales, concretamente de la pared celular.

En años posteriores se describieron casos, también asociados a mortalidades, en almeja (*Venerupis rhomboides*) en Galicia (España) (VILLALBA *et al.* 1999), ostra perlífera tropical (*Pinctada maxima*) y ostra australiana (*Crassostrea ariakensis*) en China (WU y PAN 1999; SUN y WU 2004). En estos casos, un procariota intracelular tipo *Rickettsia* fue el único patógeno observado y, por tanto, probable causante de las mortalidades. En el caso de la almeja, la infección estaba localizada en el epitelio branquial, mientras que en la ostra se observó una infección más generalizada, detectándose el microorganismo no sólo en branquias sino también en digestivo, manto y hepatopáncreas.

En todas las descripciones de organismos tipo *Rickettsia* en moluscos existen características comunes que incluyen entre otras, el ser parásito obligado con formación de inclusiones citoplasmáticas observables histológicamente (Fig. 4), tener morfología pleomórfica, carácter Gram-negativo, con pared celular de tipo bacteriana con membrana externa, una zona periplasmática con ribosomas densa a los electrones y con fisión binaria como modo de multiplicación (LE GALL *et al.* 1988; VILLALBA *et al.* 1999; WU y PAN 1999; WU *et al.* 2005). Si bien la mayoría de las descripciones hablan de inclusiones basófilas (HARSHBARGER & Chang 1977; MEYERS 1981; COMPS 1983; GULKA *et al.* 1983; MORRISON y SHUM 1983; ELSTON y PEACOCK 1984; ELSTON 1986; MIALHE *et al.* 1987; NORTON *et al.* 1993a; RENAULT y COCHENNEC 1994; WEN *et al.* 1994; HINE y DIGGLES 2002), en algunos casos se han observado inclusiones con carácter eosinófilo, incluso en el mismo hospedador (MEYERS 1981; NORTON *et al.* 1993b; WEN *et al.* 1994), sin que se conozca la razón de esta diferencia en la tinción. Se ha



sugerido que podría deberse a diferencias entre distintas especies de *Rickettsia* o a diferentes estadios de las inclusiones (SUN y WU 2004).

Ya hemos mencionado la controversia sobre la patogenicidad de estos procariotas para moluscos marinos y el daño que pueden causar en las células del hospedador. Mientras que algunos autores señalan su papel determinante en la mortalidad y la enfermedad (GULKA *et al.* 1983; LE GALL *et al.* 1988; NORTON *et al.* 1993 a,b; WU y PAN 1999, 2000; VILLALBA *et al.* 1999). Otros autores sugieren que estos microorganismos no producen daños a las células del hospedador o causan únicamente una patología limitada (FRIES y GRANT 1991; MORRISON y SHUM 1983).

Hay algunas evidencias que apoyarían la primera hipótesis. Entre ellas, y debido a que las células que sufren la infección en el hospedador son no fagocíticas (células epiteliales en general), estos organismos poseen probablemente mecanismos de penetración e infección de las células del hospedador. Las rickettsias no matan las células por producción de toxinas, sino por destrucción celular (WINKLER 1990; ROMERO *et al.*, 2000). Estos hechos son consistentes con los resultados de algunos de los trabajos realizados con moluscos que describen las células infectadas repletas de bacterias hasta su ruptura y la liberación de la progenie bacteriana (VILLABA *et al.* 1999; WU y PAN 1999; SUN y WU 2004; WU *et al.* 2005).

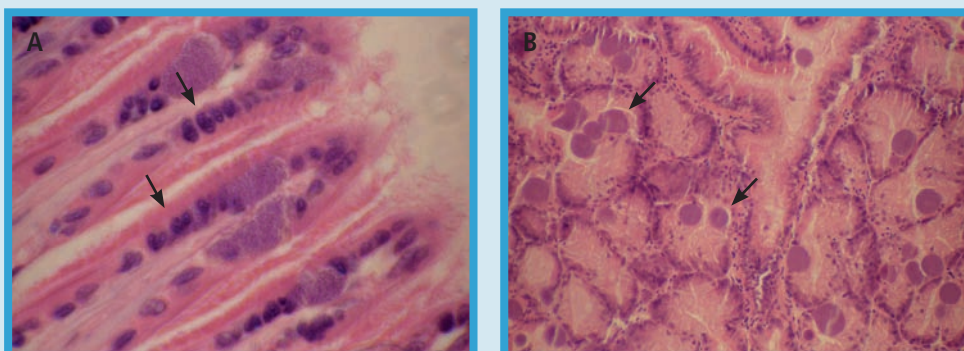


FIGURA 4.

Localización de inclusiones de organismos tipo *Rickettsia* en branquia (A) y células digestivas (B) de almeja fina (*Ruditapes decussatus*).



La hipótesis más aceptada hoy en día es que estos microorganismos podrían presentar baja virulencia y que el grado de los daños producidos podría estar relacionado con el grado de infección. Así, sólo en casos de infecciones masivas que impedirían por acción mecánica la actuación de importantes funciones fisiológicas, se presentaría una patología significativa.

3.4. Nocardiosis

En 1945 se detectaron por vez primera en Japón mortalidades en ostras del Pacífico (*C. gigas*) durante los meses de verano (IMAI *et al.* 1965). Algunos años más tarde, en 1956, mortalidades similares ocurrieron en América del Norte (PERDUE *et al.* 1981). Las primeras hipótesis sobre las posibles causas de la enfermedad fueron un estrés fisiológico inducido por un metabolismo elevado o la maduración de las gónadas en condiciones de alta concentración de nutrientes y elevadas temperaturas (IMAI *et al.* 1965; MORI *et al.* 1975; PERDUE *et al.* 1981). Sin embargo, la presencia de alteraciones patológicas en el tejido conectivo circundante al tracto digestivo, hacía sospechar de una naturaleza infecciosa, probablemente producida por una bacteria Gram positiva (NUMACHI 1965). En 1991, FRIEDMAN y HEDRICK aislaron una bacteria perteneciente al género *Nocardia* a partir de ostras enfermas cultivadas en el estado de Washington (USA) y en la Columbia Británica (Canadá), y nombraron la enfermedad como Nocardiosis de la ostra del Pacífico (PON, del inglés Pacific Oyster Nocardiosis).

La caracterización fenotípica y genética de las cepas aisladas a partir de ostras enfermas demostró que se trataba de una nueva especie dentro del género *Nocardia*, recibiendo el nombre de *Nocardia crassostreae* (FRIEDMAN *et al.* 1998), siendo las especies más cercanas filogenéticamente *N. otitidiscavarium* y *N. seriolae*.

La enfermedad, tanto en infecciones naturales como experimentales, se caracteriza por no presentar prácticamente síntomas externos. En casos de infecciones leves, los animales enfermos pueden presentar áreas de decoloración en el manto, mientras que en casos más graves se ha observado la aparición de nódulos verdosos o amarillentos en la mayoría de los tejidos incluyendo músculo abductor, branquias, corazón y manto (FRIEDMAN y HEDRICK 1991). Estos nódulos están formados



por hemocitos y bacterias Gram positivas y con característica de ácido alcohol resistencia.

3.5. Otras enfermedades de etiología bacteriana

Se han descrito infecciones por representantes de los géneros *Chlamydia* y *Mycoplasma* en una amplia variedad de moluscos bivalvos adultos, incluyendo ostra, vieira, almeja, mejillón o berberecho, surgiéndose su potencial patogénico (HARSHBARGER y CHANG 1977; JOLY y COMPS 1980; ELSTON 1986; BOWER y MEYER 1991; CAJARVILLE y ANGULO 1991; BOWER 1992; AZEVEDO 1993; NORTON *et al.* 1993b; RENAULT y COCHENNEC 1995; SVÄRDH 1999; HINE y DIGGLES 2002; WARD *et al.* 2004; MOSS *et al.* 2007).

La mayoría de las descripciones son mediante estudios histológicos en los que se han observado prevalencias muy variables, y en ocasiones algunos daños en los tejidos del hospedador relacionados con la intensidad de la infección, como en el caso de rickettsias (SVÄRDH 1999; WARD *et al.* 2004). La transmisión vertical, en el caso de clamidias, y la posibilidad de zoonosis, por ambos tipos de microorganismos, son aspectos que están siendo investigados.

El género *Cytophaga* también ha sido descrito como causante de lesiones en juveniles de la ostra *Crassostrea gigas*. DUNGAN y ELSTON (1988), en un primer estudio relacionado con mortalidades en juveniles de *C. gigas*, observan mediante microscopía electrónica las lesiones degenerativas del ligamento que presentan los ejemplares. Detectan así la presencia de poblaciones bacterianas densas y homogéneas asociadas al «resilium» en proceso de degradación. El «resilium» es uno de los dos componentes estructurales del ligamento, responsable de la apertura de las valvas por oposición al músculo abductor, lo que hace que una pérdida de sus funciones redunde en problemas de alimentación, respiración y excreción, es decir, en un debilitamiento fisiológico. Además, supone una pérdida de la barrera mecánica que impide el acceso a la cavidad paleal y a los tejidos blandos de patógenos o factores ambientales tóxicos.

Bacterias pertenecientes al género *Cytophaga* resultan ser dominantes o codominantes en estas poblaciones. Mediante experimentos *in vitro* demuestran la capacidad de estos aislados de utilizar y de-



gradar el ligamento («resilium»), cuando éste es la única fuente de carbono y nitrógeno (DUNGAN *et al.* 1989).

Los resultados, aunque no son concluyentes en lo que se refiere a la relación directa del género *Cytophaga* con los daños observados en los tejidos blandos, sí apoyan la hipótesis de que las lesiones en el ligamento que ocasionan disminuyen la resistencia de las ostras a la colonización por otros microorganismos patógenos.

4. DIAGNÓSTICO DE ENFERMEDADES BACTERIANAS

El diagnóstico tradicional de enfermedades bacterianas pasa por el aislamiento, en medios generales o selectivos (Fig. 5), y la caracterización bioquímica de los cultivos puros de los microorganismos aislados, ya que en la mayoría de los casos no existe una sintomatología específica que pueda ser asociada con la infección por una especie bacteriana determinada y que, por tanto, pueda ayudar en el diagnóstico. Los procedimientos largos y tediosos que resultan del empleo de métodos clásicos en tubo en placa (LEMOS *et al.* 1985; ROMALDE *et al.* 1990; PRADO *et al.* 2005), pueden reducirse en gran medida mediante el empleo de sistemas miniaturizados (i.e. API 20E, API 50CH o API ZYM) (Fig. 6). Sin embargo, hay que tener en cuenta que la mayoría de estos sistemas han sido diseñados para su uso en clínica humana y, en consecuencia, las bases de datos que utilizan para la identificación de los microorganismos pueden no ser muy completas en el caso de patógenos de moluscos. Además, en algunos casos se han descrito resultados falsos, positivos o negativos, para algunos patógenos en acuicultura (ROMALDE y TORANZO 1991; SANTOS *et al.* 1993).

Por otro lado, en el caso de los miembros del género *Vibrio*, y a pesar de que se han descrito algunas claves identificativas (ALSINA y BLANCH 1994), la existencia de variabilidad intraespecífica, en algunos casos, y el incremento espectacular en los últimos años en el número de especies dentro del género, hacen que su utilidad hoy en día sea limitada. Es destacable el caso del grupo de *V. splendidus* donde en los últimos años se han descrito más de 8 especies nuevas a partir de moluscos y otros hospedadores, presentando algunas de ellas

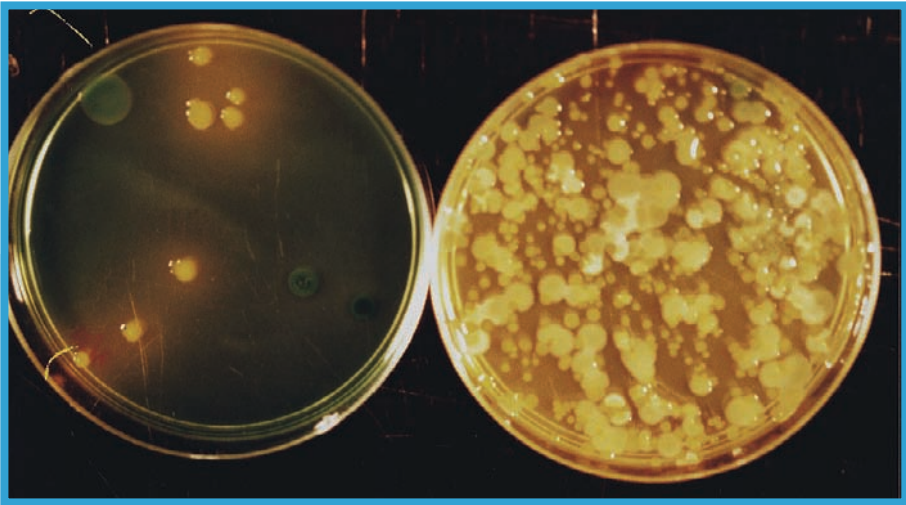


FIGURA 5.

Poblaciones de vibrios obtenidas a partir de muestras de moluscos en el medio selectivo TCBS (tiosulfato-citrato-bilis-sacarosa) agar.

a)



b)



FIGURA 6.

Perfiles obtenidos para una cepa de *Vibrio neptunius* con los sistemas miniaturizados API 20E (a) y API ZYM (b).

como *Vibrio crassostreae* potencial patogénico (FAURY *et al.* 2004; LE ROUX *et al.* 2005; LE ROUX y AUSTIN 2006).

Estos hechos han impulsado en gran medida el uso de métodos moleculares para el diagnóstico de enfermedades en acuicultura y la identificación de patógenos, principalmente basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o en la secuenciación (CUNNINGHAM 2002; SAVAN *et al.* 2005). Así, se han descrito protocolos de PCR específicos para la detección de *Roseovarius crassostreae*, agente de la enfermedad juvenil de ostra (JOD) (MALOY *et al.* 2005) o de *Vibrio tapetis*, causante de la enfermedad del anillo marrón (Fig. 7) (ROMALDE *et al.* 2007), entre otros. Por otro lado, la secuenciación de los genes de RNA ribosómico 16S y de otros genes conservados (genes «house-keeping») han permitido situar taxonómicamente nuevos patógenos de moluscos como *V. neptunius*, *V. ostreicida*, *V. aestuarianus*, o *Nocardia crassostreae* (FRIEDMAN *et al.* 1998; PRADO *et al.* 2005, 2008; GARNIER *et al.* 2007).

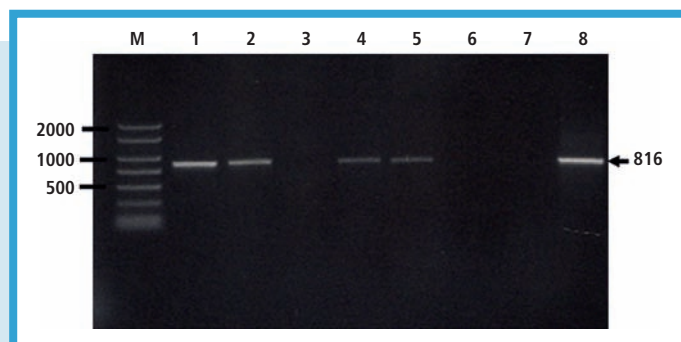
Mención aparte merecen los procariotas intracelulares de los grupos *Rickettsia* y *Chlamydia*. La falta de una línea celular de moluscos en la que poder cultivarlos *in vitro* hace imposible hasta el momento su aislamiento, y su estudio se ha realizado mediante purificación de las células bacterianas en gradientes de densidad y la posterior caracterización electroforética de las proteínas mayoritarias, la identificación bioquímica de sus enzimas o la preparación de sueros policlonales

FIGURA 7.

Detección de *V. tapetis* por PCR en agua intervalvar de almejas infectadas. Líneas:

M: marcador de peso molecular; 1 a 6, almejas procedentes de poblaciones naturales;

7, Control negativo; 8, Control positivo. Los números indican el tamaño en pares de bases del marcador (izquierda) y del fragmento específico (derecha).





para trabajos serológicos (MIALHE *et al.* 1985, 1988; LE GALL *et al.* 1992; WU *et al.* 2005). Además, en los últimos años se están llevando a cabo estudios de caracterización genética de *Rickettsias* de moluscos bivalvos, mediante la amplificación del DNA bacteriano a partir de los tejidos infectados y su posterior análisis mediante secuenciación o tipado molecular.

Como se ha mencionado con anterioridad, se ha demostrado en muchas especies bacterianas patógenas de bivalvos variabilidad intra-específica que en ocasiones, puede llevar aparejada una variabilidad en las características de virulencia de las cepas. El tipado intraespecífico será por tanto una herramienta útil en el estudio de los patógenos bacterianos, no sólo desde el aspecto taxonómico, sino también en el epidemiológico (VAN BELKUM *et al.* 2001; ROMALDE 2005). Desde un punto de vista epidemiológico, las técnicas de tipado molecular y/o genético pueden ser de gran ayuda en el reconocimiento de brotes de enfermedad, en determinar el origen de la infección, la detección de cepas con particular virulencia, así como en el estudio de la distribución geográfica y del rango de hospedadores de posibles variantes de un patógeno específico (ROMALDE 2005).

Entre otras técnicas de tipado genético, el ribotipado, el análisis de polimorfismos de los fragmentos de restricción (RFLP, del inglés «Restriction Fragment Length Polymorphisms»), la electroforesis de campos pulsados (PFGE, del inglés «Pulsed Field Gel Electrophoresis»), el estudio de los polimorfismos de fragmentos de amplificación (AFLP-PCR, del inglés «Amplification Fragment-Length Polymorphism-PCR»), la amplificación aleatoria de DNA (RAPD, del inglés «Random amplified polymorphic DNA»), o la PCR de elementos repetitivos (Rep-PCR, del inglés «Repetitive element PCR»), han sido utilizadas para el estudio de patógenos de moluscos (CASTRO *et al.* 1997; ROMALDE *et al.* 2002; RODRIGUEZ *et al.* 2006; WANG *et al.* 2006; GARNIER *et al.* 2007).

5. CONSIDERACIONES FINALES

En este capítulo hemos intentado hacer una revisión lo más actualizada posible del estado actual de los conocimientos sobre patología



bacteriana de moluscos bivalvos. Es esperable que en un futuro próximo, con la posible diversificación de especies de bivalvos en cultivo y con la incorporación de nuevas áreas geográficas al cultivo intensivo de estos organismos, aparezcan nuevas especies con potencial patológico para diferentes tipos de bivalvos.

El pronto conocimiento de los nuevos patógenos podrá ser de gran ayuda para su control que pasa, debido a las especiales características del cultivo de bivalvos, especialmente de juveniles y adultos, por el establecimiento de medidas preventivas adecuadas y la limitación de movimientos de individuos afectados. El desarrollo de nuevos métodos moleculares de diagnóstico será crucial para lograr tales objetivos. Además, su aplicación en estudios acerca de los patógenos en cultivos en criadero permitirá un mejor conocimiento de la distribución del patógeno en los diferentes compartimentos de la instalación y las posibles transmisiones entre ellos. También permitirá identificar la etiología exacta de la enfermedad, las rutas de infección y el modo de acción de los patógenos.

6. REFERENCIAS

- ALSINA, M. y A. R. BLANCH, 1994 A set of keys for biochemical identification of environmental *Vibrio* species. J. Appl. Bacteriol. **76**: 79-85.
- ANGUIANO-BELTRÁN, C., M. L. LIZÁRRAGA-PARTIDA y R. SEARCY-BERNAL, 2004 Effect of *Vibrio alginolyticus* on larval survival of the blue mussel *Mytilus galloprovincialis*. Dis. Aquat. Org. **59**: 119-123.
- ARAYA, R. A., M. A. JORQUERA y C. E. RIQUELME, 1999 Asociación de bacterias al ciclo de vida de *Argopecten purpuratus*. Revista Chilena de Historia Natural **72**: 261-271.
- AZEVEDO, C., 1993 Occurrence of an unusual branchial mycoplasma-like infection in cockle *Cerastoderma edule* (Mollusca, Bivalvia). Dis. Aquat. Org. **16**: 55-59.
- BOARDMAN, C. L., A. P. MALOY y K. J. BOETTCHER, 2008 Localization of the bacterial agent of juvenile oyster disease (*Roseovarius crassostreae*) within affected eastern oysters (*Crassostrea virginica*). J. Invertebr. Pathol. **97**: 150-158.
- BOARDMAN, C. L. 2005 Host-pathogen interactions between Eastern oysters (*Crassostrea virginica*) and the bacterial agent of juvenile oyster disease (*Roseovarius crassostreae*). Master's thesis, Dept. Biochem. Microbiol. Mol. Biol. University of Maine, Orono, Maine.



- BOETTCHER, K. J., B. J. BARBER y J. T. SINGER, 1999 Use of antibacterial agents to elucidate the etiology of juvenile oyster disease (JOD) in *Crassostrea virginica* and numerical dominance of an α -Proteobacterium in JOD-affected animals. Appl. Environ. Microbiol. **65**: 2534–2539.
- BOETTCHER, K. J., B. J. BARBER y J. T. SINGER, 2000 Additional evidence that juvenile oyster disease is caused by a member of the *Roseobacter* group and colonization of nonaffected animals by *Stappia stellulata*-like strains. Appl. Environ. Microbiol. **66**: 3924–3930.
- BOETTCHER, K. J., K. K. GEAGHAN, A. P. MALOY y J. B. BARBER, 2005 *Roseovarius crassostreae* sp. nov., a member of the *Roseobacter* clade and the apparent cause of juvenile oyster disease (JOD) in cultured Eastern oysters. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **55**: 1531-1537.
- BORREGO, J. J., D. CASTRO, A. LUQUE, C. PAILLARD, P. MAES *et al.*, 1996 *Vibrio tapetis* sp.nov., the causative agent of the brown ring disease affecting cultured clams. Int. J. Syst. Bacteriol. **46**: 480-484.
- BOWER, S. M., 1992 Diseases of cultured japanese scallops (*Patinopecten yesoensis*) in British Columbia, Canada. Aquaculture **107**: 201-210.
- BOWER S. M., S. E. MCGLADDERY y I. M. PRICE, 1994 Synopsis of infectious disease and parasites of commercially exploited shellfish. Ann. Rev. Fish Dis. **4**: 1-200.
- BOWER, S. M. y G. R. MEYER 1991 Disease of Japanese scallops (*Patinopecten yesoensis*) caused by an intracellular bacterium. J. Shellfish Res. **10**: 513.
- BRICEL, V. M., S. E. FORD, F. J. BORRERO, F. O. PERKINS, G. RIVARA *et al.*, 1992 Unexplained mortalities of hatchery-reared juvenile oysters, *Crassostrea virginica* (Gmelin). J. Shellfish Res. **11**: 331-347.
- BROWN, C., 1973 The effects of some selected bacteria on embryos and larvae of the American oyster, *Crassostrea virginica*. J. Invertebr. Pathol. **21**: 215-223.
- 1974 A pigment-producing Pseudomonad which discolors culture containers of embryos of a bivalve mollusk. Chesapeake Sci. **15**: 17-21.
- 1981a A study of two shellfish-pathogenic *Vibrio* strains isolated from a Long Island hatchery during a recent outbreak of disease. J. Shellfish Res. **1**: 83-87.
- 1981b A prodiginine pigment toxic to embryos and larvae of *Crassostrea virginica*. J. Invertebr. Pathol. **38**: 281-293.
- 1983 Bacterial diseases in bivalve larval cultures and their control, pp. 230-242 en *Culture of marine invertebrates*, editado por Carl J. Berg, jr. Hutchinson Ross Publishing Company, Stroudsburg, Pennsylvania.



- BROWN, C. y E. LOSEE, 1978 Observations on natural and induced epizootics of vibriosis in *Crassostrea virginica* larvae. J. Invertebr. Pathol. **31**: 41-47.
- BROWN, C. y G. ROLAND, 1984 Characterization of exotoxin produced by a shellfish-pathogenic *Vibrio* sp. J. Fish Dis. **7**: 117-126.
- BROWN, C. y L. P. TETTELBAACH, 1988 Characterization of a nonmotile *Vibrio* sp. pathogenic to larvae of *Mercenaria mercenaria* and *Crassostrea virginica*. Aquaculture **74**: 195-204.
- BUCHANAN, J. S., 1978 Cytological studies on a new species of rickettsia found in association with a phage in the digestive gland of the marine bivalve mollusc, *Tellina tenuis* (da Costa). J. Fish Dis. **1**: 27-43.
- CAJARAVILLE, M. P. y E. ANGULO, 1991 *Chlamydia*-like organisms in digestive and duct cells of mussels from the Basque coast. J. Invertebr. Pathol. **58**: 381-386.
- CASTRO, D., J. L. ROMALDE, J. VILA, B. MAGARIÑOS, A. LUQUE *et al.*, 1997 Intraspecific characterization of *Vibrio tapetis* strains by use of pulsed-field gel electrophoresis, ribotyping and plasmid profiles. Appl. Environ. Microbiol. **93**: 438-447.
- CHENEY, D. P., B. F. McDONALD y R. A. ELSTON, 2000 Summer mortality of Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg): initial findings on multiple environmental stressors in Puget Sound, Washington, 1998. J. Shellfish Res. **19**: 353-380.
- COMPS, M., 1983 Recherches histologiques et cytologiques sur les infections intracellulaires des mollusques bivalves marins. Thèse de Doctorat d'Etat, Université des Sciences et Techniques du Languedoc, Montpellier.
- CUNNINGHAM, C., 2002 Molecular diagnosis of fish and shellfish disease: present status and potential use in disease control. Aquaculture **206**: 199-55.
- DAVEY, M. E. y G. A. O'TOOLE, 2000 Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. Microbiol. Mol. Biol. Rev. **64**: 847-867.
- DAVIS, C. V. y B. J. BARBER, 1994 Size-dependent mortality in hatchery-reared populations of oysters, *Crassostrea virginica*, Gmelin 1791, affected by juvenile oyster disease. J. Shellfish Res. **13**: 137-142.
- DAVIS, C. y P. E. CHANLEY, 1956 Effects of some dissolved substances on bivalve larvae. Proceed. Natl. Shellfish. Assoc. **46**: 59-47.
- DISALVO, L. H., J. BLECKA y R. ZEBAL, 1978 *Vibrio anguillarum* and larval mortality in a California coastal shellfish hatchery. Appl. Environ. Microbiol. **35**: 219-221.
- DUNGAN, C. F. y R. A. ELSTON, 1988 Histopathological and ultrastructural characteristics of bacterial destruction of the hinge ligaments of cultured juvenile Pacific oysters, *Crassostrea gigas*. Aquaculture **72**: 1-14.



- DUNGAN, C. F., R. A. ELSTON y M. H. SCHIEWE, 1989 Evidence for colonization and destruction of hinge ligaments in cultured juvenile Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) by *Cytophaga*-like bacteria. Appl. Environ. Microbiol. **55**: 1128-1135.
- ELSTON, R. y L. LEIBOVITZ, 1980 Pathogenesis of experimental vibriosis in larval American oysters, *Crassostrea virginica*. Can. J. Fish Aquat. Sci. **37**: 964-978.
- ELSTON, R., E. L. ELLIOT y R. R. COLWELL, 1982 Conchiolin infection and surface coating *Vibrio*: shell fragility, growth depression and mortalities in cultured oysters and clams, *Crassostrea virginica*, *Ostrea edulis* and *Mercenaria mercenaria*. J. Fish Dis. **5**: 265-284.
- ELSTON, 1984 R. A., P. FRELIER y D. CHENEY, 1999 Extrapallial abscesses associated with chronic bacterial infections in the intensively cultured juvenile Pacific oyster *Crassostrea gigas*. Dis. Aquat. Org. **37**: 115-120.
- ELSTON, R. A. y M. G. PEACOCK, 1984 A rickettsiales-like infection in the Pacific razor clam, *Siliqua patula*. J. Invertebr. Pathol. **44**: 84-96.
- ELSTON, R., 1984 Prevention and management of infectious diseases in intensive mollusc husbandry. J. World Maricul. Soc. **15**: 284-300.
- ELSTON, R.A. 1986 Anintranuclear pathogen (nuclear inclusion X; NIX) associated with massive mortalities on the pacific razor clam, siliquapatula. J. Invertebr. Pathol. 47:93-104.
- ESTES, R. M., C. S. FRIEDMAN, R. A. ELSTON y R. P. HERWIG, 2004 Pathogenicity testing of shellfish hatchery bacterial isolates on Pacific oyster *Crassostrea gigas* larvae. Dis. Aquat. Org. **58**: 223-230.
- FAURY, N., D. SAULNIER, F. L. THOMPSON, M. GAY, J. SWINGS *et al.*, 2004 *Vibrio crassostreae* sp. nov isolated from the haemolymph of oysters (*Crassostrea gigas*). Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **54**, 2137-2140.
- FORD, S. E. y F. J. BORRERO, 2001 Epizootiology and pathology of juvenile oyster disease in the easter oyster, *Crassostrea virginica*. J. Invertebr. Pathol. **78**: 141-154.
- FRIEDMAN, C. S. y R. P. HEDRICK, 1991 Pacific oyster nocardiosis: Isolation of the bacterium and induction of laboratory infections. J. Invertebr. Pathol. **57**: 109-120.
- FRIEDMAN, C. S., B. L. BEAMAN, J. CHUN, M. GOODFELLOW, A. GEE *et al.*, 1998 *Nocardia crassostreae* sp. nov., the casual agent of nocardiosis in Pacific oysters. Int. J. Syst. Bacteriol. **48**: 237-246.
- FRIES, C. R. y D. M. GRANT, 1991 Rickettsiae in gill epithelial cells of the hard clam *Mercenaria mercenaria*. J. Invertebr. Pathol. **57**: 166-171.



- GARLAND, C. D., G. V. NASH, C. E. SUMNER y T. A. McMEEKIN, 1983 Bacterial pathogens of oyster larvae (*Crassostrea gigas*) in a Tasmanian hatchery. *Aust. J. Mar. Fresw. Res.* **34**: 483-487.
- GARNIER, M., Y. LABREUCHE, C. GARCIA, M. ROBERT y J. L. NICOLAS, 2007 Evidence for the involvement of pathogenic bacteria in summer mortalities of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Microb. Ecol.* **53**: 187-196.
- GAY, M., F. C. J. BERTHE y F. LE ROUX, 2004a Screening of vibrio isolates to develop an experimental infection model in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Dis. Aquat. Org.* **59**: 49-56.
- GAY, M., T. RENAULT, A.-M. PONS y F. LE ROUX, 2004b Two *Vibrio splendidus* related strains collaborate to kill *Crassostrea gigas*: taxonomy and host alterations. *Dis. Aquat. Org.* **62**: 65-74.
- GÓMEZ-LEÓN, J., L. VILLAMIL, M. L. LEMOS, B. NOVOA y A. FIGUERAS, 2005 Isolation of *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio splendidus* from aquacultured carpet shell clam (*Ruditapes decussatus*) larvae associated with mass mortalities. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 98-104.
- GUILLARD, R. R. L., 1959 Further evidence of the destruction of bivalve larvae by bacteria. *Biol. Bull.* **117**: 258-266, 1959.
- GULKA, G., P. W. CHANG y K. A. MARTI, 1983 Prokaryotic infection associated with a mass mortality of the sea scallop, *Placopecten magellanicus*. *J. Fish Dis.* **6**: 355-364.
- HADA, H. S., P. A. WEST, J. V. LEE, J. STEMMLER y R. R. COLWELL, 1984 *Vibrio tubiashii* sp. nov., a pathogen of bivalve mollusks. *Intern. J. System. Bacteriol.* **34**: 1-4.
- HARSHBARGER, J. C. y S. C. CHANG, 1977 Chlamydiae (with phages), mycoplasmas, and rickettsiae in Chesapeake Bay bivalves. *Science* **196**: 666-668.
- HELM, M. M. y F. M. SMITH, 1971 Observations on a bacterial disease in laboratory-cultured larvae of the European flat oyster, *Ostrea edulis* L. *Int. Counc. Explor. Sea, CM 1971 / k:10*, 9 pp.
- HINE, P. M. y B. K. DIGGLES, 2002 Prokaryote infections in the New Zealand scallops *Pecten novaezelandiae* and *Chlamys delicatula*. *Dis. Aquat. Org.* **50**: 137-144.
- IMAI, T., K.-I. NUMACHI, J. OIZIMU y S. SATO, 1965 Studies on the mass mortality of the oyster in Matsushima Bay. II. Search for the cause of mass mortality and the possibility to prevent it by transplantation experiment. *Bull. Tohoku Reg. Fish. Res. Lab.* **25**: 25-38.
- JEFFRIES, V. E., 1982 Three *Vibrio* strains pathogenic to larvae of *Crassostrea gigas* and *Ostrea edulis*. *Aquaculture* **29**: 201-226.



- JOLY, J. P. y M. COMPS 1980 Étude d'un micro-organisme de tupe chlamydien chez la palourde *Ruditapes decussatus* L. Rev. Trav. Inst. Pêches Marit. **44**: 285-287.
- KARUNASAGAR, I., S. K. OTTA y I. KARUNASAGAR, 1996 Biofilm formation by *Vibrio harveyi* on surfaces. Aquaculture **140**: 241-245.
- LABREUCHE, Y., C. LAMBERT, P. SOUDANT, V. BOULO, A. HUVET *et al.*, 2006a. Cellular and molecular hemocyte responses of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, following bacterial infection with *Vibrio aestuarianus* strain 01/32. Microbiol. Infect. **8**: 2715-2724.
- LABREUCHE, Y., P. SOUDANT, M. GONÇALVES, C. LAMBERT and J.-L. NICOLAS, 2006b. Effects of extracellular products from the pathogenic *Vibrio aestuarianus* strain 01/32 on lethality and cellular immune responses of the oyster *Crassostrea gigas*. Develop. Comp. Immunol. **30**: 367-379.
- LACOSTE, A., F. JALABERT, S. MALHAM, A. CUEFF, F. GÉLÉBART *et al.*, 2001 A *Vibrio splendidus* strains is associated with summer mortality of juvenil oysters *Crassostrea gigas* in the Bay of Morlais (North Brittany, France). Dis. Aquat. Org. **46**: 139-145.
- LAMBERT & NICOLAS 1998 *Vibrio pectenica* sp. nov., a pathogen of scallop (*Pecten maximus*) larvae. Int. J. Syst. Bacteriol. **48**: 481-487.
- LAMBERT, C. y J. L. NICOLAS, 1998 Specific inhibition of chemiluminiscent activity by pathogenic *Vibrios* in hemocytes of two marine Bivalves: *Pecten maximus* and *Crassostrea gigas*. J. Invertebr. Pathol. **71**: 53-63.
- LAMBERT, C., J. L. NICOLAS y V. CILIA, V. 1999 *Vibrio splendidus*-related strain isolated from brown deposit in scallop (*Pecten maximus*) cultured in Brittany (France). Bull. Eur. Ass. Fish Pathol. **19**: 102-106.
- LAMBERT, C., J. L. NICOLAS y V. BULTEL, 2001 Toxicity to bivalve hemocytes of pathogenic *Vibrio* cytoplasmic extract. J. Invertebr. Pathol. **77**: 165-172.
- LAUCKNER, G., 1983 Diseases of Mollusca: Bivalvia, pp. 477-961 en *Diseases of marine animals, vol. II*, editado por O. Kinne. Biologische Anstalt Helgoland, Hamburg.
- LE MOS, M. L., A. E. TORANZO y J. L. BARJA 1985 Modified medium for the oxidation-fermentation test in the identification of marine bacteria. Appl. Environ. Microbiol. **49**:1541-1543.
- LE GALL, G. y E. MIALHE, 1992 Purification of Rickettsiales-like organisms associated with *Pecten maximus* (Mollusca: Bivalvia): serological and biochemical characterization. Dis. Aquat. Org. **12**: 215-220.
- LE GALL, G., D. CHAGOT, E. MIALHE y H. GRIZEL, 1988 Branchial rickettsiales-like infection associated with a mass mortality of sea scallop *Pecten maximus*. Dis. Aquat. Org. **10**: 139-145.



- LE GALL, G., C. MOURTON, V. BOULO, F. PAOLUCCI, B. PAU *et al.*, 1992 Monoclonal antibodies against a gill Rickettsiales-like organism of *Pecten maximus* (Bivalvia): application to indirect immunofluorescence diagnosis. *Dis. Aquat. Org.* **14**: 213-217.
- LE ROUX, F., M. GAY, C. LAMBERT, M. WAETCHER, S. POUBALANNE *et al.*, 2002 Comparative analysis of *Vibrio splendidus*-related strains isolated during *Crassostrea gigas* mortality events. *Aquat. Living Resour.* **15**: 251-258.
- LE ROUX, F., A. GOUBET, F. L. THOMPSON, N. FAURY, M. GAY *et al.*, 2005 *Vibrio gigantis* sp. nov. Isolated from the haemolymph of cultured oysters (*Crassostrea gigas*). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **55**, 2251-2255.
- LE ROUX, F. y B. AUSTIN, 2006 *Vibrio splendidus*, pp. 285-296 en *The Biology of Vibrios*, editado por F. L. Thompson, B. Austin y J. Swings. ASM Press, Washington.
- LEWIS, E. J., C. A. FARLEY, E. B. SMALL y A. M. BAYA, 1996 A synopsis of juvenile oyster disease (JOD) experimental studies in *Crassostrea virginica*. *Aquat. Living Resour.* **9**: 169-178.
- LIPP, P. R., B. BROWN, J. LISTON y K. CHEW, 1976 Recent findings on the summer diseases of Pacific oysters. *Proc. Nat. Shellfish Assoc.* **65**: 9-10.
- LODEIROS, C., J. BOLINCHES, C. P. DOPAZO and A. E. TORANZO, 1987 Bacillary necrosis in hatcheries of *Ostrea edulis* in Spain. *Aquaculture* **65**: 15-29.
- LODEIROS, C., L. Y. FREITES y A. VÉLEZ, 1992 Necrosis bacilar en larvas del bivalvo *Euvola ziczac* (Linneo, 1758) causada por una *Pseudomonas* sp. Microbiología, *Acta Científica Venezolana* **43**: 154-158.
- LUNA-GONZÁLEZ, A., A. N. MAEDA-MARTÍNEZ, J. C. SÁINZ y F. ASCENCIO-VALLE, 2002 Comparative susceptibility of veliger larvae of four bivalve mollusks to a *Vibrio alginolyticus* strains. *Dis. Aquat. Org.* **49**: 221-226.
- LYPOWSKY, V. P. y K. K. CHEW, 1972 Mortality of Pacific oysters *C. gigas*: the influence of temperature and enriched seawater on survival. *Proc. Nat. Shellfish Assoc.* **62**: 72-82.
- MALOY, A. P., B. J. BARBER y K. J. BOETTCHER, 2005 A PCR-based diagnostic assay for the detection of *Roseovarius crassostreae* in *Crassostrea virginica* affected by juvenile oyster disease (JOD). *Dis. Aquat. Org.* **67**: 155-162.
- MALOY, A. P., S. E. FORD, R. C. KARNEY y K. J. BOETTCHER, 2007 *Roseovarius crassostreae*, the etiological agent of Juvenile Oyster Disease (now to be known as *Roseovarius* Oyster Disease) in *Crassostrea virginica*. *Aquaculture* **269**: 71-83.
- MCGLADDERY, S. E., 1999 Shellfish diseases (viral, bacterial and fungal), pp. 738-842 en *Fish Diseases and Disorders*, editado por P. T. K. Woo y D. W. Bruno D. W.



- MEYERS, T. R., 1981 Endemic diseases of cultured shellfish of Long Island, New York: Adult and juvenile American oysters (*Crassostrea virginica*) and hard clams (*Mercenaria mercenaria*). *Aquaculture* **22**: 305-330.
- MEYERS, T. R., S. SHORT y W. EATON, 1990 Summer mortalities and incidental parasitisms of cultured Pacific oysters in Alaska. *J. Aquat. Anim. Health* **2**: 172-176.
- MIALHE, E., E. BACHÈRE, C. LE BEC y H. GRIZEL, 1985 Isolement et purification de *Marteilia* (Protozoa: Asctospora) parasite de bivalves marins. *C. R. Acad. Sci. Paris* **301**: 137-142.
- MIALHE, E., D. CHAGOT, V. BOULO, M. COMPS, F. RUANO *et al.*, 1987 An infection of *Ruditapes decussatus* (Bivalvia) by *Rickettsia*. *Aquaculture* **67**: 258-259.
- MIALHE, E., E. BACHÈRE, D. CHAGOT y H. GRIZEL, 1988 Isolation and purification of Protozoa *Bonamia ostreae* (Pichot *et al.* 1980), a parasite affecting the flat oyster *Ostrea edulis* L. *Aquaculture* **71**: 293-299.
- MORI, K., T. IMAI, K. TOYOSHIMA y I. USUI, 1965 Studies on the mass mortality of the oyster in Matsushima Bay. IV. changes in the physiological activity and the glycogen content of the oyster during the stages of sexual maturation and spawning. *Bull. Tohoku Reg. Fish. Res.* **25**: 49-64.
- MORI, K., 1975 Seasonal variation in physiological activity of scallops under culture in the coastal waters of Sanriku district, Japan, and a physiological approach of a possible cause of their mass mortality. *Bull. Mar. Biol. Stn. Asamushi Tohoku Univ.* **15**: 59-79.
- MORRISON, C. y G. SHUM, 1983 Chlamydia-like organisms in the digestive diverticula of the bay scallop, *Argopecten irradians* (Lmk). *J. Fish Dis.* **6**: 537-541.
- MOSS, J. A., E. M. BURRESON, J. F. CORDES, C. F. DUNGAN, G. D., A. WANG *et al.*, 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.
- MURCHELANO, R. A., C. BROWN, C. y J. BISHOP, 1975 Quantitative and qualitative studies of bacteria isolated from sea water used in the laboratory culture of the American oyster, *Crassostrea virginica*. *J. Fish. Res. Board Can.* **32**: 739-745.
- NICOLAS, J. L., S. CORRE, G. GAUTHIER, R. ROBERT y D. ANSQUER, 1996 Bacterial problems associated with scallop *Pecten maximus* larval culture. *Dis. Aquat. Org.* **27**: 67-76.
- NORTON, J. H., M. A. SHEPHERD, M. R. ABDON-NAGUIT y S. LINDSAY, 1993a Mortalities in the Giant clam *Hippopus hippopus* associated with Rickettsiales-like organisms. *J. Invertebr. Pathol.* **62**: 207-209.



- NORTON, J. H., M. A. SHEPHERD y H. C. PRIOR, 1993b Intracellular bacteria associated with winter mortality in juvenile giant clam, *Tridacna gigas*. J. Invertebr. Pathol. **62**: 204-206.
- NOTTAGE & BIRKBECK, 1987 Interactions between different strains of *Vibrio alginolyticus* and hemolymph fractions from adult *Mytilus edulis*. J. Invertebr. Pathol. **56**: 15-19
- NOTTAGE, A. S. y T. H. BIRKBECK, 1987 The role of toxins in *Vibrio* infections of bivalve molluscs. Aquaculture **67**: 244-246.
- NOTTAGE, A. S., P. D. SINCLAIR y T. H. BIRKBECK, 1989 Role of low-molecular-weight ciliostatic toxins in vibriosis of bivalve mollusks. J. Aquat. Anim. Health **1**: 80-186.
- NUMACHI, K-I., J. OIZIMU, S. SATO y T. IMAI, 1965 studies on the mass mortality of the oyster in Matsushima Bay. III. The pathological changes of the oyster caused by a gram-positive bacteria and the frequency of their infection. Bull. Tohoku Reg. Fish. Res. Lab. **25**: 39-47.
- OPHIR, T. y D. L. GUTNICK, 1994 A role for exopolysaccharides in the protection of microorganisms from desiccation. Appl. Environ. Microbiol. **60**: 740-745.
- OTTO, S. V., J. C. HARSHBARGER y S. C. CHANG, 1979 Status of selected unicellular eucaryote pathogens, and prevalence and histopathology of inclusions containing obligate prokaryote parasite, in commercial bivalve mollusks from Maryland estuaries. Haliotis **8**: 285-295.
- PAILLARD, C., K. A. ASHTON-ALCOX y S. E. FORD, 1996 Changes in bacterial densities and hemocyte parameters in Eastern oysters, *Crassostrea virginica*, affected by juvenile oyster disease. Aquat. Living Resour. **9**: 145-158.
- PAILLARD, C., F. LE ROUX y J. J. BORREGO, 2004 Bacterial disease in marine bivalves, a review of recent studies: Trends and evolution. Aquat. Living Resour. **17**: 477-498.
- PERDUE, J. A., J. H. BEATTIE y K. K. CHEW, 1981 Some relationships between gametogenic cycle and summer mortality phenomenon in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) in Washington State. J. Shellfish Res. **1**: 9-16.
- PRADO, S., 2006 Microbiota asociada a criaderos de moluscos: patogénesis y probiosis. Tesis Doctoral. Universidad de Santiago de Compostela.
- PRADO, S., J. L. ROMALDE, J. MONTES y J. L. BARJA, 2005 Pathogenic bacteria isolated from disease outbreaks in shellfish hatcheries. First description of *Vibrio neptunius* as an oyster pathogen. Dis. Aquat. Org. **67**: 209-215.
- PRADO, S., J. L. ROMALDE y J. L. BARJA, 2008 *Vibrio ostreicida* sp nov., a new pathogen for flat oyster (*Ostrea edulis*) larvae. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. (In press).



- PRIEUR, D. y J. P. CARVAL, 1979 Bacteriological and physico-chemical analysis in a bivalve hatchery: Techniques and preliminary results. *Aquaculture* **17**: 359-374.
- RENAULT, T., N. COCHENNEC, R. M. LE DEUFF y B. CHOLLET, 1994 Herpes-like virus infecting Japanese oyster (*Crassostrea gigas*) spat. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.* **14**: 64-65.
- RENAULT, T., R. M. LE DEUFF, N. COCHENNEC, B. CHOLLET y P. MAFFART, 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 y COCHENNEC, 1994 Rickettsia-like organisms in the cytoplasm of gill epithelial cells of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *J. Invertebr. Pathol.* **64**: 160-162.
- RENAULT y COCHENNEC, 1995 Chlamydia-like organisms in ctenidia and mantle cells of the Japanese oyster *Crassostrea gigas* from the French Atlantic coast. *Dis. Aquat. Org.* **23**: 153-159.
- RIQUELME, C., G. HAYASHIDA, A. E. TORANZO, J. VILCHES y P. CHÁVEZ, 1995 Pathogenicity studies on a *Vibrio anguillarum*-related (VAR) strain causing an epizootic in *Argopecten purpuratus* larvae cultured in Chile. *Dis. Aquat. Org.* **22**: 135-141.
- RIQUELME, C., G. HAYASHIDA, R. ARAYA, A. UCHIDA, M. SATOMI, *et al.*, 1996 Isolation of a native bacterial strain from the scallop *Argopecten purpuratus* with inhibitory effects against pathogenic vibrios. *J. Shellfish Res.* **15**: 369-374.
- RODRÍGUEZ, J. M., S. LÓPEZ-ROMALDE, R. BEAZ, M.C. ALONSO, D. CASTRO *et al.*, 2006 Molecular fingerprinting of *Vibrio tapetis* strains using three PCR-based methods: ERIC-PCR, REP-PCR and RAPD. *Dis. Aquat. Org.* **69**: 175-183.
- ROMALDE, J. L., 2005 Application of DNA fingerprinting techniques to the study of fish and shellfish pathogens, pp. 163-191 en *Trends in DNA Fingerprinting Research*, editado por M.M. Read. Nova Science Publishers, Inc. Nueva York.
- ROMALDE, J. L. y A. E. TORANZO, 1991 Evaluation of the API-20E system for the routine diagnosis of the enteric redmouth disease. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol* **11**: 147-149.
- ROMALDE, J. L., A. E. TORANZO y J. L. BARJA, 1990 Changes in bacterial populations during red tides caused by *Mesodinium rubrum* and *Gymnodinium catenatum* in North West Coast of Spain. *J. Appl. Bacteriol.* **68**: 123-132.
- ROMALDE, J. L., D. CASTRO, B. MAGARIÑOS, L. LÓPEZ-CORTÉS y J. J. BORREGO 2002 Comparison of ribotyping, pulsed-field gel electrophoresis and random



- amplified polymorphic DNA for molecular typing *Vibrio tapetis*. Syst. Appl. Microbiol. **25**: 544-550.
- ROMALDE, J. L., J. M. RODRÍGUEZ y J. J. BORREGO 2007 Protocolo de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) para detección e identificación de *Vibrio tapetis* a partir de cultivos puros del microorganismo y de tejidos de moluscos. Oficina Española de Patentes y Marcas. Nº Publ. 2265707.
- ROMERO, X., J. F. THURNBULL y R. JIMÉNEZ, 2000 Ultrastructure and cytopathology of a rickettsia-like organism causing systemic infection in the redclaw crayfish, *Cherax quadricarinatus* (Crustacea: Decapoda), in Ecuador. J. Invertebr. pathol. **76**: 95-104.
- SÁINZ, J. C., A. N. MAEDA-MARTÍNEZ y F. ASCENCIO, 1998 Experimental vibriosis induction with *Vibrio alginolyticus* of larvae of the Catarina scallop (*Argopecten ventricosus=circularis*) (Sowerby II, 1842). Microb. Ecol. **35**: 188-192.
- SANDLUND, N., L. TORKILDSEN, T. MAGNESEN, S. MORTENSEN y Ø. BERGH, 2006 Immunohistochemistry of great scallop *Pecten maximus* larvae experimentally challenged with pathogenic bacteria. Dis. Aquat. Org. **69**: 163-173.
- SANTOS, Y., J. L. ROMALDE, I. BANDÍN, B. MAGARIÑOS, S. NUÑEZ *et al.*, 1993 Usefulness of the API-20E system for the identification of bacterial fish pathogens. Aquaculture **116**: 111-120.
- SAVAN, R., T. KONO y M. SAKAI, 2005 Loop-mediated isothermal amplification: an emergin technology for detection of fish and shellfish pathogens. J. Fish Dis. **28**: 573-581.
- SINDERMANN, C. J., 1990 Diseases of Marine Shellfish, en *Principal Diseases of Marine Fish and Shellfish*, Academic Press, San Diego.
- SOLETSCHNIK, P., O. LE MOINE, N. FAURY, D. RAZET, P. GEAIRON *et al.*, 1999 Summer mortality of the oyster in the Bay Marennes-Oleron: spatial variability of environment and biology using a geographical information system (GIS). Aquat. Living Resour. **12**: 131-143.
- SUGUMAR, G., T. NAKAI, Y. HIRATA, D. MATSUBARA y K. MUROGA, 1998 *Vibrio splendidus* biovar II as the causative agent of bacillary necrosis of Japanese oyster *Crassostrea gigas* larvae. Dis. Aquat. Org. **33**: 111-118.
- SUN, J. y X. WU, 2004 Histology, ultrastructure, and morphogenesis of a rickettsia-like organism causing disease in the oyster, *Crassostrea ariakensis* Gould. J. Invertebr. Pathol. **86**: 77-86.
- SUTTON, D. C. y R. GARRICK, 1993 Bacterial disease of cultured giant clam *Tridacna gigas* larvae. Dis. Aquat. Org. **16**: 47-53.



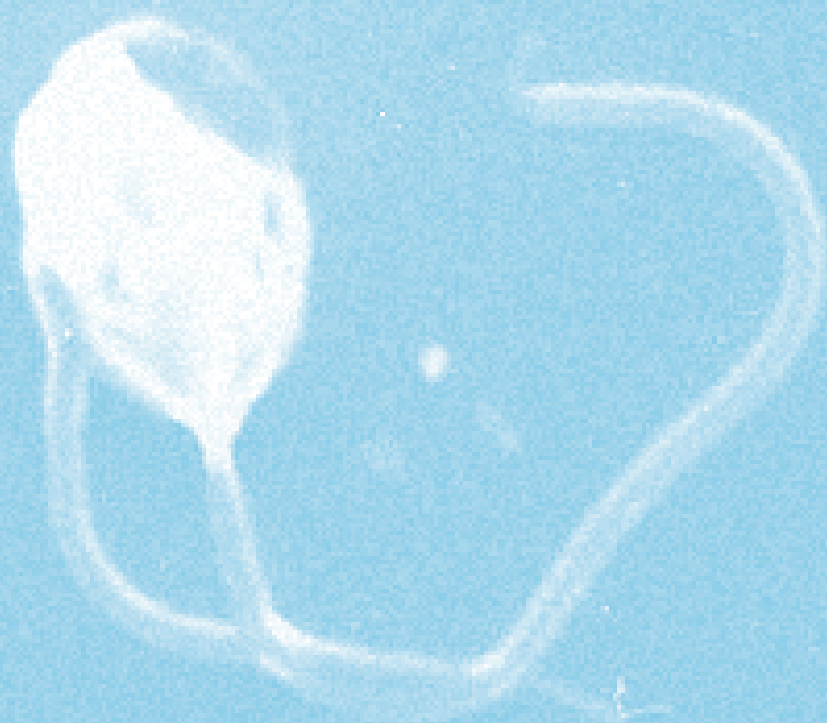
- SVÄRDH, L., 1999 Bacteria, granulocytomas, and trematode metacercariae in the digestive gland of *Mytilus edulis*: seasonal and interpopulation variation. *J. Invertebr. Pathol.* **74**: 275-280.
- THOMPSON, F. L., Y. LI, B. GÓMEZ-GIL, C. C. THOMPSON, B. HOSTE, *et al.* 2003. *Vibrio neptunius* sp. nov., *Vibrio brasiliensis* sp. nov. and *Vibrio xuii* sp. nov., isolated from the marine aquaculture environment (bivalves, fish, rotifers and shrimps). *Int. J. Syst. Evol. Microb.* **53**: 245-252.
- TUBIASH, H. S., 1974 Single and continuous exposure of the adult American oyster, *Crassostrea virginica*, to marine vibrios. *Can. J. Microb.* **20**: 513-517.
- 1975 Bacterial pathogens associated with cultured bivalve mollusk larvae, pp. 61-71, en *Culture of Marine Invertebrate Animals*, editado por W. L. Smith y C. M. H. Chanley. Plenum Press, New York, USA.
- TUBIASH, H. S., P. E. CHANLEY y E. LEIFSON, E., 1965 Bacillary necrosis, a disease of larval and juvenile bivalve mollusks. I. Etiology and epizootiology. *J. Bacteriol.* **90**: 1036-1044.
- TUBIASH, H. S., R. R. COLWELL y R. SAYAZAKI, 1970 Marine vibrios associated with bacillary necrosis, a disease of larval and juvenile bivalve mollusks. *J. Bacteriol.* **103**: 271-272.
- TUBIASH y OTTO, 1986 Bacterial problems in oysters. A review., pp. 233-242, en *Pathology in Marine Aquaculture*, editado por C. P. Vivarès, J. R. Bonami, y E. Jasper. European Aquaculture Society, Spec. Publ. 9. Bredene (Bélgica).
- VAN BELKUM, A., M. STRUELENS, A. DE VISSER, H. VERBRUGH y M. TIBAYRENC, 2001 Role of genomic typing in taxonomy, evolutionary genetics, and microbial epidemiology. *Clin. Microbiol. Rev.* **14**: 547-560.
- VILLALBA, A., M. J. CARBALLAL, C. LÓPEZ, A. CABADA, L. CORRAL *et al.*, 1999 Branchial rickettsia-like infection associated with clam *Venerupis rhomboides* mortality. *Dis. Aquat. Org.* **36**: 53-60.
- WAECHTER, M., F. LE ROUX, J. L. NICOLAS, E. MARISSAL y F. BERTHE, 2002 Characterization of *Crassostrea gigas* spat pathogenic bacteria. *C. R. Acad. Sci. Paris* **325**: 231-238.
- WALNE, P. R., 1956 Bacteria in experiments on rearing oyster larvae. *Nature* **178**: 91.
- 1958 The importance of bacteria in laboratory experiments on rearing the larvae of *Ostrea edulis* (L.). *J. mar. biol. Ass. U.K.* **37**: 415-425.
- WANG, Y., P. C. LEUNG, P.-Y. QIAN y J.-D. GU, 2006 Antibiotic resistance and plasmid profile of environmental isolates of *Vibrio* species from Mai Po Nature Reserve, Hong Kong. *Ecotoxicology* **15**: 371-378.



- WARD, M. E., J. D. SHIELDS y C. L. VAN DOVER, 2004 Parasitism in species of *Bathymodiolus* (Bivalvia: Mytilidae) mussels from deep-sea and hydrothermal vents. *Dis. Aquat. Org.* **62**: 1-16.
- WATNICK, P. y Y. R. KOLTER, 2000 Biofilm, city of microbes. *J. Bacteriol.* **182**: 2675-2679.
- WEN, C.-M., G.-H. KOU y S.-N. CHEN, 1994 Rickettsiaceae-like microorganisms in the gill and digestive gland of the hard clam, *Meretrix lusoria* Röding. *J. Invertebr. Pathol.* **64**: 138-142.
- WINKLER, H. H., 1990 Rickettsia species (as organisms). *Annu. Rec. Microbiol.* **44**: 131-153.
- WU, X. Z., J. JINGFENG, W. ZHANG y B. WEN, 2005 Purification and antigenic characteristics of a rickettsia-like organism from the oyster *Crassostrea ariakensis*. *Dis. Aquat. Org.* **67**: 149-154.
- WU, X. Z. y J. P. PAN, 1999 Studies on Rickettsia-like organism disease of the Tropical marine pearl oyster. I: The fine structure and morphogenesis of *Pinctada maxima* pathogen Rickettsia-like organism. *J. Invertebr. Pathol.* **73**: 162-172.
- 2000 An intracellular prokaryotic microorganism associated with lesions in the oyster *Crassostrea ariakensis* Gould. *J. Fish Dis.* **23**: 409-414.
- ZOBELL, C. E. y C. B. FELTHAM, 1938 Bacteria as food for certain marine invertebrates. *J. Mar. Res.* **1**: 312-327.

5

LA ENFERMEDAD DEL ANILLO MARRÓN



LA ENFERMEDAD DEL ANILLO MARRÓN

Castro D.¹, Romalde J. L.², y Borrego J. J.¹

¹Departamento de Microbiología. Facultad de Ciencias.
Universidad de Málaga. 29071 Málaga

²Departamento de Microbiología y Parasitología. Facultad de
Biología-Centro de Investigaciones Biológicas (CIBUS).
Universidad de Santiago de Compostela.
15782 Santiago de Compostela

Resumen

La enfermedad del anillo marrón (BRD), considerada como la primera patología de demostrada etiología bacteriana en bivalvos adultos, es uno de los principales factores limitantes del cultivo de almejas en Europa, asociado a graves pérdidas económicas en el sector. La enfermedad se describió por primera vez en *Ruditapes philippinarum* en 1987, y se caracteriza por la presencia de un depósito orgánico marrón (conchiolina) en la superficie interna de las valvas. El agente etiológico de esta enfermedad, aislado en 1990, se caracterizó como una nueva especie del género *Vibrio*, a la que se denominó *V. tapetis*.

Nuestra intención en el presente capítulo es mostrar una visión del conocimiento actual a cerca de este patógeno bacteriano y de la patogénesis de la enfermedad que ocasiona. También se revisan algunas cuestiones importantes relacionadas con la caracterización del patógeno, sus posibles mecanismos de virulencia y su papel en la relación patógeno-hospedador, así como la epidemiología de la enfermedad del anillo marrón. Además, se discuten los nuevos métodos moleculares utilizados en el diagnóstico de la enfermedad y su posible aplicación tanto a la detección como a la clasificación intraespecífica de este patógeno.



Abstract

*Brown Ring Disease (BRD), considered as the first disease of demonstrated bacterial etiology in adult bivalves, is one of the main limiting factors of the clam culture in Europe, causing heavy economic losses in this sector. First described in *Ruditapes philippinarum* during 1987, the disease is characterized by the presence of a brown deposit of organic material (conchiolin) on the inner surface of the valves. The etiologic agent, isolated in 1990, was characterized as a new species within the genus *Vibrio*, and designed as *Vibrio tapetis*.*

With this chapter our aim is to present a picture of the current state of knowledge about this bacterial pathogen and the pathogenesis of the disease it causes. Some important questions including the characterization of the pathogen, its putative virulence mechanisms and their role in the interaction host-pathogen, as well as the epidemiology of the disease, are reviewed. In addition, the new molecular methods for the diagnosis of the disease and their potential usefulness for both detection and intraspecific classification of this pathogen will be discussed.

1. INTRODUCCIÓN

La mayoría de los estudios relacionados con enfermedades de origen microbiano en moluscos se han centrado en patologías de estadios larvarios, post-larvarios o juveniles de especies de interés comercial, cultivadas en condiciones controladas. Las descripciones de enfermedades bacterianas en bivalvos adultos son esporádicas y en muchos casos no existen evidencias suficientes que corroboren la etiología de la enfermedad. Sin embargo, se han descrito patologías con carácter epizootico donde se ha podido demostrar su etiología bacteriana mediante aislamiento del agente patógeno e inducción experimental de la enfermedad. La primera corresponde con episodios de mortalidades masivas de *Pinctada maxima* en Australia, debidas a *Vibrio harveyi* (PASS *et al.* 1987), y la segunda es la nocardiosis de la ostra pacífica en el noroeste de USA y Canadá (FRIEDMAN y HEDRICK 1991), aunque en estos casos ha quedado demostrado el carácter oportunista del agente causal bacteriano. La enfermedad del anillo



marrón (BRD) puede considerarse como la primera enfermedad de etiología bacteriana demostrada en bivalvos adultos.

La enfermedad del anillo marrón apareció por primera vez en el verano de 1987 en los cultivos de almeja japonesa (*Ruditapes philippinarum*) en la Bretaña francesa, asociada a mortalidades masivas en distintos parques venerícolas de Brouennou (Finisterre, Francia) (FLASSCH 1987). La enfermedad se caracteriza por la presencia de un depósito orgánico marrón oscuro en la superficie interna de las valvas, generalmente localizado entre la línea paleal y el borde de la concha, y que frecuentemente invade por completo el seno paleal (Fig. 1). Debido a los signos de la enfermedad, esta patología se denominó «enfermedad del anillo marrón» (PAILLARD y MAES 1989).

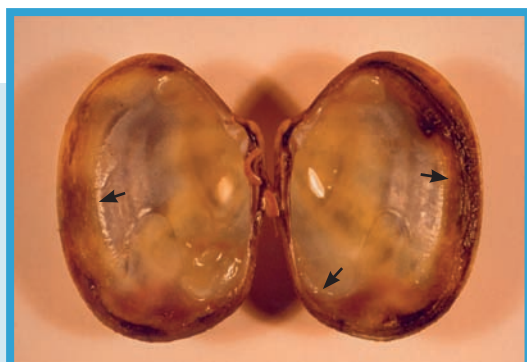


FIGURA 1.

Concha de *Ruditapes philippinarum* afectado por la enfermedad del anillo marrón. En la superficie interna de las valvas aparece el depósito orgánico de color marrón oscuro característico, localizado entre la línea paleal (flechas) y el borde de la concha. X 2.

La enfermedad del anillo marrón puede considerarse como una verdadera epizootia, ya que se han descrito mortalidades superiores al 50% en almejas cultivadas en Brouennou (PAILLARD *et al.* 1989), y del 10 al 67% en otras zonas del litoral atlántico francés (FLASSCH 1989). En años sucesivos, la enfermedad alcanzó zonas de poblaciones naturales de almejas a lo largo de la costa atlántica francesa (Landela, Albers, Bahía de Brest, Golfo de Morbihan, Arcachon, etc.) (PAILLARD 2004).

En la península Ibérica, esta enfermedad se detectó por primera vez en 1989 en diversos parques venerícolas de la provincia de Cádiz (CASTRO *et al.* 1990), y desde entonces la enfermedad ha sido descrita en otras zonas geográficas como Asturias, Cantabria, Galicia y nor-



te de Portugal (CASTRO *et al.* 1992; FIGUERAS *et al.* 1996; NOVOA *et al.* 1998).

La falta de procedimientos legales europeos sobre la exportación de almejas ha hecho que la enfermedad se diseminara a otros países europeos, como Italia, Irlanda y Reino Unido (PAILLARD *et al.* 1994; ALLAM *et al.* 2000b). Recientemente, se han detectado síntomas de la enfermedad del anillo marrón en almejas japonesas cultivadas en el sur de Corea (PARK *et al.* 2006).

El síntoma típico de la enfermedad del anillo marrón es la formación de un depósito anormal de conchiolina, sintetizado por el borde del manto y no sujeto a procesos de calcificación. A menudo pueden aparecer procesos de reparación de la concha consistentes en la superposición de concreciones calcificadas que cubren el depósito orgánico (PAILLARD y MAES 1994). Frecuentemente, las almejas afectadas presentan deformaciones en las conchas, lo que reduce su crecimiento (PAILLARD 1992).

En moluscos bivalvos es frecuente la descripción de malformaciones de las conchas y alteraciones en los procesos de biomineralización, asociados a efectos tóxicos presentes en el medio ambiente, a condiciones de estrés, o a la acción de diferentes agentes biológicos (para mayor información ver CASTRO *et al.* 1997c). La presencia de la enfermedad del anillo marrón en semillas de almeja japonesa observada en diferentes criaderos y su rápida dispersión geográfica a prácticamente todas las zonas venerícolas francesas, llevaron a pensar en la transmisibilidad de esta patología, descartándose un posible origen genético (FLASSCH 1989). Esta transmisibilidad fue comprobada por PAILLARD *et al.* (1989), quienes inocularon diferentes lotes de *R. philippinarum*, así como de otras especies relacionadas (*R. decussatus*, *Venerupis aurea* y *Tapes pullastra*), con sobrenadantes de homogenizados de almejas afectadas. La frecuencia de aparición de depósitos orgánicos marrones, similares a los observados en la enfermedad natural, en almejas japonesas inoculadas variaba entre un 19,6 y un 44,2%, mientras que el intervalo de incidencia en lotes inoculados con homogenizados de almejas sin síntomas era del 0 al 7,2%. La transmisión de los síntomas a otras especies fue elevada (media del 28,6%), aunque parecía existir una cierta resistencia interespecífica al agente inductor de la patolo-



gía. Los síntomas de la enfermedad se suprimían completamente al filtrar los sobrenadantes de los homogenizados de almejas afectadas por membranas de 0,2 μm de tamaño de poro. Esta pérdida de infectividad de los sobrenadantes filtrados descartaba el origen vírico de la enfermedad. Desde 1990 se conoce que el anillo marrón está relacionado con la presencia de un agente bacteriano perteneciente al género *Vibrio*, al que previamente se le denominó *Vibrio* P1 por PAILLARD y MAES (1990), y que resultó ser una nueva especie de este género denominada *V. tapetis* (BORREGO *et al.* 1996a). La inoculación de esta bacteria (con dosis de 10^7 ufc/animal) en la cavidad paleal de almejas sanas inducía la sintomatología característica en más del 90% de la población inoculada.

La enfermedad del anillo marrón afecta a almejas de los géneros *Ruditapes*, *Tapes* y *Venerupis*, habiéndose detectado en poblaciones naturales y cultivadas de *R. philippinarum*, *R. decussatus*, *V. aurea* y *T. rhomboides*, donde ha sido posible aislar su agente causal (PAILLARD 2004). *V. tapetis* se ha aislado también de berberechos (*Cerastoderma edule*) sin sintomatología (MAES y PAILLARD 1992), y más recientemente de peces cultivados, asociándose en algunos casos a vibriosis (JENSEN *et al.* 2003; REID *et al.* 2003a).

2. CARACTERIZACIÓN DEL AGENTE ETIOLÓGICO DE LA ENFERMEDAD DEL ANILLO MARRÓN

2.1. Métodos de detección

V. tapetis se ha aislado a partir de agua intervalvar, homogenizados de tejidos y depósito orgánico de diversas especies de almejas que mostraban la sintomatología del anillo marrón, empleando métodos bacteriológicos estándares desarrollados por MAES (1992) y CASTRO (1994). Estos métodos utilizan el agar marino como medio primario de aislamiento, para posteriormente seleccionar las colonias presuntivas por su capacidad de crecer a 22 °C y 4 °C pero no a 30 °C, y por no producir ácidos a partir de sacarosa ni manitol.

No obstante, en algunas zonas geográficas el método bacteriológico estándar fracasa en la detección y aislamiento de *V. tapetis* a partir



de almejas afectadas por la enfermedad del anillo marrón. CASTRO *et al.* (1997d; 2002) apuntaban tres razones que podrían explicar este fracaso:

1. Condiciones medioambientales adversas para *V. tapetis*.
2. Baja sensibilidad del método bacteriológico.
3. Inhibición de *V. tapetis* por la microbiota competidora presente en las muestras.

En estos casos hay que aplicar otras técnicas de detección, presentando las técnicas inmunológicas y moleculares mayor rapidez y sensibilidad. CASTRO *et al.* (1995) desarrollaron una técnica de inmunofluorescencia indirecta con anticuerpos policlonales que permitía la detección del patógeno en el agua intervalval, estimándose una concentración en estas muestras del orden de 10^3 células/ml. Posteriormente, NOEL *et al.* (1996) y CASTRO *et al.* (1997b) desarrollaron métodos basados en la técnica de ELISA, usando anticuerpos monoclonales y policlonales, respectivamente, para la detección rápida de *V. tapetis* a partir de fluidos extrapaleales y hemolinfa. No obstante, estos métodos serológicos presentaban límites de detección superiores a 5×10^4 ufc/ml.

Recientemente se han desarrollado distintos métodos moleculares, utilizando la técnica de hibridación en dot-blot o bien basados en la técnica de la PCR, para la identificación rápida y específica de *V. tapetis* (PAILLARD *et al.* 2006; ROMALDE *et al.* 2007), que presentan límites de detección de aproximadamente 10^2 ufc/ml.

2.2. Caracterización de *V. tapetis*

2.2.1. Características fenotípicas

Mediante examen a microscopía electrónica, las células de *V. tapetis* muestran una morfología bacilar y curvada típica del género *Vibrio*, con una longitud entre 1,5-2,5 μ m y un grosor de 0,4-0,6 μ m. Estas células presentan un único flagelo polar con una longitud de 3,2 μ m. En ocasiones, puede observarse que el flagelo está recubierto por una envuelta o vaina que engloba aproximadamente un tercio de la longitud del mismo.

Las características bioquímicas de las cepas de *V. tapetis* aisladas en diferentes localizaciones geográficas y épocas indican que todas



las cepas constituyen un grupo muy homogéneo. Las características diferenciales son: crecimiento a 4 °C, incapacidad de crecimiento a 30 °C y al 6% de NaCl, ausencia de las enzimas arginina dihidrolasa, lisina descarboxilasa y ornitina descarboxilasa, y resultado negativo en las pruebas del Voges-Proskauer y en la fermentación de sacarosa, D-manitol, amigdalina y glicerol (BORREGO *et al.* 1996a).

En cuanto a la utilización de un único sustrato como fuente de carbono y energía, el 90% de las cepas de *V. tapetis* son capaces de utilizar D-fructosa, D-galactosa, D-glucosa, maltosa, D-manosa, D-psicosa, propionato, succinato, N-acetilglucosamina y Tween-40.

Los primeros estudios de caracterización antigénica de *V. tapetis* indicaban que todas las cepas presentaban una elevada identidad serológica, sin la existencia de reacciones cruzadas con otras cepas de especies de *Vibrio* relacionadas (CASTRO *et al.* 1992). Así, el análisis electroforético de las proteínas de membrana externa de las cepas de *V. tapetis* mostró que todas las cepas presentaban un patrón de bandas idéntico, expresando proteínas de masas moleculares comprendidas entre 78 y 15 kDa, con una proteína mayoritaria de 35 kDa de masa molecular estimada. Además, todas las cepas de *V. tapetis* mostraban un patrón electroforético de lipopolisacáridos muy similar (CASTRO *et al.* 1996).

El aislamiento de nuevas cepas con diferentes orígenes ha permitido observar que existe cierta variabilidad antigénica entre aislados de *V. tapetis* (LUQUE 1997), pudiendo establecerse la existencia de tres grupos serológicos con cierto valor epidemiológico (BALBOA *et al.* 2006). Así, el serotipo mayoritario incluye, además de la cepa tipo, los aislados obtenidos de *R. phillipinarum*, *V. aurea* y *C. edule*. Un segundo serotipo agrupa cepas gallegas aisladas de *R. decussatus*, mientras que el tercero incluye únicamente una cepa aislada de fletán (*Hippoglossus hippoglossus*) en el Reino Unido.

2.2.2. Características genóticas

La temperatura de fusión o melting (T_m) del ADN genómico de las cepas de *V. tapetis* oscila entre 70,7 y 72 °C, con un valor medio de $71,4 \pm 0,45$ °C. El contenido de G+C del ADN de las cepas oscila entre 42,9 y 46,6 mol%, con un valor medio de $44,4 \pm 1,03$ mol% (BORREGO



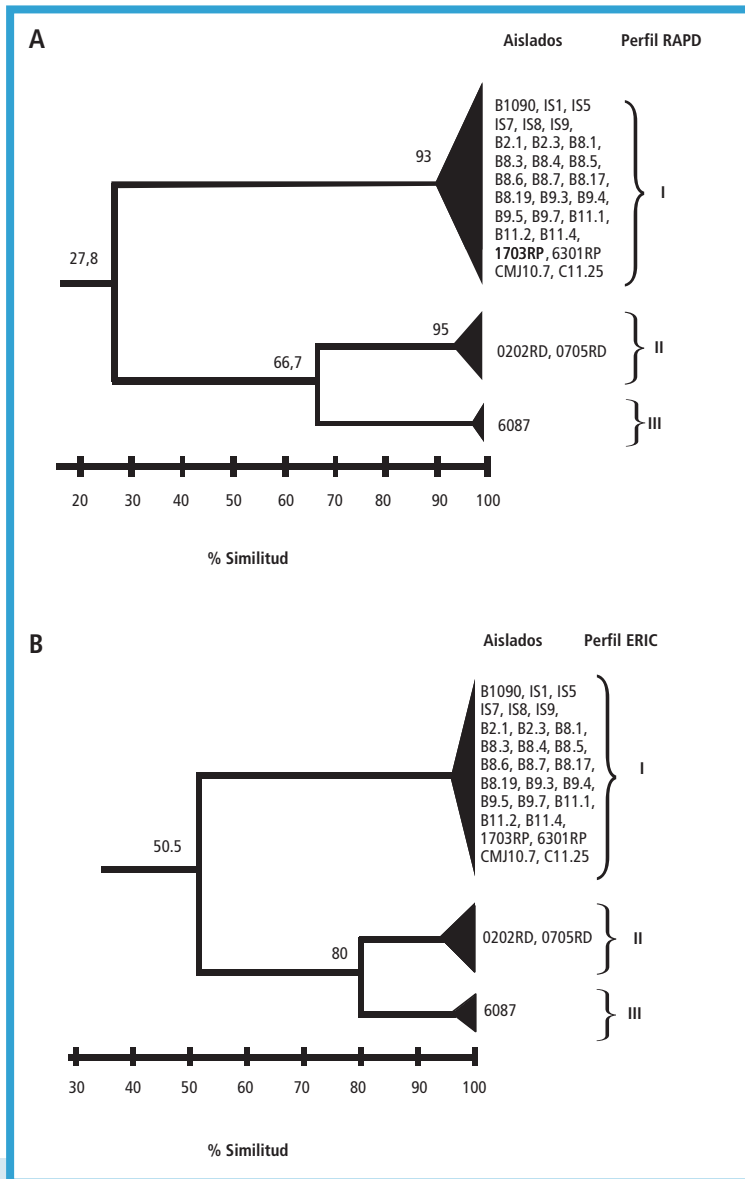
et al. 1996a). Los análisis de hibridación ADN-ADN realizados indican una homología del 100% entre las cepas aisladas en Francia; sin embargo, las cepas procedentes de Galicia mostraban una homología con respecto a la cepa tipo *V. tapetis* CECT 4600^T que variaba entre el 74 y 91% (LUQUE 1997).

Los análisis de restricción del ADN genómico utilizando electroforesis en campo pulsante y la enzima de restricción *NotI* permitían discriminar a las cepas de *V. tapetis* en 6 tipos, incluyéndose el 96,3% de las cepas en el tipo 1 (CASTRO *et al.* 1997a). Sin embargo, no se ha podido establecer ningún tipo de relación entre los perfiles obtenidos y el origen de los aislados (ROMALDE *et al.* 2002).

Las cepas de *V. tapetis*, independientemente de la endonucleasa de restricción utilizada, pueden separarse en dos grupos o ribotipos en función del patrón de restricción del ADN genómico hibridado con una sonda complementaria a los genes codificadores del ARNr 16S y 23S. El segundo de estos ribotipos está representado por una única cepa aislada de *R. decussatus* en Galicia (CASTRO *et al.* 1997a; ROMALDE *et al.* 2002).

El análisis plasmídico realizado por CASTRO *et al.* (1997a) mostró que todas las cepas de *V. tapetis* presentaban un único plásmido de aproximadamente 74,5 kb. No obstante, una cepa aislada de Galicia no mostraba la presencia de ningún plásmido. Más recientemente, LE CHEVALLIER *et al.* (2003) han publicado la presencia en cepas de *V. tapetis* de una dotación de 2 a 4 plásmidos de alta masa molecular, oscilando entre 60 y 100 kb.

Recientemente, RODRIGUEZ *et al.* (2006), utilizando tres técnicas moleculares basadas en la PCR (ERIC-PCR, REP-PCR y RAPD), han demostrado la existencia de tres grupos genéticos en *V. tapetis*, fuertemente correlacionados con el hospedador de origen (Fig. 2). El primer grupo de cepas de *V. tapetis* (aproximadamente el 90% de las cepas analizadas) estaba constituido por cepas aisladas de *R. philippinarum*, *V. aurea* y *C. edule* procedentes de Francia y España. El segundo grupo (aproximadamente 7%) estaba constituido por cepas procedentes de Galicia y que se habían aislado en *R. decussatus*. Por último, el tercer grupo estaba representado por solo una cepa que procedía de un aislamiento en peces cultivados (*H. hippoglossus*) en el Reino Unido. Es

**FIGURA 2.**

Dendrogramas obtenidos mediante análisis UPGMA de los perfiles de RAPD (A) y ERIC-PCR (B) presentados por los aislados de *Vibrio tapetis*.

interesante señalar que estos tres grupos genéticos coinciden con la distribución en serotipos mencionada anteriormente.

Los estudios de secuenciación de genes «housekeeping» como *rpoA*, *atpA* o *recA* entre otros, así como el análisis proteómico de cepas representativas de estos grupos apoyan la existencia de una variabilidad significativa entre aislados (Fig. 3) y sugieren que en un futuro podrían incluso diferenciarse subespecies dentro de la especie *V. tapetis* (BALBOA *et al.* 2006; 2007).

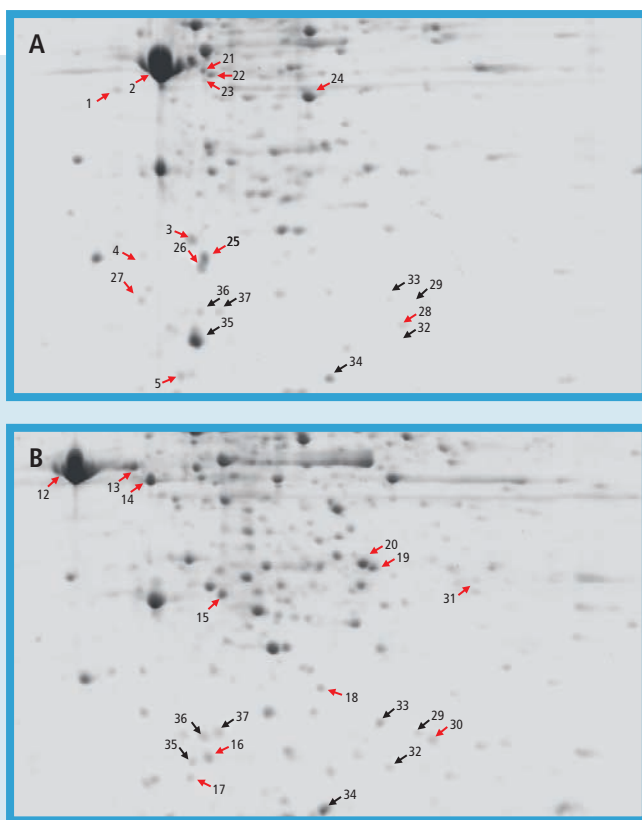


FIGURA 3.

Electroforesis bidimensional de proteínas de las cepas CECT4600^T y 6087 de *V. tapetis*, aisladas de *R. philippinarum* (A) y *Hippoglossus hippoglossus* (B). Aparecen marcadas las proteínas comunes (flechas negras) y específicas (flechas rojas).



3. PATOLOGÍA ASOCIADA A LA ENFERMEDAD DEL ANILLO MARRÓN

3.1. Descripción macroscópica

En la enfermedad del anillo marrón es posible diferenciar dos procesos, que generalmente se observan conjuntamente en ejemplares de *R. philippinarum* afectados por esta epizootia: la formación de un depósito orgánico, no mineralizado, sobre la superficie interna de la concha, y el recubrimiento del depósito por capas calcificadas de neoformación, similares al material que constituye el estrato homogéneo o concha interna (CASTRO 1994; PAILLARD y MAES 1994).

El depósito orgánico que constituye el síntoma característico de la enfermedad del anillo marrón presenta un aspecto muy heterogéneo debido, fundamentalmente, a su localización, extensión y grosor. En su forma más aparente, este depósito está constituido por numerosas láminas de naturaleza orgánica (Fig. 4A). Cuando el depósito presenta un grosor menor, éste aparece como una fina película orgánica ligeramente marrón (a veces plegada) adherida al borde interno de la concha, rodeada de pequeñas manchas puntiformes marrones (Figs. 4B,C). Estos puntos marrones constituyen los estadios iniciales de la formación del depósito orgánico, visibles en animales infectados experimentalmente con *V. tapetis* (Fig. 4D).

Diversas observaciones realizadas en ejemplares de *R. philippinarum* afectados por el anillo marrón indican que en el curso de la enfermedad puede existir un proceso de reparación de la concha, consistente en un recubrimiento gradual del depósito orgánico no calcificado por capas de material conquiolináceo mineralizado (Fig. 5). Al final de dicho proceso de reparación se restablece la continuidad del estrato interno de la concha, si bien en la mayoría de las almejas con conchas regeneradas éstas presentan ciertas características que permiten diagnosticar que el animal sufrió la enfermedad del anillo marrón. El recubrimiento progresivo del depósito orgánico suele conllevar un engrosamiento anormal de las zonas de la concha afectadas. Además, el relieve del depósito puede persistir en el estrato homogéneo de nueva formación, que frecuentemente presenta crestas o estrías perpendiculares al borde de la concha (CASTRO 1994; PAILLARD y MAES 1995b).

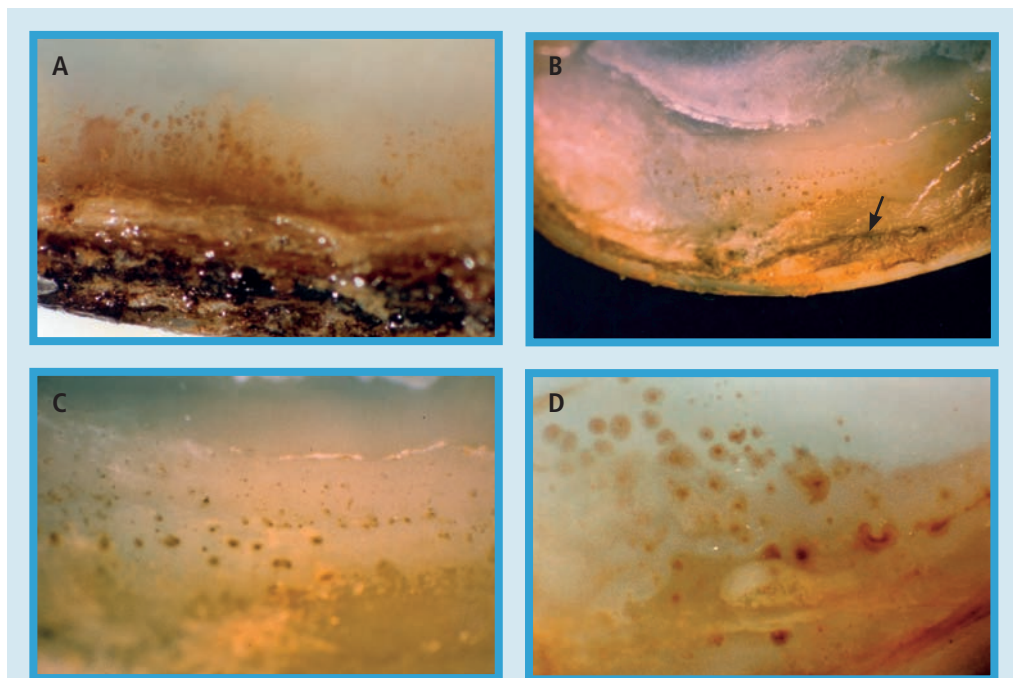


FIGURA 4.

Detalle de los depósitos orgánicos en conchas de ejemplares de *R. philippinarum* afectados por la enfermedad del anillo marrón. Película orgánica adherida al borde interno de la concha (flecha). A, X 12; B, X 5; C, X 25; D, X 56.

Los ejemplares de *R. philippinarum* afectados por la enfermedad del anillo marrón no presentan daños aparentes (a nivel macroscópico) en su masa corporal, en comparación con almejas sanas. La única característica diferencial detectada es una retracción del manto en las zonas adyacentes al depósito (CASTRO 1994; PAILLARD *et al.* 1994).

En algunas almejas afectadas por esta epizootia se han observado diversas deformidades externas en las conchas, que corresponden a una alteración del crecimiento de las mismas durante el período de tiempo en que el animal presenta la patología. Estas malformaciones generalmente incluyen la aparición de estrías de crecimiento anormalmente juntas o deformadas, la presencia de conchas «labiadas», la aparición de muescas o aperturas en el margen de la concha, o el cre-

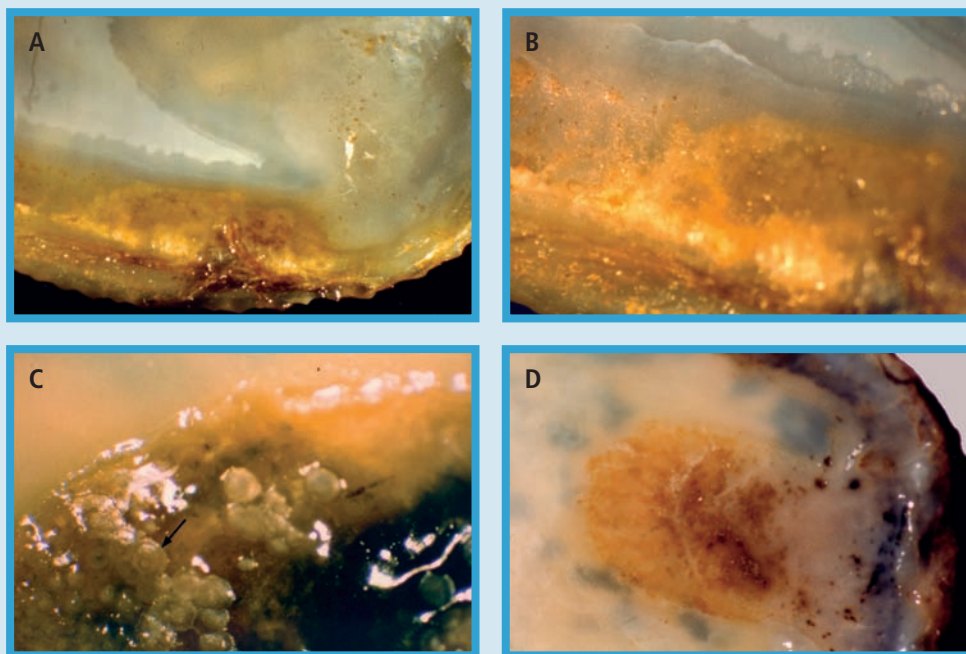


FIGURA 5.

Proceso de reparación en conchas de almejas japonesas enfermas. Los depósitos aparecen recubiertos por pequeñas concreciones a modo de escamas (A) y detalle (B).

Estas concreciones aparecen como cristales calcáreos con patrones concéntricos de crecimiento (flecha) (C). Capa de material calcificado recubriendo el depósito (D).

A, X 6; B, X 13; C, X 22; D, X 5.

cimiento asimétrico de una de las valvas (para una mayor información ver PAILLARD y MAES 1995b; CASTRO *et al.* 1997c).

3.2. Estudios histológicos

El depósito marrón se localiza en el compartimento periférico de la superficie interna de las valvas de *R. philippinarum* afectadas por esta enfermedad. Este compartimento o cavidad extrapaleal, está constituido por tres elementos que lo delimitan: el borde paleal, el borde de la concha y el periostraco libre, denominado lámina periostracal por PAILLARD (1992). Estudios a nivel microscópico de animales con conchas

descalcificadas han permitido establecer que las alteraciones histológicas típicas de animales enfermos se reducen a los componentes de la cavidad extrapaleal (PAILLARD 1992; CASTRO 1994), si bien en algunos casos se ha observado una degeneración en la glándula digestiva, limitada a almejas con depósitos marrones muy desarrollados (PLANA y LE PENNEC 1991).

La aparición de numerosos hemocitos en el tejido conjuntivo del manto es uno de los síntomas histopatológicos más frecuentemente detectados en animales con depósitos bien desarrollados no recubiertos (Fig. 6C). Estas acumulaciones de hemocitos se concentran en la zona subyacente al epitelio externo y en el conectivo de los lóbulos

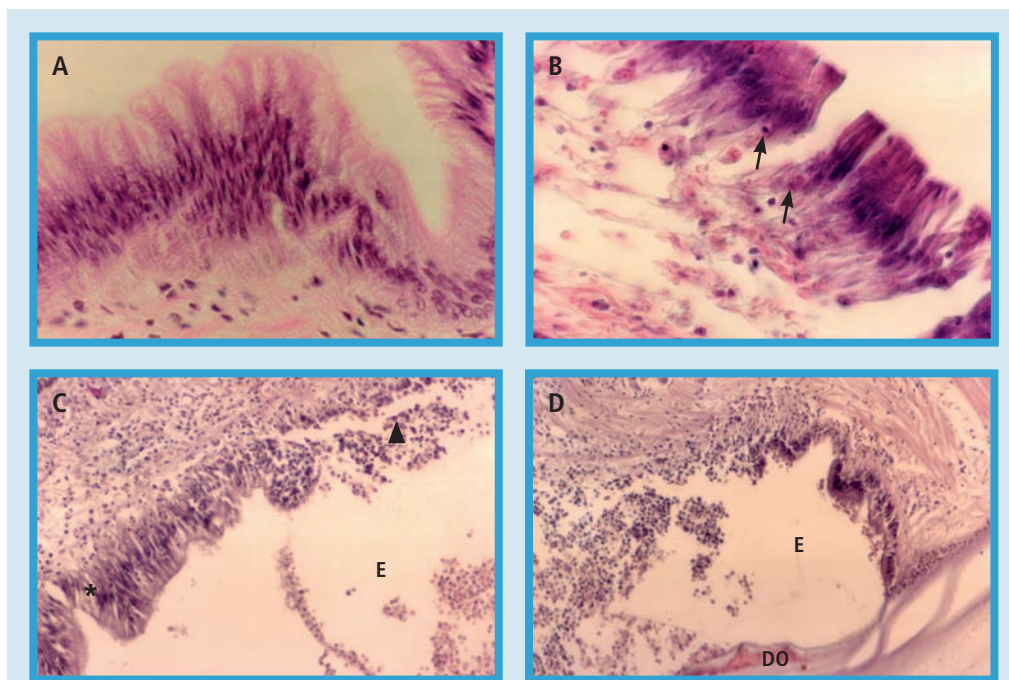


FIGURA 6.

Secciones histológicas de *R. philippinarum* afectados por la enfermedad del anillo marrón. Desestructuración de la monocapa epitelial (A). Infiltración hemocitaria (fechas) dentro de la capa epitelial (B). Desestructuración (asterisco) y pérdida (cabeza de flecha) del epitelio externo del manto (C). Salida masiva de hemocitos al espacio extrapaleal (D). DO: depósito orgánico; E: espacio extrapaleal. HE. A y B, X 355; C, X 130; D, X 118.



paleales medio y externo, localizaciones donde es posible detectar el patógeno mediante inmunohistoquímica (CASTRO 1994). La presencia de infiltraciones hemocitarias se ha descrito con frecuencia en ostras (*Crassostrea virginica*) afectadas por la denominada «Enfermedad de la ostras juveniles» (JOD), otra enfermedad de la concha similar al anillo marrón de etiología aún desconocida (BRICELJ *et al.* 1992).

En estos animales el manto en contacto con los depósitos muestra también otras lesiones, caracterizadas por una degeneración, más o menos severa, de su epitelio externo. Estas lesiones pueden manifestarse como una alteración de la capa epitelial, que presenta una desorganización tanto en la estructuración como en la ordenación de sus células (PAILLARD 1992; CASTRO 1994) (Fig. 6).

En algunas muestras también se observan pérdidas parciales del epitelio de los lóbulos paleales externo y medio, pudiendo afectarse las zonas media y superior del surco periostracal. En almejas donde el depósito orgánico compromete el seno paleal, se observan generalmente lesiones similares a las anteriormente descritas en los epitelios, tanto externo como interno, de los sifones (CASTRO 1994).

La secreción periostracal de almejas enfermas también presenta modificaciones características, que constituyen una cierta desviación de la estructura laminar y ordenada típica del periostraco. Estas modificaciones se detectan en toda su longitud, aunque son más evidentes y constantes en la lámina periostracal (PAILLARD y MAES 1995a; CASTRO *et al.* 1997c) (Fig. 7). En este periostraco libre se observa un incremento del grosor de la capa externa, mientras que la capa de matrices orgánicas conquiliares es muy fina, siendo difícil establecer la existencia de capas media e interna en esta lámina periostracal. Sobre la capa externa del periostraco libre se produce una acumulación de material basófilo, donde es posible diferenciar hemocitos y restos celulares. A microscopía electrónica de barrido puede apreciarse como el periostraco libre (desde la salida del surco periostracal hasta el borde de la concha o la zona de contacto con el depósito orgánico) aparece fuertemente colonizado por bacterias (Figs. 9C-E), identificadas como *V. tapetis* mediante inmunotinción (CASTRO *et al.* 1997c).

En las almejas enfermas el periostraco libre no alcanza el borde de crecimiento de la concha, sino que queda relegado a posiciones más

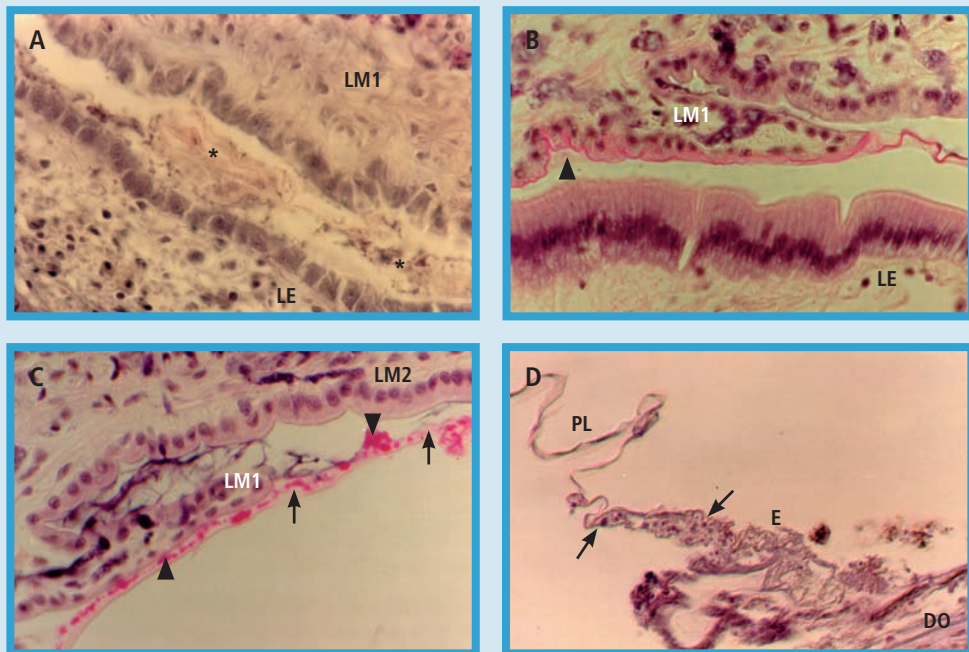


FIGURA 7.

Sección transversal del manto de una almeja enferme. Capa interna del periostraco rodeada de material basófilo granular (asteriscos) (A), con poca matriz fibrosa (cabeza de flecha) (B). Capa externa del periostraco condensada (cabeza de flecha), con matrices orgánicas conquiliares (flechas) de pequeño grosor (C). Hemocitos y restos celulares rodeando a la lámina periostracal (flechas) (D). LE: lóbulo externo del manto; LM1: lóbulo medio primario; LM2: lóbulo medio secundario; PL: lámina perisotractal; DO: depósito orgánico. HE. A y B, X 380; C, X 425 (óptica de Nomarski); D, X 280.

internas, estableciendo una continuidad estructural con el depósito orgánico (Fig. 8C). Las distintas capas que forman el depósito son claramente identificables como material periostracal, que se acumula sin sufrir los procesos de organización que dan lugar a la aparición de los distintos estratos de la concha. En algunas zonas es posible observar cómo el periostraco libre, plegándose sobre sí mismo, se deposita sobre el estrato homogéneo de la concha (o sobre la concha de neoformación), constituyendo así el inicio de un depósito orgánico (Figs. 8A,B).

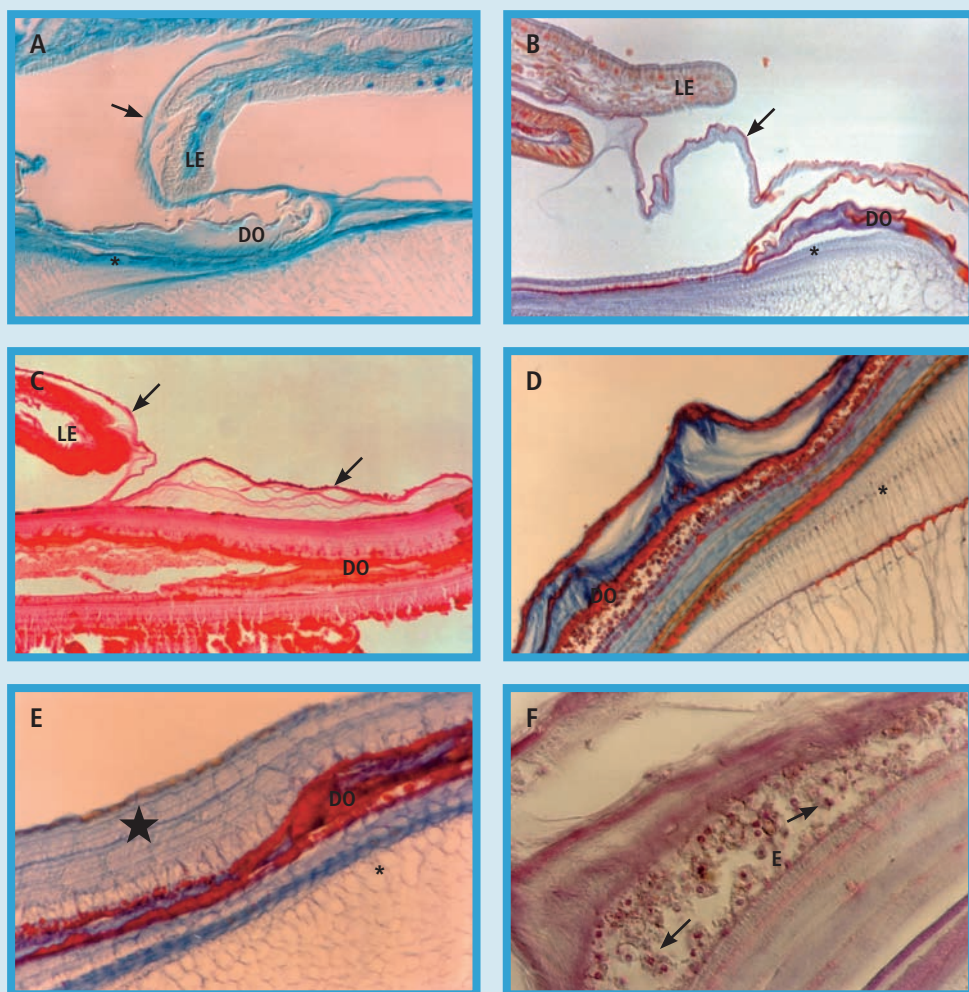


FIGURA 8.

Secciones de conchas descalcificadas. El periostraco libre (flecha), se deposita sobre la concha (asterisco), constituyendo el inicio del depósito orgánico (A). Almejas inoculadas con *V. tapetis* (B). La lámina periostracal (flechas) se deposita sobre el depósito orgánico (C). Estructura multiestratificada del depósito orgánico (asterisco) (D). Material organizado (estrella) del depósito orgánico que lo recubre totalmente (E). Acúmulos de hemocitos (flechas) y restos celulares, que contribuyen a la heterogeneidad de dicho depósito (F). A, Azul alciano (0,3 M de $MgCl_2$), X 140 (óptica de Nomarski); B, D y E, Tricrómico de Mallory, X 260, X 118, X 235, respectivamente; C, Tinción de Weigert-Van Gieson, X 120. F, HE, X 390 (óptica de Nomarski).

El depósito orgánico que constituye el síntoma típico de la enfermedad del anillo marrón aparece, en corte transversal, como una estructura multiestratificada de naturaleza heterogénea, localizada sobre la superficie interna de la concha (Fig. 8D). Esta heterogeneidad viene determinada por la presencia de distintas capas, dispuestas en muchas zonas de manera anárquica, con diversa consistencia y composición. Además, hay que considerar que estos depósitos pueden presentar una estructura muy compleja dependiendo de la presencia y extensión de fenómenos de recuperación. El depósito aparece fuertemente colonizado por bacterias, inmersas en la matriz orgánica del mismo o entre las distintas capas que lo constituyen (Figs. 9A, B).

En las almejas con depósitos recubiertos se observa una normalización de la secreción periostracal, que recupera su estructuración típica (Fig. 8E). Además, generalmente no aparecen lesiones degenerativas en el epitelio externo del manto, aunque se aprecia un mayor número de hemocitos en el conectivo subyacente, en comparación con animales sanos. Entre las capas del depósito orgánico recubierto se observan restos celulares y células similares a hemocitos (Fig. 8F). Estos hechos podrían indicar que el proceso de recuperación de la enfermedad del anillo marrón no sólo supone una regeneración de la superficie interna de la concha, sino también una reparación de los daños tisulares y una restauración de la correcta funcionalidad del manto secretor del periostraco (CASTRO 1994; CASTRO *et al.* 1997c).

4. INTERACCIÓN HOSPEDADOR-PATÓGENO

4.1. Patogenicidad de *V. tapetis*

Mediante inmunohistoquímica se han detectado células de *V. tapetis* adheridas al epitelio externo del manto y a la lámina periostracal, así como en forma de acúmulos en el conectivo del borde del manto, espacio extrapaleal y depósito orgánico (CASTRO *et al.* 1997c; ALLAM *et al.* 2000b). La adhesión del patógeno a la lámina periostracal, y su posterior colonización, parece ser el primer evento en la patogénesis del anillo marrón. El proceso normal de síntesis y deposición de la lámina periostracal se interrumpe, dando lugar a la acumulación desordenada de material conquiolar que constituye el depósito orgánico.

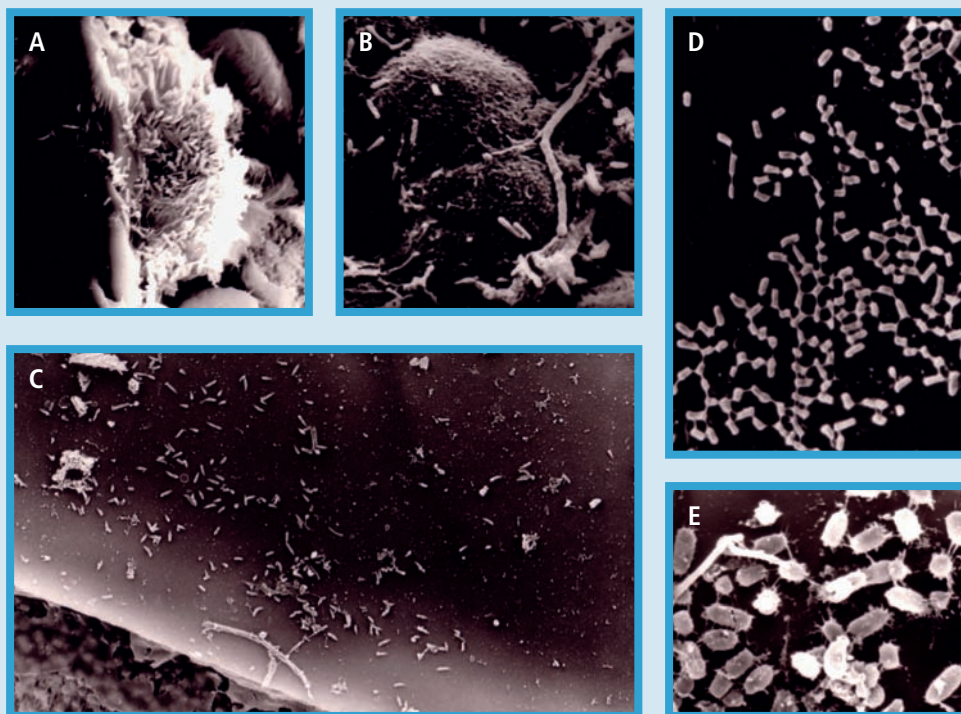


FIGURA 9.

Microfotografías electrónicas de barrido de ejemplares de almejas japonesas afectados por la enfermedad del anillo marrón. El depósito orgánico aparece fuertemente colonizado por bacterias (A) y algunas hifas de hongos (B). Colonización bacteriana en la superficie externa del periostraco libre (C, D, E). A, X 2100. B, X 3000. C, X 1025. D, X 2300. E, X 5300.

Posteriormente, la infección bacteriana progresa al epitelio externo del manto, probablemente precedida por la penetración de la bacteria en el espacio extrapaleal, como se ha comprobado a las 24 h de iniciarse los experimentos de infección (CASTRO *et al.* 1997c). Esta asociación del patógeno al epitelio del manto sería responsable de los daños observados en el mismo, permitiendo la entrada del patógeno al conectivo expuesto. Esta vía de penetración del patógeno ha sido también propuesta por ALLAM *et al.* (2002).

La enfermedad del anillo marrón constituye una epizootia relacionada con episodios de elevada mortalidad en cultivos de *R.*

philippinarum. Sin embargo, las causas de esta mortalidad no se han establecido claramente. Aunque en infecciones experimentales realizadas con dosis muy elevadas del patógeno se ha constatado la aparición de infecciones sistémicas que producen la muerte del hospedador (ALLAM *et al.* 2002), en animales enfermos de forma natural, y a pesar de la presencia de depósitos orgánicos de considerable tamaño, no se detectan células del patógeno en tejidos internos (salvo en el conectivo del manto en zonas adyacentes a los depósitos), ni existen evidencias histológicas de daños sistémicos (PAILLARD 1992; CASTRO 1994).

CASTRO (1994) propuso que las alteraciones fisiológicas relacionadas con la formación y presencia de los depósitos orgánicos podrían ocasionar en casos severos el debilitamiento y muerte del animal. Este proceso comenzaría con la acumulación de material orgánico en la superficie interna de las valvas, lo que provocaría la imposibilidad del cierre hermético de la concha, facilitando la entrada de diversas partículas del sedimento en la cavidad paleal. El material presente en la cavidad paleal produciría una agresión mecánica de los filamentos branquiales, a la vez que induciría un incremento en la síntesis y secreción de mucus, con la consiguiente extenuación de las reservas corporales del hospedador. En casos extremos, la contaminación de la cavidad paleal y la deficiencia de oxígeno forzarían al animal a la superficie del sedimento, donde se produciría su muerte. Además, la propia síntesis del depósito orgánico supone una desviación de la energía metabólica del hospedador, que conllevaría un cese del crecimiento y una disminución importante del índice de condición.

PLANA *et al.* (1996) demostraron que los ejemplares de *R. philippinarum* infectados con *V. tapetis* sufrían descensos significativos de su índice de condición, lo que sugería que las masivas mortalidades debidas al anillo marrón podrían ser el resultado de una alteración de la actividad metabólica de las almejas.

Aunque los mecanismos de patogenicidad del agente causal de la enfermedad del anillo marrón permanecen completamente sin dilucidar, está claro que los factores de adhesión a células y/o tejidos y la síntesis de agresinas implicadas en la invasión tisular deben ser esenciales como factores de virulencia.



V. tapetis presenta en su superficie moléculas de adhesinas que le permiten la colonización y proliferación en los compartimentos periféricos del hospedador (PAILLARD y MAES 1995a). Por medio de estas adhesinas (hemaglutininas, pili, flagelos y proteínas de membrana externa), las cepas de *V. tapetis* muestran una mayor capacidad de adhesión a hemocitos y células de manto de almejas que a líneas celulares de peces (LÓPEZ-CORTÉS *et al.* 1999b), lo que sugiere la existencia de una especificidad a nivel de hospedador y de tejido.

BORREGO *et al.* (1996b) demostraron que existen diferencias entre las cepas de *V. tapetis* en su capacidad de síntesis de productos exoenzimáticos (agresinas) responsables de sus factores invasivos. Así, las cepas de *V. tapetis* eran productoras y secretoras de fosfatasa alcalina, esterasa, esterasa-lipasa, leucina-arilamidasa, alfa-quimiotripsina, fosfatasa ácida, fosfohidrolasa, hemolisinas y N-acetil- β -glucosaminidasa, pero las más virulentas presentaban además otras actividades exoenzimáticas como lipasa, valina-arilamidasa, cistina-arilamidasa, β -glucuronidasa, alfa- y β -glucosidasa, alfa-manosidasa y alfa-fucosidasa.

Las células de *V. tapetis* producen un efecto citotóxico *in vitro* sobre hemocitos de almejas, que se pone de manifiesto por la pérdida de los filópodos y el redondeamiento celular (LANE y BIRBECK 2000). CHOQUET *et al.* (2003), utilizando la técnica de citometría de flujo, han demostrado también una reducción en las propiedades de adhesión de los hemocitos de almejas debidas a un factor citotóxico de *V. tapetis*, aunque aún no se han identificado ni caracterizado los genes implicados en esta citotoxicidad. Más recientemente, ALLAM y FORD (2006) han demostrado que tanto las células de *V. tapetis* como sus productos extracelulares causan daños fisiológicos e inactivación de los hemocitos de *R. philippinarum*, y en menor medida de otras especies de moluscos que no son afectadas por la enfermedad del anillo marrón. Estos autores proponen la implicación de un factor citotóxico termolábil que inhibiría el citoesqueleto de los hemocitos.

El papel de los plásmidos en los mecanismos de virulencia de cepas patógenas ha sido establecido en algunas especies bacterianas. El hecho de que todas las cepas de *V. tapetis* posean un plásmido podría indicar una relación con su poder patógeno. Para verificar esta hipótesis se tendrían que realizar experimentos de transferencia del plásmido



entre cepas positivas y negativas, junto a experimentos de curación. En nuestro laboratorio se han realizado experimentos de curación utilizando compuestos intercalantes (anaranjado de acridina y bromuro de etidio) o transposones asesinos, pero los ensayos realizados no han tenido éxito (BORREGO *et al.* 1996b). De igual forma, LE CHEVALLIER *et al.* (2003) tampoco han conseguido cepas de *V. tapetis* curadas. Esto podría suponer que estos plásmidos de gran tamaño pueden cumplir funciones esenciales para la viabilidad de estas cepas, por lo que su contribución a las funciones del microorganismo hacen imposible el obtener cepas sin el plásmido.

4.2. Mecanismos de defensa del hospedador

En la enfermedad del anillo marrón la infección bacteriana queda restringida al espacio extrapaleal y al borde del manto, no extendiéndose a otros tejidos del hospedador. Además, en la mayoría de las infecciones experimentales donde el patógeno se inyecta en la cavidad paleal las almejas desarrollan síntomas clínicos de BRD pero raramente mueren (PAILLARD *et al.* 1994; CASTRO *et al.* 1997d; ALLAM *et al.* 2002). Esto podría explicarse por la actuación de los mecanismos de defensa presentes en los moluscos adultos. En este sentido, uno de los síntomas más frecuentemente observados en almejas enfermas es la presencia de infiltraciones de hemocitos en el conectivo del manto, en las mismas zonas en las que se detecta el patógeno, así como una movilización de los mismos hacia el espacio extrapaleal (OUBELLA *et al.* 1993; 1994; CASTRO 1994). Además, ALLAM y PAILLARD (1998) demostraron que los fluidos extrapaleales de *R. philippinarum* presentan altas concentraciones de hemocitos y de factores humorales (similares a la lisozima).

En algunas almejas afectadas por la enfermedad del anillo marrón puede existir un proceso de reparación de la concha, consistente en un recubrimiento gradual del depósito orgánico por capas de material conquiolináceo mineralizado. Esta reparación parece ser un proceso similar al de la formación de «blisters», producidos en muchas especies de moluscos en respuesta a la presencia de partículas extrañas (tanto inertes como parásitos pluricelulares) en el espacio extrapaleal (ALLAM *et al.* 2000a).



En los moluscos la reacción inflamatoria puede provocar, además de la destrucción o aislamiento del agente patógeno, una reparación completa de los tejidos dañados. Por tanto, el proceso de curación de la enfermedad del anillo marrón implicaría dos mecanismos defensivos: una respuesta inflamatoria, que produciría una eliminación del patógeno y la reparación de los daños del epitelio del manto, y un recubrimiento del depósito orgánico que culminaría con la reparación de la superficie interna de la concha (CASTRO 1994).

Por otra parte, se ha observado que algunos depósitos de considerable grosor están constituidos por una alternancia de estratos heterogéneos (el depósito propiamente dicho), y por capas de matriz conquiliar de neoformación, lo que se ha interpretado como la existencia de una sucesión temporal de episodios de recuperación y de renovación de los depósitos orgánicos (CASTRO 1994; PAILLARD y MAES 1995a; 1995b). Esto podría explicarse por la existencia de episodios de recidivas del patógeno en el animal infectado, coincidentes con ciclos de inmunodepresión causados por extenuación de los mecanismos defensivos, o bien por disminución del estado fisiológico, como consecuencia de mecanismos naturales (por ejemplo, ciclo reproductivo) o agentes estresantes externos (fundamentalmente medioambientales). En este sentido, REID *et al.* (2003b) y PAILLARD *et al.* (2004) han demostrado que la salinidad y la temperatura afectan significativamente el desarrollo de la enfermedad por influencia sobre los mecanismos de defensa de los bivalvos.

El sistema inmune de los moluscos bivalvos está formado fundamentalmente por hemocitos que desde la hemolinfa son capaces de migrar a los tejidos en respuesta a materiales extraños, incluyendo microorganismos patógenos. La primera estrategia de defensa de los moluscos implica un proceso de fagocitosis y encapsulación del material extraño, liberándose a continuación metabolitos oxidantes y enzimas degradativas, así como la secreción de moléculas citotóxicas y aglutinantes.

El proceso de fagocitosis realizado por los hemocitos de los moluscos bivalvos es esencial para la determinación de la capacidad de defensa del hospedador, ya que este proceso culmina con la eliminación del agente inductor de la respuesta inmune. De acuerdo a LOPEZ



et al. (1997), el proceso de fagocitosis en bivalvos se caracteriza por las siguientes etapas: 1) Activación quimiotáctica de los hemocitos; 2) adhesión de las partículas extrañas a la superficie de los fagocitos; 3) endocitosis de las partículas; y 4) digestión intracelular. Este proceso implica un proceso de migración quimiotáctica de los hemocitos debido a sustancias liberadas por el tejido dañado y/o por los microorganismos invasores.

En el caso de la enfermedad del anillo marrón, LOPEZ-CORTÉS *et al.* (1999a) estudiaron las actividades fagocíticas y de respuesta quimiotáctica de los hemocitos frente a *V. tapetis*. Los resultados obtenidos por estos autores indicaban que los productos extracelulares de *V. tapetis* mostraban efectos quimiotácticos para los hemocitos; sin embargo, la fagocitosis era un proceso no específico, que no requería de proteínas solubles de la hemolinfa para el proceso de reconocimiento e internalización del microorganismo. Aunque la viabilidad del patógeno incrementaba la fagocitosis, su virulencia no parecía afectar a este proceso.

De acuerdo a LANE y BIRBECK (2000), la especificidad patógeno-molusco hospedador puede depender de la afinidad de interacción entre el patógeno y los hemocitos del hospedador. Para explicar la resistencia de *R. decussatus* a los síntomas de la enfermedad del anillo marrón, ALLAM *et al.* (2001) estudiaron los parámetros hemocitarios y el proceso de fagocitosis en esta especie en comparación con *R. philippinarum*. Estos autores concluyeron que la resistencia a la enfermedad del anillo marrón estaba relacionada con la concentración de los hemocitos granulares y con su actividad fagocítica.

5. PREVENCIÓN Y CONTROL DE LA ENFERMEDAD

El empleo de medidas terapéuticas en parques intermareales de cultivo es impracticable, debido a los elevados costes y a los riesgos ambientales que supondría el uso de cualquier agente quimioterápico en estas condiciones. Por ello, el criterio de prevención constituye en esencia el único mecanismo de control disponible en enfermedades que afectan a cultivos extensivos de moluscos (ALDERMAN 1992). Los da-



tos epizooticos recogidos en Francia a raíz de la aparición y extensión de la enfermedad del anillo marrón llevaron a las autoridades francesas competentes a proponer diversas medidas zootécnicas tendentes a disminuir la incidencia de esta patología. Entre las medidas recomendadas, similares a las que se han demostrado efectivas en la profilaxis de otras enfermedades de bivalvos como la bonamiasis o la marteliasis en *Ostrea edulis*, se encontraban, además de un control estricto de los lotes de semillas, la reducción de la carga de siembra en las distintas fases del cultivo de almejas, y la planificación de estas fases con el fin de comenzar el engorde en una época que permitiese completar el crecimiento hasta talla comercial evitando el periodo de máxima incidencia de la enfermedad (FLASSCH 1987; FLASSCH y GRIZEL 1989).

Las características físicas del sedimento, así como los ciclos biogeoquímicos de la materia orgánica en este sustrato, influyen de manera notable sobre la fisiología y, por consiguiente, sobre la patología de las almejas cultivadas (FLASSCH 1987; BARILLARI *et al.* 1990). En este sentido, los estudios realizados en parques intermareales de cultivo localizados en la Bahía de Cádiz permitieron comprobar que en parcelas con sustrato natural tipo fangoso existe una mayor incidencia de anillo marrón y menor supervivencia en comparación con las presentadas por almejas de la misma procedencia sembradas en terrenos transformados con arena gravosa (MUÑOZ *et al.* 1993; CASTRO 1994; MARTINEZ-MANZANARES *et al.* 1998). Estos resultados concuerdan con las observaciones iniciales realizadas en la Bretaña francesa (PAILLARD 1992).

Otra variable importante en el cultivo de moluscos en zonas intermareales es el índice de cobertura mareal. En la Bahía de Cádiz, MUÑOZ *et al.* (1993) obtuvieron menores porcentajes de anillo marrón y de mortalidad en las parcelas con mayores coeficientes de emersión (índice de cobertura 1), si bien en estas zonas las almejas no alcanzaban la talla comercial tras 16 meses de engorde, por lo que estos autores sugerían coberturas mareales entre 0,4 y 0,8 como las más adecuadas para el cultivo de *R. philippinarum*.

Los estudios epizooticos realizados en Francia mostraron también la existencia de una relación entre la densidad de cultivo y la incidencia de la enfermedad del anillo marrón (FLASSCH 1989). Sin embargo, en el litoral suratlántico español no se encontraron diferencias significativas



en cuanto a la incidencia de anillo marrón en función de la densidad de siembra, tanto en cultivos intermareales (MUÑOZ *et al.* 1993) como en condiciones de preengorde suspendido (CASTRO 1994), al menos para valores de densidad dentro del rango normalmente utilizado en nuestra área geográfica.

MARTINEZ-MANZANARES *et al.* (1998) realizaron estudios de transmisión de la enfermedad del anillo marrón, concluyendo que la vía más probable de transmisión de su agente etiológico era por contacto directo con almejas infectadas. MAES (1992) apuntó a las heces como posible vehículo de transmisión en el medio.

Se han propuesto algunos tratamientos para el control de la enfermedad del anillo marrón a nivel de semillero, tales como la administración por baño de furazolidona (NOEL *et al.* 1992), flumequina, nitrofurantoína o ácido oxolínico (MARTINEZ-MANZANARES *et al.* 1998), o el incremento de la temperatura por encima de 21 °C (PAILLARD 2004), si bien ninguno de estos tratamientos ha sido ensayado a escala productiva.

6. REFERENCIAS

- ALDERMAN, D. J., 1992 Chemotherapy in the control of molluscan diseases, pp. 39-43 in *Chemotherapy in Aquaculture: from Theory to Reality*, edited by C. MICHEL and D.J. ALDERMAN. Officine International des Epizooties, Paris.
- ALLAM, B. y S. E. FORD, 2006 Effects of the pathogenic *Vibrio tapetis* on defence factors of susceptible and non-susceptible bivalve species: I. Haemocyte changes following *in vitro* challenge. *Fish and Shellfish Immunol.* **20**: 374-383.
- ALLAM, B. y C. PAILLARD, 1998 Defense factors in clam extrapallial fluids. *Dis. Aquat. Org.* **33**: 123-128.
- ALLAM, B., K. A. ASHTON-ALCOX y S. E. FORD, 2001 Haemocyte parameters associated with resistance to brown ring disease in *Ruditapes* spp. clams. *Develop. Comp. Immunol.* **25**: 365-375.
- ALLAM, B., C. PAILLARD y M. AUFFRET, 2000a Alterations in hemolymph and extrapallial fluid parameters in the manila clam, *Ruditapes philippinarum*, challenged with the pathogen *Vibrio tapetis*. *J. Invertebr. Pathol.* **76**: 63-69.
- ALLAM, B., C. PAILLARD y S. E. FORD, 2002 Pathogenicity of *Vibrio tapetis*, the etiological agent of brown ring disease in clams. *Dis. Aquat. Org.* **48**: 221-231.



- ALLAM, B., C. PAILLARD, A. HOWARD y M. LE PENNEC, 2000b Isolation of the pathogen *Vibrio tapetis* and defense parameters in brown ring diseased manila clams *Ruditapes philippinarum* cultivated in England. *Dis. Aquat. Org.* **41**: 105-113.
- BALBOA, S., J. BERMUDEZ-CRESPO, C. GIANZO, A. DOCE, J. L. LOPEZ y J. L. ROMALDE, 2007 Proteomic analysis of *Vibrio tapetis*, the etiological agent of Brown Ring Disease. *Vibrio2007*, The second Conference on the Biology of Vibrios, Paris, p. 54.
- BALBOA, S., S. PRADO, R. BEAZ, J. L. BARJA y J. L. ROMALDE, 2006 Biochemical, serological and genetical intraspecific diversity in the clam pathogen *Vibrio tapetis*. 5th International Symposium on Aquatic Animal Health, San Francisco, p. 230.
- BARILLARI, A., A. BOLDRIN, M. PELLIZZATO y M. TURCHETTO, 1990 *Tapes philippinarum: Biologia e Sperimentazione*. Ente di Sviluppo Agricolo Veneto, Trieste.
- BORREGO, J. J., D. CASTRO, A. LUQUE, C. PAILLARD, P. MAES, M. T. GARCIA y A. VENTOSA, 1996a *Vibrio tapetis* sp. nov., the causative agent of the brown ring disease affecting cultured clams. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **46**: 480-484.
- BORREGO, J. J., A. LUQUE, D. CASTRO, J. A. SANTAMARIA y E. MARTINEZ-MANZANARES, 1996b Virulence factors of *Vibrio* P1, the causative agent of brown ring disease in the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*. *Aquat. Living Resour.* **9**: 125-136.
- BRICELJ, V. M., S. E. FORD, F. J. BORRERO, F. O. PERKINS, G. RIVARA, R. E. HILLMAN, R. A. ELSTON y J. CHANG, 1992 Unexplained mortalities of hatchery-reared, juvenile oysters, *Crassostrea virginica* (Gmelin). *J. Shellfish Res.* **11**: 331-347.
- CASTRO, D., 1994 *Patologías de Origen Bacteriano en Almejas Cultivadas Tapes decussatus y T. philippinarum*. Tesis Doctoral. Universidad de Málaga.
- CASTRO, D., A. LUQUE, J. A. SANTAMARIA, P. MAES, E. MARTINEZ-MANZANARES y J. J. BORREGO, 1995 Development of immunological techniques for the detection of the potential causative agent of the brown ring disease. *Aquaculture* **132**: 97-104.
- CASTRO, D., E. MARTINEZ-MANZANARES, A. LUQUE, B. FOUZ, M. A. MORIÑIGO, J. J. BORREGO y A. E. TORANZO, 1992 Characterization of strains related to brown ring disease outbreaks in southwestern Spain. *Dis. Aquat. Org.* **14**: 229-236.
- CASTRO, D., M. A. MORIÑIGO, R. CORNAX, E. MARTINEZ-MANZANARES y J. J. BORREGO, 1990 Microflora associated with outbreaks of brown ring from clams (*Tapes semidecussatus*) in southwestern Spain. In: A. Figueras, W.S. Fisher and P. van Banning (eds). Fourth International Colloquium on Pathology in Marine Aquaculture. Instituto de Investigaciones Marinas, Vigo, p. 86.



- CASTRO, D., M. J. PUJALTE, L. LOPEZ-CORTES, E. GARAY y J. J. BORREGO, 2002 Vibrios isolated from the cultured manila clam (*Ruditapes philippinarum*): Numerical taxonomy and antibacterial activities. *J. Appl. Microbiol.* **93**: 438-447.
- CASTRO, D., J. L. ROMALDE, J. VILA, B. MAGARIÑOS, A. LUQUE y J. J. BORREGO, 1997a Intraspecific characterization of *Vibrio tapetis* strains by use of Pulsed-Field Gel Electrophoresis, ribotyping, and plasmid profiling. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 1449-1452.
- CASTRO, D., J.A. SANTAMARIA, A. LUQUE, E. MARTINEZ-MANZANARES y J.J. BORREGO. 1996. Antigenic characterization of the etiological agent of the brown ring disease affecting manila clams. *Syst. Appl. Microbiol.* **19**: 231-239.
- CASTRO, D., J. A. SANTAMARIA, A. LUQUE, E. MARTINEZ-MANZANARES y J. J. BORREGO, 1997b Antigenic characterization of the etiological agent of the brown ring disease affecting manila clams. *System. Appl. Microbiol.* **19**: 231-239.
- CASTRO, D., J. A. SANTAMARIA, A. LUQUE, E. MARTINEZ-MANZANARES y J. J. BORREGO, 1997c *La Enfermedad del Anillo Marrón en Almejas Cultivadas*. Servicio de Publicaciones. Universidad de Málaga.
- CASTRO, D., J. A. SANTAMARIA, A. LUQUE, E. MARTINEZ-MANZANARES y J. J. BORREGO, 1997d Determination of the etiological agent of brown ring disease in southwestern Spain. *Dis. Aquat. Org.* **29**: 181-188.
- CHOQUET, G., P. SOUDANT, C. LAMBERT, J. L. NICOLAS y C. PAILLARD, 2003 Reduction of adhesion properties of *Ruditapes philippinarum* hemocytes exposed to *Vibrio tapetis*. *Dis. Aquat. Org.* **57**: 109-116.
- FIGUERAS, A., J. A. F. ROBLEDO y B. NOVOA, 1996 Brown ring disease and parasites in clams (*Ruditapes decussatus* and *R. philippinarum*) from Spain and Portugal. *J. Shellfish Res.* **15**: 363-368.
- FLASSCH, J. P., 1987 L'élevage des palourde en France en 1987. *Aqua Rev.* **15**: 12-16.
- 1989 Bilan des travaux sur la maladie des anneaux bruns chez la palourde de l'élevage. *Equinoxe* **29**: 9-11.
- FLASSCH, J. P. y H. GRIZEL, 1989 Lettre d'information aux venericulteurs sur le phenomene de «l'anneau brun». IFREMER, March 1989.
- FRIEDMAN, C. S. y R. P. HEDRICK, 1991 Pacific oyster nocardiosis: isolation of the bacterium and induction of laboratory infections. *J. Invertebr. Pathol.* **57**: 109-120.
- JENSEN, S., O. B. SAMUELSEN, K. ANDERSEN, L. TORKILDSEN, C. LAMBERT, G. CHOQUET, C. PAILLARD y O. BERGH, 2003 Characterization of strains of *Vibrio splendidus* and *V. tapetis* isolated from corksling wrasse *Symphodus melops* suffering vibriosis. *Dis. Aquat. Org.* **53**: 25-31.



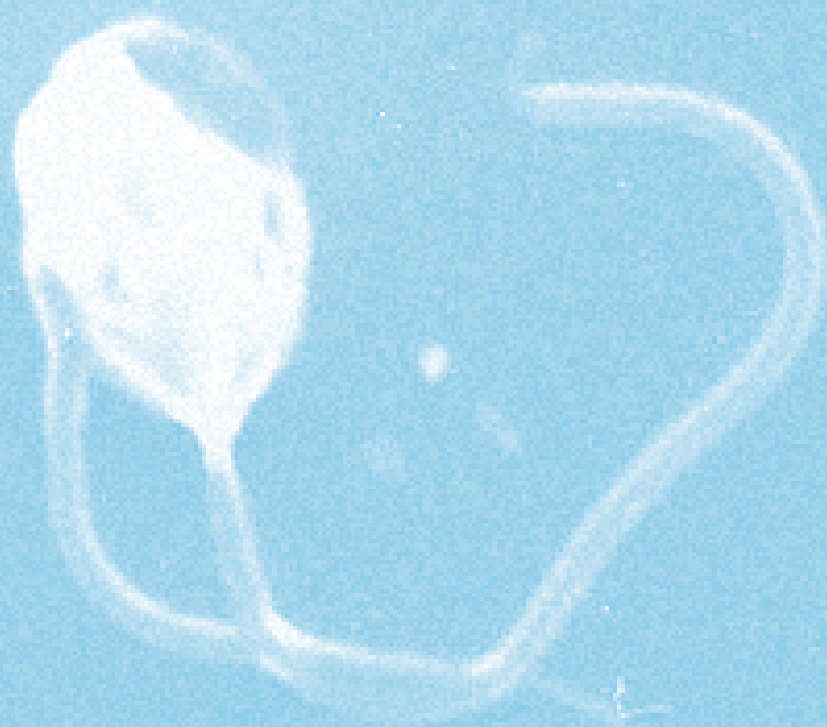
- LANE, E. y T. H. BIRKBECK, 2000 Species specificity of some bacterial pathogens of bivalve molluscs is correlated with their interaction with bivalve haemocytes. *J. Fish Dis.* **23**: 275-279.
- LE CHEVALIER, P., C. LE BOULAY y C. PAILLARD, 2003 Characterization by restriction fragment length polymorphism and plasmid profiling of *Vibrio tapetis* strains. *J. Basic Microbiol.* **43**: 414-422.
- LOPEZ, C., M. J. CARBALLAL, C. AZEVEDO y A. VILLALBA, 1997 Differential phagocytic ability of the circulating haemocyte types of the carpet shell clam *Ruditapes decussatus* (Mollusca: Bivalvia). *Dis. Aquat. Org.* **30**: 209-215.
- LOPEZ-CORTES, L., D. CASTRO, J. I. NAVAS y J. J. BORREGO, 1999a Phagocytic and chemotactic responses of manila and carpet shell clam haemocytes against *Vibrio tapetis*, the causative agent of brown ring disease. *Fish and Shellfish Immunol.* **9**: 543-555.
- LOPEZ-CORTES, L., A. LUQUE, E. MARTINEZ-MANZANARES, D. CASTRO y J. J. BORREGO, 1999b Adhesion of *Vibrio tapetis* to clam cells. *J. Shellfish Res.* **18**: 91-97.
- LUQUE, A., 1997 *Caracterización del Agente Causal de la Enfermedad del Anillo Marrón en Almejas Cultivadas*. Tesis Doctoral. Universidad de Málaga.
- MAES, P., 1992 *Pathologie Bactérienne chez Deux Invertébrés marins d'intérêt Commercial, Ruditapes philippinarum et Paracentrotus lividus*. Thèse de Doctorat. Université de Brest.
- MAES, P. y C. PAILLARD, 1992 Effect du *Vibrio* P1, pathogène de *Ruditapes philippinarum*, sur d'autres espèces de bivalves. Les Mollusques marins, Biologie et Aquaculture. Ifremer, Actes de Colloques **14**: 141-148.
- MARTINEZ-MANZANARES, E., D. CASTRO, J. I. NAVAS, L. LOPEZ-CORTES y J. J. BORREGO, 1998 Transmission routes and treatment of brown ring disease affecting manila clam (*Tapes philippinarum*). *J. Shellfish Res.* **17**: 1051-1056.
- MUÑOZ, J. L., A. SANCHEZ-LAMADRID y M. SAAVEDRA, 1993 Incidencia del anillo marrón en cultivos intermareales de la almeja japonesa (*Ruditapes philippinarum*). International Conference World Aquaculture'93. European Aquaculture Society, Special Publication No. 19, Torremolinos, p. 72.
- NOEL, T., E. AUBREE, D. BLATEAU, E. MIALHE y H. GRIZEL, 1992 Treatments against the *Vibrio* P1, suspected to be responsible for mortalities in *Tapes philippinarum*. *Aquaculture* **107**: 171-174.
- NOEL, T., J. L. NICOLAS, V. BOULO, E. MIALHE y Ph. ROCH, 1996 Development of a colony-blot ELISA assay using monoclonal antibodies to identify *Vibrio* P1 responsible for «brown ring disease» in the clam *Tapes philippinarum*. *Aquaculture* **146**: 171-178.



- NOVOA, B., A. LUQUE, D. CASTRO, J. J. BORREGO y A. FIGUERAS, 1998 Characterization and infectivity of four bacterial strains isolated from brown ring disease-affected clams. *J. Invertebr. Pathol.* **71**: 34-41.
- OUBELLA, R., P. MAES, C. PAILLARD y M. AUFFRET, 1993 Experimentally induced variation in hemocyte density for *Ruditapes philippinarum* and *R. decussatus* (Mollusca, Bivalvia). *Dis. Aquat. Org.* **15**: 193-197.
- OUBELLA, R., C. PAILLARD, P. MAES y M. AUFFRET, 1994 Changes in hemolymph parameters in the manila clam *Ruditapes philippinarum* (Mollusca, Bivalvia) following bacterial challenge. *J. Invertebr. Pathol.* **64**: 33-38.
- PAILLARD, C., 1992 *Etiologie et Caractérisation de la Maladie de L'anneau Brun chez la Palourde D'élevage, Ruditapes philippinarum*. Thèse de Doctorat. Université de Brest.
- 2004 A short-review of brown ring disease, a vibriosis affecting clams, *Ruditapes philippinarum* and *Ruditapes decussatus*. *Aquat. Living Resour.* **17**: 467-475.
- PAILLARD, C. y P. MAES. 1989. Originepathogène d'"anneaubrun" chez *Tapes philippinarum* (Mollusque, bivalve). *C.R. Acad. Sci. Paris, Ser. III.* **309**: 235-241.
- PAILLARD, C. y P. MAES, 1990 Etiologie de la maladie de l'anneau brun chez *Tapes philippinarum*: Pathogenicité d'un *Vibrio* sp. *C.R. Acad. Sci. Paris, Ser III* **310**: 15-20.
- 1994 The brown ring disease symptom in the manila clam, *Ruditapes philippinarum*: Establishment of a classification system. *Dis. Aquat. Org.* **19**: 137-146.
- 1995a The brown ring disease in the manila clam, *Ruditapes philippinarum*. I. Ultrastructural alterations of the periostracal lamina. *J. Invertebr. Pathol.* **65**: 91-100.
- 1995b The brown ring disease in the manila clam, *Ruditapes philippinarum*. II. Microscopic study of the brown ring syndrome. *J. Invertebr. Pathol.* **65**: 101-110.
- PAILLARD, C., B. ALLAM y R. OUBELLA, 2004 Effect of temperature on defense parameters in Manila clam *Ruditapes philippinarum* challenged with *Vibrio tapetis*. *Dis. Aquat. Org.* **59**: 249-262.
- PAILLARD, C., S. GAUSSON, J. L. NICOLAS, J. P. LE PENNEC y D. HARAS, 2006 Molecular identification of *Vibrio tapetis*, the causative agent of the brown ring disease of *Ruditapes philippinarum*. *Aquaculture* **253**: 25-38.
- PAILLARD, C., P. MAES y R. OUBELLA, 1994 Brown ring disease in clams. *Ann. Rev. Fish Dis.* **4**: 219-240.

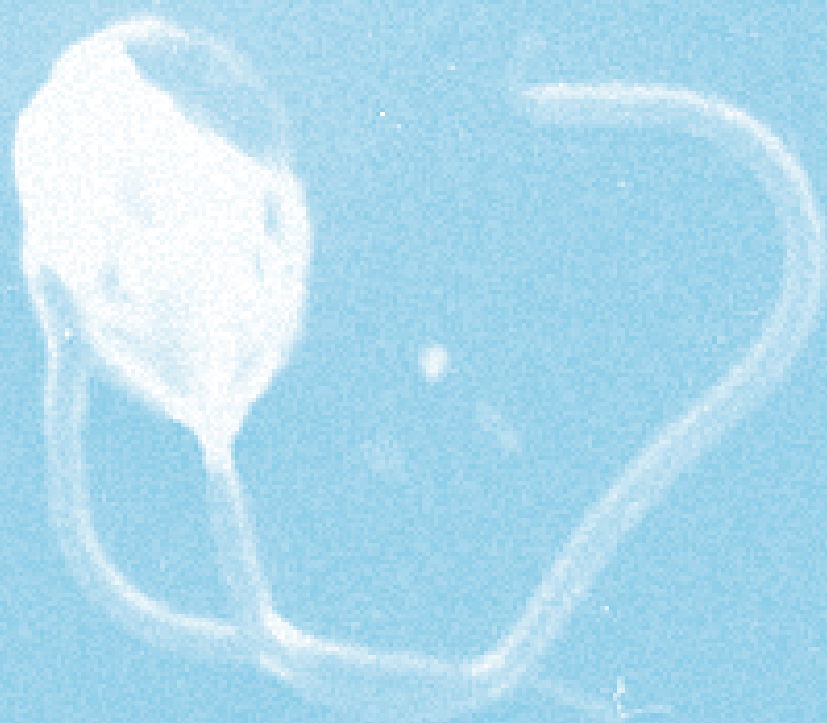


- PAILLARD, C., L. PERCELAY, M. LE PENNEC y D. L. PICARD, 1989 Origine pathogène de l'anneau brun chez *Tapes philippinarum* (Mollusque, bivalve). C.R. Acad. Sci. Paris, Ser III **309**: 235-241.
- PARK, K. I., C. PAILLARD, P. LE CHEVALIER y K. S. CHOI, 2006 Report on the occurrence of brown ring disease (BRD) in manila clam, *Ruditapes philippinarum*, on the west coast of Korea. Aquaculture **255**: 610-613.
- PASS, D. A., R. DYBDAHL y M. M. MANNION, 1987 Investigations into the causes of mortality of the pearl oyster, *Pinctada maxima* (Jamson), in western Australia. Aquaculture **65**: 149-169.
- PLANA, S. y M. LE PENNEC, 1991 Altérations de la glande digestive et conséquences nutritionnelles chez la palourde *Ruditapes philippinarum* contaminée par une bactérie du genre *Vibrio*. Aquat. Living Resour. **4**: 255-264.
- PLANA, S., G. SINQUIN, P. MAES, C. PAILLARD y M. LE PENNEC, 1996 Variations in biochemical composition of juvenile *Ruditapes philippinarum* infected by a *Vibrio* sp. Dis. Aquat. Org. **24**: 205-213.
- REID, H. I., H. L. DUNCAN, L. A. LAIDLER, D. HUNTER y T. H. BIRKBECK, 2003a Isolation of *Vibrio tapetis* from cultivated atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). Aquaculture **221**: 65-74.
- REID, H. I., P. SOUDANT, C. LAMBERT, C. PAILLARD and T. H. BIRKBECK, 2003b Salinity effects on immune parameters of *Ruditapes philippinarum* challenged with *Vibrio tapetis*. Dis. Aquat. Org. **56**: 249-258.
- RODRIGUEZ, J. M., S. LOPEZ-ROMALDE, R. BEAZ, M. C. ALONSO, D. CASTRO y J. L. ROMALDE, 2006 Molecular fingerprinting of *Vibrio tapetis* strains using three PCR-based methods: ERIC-PCR, REP-PCR and RAPD. Dis. Aquat. Org. **69**: 175-183.
- ROMALDE, J. L., D. CASTRO, B. MAGARIÑOS, L. LOPEZ-CORTES y J. J. BORREGO, 2002 Comparison of ribotyping, randomly amplified polymorphic DNA and pulsed-field gel electrophoresis for molecular typing of *Vibrio tapetis*. System. Appl. Microbiol. **25**: 544-550.
- ROMALDE, J. L., J. M. RODRIGUEZ y J. J. BORREGO, 2007 Protocolo de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) para detección e identificación de *Vibrio tapetis* a partir de cultivos puros del microorganismo y de tejidos de moluscos. Oficina Española de Patentes y Marcas, N° Publicación: 2265707.



6

PERKINSOSIS EN MOLUSCOS



PERKINSOSIS EN MOLUSCOS

Villalba A.¹, Gestal C.², Casas S. M.³ y Figueras A.²

¹Centro de Investigacións Mariñas, Consellería do Mar, Xunta de Galicia, Apto. 13, 36620 Vilanova de Arousa, Spain

²Instituto de Investigaciones Marinas, IIM-CSIC. Eduardo Cabello 6, 36208 Vigo, Spain

³Cooperative Aquatic Animal Health Research Program, Department of Veterinary Science, Louisiana State University Agricultural Center, Baton Rouge, Louisiana 70803, USA

Resumen

El género *Perkinsus* agrupa protozoos parásitos de moluscos marinos. El género está presente en América, África, Europa, Asia y Oceanía y algunas de sus especies ocasionan mortandades masivas. La proliferación del parásito en los tejidos del hospedador supone que un tipo celular, denominado trofozoíto, sufre divisiones binarias sucesivas, permaneciendo unidas las células hijas que se van produciendo hasta que se independizan y constituyen nuevos trofozoítos. Al morir el hospedador, los trofozoítos se transforman en hipnoesporas y éstas, cuando se transfieren al agua de mar, entran en un proceso de zoosporulación conducente a la liberación de zoosporas móviles. Trofozoítos, hipnoesporas y zoosporas son capaces de iniciar una infección en un hospedador sano. La posición taxonómica del género es controvertida aunque actualmente existe consenso en situarlo en los Alveolata, un grupo de protozoos que incluye a Ciliados, Apicomplexa y Dinoflagelados. Se consideran 7 especies válidas dentro del género: *P. marinus*, *P. olseni*, *P. qugwadi*, *P. chesapeaki*, *P. mediterraneus*, *P. honshuensis* y *P. beihaiensis*. Los métodos de diagnóstico disponibles incluyen técnicas histológicas, incubación de tejidos del hospedador en caldo de tioglicolato y técnicas moleculares para detectar secuencias de ADN (o



proteínas) exclusivas del parásito. La dinámica de la perkinsosis está influida por la temperatura y la salinidad del agua, existiendo diferencias en los rangos óptimos de estas variables entre especies del género. La edad del hospedador influye positivamente en la probabilidad de infección. Se han desarrollado protocolos para cultivar *in vitro* 6 especies del género. La respuesta inmunitaria ante la infección incluye la fagocitosis o la encapsulación del parásito por hemocitos, depende de la especie hospedadora que la reacción sea una u otra. Otros efectos de la infección sobre el sistema inmune de algunas especies hospedadoras son la disminución de la capacidad fagocítica de los hemocitos, inducción de lectinas específicas, inhibición de especies reactivas de oxígeno, inhibición de la apoptosis de los hemocitos e inducción de un polipéptido tóxico para el parásito. Se han detectado en algunas especies de *Perkinsus* mecanismos que les permiten proliferar superando al sistema inmunitario del hospedador, como son la actividad antioxidante para enfrentarse a las especies reactivas de oxígeno, liberación de proteasas que degradan los tejidos del hospedador, aunque éste trata de contrarrestarlo con la actividad antiproteasa de su hemolinfa, y rutas metabólicas particulares. Se están caracterizando genes del hospedador cuya expresión está modulada por la infección y genes del parásito implicados en su supervivencia y virulencia.

Abstract

The genus Perkinsus includes protozoan parasites infecting marine molluscs. This genus has been reported from America, Africa, Europe, Asia and Oceania and some of their species cause mass mortalities. The parasite proliferation through host tissues involves that a cell type, named trophozoite, undergoes successive bipartitioning and the daughter cells stay packed until they become independent giving rise to new trophozoites. The latter become hyponospores when the host dies and they enter upon zoosporulation when transferred into seawater, which leads to the release of hundreds of motile zoospores. Trophozoites, hyponospores and zoospores are able to infect healthy hosts. The genus taxonomic position is controversial but nowadays there is consensus to set it into Alveolata, a group of protozoans including Ciliates, Apicomplexa and Dinoflagellates. Seven species are considered



valid within the genus: P. marinus, P. olseni, P. qugwadi, P. chesapeaki, P. mediterraneus, P. honshuensis and P. beihaiensis. The available diagnostic methods involve histological techniques, incubation of host tissues in fluid thyoglicolate medium and molecular techniques to detect DNA (or protein) sequences that are exclusive of the parasite. The perkinsosis dynamics is influenced by water temperature and salinity, with differences in the optimal ranges for those variables among Perkinsus spp. The host age positively influences the infection probability. Procedures for in vitro cultivation of 6 Perkinsus spp. have been established. The immune response against the infection involves phagocytosis or encapsulation of the parasite, depending on host species which of the two reactions occurs. Other infection effects on the immune system of some host species are decrease of haemocyte immune capability, induction of specific lectins, reactive oxygen intermediate inhibition, haemocyte apoptosis inhibition and induction of a polypeptide toxic for the parasite. Mechanisms allowing some Perkinsus spp. to proliferate overcoming the host immune response have been detected, such as antioxidant activity to face reactive oxygen intermediate host production, protease release to degrade host tissues, although the host counteract with antiprotease activity in the haemolymph, and particular metabolic pathways. Host genes whose expression is modulated by infection and parasite genes involved in survival and virulence are being characterised.

1. INTRODUCCIÓN

La perkinsosis, enfermedad causada por parásitos del género *Perkinsus*, se detectó por primera vez en el ámbito de las investigaciones iniciadas en 1946 para determinar la causa de mortandades masivas de la ostra *Crassostrea virginica* en la costa de Louisiana (EE.UU), cuya producción tenía una gran trascendencia socioeconómica. La industria petrolera financió dichas investigaciones pues el sector ostrícola presionaba responsabilizando de la mortalidad de la ostra a las operaciones de extracción de crudo (RAY 1996). La conclusión más relevante fue la detección de un patógeno desconocido, denominado entonces *Dermocystidium marinum* (MACKIN *et al.* 1950) y actualmente conocido como *Perkinsus marinus*, como responsable de la mortalidad. Desde entonces, este parásito se ha detectado en ostras *C. virginica* a lo largo

del litoral Atlántico de Norteamérica, desde Maine (EE.UU) (FORD 1996) hasta la península de Yucatán (México) (GULLIAN-KLANIAN *et al.* 2008). Recientemente se ha detectado en el litoral Pacífico de México (CÁCERES-MARTÍNEZ *et al.* 2008). Desde la primera detección de la perkinsosis hasta la actualidad se han descrito otras especies del género *Perkinsus* (Tabla 1), constatándose que esta enfermedad afecta a una amplia variedad de moluscos, tanto bivalvos (ostreidos, venéridos, pectínidos, ostras perlíferas, almejas gigantes, ...) como gasterópodos (orejas de mar). Se han detectado casos de perkinsosis en América (Norte y Sur), Europa, Asia, África y Oceanía, aunque en algunos casos no se ha identificado la especie del género *Perkinsus* en cuestión. Debido a su trascendencia económica, especialmente en los EE.UU, sumado a su amplia distribución geográfica, esta enfermedad ha sido objeto del mayor esfuerzo investigador entre las enfermedades de moluscos de todo el mundo. Varias revisiones minuciosas de la información disponible sobre esta enfermedad han precedido a la presente (FISHER 1996; VILLALBA *et al.* 2004; VILLALBA 2008).

2. CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS Y CICLO DE VIDA

En el ciclo de vida de las especies de *Perkinsus* se conocen diferentes estadios que corresponden a la proliferación en los tejidos del hospedador y a la etapa de vida libre. En los tejidos del hospedador, el estadio característico se denomina **trofozoíto**, con forma esférica u ovoide, contiene una vacuola que ocupa gran parte del volumen celular y presenta el núcleo en posición periférica, con nucleolo patente. El rango del tamaño del trofozoíto, en general entre 5 y 15 μm , varía en función de la especie, y en algunas de ellas es frecuente la presencia de una inclusión, denominada vacuoplasto, en la gran vacuola (Fig. 1). La proliferación del parásito supone que los trofozoítos se multiplican por divisiones binarias sucesivas, de forma que las células hijas resultantes permanecen juntas durante un tiempo, dispuestas en forma de roseta, rodeadas por la pared original de la célula madre (Fig. 2), hasta que finalmente se independizan. Cada célula en división puede producir de 2 a aproximadamente 60 nuevas células. Las células hijas

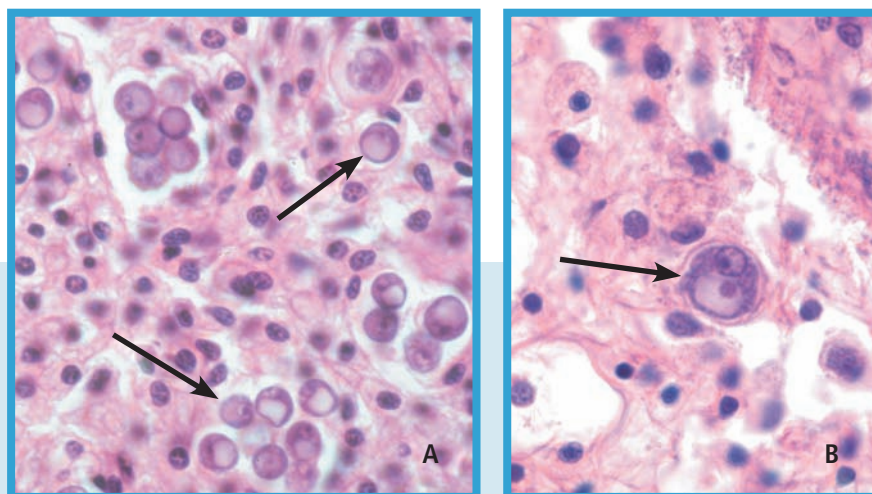


FIG. 1.

Trofozoitos de *Perkinsus* spp. A. Corte histológico de las branquias de una almeja *Ruditapes decussatus* infectada por trofozoitos de *Perkinsus olseni* (flechas). B. Corte histológico de la masa visceral de una ostra plana *Ostrea edulis* mostrando un trofozoito de *Perkinsus mediterraneus*.

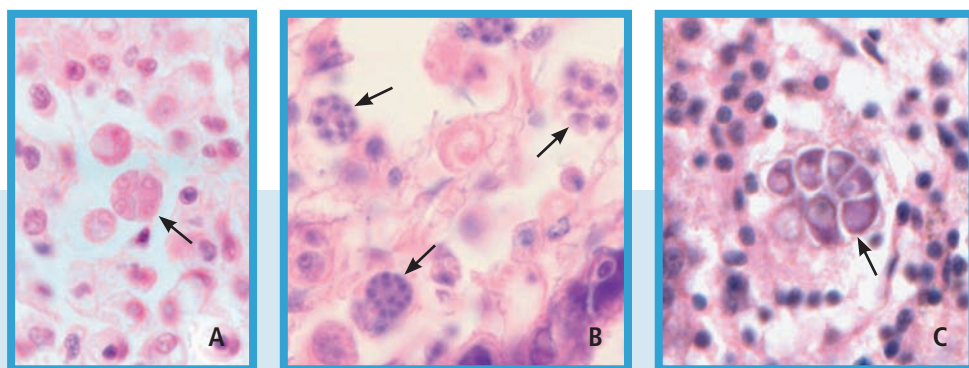


FIG. 2.

Proliferación de *Perkinsus* spp. A. Corte histológico de las branquias de una almeja *Ruditapes decussatus* mostrando un estado de división de *Perkinsus olseni* (flecha) que contiene cuatro células. B. Corte histológico de la masa visceral de una ostra americana *Crassostrea virginica* mostrando diferentes etapas de división (flechas) de *Perkinsus marinus*. C. Corte histológico de la masa visceral de una ostra plana *Ostrea edulis* mostrando un estado de división (flecha) de *Perkinsus mediterraneus*.

(trofozoítos inmaduros) aumentan progresivamente de tamaño y desarrollan la vacuola característica, convirtiéndose en trofozoítos (GOGGIN y LESTER 1995; PERKINS 1996; BLACKBOURN *et al.* 1998).

Una característica propia del género supone que cuando los tejidos del hospedador infectado se incuban en caldo de tioglicolato, en oscuridad y condiciones anaeróbicas, los trofozoítos aumentan su tamaño 2, 3 o más veces y se rodean de una pared gruesa, de naturaleza polisacárida, lo que constituye el estadio denominado **hipnoespora** o prezoosporangio (RAY 1952) (Fig. 3). Esta transformación de los trofozoítos en hipnoesporas fue observada en hospedadores moribundos (RAY 1954; MACKIN 1962, PERKINS 1968; VALIULIS y MACKIN 1969) aunque esta característica del ciclo de *Perkinsus* se ha observado en raras ocasiones. Cuando las hipnoesporas se incuban en agua de mar, se desencadena el proceso de zoosporulación, por el que se transforman en zoosporangios en un proceso que culmina con la liberación de zoosporas biflageladas. Las hipnoesporas pueden sobrevivir durante periodos prolongados de condiciones adversas, manteniendo la

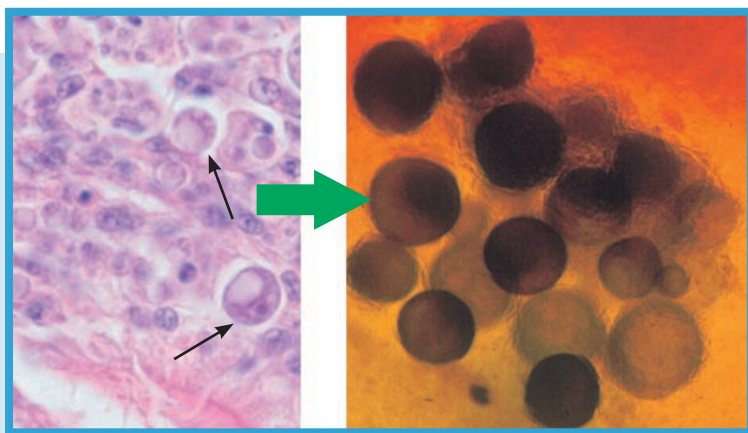


FIG. 3.

Hipnoesporas de *Perkinsus marinus*, teñidas con colorante de Lugol, (micrografía derecha). Las hipnoesporas se producen por la transformación de los trofozoítos (micrografía izquierda, flechas) presentes en los tejidos del hospedador, cuando la vianda se incuba en caldo de tioglicolato.



capacidad de entrar en zooesporulación cuando las condiciones son favorables; por ello se consideran un estadio de resistencia en el ciclo de vida (CASAS *et al.* 2002a), que se origina a partir de los trofozoítos cuando el hospedador muere y que, una vez en contacto con el agua de mar, cuando las condiciones ambientales son favorables entran en zooesporulación (PERKINS 1968; VALIULIS y MACKIN 1969). Partiendo de la hipnoespora (prezooesporangio), el proceso de zooesporulación supone una sucesión de divisiones celulares binarias, manteniéndose la integridad de la pared de la hipnoespora original a lo largo del proceso. Las células hijas resultantes se diferencian en **zooesporas** biflageladas. Así, la hipnoespora se convierte en un **zooesporangio** que alberga centenares de zooesporas «bullendo» en su interior hasta que se liberan al exterior a través de un tubo (a veces dos) de descarga (PERKINS y MENZEL 1966, 1967; AZEVEDO 1989; AUZOUX-BORDENAVE *et al.* 1995; McLAUGHLIN *et al.* 2000; CASAS *et al.* 2002a, 2004) (Fig. 4). Las zooesporas móviles, gracias a dos flagelos de inserción lateral, tienen

FIG. 4.

Progresión del proceso de zooesporulación de *Perkinsus olseni*.

A. Zooesporangio en estado unicelular, mostrando el tubo de descarga (flecha) ligeramente desenfocado.

B. Zooesporangio con 2 células.

C. Zooesporangio con 4 células.

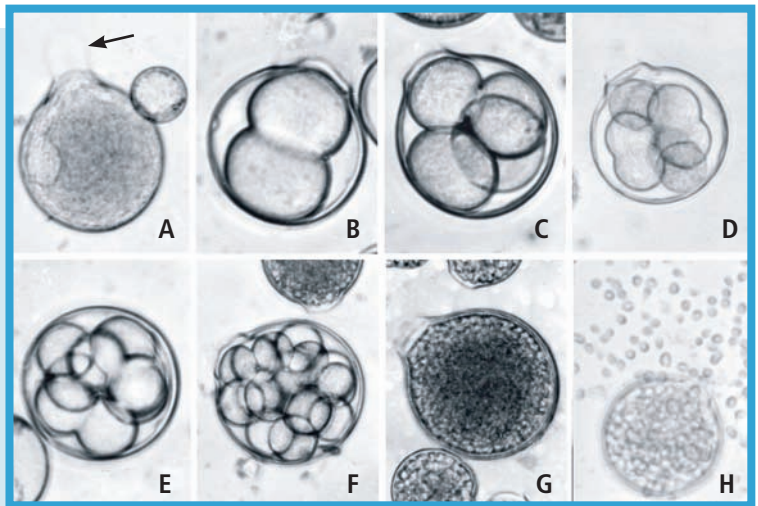
D. Zooesporangio en división, correspondiente a la transición entre 4 y 8 células.

E. Zooesporangio con 8 células.

F. Zooesporangio con 16 células.

G. Zooesporangio que encierra centenares de zooesporas móviles.

H. Zooesporas liberadas moviéndose alrededor de un zooesporangio en fase de liberación de zooesporas.



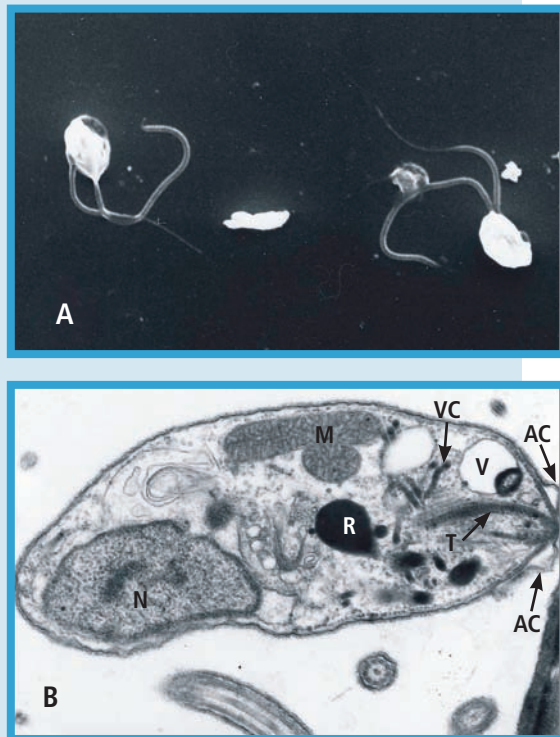
forma elipsoidal, ovoidal o incluso son piriformes (Fig. 5). Hay descripciones detalladas de la ultraestructura de las zoosporas de varias especies de *Perkinsus* pues tiene valor taxonómico (PERKINS 1968, 1976; AZEVEDO 1989; McLAUGHLIN *et al.* 2000; COSS *et al.* 2001a; CASAS *et al.* 2002a, 2004).

La transmisión de la infección por especies de *Perkinsus* se produce directamente de molusco a molusco, sin la necesidad de hospedadores intermediarios (RAY 1954; CHU 1996; GOGGIN y LESTER 1995; BLACKBOURN *et al.* 1998). ¿Cuál es el estadio que inicia la infección en un hospedador sano? De manera experimental se ha conseguido transmitir la infección utilizando trofozoítos, hipnoesporas, zooesporangios y zooesporas (GOGGIN *et al.* 1989; VOLETY y CHU 1994; RODRÍGUEZ *et al.* 1994; CHU 1996; BUSHEK *et al.* 1997; CHINTALA *et al.* 2002; FORD *et al.* 2002;

FIG. 5.

Zooesporas de *Perkinsus olseni*.

A. Micrografía electrónica de transmisión de dos zooesporas *in toto*; micrografía cedida por el Prof. Carlos Azevedo. B. Corte ultrafino de una zooespora; micrografía electrónica de transmisión cedida por el Prof. Carlos Azevedo. AC: alvéolos corticales; M: mitocondria; N: núcleo; R: rhoptry; T: toxicisto; V: vacuola; VC: vesículas asociadas a cintas.





BUSHEK *et al.* 2002b). Se ha constatado que, además de las hipnoesporas y zooesporas que se producen tras la muerte del hospedador, los moluscos vivos infectados también liberan células viables del parásito a través de las heces (BUSHEK *et al.* 1997; SCANLON *et al.* 1997; BUSHEK *et al.* 2002b) y posiblemente a través de los gonoductos (MOSS *et al.* 2008) o por diapédesis a través del epitelio del manto o branquias. RAGONE CALVO *et al.* (2003) informaron de que en el medio natural las tasas de transmisión máximas de *P. marinus* se producen cuando la mortalidad de la ostra *C. virginica* provocada por el parásito alcanza sus valores máximos, aunque la transmisión también se produce cuando la mortalidad es baja o nula, lo que sugiere que la muerte del hospedador no es un requisito indispensable para la transmisión.

3. POSICIÓN TAXONÓMICA

La posición taxonómica del género *Perkinsus* es una cuestión controvertida desde su descubrimiento. Inicialmente a la especie tipo se le denominó *Dermocystidium marinum* (MACKIN *et al.* 1950), por considerar que se trataba de un hongo. Tras diferentes asignaciones, las similitudes ultraestructurales de la zooespora de este parásito con los Apicomplexa (PERKINS 1976), condujeron a crear el género *Perkinsus*, dentro del filo Apicomplexa (LEVINE 1978). Los primeros análisis taxonómicos basados en secuencias de ADN de la subunidad pequeña del gen del ARN ribosómico, sugirieron que el género *Perkinsus* es más cercano a los dinoflagelados que a los Apicomplexa (FONG *et al.* 1993; GOGGIN y BARKER 1993). El análisis resultante de la combinación de criterios morfológicos y de secuencias génicas correspondientes a la subunidad pequeña del ARN ribosómico y de la actina, confirmó la proximidad entre dinoflagelados y *Perkinsus* (SIDALL *et al.* 1997). En los últimos años se han acumulado evidencias de la existencia de plastos en las células de *Perkinsus* (GRAUVOGEL *et al.* 2007; STELTER *et al.* 2007; TELES-GRILLO *et al.* 2007, VENEGAS-CALERÓN *et al.* 2007, MATSUZAKI *et al.* 2008). Actualmente parece existir consenso en situar al género *Perkinsus* dentro de los Alveolata, un grupo de protozoos que incluye a Ciliados, Apicomplexa y Dinoflagelados (KUVARDINA *et al.* 2002; SALDARRIAGA *et al.* 2003; CAVALIER-SMITH y CHAO 2004). NORÉN *et al.* (1999)



propusieron la creación del *phylum* Perkinsozoa que incluiría *Perkinsus* y otros Alveolados que comparten caracteres con Apicomplexa y Dinoflagelados. Sin embargo, CAVALIER-SMITH y CHAO (2004) propusieron agrupar Apicomplexa y Dinoflagelados junto con otros protozoos evolutivamente muy próximos en el *phylum* Myzozoa de forma que *Perkinsus* se incluiría también en dicho *phylum* como un linaje muy próximo evolutivamente a los Dinoflagelados, pero sin la consideración de Dinoflagelado; según esta clasificación, el género *Perkinsus* estaría incluido en el orden Perkinsida, clase Perkinsea, *Infraphylum* Protalveolata, *Subphylum* Dinozoa, *phylum* Myzozoa. El *phylum* Myzozoa junto con el *phylum* Ciliophora (los ciliados) se incluye dentro del infrareino Alveolata, subreino Biciliata, reino Protozoa (CAVALIER-SMITH 2004).

4. ESPECIES INCLUIDAS EN EL GÉNERO *PERKINSUS*

Hasta el momento se han descrito 10 especies del género *Perkinsus*, de las que 7 se consideran válidas actualmente (Tabla 1). Aunque en los primeros casos se utilizaron criterios morfológicos, de hospedador y geográficos para separar especies dentro del género, con el tiempo han cobrado una importancia prioritaria criterios moleculares, en concreto secuencias de ADN de varios loci. En cuanto a los criterios morfológicos, se han aducido diferencias entre especies en la morfología de la hipnoespora/zooesporangio, tales como el tamaño, la relación entre la longitud del tubo de descarga y el diámetro del zooesporangio, el número de tubos de descarga y la ultraestructura de la pared; en el caso de las zooesporas se han observado diferencias en el tamaño, el ángulo formado entre los dos flagelos en su inserción, la existencia de un cuerpo denso en el corpúsculo basal de los flagelos y la distribución de los alveolos corticales sobre la superficie. Por lo que se refiere al hospedador, hay solapamientos múltiples entre las especies de *Perkinsus* y los criterios geográficos son poco fiables debido a los numerosos movimientos de moluscos realizados consciente o inconscientemente por el hombre y a los solapamientos múltiples en el rango geográfico entre especies de *Perkinsus*. El criterio al que se



TABLA 1.
Especies válidas del género *Perkinsus* y sus hospedadores.

Especie	Hospedador tipo	Otros hospedadores	Países afectados	Referencias bibliográficas
<i>Perkinsus marinus</i>	<i>Crassostrea virginica</i>	Ostras: <i>Crassostrea gigas</i> , <i>C. ariakensis</i> , <i>C. rhizophorae</i> , <i>C. corteziensis</i> Almejas: <i>Mya arenaria</i> , <i>Macoma balthica</i> , <i>Macoma mitchelli</i> , <i>Mercenaria mercenaria</i>	EE UU, México	MACKIN <i>et al.</i> 1950; BURRESON <i>et al.</i> 1994b; ANDREWS 1996; CALVO <i>et al.</i> 1999; CALVO <i>et al.</i> 2001; COSS <i>et al.</i> 2001a; CACERES-MATINEZ <i>et al.</i> 2008; PECHER <i>et al.</i> 2008
<i>Perkinsus olseni</i> (= <i>atlanticus</i>)	<i>Haliotis ruber</i>	Almejas: <i>Ruditapes decussatus</i> , <i>R.uditapes philippinarum</i> , <i>Austrovenus stutchburyi</i> , <i>Pitar rostrata</i> , <i>Protothaca jedoensis</i> Ostras: <i>Crassostrea ariakensis</i> , <i>Crassostrea hongkongensis</i> Orejas de mar: <i>Haliotis laevigata</i> , <i>Haliotis scalaris</i> , <i>Haliotis cyclobates</i>	Australia, Nueva Zelanda, Corea del Sur, Japón, China, Portugal, España, Italia y Uruguay	LESTER y DAVIS 1981; AZEVEDO 1989; GOGGIN y LESTER 1995; HAMAGUCHI <i>et al.</i> 1998; DE LA HERRÁN <i>et al.</i> 2000; CREMONTE <i>et al.</i> 2005; PARK <i>et al.</i> 2005; PARK <i>et al.</i> 2006b; ZHANG <i>et al.</i> 2005; ABOLLO <i>et al.</i> 2006; MOSS <i>et al.</i> 2007
<i>Perkinsus qugwadi</i>	<i>Patinopecten yessoensis</i>		Canadá	BOWER <i>et al.</i> 1998
<i>Perkinsus chesapeakei</i> (= <i>andrewsi</i>)	<i>Mya arenaria</i>	Almejas: <i>Macoma balthica</i> , <i>Macoma mitchelli</i> , <i>Mercenaria mercenaria</i> , <i>Tagelus plebeius</i> , <i>Cyrtopleura costata</i> , <i>Rangia cuneata</i> , <i>Mulinia lateralis</i> Ostras: <i>Crassostrea virginica</i>	EE UU	KOTOB <i>et al.</i> 1999a; MC LAUGHLIN <i>et al.</i> 2000; COSS <i>et al.</i> 2001a; DUNGAN <i>et al.</i> 2002; BURRESON <i>et al.</i> 2005; REECE <i>et al.</i> 2008
<i>Perkinsus mediterraneus</i>	<i>Ostrea edulis</i>		España	CASAS <i>et al.</i> 2004
<i>Perkinsus honshuensis</i>	<i>Ruditapes philippinarum</i>		Japón	DUNGAN y REECE 2006
<i>Perkinsus belthaisis</i>	<i>Crassostrea hongkongensis</i>	<i>Crassostrea ariakensis</i>	China	MOSS <i>et al.</i> 2008



le confiere mayor solvencia para discriminar entre especies del género se basa en las secuencias de ADN de varios loci, en concreto se han usado secuencias correspondientes a varias regiones del gen del ARN ribosómico (la subunidad grande LSU, el espaciador transcrito interno ITS y el espaciador no transcrito NTS dentro del espaciador intergénico IGS) y genes de actina (tipo I y tipo II). El análisis filogenético realizado usando secuencias de la subunidad grande y el espaciador transcrito interno el gen ribosómico y el gen de actina tipo I da soporte a la validez de las 7 especies del género *Perkinsus* incluidas en la Tabla 1 (Moss *et al.* 2008).

Tras la especie tipo, *P. marinus*, detectada en ostras *Crassostrea virginica* de los EE.UU, un parásito detectado en orejas de mar *Haliotis ruber* de Australia, fue considerado como una especie nueva, *Perkinsus olseni*, alegando las diferencias de hospedador y de localización geográfica (LESTER y DAVIS 1981). AZEVEDO (1989), al describir por primera vez un parásito del género en Europa y en un hospedador nuevo, *Ruditapes decussatus*, propuso la nueva especie *Perkinsus atlanticus*. Sin embargo, el análisis posterior de la secuencia del NTS condujo a considerar esta especie como sinónimo de *P. olseni* (MURRELL *et al.* 2002), con preferencia de uso de la denominación más antigua, *P. olseni*. En la actualidad el rango geográfico y el de hospedadores conocidos de esta especie son muy amplios (Tabla 1). En 1991 se propuso la especie nueva *Perkinsus karlssoni* para denominar a un parásito detectado en *Argopecten irradians* de Canadá (McGLADDERY *et al.* 1991), pero posteriormente se negó la validez de esta especie al constatarse que en la descripción se habían mezclado estadios de organismos diferentes (GOGGIN *et al.* 1996). BLACKBOURN *et al.* (1998) establecieron la especie nueva *Perkinsus qugwadi* para denominar a un parásito de vieiras *Patinopecten yessoensis* cultivadas en Canadá; el análisis histológico y de ultraestructura reveló la existencia en los tejidos del hospedador de estadios equiparables a los trofozoítos, zooesporangios y zooesporas descritos para las especies de *Perkinsus*. Sin embargo, el que la zooesporulación tenga lugar en los tejidos del hospedador y el que los trofozoítos no aumenten de tamaño en el caldo de tioglicolato son caracteres que alejan a este parásito de las restantes especies de *Perkinsus* conocidas; además, los análisis filogenéticos que se han



realizado con la secuencias del ITS sitúan a *P. qugwadi* en posición muy divergente con respecto al resto de las especies del género (CASAS *et al.* 2002a; Moss *et al.* 2008), por lo que este parásito no debería estar incluido en el género *Perkinsus*. La especie *Perkinsus chesapeaki* fue establecida por McLAUGHLIN *et al.* (2000) para denominar a un parásito de la almeja *Mya arenaria* detectado en la bahía de Chesapeake (EE.UU), considerando en este caso los análisis de secuencias de ADN del gen del ARN ribosómico (KOTOV *et al.* 1999a, b). Muy poco tiempo después COSS *et al.* (2001a, b) propusieron la especie nueva *Perkinsus andrewsi* para referirse a un parásito de la almeja *Macoma balthica* detectado en la misma región que la especie anterior, pero el análisis de secuencias de ADN de varias regiones del gen del ARN ribosómico (LSU, ITS y NTS) y genes de actina (tipo I y tipo II) llevaron a considerar a *P. cheapeaki* y *P. andrewsi* como sinónimas (BURRESON *et al.* 2005), con preferencia de uso de la denominación más antigua, *P. chesapeaki*. Aunque *P. marinus* y *P. chesapeaki* muestran solapamiento en el rango de especies hospedadoras en la bahía de Chesapeake, la primera de las especies parasita casi exclusivamente ostras mientras que la segunda infecta predominantemente almejas (REECE *et al.* 2008). Una nueva especie, *Perkinsus mediterraneus*, se estableció al encontrar un parásito de la ostra *Ostrea edulis* en las Islas Baleares (CASAS *et al.* 2004). En el litoral Pacífico de Asia se han descrito en los últimos años dos especies nuevas, *Perkinsus honshuensis*, parásito de la almeja *Ruditapes philippinarum* detectado en Japón (DUNGAN y REECE 2006), y *Perkinsus beihaiensis*, encontrado en ostras *Crassostrea hongkongensis* de China (MOSS *et al.* 2008). El rango geográfico y el de hospedadores de la mayor parte de las especies mencionadas se han ido ampliando con el tiempo (Tabla 1) y, por otro lado, son muchos los casos en que se han detectado parásitos de tipo *Perkinsus* en diferentes moluscos de áreas geográficas diversas sin que se haya identificado de qué especie se trataba.

En el litoral español, se detectó la presencia de organismos de tipo *Perkinsus* en almejas de diferentes áreas: Galicia (GONZÁLEZ *et al.* 1987; FIGUERAS *et al.* 1992), región suratlántica (VILLALBA y NAVAS 1988; NAVAS *et al.* 1992), Cataluña (SAGRISTÀ *et al.* 1992; SANTMARTÍ *et al.* 1995), Asturias (CIGARRÍA *et al.* 1997), litoral vizcaíno (DANG *et al.* 2008). Los estudios



taxonómicos han permitido identificar *Perkinsus olseni* en almejas de Galicia (ROBLEDO *et al.* 2000, CASAS *et al.* 2002a), región suratlántica (DE LA HERRÁN *et al.* 2000) y Cataluña (ELANDALOUSSI *et al.* 2009) y *Perkinsus mediterraneus* en ostras de las Islas Baleares (CASAS *et al.* 2004).

5. MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO

Los métodos de diagnóstico se pueden distribuir en 3 grupos: (1) visualización del parásito tal como aparece en el hospedador, (2) incubación de tejidos del hospedador en caldo de tioglicolato y (3) aplicación de técnicas moleculares para detectar secuencias de ADN (o proteínas) exclusivas del parásito. El primero de los grupos incluye técnicas estándar dirigidas a la visualización de cualquiera de los estadios conocidos del parásito, como por ejemplo en cortes histológicos del hospedador, muestras de hemolinfa, frotis de tejido, etc... Debido a la dificultad de discriminar especies del género por criterios morfológicos, este grupo de procedimientos no permite la identificación del parásito a nivel específico. No existen signos macroscópicos inequívocamente específicos de la perkinsosis, aunque en las almejas afectadas por perkinsosis intensa es frecuente la presencia de pústulas blanquecinas en la superficie de las branquias o del manto, que se corresponden con focos grandes de hemocitos en torno a acúmulos de parásitos.

5.1. Incubación en caldo de tioglicolato

La incubación de tejidos del hospedador en caldo de tioglicolato es un método de diagnóstico de perkinsosis muy utilizado por su alta sensibilidad y bajo coste. Permite además la cuantificación de la intensidad de infección, pero su especificidad se restringe al nivel de género. El método fue desarrollado por RAY (1952) quien, buscando un procedimiento de cultivo *in vitro* del parásito, comprobó que al incubar tejidos infectados del hospedador en caldo de tioglicolato las células del parásito aumentaban su tamaño notablemente, superando 40–50 µm de diámetro; además desarrollaban una pared gruesa de naturaleza polisacáridica, por lo que se teñían de forma intensa y rápida con el colorante de Lugol, con lo que su visualización era muy fácil con muy pocos aumentos, en forma de esferas de gran tamaño



de color muy oscuro (de azul a negro). A partir de estas observaciones, el método de diagnóstico se fue perfeccionando (RAY 1966). Los detalles del procedimiento pueden encontrarse en HOWARD *et al.* (2004). El medio en que se incuban los tejidos se prepara disolviendo caldo de tioglicolato sódico con dextrosa en agua destilada y ajustando la salinidad con cloruro sódico; el medio debe esterilizarse y se complementa con antibióticos. La elección de los órganos de los que tomar una porción para incubar depende de la especie hospedadora; en el caso de las ostras suelen emplearse fragmentos de recto y branquias, mientras que en el caso de las almejas suelen emplearse branquias. La incubación ha de realizarse en tubos cerrados para impedir la renovación de aire y en oscuridad, con una duración de 5 a 7 días a la temperatura del laboratorio. Tras la incubación, los tejidos se depositan sobre un portaobjetos, se cubren con solución de Lugol, se trocean con un escalpelo y, tras colocar el cubreobjetos, se observan con microscopio con bajo aumento. Dado que las células del parásito no se multiplican durante la incubación sino que simplemente aumentan de tamaño, el número de las esferas oscuras (hipnoesporas) presentes en el tejido es un fiel reflejo de la situación previa a la incubación, por lo que este método de diagnóstico puede ser cuantitativo. De hecho Mackin (en RAY, 1954) propuso una escala numérica para estimar la intensidad de infección en cada individuo, basada en el recuento de las hipnoesporas, con las siguientes categorías de intensidad de infección: 0.5 (muy ligera), 1 (ligera), 2 (ligera a moderada), 3 (moderada), 4 (moderada a intensa) y 5 (intensa). Este método de diagnóstico es sencillo y barato, su sensibilidad es mayor que el examen de cortes histológicos (RODRÍGUEZ y NAVAS 1995; McLAUGHLIN y FAISAL 1999; VILLALBA *et al.* 2005), pero no permite discriminar entre especies del género *Perkinsus*. Dado que la distribución del parásito no suele ser homogénea en los diferentes órganos del hospedador (CHOI *et al.* 1989, McLAUGHLIN y FAISAL 1999; OLIVER *et al.* 1998), la técnica se adaptó para que, incubando toda la carne del hospedador y, seguidamente, digiriendo los tejidos del hospedador, se pudiesen recoger todas las hipnoesporas y realizar un recuento, estimando así la carga total de parásitos en el individuo infectado (CHOI *et al.* 1989; FISHER y OLIVER 1996, ALMEIDA *et al.* 1999). GAUTHIER y FISHER (1990) adaptaron el método para incubar exclusiva-

mente una muestra de hemolinfa del molusco como una vía no letal para diagnosticar perkinsosis. NICKENS *et al.* (2002) optimizaron este protocolo, lo que permite recoger un mayor número de hipnoesporas y de mayor tamaño, disminuyendo los residuos tisulares y la viscosidad de la muestra. La mayor sensibilidad del método se consigue cuando se incuba toda la carne del hospedador (BUSHEK *et al.* 1994; RODRÍGUEZ y NAVAS 1995; VILLALBA *et al.* 2005). ELLIN y BUSHEK (2006) han propuesto un método para cuantificar estadios planctónicos de *Perkinsus* spp. en muestras de agua, que combina la filtración de las muestras de agua con la incubación en caldo de tioglicolato, seguida de digestión y tinción con solución de Lugol.

5.2. Métodos moleculares

La posibilidad de realizar diagnósticos mediante inmunoensayos depende de la disponibilidad de anticuerpos específicos frente a los parásitos. CHOI *et al.* (1991) desarrollaron anticuerpos policlonales frente a hipnoesporas de *P. marinus*, pero no reconocían otros estadios del parásito. DUNGAN y ROBERSON (1993) produjeron anticuerpos monoclonales con la misma limitación; en cambio desarrollaron anticuerpos policlonales que reconocían todos los estadios del parásito, aunque no eran específicos de *P. marinus*, pues también reaccionaban con células de *P. olsenii* (MAENO *et al.* 1999), e incluso con varias especies de dinoflagelados (BUSHEK *et al.* 2002a). Una prueba diagnóstica basada en anticuerpos policlonales mostró una sensibilidad alta frente a *P. marinus*, pero su especificidad no se ha examinado con detalle (OTTINGER *et al.* 2001). MONTES *et al.* (2002) produjeron anticuerpos policlonales que reconocían hipnoesporas de *P. olsenii*. En cualquier caso, con el desarrollo de pruebas diagnósticas basadas en el reconocimiento de secuencias de ADN se ha desatendido el desarrollo de inmunoensayos diagnósticos.

A raíz del conocimiento de secuencias de varias regiones del gen del ARN ribosómico del parásito se han desarrollado pruebas diagnósticas basadas en el reconocimiento de tales secuencias. Se han diseñado cebadores para diagnosticar la infección con especificidad para varias especies de *Perkinsus* mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), como es el caso de *P. marinus* (MARSH *et al.* 1995; ROBLEDO *et al.*



1998) y *P. chesapeaki* (COSS *et al.* 2001b) a partir de la secuencia del NTS; *P. olseni* a partir del ITS (HAMAGUCHI *et al.* 1998) y del IGS (DE LA HERRÁN *et al.* 2000; ROBLEDO *et al.* 2000; PARK *et al.* 2002); *P. beihaiensis* a partir del ITS (MOSS *et al.* 2008) y *Perkinsus* sp. de la almeja *Mercenaria mercenaria* a partir del IGS (PECHER *et al.* 2008). También se han diseñado cebadores cuya especificidad se limita al nivel de género *Perkinsus*, a partir de la secuencia del ITS (CASAS *et al.* 2002a) y del IGS (ROBLEDO *et al.* 2002), que por tanto permiten diagnosticar la perkinsosis sin identificar la especie implicada. YARNALL *et al.* (2000) fueron pioneros en cuantificar la intensidad de infección por *P. marinus* mediante PCR; posteriormente se desarrollaron procedimientos para cuantificar mediante rtPCR las infecciones por *P. marinus* (AUDEMARD *et al.* 2004; BAIRD y ROESIADI 2005; GAUTHIER *et al.* 2006, ULRICH *et al.* 2007) o incluso con el uso de cebadores con especificidad a nivel de género (AUDEMARD *et al.* 2004; GAUTHIER *et al.* 2006). Para aumentar la sensibilidad del diagnóstico se han diseñado procedimientos que combinan la PCR con ELISA para la detección de *P. marinus* y *P. olseni*; en este caso se utilizan sondas marcadas con digoxigenina que hibridan con la región amplificada por PCR (ELANDALLOUSI *et al.* 2004). La combinación de PCR con el análisis del polimorfismo de la longitud de los fragmentos producidos por la digestión de los productos de la amplificación mediante endonucleasas de restricción (RFLP) se ha aplicado para distinguir infecciones por diferentes especies de *Perkinsus*, pues en función de las endonucleasas que se empleen, los patrones de restricción son distintos entre *P. marinus* y *P. chesapeaki* (KOTOB *et al.* 1999a) y entre éstas, *P. olseni* y *P. mediterraneus* (ABOLLO *et al.* 2006). También se han desarrollado procedimientos «multiplex PCR» que permiten diagnosticar la infección por *P. marinus* conjuntamente con la infección por los protozoos *Haplosporidium nelsoni* y *Haplosporidium costale* (PENNA *et al.* 2001, RUSSELL *et al.* 2004), lo que se justifica porque las tres especies mencionadas coexisten en áreas del litoral de los EE.UU parasitando a la ostra *C. virginica*. Finalmente, se han desarrollado sondas de ADN que permiten el diagnóstico de la perkinsosis mediante hibridación *in situ* sobre cortes histológicos, bien con especificidad a nivel de género (ELSTON *et al.* 2003) bien específicas para detectar *P. olseni* (NAVAS *et al.* 2001) y *P. beihaiensis* (MOSS *et al.* 2008).



La elección de un método de diagnóstico u otro dependerá del ámbito en el que se enmarca la diagnosis, ya se trate de programas de vigilancia en zonas en las que ya se ha detectado la presencia de la enfermedad o en zonas donde no se ha detectado, si se conoce o no la especie o especies presentes en una zona, si se quiere certificar la presencia de la enfermedad en una zona donde no se había detectado previamente o si se quiere certificar su ausencia. La Tabla 2 resume la adecuación de los métodos de diagnóstico de la perkinsosis en función del ámbito en que se enmarca la diagnosis y de criterios de sensibilidad, especificidad, laboriosidad, coste y rapidez del diagnóstico. Las técnicas más usadas en la actualidad son la incubación en caldo de tioglicolato y la PCR. La limitación fundamental de la primera, su especificidad únicamente a nivel de género, puede solventarse si los tejidos con diagnóstico positivo se someten a PCR, lo que es viable con determinadas precauciones (AUDEMARD *et al.* 2008). Para evitar usos o interpretaciones inadecuados del diagnóstico por PCR es conveniente tener en cuenta que esta técnica lo que detecta es la presencia del ADN del parásito y que, para que un positivo por PCR se considere como prueba de infección en un hospedador concreto, conviene que el método de diagnóstico por PCR se haya validado con otro que permita la visualización del parásito, preferentemente en el área geográfica y en el hospedador en cuestión (BURRESON 2008).

6. ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS. DINÁMICA DE LA INFECCIÓN POR *PERKINSUS* SPP.

6.1. Influencia de factores ambientales

La mayor parte de los estudios sobre aspectos epidemiológicos de la perkinsosis se han centrado sobre *P. marinus*. La temperatura y la salinidad del agua tienen una influencia determinante en la dinámica de la infección por este parásito en las poblaciones de su hospedador *Crassostrea virginica* del litoral de los EE.UU (MACKIN 1962; QUICK y MACKIN 1971; ANDREWS 1988; CROSBY y ROBERTS 1990; BURRESON y RAGONE CALVO 1996; SONIAT 1996). La prevalencia y la intensidad de infección por *P. marinus* en el medio natural aumentan al aumentar la salinidad. En las bahías afectadas por *P. marinus*, las zonas estuáricas con salini-

**TABLA 2.**

Adecuación de los métodos de diagnóstico de perkinsosis en función del ámbito en que se enmarca la diagnosis, sea en programas de vigilancia, diagnosis presuntiva o diagnosis confirmativa. A = es el método recomendado por razones de disponibilidad, utilidad, así como por su especificidad y sensibilidad diagnóstica; B = es un método estándar con buena especificidad y sensibilidad diagnóstica; C = es un método aplicable en algunas situaciones, pero su costo, laboriosidad, sensibilidad u otros factores limitan seriamente su aplicación; D = es un método no recomendable en la actualidad. Tabla subjetiva adaptada y modificada a partir de OIE (2009).

Método	Vigilancia	Diagnosis presuntiva	Diagnosis confirmativa
Signos macroscópicos (Sensibilidad muy limitada, especificidad casi nula)	D	D	D
Citología de hemolinfa (Sensibilidad limitada, especificidad muy alta a nivel de género, rápido, barato)	C	C	D
Cortes histológicos (Sensibilidad limitada, especificidad muy alta a nivel de género, lento, caro)	C	D	D
Incubación en caldo de tioglicolato de fragmentos de órganos (RFTM) (Sensibilidad alta, especificidad muy alta a nivel de género, lento, barato)	A	B	D
Incubación de toda la carne en caldo de tioglicolato (carga total de parásitos) (Sensibilidad muy alta, especificidad muy alta a nivel de género, muy laborioso, lento)	C	C	D
PCR (Sensibilidad muy alta, especificidad muy alta a nivel de especie, rápido)	B	A	B*
Hibridación in situ sobre cortes histológicos (Sensibilidad alta, especificidad muy alta a nivel de especie, muy laborioso, lento, caro)	C	B	A
Análisis de secuencias de ADN (Sensibilidad muy alta, especificidad muy alta a nivel de especie, muy laborioso, lento, caro)	D	D	B*

* Únicamente se detecta la presencia de ADN del parásito, por lo que el método ha de combinarse con otro (histología o incubación en caldo de tioglicolato) que permita detectar células del parásito.



dades inferiores a 12-15‰ se mantuvieron libres del parásito durante muchos años hasta que, tras una serie de años secos, la salinidad superó dicho límite y el parásito penetró en tales zonas. Una vez establecido en esas zonas, aun cuando la salinidad retornó a valores bajos, el parásito ha persistido incluso tolerando salinidades inferiores a 5‰ durante más de 3 meses, aunque con prevalencias e intensidades mínimas. Cuando la salinidad aumenta, la prevalencia y la intensidad de infección se incrementan.

La prevalencia y la intensidad de las infecciones por *P. marinus* también aumentan con el incremento de la temperatura, de forma que en latitudes intermedias con ciclos anuales de periodos fríos y cálidos hay un patrón estacional de variación de prevalencia e intensidad de infección, mientras que en latitudes más bajas, cálidas durante todo el año, no se ha observado tal patrón estacional en la dinámica de la infección. La dinámica estacional se ha estudiado con detalle en la Bahía de Chesapeake (EE.UU); allí cuando la temperatura sobrepasa los **20° C**, hacia el final de la primavera, la infección progresa en las ostras, alcanzándose máximos de intensidad de infección al final del verano y principios de otoño, que es cuando se registra un pico de mortalidad en la población de ostras. Las ostras infectadas muertas son fuentes de hipnoesporas, por lo que el periodo de máxima abundancia de zoosporas libres y, por tanto, de máxima probabilidad de adquirir la infección es el de final de verano y comienzos del otoño. Con la bajada de la temperatura, las infecciones adquiridas se mantienen a un nivel mínimo de intensidad de infección durante el invierno e inicio de la primavera y es al final de la primavera cuando la infección retoma la progresión. Incluso al inicio de la primavera, cuando la temperatura ya ha entrado en fase de ascenso, se ha constatado que la disminución de la prevalencia e intensidad de perkinsosis continúan disminuyendo (BURRESON y RAGONE CALVO 1996), lo que se explicaría porque la temperatura es suficientemente alta como para estimular el sistema inmune de la ostra, que elimina parásitos activamente, pero no lo suficientemente alta como para estimular la proliferación del parásito (LA PEYRE *et al.* 2008). El número de parásitos que quedan en la ostra hacia el final de la primavera es, por tanto, clave para la intensificación de la infección cuando la temperatura supere el umbral (20°



C) de proliferación de *P. marinus*. Así, los años en que el invierno y, en especial, el inicio de la primavera son menos fríos que de costumbre, las prevalencias e intensidades de infección se intensifican antes y se amplía el periodo de máxima intensidad, con lo que la mortalidad de las ostras en tales años es incluso más dramática. La influencia de la temperatura ha determinado que *P. marinus* haya colonizado latitudes cada vez más altas muy probablemente como consecuencia de una tendencia de aumento de la temperatura media del invierno ligada al calentamiento global (FORD 1996; FORD y CHINTALA 2006). En latitudes bajas como el Golfo de Méjico, en que la variación de la temperatura del agua es moderada, la dinámica de la infección (por tanto el desencadenamiento de brotes epidémicos) está marcada por la salinidad, por lo que hay una alta dependencia de la pluviosidad y por tanto una asociación marcada con el fenómeno climático de la Oscilación del Sur El Niño, que tiene una influencia decisiva sobre el clima de esa zona: durante la fase de «La Niña» la pluviosidad es menor y se favorece la proliferación del parásito (SONIAT *et al.* 2005, 2009). Sin embargo, en latitudes más altas de la costa atlántica de los EE.UU, la temperatura tiene una influencia más marcada en la dinámica de la infección, por lo que hay una asociación con el fenómeno climático de la Oscilación Noratlántica (SONIAT *et al.* 2009).

En el caso de *P. olseni*, el estudio de la dinámica de la infección por este parásito en un banco de almejas *Ruditapes decussatus* de Galicia mostró un patrón anual influido por la temperatura (VILLALBA *et al.* 2005). En la primavera, cuando la temperatura supera los **15 °C** la infección progresa registrándose un pico de intensidad; la intensidad se mantiene alta durante el verano, alcanzándose un nuevo pico hacia el final del verano o comienzos del otoño, coincidiendo con valores máximos de tasa de mortalidad de las almejas, cuando la temperatura alcanza máximos anuales (19-21 °C); con el descenso de la temperatura, hay una regresión de las infecciones, con valores mínimos de prevalencia e intensidad de infección desde el final del otoño al comienzo de la primavera (mínimo anual de 9-10 °C). Como en el caso ya mencionado de *P. marinus*, la importancia de los inviernos menos fríos como potenciadores de la proliferación de *P. olseni* ha sido sugerida por LIANG *et al.* (2008). La influencia de la salinidad en la dinámica



de la infección por *P. olseni* todavía no se ha abordado con rigor mediante estudios de campo. En el caso de la infección de las vieiras *Patinopecten yessoensis* por *P. qugwadi*, no se detectó estacionalidad, pero el parásito se mostró patogénico y con capacidad para producir zoosporas a **10 °C** (BOWER *et al.* 1998).

Estudios realizados en laboratorio han confirmado la influencia de la temperatura y la salinidad del agua en la perkinsosis. Por un lado, mediante infecciones experimentales *in vivo* se ha demostrado que ambos factores influyen en la infectividad y en la progresión de la infección por *P. marinus* en la ostra *C. virginica* (FISHER *et al.* 1992; CHU y LA PEYRE 1993 a, b; CHU *et al.* 1993; RAGONE y BURRESON 1993; CHU 1996; CHU *et al.* 1996; CHU y VOLETY 1997; LA PEYRE *et al.* 2003), así como en el caso de la progresión de la infección por *P. olseni* en la almeja *R. philippinarum* (LIANG *et al.* 2008). Por otro lado, mediante experimentos *in vitro* se ha confirmado la influencia de temperatura y salinidad en la actividad celular y viabilidad del parásito, tanto en el caso del proceso de zoosporulación de *P. marinus* (CHU y GREENE 1989) y *P. olseni* (AUZOUX-BORDENAVE *et al.* 1995; AHN y KIM 2001; CASAS *et al.* 2002a) como en el de los trofozoítos de ambas especies (BURRESON *et al.* 1994a; DUNGAN y HAMILTON 1995; GAUTHIER y VASTA 1995; O'FARRELL *et al.* 2000, LA PEYRE *et al.* 2006; 2008). La comparación de la proliferación *in vitro* de ambas especies mostró que, si bien en ambas especies la tasa de proliferación fue mayor a 28 °C que a 15 °C, la tasa de proliferación de *P. marinus* fue mayor que la de *P. olseni* a 28 °C, mientras que la de *P. olseni* fue mayor que la de *P. marinus* a 15 °C, lo que es coherente con las observaciones de campo referidas arriba. La transcendencia de temperatura y salinidad para la dinámica de la infección no sólo se debe a la influencia de ambos factores ambientales sobre la actividad y viabilidad del parásito sino también a la probada influencia de ambos factores sobre el funcionamiento del sistema inmunitario del hospedador (LA PEYRE *et al.* 2008; CHU y LA PEYRE 1993 a, b; ANDERSON 1996).

6.2. Influencia de factores estresantes

La progresión de la infección por *P. marinus* en ostras se acentúa por la degradación de la calidad del agua (contaminación) y destrucción del hábitat (métodos de extracción de ostra agresivos) (ANDERSON



et al. 1996; CHU y HALE 1994). También en el caso de la infección de almejas por *P. olsenii* se ha constatado que en las zonas más afectadas por la actividad humana se favorece el avance de la infección (LEITE et al. 2004). La elevada mortalidad de almejas *R. decussatus* registrada en el Algarve (S. de Portugal) ha sido achacada a la infección por *P. olsenii* (AZEVEDO 1989), a la contaminación (BEBIANNO 1995) y a la situación de hipoxia (SOBRAL y WIDDOWS 1997); probablemente los tres factores contribuyen de forma sinérgica a la mortandad. ANDERSON et al. (1998) también sugirieron que la contaminación por TBT, la hipoxia y la infección por *P. marinus* contribuyeron de forma sinérgica a una mortandad de ostras. HOFMANN et al. (1995) y POWELL et al. (1996) enfatizaron el papel de los factores que determinan el estado nutricional de la ostra (disponibilidad de alimento y factores que influyen en la ingestión de alimento) en la progresión de la infección por *P. marinus*. La debilidad del hospedador tras la puesta puede facilitar también la progresión de la perkinsosis.

6.3. Influencia de la edad

La mayor prevalencia de *P. marinus* en ostras adultas que en juveniles en un mismo área fue explicada por la mayor tasa de filtración y la exposición más prolongada al parásito de las adultas, lo que aumenta la probabilidad de adquirir la infección (BURRESON y RAGONE CALVO 1996; SONIAT 1996; POWELL et al. 1996). También se constató la asociación entre la prevalencia y la intensidad de infección por *P. olsenii* y la edad de las almejas *R. decussatus* de un banco natural, de forma que no se detectó el parásito en almejas menores de un año mientras que todas las mayores de 3 años estaban infectadas (VILLALBA et al. 2005). Una asociación similar se constató en un estudio sobre almejas *R. phillipinarum* de Corea, al no detectar ninguna infección en almejas menores de 15 mm y encontrar infectadas casi el 100% de las almejas mayores de 20 mm.

6.4. Modelos predictivos

Se han desarrollado varios modelos que simulan la dinámica de la infección de *P. marinus* incorporando los factores que la influyen (HOFMANN et al. 1995; POWELL et al. 1996; SONIAT y KORTRIGHT 1998; RAGO-



NE CALVO *et al.* 2000). Estos modelos pueden ser herramientas predictivas útiles para gestionar los bancos afectados tratando de minimizar las pérdidas por la enfermedad.

7. CULTIVO *IN VITRO* DEL PARÁSITO

La disponibilidad de células del parásito que proporcionan los cultivos *in vitro* ha posibilitado desarrollar experimentación crucial para conocer la biología, fisiología, bioquímica, genética del parásito, sus mecanismos de patogenicidad y comprender la interacción con el hospedador. Una limitación la marca el que la virulencia de las células que proliferan *in vitro* es menor que la de las aisladas del hospedador (BUSHEK *et al.* 1997; BUSHEK *et al.* 2002b; FORD *et al.* 2002). El medio de cultivo JL-ODRP-1 (LA PEYRE *et al.* 1993) que se asemeja a la composición del plasma de la ostra, se usó para propagar *P. marinus* y *P. chesapeakei* (LA PEYRE *et al.* 1993; McLAUGHLIN y FAISAL 1998). Con el medio de cultivo JL-ODRP-2, derivado del anterior, se establecieron cultivos de *P. olseni* (CASAS *et al.* 2002b) y *P. mediterraneus* (CASAS *et al.* 2008). El medio comercial DME: Ham's F-12 con varios suplementos nutritivos se usó para cultivar *P. marinus* (GAUTHIER y VASTA 1993, 1995; GAUTHIER *et al.* 1995), *P. chesapeakei* (COSS *et al.* 2001; BURRESON *et al.* 2005), *P. olseni* (CASAS *et al.* 2002b; ROBLEDO *et al.* 2002; DUNGAN *et al.* 2007), *P. honshuensis* (DUNGAN y REECE 2006) y *P. beihaiensis* (MOSS *et al.* 2008). *P. marinus* también se ha cultivado en medio Leibowitz's L-15 con suplementos (KLEINSCHUSTER y SWINK 1993). LA PEYRE y FAISAL (1996, 1997) formularon medios sin proteínas para cultivos *P. marinus* con los que estudiar las proteínas liberadas por el parásito al medio. Como fuente de inóculo en los cultivos se han usado diferentes órganos infectados del hospedador, como corazón, ganglio visceral, hemolinfa y branquias, mientras que en otros casos se han utilizado hipnoesporas derivadas de la incubación de tejidos infectados en caldo de tioglicolato. La *American Type Culture Collection* (ATTC) mantiene cultivos congelados de todas las especies mencionadas que están a disposición de los investigadores.

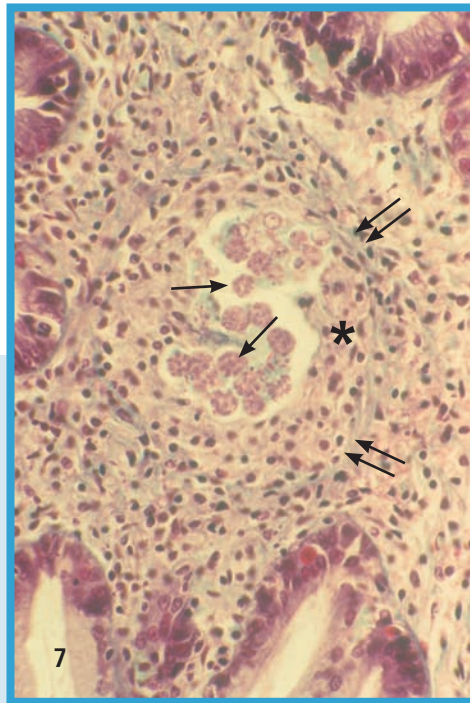
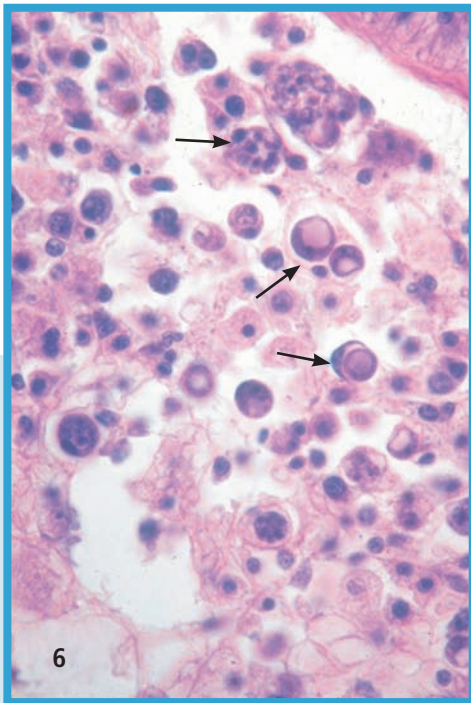
Dado que un mismo hospedador puede estar infectado por más de una cepa de una especie de *Perkinsus* o incluso por dos especies



diferentes del género (KOTOB *et al.* 1999a, b; DUNGAN y REECE 2006), la capacidad de producir cultivos clónicos es esencial cuando se requiere que todas las células sean genéticamente idénticas. Se han establecido cultivos clónicos mediante el aislamiento individual de células por diluciones sucesivas, de forma que cada célula aislada origina un clon al proliferar (GAUTHIER y VASTA 1995). Otro método de clonación conlleva el aislamiento de células individuales por micromanipulación y su mantenimiento sobre una membrana colocada por encima de células que se dividen activamente, de forma que los productos liberados por las células que proliferan se difunden a través de la membrana y estimulan la proliferación de la célula aislada (BUSHEK *et al.* 2000). Sea cual sea el método de aislamiento, la adición de factores de crecimiento y hormonas puede estimular la proliferación de las células aisladas y acelerar la obtención de cultivos clónicos (CASAS y LA PEYRE 2009).

8. INTERACCIÓN HOSPEDADOR-PARÁSITO

La observación de cortes histológicos de moluscos afectados por perkinsosis pone de manifiesto, en mayor o menor medida, una respuesta inmunitaria del hospedador frente al parásito que supone la concentración de hemocitos en las áreas en las que el parásito está presente. En el caso de las ostras *C. virginica*, un porcentaje elevado de las células de *P. marinus*, tanto aisladas como en división, aparecen fagocitadas en el interior de hemocitos (Fig. 6); sin embargo, las células fagocitadas del parásito en su mayoría no son destruidas sino que se desarrollan y pueden destruir el hemocito (MACKIN 1951). Células de *P. beihaiensis* aisladas y en división sin daño aparente se observaron también fagocitadas por hemocitos en los tejidos de las ostras *C. hongkongensis* y *C. ariakensis* (MOSS *et al.* 2008). En cambio, es la encapsulación de las células del parásito por parte de hemocitos (Fig. 7), en lugar de la fagocitosis, la reacción predominante en el caso de almejas *R. decussatus*, *R. philippinarum* y *Mya arenaria* (CHAGOT *et al.* 1987; NAVAS *et al.* 1992; MONTES *et al.* 1995a; SAGRISTÀ *et al.* 1995; MONTES *et al.* 1996; ORDÁS *et al.* 2001; PARK y CHOI 2001; CHOI *et al.* 2002), orejas de mar *Haliotis* spp. (GOGGIN y LETSER 1995) y vieiras *P. yessoensis* (BOWER *et al.* 1998) frente a la especie correspondiente de



FIGS. 6 Y 7.

Respuesta hemocitaria de ostra y almeja ante *Perkinsus* spp. **Fig. 6.** Corte histológico de la masa visceral de una ostra americana *Crassostrea virginica* mostrando hemocitos (flechas) que han fagocitado *Perkinsus marinus*. **Fig. 7.** Corte histológico de la masa visceral de una almeja *Ruditapes decussatus* mostrando un foco de proliferación de *Perkinsus olseni* (flechas) rodeado por varias capas de hemocitos (*) y fibras conjuntivas (pares de flechas) correspondientes a una reacción de encapsulación del parásito por parte del hospedador.

Perkinsus, llegándose a observar hasta varias decenas de parásitos en un único foco de encapsulación hemocitaria. Aun siendo obvia la respuesta inmunitaria, ésta es ineficaz en muchos casos pues la infección progresa en el hospedador. Esto justifica los numerosos estudios realizados sobre la interacción entre el hospedador y el parásito. La mayor parte de estos estudios se han centrado en el modelo *C. virginica*-*P. marinus*, mientras que una fracción pequeña corresponde a la interacción entre almejas y *P. olseni* (revisado por SOUDANT et al. 2008).



8.1. Perkinsosis y el sistema inmunitario del hospedador

Numerosos estudios han evaluado la asociación de la perkinsosis con parámetros inmunitarios del hospedador. Con frecuencia los resultados han sido contradictorios entre estudios, lo que dificulta extraer conclusiones. La complejidad de la interpretación de este tipo de resultados se explica en parte por la notable influencia de factores ambientales sobre los parámetros del sistema inmunitario de los moluscos (FENG y CANZONNIER 1970; STEINERT y PICKWELL 1985; FISHER y NEWELL 1986; CHU 1988; FISHER y TAMPLIN 1988; CHU y LA PEYRE 1993b; CHU 2000; DA SILVA *et al.* 2008a).

8.1.1. Hemograma

Se ha observado que el número de hemocitos en la hemolinfa tiende a aumentar en las ostras infectadas con *P. marinus* (ANDERSON *et al.* 1992, 1995; CHU y LA PEYRE 1993b; LA PEYRE *et al.* 1995a, b), mientras que en almejas infectadas por *P. olsenii* se ha detectado la tendencia contraria (ORDÁS *et al.* 2000; CASAS 2002). El aumento notable de hemocitos que se infiltran en los tejidos de áreas infectadas podría justificar la disminución de los hemocitos circulantes en la hemolinfa (CASAS 2002).

8.1.2. Actividad fagocítica

Se ha constatado que el porcentaje de células de la hemolinfa que son capaces de fagocitar partículas disminuye tanto en las ostras infectadas por *P. marinus* (LA PEYRE *et al.* 1995b; GOEDKEN *et al.* 2005) como en las almejas infectadas por *P. olsenii* (ORDÁS *et al.* 2000), aunque en otros estudios no se detectó un efecto significativo de *P. olsenii* en las almejas (HÉGARET *et al.* 2007; DA SILVA *et al.* 2008b). Es destacable el que los hemocitos de *C. virginica* mostrasen una mayor capacidad de fagocitar células de *P. marinus* que los hemocitos de *C. gigas*, una ostra más tolerante a la infección (GAUTHIER y VASTA 2002).

8.1.3. Lectinas

Varios estudios han demostrado que la infección por *P. olsenii* induce la producción de varios tipos de lectinas con distintas especificidades en la almeja *R. philippinarum* que se han caracterizado de-

talladamente (BULGAKOV *et al.* 2004; KIM *et al.* 2006; KANG *et al.* 2006; KIM *et al.* 2008 a, b). Estas lectinas tienen especificidad para ligarse a diferentes azúcares de la superficie celular del parásito y juegan un papel fundamental en su reconocimiento como cuerpo extraño frente al que hay que reaccionar. El conjunto de lectinas expresadas frente a la infección por *P. olseni* es diferente al resultante de la exposición a *Vibrio tapetis* (bacteria responsable de la enfermedad del anillo marrón en la almeja) (KANG *et al.* 2006) lo que demuestra especificidad en la respuesta. KANG *et al.* (2008) comprobaron que una de estas lectinas está asociada a una proteasa que, a su vez, podría jugar un papel en la defensa frente al parásito. En el caso de la ostra *C. virginica*, (GAUTHIER *et al.* 2004) comprobaron la presencia en la superficie celular de *P. marinus* de azúcares a los que se ligan lectinas que habían sido previamente caracterizadas en la ostra (VASTA *et al.* 1982; VASTA *et al.* 1984), lo que sugería la implicación de las lectinas en el reconocimiento del parásito. TASUMI y VASTA (2007) demostraron que la infección por *P. marinus* induce la movilización de una lectina hacia la superficie de los hemocitos de *C. virginica*, facilitando el reconocimiento del parásito y promoviendo su fagocitosis.

8.1.4. Producción de especies reactivas de oxígeno

El proceso de producción de especies reactivas de oxígeno (radicales tóxicos), que está asociado a la fagocitosis de patógenos por los hemocitos y que contribuye a la degradación de los patógenos fagocitados, se inhibe cuando los hemocitos de *C. virginica* se enfrentan a células vivas de *P. marinus* (LA PEYRE *et al.* 1995c; VOLETY y CHU 1995; ANDERSON 1999a, b; SCHOTT *et al.* 2003a). Esta inhibición permite que el parásito se mantenga vivo dentro de los hemocitos de la ostra. En cambio, no se ha encontrado un efecto significativo de *P. olseni* en la producción de especies reactivas de oxígeno por los hemocitos de la almeja *R. philippinarum* (HÉGARET *et al.* 2007; DA SILVA *et al.* 2008b).

8.1.5. Producción de óxido nítrico

VILLAMIL *et al.* (2007) constataron que *P. marinus* induce un aumento en la producción de óxido nítrico por los hemocitos de *C. virginica*; la producción de óxido nítrico está asociada a la fagocitosis de patógenos



por los hemocitos, contribuyendo a la degradación de los patógenos fagocitados. Los autores sugirieron que el óxido nítrico contribuye a destruir *P. marinus* en las primeras etapas de infección, aunque de algún modo el parásito supera esa fase y la infección progresa. Constataron que aunque el óxido nítrico inhibe parcialmente la proliferación *in vitro* del parásito, éste muestra cierta resistencia, si bien los mecanismos de resistencia de *P. marinus* al óxido nítrico no se conocen.

8.1.6. Apoptosis

La apoptosis o muerte celular programada, es un recurso que los organismos pueden utilizar para impedir la proliferación de patógenos intracelulares pues, a diferencia de lo que ocurre con la necrosis, las células al morir no liberan el patógeno, tratando de evitar su proliferación. *P. marinus* parece que inhibe la apoptosis de los hemocitos de *C. virginica*, lo que facilita su proliferación (SUNILA y LABANCA 2003): En cambio, no se ha encontrado un efecto significativo de *P. olseni* sobre la apoptosis de hemocitos de la almeja *R. philippinarum* (HÉGARET *et al.* 2007; DA SILVA *et al.* 2008b).

8.1.7. Polipéptido anti-Perkinsus

En la respuesta inflamatoria de las almejas *R. philippinarum* y *R. decussatus* frente a *P. olseni*, cuando los hemocitos se disponen rodeando al parásito, los granulocitos se diferencian en granulocitos secretores que sintetizan un polipéptido ligeramente glucosilado, con un peso molecular de 225 kDa. Este polipéptido (p225) se almacena en gránulos y es liberado acumulándose y formando una cápsula en torno al parásito (MONTES *et al.* 1995a, 1996). El polipéptido no se sintetiza en almejas no infectadas o bien expuestas a otros microorganismos como algas o bacterias (MONTES *et al.* 1995b, 1996, 1997), por lo que se puede considerar una respuesta específica a la infección por *P. olseni*. No se conoce con exactitud la eficacia con que las células del parásito son eliminadas por este proceso, pero de esta forma podría evitarse la diseminación del parásito a través del sistema circulatorio. No obstante, la acumulación de hemocitos a veces es tan intensa que podría llegar a obliterar los senos sanguíneos con consecuencias fatales (MONTES *et al.* 1995a).

8.1.8. Actividad citocida en el plasma

Se comprobó que la actividad anti-*P. marinus* presente en el plasma de la hemolinfa fue muy superior en moluscos resistentes a la perkinsosis que en *C. virginica* (ANDERSON y BEAVEN 2001b); los autores sugirieron que esta actividad sería dependiente (al menos en parte) de moléculas diferentes a la lisozima o péptidos antimicrobianos. GAUTHIER y VASTA (2002) también constataron que el plasma de especies de bivalvos poco o nada susceptibles a la perkinsosis inhibe la proliferación *in vitro* de *P. marinus* de forma mucho más efectiva que el de *C. virginica*.

8.1.9. Lisozima

Las lisozimas son enzimas con actividad antibacteriana, aunque también se les ha conferido actividad antifúngica y antiprotozoaria. En los bivalvos está presente en muchos órganos, hemocitos circulantes y plasma de la hemolinfa (ITOY *et al.* 2007). No se ha encontrado información sobre si la lisozima tiene efecto en parásitos del género *Perkinsus*. El efecto de la perkinsosis en los niveles de lisozima del plasma del hospedador es controvertido, pues en algunos estudios no se encontró efecto significativo en el caso de *C. virginica* y *P. marinus* (CHU y LA PEYRE 1989, 1993 a, b; CHU *et al.* 1993) ni tampoco en el caso de *P. olseni*-*R. decussatus* (ORDÁS *et al.* 2000; CASAS 2002), mientras que LA PEYRE *et al.* (1995b) detectaron una ligera disminución de la concentración de lisozima en el suero de *C. virginica* infectada por *P. marinus* y CHU y LA PEYRE (1993b) observaron un incremento.

8.1.10. Fenoloxidasa

La fenoloxidasa es una enzima cuya implicación en las reacciones de defensa de los artrópodos frente a patógenos se conoce desde hace tiempo, así como los mecanismos a través de los que actúa. Sin embargo, apenas se conocen los mecanismos por los que esta enzima está implicada en el sistema inmunitario de los moluscos bivalvos, si bien los estudios realizados sobre la relación entre esta enzima y la parasitación de la ostra australiana *Saccostrea glomerata* por el protozoo *Marteilia sydneyi* (enfermedad QX) sugieren un papel crucial de la fenoloxidasa en la tolerancia a dicha enfermedad (NEWTON *et al.* 2004,



BUTT y RAFTOS 2007; 2008). Se desconoce si la fenoloxidasa juega un papel importante en la reacción frente a la perkinsosis; por un lado se comprobó que *P. marinus* inhibía *in vitro* la actividad fenoloxidasa de la hemolinfa de ostras *C. virginica* (JORDAN y DEATON 2005), mientras que se registraron niveles más altos de esta enzima en los hemocitos y plasma de almejas *R. decussatus* con infecciones ligeras y moderadas por *P. olsenii* que en las almejas no infectadas MUÑOZ *et al.* 2006).

8.1.11. Actividad antiproteasa en el plasma

Como se comenta más abajo, la liberación de proteasas es uno de los factores de virulencia de *Perkinsus*. Se ha demostrado la existencia de actividad inhibitoria de las proteasas liberadas por el parásito en el plasma de la ostras *C. virginica* infectadas por *P. marinus* (FAISAL *et al.* 1998; OLIVER *et al.* 1999), existiendo una correlación negativa entre la actividad inhibitoria de las proteasas del parásito y la intensidad de infección (OLIVER *et al.* 2000). La ostra *C. gigas* que es menos susceptible a *P. marinus*, muestra actividad antiproteasa en el plasma significativamente más alta que *C. virginica* (FAISAL *et al.* 1999b). XUE *et al.* (2006) han purificado del plasma de *C. virginica* y caracterizado una proteína inhibidora de proteasas, a la que han denominado cvSI-1; esta proteína inhibe la perkinsina, que es la proteasa mayoritaria liberada por *P. marinus*, y la subtilisina, proteasa producida por *Bacillus licheniformis*, entre otras proteasas serínicas.

8.1.12. Genes implicados en la respuesta inmunitaria

Un planteamiento cada vez más utilizado para obtener una visión amplia de la respuesta inmune de moluscos bivalvos frente a infecciones es el análisis de los genes cuya expresión se inhibe o se potencia ante la infección. Mediante hibridación sustractiva supresiva se han identificado genes cuya expresión está regulada (inhibida o potenciada) en *C. virginica* y *C. gigas* frente a la infección por *P. marinus* (TANGUY *et al.* 2004), en *R. philippinarum* frente a la infección por *P. olsenii* (KANG *et al.* 2006) y en *R. decussatus* frente a *P. olsenii* (PRADO-ÁLVAREZ *et al.* 2009). El número de secuencias de genes conocidas, bien completas o incompletas, pertenecientes a bivalvos susceptibles a la perkinsosis está creciendo en los últimos años; la disponibilidad de

secuencias de genes permite evaluar, mediante la técnica de rtPCR, en qué medida su expresión está influenciada por la perkinsosis. La identificación de genes implicados en la respuesta a la perkinsosis podría permitir usar genes marcadores de tolerancia/resistencia en programas de selección genética para obtener estirpes tolerantes o resistentes a la enfermedad. Mediante una estrategia diferente, usando marcadores neutros (AFLP) y comparando el genoma de dos familias de *C. virginica* antes y después de que *P. marinus* ocasionase mortandad, Yu y Guo (2006) han identificado en el genoma de la ostra una serie de loci asociados muy probablemente a la tolerancia a la infección por *P. marinus*. Con una estrategia similar, SOKOLOVA *et al.* (2006) detectaron dos loci en el genoma de *C. virginica* asociados a tolerancia frente a *P. marinus*.

8.2. Supervivencia del parásito en el hospedador y factores de virulencia

El parásito cuenta con mecanismos que le permiten sobrevivir y proliferar dentro del hospedador a pesar de que el hospedador trata de impedirlo mediante el sistema inmunitario.

8.2.1. Actividad antioxidante

Como se ha comentado arriba, la producción de especies reactivas de oxígeno asociada a la fagocitosis se inhibe cuando los hemocitos de *C. virginica* se enfrentan a *P. marinus*. Además, se comprobó que *P. marinus* tolera la exposición *in vitro* a especies reactivas de oxígeno, en concreto el ion superóxido y el peróxido de hidrógeno (SCHOTT *et al.* 2003a). Todo ello sugiere que el parásito ha desarrollado mecanismos para evitar el daño oxidativo mediante la anulación de la síntesis y/o la eliminación de los radicales tóxicos (detoxificación). VOLETY y CHU (1997) detectaron niveles altos de fosfatasa ácida en los productos extracelulares de *P. marinus*; esta enzima podría actuar desfosforilando enzimas como la NADPH oxidasa, bloqueando así la cascada de producción de especies reactivas de oxígeno. Una de las rutas de detoxificación de *P. marinus* conlleva la dismutación del ion superóxido a oxígeno molecular y peróxido de hidrógeno mediante la superóxido dismutasa; se han purificado y caracterizado dos superóxido dismutasas con hierro como cofactor de *P. marinus* (AHMED *et al.* 2003; ASOJO *et*



al. 2006), sus genes se han identificado y caracterizado (WRIGHT *et al.* 2002; SCHOTT y VASTA 2003; SCHOTT *et al.* 2003b) y se ha determinado su localización subcelular (SCHOTT y VASTA 2003; FERNÁNDEZ-ROBLEDO *et al.* 2008a). Por otro lado, se ha demostrado la actividad peroxidasa dependiente de ascorbato en *P. marinus*; esta enzima podría eliminar el peróxido de hidrógeno (SCHOTT *et al.* 2003a).

8.2.2. Secreción de proteasas

Tan pronto como se pudo contar con cultivos *in vitro* del parásito, los productos liberados por las células cultivadas fueron objeto de estudio. Aunque se han detectado múltiples actividades líticas en los productos extracelulares (CASAS *et al.* 2002c), los estudios se han enfocado mayoritariamente sobre la actividad proteolítica detectada, con capacidad para degradar proteínas del hospedador (LA PEYRE *et al.* 1995c; FAISAL *et al.* 1999a), lo que favorece la invasión y propagación por los tejidos del hospedador y puede facilitar la disponibilidad de nutrientes (LA PEYRE *et al.* 1996). Se constató que las proteasas liberadas *in vitro* por *P. marinus* inhibían funciones inmunitarias de *C. virginica*, como la movilidad de los hemocitos, la actividad lisozima, la aglutinación (GARREIS *et al.* 1996), y la actividad vibriocida de los hemocitos (TALL *et al.* 1999). Tanto la progresión de la infección *in vivo* como la proliferación *in vitro* de *P. marinus* se ven inhibidas por la bacitracina (un inhibidor de proteasas), lo que apoya la consideración de las proteasas de *P. marinus* como factor de virulencia (FAISAL *et al.* 1999b). El análisis de las proteasas liberadas *in vitro* por *P. marinus* mostró que pertenecen a la clase de proteasas serínicas del tipo quimotripsina, confiriendo el nombre de perkinsina a la más abundante (FAISAL *et al.* 1999a). BROWN y REECE (2003) identificaron un gen en el genoma de *P. marinus* correspondiente a una proteasa cuya secuencia es muy próxima a la de la familia de proteasas serínicas del tipo subtilisina. No se conoce apenas la actividad enzimática de los productos extracelulares de otras especies de *Perkinsus*. En el caso de *P. olseni* no se detectó actividad proteasa de tipo tripsina o quimotripsina, aunque sí se detectaron otras actividades líticas de tipo esterasa, glucosidasa y fosfatasa (CASAS *et al.* 2002c). Tampoco se detectó actividad proteolítica en el caso de *P. chesapeakei* (McLAUGHLIN *et al.* 2000). *Perkinsus mediterranea*



neus es la única especie en la que se han detectado proteasas además de en *P. marinus* (CASAS *et al.* 2008).

8.2.3. Aspectos del metabolismo

En los últimos años se han desarrollado estudios sobre el metabolismo de algunas especies de *Perkinsus* para entender cómo sobrevive el parásito en el hospedador, su patogenicidad y, en otros casos, buscando vías para atacar al parásito mediante medidas terapéuticas. *P. marinus* tiene capacidad para sintetizar fosfolípidos y adquirir y metabolizar lípidos del hospedador (CHU *et al.* 2000, LUND y CHU 2002; CHU *et al.* 2003). A diferencia de otros protozoos parásitos, *P. marinus* sintetiza un amplio rango de ácidos grasos poliinsaturados (SOUDANT y CHU 2001, CHU *et al.* 2002) incluido el ácido araquidónico; este último lo sintetiza a través de una vía inusual (CHU *et al.* 2004; VENEGAS-CALERÓN *et al.* 2007). *P. marinus* utiliza probablemente la ruta de la ácido graso sintetasa tipo II para sintetizar ácidos grasos (LUND *et al.* 2005), mientras que no es capaz de sintetizar esteroides y ha de tomarlos del hospedador (LUND *et al.* 2007). No se ha investigado si, como ocurre en otros protozoos parásitos, algunos metabolitos asociados a estas rutas tienen implicaciones en la virulencia de *P. marinus*. Este parásito sintetiza isoprenoides a través de la ruta independiente del mevalonato (STELTER *et al.* 2007). Las rutas del shikimato y del folato que están implicadas en la síntesis de vitamina B9, una coenzima para la síntesis de DNA/RNA, se han identificado en *P. olseni* (ELANDALLOUSI *et al.* 2005). LEITE *et al.* (2008) han caracterizado los genes de prolil hidroxilasas implicadas en la tolerancia a la hipoxia presentes en el genoma de *P. olseni*, comprobando que su expresión se incrementa de forma considerable en presencia de la hemolinfa del hospedador *R. decussatus*, lo que sugiere la implicación de las prolil hidroxilasas asociadas a la tolerancia a la hipoxia en los mecanismos de infección.

8.2.4. Genes del parásito implicados en virulencia

Hay en marcha un proyecto de secuenciación del genoma de *P. marinus*, desarrollado conjuntamente por el *J Craig Venter Institute* y el *Center for Marine Biotechnology* de la Universidad de Maryland (EE.UU). Parte de la información generada se puede consultar en la



dirección web <http://www.tigr.org/tdb/e2k1/pmg/>. En cualquier caso ya se han dado pasos en la caracterización de genes del parásito implicados en virulencia y supervivencia, como es el caso de los genes de superóxido dismutasas (WRIGHT *et al.* 2002; SCHOTT y VASTA, 2003; SCHOTT *et al.* 2003b) y proteasas (BROWN y REECE 2003) de *P. marinus* y prolil hidroxilasas asociadas a la tolerancia a hipoxia de *P. olsenii* (LEITE *et al.* 2008). Se han identificado una serie de genes de *P. olsenii* cuya expresión se potencia con el enfrentamiento del parásito a la hemolinfa de la almeja *R. decussatus* (ASCENSO *et al.* 2007). La expresión de genes de *P. olsenii* frente a la hemolinfa de bivalvos susceptibles y no susceptibles se ha estudiado mediante un *macroarray* (ASCENSO *et al.* 2009). Por otro lado, se ha puesto a punto un procedimiento de transfección de genes para *P. marinus* que facilitará el estudio de la regulación y expresión de genes (FERNÁNDEZ-ROBLEDO *et al.* 2008b).

8.3. Efectos de la enfermedad en la fisiología del hospedador

Los estudios sobre los efectos de la perkinsosis en la fisiología del hospedador se restringen a *P. marinus* y, en menor medida, *P. olsenii*. Por lo que se refiere a la fisiología energética del hospedador, CHOI *et al.* (1989) concluyeron que en ostras *C. virginica* de tamaño grande con infecciones intensas por *P. marinus*, el enorme número de parásitos consumen más energía de la que la ostra necesita para satisfacer su propia demanda del metabolismo basal, por lo que el balance energético es negativo para el hospedador. Sin embargo, en ostras jóvenes, de menor tamaño, la respiración consume una fracción más pequeña del suministro energético, de forma que el impacto neto de *P. marinus* en el balance energético de la ostra es menor. Usando las mismas estimaciones del consumo energético del parásito que CHOI *et al.* (1989), CASAS (2002) concluyó que, de acuerdo con el número de células de *P. olsenii* presentes en los tejidos de almejas *R. decussatus* con infecciones intensas, el consumo energético del parásito sobrepasa la energía necesaria para mantener el metabolismo basal del hospedador, lo que se agudiza en condiciones de temperatura elevada y escasez de alimento, frecuentes en verano, que es cuando se intensifican las infecciones. No se ha detectado ningún efecto significativo



de *P. marinus* en la tasa de aclaramiento, eficiencia de absorción y consumo de oxígeno de *C. virginica* (NEWELL *et al.* 1994; PAYNTER 1996; WILLSON y BURNETT 2000), mientras que la tasa de aclaramiento tiende a disminuir y a aumentar el consumo de oxígeno en almejas *R. decussatus* con infecciones intensas por *P. olseni*, sin que se hayan detectado efectos en la eficiencia de absorción (CASAS 2002). El desequilibrio energético ocasionado por la perkinsosis intensa ha de contribuir a la reducción del crecimiento detectada en ostras *C. virginica* infectadas por *P. marinus* (ANDREWS 1961) y a la pérdida de condición observada en *C. virginica* (ANDREWS 1961; CRAIG *et al.*, 1989; CROSBY y ROBERTS 1990; PAYNTER y BURRESSON 1991; DITTMAN *et al.* 2001) y en almejas *R. decussatus* (CASAS 2002; LEITE *et al.* 2004) infectadas por *P. marinus* y *P. olseni* respectivamente.

Otra de las disfunciones causadas por la perkinsosis avanzada afecta a la gametogénesis, con lo que se reduce el potencial reproductivo de *C. virginica* (KENNEDY *et al.* 1995; DITTMAN *et al.* 2001), *R. decussatus* (CASAS 2002) y *R. philippinarum* (PARK *et al.* 2006a). Un efecto más de la perkinsosis *P. olseni* es la disminución de la capacidad defensiva del hospedador frente a otros patógenos; así MONTES *et al.* (2001) detectaron que *P. olseni* favorece el desarrollo de infecciones oportunistas por virus y bacterias en la almeja *R. philippinarum*. También se ha detectado que los efectos de modulación del sistema inmunitario de *R. philippinarum* producido por algas tóxicas se intensifican por infecciones avanzadas de *P. olseni* (HÉGARET *et al.* 2009).

9. REFERENCIAS

- ABOLLO, E., S. M. CASAS, G. CESCHIA y A. VILLALBA, 2006 Differential diagnosis of *Perkinsus* species by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism assay. *Molecular and Cell Probes* **20**: 323-329.
- AHMED, H., E. J. SCHOTT, J. D. GAUTHIER y G. R. VASTA, 2003 Superoxide dismutases from the oyster parasite *Perkinsus marinus*: purification, biochemical characterization, and development of a plate microassay for activity. *Analytical Biochemistry* **318**: 132-141.
- AHN, K. J. y K. H. KIM, 2001 Effect of temperature and salinity on *in vitro* zoosporulation of *Perkinsus* sp. in Manila clams *Ruditapes philippinarum*. *Diseases of Aquatic Organisms* **48**: 43-46.



- ALMEIDA, M., F. BERTHE, A. THÉBAULT y M. T. DINIS, 1999 Whole clam culture as a quantitative diagnostic procedure of *Perkinsus atlanticus* (Apicomplexa, Perkinsea) in clams *Ruditapes decussatus*. *Aquaculture* **177**: 325-332.
- ANDERSON, R. S., 1996 Interactions of *Perkinsus marinus* with humoral factors and hemocytes of *Crassostrea virginica*. *Journal of Shellfish Research* **15**: 127-134.
- ANDERSON, R. S., 1999a *Perkinsus marinus* secretory products modulate superoxide anion production by oyster (*Crassostrea virginica*) haemocytes. *Fish and Shellfish Immunology* **9**: 51-60.
- ANDERSON, R. S., 1999b Lack of hemocyte chemiluminescence stimulation by *Perkinsus marinus* in eastern oysters *Crassostrea virginica* with Dermo disease. *Journal of Aquatic Animal Health* **11**: 179-182.
- ANDERSON, R. S. y A. E. BEAVEN, 2001 Antibacterial activities of oyster (*Crassostrea virginica*) and mussel (*Mytilus edulis* and *Geukensia demissa*) plasma. *Aquatic Living Resources* **14**: 343-349.
- ANDERSON, R. S., K. T. PAYNTER y E. M. BURRESON, 1992 Increased reactive oxygen intermediate production by hemocytes withdrawn from *Crassostrea virginica* infected with *Perkinsus marinus*. *Biological Bulletin* **183**: 476-481.
- ANDERSON, R. S., E. M. BURRESON y K. T. PAYNTER, 1995 Defense responses of hemocytes withdrawn from *Crassostrea virginica* infected with *Perkinsus marinus*. *Journal of Invertebrate Pathology* **66**: 82-89.
- ANDERSON, R. S., M. A. UNGER y E. M. BURRESON, 1996 Enhancement of *Perkinsus marinus* disease progression in TBT-exposed oysters (*Crassostrea virginica*). *Marine Environmental Research* **42**: 177-180.
- ANDERSON, R. S., L. L. BRUBACHER, L. RAGONE CALVO, M. A. UNGER y E. M. BURRESON, 1998 Effects of tributyltin and hypoxia on the progression of *Perkinsus marinus* infections and host defence mechanisms in oyster, *Crassostrea virginica* (Gmelin). *Journal of Fish Diseases* **21**: 371-380.
- ANDREWS, J. D., 1961 Measurement of shell growth in oysters by weighing in water. *Proceedings of the National Shellfisheries Association* **52**: 1-11.
- ANDREWS, J. D., 1988 Epizootiology of the disease caused by the oyster pathogen *Perkinsus marinus* and its effects on the oyster industry. *American Fisheries Society Special Publication* **18**: 47-63.
- ASCENSO, R. M. T., R. B. LEITE, R. AFONSO y M. L. CANCELA, 2007 Suppression-subtractive hybridization: A rapid and inexpensive detection methodology for up-regulated *Perkinsus olseni* genes. *African Journal of Biochemistry Research* **3**: 024-028.



- ASCENSO, R. M. T., R. B. LEITE, R. AFONSO y M. L. CANCELA, 2009 Expression pattern of *Perkinsus olseni* in response to bivalves with different susceptibility to perkinsiosis. *Journal of Fish Diseases* **32**: 633-636.
- ASOJO, O. A., E. J. SCHOTT, G. R. VASTA y A. M. SILVA, 2006 Structures of PmSOD1 and PmSOD2, two superoxide dismutases from the protozoan parasite *Perkinsus marinus*. *Acta Crystallographica Section F Structural Biology and Crystallization Communications* **62**:1072-1075.
- AUDEMARD, C., K. S. REECE y E. M. BURRESON, 2004 Real-time PCR for detection and quantification of the protistan parasite *Perkinsus marinus* in environmental waters. *Applied and Environmental Microbiology* **70**: 6611-6618.
- AUDEMARD, C., R. B. CARNEGIE y E. M. BURRESON, 2004 Shellfish tissues evaluated for *Perkinsus* spp. using the Ray's fluid thioglycollate medium culture assay can be used for downstream molecular assays. *Diseases of Aquatic Organisms* **80**: 235-239.
- AUZOUX-BORDENAVE, S., A. M. VIGARIO, F. RUANO, I. DOMART-COULON y D. DOUMENC, 1995 *In vitro* sporulation of the clam pathogen *Perkinsus atlanticus* (Apicomplexa, Perkinsea) under various environmental conditions. *Journal of Shellfish Research* **14**: 469-475.
- AZEVEDO, C., 1989 Fine structure of *Perkinsus atlanticus* n. sp. (Apicomplexa, Perkinsea) parasite of the clam *Ruditapes decussatus* from Portugal. *Journal of Parasitology* **75**: 627-635.
- BAIRD, K. y G. ROESIJADI, 2005 Analysis of *Perkinsus marinus* in *Crassostrea virginica* using real-time polymerase chain reaction. *Journal of Shellfish Research* **24**: 640.
- BEBIANNO, M. J., 1995 Effects of pollutants in the Ria Formosa Lagoon, Portugal. *Science of the Total Environment* **171**: 107-115.
- BLACKBOURN, J., S. M. BOWER y G. R. MEYER, 1998 *Perkinsus qugwadi* sp. nov. (incertae sedis), a pathogenic protozoan parasite of Japanese scallops, *Patinopecten yessoensis*, cultured in British Columbia, Canada. *Canadian Journal of Zoology* **76**: 942-953.
- BOWER, S. M., J. BLACKBOURN y G. R. MEYER, 1998 Distribution, prevalence, and pathogenicity of the protozoan *Perkinsus qugwadi* in Japanese scallops, *Patinopecten yessoensis*, cultured in British Columbia, Canada. *Canadian Journal of Zoology* **76**: 954-959.
- BROWN, G. D. y K. S. REECE, 2003 Isolation and characterization of serine protease genes from *Perkinsus marinus*. *Diseases of Aquatic Organisms* **57**: 117-126.



- BULGAKOV, A. A., K. I. PARK, K.-S. CHOI, H.-K. KIM y M. CHO, 2004 Purification and characterisation of a lectin isolated from the Manila clam *Ruditapes philippinarum* in Korea. *Fish and Shellfish Immunology* **16**: 487-499.
- BURRESON, E. M., 2008 Misuse of PCR assay for diagnosis of mollusc protistan infections. *Diseases of Aquatic Organisms* **81**: 81-83.
- BURRESON, E. M. y L. M. RAGONE CALVO, 1996 Epizootiology of *Perkinsus marinus* disease of oysters in Chesapeake Bay, with emphasis on data since 1985. *Journal of Shellfish Research* **15**: 17-34.
- BURRESON, E. M., L. M. RAGONE CALVO, J. F. LA PEYRE, F. COUNTS y K. T. PAYNTER, 1994a Acute osmotic tolerance of cultured cells of the oyster pathogen *Perkinsus marinus* (Apicomplexa: Perkinsida). *Comparative Biochemistry and Physiology*, series A, **109**: 575-582.
- BURRESON, E. M., R. S. ALVAREZ, V. V. MARTÍNEZ y L. A. MACEDO, 1994b *Perkinsus marinus* (Apicomplexa) as a potential source of oyster *Crassostrea virginica* mortality in coastal lagoons of Tabasco, Mexico. *Diseases of Aquatic Organisms* **20**: 77-82.
- BURRESON, E. M., K. S. REECE y C. F. DUNGAN, 2005 Molecular, morphological, and experimental evidence support the synonymy of *Perkinsus chesapeaki* and *Perkinsus andrewsi*. *Journal of Eukaryotic Microbiology* **52**: 258-270.
- BUSHEK, D., S. E. FORD y S. K. ALLEN, 1994 Evaluation of methods using Ray's fluid thioglycollate medium for diagnosis of *Perkinsus marinus* infection in the eastern oyster, *Crassostrea virginica*. *Annual Review of Fish Diseases* **4**: 201-217.
- BUSHEK, D., S. K. ALLEN, K. A. ALCOX, R. GUSTAFSON y S. E. FORD, 1997 Response of *Crassostrea virginica* to *in vitro* cultured *Perkinsus marinus*: preliminary comparison of three inoculation methods. *Journal of Shellfish Research* **16**: 479-485.
- BUSHEK, D., R. HOLLEY y K. S. REECE, 2000 Use of micromanipulation and «feeder layers» to clone the oyster pathogen *Perkinsus marinus*. *Journal of Eukaryotic Microbiology* **47**: 164-166.
- BUSHEK, D., C. F. DUNGAN y A. J. LEWITUS, 2002a Serological affinities of the oyster pathogen *Perkinsus marinus* (Apicomplexa) with some dinoflagellates (Dinophyceae). *Journal of Eukaryotic Microbiology* **49**: 11-16.
- BUSHEK, D., S. E. FORD y M. M. CHINTALA, 2002b Comparison of *in vitro*-cultured and wild-type *Perkinsus marinus*. III. Fecal elimination and its role in transmission. *Diseases of Aquatic Organisms* **51**: 217-225.
- BUTT, D. y D. RAFTOS, 2007 Immunosuppression in Sydney rock oysters (*Saccostrea glomerata*) and QX disease in the Hawkesbury River, Sydney. *Marine and Freshwater Research* **58**: 213-221.



- BUTT, D. y D. RAFTOS, 2008 Phenoloxidase-associated cellular defence in the Sydney rock oyster, *Saccostrea glomerata*, provides resistance against QX disease infections. *Developmental and Comparative Immunology* **32**: 299-306.
- CÁCERES-MARTÍNEZ, J., R. VÁSQUEZ-YEOMANS, G. PADILLA-LARDIZÁBAL y M. A. DEL RÍO PORTILLA, 2008 *Perkinsus marinus* in pleasure oyster *Crassostrea corteziensis* from Nayarit, Pacific coast of México. *Journal of Invertebrate Pathology* **99**: 66-73.
- CALVO, G. W., M. LUCKENBACH, S. K. ALLEN J. R. y E. M. BURRESON, 1999 A comparative field study of *Crassostrea gigas* (Thunberg 1793) and *Crassostrea virginica* (Gmelin 1791) in relation to salinity in Virginia. *Journal of Shellfish Research* **18**: 465-473.
- CALVO, G. W., M. LUCKENBACH, S. K. ALLEN J. R. y E. M. BURRESON, 2001 A comparative field study of *Crassostrea ariakensis* (Fujita 1913) and *Crassostrea virginica* (Gmelin 1791) in relation to salinity in Virginia. *Journal of Shellfish Research* **20**: 221-229.
- CASAS, S. M., 2002 Estudio de la perkinsosis en la almeja fina, *Tapes decussatus* (Linnaeus, 1758), de Galicia. Ph. D. Thesis, University of Santiago de Compostela, Spain.
- CASAS, S. M., A. VILLALBA y K. S. REECE, 2002a Study of perkinsosis in the carpet shell clam *Tapes decussatus* in Galicia (NW Spain). I. Identification of the aetiological agent and *in vitro* modulation of zoosporulation by temperature and salinity. *Diseases of Aquatic Organisms* **50**: 51-65.
- CASAS, S. M., J. F. LA PEYRE, K. S. REECE, C. AZEVEDO y A. VILLALBA, 2002b Continuous *in vitro* culture of the carpet shell clam *Tapes decussatus* protozoan parasite *Perkinsus atlanticus*. *Diseases of Aquatic Organisms* **52**: 217-231.
- CASAS, S. M., J. F. LA PEYRE y A. VILLALBA, 2002c Extracellular enzyme activities of *Perkinsus atlanticus* in culture and comparison with *Perkinsus marinus*. In: Harrington KS (ed.), Abstracts from the 4th International Symposium on Aquatic Animal Health. September 1-5, 2002, New Orleans, Louisiana, USA. p. 233.
- CASAS, S. M., A. GRAU, K. S. REECE, K. APAKUPAKUL, C. AZEVEDO *et al.* 2004 *Perkinsus mediterraneus* n. sp. a protistan parasite of the European flat oyster *Ostrea edulis* (L.) from the Coast of Balearic Islands, Mediterranean Sea. *Diseases of Aquatic Organisms* **58**: 231-244.
- CASAS, S. M., K. S. REECE, A. VILLALBA y J. F. LA PEYRE, 2008 Continuous culture of *Perkinsus mediterraneus*, a parasite of the European flat oyster *Ostrea edulis*, and characterization of its morphology, propagation and extracellular proteins *in vitro*. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, **55**: 34-43.



- CASAS, S. M. y J. F. LA PEYRE, 2009 In vitro effects of growth factors and hormones on three *Perkinsus* species and increased proliferation of *P. marinus* during cloning. *Experimental Parasitology* **121**: 257-267.
- CAVALIER-SMITH, T., 2004 Only six kingdoms of life. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B Biological Sciences*, **271**: 1251-1262.
- CAVALIER-SMITH, T. y E. E. CHAO, 2004 Protoalveolate phylogeny and systematics and the origins of Sporozoa and dinoflagellates (phylum Myzozoa nom. nov.). *European Journal of Protistology* **40**: 185-212.
- CHAGOT, D., M. COMPS, V. BOULO, F. RUANO y H. GRIZEL, 1987. Histological study of a cellular reaction in *Ruditapes decussatus* infected by a protozoan. *Aquaculture* **67**: 260-261.
- CHINTALA, M. M., D. BUSHEK y S. E. FORD, 2002 Comparison of *in vitro*-cultured and wild-type *Perkinsus marinus*. I. Dosing methods and host response. *Diseases of Aquatic Organisms* **51**: 203-216.
- CHOI, K. S., E. A. WILSON, D. H. LEWIS, E. N. POWELL y S. M. RAY, 1989 The energetic cost of *Perkinsus marinus* parasitism in oysters: quantification of the thioglycollate method. *Journal of Shellfish Research* **8**: 125-131.
- CHOI, K. S., D. H. LEWIS, E. N. POWELL, P. F. FRELIER y S. M. RAY, 1991 A polyclonal antibody developed from *Perkinsus marinus* hypnospores fails to cross react with other life stages of *P. marinus* in oyster (*Crassostrea virginica*) tissues. *Journal of Shellfish Research* **10**: 411-415.
- CHOI, K. S., K. I. PARK, K. W. LEE y K. MATSUOKA, 2002 Infection intensity, prevalence and histopathology of *Perkinsus* sp. in the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*, in Isahaya Bay, Japan. *Journal of Shellfish Research* **21**: 119-125.
- CHU, F. L. E., 1988 Humoral defense factors in marine bivalves. *American Fisheries Society Special Publication* **18**: 178-188.
- CHU, F. L. E., 1996 Laboratory investigations of susceptibility, infectivity and transmission of *Perkinsus marinus* in oysters. *Journal of Shellfish Research* **15**: 57-66.
- CHU, F.-L. E., 2000 Defense mechanisms of marine bivalves. In: Fingeraman, M., Nagabhushanam, R. (Eds.), *Recent Advances in Marine Biotechnology: Immunobiology and Pathology*. Science publishers Inc., Enfield (NH), USA, pp. 1-42.
- CHU, F. L. E. y K. H. GREENE, 1989 Effect of temperature and salinity on *in vitro* culture of the oyster pathogen, *Perkinsus marinus* (Apicomplexa: Perkinsea). *Journal of Invertebrate Pathology* **53**: 260-268.



- CHU, F. L. E. y R. C. HALE, 1994 Relationship between pollution and susceptibility to infectious diseases in the eastern oyster, *Crassostrea virginica*. *Marine Environmental Research* **38**: 243-256.
- CHU, F. L. E. y J. F. LA PEYRE, 1989 Effect of environmental factors and parasitism on hemolymph lysozyme and protein of American oysters (*Crassostrea virginica*). *Journal of Invertebrate Pathology* **54**: 224-232.
- CHU, F. L. E. y J. F. LA PEYRE, 1993a *Perkinsus marinus* susceptibility and defense-related activities in eastern oysters *Crassostrea virginica*: temperature effects. *Diseases of Aquatic Organism* **16**: 223-234.
- CHU, F. L. E. y J. F. LA PEYRE, 1993b Development of disease caused by the parasite *Perkinsus marinus* and defense-related hemolymph factors in three populations of oysters from the Chesapeake Bay, USA. *Journal of Shellfish Research* **12**: 21-27.
- CHU, F. L. E. y A. K. VOLETY, 1997 Disease processes of the parasite *Perkinsus marinus* in eastern oyster *Crassostrea virginica*: minimum dose for infection initiation, and interaction of temperature, salinity and infective cell dose. *Diseases of Aquatic Organism* **28**: 61-68.
- CHU, F. L. E., J. F. LA PEYRE y E. M. BURRESON, 1993 *Perkinsus marinus* infection and potential defense-related activities in eastern oysters, *Crassostrea virginica*: salinity effects. *Journal of Invertebrate Pathology* **62**: 226-232.
- CHU, F. L. E., A. K. VOLETY y G. CONSTANTIN, 1996 A comparison of *Crassostrea gigas* and *Crassostrea virginica*: effects of temperature and salinity on susceptibility to the protozoan parasite, *Perkinsus marinus*. *Journal of Shellfish Research* **15**: 375-380.
- CHU, F. L. E., P. SOUDANT, A. K. VOLETY y Y. HUANG, 2000 Uptake and interconversion of fluorescent lipid analogs in the protozoan parasite, *Perkinsus marinus*, of the oyster, *Crassostrea virginica*. *Experimental Parasitology* **95**: 240-251.
- CHU, F. L. E., E. LUND, P. SOUDANT y E. HARVEY, 2002 *De novo* arachidonic acid synthesis in *Perkinsus marinus*, a protozoan parasite of the eastern oyster. *Molecular and Biochemical Parasitology* **119**: 179-190.
- CHU, F. L. E., P. SOUDANT y E. D. LUND, 2003 *Perkinsus marinus*, a protozoan parasite of the Eastern oyster (*Crassostrea virginica*): effects of temperature on the uptake and metabolism of fluorescent lipid analogs and lipase activities. *Experimental Parasitology* **105**: 121-130.
- CHU, F. L. E., E. D. LUND, E. HARVEY y R. ADLOF, 2004 Arachidonic acid synthetic pathways of the oyster protozoan parasite, *Perkinsus marinus*: evidence for usage of a delta-8 pathway. *Molecular and Biochemical Parasitology* **133**: 45-51.



- CIGARRÍA, J., C. RODRÍGUEZ y J. M. FERNÁNDEZ 1997 Impact of *Perkinsus* sp. on Manila clam *Ruditapes philippinarum* beds. *Diseases of Aquatic Organisms* **29**: 117-120.
- COSS, C. A., J. A. F. ROBLEDO y G. R. VASTA, 2001a Fine structure of clonally propagated *in vitro* life stages of a *Perkinsus* sp. isolated from the Baltic clam *Macoma balthica*. *Journal of Eukaryotic Microbiology* **48**: 38-51.
- COSS, C. A., J. A. F. ROBLEDO, G. M. RUIZ y G. R. VASTA, 2001b Description of *Perkinsus andrewsi* n. sp. isolated from the Baltic clam (*Macoma balthica*) by characterization of the ribosomal RNA locus, and development of a species-specific PCR-based diagnostic assay. *Journal of Eukaryotic Microbiology* **48**: 52-61.
- CRAIG, A., E. N. POWELL, R. R. FAY and J. M. BROOKS, 1989 Distribution of *Perkinsus marinus* in Gulf Coast oyster populations. *Estuaries* **12**: 82-91.
- CREMONTE, F., P. BALSEIRO y A. FIGUERAS, 2005 Occurrence of *Perkinsus olseni* (Protozoa: Apicomplexa) and other parasites in the venerid commercial clam *Pitar rostrata* from Paraguay, southwestern Atlantic coast). *Diseases of Aquatic Organisms* **64**: 85-90.
- CROSBY, M. P. y C. F. ROBERTS, 1990 Seasonal infection intensity cycle of the parasite *Perkinsus marinus* (and absence of *Haplosporidium* spp.) in oysters from a South Carolina salt marsh. *Diseases of Aquatic Organisms* **9**: 149-155.
- DANG, C., X. DE MONTAUDOUIN, P. GONZALEZ, N. MESMER-DUDONS y N. CAILL-MILLY, 2008 Brown muscle disease (BMD), an emergent pathology affecting Manila clam *Ruditapes philippinarum* in Arcachon Bay (SW France). *Diseases of Aquatic Organisms* **80**: 219-228.
- DA SILVA, P. M., P. COMESAÑA, J. FUENTES y A. VILLALBA, 2008 Variability of haemocyte and haemolymph parameters in European flat oyster *Ostrea edulis* families obtained from brood stocks of different geographical origins and relation with infection by the protozoan *Bonamia ostreae*. *Fish and Shellfish Immunology*, **24**: 551-563.
- DA SILVA, P. M., P. COMESAÑA, J. FUENTES y A. VILLALBA, 2008a Variability of haemocyte and haemolymph parameters in European flat oyster *Ostrea edulis* families obtained from brood stocks of different geographical origins and relation with infection by the protozoan *Bonamia ostreae*. *Fish and Shellfish Immunology* **24**: 551-563.
- DA SILVA, P. M., H. HÉGARET, C. LAMBERT, G. H. WIKFORS, N. LE GOICET *et al.*, 2008b Immunological responses of the Manila clam (*Ruditapes philippinarum*) with varying parasite (*Perkinsus olseni*) burden, during a long term exposure to the harmful alga, *Karenia selliformis*, and possible interactions. *Toxicon* **51**: 563-573.



- DE LA HERRÁN, R., M. A. GARRIDO-RAMOS, J. I. NAVAS, C. RUIZ REJÓN y M. RUIZ REJÓN, 2000 Molecular characterization of the ribosomal RNA gene region of *Perkinsus atlanticus*: its use in phylogenetic analysis and as a target for a molecular diagnosis. *Parasitology* **120**: 345-353.
- DITTMAN, D. E., S. E. FORD y D. K. PADILLA, 2001 Effects of *Perkinsus marinus* on reproduction and condition of the eastern oyster, *Crassostrea virginica*, depend on timing. *Journal of Shellfish Research* **20**: 1025-1034.
- DUNGAN, C. F. y R. M. HAMILTON, 1995 Use of the tetrazolium-based cell proliferation assay to measure effects of *in vitro* conditions on *Perkinsus marinus* (Apicomplexan) proliferation. *Journal of Eukaryotic Microbiology* **42**: 379-388.
- DUNGAN, C. F. y B. S. ROBERSON, 1993 Binding specificities of mono- and polyclonal antibodies to the protozoan oyster pathogen *Perkinsus marinus*. *Diseases of Aquatic Organisms* **15**: 9-22.
- DUNGAN, C. F. y K. S. REECE, 2006 *In Vitro* propagation of two *Perkinsus* spp. parasites from Japanese Manila clam *Venerupis philippinarum* and description of *Perkinsus honshuensis* n. sp. *Journal of Eukaryotic Microbiology* **53**: 316-326.
- DUNGAN, C. F., R. M. HAMILTON, K. L. HUDSON, C. B. MCCOLLOUGH y K. S. REECE, 2002 Two epizootic diseases in Chesapeake Bay commercial clams, *Mya arenaria* and *Tagelus plebius*. *Diseases of Aquatic Organisms* **50**: 67-78.
- DUNGAN, C. F., K. S. REECE, J. A. MOSS, R. M. HAMILTON y B. K. DIGGLES, 2007 *Perkinsus olseni* *in Vitro* isolates from the New Zealand clam *Austrovenus stutchburyi*. *Journal of Eukaryotic Microbiology* **54**: 263-270.
- ELANDALOUSSI, L. M., R. M. LEITE, R. AFONSO, P. A. NUNES, J. A. F. ROBLEDO *et al.*, 2004 Development of a PCR-ELISA assay for diagnosis of *Perkinsus marinus* and *Perkinsus atlanticus* infections in bivalve molluscs. *Molecular and Cell Probes* **18**: 89-96.
- ELANDALOUSSI, L. M., P. M. RODRIGUES, R. AFONSO, R. B. LEITE, P. A. NUNES *et al.*, 2005 Shikimate and folate pathways in the protozoan parasite, *Perkinsus olseni*. *Molecular and Biochemical Parasitology* **142**: 106-109.
- ELANDALOUSSI, L. M., N. CARRASCO, A. ROQUE, K. ANDRÉE y M. D. FURONES, 2009 First record of *Perkinsus olseni*, a protozoan infecting the commercial clam *Ruditapes decussatus* in Spanish Mediterranean waters. *Journal of Invertebrate Pathology*, **100**: 50-53.
- ELLIN, R. y D. BUSHEK, 2006 Adaptation of Ray's fluid thioglycollate medium assay to detect and quantify planktonic stages of *Perkinsus* sp. parasites. *Journal of Shellfish Research* **25**: 1037-1042.



- ELSTON, R. A., C. F. DUNGAN, T. R. MEYER y K. S. REECE, 2003 *Perkinsus* sp. infection risk for Manila clams, *Venerupis philippinarum* (A. Adams and Reeve, 1850) on the Pacific coast of North and Central America. *Journal of Shellfish Research* **22**: 661-665.
- FAISAL, M., E. A. MACINTYRE K. G. ADHAM, B. D. TALL, M. H. KOTHARY *et al.*, 1998 Evidence for the presence of protease inhibitors in eastern (*Crassostrea virginica*) and Pacific (*Crassostrea gigas*) oysters. *Comparative Biochemistry and Physiology, series B*, **121**: 161-168.
- FAISAL, M., J. F. LA PEYRE y E. E. ELSAYED, 1999a Bacitracin inhibits the oyster pathogen *Perkinsus marinus* in vitro and in vivo. *Journal of Aquatic Animal Health* **11**: 130-138.
- FAISAL, M., J. L. OLIVER y S. L. KAATTARI, 1999b Potential role of protease-antiprotease interactions in *Perkinsus marinus* infection in *Crassostrea* spp. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* **19**: 269-276.
- FENG, S. Y. y W. J. CANZONIER, 1970 Humoral responses in the american oyster (*Crassostrea virginica*) infected with *Bucephalus* sp. and *Minchinia nelsoni*. *American Fisheries Society Special Publication* **5**: 497-510.
- FERNÁNDEZ-ROBLEDO, J. A., E. J. SCHOTT y G. R. VASTA, 2008a *Perkinsus marinus* superoxide dismutase 2 (PmSOD2) localizes to single-membrane subcellular compartments. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **375**: 215-219.
- FERNÁNDEZ-ROBLEDO, J. A., Z. LIN y G. R. VASTA, 2008b Transfection of the protozoan parasite *Perkinsus marinus*. *Molecular and Biochemical Parasitology* **157**: 44-53.
- FIGUERAS, A., J. A. F. ROBLEDO y B. NOVOA, 1992 Occurrence of haplosporidian and *Perkinsus*-like infections in carpet-shell clams, *Ruditapes decussatus* (Linnaeus, 1758), of the Ría de Vigo (Galicia, NW Spain). *Journal of Shellfish Research* **11**: 377-382.
- FISHER, W. S., (editor) 1996 Número especial. *Journal of Shellfish Research* **15**: 1-183.
- FISHER, W. S. y R. I. E. NEWELL, 1986 Seasonal and environmental variation in protein and carbohydrate levels in the hemolymph from American oysters (*Crassostrea virginica* Gmelin). *Comparative Biochemistry and Physiology, series A*, **85**: 365-372.
- FISHER, W. S. y L. M. OLIVER, 1996 A whole-oyster procedure for diagnosis of *Perkinsus marinus* disease using Ray's fluid thioglycollate culture medium. *Journal of Shellfish Research* **15**: 109-117.



- FISHER, W. S. y M. TAMPLIN, 1988 Environmental influence on activities and foreign-particle binding by hemocytes of American oysters, *Crassostrea virginica*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science* **45**: 1309-1315.
- FISHER, W. S., J. D. GAUTHIER y J. T. WINSTEAD, 1992 Infection intensity of *Perkinsus marinus* disease in *Crassostrea virginica* (Gmelin, 1791) from the Gulf of Mexico maintained under different laboratory conditions. *Journal of Shellfish Research* **11**: 263-269.
- FONG, D., R. RODRÍGUEZ, K. KOO, J. SUN, M. L. SOGIN, *et al.*, 1993 Small subunit ribosomal RNA gene sequence of the oyster parasite *Perkinsus marinus*. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* **2**: 346-350.
- FORD, S. E., 1996 Range extension by the oyster parasite *Perkinsus marinus* into the North Eastern United States: response to climate change? *Journal of Shellfish Research* **15**: 45-56.
- FORD, S. E. y M. M. CHINTALA, 2006 Northward expansion of a marine parasite: Testing the role of cold adaptation. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **339**: 226-235.
- FORD, S. E., M. M. CHINTALA y D. BUSHEK, 2002 Comparison of *in vitro*-cultured and wild-type *Perkinsus marinus*. I. Pathogen virulence. *Diseases of Aquatic Organisms* **51**: 187-201.
- GARREIS, K. A., J. F. LA PEYRE y M. FAISAL, 1996 The effects of *Perkinsus marinus* extracellular products and purified proteases on oyster defence parameters *in vitro*. *Fish and Shellfish Immunology* **6**: 581-597.
- GAUTHIER, J. D. y W. S. FISHER, 1990 Hemolymph assay for diagnosis of *Perkinsus marinus* in oysters *Crassostrea virginica*. *Journal of Shellfish Research* **9**: 367-371.
- GAUTHIER, J. y G. VASTA, 1993 Continuous *in vitro* culture of the eastern oyster parasite *Perkinsus marinus*. *Journal of Invertebrate Pathology* **62**: 321-323.
- GAUTHIER, J. y G. VASTA, 1995 *In vitro* culture of the eastern oyster parasite *Perkinsus marinus*: optimisation of the methodology. *Journal of Invertebrate Pathology* **66**: 156-168.
- GAUTHIER, J. D. y G. VASTA, 2002 Effects of plasma from bivalve mollusk species on the *in vitro* proliferation of the protistan parasite *Perkinsus marinus*. *Journal of Experimental Zoology* **292**: 221-230.
- GAUTHIER, J., B. FEIG y G. VASTA, 1995 Effect of fetal bovine serum glycoproteins on the *in vitro* proliferation of the oyster parasite *Perkinsus marinus*: development of a fully defined medium. *Journal of Eukaryotic Microbiology* **42**: 307-313.



- GAUTHIER, J. D., J. A. JENKINS y J. F. LA PEYRE, 2004 Flow cytometric analysis of lectin binding to *in vitro*-cultured *Perkinsus marinus* surface carbohydrates. *Journal of Parasitology* **90**: 446-454.
- GAUTHIER, J. D., C. R. MILLER y A. E. WILBUR, 2006 Taqman® MGB real-time PCR approach to quantification of *Perkinsus marinus* and *Perkinsus* spp. in oysters. *Journal of Shellfish Research* **25**: 619-624.
- GOEDKEN, M., B. MORSEY, I. SUNILA y S. DE GUISE, 2005 Immunomodulation of *Crassostrea gigas* and *Crassostrea virginica* cellular defense mechanisms by *Perkinsus marinus*. *Journal of Shellfish Research* **24**: 487-496.
- GOGGIN, C. L. y S. C. BARKER, 1993 Phylogenetic position of the genus *Perkinsus* (Protista, Apicomplexa) based on small subunit ribosomal RNA. *Molecular and Biochemical Parasitology* **60**: 65-70.
- GOGGIN, C. L. y R. J. G. LESTER, 1995 *Perkinsus*, a protistan parasite of abalone in Australia: a review. *Marine and Freshwater Research* **46**: 639-646.
- GOGGIN, C. L., K. B. SEWELL y R. J. G. LESTER, 1989 Cross-infection experiments with Australian *Perkinsus* species. *Diseases of Aquatic Organisms* **7**: 55-59.
- GOGGIN, C. L., S. E. MCGLADDERY, S. K. WHYTE y R. J. CAWTHORN, 1996 An assessment of lesions in bay scallops *Argopecten irradians* attributed to *Perkinsus karlssoni* (Protozoa, Apicomplexa). *Diseases of Aquatic Organisms* **24**: 77-80.
- GONZÁLEZ, V., J. PEÑAS y A. DÍAZ, 1987 Dermocystidiosis en almeja fina portuguesa de importación. *Actas del II Congreso Nacional de Acuicultura, Cuadernos marisqueros* **12**: 695-700.
- GRAUVOGEL, C., K. S. REECE, H. BRINKMANN y J. PETERSEN, 2007 Plastid Isoprenoid Metabolism in the Oyster Parasite *Perkinsus marinus* Connects Dinoflagellates and Malaria Pathogens—New Impetus for Studying Alveolates. *Journal of Molecular Evolution* **65**: 725-729.
- GULLIAN-KLANIAN, M., J. A. HERRERA-SILVEIRA, R. RODRÍGUEZ-CANUL y L. AGUIRRE-MACEDO, 2008 Factors associated with the prevalence of *Perkinsus marinus* in *Crassostrea virginica* from the southern Gulf of Mexico. *Diseases of Aquatic Organisms* **79**: 237-247.
- HAMAGUCHI, M., N. SUZUKI, H. USUKI y H. ISHIOKA, 1998 *Perkinsus* protozoan infection in short-necked clam *Tapes* (= *Ruditapes*) *philippinarum* in Japan. *Fish Pathology* **33**: 473-480.
- HÉGARET, H., P. M. DA SILVA, G. H. WIKFORS, C. LAMBERT, T. DE BETTIGNIES *et al.*, 2007 Hemocyte responses of Manila clams, *Ruditapes philippinarum*, with varying parasite, *Perkinsus olseni*, severity to toxic-algal exposures. *Aquatic Toxicology* **84**: 469-479.



- HÉGARET, H., P. M. DA SILVA, I. SUNILA, S. E. SHUMWAY, M. S. DIXON *et al.*, 2009 Perkinsosis in the Manila clam *Ruditapes philippinarum* affects responses to the harmful-alga, *Prorocentrum minimum*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **371**: 112-120.
- HOFMANN, E. E., E. N. POWELL, J. M. KLINCK y G. SAUNDERS, 1995 Modelling diseased oyster populations. I. Modelling *Perkinsus marinus* infections in oysters. *Journal of Shellfish Research* **14**: 121-151.
- HOWARD D. W., E. J. LEWIS, B. J. KELLER y C. S. SMITH, 2004 Histological Techniques for Marine Bivalve Mollusks and Crustaceans. NOAA Technical Memorandum NOS NCCOS 5, 2nd edition, Oxford, Maryland, EE UU.
- JORDAN, P. J. y L. E. DEATON, 2005 Characterization of phenoloxidase from *Crassostrea virginica* hemocytes and the effect of *Perkinsus virginus* on phenoloxidase activity in the hemolymph of *Crassostrea virginica* and *Geukensia demissa*. *Journal of Shellfish Research* **24**: 477-482.
- KANG, Y. S., Y. M. KIM, K. I. PARK, S. K. CHO, K. S. CHOI *et al.*, 2006 Analysis of EST and lectin expressions in hemocytes of Manila clams (*Ruditapes philippinarum*) (Bivalvia: Mollusca) infected with *Perkinsus olseni*. *Developmental and Comparative Immunology* **30**: 1119-1131.
- KANG, Y. S, K. S. CHOI, Y. B. CHUNG, S. KIM y M. CHO, 2008 Protease associated with lectin produced by *Perkinsus olseni* infected Manila clams (*Ruditapes philippinarum*). *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* **28**: 89-96.
- KENNEDY, V. S., R. I. E. NEWELL, G. E., KRANTZ y S. OTTO, 1995 Reproductive capacity of the eastern oyster *Crassostrea virginica* infected with the parasite *Perkinsus marinus*. *Diseases of Aquatic Organisms* **23**: 135-144.
- KIM, J. Y., Y. M. KIM, S. K. CHO, K. S. CHOI y M. CHO 2008a Noble tandem-repeat galectin of Manila clam *Ruditapes philippinarum* is induced upon infection with the protozoan parasite *Perkinsus olseni*. *Developmental and Comparative Immunology* **32**: 1131-1141.
- KIM, J. Y., M. ADHYA, S. K. CHO, K. S. CHOI y M. CHO, 2008b Characterization, tissue expression, and immunohistochemical localization of MCL3, a C-type lectin produced by *Perkinsus olseni*-infected Manila clams (*Ruditapes philippinarum*). *Fish and Shellfish Immunology* **25**: 598-603.
- KIM, Y. M., K. I. PARK, K. S. CHOI, R. A. ALVAREZ, R. D. CUMMINGS *et al.*, 2006 Lectin from the Manila clam *Ruditapes philippinarum* is induced upon infection with the protozoan parasite *Perkinsus olseni*. *Journal of Biological Chemistry* **281**: 26854-26864.
- KLEINSCHUSTER, S. J. y S. L. SWINK, 1993 A simple method for the *in vitro* culture of *Perkinsus marinus*. *Nautilus* **107**: 76-78.



- KOTOB, S. I., S. M. McLAUGHLIN, P. VAN BERKUM y M. FAISAL, 1999a Characterization of two *Perkinsus* spp. from the softshell clam, *Mya arenaria* using the small subunit ribosomal RNA gene. *Journal of Eukaryotic Microbiology* **46**: 439-444.
- KOTOB, S. I., S. M. McLAUGHLIN, P. VAN BERKUM y M. FAISAL, 1999b Discrimination between two *Perkinsus* spp. isolated from the softshell clam, *Mya arenaria*, by sequence analysis of two internal transcribed spacer regions and the 5.8S ribosomal RNA gene. *Parasitology* **119**: 363-368.
- KUVARDINA, O. N., B. S. LEANDER, V. V. ALESHIN, A. P. MYL'NIKOV, P. J. KEELING *et al.*, 2002 The phylogeny of the colpodellids (Alveolata) using small subunit rRNA gene sequences suggests they are the free-living sister group to apicomplexans. *Journal of Eukaryotic Microbiology* **49**: 498-504.
- LA PEYRE, J. F. y M. FAISAL, 1996 Optimal culture conditions for the propagation of the oyster pathogen *Perkinsus marinus* (Apicomplexa) in protein deficient medium. *Parasite* **3**: 147-153.
- LA PEYRE, J. F. y M. FAISAL, 1997 Development of a protein-free chemically defined culture medium for the propagation of the oyster pathogen *Perkinsus marinus*. *Parasite* **4**: 67-73.
- LA PEYRE, J. F., M. FAISAL y E. M. BURRESON, 1993 *In vitro* propagation of the protozoan *Perkinsus marinus*, a pathogen of the eastern oyster, *Crassostrea virginica*. *Journal of Eukaryotic Microbiology* **40**: 304-310.
- LA PEYRE, J. F., F. E. CHU y J. M. MEYERS, 1995a Hemocytic and humoral activities of eastern and Pacific oysters following challenge by the protozoan *Perkinsus marinus*. *Fish and Shellfish Immunology* **5**: 179-190.
- LA PEYRE, J. F., F. E. CHU y W. K. VOGELBEIN, 1995b *In vitro* interaction of *Perkinsus marinus* merozoites with eastern and Pacific oyster haemocytes. *Developmental and Comparative Immunology* **19**: 291-304.
- LA PEYRE, J. F., D. Y. SCHAFHAUSER, E. H. RIZKALLA y M. FAISAL, 1995c Production of serine proteases by the oyster pathogen *Perkinsus marinus* (Apicomplexa) *in vitro*. *Journal of Eukaryotic Microbiology* **42**: 544-551.
- LA PEYRE, J. F., H. A. YARNALL y M. FAISAL, 1996 Contribution of *Perkinsus marinus* extracellular products in the infection of eastern oysters (*Crassostrea virginica*). *Journal of Invertebrate Pathology* **68**: 312-313.
- LA PEYRE, M. K., A. D. NICKENS, A. K. VOLETY, G. S. TOLLEY y J. F. LA PEYRE, 2003 Environmental significance of freshets in reducing *Perkinsus marinus* infection in eastern oysters *Crassostrea virginica*: potential management applications. *Marine Ecology Progress Series* **248**: 165-176.



- LA PEYRE, M. K, S. M. CASAS y J. F LA PEYRE, 2006 Salinity effects on viability, metabolic activity and proliferation of three *Perkinsus* species. *Diseases of Aquatic Organisms* **71**: 59-74.
- LA PEYRE, M. K, S. M. CASAS, A. VILLALBA y J. F LA PEYRE, 2008 Determination of the effects of temperature on viability, metabolic activity and proliferation of two *Perkinsus* species, and its significance to understanding seasonal cycles of perkinsosis. *Parasitology*, **135**: 505-519.
- LEITE, R. B., R. AFONSO y M. L. CANCELA, 2004 *Perkinsus* sp. infestation in carpet-shell clams, *Ruditapes decussatus* (L), along the Portuguese coast. Results from a 2-year survey. *Aquaculture* **240**: 39-53.
- LEITE, R. B., A. B. BRITO y M. L. CANCELA, 2008 An oxygen molecular sensor, the HIF prolyl 4-hydroxylase, in the marine protist *Perkinsus olseni*. *Protist* **159**: 355-368.
- LESTER, R. J. G. y G. H. G. DAVIS, 1981 A new *Perkinsus* species (Apicomplexa, Perkinsea) from the abalone *Haliotis ruber*. *Journal of Invertebrate Pathology* **37**: 181-187.
- LEVINE, N. D., 1978 *Perkinsus* gen. n. and other new taxa in the protozoan phylum Apicomplexa. *Journal of Parasitology* **64**: 549.
- LIANG, Y. B., X. C. ZHANG, H. X. CHEN y C. D. WANG, 2008 Effects of temperature and salinity on *Perkinsus atlanticus* disease triggering of clams *Ruditapes philippinarum*. *Marine Environmental Science* **27**: 1-5.
- LUND, E. D. y F. L. E. CHU, 2002 Phospholipid biosynthesis in the oyster protozoan parasite, *Perkinsus marinus*. *Molecular and Biochemical Parasitology* **121**: 245-253.
- LUND E. D., P. SOUDANT, E. HARVEY, S. BOLTON, A. FLOWERS y F. L. E. CHU, 2005 Effects of the drug triclosan on growth, viability and fatty acid synthesis in the oyster protozoan parasite *Perkinsus marinus*. *Diseases of Aquatic Organisms* **67**: 217-224.
- LUND, E. D., F. L. E. CHU, P. SOUDANT y E. HARVEY, 2007 *Perkinsus marinus*, a protozoan parasite of the eastern oyster, has a requirement for dietary sterols. *Comparative Biochemistry and Physiology, series A*, **146**: 141-147.
- MACKIN, J. G., 1951 Histopathology of infection of *Crassostrea virginica* (Gmelin) by *Dermocystidium marinum* Mackin, Owen and Collier. *Bulletin of Marine Science of the Gulf and Caribbean* **1**: 72-87.
- MACKIN, J. G., 1962 Oyster disease caused by *Dermocystidium marinum* and other microorganisms in Louisiana. *Publications of the Institute of Marine Science, University of Texas* **7**: 132-229.



- MACKIN, J. G., H. M. OWEN y A. COLLIER, 1950 Preliminary note on the occurrence of a new protistan parasite, *Dermocystidium marinum* n. sp. in *Crassostrea virginica* (Gmelin). *Science* **111**: 328-329.
- MAENO, Y., T. YOSHINAGA y K. NAKAJIMA, 1999 Occurrence of *Perkinsus* species (Protozoa, Apicomplexa) from Manila clam *Tapes philippinarum* in Japan. *Fish Pathology* **34**: 127-131.
- MARSH, A. G., J. D. GAUTHIER y G. R. VASTA, 1995 A semiquantitative PCR assay for assessing *Perkinsus marinus* infections in the eastern oyster, *Crassostrea virginica*. *Journal of Parasitology* **81**: 577-583.
- MATSUZAKI, M., H. KUOIWA, T. KUROIWA, K. KITA y H. NOZAKI, 2008 A cryptic algal group unveiled: a plastid biosynthesis pathway in the oyster parasite *Perkinsus marinus*. *Molecular Biology and Evolution* **25**: 1167-1179.
- MCGLADDERY, S. E., R. J. CAWTHORN y B. C. BRADFORD, 1991 *Perkinsus karlssoni* n. sp. (Apicomplexa) in bay scallops *Argopecten irradians*. *Diseases of Aquatic Organisms* **10**: 127-137.
- MCLAUGHLIN, S. M. y M. FAISAL, 1998 *In vitro* propagation of two *Perkinsus* species from the softshell clam *Mya arenaria*. *Parasite* **5**: 341-348.
- MCLAUGHLIN, S. M. y M. FAISAL, 1999 A comparison of diagnostic assays for detection of *Perkinsus* spp. in the softshell clam *Mya arenaria*. *Aquaculture* **172**: 197-204.
- MCLAUGHLIN, S. M., B. D. TALL, A. SHAHEEN, E. E. ELSAYED y M. FAISAL, 2000 Zoosporulation of a new *Perkinsus* species isolated from the gills of the softshell clam *Mya arenaria*. *Parasite* **7**: 115-122.
- MONTES, J. F., M. DURFORT y J. GARCÍA VALERO, 1995a Cellular defence mechanism of the clam *Tapes semidecussatus* against infection by the protozoan *Perkinsus* sp. *Cell and Tissue Research* **279**: 529-538.
- MONTES, J. F., M. DURFORT y J. GARCÍA VALERO, 1995b Characterization and localization of a Mr 225 kDa polypeptide specifically involved in the defence mechanisms of the clam *Tapes semidecussatus*. *Cell and Tissue Research* **280**: 27-37.
- MONTES, J. F., M. DURFORT y J. GARCÍA VALERO, 1996 When the venerid clam *Tapes decussatus* is parasitized by the protozoan *Perkinsus* sp. it synthesizes a defensive polypeptide that is closely related to p225. *Diseases of Aquatic Organisms* **26**: 149-157.
- MONTES, J. F., J. A. DEL RIO, M. DURFORT y J. GARCÍA VALERO, 1997 The protozoan parasite *Perkinsus atlanticus* elicits a unique defensive response in the clam *Tapes semidecussatus*. *Parasitology* **114**: 339-350.



- MONTES, J. F., M. DURFORT y J. GARCÍA VALERO, 2001 Parasitism by the protozoan *Perkinsus atlanticus* favours the development of opportunistic infections. *Diseases of Aquatic Organisms* **46**: 57-66.
- MONTES, J. F., M. DURFORT, A. LLADÓ y J. GARCÍA VALERO, 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., E. M. BURRESON, J. F. CORDES, C. F. DUNGAN, G. D. BROWN *et al.*, 2007 Pathogens in *Crassostrea ariakensis* and other Asian oyster species: implications for non-native oyster introduction to Chesapeake Bay. *Diseases of Aquatic Organisms* **77**: 207-233.
- MOSS, J. A., J. XIAO, C. F. DUNGAN y K. S. REECE, 2008 Description of *Perkinsus beihaiensis* n. sp., a new *Perkinsus* sp. parasite in oysters of southern China. *Journal of Eukaryotic Microbiology* **55**: 117-130.
- MUÑOZ, P., J. MESEGUER y M. A. ESTEBAN, 2006 Phenoloxidase activity in three commercial bivalve species. Changes due to natural infestation with *Perkinsus atlanticus*. *Fish and Shellfish Immunology* **20**: 12-19.
- MURRELL, A., S. N. KLEEMAN, S. C. BARKER y R. J. G. LESTER, 2002 Synonymy of *Perkinsus olseni* Lester & Davis, 1981 and *Perkinsus atlanticus* Azevedo, 1989 and an update on the phylogenetic position of the genus *Perkinsus*. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* **22**: 258-265.
- NAVAS, J. I., M. C. CASTILLO, P. VERA y M. RUIZ-RICO, 1992 Principal parasites observed in clams, *Ruditapes decussatus* (L.), *Ruditapes philippinarum* (Adams et Reeve), *Venerupis pullastra* (Montagu) and *Venerupis aureus* (Gmelin), from the Huelva coast (S.W. Spain). *Aquaculture* **107**: 193-199.
- NAVAS, J. I., R. DE LA HERRÁN, M. A. GARRIDO-RAMOS, C. RUIZ REJÓN y M. RUIZ REJÓN, 2001 La detección de *Perkinsus atlanticus* en la almeja fina mediante técnicas moleculares. Junta de Andalucía, Consejería de Agricultura y Pesca. Sevilla, España. 50 pp.
- NEWELL, R. I. E., K. T. PAYNTER y E. M. BURRESON, 1994 Physiological effects of protozoan parasitism on the eastern oyster *Crassostrea virginica*: feeding and metabolism. *Journal of Shellfish Research* **13**: 294.
- NEWTON, K., R. PETERS y D. RAFTOS, 2004 Phenoloxidase and QX disease resistance in Sydney rock oysters (*Saccostrea glomerata*). *Developmental and Comparative Immunology* **28**: 565-569.
- NICKENS, A.D., J. F. LA PEYRE, E. S. WAGNER y T. R. TIERSCH, 2002 An improved procedure to count *Perkinsus marinus* in eastern oyster hemolymph. *Journal of Shellfish Research* **21**: 725-732.
- NÖREN, F., O. MÖESTRUP y A. S. REHNSTAM-HOLM, 1999 *Parvilucifera infectans* Nören et Möestrup gen. et sp. nov. (Perkinsozoa phylum nov.): a parasitic flagel-



- late capable of killing toxic microalgae. *European Journal of Protistology* **35**: 233-254.
- O'FARRELL, C., J. F. LA PEYRE, K. T. PAYNTER y E. M. BURRESON, 2000 Osmotic tolerance and volume regulation in *in vitro* cultures of the oyster pathogen *Perkinsus marinus*. *Journal of Shellfish Research* **19**: 139-145.
- OIE, 2009 Manual of Diagnostic Test for Aquatic Animals. World Organisation for Animal Health,
- OLIVER, L. M., W. S. FISHER, S. E. FORD, L. M. RAGONE CALVO, E. M. BURRESON *et al.*, 1998 *Perkinsus marinus* tissue distribution and seasonal variation in oysters *Crassostrea virginica* from Florida, Virginia, and New York. *Diseases of Aquatic Organisms* **34**: 51-61.
- OLIVER, J. L., T. D. LEWIS, M. FAISAL y S. L. KAATTARI, 1999 Analysis of the effects of *Perkinsus marinus* proteases on plasma proteins of the eastern oyster (*Crassostrea virginica*) and the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *Journal of Invertebrate Pathology* **74**: 173-183.
- OLIVER, J. L., P. M. GAFFNEY, S. K. ALLEN, M. FAISAL y S. L. KAATTARI, 2000 Protease inhibitory activity in selectively bred families of eastern oysters. *Journal of Aquatic Animal Health* **12**: 136-145.
- OLIVER, L. M., W. S. FISHER, S. E. FORD, L. M. RAGONE CALVO, E. M., BURRESON *et al.*, 1998 *Perkinsus marinus* tissue distribution and seasonal variation in oysters *Crassostrea virginica* from Florida, Virginia and New York. *Diseases of Aquatic Organisms* **34**: 51-61.
- ORDÁS, M. C., A. ORDÁS, C. BELOSO y A. FIGUERAS, 2000 Immune parameters in carpet shell clams naturally infected with *Perkinsus atlanticus*. *Fish and Shellfish Immunology* **10**: 597-609.
- ORDÁS, M. C., J. GÓMEZ-LEÓN y A. FIGUERAS, 2001 Histopathology of the infection by *Perkinsus atlanticus* in three clam species (*Ruditapes decussatus*, *R. philippinarum* and *R. pullastra*) from Galicia (NW Spain). *Journal of Shellfish Research* **20**: 1019-1024.
- OTTINGER, C. A., T. D. LEWIS, D. A. SHAPIRO, M. FAISAL y S. L. KAATTARI, 2001 Detection of *Perkinsus marinus* extracellular proteins in tissues of the eastern oyster *Crassostrea virginica*: potential use in diagnostic assays. *Journal of Aquatic Animal Health* **13**: 133-141.
- PARK, K. I. y K. S. CHOI, 2001 Spatial distribution of the protozoan parasite *Perkinsus* sp. found in the Manila clams, *Ruditapes philippinarum*, in Korea. *Aquaculture* **203**: 9-22.
- PARK, K., Y. M. PARK, J. LEE y K. S. CHOI, 2002 Development of a PCR assay for the detection of the protozoan parasite Perkinsus. *Korean Journal of Environmental Biology* **20**: 109-127.



- PARK, K.-I., J.-K. PARK, J. LEE y K.-S. CHOI, 2005 Use of molecular markers for species identification of Korean *Perkinsus* sp. isolated from Manila clams *Ruditapes philippinarum*. *Diseases of Aquatic Organisms* **66**: 255-263.
- PARK, K.-I., A. FIGUERAS y K.-S. CHOI, 2006a Application of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the study of reproduction in the Manila clam *Ruditapes philippinarum* (Mollusca: Bivalvia): II. Impacts of *Perkinsus olseni* on clam reproduction. *Aquaculture* **251**: 182-191.
- PARK, K. I., T. T. T. NGO, S. D. CHOI, M. CHO y K. S. CHOI, 2006b Occurrence of *Perkinsus olseni* in the venus clam *Protothaca jedoensis* in Korean waters. *Journal of Invertebrate Pathology* **93**: 81-87.
- PAYNTER, K. T., 1996 The effects of *Perkinsus marinus* infection on physiological processes in the eastern oyster, *Crassostrea virginica*. *Journal of Shellfish Research* **15**: 119-125.
- PAYNTER, K. T. y E. M. BURRESSON, 1991 Effects of *Perkinsus marinus* infection in the eastern oyster *Crassostrea virginica* II. Disease development and impact on growth rate at different salinities. *Journal of Shellfish Research* **10**: 425-431.
- PECHER W. T., M. R. ALAWI, E. J. SCHOTT, J. A. F. ROBLEDO, L. ROTH *et al.*, 2008 Assessment of the northern distribution range of selected *Perkinsus* species in eastern oysters (*Crassostrea virginica*) and hard clams (*Mercenaria mercenaria*) with the use of PCR-based detection assays. *Journal of Parasitology* **94**: 410-422.
- PENNA, M. S., M. KHAN y R. A. FRENCH, 2001 Development of a multiplex PCR for the detection of *Haplosporidium nelsoni*, *Haplosporidium costale* and *Perkinsus marinus* in the eastern oyster (*Crassostrea virginica*, Gmelin 1971). *Molecular and Cell Probes* **15**: 385-390.
- PERKINS, F. O., 1968 Fine structure of zoospores from *Labyrinthomyxa* sp. parasitizing the clam *Macoma balthica*. *Chesapeake Science* **9**: 198-208.
- PERKINS, F. O., 1976 Zoospores of the oyster pathogen, *Dermocystidium marinum*. I. Fine structure of the conoid and other sporozoan-like organelles. *Journal of Parasitology* **62**: 959-974.
- PERKINS, F. O., 1996 The structure of *Perkinsus marinus* (Mackin, Owen and Collier, 1950) Levine, 1978 with comments on taxonomy and phylogeny of *Perkinsus* spp. *Journal of Shellfish Research* **15**: 67-87.
- PERKINS, F. O. y R. W. MENZEL, 1966 Morphological and cultural studies of a motile stage in the life cycle of *Dermocystidium marinum*. *Proceedings of the National Shellfisheries Association* **56**: 23-30.



- PERKINS, F. O. y R. W. MENZEL, 1967 Ultrastructure of sporulation in the oyster pathogen *Dermocystidium marinum*. *Journal of Invertebrate Pathology* **9**: 205-229.
- POWELL, E. N., J. M. KLINCK y E. E. HOFMANN, 1996. Modeling diseased oyster populations. II. Triggering mechanisms for *Perkinsus marinus* epizootics. *Journal of Shellfish Research* **15**: 141-165.
- PRADO-ÁLVAREZ, M., C. GESTAL, B. NOVOA y A. FIGUERAS, 2009 Differentially expressed genes of the carpet shell clam *Ruditapes decussatus* against *Perkinsus olseni*. *Fish and Shellfish Immunology* **26**: 72-83.
- QUICK, J. A. y J. G. MACKIN, 1971 Oyster parasitism by *Labyrinthomyxa marina* in Florida. Florida Department of Natural Resources. Marine Research Laboratory Professional Papers Series **13**: 1-55.
- RAGONE, L. M. y E. M. BURRESON, 1993 Effect of salinity on infection progression and pathogenicity of *Perkinsus marinus* in the eastern oyster, *Crassostrea virginica* (Gmelin). *Journal of Shellfish Research* **12**: 1-7.
- RAGONE CALVO, L. M., R. L. WETZEL y E. M. BURRESON, 2000 Development and verification of a model for the population dynamics of the protistan parasite, *Perkinsus marinus*, within its host, the eastern oyster, *Crassostrea virginica*, in Chesapeake Bay. *Journal of Shellfish Research* **20**: 231-241.
- RAGONE CALVO, L. M., C. F. DUNGAN, B. S. ROBERSON y E. M. BURRESON, 2003 Systematic evaluation of factors controlling *Perkinsus marinus* transmission dynamics in lower Chesapeake Bay. *Diseases of Aquatic Organisms* **56**: 75-86.
- RAY, S. M., 1952 A culture technique for the diagnosis of infection with *Dermocystidium marinum* Mackin, Owen, and Collier in oysters. *Science* **116**: 360-361.
- RAY, S. M., 1954 Biological studies of *Dermocystidium marinum*. The Rice Institute Pamphlet (Special issue) **41**: 1-114.
- RAY, S. M., 1966 A review of the culture method for detecting *Dermocystidium marinum*, with suggested modifications and precautions. *Proceedings of the National Shellfisheries Association* **54**: 55-69.
- RAY, S. M., 1996 Historical perspective on *Perkinsus marinus* disease of oysters in the Gulf of Mexico. *Journal of Shellfish Research* **15**: 9-11.
- REECE, K. S., C. F. DUNGAN y E. M. BURRESON, 2008 Molecular epizootiology of *Perkinsus marinus* and *P. chesapeaki* infections among wild oysters and clams in Chesapeake Bay, USA. *Diseases of Aquatic Organisms* **82**: 237-248.
- ROBLEDO, J. A. F., J. D. GAUTHIER, C. A. COSS, A. C. WRIGHT y G. R. VASTA, 1998 Species- specificity and sensitivity of a PCR- based assay for *Perkinsus marinus* in the eastern oyster, *Crassostrea virginica*: a comparison with the fluid thioglycollate assay. *Journal of Parasitology* **84**: 1237-1244.



- ROBLEDO, J. A. F., C. A. COSS y G. R. VASTA, 2000 Characterization of the ribosomal RNA locus of *Perkinsus atlanticus* and development of a polymerase chain reaction-based diagnostic assay. *Journal of Parasitology* **86**: 972-978.
- ROBLEDO, J. A. F., P. A. NUNES, M. L. CANCELA y G. R. VASTA, 2002 Development of an *in vitro* clonal culture and characterization of the rRNA gene cluster of *Perkinsus atlanticus*, a protistan parasite of the clam *Tapes decussatus*. *Journal of Eukaryotic Microbiology* **49**: 414-422.
- RODRÍGUEZ, F. y J. I. NAVAS, 1995 A comparison of gill and hemolymph assays for the thioglycollate diagnosis of *Perkinsus atlanticus* (Apicomplexa, Perkinsea) in clams, *Ruditapes decussatus* (L.) and *Ruditapes philippinarum* (Adams et Reeve). *Aquaculture* **132**: 145-152.
- RODRÍGUEZ, F., T. GODOY y J. I. NAVAS, 1994 Cross-infection with *Perkinsus atlanticus* in *Ruditapes decussatus*, *Ruditapes philippinarum* and *Venerupis pul-lastra*. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* **14**: 24-27.
- RUSSELL, S., S. FRASCA J. R. y I. SUNILA, 2004 Application of a multiplex PCR for the detection of protozoan pathogens of the eastern oyster *Crassostrea virginica* in field samples. *Diseases of Aquatic Organisms* **59**: 85-91.
- SAGRISTÀ, E., M. DURFORT y C. AZEVEDO, 1992 *Perkinsus* sp. (phylum Apicomplexa) in Mediterranean clam *Ruditapes semidecussatus* from Spain: ultrastructural study of the response of the host tissues. Abstracts of the 5th International Colloquium on Pathology in Marine Aquaculture (PAMAQ V). Montpellier, Francia, p. 17.
- SAGRISTÀ, E., M. DURFORT y C. AZEVEDO, 1995 *Perkinsus* sp. (Phylum Apicomplexa) in Mediterranean clam *Ruditapes semidecussatus*: ultrastructural observations of the cellular response of the host. *Aquaculture* **132**: 153-160.
- SALDARRIAGA, J. F., M. L. MCEWAN, N. M. FAST, F. J. TAYLOR y P. J. KEELING, 2003 Multiple protein phylogenies show that *Oxyrrhis marina* and *Perkinsus marinus* are early branches of the dinoflagellate lineage. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **53**: 355-365.
- SANTMARTÍ, M. M., J. GARCÍA VALERO, J. MONTES, A. PECH y M. DURFORT, 1995 Seguimiento del protozoo *Perkinsus* sp. en las poblaciones de *Tapes decussatus* y *Tapes semidecussatus* del delta del Ebro. En: Castelló F, Calderer (eds) *Actas del V Congreso Nacional de Acuicultura*, May 10-13, 1995, S. Carlos de la Rápita, Spain, Universidad de Barcelona, Barcelona, Spain, pp. 260-265.
- SCANLON, C. H., L. M. RAGONE CALVO y E. M. BURRESON, 1997 The potential for transmission of *Perkinsus marinus* by fecal matter from the Eastern oyster, *Crassostrea virginica*. *Journal of Shellfish Research* **16**: 332.
- SCHOTT, E. J. y G. R. VASTA, 2003 The PmSOD1 gene of the protistan parasite *Perkinsus marinus* complements the *sod2Δ* mutant of *Saccharomyces cer-*



- evisiae*, and directs an iron superoxide dismutase to mitochondria. Molecular and Biochemical Parasitology **126**: 81-92.
- SCHOTT, E. J., W. T. PECHER, F. OKAFOR y G. R. VASTA, 2003a The protistan parasite *Perkinsus marinus* is resistant to selected reactive oxygen species. Experimental Parasitology **105**: 232-240.
- SCHOTT, E. J., J. A. F. ROBLEDÓ, A. C. WRIGHT, A.M. SILVA y G. R. VASTA, 2003b Gene organization and homology modeling of two iron superoxide dismutases of the early branching protist *Perkinsus marinus*. Gene **309**: 1-9.
- SIDDALL, M. E., K. S. REECE, J. E. GRAVES y E. M. BURRESON, 1997 'Total evidence' refutes the inclusion of *Perkinsus* species in the phylum Apicomplexa. Parasitology **115**: 165-176.
- SOBRAL, P. y J. WIDDOWS, 1997 Influence of hypoxia and anoxia on the physiological responses of the clam *Ruditapes decussatus* from southern Portugal. Marine Biology **127**: 455-461.
- SOKOLOVA, I. M., J. D. OLIVER y L. J. LEAMY, 2006 An AFLP approach to identify genetic markers associated with resistance to *Vibrio vulnificus* and *Perkinsus marinus* in eastern oysters. Journal of Shellfish Research **25**: 95-100.
- SONIAT, T. M., 1996 Epizootiology of *Perkinsus marinus* disease of eastern oysters in the Gulf of Mexico. Journal of Shellfish Research **15**: 35-43.
- SONIAT, T. M. y E. V. KORTRIGHT, 1998 Estimating time to critical levels *Perkinsus marinus* in eastern oysters, *Crassostrea virginica*. Journal of Shellfish Research **17**: 1071-1080.
- SONIAT, T. M., J. M. KLINCK, E. J. POWELL y E. E. HOFMANN, 2005 Understanding the success and failure of oyster populations: climatic cycles and *Perkinsus marinus*. Journal of Shellfish Research **24**: 83-93.
- SONIAT, T. M., E. E. HOFMANN, J. M. KLINCK y E. J. POWELL, 2009 Differential modulation of eastern oyster (*Crassostrea virginica*) disease parasites by El Niño-Southern Oscillation and the North Atlantic Oscillation. International Journal of Earth Sciences **98**: 99-114.
- SOUDANT, P. y F. L. E. CHU, 2001 Lipid class and fatty acid composition of the protozoan parasite of oysters, *Perkinsus marinus* cultivated in two different media. Journal of Eukaryotic Microbiology **48**: 309-319.
- SOUDANT, P., R. LEITE, F.-L. E. CHU, A. VILLALBA y L. CANCELA, 2008 Bivalves-*Perkinsus* spp. interactions. En: A. Villalba (ed.) Workshop for the analysis of the impact of perkinsosis to the European shellfish industry. Centro de Investigacións Mariñas, Consellería de Pesca e Asuntos Marítimos da Xunta de Galicia, Vilanova de Arousa, Spain. Centro Tecnológico del Mar – Fundación CETMAR, Vigo, Spain. pp:78-109.



- STEINERT, S. A. y G. V. PICKWELL, 1985 Multiple forms of lysozyme in copper stressed mussels (*Mytilus edulis*). *Marine Environmental Research* **17**: 211-214.
- STELTER, K., N. M. EL-SAYED y F. SEEGER, 2007 The expression of a plant-type ferredoxin redox system provides molecular evidence for a plastid in the early dinoflagellate *Perkinsus marinus*. *Protist* **158**: 119-130.
- SUNILA, I. y J. LABANCA, 2003 Apoptosis in the pathogenesis of infectious diseases of the eastern oyster *Crassostrea virginica*. *Diseases of Aquatic Organisms* **56**: 163-170.
- TALL, B. D., J. F. LA PEYRE, J. W. BIER, M. D. MILIOTIS, K. E. HANES *et al.*, 1999 *Perkinsus marinus* extracellular protease modulates survival of *Vibrio vulnificus* in Eastern oyster (*Crassostrea virginica*) hemocytes. *Applied Environmental Microbiology* **65**: 4261-4263.
- TANGUY, A., X. GUO y S. E. FORD, 2004 Discovery of genes expressed in response to *Perkinsus marinus* challenge in Eastern (*Crassostrea virginica*) and Pacific (*C. gigas*) oysters. *Gene* **338**: 121-31.
- TASUMI, S. y G. R. VASTA, 2007 A tandem repeat galectin from hemocytes of the oyster *Crassostrea virginica* is a receptor for the protistan parasite *Perkinsus marinus*. *Glycobiology* **18**: 951.
- TELES-GRILLO, M. L., J. TATO-COSTA, S. M. DUARTE, A. MAIA, G. CASAL *et al.*, 2007 Is there a plastid in *Perkinsus atlanticus* (phylum Perkinsozoa)? *European Journal of Protistology* **43**: 163-167.
- ULRICH P. N., J. W. EWART y A. G. MARSH, 2007 Prevalence of *Perkinsus marinus* (Dermo), *Haplosporidium nelsoni* (MSX), and QPX in bivalves of Delaware's inland bays and quantitative, high-throughput diagnosis of Dermo by QPCR. *Journal of Eukaryotic Microbiology* **54**: 520-526.
- VALIULIS, G. A. y J. G. MACKIN, 1969 Formation of sporangia and zoospores by *Labyrinthomyxa* sp. parasitic in the clam *Macoma balthica*. *Journal of Invertebrate Pathology* **14**: 268-270.
- VASTA, G. R., J. T. SULLIVAN, T. C. CHENG, J. J. MARCHALONIS y G. W. WARR, 1982 A cell membrane-associated lectin of the oyster hemocyte. *Journal of Invertebrate Pathology* **40**: 367-377.
- VASTA, G. R., T. C. CHENG y J. J. MARCHALONIS, 1984. A lectin on the hemocyte membrane of the Oyster (*Crassostrea virginica*). *Cellular Immunology* **88**: 475-488.
- VENEGAS-CALERÓN, M., F. BEUDON, O. SALANOVA y J. A. NAPIER, 2007 Cotranscribed genes for long Caín polyunsaturated fatty acid biosynthesis in the protozoan *Perkinsus marinus* incluye a plant-like FAE1 3-ketoacyl-CoA synthase. *Journal of Biological Chemistry* **282**: 2996-3003.



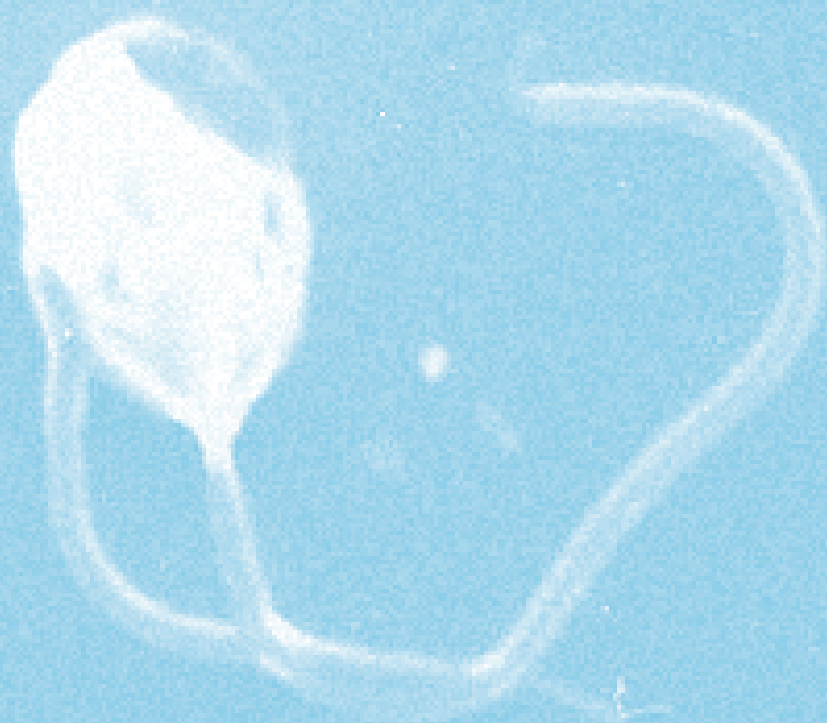
- VILLALBA, A. (Editor), 2008 Workshop for the analysis of the impact of perkinsosis to the European shellfish industry. Centro de Investigacións Mariñas, Consellería de Pesca e Asuntos Marítimos da Xunta de Galicia, Vilanova de Arousa, Spain. Centro Tecnológico del Mar – Fundación CETMAR, Vigo, Spain. 164 p.
- VILLALBA, A. y J. I. NAVAS, 1988 Occurrence of *Minchinia tapetis* and a *Perkinsus*-like parasite in cultured clams, *Ruditapes decussatus* and *R. philippinarum*, from south Atlantic coast of Spain. Preliminary results. Proceedings of the 3rd International Colloquium on Pathology in Marine Aquaculture (PAMAQ III). Gloucester Point, Virginia USA, p. 57-58
- VILLALBA, A., K. S. REECE, M. C. ORDÁS, S. M. CASAS y A. FIGUERAS, 2004 Perkinsosis in molluscs: A review. *Aquatic Living Resources* **17**: 411-432.
- VILLALBA, A., S. M. CASAS, M. C. LÓPEZ y M. J. CARBALLAL, 2005 Study of the perkinsosis of the carpet shell clam *Tapes decussatus* in Galicia (NW Spain). II. Temporal pattern of disease dynamics and association with clam mortality. *Diseases of Aquatic Organisms* **65**: 257-267.
- VILLAMIL, L., J. GÓMEZ-LEÓN y M. GÓMEZ-CHIARRI, 2007 Role of nitric oxide in the defenses of *Crassostrea virginica* to experimental infection with the protozoan parasite *Perkinsus marinus*. *Developmental and Comparative Immunology* **31**: 968-977.
- VOLETY, A. K. y F. L. E. CHU, 1994 Comparison of infectivity and pathogenicity of two life stages, meront (trophozoite) and prezoosporangia stages of the oyster pathogen *Perkinsus marinus* in Eastern oysters *Crassostrea virginica* (Gmelin 1971). *Journal of Shellfish Research* **13**: 521-527.
- VOLETY, A. K. y F. L. E. CHU, 1995 Suppression of chemiluminescence of eastern oyster (*Crassostrea virginica*) haemocytes by the protozoan parasite *Perkinsus marinus*. *Developmental and Comparative Immunology* **19**: 135-142.
- VOLETY, A. K. y F. L. E. CHU, 1997 Acid phosphatase activity in *Perkinsus marinus*, the protistan parasite of the American oyster, *Crassostrea virginica*. *Journal of Parasitology* **83**: 1093-1098.
- WILLSON, L. L. y L. E. BURNETT, 2000 Whole animal and gill tissue oxygen uptake in the Eastern oyster *Crassostrea virginica*: Effects of hypoxia, hypercapnia, air exposure, and infection with the protozoan parasite *Perkinsus marinus*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **246**: 223-240.
- WRIGHT, A. C., H. AHMED, J. D. GAUTHIER, A. M. SILVA y G. R. VASTA, 2002 cDNA cloning and characterization of two iron superoxide dismutases from the oyster parasite *Perkinsus marinus*. *Molecular and Biochemical Parasitology* **123**: 73-77.



- XUE, Q. G., G. L. WALDROP, K. L. SCHEY, N. ITOH, M. OGAWA *et al.*, 2006 A novel slow-tight binding serine protease inhibitor from eastern oyster (*Crassostrea virginica*) plasma inhibits perkinsin, the major extracellular protease of the oyster protozoan parasite *Perkinsus marinus*. *Comparative Biochemistry Physiology*, series B, **145**: 16-26.
- YARNALL, H. A., K. S. REECE, N. A. STOKES y E. M. BURRESON, 2000 A quantitative competitive polymerase chain reaction assay for the oyster pathogen *Perkinsus marinus*. *Journal of Parasitology* **86**: 827-837.
- YU, Z. y X. GUO, 2006 Identification and mapping of disease-resistance QTL in the eastern oyster, *Crassostrea virginica* Gmelin. *Aquaculture* **254**: 160-170.
- ZHANG, X, Y. LIANG, J. FAN, W. ZHANG, H. PU *et al.*, 2005 Identification of *Perkinsus*-like parasite in Manila clam, *Ruditapes philippinarum* using DNA molecular marker at ITS region. *Acta Oceanologica Sinica* 24: 139-144.

7

MARTEILIOSIS EN MOLUSCOS



MARTEILIOSIS EN MOLUSCOS

Aranguren R.¹, Poisa-Beiro L.¹, Villalba A.² y Figueras A.¹

¹Instituto Investigaciones Marinas. IIM-CSIC.

Eduardo Cabello 6, 36208 Vigo, España

²Centro de Investigaciones Mariñas (CIMA). Consellería do Mar.

Pedras de Corón s/n. 36620 Vilanova de Arousa, España

Resumen

Los parásitos de moluscos pertenecientes al phylum Paramyxea se encuentran entre los más importantes que parasitan a moluscos bivalvos en todo el planeta. Actualmente, dentro de este filo se incluyen dos géneros que afectan a estos animales: el género *Marteilia* y el género *Marteilioides*.

Los miembros más importantes y mejor estudiados hasta el momento de este filo son dos especies que pertenecen al género *Marteilia*: *Marteilia refringens* y *Marteilia sydneyi*. *M. refringens* es el parásito responsable de la enfermedad de los Abers o enfermedad de la glándula digestiva de la ostra plana, *Ostrea edulis*. Es la causa de una importante mortalidad de estas ostras en verano en la costa atlántica europea. *M. sydneyi* es el agente etiológico de la enfermedad QX que afecta a la ostra de roca de Sydney, *Saccostrea commercialis* en la costa este de Australia.

Marteilia refringens ha causado importantes pérdidas económicas en el sector de la acuicultura y por eso, actualmente, es un patógeno de declaración obligatoria listado por la Organización Mundial de Sanidad Animal (O.I.E. 2009).

Abstract

The parasites of mollusks belonging to the phylum Paramyxea are among the most significant that parasitize bivalves worldwide. Currently, within

this phylum includes two genera that affect these animals: genus *Marteilia* and genus *Marteilioides*.

Members of this phylum most important and best studied are two species belonging to the genus *Marteilia*: *Marteilia refringens* and *Marteilia sydneyi*. *M. refringens* is the parasite responsible for the Aber disease or digestive gland disease of the flat oyster, *Ostrea edulis*. It causes significant mortality of oysters in summer on the European Atlantic coast. *M. sydneyi* is the etiologic agent of QX disease that affects the Sydney rock oyster, *Saccostrea commercialis* on the east coast of Australia.

Marteilia refringens has caused heavy economic losses to aquaculture and so, now, are a notifiable pathogen listed by the World Organisation for Animal Health (O.I.E. 2009).

1. INTRODUCCIÓN

El phylum Paramyxea engloba a un importante grupo de protozoos parásitos de invertebrados marinos. Actualmente, dentro de este filo se incluyen dos géneros que afectan a moluscos bivalvos de interés comercial, el género *Marteilia* (GRIZEL *et al.* 1974) y el género *Marteilioides* (COMPS *et al.* 1986). Sin embargo, los parásitos pertenecientes a este filo no sólo afectan a los bivalvos, sino que afectan también a una gran variedad de invertebrados marinos como pueden ser los crustáceos y los anélidos. Probablemente, la biodiversidad de estos protozoos está subestimada debido al limitado número de estudios que se han realizado acerca de los parásitos que afectan a los invertebrados de ambientes marinos.

Los parásitos pertenecientes al género *Marteilia* han ido ganando protagonismo en el mundo de la patología de bivalvos durante las últimas décadas, ya que afectan a moluscos bivalvos de gran interés económico para la acuicultura europea, como son la ostra plana, *Ostrea edulis*, y los mejillones *Mytilus galloprovincialis* y *Mytilus edulis*.

Dentro del género *Marteilia*, la especie *Marteilia refringens* (GRIZEL *et al.* 1974; PERKINS 1976) es la causante de la enfermedad de los Abers, que ha causado importantes mortalidades desde su descubrimiento en 1968 en *Ostrea edulis* en Europa (HERRBACH 1971; GRIZEL *et al.* 1974; ALDERMAN 1979; GRIZEL 1985), y *Marteilia sydneyi* (PERKINS y WOLF 1976)



es responsable de la enfermedad conocida como QX, causante de altas mortalidades en la ostra *Saccostrea glomerata* en Australia.

Dentro del género *Marteilioides* se incluyen tan sólo dos especies, *Marteilioides chungmuensis* (COMPS *et al.* 1986), parásito de la ostra *Crassostrea gigas* en Japón y Corea, y *M. branchialis* (ANDERSON y LESTER 1992) descubierta en Australia en *Saccostrea glomerata*. Ambos parásitos causan lesiones focales, ocasionando la reducción del crecimiento, merma de la calidad y, a veces, la muerte del molusco.

Los protozoos parásitos que afectan a los moluscos bivalvos pertenecientes a este *phylum* han sido muy estudiados desde 1988 (FIGUERAS y MONTES). En este capítulo haremos una revisión actualizada de la marteiliosis haciendo especial hincapié en la taxonomía, epidemiología, patología y métodos de control de la enfermedad.

2. TAXONOMÍA DEL PHYLUM PARAMYXEA

La taxonomía de las especies de *Marteilia* ha estado marcada por una gran controversia. Recientemente, gracias a los avances en biología molecular, se ha podido ir esclareciendo esta situación. El filo paramyxea al que pertenecen actualmente cuatro géneros (*Marteilia*, *Paramarteilia*, *Paramyxa* y *Marteilioides*) ha experimentado varios cambios en los últimos años. Inicialmente, los géneros *Marteilia* y *Paramarteilia* fueron incluidos dentro del filo Haplospora debido a la presencia de estructuras similares a los haplosporosomas (PERKINS 1979). SPRAGUE creó el filo Ascetospora dentro del cual fue incluido *Marteilia* en la clase Stellatosporea (Familia Marteiliidae, orden Occlusosporidia) mientras que *Paramarteilia* fue incluido en la clase Paramyxea (Orden Paramyxia). Esta clasificación fue mantenida por LEVINE *et al.* (1980) y SPRAGUE (1982). Posteriormente, debido a la naturaleza plurinuclear y a la producción endógena de células, *Marteilia*, *Paramarteilia* y *Paramyxa* fueron incluidos en la clase Paramyxea dentro del filo Ascetospora (DESPORTES 1981; DESPORTES y LOM 1981; DESPORTES y NASHED 1983), englobando a *Marteilia* y *Paramarteilia* en el orden Marteilidea y a *Paramyxa* en el orden Paramyxidea.

Existen descripciones de *Marteilia refringens* desde los años 70 (COMPS 1970; HERRBACK 1971; BONAMI *et al.* 1971; GRIZEL *et al.* 1974). En



un principio se clasificó al parásito *Marteilia refringens* como un hongo perteneciente al orden Chytridiales (HERRBACH 1971) por su asociación con animales muertos o moribundos. Desde entonces su posición taxonómica ha ido cambiando de Labyrinthomyxa también de naturaleza fúngica (GRIZEL y TIGÉ 1973) a Microspora (GRIZEL *et al.* 1974). El género *Marteilia* ha estado también ligado con los haplosporidios debido a la presencia de gránulos en la membrana similares a los de los haplosporidios (COMPS 1970; PERKINS 1975; 1976) y a los myxosporidios debido al proceso de desarrollo caracterizado por ser pluricelulares y poseer una individualización somática temprana (DESORTES y GINSBURGUER-VOGEL 1977; DESORTES y LOM 1981). En 1984, CORLISS hizo una revisión del reino protista como un grupo polifilético que requiere de más estudios. En 1990 DESORTES y PERKINS propusieron elevar la clase Paramyxea a filo, en el que se incluían los géneros *Marteilia*, *Paramarteilia*, *Paramyxa* y *Marteilioides*. Este último género incluye a dos especies: *Marteilioides chungmensis*, parásito de *Crassostrea gigas* descrito en Japón (COMPS *et al.* 1986) y observado también recientemente en *C. nippona* (ITO *et al.* 2004); y *M. branchialis*, parásito observado en Australia en *Saccostrea glomerata* (ANDERSON y LESTER 1992).

Recientemente, se ha secuenciado el ADN ribosómico de la subunidad menor de *Marteilia refringens* y se han llevado a cabo nuevos estudios filogenéticos (BERTHE *et al.* 2000). Estos estudios validaron la descripción del filo Paramyxea que habían hecho DESORTES y PERKINS en 1990. Así, los resultados indicaron que *Marteilia refringens* no está relacionada con ningún filo eucariótico del que se conozca su ADN ribosómico de la subunidad menor. Los resultados también confirmaron que *Marteilia refringens* no está relacionada con Myxosporidia ni con Haplosporidia. Sin embargo, análisis moleculares muestran evidencias de que los Haplosporidia forman un orden dentro del filo Cercozoa (CAVALIER-SMITH y CHAO 2003) y que Haplosporidia y Paramyxea son órdenes separados dentro de dicho filo. Esta posición es algo controvertida ya que existen otros estudios que parecen indicar que Haplosporidia está relacionado con Cercozoa, como taxón hermano, pero no dentro del filo Cercozoa (BURRESON comunicación personal). Aunque los valores que lo refrendan son bajos (*Marteilia* comparte una delección de un nucleótido con especies de *Haplosporidium* y de *Minchinia*)



CAVALIER-SMITH y CHAO consideran que *M. refringens* es un haplosporidio. Esta controversia podría esclarecerse en un futuro próximo gracias al rápido desarrollo de la biología molecular.

Por lo tanto, basándonos en la secuenciación del ADN ribosómico de la subunidad menor, el análisis filogenético sugiere un origen evolutivo temprano de Paramyxea (BERTHE *et al.* 2000). Este dibujo basal topológico, hecho a partir del análisis del rDNA, está siendo reconocido cada vez con más fuerza como un artefacto debido a la gran variación en el ratio de la evolución molecular entre el taxón de eucariotas (PEYRETAILLADE *et al.* 1998; STILLER *et al.* 1999). El principio de los linajes emergentes habría podido evolucionar mucho más rápido que para muchos eucariotas, tal y como ocurre con la mayoría de los organismos parásitos. El impacto de estos altos ratios evolutivos pudo haber sido modulado al aumentar el número de secuencias disponibles para realizar el análisis filogenético (ITOY *et al.* 2003; KLEEMAN *et al.* 2004; PUTINAOWARAT, TAVEEKIJAKARN, SOMSIRI y BERTHE, datos sin publicar). En este sentido, sería necesario la secuenciación de otros genes de interés filogenético para poder llegar a entender el origen evolutivo de los Paramyxeos.

Actualmente, la clasificación seguida por la mayoría de los patólogos de moluscos es la de DESPORTES Y PERKINS de 1990, corroborada por BERTHE *et al.*, 2000. En dicha clasificación se considera que el filo *Paramyxea* incluye dos clases: Marteiliidea y Paramyxidea. La clase Marteiliidea contiene tres géneros; *Marteilia* (GRIZEL *et al.* 1974), *Paramarteilia* (GINSBURGUER-VOGEL y DESPORTES 1979b) y *Marteilioides* (COMPS *et al.* 1986). La clase Paramyxidea incluye un único género, *Paramyxa* (CHATTON 1911) (Figura 1).

2.1. Clase Marteiliidea

2.1.1. *Marteilia*

El género *Marteilia* engloba varias especies. *Marteilia refringens* que se ha observado en ostras, *O. edulis*, *O. angasi*, *O. puelchana*, *O. chilensis* (GRIZEL *et al.* 1974; GRIZEL *et al.* 1982; PASCUAL *et al.* 1991; BOUGRIER *et al.* 1986) y en mejillones *M. edulis* y *M. galloprovincialis* (TIGÉ y RABOUIN 1976; VILLALBA *et al.* 1993c). También se han encontrado células de

FIGURA 1.

Phylum Paramyxea propuesto por Desportes y Perkins (1990) y confirmado por Berthe *et al.*, (2000). Modificado por AUDERMARD (2001)

Phylum Paramyxea (DESPORTES Y PERKINS, 1990)

La esporulación resulta de una serie de diferenciaciones de una célula ameboide que germina a partir de esporas en los tejidos de los invertebrados marinos. Su desarrollo se caracteriza por la producción de células descendientes que quedan dentro de la célula parental.

Clase 1: Marteiliidea (DESPORTES Y GINSBURGER VOGEL 1977)

Con tres géneros:

- *Marteilia* (parásito de bivalvos marinos)
- *Paramartellia* (parásito del crustáceo anfípodo marino *Orchestia gammarellus*)
- *Marteilioides* (parásito de bivalvos marinos)

Clase 2: Paramyxidea (CHATTON, 1911)

Supuesta meiosis con eliminación de un glóbulo polar.

1 género:

- *Paramyxa* (parásito del anélido poliqueto *Poecilochaetus serpens*)

M. refringens en la ostra *Crassostrea gigas* (CAHOUR 1979; MONTES *et al.* 1998) y presumiblemente en la ostra americana, *C. virginica* (RENAULT *et al.* 1995). De todos modos, estos casos no se asociaron con infecciones viables ya que las formas detectadas de *Marteilia* no evolucionaban a estadios maduros y su presencia se podría interpretar como resultado de la condición filtradora del organismos (BERTHE *et al.* 2004).

Recientemente, se han detectado células de *M. refringens* en la glándula digestiva de *Solen marginatus* y *Chamelea gallina* en España (LOPEZ FLORES *et al.* 2008a,b). En ambos casos la presencia del parásito fue confirmada mediante PCR e hibridación *in situ*. En ambas especies de moluscos se encontraron estadios maduros del parásito, pudiendo considerarse como nuevas especies hospedadoras de *M. refringens*.

Otra especie del género *Marteilia*, *M. maurini*, se describió en el mejillón *M. edulis* y *M. galloprovincialis* en Francia (COMPS *et al.* 1981; 1982; AUFFRET y PODER 1985).

En Australia, *M. sydneyi* se describió en *Saccostrea glomerata* (PERKINS y WOLF 1976). Más tarde, la especie *M. christenseni* se describió en *Scrobicularia plana* (= *S. piperata*) por COMPS (1983) en la costa Atlántica de Francia, y *M. lengehi* en *Saccostrea cucullata* en el Golfo Pérsico (COMPS 1976) y posiblemente, en Australia (HINE 1996; HINE Y THORNE 2000).



La lista de especies en el género *Marteilia* no se debe dar por concluida ya que se han descrito aislados cuya validación está aún por aclarar. Así, en Europa, se han descrito *Marteilia* sp., en berberecho, *Cardium edule*, en almeja *Tapes decussatus*, *Tapes rhomboides* y *Tapes pullastra* (COMPS *et al.* 1975; PODER *et al.* 1983; VILLALBA *et al.* 1993a; FIGUERAS *et al.* 1996), en navajas *Ensis minor* y *E. siliqua* (CESCHIA *et al.* 2001) en *Solen marginatus* (LOPEZ y DARRIBA 2006) y en mejillones, *Mytilus modiolus*, *M. edulis* y *M. galloprovincialis* (COMPS *et al.*, 1975; PODER *et al.*, 1983; AUFFRET y PODER 1985, 1987; CESCHIA *et al.* 1991; FIGUERAS *et al.* 1991, ZRNCIC *et al.* 2001; ICES-WGPDMO 2006) aunque éstos últimos informes se refieren a aislados de *M. maurini*. Hay otros casos descritos de marteiliosis en moluscos, concretamente en *Argopecten gibbus* en Florida (MOYER *et al.* 1993) y en *Tridacna máxima* en Fiji (NORTON *et al.* 1993). Más recientemente, también se han observado organismos del filo Paramyxea relacionados con *Marteilia* en la ostra *Saccostrea forskali* en Tailandia (TAVEEKIJAKARN *et al.* 2002) y en la ostra *Pinctada margaritifera* de Australia (BERTHE *et al.* 2004) y en *Ruditapes philippinarum* en Japón (ITOY *et al.* 2005). Es de suponer que se seguirán describiendo nuevos casos de marteiliosis en nuevas especies de moluscos ya que cada vez se están realizando más estudios de patología en el campo de la acuicultura.

Marteilia refringens = ó ≠ *Marteilia maurini*

A pesar de todos los casos de Marteiliosis detectados en moluscos a lo largo de los años, todavía existe cierto debate en cuanto a su posición taxonómica. La ultraestructura y la especificidad del hospedador se emplearon en el pasado como características diferenciadoras de estas dos especies (GRIZEL *et al.* 1974; COMPS *et al.* 1981; AUFFRET y PODER 1985). Pero tras la observación de *Marteilia refringens* en mejillones, la especificidad del hospedador quedó invalidada como argumento (VILLALBA *et al.* 1993c; ROBLEDO y FIGUERAS 1995). Estas descripciones, junto con el hecho de que los anticuerpos monoclonales y policlonales obtenidos para reaccionar con *Marteilia* sp., aislada de *M. edulis*, mostraron reacción cruzada con *Marteilia* sp., aislada de *O. edulis* durante ensayos inmunológicos (TISCAR *et al.* 1993; ROBLEDO *et al.* 1994; BERTHE *et al.* 2004), pero no reaccionaron con *M. sydneyi*



(ANDERSON *et al.* 1994a) plantearon interrogantes en el ámbito taxonómico. La imposibilidad de establecer diferencias entre ambas especies en base a criterios ultraestructurales apuntada por VILLALBA *et al.* (1993c) se corroboró con estudios posteriores, haciendo énfasis en los haplosporosomas, inclusiones estriadas y la morfología de la pared de la espora, llegándose a la conclusión de que *Marteilia maurini* aislada de mejillones *M. edulis* y *M. galloprovincialis* no se podía separar de la *Marteilia refringens* aislada de *Ostrea edulis* (LONGSHAW *et al.* 2001).

Se llevaron a cabo distintos estudios moleculares para intentar aclarar la duda planteada. Estudios basados en el gen del ARNr 18S demostraron que este gen no tiene suficiente potencia para discriminar entre las presuntas especies ya que presenta una fuerte constricción evolutiva (BERTHE *et al.* 2000; CAVALIER-SMITH y CHAO 2003). Posteriormente, se analizó la región del primer espaciador transcrito interno (ITS-1) del gen del rRNA (LE ROUX *et al.* 2001). Esta región es más polimórfica que la región 18S rDNA, es decir, acumula cambios en la secuencia de ADN más rápidamente. Otros estudios basados en polimorfismos en la región del espaciador ITS-1 habían ayudado a aclarar las relaciones de parentesco entre algunos grupos de parásitos (HIDE Y TAIT 1991). Este estudio demostró un claro dimorfismo que proponía la existencia de dos especies de *Marteilia* en Europa (LE ROUX *et al.* 2001).

Sin embargo, posteriormente se realizó un nuevo estudio basado en el rADN del espaciador ribosómico intergénico (IGS) de *Marteilia* (LOPEZ-FLORES *et al.* 2004) que evoluciona más rápidamente que el ITS-1, y posicionó a los dos parásitos como dos subtipos de una misma especie de *Marteilia refringens*. Este resultado se basó en que la variabilidad intraespecífica encontrada en la secuencia IGS fue similar a la variabilidad interespecífica, lo cual no permitiría diferenciar genéticamente a dos especies diferentes.

2.1.2. *Paramarteilia*

Cuando hablamos del género *Paramarteilia*, pasamos de hablar de los moluscos como hospedadores a que lo sean los crustáceos. Así, *Paramarteilia orchestiae* es un parásito de especies anfípodas como *Orchestia gammarellus*, *O. mediterránea* y *O. aestuarensis*



(GINSBURGUER-VOGEL *et al.* 1976; GINSBURGER-VOGEL y DESPORTES 1979a,b; GINSBURGUER-VOGEL 1991).

2.1.3. *Marteilioides*

Dentro del género *Marteilioides* se conocen 2 especies, *Marteilioides chungmuensis* y *M. branchialis*. La primera es un parásito de los ovocitos y se ha descrito en *Crassostrea gigas* de distintas regiones del Pacífico (COMPS *et al.* 1986, 1987; PARK y CHUNG 1989; ITOH *et al.* 2002). Aunque fue descrita, formalmente, por COMPS y colaboradores en 1986 ya se había hablado de esta especie con anterioridad en varios artículos en los que se describía como ameba-like en gónadas de ostras recolectadas en la costa sur de Corea (CHUNG 1970; 1972; 1979) y Japón (MATSUZATO *et al.* 1977). También se han registrado casos de protistas en *C. gigas* en EEUU (BECKER y PAULEY 1968) que se interpretaron como *M. chungmuensis* (HINE 1996). Por otra parte, se detectó un parásito protista en el ovario de la ostra *Saccostrea echinata* (WOLF 1977) que podría ser *M. chungmuensis* descrito anteriormente en Australia (HINE 1996). Y más recientemente, se han descrito la presencia de organismos *Marteilioides*-like en la almeja japonesa, *Ruditapes philippinarum*, en la costa sur de Corea (LEE *et al.* 2001) y en Japón (ITOY *et al.* 2005). Por último, otra especie del género, *Marteilioides M. branchialis*, se describió en la ostra, *Saccostrea glomerata*, en Australia (ANDERSON y LESTER 1992).

2.2. Clase *Paramyxidea*

La clase *Paramyxidea* incluye el género *Paramyxa* (CHATTON 1911). *Paramyxa paradoxa* es un parásito de larvas planctónicas del poliqueto anélido, *Poecilochaetus serpens* (CHATTON 1911; DESPORTES y LOM 1981). Aunque este organismo comparte características comunes con los miembros de la clase *Marteiliidae*, se diferencia principalmente en que muestra un paso de división celular interpretado como una reducción cromática para dar lugar a la producción de un esporoplasma haploide (DESPORTES 1981).

Los esfuerzos desarrollados para abordar la sistemática de estos organismos, y el énfasis que se ha dado a la taxonomía y filogenia de este filo pueden resultar, aparentemente, sorprendentes. Sin embargo,



estos esfuerzos son llevados a cabo por razones de peso ya que, entre estos organismos, se encuentran algunos de los responsables de las mortalidades masivas y de las pérdidas económicas más importantes de la acuicultura. Debido a esto es de vital importancia diagnosticarlos adecuadamente para proveer una base científica en los programas de monitoreo (BERTHE *et al.* 1999).

3. PATOGENIA

Tal y como se ha comentado anteriormente, los parásitos del filo Paramyxea pueden tener un efecto letal en sus hospedadores. Así, *Marteilia refringens* es el agente causal de la enfermedad de los Abers, que provoca elevadas mortalidades en la ostra plana, *Ostrea edulis*, en Europa (ALDERMAN 1979; GRIZEL 1985), y *Marteilia sydneyi* es la responsable de la enfermedad QX en la ostra *Saccostrea glomerata* en Australia (PERKINS y WOLF 1976; ADLARD y ERNST 1995). *Marteiliodes chungmuensis* (COMPS *et al.* 1986) es también un patógeno serio que afecta a la ostra del Pacífico, *Crassostrea gigas*, especie de gran importancia en la ostricultura mundial, aunque el parásito no ocasiona mortandades masivas pero las lesiones que provoca suponen la pérdida de valor comercial del hospedador. En otros casos, como ocurre generalmente con *Mytilus* spp., pueden no ser los responsables de mortalidades elevadas, pero sí pueden provocar problemas de carácter fisiológico como la pérdida de índice de condición o problemas en el desarrollo gonadal (VILLALBA *et al.* 1993b; PÉREZ CAMACHO *et al.* 1997).

Los Paramyxea afectan principalmente a dos sistemas, el digestivo y el reproductivo (BERTHE *et al.* 2004). Existen algunas excepciones como es el caso de *Marteiloides branchialis* que afecta a las branquias de su hospedador *S. glomerata* (ANDERSON y LESTER 1992). En el caso del género *Marteilia*, la glándula digestiva parece ser el órgano diana, a excepción del hospedador *A. grani*, donde el parásito se localiza en el ovario del copépodo (AUDERMARD *et al.* 2002) o *Marteilia* sp. que afecta al tejido renal de *Tridacna maxima* (NORTON *et al.* 1993). Es de resaltar este hecho de que *M. refringens* se desarrolle en el ovario del copépodo *A. grani*. Si se tiene en cuenta que en su hospedador inmediatamente precedente, la ostra *O. edulis*, el parásito afecta al



sistema digestivo, parece ser que el mismo parásito alterna diferentes tejidos diana según la especie a la que parasita (BERTHE *et al.* 2004).

Los efectos patológicos producidos por los paramyxeos sobre los hospedadores han sido ampliamente descritos para la ostra *Ostrea edulis* y mejillones *Mytilus* spp. causados por el parásito *Marteilia refringens* y para la ostra *Saccostrea glomerata* causados por el parásito *Marteilia sydneyi*.

Marteilia refringens parasita el sistema digestivo de *Ostrea edulis*. Las ostras planas parasitadas experimentan la disminución o ausencia de crecimiento y muestran una masa visceral decolorada de tono amarillo claro (COMPS 1970). El parásito progresa a expensas de las células epiteliales del sistema digestivo del hospedador, limitando la actividad metabólica de éste y perturbando sus funciones digestivas, así mismo, produce obturación mecánica a nivel de los túbulos hepatopancreáticos (COMPS 1970; GRIZEL *et al.* 1974). De esta manera la acción patógena de *M. refringens* puede dar lugar a una modificación del metabolismo celular de la ostra, así como a la desintegración de los túbulos digestivos. Las esporas maduras de *Marteilia refringens*, se liberan al medio ambiente a través del lumen de los túbulos digestivos y del intestino. Esta liberación está asociada con la destrucción del epitelio de la glándula digestiva del hospedador y de los túbulos digestivos secundarios (ALDERMAN 1979; ROBLED0 y FIGUERAS 1995). Algunos autores también han sugerido la existencia de una toxina segregada por el parásito (GRIZEL *et al.* 1974). En cuanto al metabolismo del hospedador, *M. refringens* puede interferir con la acumulación de glucógeno de reserva (GRIZEL *et al.* 1974). Por otro lado, la presencia del parásito también tiene efectos negativos en la gametogénesis y en el desarrollo gonadal (ROBERT *et al.* 1991). Todos estos factores tienen como resultado final una inhibición del crecimiento, una elevada pérdida de índice de condición y, finalmente, pueden causar la muerte del individuo (FIGUERAS y VILLALBA 1988; FIGUERAS *et al.* 1991). En estadios terminales de la enfermedad, las ostras exhaustas no son capaces de cerrar las valvas (HIS *et al.* 1976). La marteiliosis afecta a las ostras principalmente durante el verano. En Europa, se han descrito infecciones por *Marteilia* desde Mayo a Diciembre con un pico entre Junio y Agosto (GRIZEL 1985, AUDERMARD *et al.* 2001), mientras que en Australia



la infección por *M. sydneyi* en la ostra *S. glomerata* empieza en Enero con un pico en Febrero y las mortalidades asociadas a la infección se detectan a lo largo de todo Abril y Mayo (PETERS y RAFTOS 2003).

Los problemas que produce *M. refringens* sobre los mejillones *Mytilus edulis* y *Mytilus galloprovincialis* son similares a los descritos en *Ostrea edulis*. En casos de infección severa se reduce la absorción de materia orgánica por parte del bivalvo (PÉREZ CAMACHO *et al.* 1997). Este tipo de infecciones también pueden producir una pérdida en el índice de condición como consecuencia de una reducción en el aporte energético. Además, el parásito puede interferir directamente sobre el proceso de alimentación y asimilación del hospedador simplemente con su presencia. El desarrollo de células adipo-granulares de almacenaje en el manto del mejillón, *Mytilus galloprovincialis*, se ve disminuido por la presencia de *Marteilia refringens* (VILLALBA *et al.* 1993b). Al igual que ocurre con *O. edulis* las esporas maduras también rompen los túbulos digestivos al ser liberadas al medio externo (ROBLEDO y FIGUERAS 1995). Como se ha comentado anteriormente, el parásito también tiene efectos negativos sobre el desarrollo gonadal de los mejillones, ya que la presencia del mismo puede llegar a reducir la gametogénesis significativamente, haciendo que los individuos más parasitados sean incapaces de empezar un nuevo ciclo gametogénico al año siguiente (VILLALBA *et al.* 1993b). En el caso de los mejillones hay discrepancias entre autores a la hora de valorar el potencial letal de este parásito, así mientras algunos autores han responsabilizado a *Marteilia refringens* de mortalidades altas en mejillón (VILLALBA *et al.* 1993c; FUENTES *et al.* 1994) otros indican que la patogénesis de este paramyxio no está asociada a mortalidades (COMPS *et al.* 1982; LONGSHAW *et al.* 2001).

Marteilia refringens, durante su ciclo de vida, también afecta al tejido ovárico del copépodo *Acartia grani* (AUDERMARD *et al.* 2002), sin embargo aún no se conocen los efectos dañinos que puede causarle al mismo. *Marteilia refringens* se observó en juveniles y adultos femeninos del copépodo, pero nunca se detectó en machos. El tejido ovárico de *Acartia grani* está completamente poblado por *M. refringens* en forma de numerosas y pequeñas células en el interior de los ovocitos (AUDERMARD *et al.* 2002). Este aparentemente elevado número de células parasíticas localizadas en el copépodo puede incrementar



la probabilidad de que el parásito encuentre el próximo hospedador dentro de su ciclo de vida. Morfológicamente, los estadios de *Marteilia refringens* observados en el copépodo parecen distintos de los observados en la glándula digestiva de la ostra, aunque son necesarios más estudios a nivel ultraestructural para confirmar ésto.

Los efectos causados por *Marteilia sydneyi* sobre *Saccostrea glomerata* son similares a los explicados anteriormente de *M. refringens* sobre *O. edulis* (WOLF 1979; PERKINS y WOLF 1976). En la infección por *Marteilia sydneyi*, se describió una reducción en la actividad fenoloxidasa, sugiriendo que la inhibición por el parásito pudiera facilitar el desarrollo de la enfermedad, ya que la cascada fenoloxidasa es un mecanismo de defensa del hospedador (PETERS y RAFTOS 2003).

En la almeja gigante, *Tridacna maxima*, se describió *Marteilia* sp. en los riñones, donde induce focos pulvulentos o acúmulos de pseudoquistes (NORTON *et al.* 1993). Aparentemente los quistes se forman a raíz de la proliferación del epitelio ciliado de los conductos renales. Aunque esta especie de *Marteilia* puede ser patogénica para el hospedador, al igual que en el caso anterior, no se ha vuelto a revisar desde su descripción inicial.

La infección por *Marteilia* sp. de la vieira *Argopecten gibbus* está asociada con la reducción del músculo aductor, la apertura de las valvas y retracción del manto. En los casos de infecciones muy severas el hospedador tiene que utilizar sus propios tejidos de forma catabólica para obtener la energía que no puede obtener a partir de la alimentación por lo que las mortalidades de éste se asocian a la falta de nutrientes (MOYER *et al.* 1993; BERTHE *et al.* 2004).

Otras especies destacables del género *Marteilia* son: *Marteilia lengehi* que afecta a *Saccostrea cucullata* del Golfo Pérsico y nordeste de Australia (COMPS 1976; HINE y THORNE 2000) y *Marteilia christenseni* que es un parásito de *Scrobicularia piperata* detectado en la costa Atlántica de Francia y parece no provocar ninguna reacción importante sobre su hospedador (COMPS 1983).

El género *Marteilioides* presenta también especies parásitas de moluscos. Así, *Marteilioides branchialis* causa múltiples lesiones focales (1-2 mm de diámetro) en las branquias de *S. glomerata*, estas lesiones están asociadas a la proliferación de las células epiteliales de la bran-



quia y a una infiltración de granulocitos (ANDERSON y LESTER 1992). Sin embargo, el modo de entrada de los patógenos en el hospedador no se conoce con precisión (ANDERSON *et al.* 1994a) y el patógeno no se ha vuelto a revisar desde su descripción original.

Marteilioides chungmuensis es un parásito que infecta el ovario de *Crassostrea gigas* (CHUNG 1979; COMPS *et al.* 1986; 1987, ITOH *et al.* 2002). El impacto de *M. chungmuensis* en el ciclo reproductivo de la ostra no está claro. Según PARK y CHUNG (1989) no hay una evidencia clara de ningún efecto dañino del parásito sobre el hospedador, aunque las ostras infectadas desarrollan una especie de nódulos en la gónada durante la época de puesta. Estas lesiones son apreciadas microscópicamente, lo que hace que este producto no sea aceptado en el mercado, llevando consigo unas serias pérdidas económicas. Las células parasíticas de *M. chungmuensis* se distribuyen normalmente en el interior del ovario, localizándose en el interior del oocito. En infecciones intensas, se observa una acumulación de los hemocitos en las proximidades de las paredes de los folículos (NGO *et al.* 2003). Los huevos infectados pueden ser retenidos en los folículos del ovario o expulsados al medioambiente a través de las branquias. Se han observado cambios estacionales en la prevalencia e intensidad de infección de *M. chungmuensis* en el ciclo reproductivo de *Crassostrea gigas* lo que sugiere que la infección puede causar un fallo en la puesta retrasándola o rompiendo los oocitos maduros.

Para hacer frente a los patógenos los moluscos cuentan con un sistema inmune. Sin embargo, el conocimiento que tenemos sobre la inmunología de moluscos es escaso. No obstante, se sabe que tan sólo poseen el sistema inmune innato, no adaptativo, dentro del que se encuentran los mecanismos de defensa humores y los mecanismos de defensa celulares que se explicarán con más detalle en otro capítulo de este libro.

Se ha constatado la implicación de algunos mecanismos de defensa en moluscos parasitados con especies del filo Paramyxea, así, la infección por *Marteilia refringens* puede producir un aumento significativo en el número de hemocitos en la hemolinfa de los moluscos afectados (CARBALLAL *et al.* 1998). En infecciones avanzadas se han podido observar infiltraciones hemocíticas de diferente grado alrededor de los



túbulos digestivos primarios y secundarios (ALDERMAN 1979; ROBLEDO y FIGUERAS 1995). Sin embargo, en fases iniciales de la infección los plasmodios situados en el epitelio del estómago y de los túbulos digestivos primarios parece que no provocan ninguna reacción hemocitaria (ROBLEDO y FIGUERAS 1995). En los casos en los que los plasmodios de *M. refringens* se localizan en las branquias del molusco pueden estar asociados a una fuerte infiltración hemocitaria en la zona adyacente al parásito (ROBLEDO y FIGUERAS 1995).

En el caso de infecciones iniciales de *M. sydneyi*, se ha observado hiperplasia epitelial, hipertrofia, fusión de los filamentos branquiales e infiltración hemocitaria (KLEEMAN *et al.* 2002a).

4. CICLO DE VIDA

En la actualidad no se conoce exactamente el ciclo de vida completo de *Marteilia refringens*, la parte más conocida es su desarrollo en la ostra, *Ostrea edulis*. En numerosos artículos publicados de este parásito paramyxio y de *Marteilia sydneyi* en Australia, se ha postulado la existencia de un ciclo de vida complejo aunque, como ya se comentó anteriormente, se desconoce su ciclo de vida exacto y los mecanismos de transmisión (BALOQUET 1979; BALOQUET *et al.* 1979; LAUCKNER 1983; GRIZEL 1985; FIGUERAS y MONTES 1988; BERTHE *et al.* 1998, KLEEMAN y ADLARD 2000; AUDERMARD *et al.* 2001; 2002).

Las primeras descripciones de *M. refringens* en ostra (HERRBACH 1971), pusieron en evidencia células esféricas uninucleadas del parásito que junto con otras células polinucleadas de tipo plasmodial (COMPS 1970) evolucionaban a estadios polinucleados maduros del mismo (GRIZEL *et al.* 1974). Estudios posteriores indicaron que estas células descritas por HERRBACH (1971) y COMPS (1970) se correspondían con estadios primarios del ciclo de desarrollo de *M. refringens*, conocidas como células primarias y células secundarias y se encontraban principalmente en el epitelio ciliado del estómago y de los túbulos digestivos primarios de la ostra plana (GRIZEL *et al.* 1974). Las células primarias se caracterizan por tener de 9 a 10 µm de diámetro y contener en el citoplasma inclusiones paracristalinas, formaciones vacuolares y haplosporosomas (PERKINS 1976). Mediante una diferenciación del



citoplasma del entorno de los núcleos (fruto de una división endógena del núcleo de la célula primaria) se forma un número variable de células secundarias (1-4 para *P. paradoxa*, 2-3 para *M. chungmuensis*, 8 para *M. refringens*, 1-12 para *P. orchestiae* y 8-16 para *M. sydneyi*) que se caracterizan por poseer un nucleolo voluminoso e inclusiones citoplasmáticas densas a los electrones. Posteriormente, estas células secundarias darán lugar, cada una de ellas, a cuatro células terciarias llamándose a este conjunto esporangio (GRIZEL *et al.* 1974; AUDERMARD *et al.* 2001). En el estadio de madurez la pared de la célula primaria se rompe produciéndose la liberación de los esporangios (HERRBACH 1971; GRIZEL 1985) observados en las heces del huésped y así liberados al medio externo (PERKINS 1976; AUDERMARD *et al.* 2002). El mismo patrón de desarrollo del parásito ha sido observado en los tejidos del mejillón (VILLALBA *et al.* 1993c; ROBLEDY FIGUERAS 1995). El proceso de esporulación del parásito en el mejillón está asociado a una colonización masiva de los divertículos digestivos, llegándose a ocupar hasta el 100% de los túbulos digestivos en un proceso sincrónico, que asegura que la producción de esporas se produzca simultáneamente en todos los túbulos digestivos afectados (VILLALBA *et al.* 1993c). Esta afección masiva de los divertículos digestivos se traduce en una reducción significativa de la absorción de materia orgánica por parte del mejillón (PÉREZ CAMACHO *et al.* 1997). En el caso de la infección de la ostra *S. glomerata* por *M. sydneyi*, también se constató un aumento exponencial del número total de parásitos en el proceso de colonización de los divertículos digestivos, llegándose al extremo de ocupar todo lugar disponible en el epitelio del 100% de los túbulos digestivos (KLEEMAN *et al.* 2002a). Estos autores demostraron que la infección comienza en el epitelio de branquias y palpos labiales de la ostra, desde donde el parásito prolifera a través del tejido conjuntivo y del circulatorio y alcanza los divertículos digestivos.

La dinámica del parásito parece estar influenciada de una forma importante por la temperatura (BALOUET 1977). Así, las tasas de parasitación e intensidad de infección de *M. refringens* sobre *O. edulis* en la costa atlántica de Francia son mayores en verano y menores en los meses de Marzo y Abril (GRIZEL 1985; AUDERMARD *et al.* 2001). La dinámica del parásito en *Mytilus* spp. es similar a la descrita para la ostra plana pero



existe una importante diferencia: las formas maduras de *M. refringens* se han observado con diferentes intensidades en el sistema digestivo de *Mytilus galloprovincialis* a lo largo de todo el año (VILLALBA *et al.* 1993c; ROBLEDO y FIGUERAS 1995). Parece que también influyen la salinidad y la tasa de renovación del agua en la distribución del parásito, así se observaron tasas de parasitación más elevadas en las zonas más internas de las rías gallegas (VILLALBA *et al.* 1993c; ROBLEDO y FIGUERAS 1995).

Observaciones de campo han llevado a los investigadores a sospechar la implicación de otras especies de hospedadores en la transmisión de *Marteilia refringens* (BALOUET 1979; BALOUET *et al.* 1979a; GRIZEL 1985, LESTER 1986). Así, se ha sugerido la implicación de peces filtradores o invertebrados ya que esporontes de *M. sydneyi* se liberan al medio ambiente antes de la muerte del hospedador (ROUBAL *et al.* 1989). Sin embargo, el alimento de peces con grandes cantidades de esporas no dio lugar a la infección; aparentemente, la espora pasaba a través del estómago. GRIZEL (1985) sugirió que las esporas de *Marteilia refringens* podrían requerir de un periodo previo de maduración en el agua de mar o en el sedimento antes de llegar a ser infectivas. En el caso de *M. sydneyi*, un estudio experimental había demostrado que las esporas tienen un período de vida corto una vez liberadas al medio ambiente (WESCHE *et al.* 1999). Este estudio también sugirió que no existen evidencias de que los pájaros o los peces jueguen un papel en el ciclo de vida o en la dispersión del parásito considerando que las esporas no sobreviven después de dos horas de ser ingeridas. Posteriormente, con la ayuda de la biología molecular, se pudo avanzar un poco más en estos estudios. Así, basándose en las secuencias del gen de la SSU rRNA de *Marteilia refringens*, se han desarrollado cebadores específicos y sondas para hibridación *in situ* permitiendo detectar ADN de *Marteilia* (LE ROUX *et al.* 1999; BERTHE *et al.* 2000). La PCR y la hibridación *in situ* representan unas herramientas muy valiosas de diagnóstico del patógeno en posibles hospedadores, porque son técnicas sensibles, rápidas e independientes del estadio de desarrollo del patógeno y de su lugar de localización en el hospedador (MIALHE *et al.* 1995). Usando la PCR se identificó el copépodo, *Paracartia (Acartia) grani* como hospedador potencial de *Marteilia refringens* (AUDERMARD *et al.* 2002) y su presencia en tejido ovárico de *A. grani* se confirmó



mediante hibridación *in situ*. En el mismo estudio, se demostró la transmisión del parásito entre *O. edulis* y *A. grani*, demostrándose que estas dos especies son contiguas en el ciclo de vida del parásito, sin embargo, los primeros intentos de transmisión reversa fallaron sugiriendo o bien la existencia de un segundo hospedador intermediario implicado, o bien, la necesidad de una fase previa de maduración del parásito en el medio. La implicación de *A. grani* en el ciclo de vida de *Marteilia refringens* parece consistente tanto con la ecología del copépodo como con la epidemiología de la enfermedad. *A. grani* se observa principalmente en primavera y verano de manera que el ciclo estacional de *Marteilia refringens* (que ya comentamos anteriormente) concuerda con el ciclo estacional de *A. grani* (GRIZEL 1985; AUDERMARD *et al.* 2002). Por otro lado, la distribución geográfica de *A. grani* también se asemeja a la distribución geográfica de *Marteilia refringens*. No obstante, todavía no se ha confirmado de manera fehaciente que la transmisión del parásito desde el copépodo al molusco sea viable, por lo que el papel del copépodo en el ciclo de vida del parásito no se ha aclarado suficientemente.

Recientemente, CARRASCO *et al.* 2008 observaron diferentes patrones de desarrollo del parásito en el copépodo *A. grani* dependiendo de la fuente de infección (ostras o mejillones) sugiriendo que aunque los últimos estudios genéticos sobre la taxonomía de *Marteilia* sp. hayan indicado que *M. refringens* y *M. maurini* son dos tipos de una misma especie, ecológicamente podrían tener comportamientos diferentes en sus ciclos de vida, y utilizar diferentes especies para el papel de hospedadores intermediarios. Estos autores, detectaron también mediante PCR la presencia del parásito en seis taxones diferentes de zooplancton incluyendo copépodos (tres Calanoida, *Acartia discaudata*, *A. clausi* y *A. italica*; un Cyclopoida, *Oithona* sp.; y un Harpacticoida, *Euterpina acutifrons*), y estadios larvarios de crustáceos decápodos (larvas zoea de Brachyura, probablemente *Portunus* sp.) (CARRASCO *et al.* 2007). Los autores proponen estos taxones como nuevos candidatos para estudio, ya que podría tratarse de hospedadores intermediarios en el proceso de infección de *Marteilia refringens*.

Como se dijo al principio de este apartado hay poco conocimiento sobre la biología de *M. refringens*, sin embargo se trata del paramyxo



que más se conoce ya que el ciclo de vida de otros paramyxeos está todavía menos estudiado. Menos documentado está el desarrollo de *Marteilioides chungmuensis* en la ostra del Pacífico (PARK y CHUNG 1989; IMANAKA *et al.* 2001; ITOH *et al.* 2002). No se conocen otros estadios de desarrollo diferentes a los estadios de esporulación en el ovario. El parásito invade los ovocitos inmaduros que remueven hacia el centro del folículo durante su desarrollo. El crecimiento del parásito se correlaciona con el crecimiento y maduración de los oocitos del hospedador (ITOY *et al.* 2002). Las esporas o propágulos pueden ser liberados al exterior mediante el canal genital.

Con el desarrollo de las nuevas técnicas moleculares se irá avanzando cada vez más en este campo (KLEEMAN y ADLARD 2000; ITOY *et al.* 2003).

5. DIAGNÓSTICO

Para muchos de los patógenos de moluscos bivalvos, las técnicas de diagnóstico son muy limitadas y las investigaciones se restringen a estudios histológicos y ultraestructurales (MIAHLE *et al.* 1995). Mientras que muchos patógenos son difíciles de detectar y reconocer usando dichos métodos, los paramyxeos son fácilmente diagnosticados, a nivel de género, aplicando metodologías simples como la histología o la citología (Fig. 2). Sin embargo, existe la necesidad de aplicar técnicas de diagnóstico más eficaces que sean capaces de distinguir entre especies, dado su gran impacto económico.

El control efectivo de la marteiliosis, como la mayoría de las enfermedades de moluscos, requiere el uso de técnicas específicas, sensibles y rápidas (BERTHE *et al.* 1999; CUNNINGHAM 2002). Se ha puesto énfasis en la tremenda importancia de estas técnicas cuando hablamos de la taxonomía y del ciclo de vida del parásito pero cobran todavía mayor relevancia al hablar del diagnóstico de los paramyxeos. El desarrollo de técnicas moleculares fue posible gracias a la puesta a punto de protocolos para la purificación del parásito a partir de tejidos infectados (MIAHLE *et al.* 1985; ROBLEDO *et al.* 1995; ITOY *et al.* 2003).

Varios artículos han descrito técnicas de diagnóstico basadas en el uso de anticuerpos de *Marteilia* spp. (ROUBAL *et al.* 1989; TISCAR *et al.*

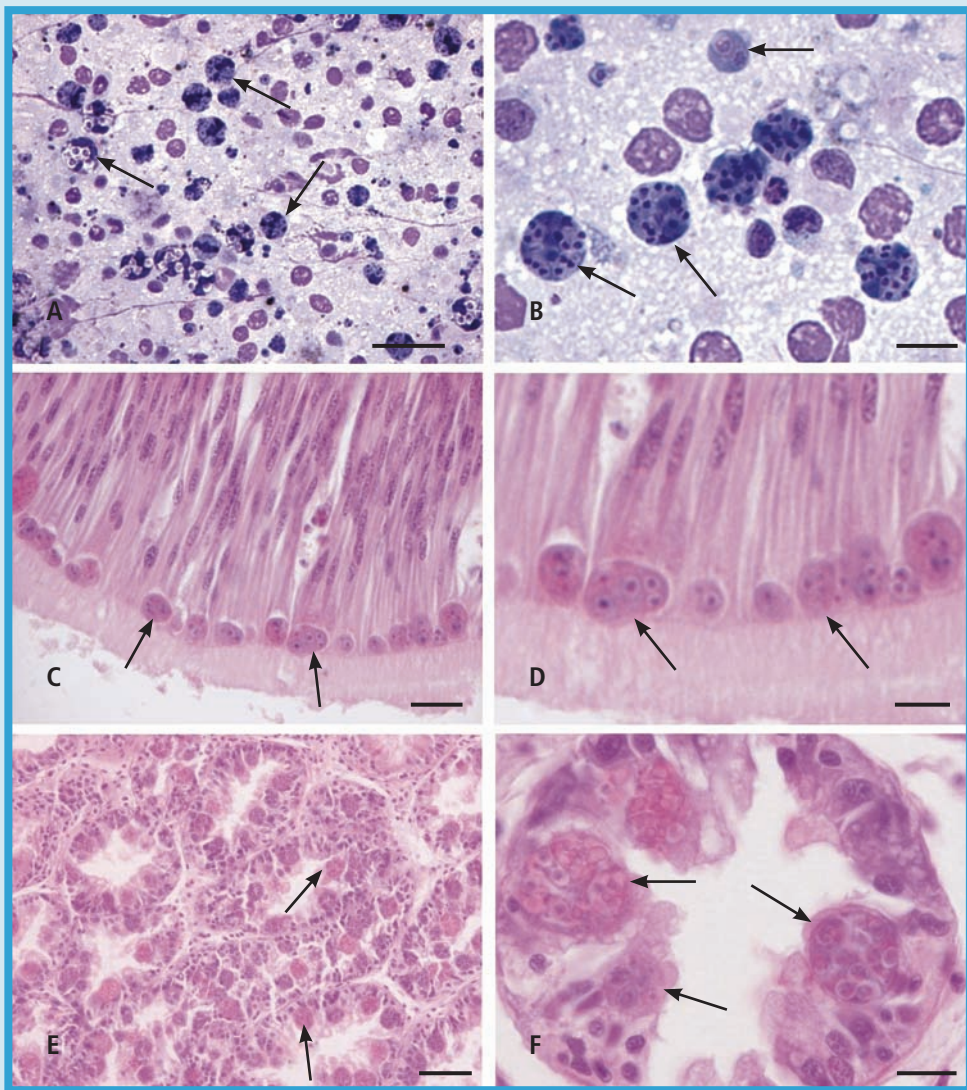


FIGURA 2.

Corte histológico de mejillón, *Mytilus galloprovincialis*. A y B. Frotis de glándula digestiva. Las flechas señalan los esporontes refringentes. C y D. Células primarias (flechas) de *Marteilia refringens* en el epitelio digestivo. E. Aspecto de una infección avanzada, con los túbulos digestivos del mejillón repletos de esporontes refringentes (flechas). Barra en A y E: 50 μ m, B y C: 20 μ m y F: 10 μ m.



1993; ANDERSON *et al.* 1994a; ROBLEDO *et al.* 1994; PERNAS *et al.* 2000). La técnica de ensayo de inmunofluorescencia indirecta (IFAT) se usó para la detección de *M. sydneyi* usando anticuerpos policlonales (ROUBAL *et al.* 1989). Se ha demostrado que los anticuerpos se unen a la membrana de la célula secundaria, a los gránulos refringentes, a la pared de la espora y a los haplosporosomas de *M. sydneyi*. Posteriormente, se describió otro ensayo de IFAT incorporando un anticuerpo policlonal contra *M. sydneyi* (ANDERSON *et al.* 1994a) comprobándose que era específico de *M. sydneyi* cuando se intentó probar frente a *M. refringens*, *M. maurini*, *Martelia* sp. y *Marteilioides chungmuensis*. También se desarrolló un anticuerpo policlonal específico de *Martelia* sp. de mejillón *M. galloprovincialis* que se une a la estructura de la espora (TISCAR *et al.* 1993). Sin embargo, se reconoce la dificultad del uso de anticuerpos policlonales como técnicas de diagnóstico rutinarias.

Hasta ahora, las sondas de genes utilizadas en el diagnóstico de la marteiliosis en los moluscos cultivados se han desarrollado para la detección de las especies de paramyxeos con una mayor implicación económica, *Martelia refringens* (LUBAT 1990; LE ROUX *et al.* 1999; 2001), *M. sydneyi* (ANDERSON *et al.* 1995; KLEEMAN y ADLARD 2000) y *M. chungmuensis* (ITO *et al.* 2003). El desarrollo de estas técnicas está avanzando lentamente y todavía más lenta va su aplicación rutinaria en los programas de vigilancia para la detección de la marteiliosis y para prevenir la dispersión de los paramyxeos.

El ADN es una molécula muy útil para usarse como base en las técnicas de diagnóstico porque su secuencia no varía a lo largo del ciclo de vida o de la fase de desarrollo del patógeno y tampoco varía con el hospedador o con la localización del parásito en los distintos tejidos del mismo. Ésto es de particular interés, teniendo en cuenta que aparentemente *Martelia* spp. en Europa no tiene especificidad de hospedador. Por otro lado, el uso rutinario de técnicas de diagnóstico basadas en ADN puede llegar a dar resultados erróneos (falsos positivos o falsos negativos) (WALKER y SUBASINGHE 2000; CUNNINGHAM 2002). No todas las regiones del ADN se pueden usar como dianas para el diseño de los cebadores o de las sondas. Los organismos más relacionados como, por ejemplo, *Martelia refringens* y *Martelia maurini* (LE ROUX *et al.* 2001) o *M. refringens* y *M. sydneyi* (KLEEMAN *et al.* 2002b)



tienen un alto grado de similitud en su secuencia, haciendo difícil el diseño de cebadores o sondas específicas.

El desarrollo de técnicas moleculares de diagnóstico especie-específicas será más fácil a medida que se vayan conociendo las secuencias de más genes y patógenos. Frecuentemente, sin embargo, cuando las secuencias de ADN han sido descritas en distintos laboratorios no se corresponden con el mismo gen o la misma región del gen, impidiendo estudios taxonómicos y comparaciones de secuencias para el desarrollo de técnicas de diagnóstico. Hay que hacer esfuerzos para obtener secuencias de las mismas regiones de los organismos relacionados para optimizar la oportunidad de desarrollar sondas y cebadores de PCR específicos con la especificidad deseada y en el caso de los paramyxos los esfuerzos se han centrado en el gen de la subunidad ribosomal pequeña (LE ROUX *et al.* 1999; 2001; BERTHE *et al.* 2000, KLEEMAN y ADLARD 2000; ITOH *et al.* 2003). Estos genes rRNA son dianas muy útiles para los ensayos de diagnóstico porque hay muchas copias en el genoma, lo que puede ayudar a asegurar la buena sensibilidad y además ofrecen un mosaico de regiones variables que permiten el análisis a distintos niveles de resolución. Las secuencias disponibles son útiles para estudios filogenéticos que ayudan a clarificar la taxonomía de estos parásitos. Sin embargo, para minimizar la posibilidad de que las técnicas de diagnóstico molecular especie-específica fallen al detectar una cepa en concreto de un patógeno, se deben secuenciar el mayor número posible de cepas de un amplio rango de distribución geográfica.

Para el diagnóstico de los paramyxos la O.I.E recomienda el uso de técnicas tanto de vigilancia como presuntivas y confirmatorias. Los programas de vigilancia de marteiliosis rutinarios se llevan a cabo mediante técnicas histológicas o improntas de glándula digestiva. Las improntas de glándula digestiva permiten diagnosticar con facilidad los estados avanzados de la enfermedad, pero no detectan las infecciones poco avanzadas en que el parásito se localiza exclusivamente en el epitelio del estómago. La histología proporciona mucha información, presencia de otros patógenos, condiciones patológicas, reacciones del hospedador o pérdida de condición después de la puesta. Las técnicas de tinción usuales son las basadas en hematoxilina-eosina



(HOWARD *et al.*, 2004 THOESON 1994). Cuando se usa una tinción como hematoxilina-eosina las estructuras nucleares y basofílicas se tiñen de un color azul-púrpura oscuro, el retículo endoplasmático se tiñe de azul mientras que el citoplasma adquiere una coloración grisácea. La tinción ácida de eosina tiñe las otras estructuras de rosa. Esta técnica de tinción es simple y reproducible y aunque sólo permita una diferenciación limitada de las estructuras celulares, es posible detectar los paramyxos y las anomalías en el tejido y la estructura celular.

Se pueden aplicar otras técnicas para determinar otras estructuras o características peculiares como la tinción tricrómica de Millot's (GU-TIÉRREZ 1977).

Cuando ocurren casos de mortalidades anormales, las técnicas de diagnóstico presuntivas como las improntas de tejido se pueden utilizar además de la histología dada su rapidez en el diagnóstico. También en este caso, la PCR es muy útil para generar resultados sensibles y específicos (WALKER y SUBASINGHE 2000; CUNNINGHAM 2002). Los problemas de la PCR son que las infecciones leves se pueden perder si el tejido es submuestreado o si factores inhibitorios en los tejidos de los moluscos dan resultados negativos. Ésto ha sido discutido cuando se utiliza la PCR como un método de screening para la detección de hospedadores alternativos (AUDERMARD *et al.* 2002). Además, la extrema sensibilidad de la PCR puede dar un resultado positivo incluso cuando el patógeno no se encuentra viable; de manera que se deben incluir controles positivos y negativos así como controles internos en los protocolos (LE ROUX *et al.* 1999). BURRESON (2008) revisó las precauciones necesarias en el uso de la PCR cuando se aplica en la búsqueda de hospedadores nuevos de parásitos conocidos.

Cuando se encuentra un patógeno en programas de muestreo rutinarios o en casos de mortalidades anormales es necesaria la utilización de la microscopía electrónica de transmisión para una identificación específica. El estudio ultraestructural de *M. refringens* permitió la descripción de las fases de desarrollo del mismo (GRIZEL *et al.* 1974), y puso de manifiesto diferencias entre las especies de *Marteilia* descritas en Europa (*M. refringens* y *M. maurini*) parasitando a la ostra y el mejillón respectivamente (COMPS *et al.* 1981). Posteriormente, se puso en entredicho la validez de la técnica para distinguir los dos tipos del



parásito (VILLALBA *et al.* 1993c; LONGSHAW *et al.* 2001). Actualmente, la microscopía electrónica de transmisión tiene un uso restringido para la diagnosis del parásito, no obstante, es una técnica relevante a la hora de estudiar nuevas fases de desarrollo del parásito en moluscos bivalvos o en otros hospedadores intermediarios.

Para diferenciar *M. refringens* de *M. maurini*, se identifican los polimorfismos a lo largo de los productos de PCR analizando los sitios de corte de la enzima de restricción HhaI (LE ROUX *et al.* 1999). Los fragmentos resultantes de la restricción son analizados por medio de un gel de electroforesis al 2%. El perfil correspondiente a *M. maurini* da tres bandas de 256, 157 y 68 pares de bases, mientras que el perfil correspondiente a *M. refringens* da dos bandas de 226 y 156 pares de bases.

Hay protocolos más detallados para el diagnóstico de *Marteilia* spp. en el manual de la O.I.E. Este manual está permanentemente revisado y actualizado, se puede consultar en http://www.oie.int/eng/normes/fmanual/A_summry.htm).

6. MÉTODOS DE CONTROL

La prevención de la marteiliosis es de crucial importancia en la acuicultura de moluscos ya que los episodios de mortalidad son un cuello de botella para la producción debido a que afectan al desarrollo socioeconómico del sector. En Francia, durante la década de los setenta los episodios de mortalidad debidos a la marteiliosis y a la bonamiosis (otra enfermedad de graves consecuencias que afecta a los moluscos bivalvos y que se explicará en detalle en otro capítulo) llevaron consigo una disminución de la producción desde aproximadamente 20.000 toneladas por año en 1970, a unas 2.000 toneladas por año a principios de los años ochenta (GOULLETQUER y HÉRAL 1997). En aproximadamente una década, la producción de ostra plana en Francia sufrió un fuerte declive que llegó a impactar negativamente en la economía del país (BERTHE *et al.* 2004).

Hay muy pocos medios para reducir el efecto de los patógenos en la acuicultura. Por lo general, los moluscos son cultivados en mar abierto lo que limita fuertemente el potencial uso de quimioterapias por la gran cantidad de producto usado, su impacto en el medio ambiente y



el riesgo de re-infección. Igualmente, la vacunación no es una opción ya que los moluscos no poseen inmunidad adquirida y, por tanto, no producen anticuerpos.

La transferencia de patógenos por los movimientos de los organismos acuáticos parece una importante causa de la propagación de dichas epizootías. Teniendo ésto en cuenta, uno de los muy pocos medios de reducir el impacto de dichos patógenos en las poblaciones de moluscos explotadas comercialmente es establecer programas efectivos de control para prevenir la transferencia de los stocks infectados. Este método de control se realiza mediante la restricción de movimiento de animales infectados a áreas que se sepa o se sospechen que están libres de *Marteilia* (O.I.E. 2009) o *Marteilioides* (ELSTON 1993; BOWER *et al.* 1994).

Se ha descrito que *M. refringens* fue controlada en Holanda por una combinación de programas de vigilancia y restricción de cultivo de ostras en Yerseke Bank donde todos los stocks de ostras infectados habían sido recolectados o destruidos (VAN BANNING 1988). Aunque visto como un caso paradigmático de gestión saludable, la explicación más probable es que el parásito no hubiera tenido la capacidad de cerrar su ciclo de vida (AUDEMARD *et al.* 2002). Por lo tanto, de lo que se trata es de que en una región o país en donde existan moluscos infectados con cualquiera de estos patógenos no se autorice la exportación hacia áreas libres de la enfermedad. Así, en este sentido, el acceso a pruebas de diagnóstico rápidas, fiables y sensibles es de vital importancia. En zonas endémicas, la reducción del impacto de los patógenos iría unido a aumentar el conocimiento de su biología (tolerancia a la temperatura y salinidad, ciclos de vida, presencia de hospedadores intermediarios, rutas de transmisión, ...) y a la mejora genética de las especies hospedadoras para aumentar su resistencia a la enfermedad. En este último caso, se debe tener un mayor conocimiento de los mecanismos de defensa de los moluscos para poder llegar a controlar las relaciones hospedador-parásito. Hasta el momento, se han llevado a cabo pocos experimentos para obtener ostras resistentes a *Marteilia* spp. mediante selección genética. En Australia, se han llevado a cabo informes preliminares de resistencia a *M. sydneyi* mediante programas de selección masiva de los hospedadores supervivientes. NEWTON *et al.* (2004) Observaron que ostras con un nivel de resistencia a la marteilio-



sis tenían mayor actividad fenoloxidasa (PO) e identificaron una nueva forma de PO que puede contribuir a aumentar la defensa inmune en el stock seleccionado. Estos estudios pueden dar lugar a la provisión de un marcador genético que puede usarse con confianza para garantizar niveles comercialmente viables de resistencia a la marteiliosis.

Datos recientes obtenidos a partir de la biología de *M. refringens* pueden dar lugar al desarrollo de nuevas estrategias de gestión basadas en un mayor conocimiento del ciclo de vida del parásito (BERTHE *et al.* 1998; AUDEMARD *et al.* 2001; 2002). Mediante la recolección de ostras fuera del período de tiempo en el que hay una mayor probabilidad de que éstas se infecten con *M. refringens*, el riesgo de la marteiliosis se puede reducir. En áreas endémicas, las semillas y juveniles de ostra se deberían reducir entre Junio y Agosto, ya que éste es el periodo de transmisión de *M. refringens* (PERKINS 1993). De modo parecido, las ostras con riesgo de infectarse con *M. sydneyi* en el hemisferio sur, no se deberían sembrar durante el periodo de Enero a Marzo y se deberían recolectar antes de acabar Diciembre (BOWER *et al.* 1994).

Una vez que se determine de forma concluyente el papel de los copépodos en el ciclo de vida de *M. refringens*, se podría establecer una estrategia más fina de control mediante un mapeo de la distribución temporal y geográfica de estas especies. Las aguas con influencia oceánica podrían usarse para almacenamiento temporal. Como el desarrollo de *M. refringens* está influenciado por la temperatura y la salinidad, se podría controlar este parásito creciendo y manteniendo las ostras en aguas de elevada salinidad (GRIZEL 1985; BOWER *et al.* 1994) o en aguas de baja temperatura ya que se necesita un umbral de 17 °C para establecer nuevas infecciones de *M. refringens* en ostras, (GRIZEL 1985; BERTHE *et al.* 1998; AUDEMARD *et al.* 2001; 2002). Por otro lado, en el caso de *M. sydneyi* las observaciones indican que los episodios de *outbreaks* no están correlacionados con fluctuaciones en el pH, salinidad y temperatura del agua (ANDERSON *et al.* 1994b; WESCHE 1995).

Aunque los tratamientos muestran pocas promesas en el control de las enfermedades de moluscos, se han sugerido varios métodos para el control de *Marteilia* spp.. Así, se han probado químicos como el azul de metileno, el verde malaquita y el furanace, pero no han resultado



efectivos para matar a *M. refringens* en las ostras infectadas *O. edulis* (GRIZEL 1979). También se intentó erradicar *M. sydneyi* de su hospedador natural, *S. glomerata*, por inmersión o inyección de pirimetamina y sulfadoxina, trimetoprima y sulfametoxazol, fosfato de cloroquina o pirimetamina (LESTER 1986). Todos estos tratamientos químicos no fueron efectivos para controlar y destruir los parásitos y, sin embargo, mataron a las ostras. Una vez en el medio ambiente, propágulos de *Marteilia* tienen, aparentemente, una vida corta. Pruebas con esporas de *M. sydneyi* demostraron que el tratamiento con 200 ppm de cloro mata el 99,5% de las esporas en dos horas y el 100% en 4 horas (WESCHE *et al.* 1999). Estos tratamientos pueden ser utilizados para controlar la enfermedad en sistemas cerrados o semicerrados como los estanques (AUDERMARD *et al.* 2001) o efluentes de instalaciones de stock.

Por último, hay que tener en cuenta que se ha descrito un hiperparásito para *M. refringens* (COMPS *et al.* 1979). *Nosema ormieresi* (Microspora) se describió como hiper-parásito de *M. refringens*, produciendo cambios necróticos como degeneración de células primarias y esporangios, alteración de la membrana, condensación del citoplasma y reducción en el número de esporas. La presencia de un hiperparásito similar fue observada en *M. refringens* de mejillones de Galicia VILLALBA *et al.* 1993c. COMPS *et al.* (1979) sugieren que este hiperparásito tiene potencial como agente de control biológico. Sin embargo, desde su descripción inicial, este parásito no se ha estudiado con más profundidad debido a su rareza en el medio ambiente y al desconocimiento de su modo de transmisión. La posibilidad de usarlo como agente de control biológico parece remota por el momento.

7. CONCLUSIÓN

En este capítulo se hace una recopilación de toda la información referente a la taxonomía, patogenia, ciclos de vida, diagnóstico y métodos de control de los parásitos paramyxos. Después de más de 30 años de estudio, estos organismos todavía plantean dudas que requieren de una mayor investigación.

La biodiversidad del grupo se cree que está subestimada dada la poca atención que se ha prestado a los parásitos de especies no ren-



tables económicamente incluso en el campo de la ecología marina.

8. REFERENCIAS

- ADLARD, R. D. E I. ERNST 1995 Extended range of the oyster pathogen *Marteilia sydneyi*. Bulletin of the European Association of fish Pathology 15: 119-121.
- ALDERMAN, D. J. 1979 Epizootiology of *Marteilia refringens* in Europe. Marine Fishery Review **41**: 67-69.
- ANDERSON, T. J. y R. J. G. LESTER 1992 Sporulation of *Marteilioides branchialis* n. sp. (Paramyxea) in the Sydney rock oyster, *Saccostrea commercialis* (Angas). Journal of Fish Diseases **18**: 507-510.
- ANDERSON, T. J., T. F. MCCAUL, V. BOULO, J. A. F. ROBLEDY y R. J. G. LESTER 1994a Light and electron immunohistochemical assays on paramyxean parasites. Aquatic Living Resources **7**: 47-52.
- ANDERSON, T. J., S. WESCHE y R. J. G. LESTER 1994b Are outbreaks of *Marteilia sydneyi* in Sydney rock oysters, *Saccostrea commercialis*, triggered by drop in environmental pH? Australian Journal of Marine and Freshwater Research **45**: 1285-1287.
- ANDERSON, T. J., R. D. ADLARD y R. J. G. LESTER 1995 Molecular diagnosis of *Marteilia sydneyi* (Paramyxea) in the Sydney rock oyster, *Saccostrea commercialis* (Angas). Journal of Fish Diseases **18**: 507-510.
- AUDEMARD, C., A. BARNAUD, C. M. COLLINS, F. LE ROUX, P. G. SAURIAU, C. COUSTAU, P. BLACHIER y F. C. J. BERTHE, 2001 Claire ponds as an experimental model for *Marteilia refringens* life-cycle studies: new perspectives. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology **257**: 87-108.
- AUDEMARD, C., F. LE ROUX, A. BARNAUD, C. COLLINS, B. SAUTOUR, P. G. SAURIAU, X. DE MONTAUDOUIN, C. COUSTAU, C. COMBES y F. C. J. BERTHE 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.
- AUFFRET, M. y M. PODER 1985 Recherches sur *Marteilia maurini*, parasite de *Mytilus edulis* sur les cotes de Bretagne nord. Revue des Travaux de l'Institut des Pêches Maritimes **47**(1-2): 105-109.
- AUFFRET, M. y M. PODER 1987 Pathology of the main bivalve mollusc species from oyster rearing areas in Brittany (France). Aquaculture **67**: 255-257.
- BALOUET, G. 1977 *Marteilia refringens* –considerations of the life cycle and development of Abers disease in *Ostrea edulis*. Int. Symp. Haplosporidian and Haploporidian-like Diseases of Shellfish; Gloucester Point, VA (USA); 17 Aug 1977. In: Haplosporidian and Haploporidian like diseases of shellfish. An international symposium held at the Virginia Institute of the Marine Science, Gloucester Point, VA 41: 64-66.



- BALOUET, G. 1979 *Marteilia refringens* - Considerations of the life cycle and development of Aber disease in *Ostrea edulis*. Marine Fishery Review **41**: 64-66.
- BALOUET, G., A. CAHOUR y C. CHASTEL 1979 Epidémiologie de la maladie de la glande digestive de l'huître plate: hypothèse sur le cycle de *Marteilia refringens*. Haliotis **8**: 323-326.
- BECKER, C. D. y G. B. PAULEY 1968 An ovarian parasite (*Protista incertae sedis*) from the pacific oyster, *Crassostrea gigas*. Journal of Invertebrate Pathology **12**: 425-437.
- BERTHE, F. C. J., M. PERNAS, M. ZERABIB, P. HAFFNER, A. THÉBAULT y A. J. FIGUERAS 1998 Experimental transmission of *Marteilia refringens* with special considerations for its life cycle. Diseases of Aquatic Organisms **34**: 135-144.
- BERTHE, F. C. J., E. BURRESON y M. HINE 1999 Use of molecular tools for mollusc disease diagnosis. Bulletin of European Association of Fish Pathology **19(6)**: 277-278.
- BERTHE, F. C. J., F. LE ROUX, E. PEYRETAILLADE, P. PEYRET, D. RODRIGUEZ, M. GOUY y C. P. VIVARÈS 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. Journal of Eukaryotic Microbiology **47(3)**: 288-293.
- BERTHE, F. C. J., F. LE ROUX, R. ADLARD y A. FIGUERAS 2004 Marteiliosis in molluscs: a review. Aquatic Living Resources **17**: 433-448.
- BONAMI, J. P., H. GRIZEL y C. VAGO 1971 Recherches sur une maladie épizootique de l'huître plate, *Ostrea edulis* Linné. Revue des Travaux de l'Institut des Pêches Maritimes **35**: 415-418.
- BOUGRIER, S., G. TIGE, E. BACHERE y H. GRIZEL 1986 *Ostrea angasi* acclimatization to French coasts. Aquaculture **58**: 151-154.
- BOWER, S. M., S. E. MCGLADDERY y I. M. PRICE 1994 Synopsis of infectious diseases and parasites of commercially exploited shellfish. Annual Review of Fish Diseases **4**: 1-199.
- BURRESON, E. M. 2008 Misuse of PCR assay for diagnosis of mollusc protistan infections. Diseases of Aquatic Organisms **80**: 81-83.
- CAHOUR, A. 1979 *Marteilia refringens* and *Crassostrea gigas*. Marine Fishery Review **41**: 19-20.
- CARBALLAL M. J., A. VILLALBA y C. LÓPEZ 1998 Seasonal variation and effects of age, food availability, size, gonadal development and parasitism on the hemogram of *Mytilus galloprovincialis*. Journal of Invertebrate Pathology **72**: 304-312.
- CARRASCO, N., I. LÓPEZ-FLORES, M. ALCARAZ, M. D. FURONES, F. C. BERTHE y I. ARZUL 2007 Dynamics of the parasite *Marteilia refringens* (Paramyxea) in *Mytilus galloprovincialis* and zooplankton populations in Alfacs Bay (Catalonia, Spain). Parasitology **134**:1541-50.



- CARRASCO N., I. ARZUL, B. CHOLLET, M. ROBERT, J. P. JOLY, M. D. FURONES y F. C. BERTHE 2008 Comparative experimental infection of the copepod *Paracartia grani* with *Marteilia refringens* and *Marteilia maurini*. *Journal of Fish Diseases* **31(7)**:497-504.
- CAVALIER-SMITH, T. y E. E. CHAO 2003 Phylogeny and classification of phylum Cercozoan (Protozoa). *Protistology* **154**: 341-358.
- CESCHIA, G., A. MION, G. OREL y G. GIORGETTI 1991 Parasitological studies in mussel culture in Friuli-Venezia Giulia (northeast Italy). *Bolletino de Ila Societa Italiana di Patologia Ittica* 24-36.
- CESCHIA, G., S. ZANCHETTA, M. SELLO, F. MONTESI y A. FIGUERAS 2001 Presenza di parassiti in cannolicchi (*Ensis minor* e *Ensis siliqua*) pescati nell'area costiera del Mar Tirreno meridionale e del Mar Adriatico. *Bolletino de Ila Societa Italiana di Patologia Ittica* **13(30)**: 20-27.
- CHATTON, E. 1911 Sur une Cnidosporidie sans cnidoblaste (*Paramyxa paradoxa*, n.g., n.sp.). *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences de Paris* **152**: 631-633.
- CHUNG, S. K. 1970 Studies on the oyster diseases. 1. Pathogenetic Investigation. *Bulletin of the Korean Fisheries Society* **3**: 7-17.
- CHUNG, S. K. 1972 Preliminary studies on the sporozoan parasites in oysters on the Southern Coast of Korea. *Bulletin of the Korean Fisheries Society* **5**: 76-82.
- CHUNG, S. K. 1979 Amoeba infection in oyster (*Crassostrea gigas*). *Bulletin of the Korean Fisheries Society* **12(4)**: 281-285.
- COMPS, M. 1970 Observations sur les causes d'une mortalité anormale des huîtres plates (*Ostrea edulis* L.) dans le bassin de Marennes. *Revue des Travaux de l'Institut des Pêches Maritimes* **34**: 317-326.
- COMPS, M. 1976 *Marteilia lengehi* n. sp., parasite de l'huître *Crassostrea cucullata* Born. *Revue des Travaux de l'Institut des Pêches Maritimes* **40**: 347-349.
- COMPS, M. 1983 Etude morphologique de *Marteilia christenseni* sp. n. parasite du lavignon *Scrobicularia piperata* P. (mollusque pelecypode). *Revue des Travaux de l'Institut des Pêches Maritimes* **47(1-2)**: 99-104.
- COMPS, M., H. GRIZEL, G. TIGÉ y J. L. DUTHOIT 1975 Parasites nouveaux de la glande digestive des mollusques marins *Mytilus edulis* L. et *Cardium edule*. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences de Paris Série D.* **281**: 179-181.
- COMPS, M., Y. PICHOT y J. P. DELTREIL 1979 Mise en evidence d'une microsporidie parasite de *Marteilia refringens* agent de la maladie de la glande digestive de *Ostrea edulis* L. *Revue des Travaux de l'Institut des Pêches Maritimes* **43(4)**: 409-412.



- COMPS, M., Y. PICHOT y P. PAPAGIANNI 1981 Research on *Marteilia maurini* n.sp. parasite of the mussel *Mytilus galloprovincialis* LmK. Revue des Travaux de l'Institut des Pêches Maritimes **45**: 211-214.
- COMPS, M., H. GRIZEL y Y. PAPAYANNI 1982 Parasitic diseases due to *Marteilia maurini* in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. ICES, Copenhagen, Denmark, pp. 3.
- COMPS, M., M. S. PARK y N. DESPORTES 1986 Etude ultrastructurale de *Marteilioides chungmuensis* n.g., n.sp. parasite des ovocytes de l'huître *Crassostrea gigas* Th. Protistologica **22**:279-285.
- COMPS, M., M. S. PARK y I. DESPORTES 1987 Fine structure of *Marteilioides chungmuensis* n.g., n.sp., parasite of the oocytes of the oyster *Crassostrea gigas*. Aquaculture **67**: 264-265.
- CORLISS, J. O. 1984 The kingdom Protista and its 45 phyla. Biosystems **17**: 87-126.
- CUNNINGHAM, C. 2002 Molecular diagnosis of fish and shellfish diseases: present status and potential use in disease control. Aquaculture **206**: 19-55.
- DESPORTES, I. 1981 Étude ultrastructurale de la sporulation de *Paramyxa paradoxa* Chatton (Paramyxida) parasite de l'annélide polychète *Poecilochaetus serpens*. Protistologica **17**: 365-386.
- DESPORTES, I. y T. GINSBURGER-VOGEL 1977 Affinities of the genus *Marteilia*, parasite of oysters (Aber disease) and of the crustacean *Orchestia gammarellus* (Pallas) with the myxosporidia, Actinomyxida and Paramyxida. Comptes rendus hebdomadaires des seances de l'Academy des Sciences, Serie D **285**: 1111-1114.
- DESPORTES, I. y J. LOM 1981 Affinités de *Paramyxa paradoxa* Chatton, 1911, parasite de *Poecilochaetus serpens* (Annélide polychète) avec les *Marteiliidae* Sprague, parasites d'huîtres et du crustacé *Orchestia gammarellus*. Comptes rendus hebdomadaires des seances de l'Academy des Sciences, Serie D **292**: 627-632.
- DESPORTES, I. y N. N. NASHED 1983 Ultraestructure of sporulation in *Minchinia dentali* (Arvy), an haplosporean parasite of *Dentalium entale* (Scaphopoda, Mollusca); taxonomic implications. Protistologica **19(3)**: 435-460.
- DESPORTES, I. y F. O. PERKINS 1990 Phylum Paramyxia. Handbook of Protoctista. Jones and Bartlet Publishing, Boston, pp. 30-35.
- ELSTON, R. A. 1993 Infectious diseases of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. Annual Review of Fish Diseases **3**: 259-276.
- FIGUERAS, A. J. y J. MONTES 1988 Aber disease of edible oysters caused by *Marteilia refringens*. American Fishery Society Special Publications **18**: 38-46.
- FIGUERAS, A. J. y A. VILLALBA 1988 Patología de moluscos en acuicultura. In: MONTEROS J. E., LABARTA U. (Eds.) Patología en acuicultura. Mundi-Prensa Libros, Madrid, cap. 4: 327-376.



- FIGUERAS, A. J., C. F. JARDON y J. R. CALDAS 1991 Diseases and parasites of rafted mussels (*Mytilus galloprovincialis* Lmk): preliminary results. *Aquaculture* **99**: 17-33.
- FIGUERAS, A. J., J. A. F. ROBLEDO y B. NOVOA 1996 Brown ring disease and parasites in clams (*Ruditapes decussatus* and *R. philippinarum*) from Spain and Portugal. *Journal of Shellfish Research* **15**: 363-368.
- FUENTES, J., A. VILLALBA, C. ZAPATA, y G. ALVAREZ 1994 Influence of mussel stock and culture environment on the infections by *Marteilia refringens* and *Myticola intestinalis* in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. Conference International Symposium on the Aquatic Animal Health, Seattle, WA (USA), pp. 55.
- GINSBURGER-VOGEL, T. 1991 Intersexuality in *Orchestia mediterranea* Costa, 1853, and *Orchestia aestuarensis* Wildish, 1987 (Amphipoda): A consequence of hybridisation or parasitic infestation? *Journal of Crustacean Biology* **11**(4): 530-539.
- GINSBURGER-VOGEL, T., I. DESPORTES, y C. ZERBIB 1976 Présence chez l'amphipode *Orchestia gammarellus* (Pallas). d'un protiste parasite; ses affinités avec *Marteilia refringens* agent de l'épizootie de l'Huître plate. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences de Paris* **283**: 939-942.
- GINSBURGER-VOGEL, T. e I. DESPORTES 1979a Structure and biology of *Marteilia* sp. in the amphipod, *Orchestia gammarellus*. *Marine Fishery Review* **41**(1-2): 3-7.
- GINSBURGER-VOGEL, T. e I. DESPORTES 1979b Etude ultrastructurale de la sporulation de *Paramarteilia orchestiae* gen. n. sp.n. parasite de l'amphipode *Orchestia gammarellus* Pallas. *Protistologica* **26**: 390-403.
- GOULLETQUER, F. y M. HERAL 1997 History, present conditions and future of the molluscan fisheries of North America and Europe. Marine Molluscan production trends in France: from fisheries to aquaculture. *Marine Fishery Review*, NOAA, technical Report NMFS **129**: 137-164.
- GRIZEL, H. 1979 *Marteilia refringens* and oyster disease - recent observations. *Marine Fishery Review* **41**(1-2): 38-39.
- GRIZEL, H. 1985 Etude des récentes epizooties de l'huître plate (*Ostrea edulis*) et leur impact sur l'ostreiculture bretonne. These doctoral du Departement de sciences. Université des Sciences et Techniques du Languedoc, Montpellier (France) pp.145.
- GRIZEL, H., y G. TIGÉ 1973 La maladie de la glandule digestive d'*Ostrea edulis* Linne. *Journal du Conseil International pour L'exploitation de la mer*. C.M.K. **13**: 1-7.
- GRIZEL, H., M. COMPS, J. R. BONAMI, F. COUSSERANS, J. L. DUTHOIT y M. A. LE PENNEC 1974 Recherche sur l'agent de la maladie de la glande digestive de *Ostrea edulis* Linne. *Science et Pêche*, Bulletin de L' Institut des Pêches maritimes **240**: 7-29.



- GRIZEL, H., M. COMPS, D. RAGUENES, Y. LEBORGNE, G. TIGÉ y A. G. MARTIN 1982 Bilan des essais d'acclimatation d'*Ostrea chilensis* sur les côtes de Bretagne. Revue des Travaux de l'Institut des Pêches Maritimes **46(3)**: 209-225.
- GUTIÉRREZ, M. 1977 Técnica de coloración del agente de la enfermedad de la glándula digestiva de la ostra plana, *Ostrea edulis* L. Investigación Pesquera **41(3)**: 643-645.
- HERRBACH, B. 1971 Sur une affection parasitaire de la glande digestive de l'huître plate, *Ostrea edulis* Linné. Revue des Travaux de l'Institut des Pêches Maritimes **35**: 79-87.
- HIDE, G. y A. TAIT 1991 The molecular epidemiology of parasites. Experientia **47**: 128-140.
- HINE, P. M. 1996 Southern hemisphere mollusc diseases and an overview of associated risk assessment problems. Revue Scientifique et Technique Office International of Epizooties **15(2)**: 563-577.
- HINE, P. M. y T. THORNE 2000 A survey of some parasites and diseases of several species of bivalve mollusc in northern Western Australia. Diseases of Aquatic Organisms **40**: 67-78.
- HIS, E., G. TIGÉ y M. A. RABOUIN 1976 Observations relatives à la maladie des huîtres plates dans le bassin d'Arcachon, vitesse d'infestation et réactions pathologiques. I.C.E.S. C.M. 1976/K:17.
- HOWARD, D. H., J. L. LEWIS, B. J. KELLER, C. S. SMITH 2004 Histological techniques for Marine Bivalve Mollusks and Crustaceans, NOAA Technical Memorandum NOS NCCOS **5**, 218p.
- ICES-WGPDMO 2006 Working Group on Diseases of Marine Organisms of International Sea Council, annual report. URL: <http://www.ices.dk/iceswork/wqdetail.asp?wqWGPDMO>.
- IMANAKA, S., N. ITOH, K. OGAWA y H. WAKABAYASHI 2001 Seasonal fluctuations in the occurrence of abnormal enlargement of the ovary of Pacific oyster *Crassostrea gigas* at Gokasho Bay, Mie, Japan. Fish Pathology **36**: 83-91.
- ITOH, N., T. ODA, T. YOSHINAGA, K. OGAWA y H. WAKABAYASHI 2002 Identification and development of paramyxean ovarian parasite in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. Fish Pathology **37(1)**: 23-28.
- ITOH, N., T. ODA, T. YOSHINAGA y K. OGAWA 2003 Isolation and 18S ribosomal DNA gene sequences of *Marteilioides chungmuensis* (Paramyxea), an ovarian parasite of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. Diseases of Aquatic Organisms **54**:163-169.
- ITOH, N., K. L. TUN, H. KOMIYAMA, N. UEKI y K. OGAWA 2004 An ovarian infection in the Iwagaki oyster, *Crassostrea nippona*, with the protozoan parasite *Marteilioides chungmuensis*. Journal of Fish Diseases **27**: 311-314.
- ITOH, N., K. MOMOYAMA y K. OGAWA 2005 First report of three protozoan parasites (a haplosporidian, *Marteilia* sp. and *Marteilioides* sp.) from the manila



- clam *Venerupis* (= *Ruditapes*) *philippinarum* in Japan. Journal of Invertebrate Pathology **88**: 201-206.
- KLEEMAN S. N. y R. D. ADLARD 2000 Molecular detection of *Marteilia sydneyi*, pathogen of Sydney rock oysters. Diseases of Aquatic Organisms **40**:137-146.
- KLEEMAN, S.N., R. D. ADLARD y R. J. G. LESTER 2002a Detection of the initial infective stages of the protozoan parasite *Marteilia sydneyi* in *Saccostrea glomerata* and their development through to sporogenesis. International Journal for Parasitology **32**: 767-784.
- KLEEMAN, N., F. LE ROUX, F. BERTHE y R. D. ADLARD 2002b Specificity of PCR and in situ hybridization assays designed for detection of *Marteilia sydneyi* and *M. refringens*. Parasitology **125**: 131-134.
- KLEEMAN, S. N., R. D. ADLARD, X. ZHU y R. B. GASSER 2004 Mutation scanning analysis of *Marteilia sydneyi* populations from different geographical locations in eastern Australia. Molecular Cell Probes **18**(2):133-138.
- LAUCKNER, G. 1983 Introduction. Bivalvia to Scaphoda. En: KINNE O (Ed.), Diseases of marine animals. Vol. 2, Biologische Anstalt Helgoland, Hamburgo (Alemania), pp. 467-1038.
- LE ROUX, F., C. AUDEMARD, A. BARNAUD y F. C. J. BERTHE 1999 DNA probes as potential tools for the detection of *Marteilia refringens*. Marine Biotechnology **1**(6): 588-597.
- LE ROUX, F., G. LORENZO, P. PEYRET, C. AUDEMARD, A. FIGUERAS, C. VIVARÈS, M. GOUY y F. C. J. BERTHE 2001 Molecular evidence for the existence of two species of *Marteilia* in Europe. Journal of Eukaryotic Microbiology **48**(4): 449-454.
- LEE, M. K., B. Y. CHO, S. Y. LEE, J. Y. KANG, H. D. JOENG, S. H. HUH y M. D. HUH 2001 Histopathological lesions of Manila clam, *Tapes philippinarum*, from Hadong and Namhae coastal areas of Korea. Aquaculture **201**: 199-209.
- LESTER, R. J. G. 1986 Field and laboratory observations on the oyster parasite *Marteilia sydneyi*. In: Parasite lives: Papers on parasites, their hosts and their associations (Cremin, M., Dobson, C. and Moorhouse, D.E. eds.) St. Lucia, University of Queensland Press: 33-40.
- LEVINE, N. D., J. O. CORLISS, F. E. G. COX, G. DEROUX, J. GRAIN, B. M. HONIBERG, G. F. LEEDALE, A. R. LOEBLICH, J. LOM, D. LYNN, E. G. MERINFELD, F. C. PAGE, G. POLJANSKY, V. SPRAGUE, J. VAVRA y F. G. WALLACE 1980 A newly revised classification of the Protozoa. Journal of Protozoology **27**: 37-58.
- LONGSHAW, M., S. W. FEIST, A. MATTHEWS y A. FIGUERAS 2001 Ultrastructural characterisation of *Marteilia* species (Paramyxea) from *Ostrea edulis*, *Mytilus edulis* and *Mytilus galloprovincialis* in Europe. Diseases of Aquatic Organisms **44**: 137-142.
- LÓPEZ, C. y S. DARRIBA 2006 Presence of *Marteilia* sp. (Paramyxea) in the razor clam *Solen marginatus* (Pennant, 1777) in Galicia (NW Spain). Journal of Invertebrate Pathology **92**(2):97-99.



- LÓPEZ-FLORES, I., R. DE LA HERRAN, M. GARRIDO-RAMOS, J. NAVAS, C. RUIZ-REJON y M. RUIZ-REJON 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., M. A. GARRIDO-RAMOS, R. DE LA HERRAN, C. RUIZ-REJÓN, M. RUIZ-REJÓN y J. NAVAS 2008a Identification of *Marteilia refringens* infecting the razor clam *Solen marginatus* by PCR and *in situ* hybridization. *Molecular Cell Probes* **22**(3): 151-155.
- LÓPEZ-FLORES, I., F. ROBLES, J. M. VALENCA, A. GRAU, A. VILLALBA, R. DE LA HERRÁN, M. A. GARRIDO-RAMOS, M. RUIZ-REJÓN y J. I. NAVAS 2008b Detection of *Marteilia refringens* using nested PCR and *in situ* hybridisation in *Chamelea gallina* from Balearic Islands (Spain). *Diseases of Aquatic Organisms* **82**(1): 79-87.
- LUBAT, V. 1990 Approches biologiques et moléculaires dans l'étude des myxosporidies, du PKX et des *Marteilia*. Thèse Doctorat es Sciences, Université des Sciences et Techniques du Languedoc, Montpellier, 118 p.
- MATSUZATO, T., T. HOSHINA, K. ARAKAWA y K. MASUMURA 1977 Studies on the so-called abnormal egg-mass of Japanese oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg) - I. Bulletin of the Hiroshima Fisheries Experimental Station. **8**: 9-25.
- MIAHLE, E., E. BACHERE, C. LE BEC y H. GRIZEL 1985 Isolement et purification de *Marteilia* (Protozoa: Asctospora) parasites de bivalves marins. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences de Paris* 301, Serie III, no 4, 137-142.
- MIALHE, E., E. BACHÈRE, V. BOULO, J. P. CADORET, J. SARAIVA, L. CARRERA, C. ROUSSEAU, V. CEDENO, J. CALDERON y R. R. COLWELL 1995 Future of biotechnology-based control of disease in marine invertebrates. *Molecular marine biology and biotechnology* **4**: 275-283.
- MONTES, J., M. A. LONGA, A. LAMA y A. GUERRA 1998 Marteiliosis of Japanese oyster (*Cassostrea gigas*) reared in Galicia NW Spain. *Bulletin of European Association of Fish Pathology* **18**: 124-126.
- MOYER, M. A., N. J. BLAKE y W. S. ARNOLD 1993 An ascetosporan disease causing mass mortality in the Atlantic calico scallop, *Agropecten gibbus* (Linnaeus, 1758). *Journal of Shellfish Research* **12**(2): 305-310.
- NEWTON, K., R. PETERS y D. RAFTOS 2004 Phenyloxidase and QX disease resistance in Sydney rock oysters (*Saccostrea glomerata*). *Developmental and Comparative Immunology*. **28**(6): 565-569.
- NGO, T. T. T., F. C. J. BERTHE y K. S. CHOI 2003 Prevalence and infection intensity of the ovarian parasite *Marteilioides chungmuensis* during an annual reproductive cycle of the oyster *Cassotrea gigas*. *Diseases of Aquatic Organisms* **56**: 259-267.
- NORTON, J. H., F. P. PERKINS y E. LEDUA 1993 *Marteilia*-like infection in a giant clam, *Tridacna maxima*, in Fiji. *Journal of Invertebrate Pathology*. **61**: 328-330.
- ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE SANIDAD ANIMAL (O.I.E.) 2009 http://www.oie.int/ESP/ES_INDEX.HTM



- PARK, M. S. y S. K. CHUNG 1989 On the *Marteilia* sp. infection in the oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). Bulletin of Fisheries Research and Development Agency, Korea **39**: 103-109.
- PASCUAL, M., A. G. MARTIN, E. ZAMPATTI, D. COATANEA, J. DEFOSSEZ y R. ROBERT 1991 Testing of the Argentina oyster, *Ostrea puelchana* in several French oyster farming sites. ICES Council Meeting Papers. ICES CM 1991/K:30 (ICESCM1991K30), Copenhagen, Denmark. 17pp.
- PÉREZ CAMACHO, A., A. VILLALBA, R. BEIRAS y U. LABARTA 1997 Absorption efficiency and condition of cultured mussels (*Mytilus edulis galloprovincialis* Linnaeus) of Galicia (NW Spain) infected by parasites *Marteilia refringens* Grizel et al. and *Mytilicola intestinalis* Steuer. Journal of Shellfish Research **16(11)**: 77-82.
- PERKINS, F. O. 1975 Fine structure of *Minchinia* sp. (Haplosporida) sporulation in the mud crab *Panopeus herbstii*. Mar. Fish Rev. **37(1)**:46-60.
- PERKINS, F. O. 1976 Ultrastructure of sporulation in the European flat oyster pathogen, *Marteilia refringens* - Taxonomic implications. J. Protozoology **23**: 64-74.
- PERKINS, F. O. 1979 Cell structure of shellfish pathogens and hyperparasites in the genera *Minchinia*, *Urosporidium*, *Haplosporidium* and *Marteilia* - Taxonomic implications. Marine Fishery Review **41(1-2)**: 25-37.
- PERKINS, F. O. 1993 Infectious diseases of molluscs. In: Advances in Fisheries Science: Pathobiology of marine and estuarine organisms (Eds. Couch, J.A. and Fournie, J.W.). Boca Raton, CRC Press, pp. 255-287.
- PERKINS, F. O. y P. H. WOLF 1976 Fine structure of *Marteilia sydneyi* sp. n. - Haplosporidian pathogen of Australian oysters. Journal of Parasitology **62**: 528-538.
- PERNAS, M., B. NOVOA, C. TAFALLA y A. FIGUERAS 2000 Efficiency of different monoclonal antibodies in immunological assays developed for the detection of *Marteilia* sp. isolated from *Mytilus galloprovincialis*. Bulletin of European Association of Fish Pathology. **20**: 193-198.
- PETERS, R. y D. A. RAFTOS 2003 The role of phenyloxidase suppression in QX disease outbreaks among Sydney rock oysters (*Saccostrea glomerata*). Aquaculture **223**: 29-39.
- PEYRETAILLADE, E., C. BIDERRE, P. PEYRET, F. DUFFIEUX, G. MÉTÉNIER, M. GOUY, B. MICHOT y C. P. VIVARÈS 1998 Microsporidian *Encephalitozoon cuniculi*, a unicellular eukaryote with an unusual chromosomal dispersion of ribosomal genes and a LSU rRNA reduced to the universal core. Nucleic Acids Research. **26**: 3513-3520.
- PODER, M., M. AUFFRET y G. BALOUET 1983 Etudes pathologiques et épidémiologiques des lésions parasitaires chez *Ostrea edulis* L. - premiers resultats d'une recherche prospective comparative chez les principales especes de mollusques des zones ostréicoles de Bretagne nord. In: Colloques sur



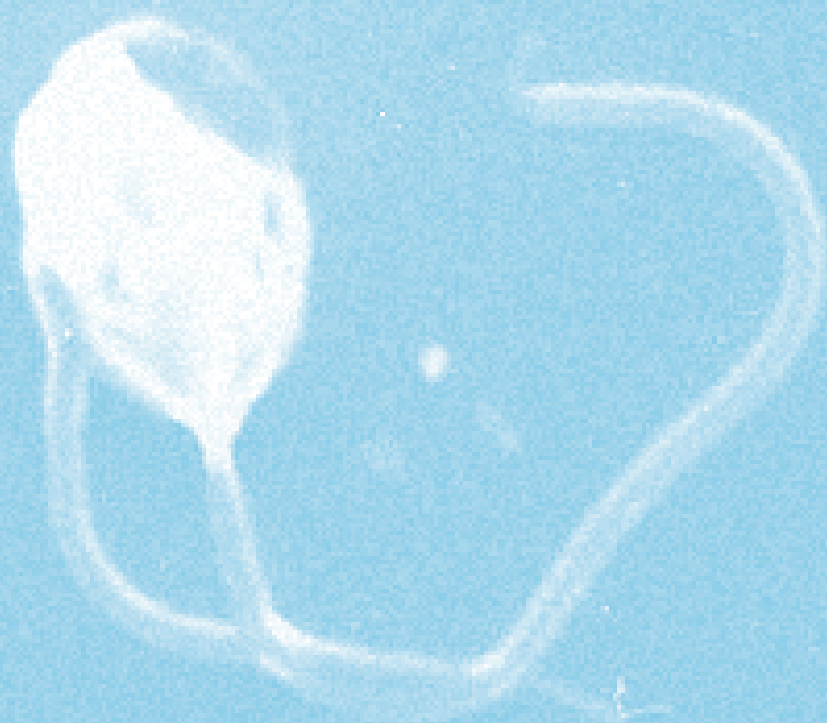
- les bases biologiques de l'aquaculture, Dec. 12-16, 1983. CNRS-CNEXO, Montpellier, p. 125-138
- RENAULT, T., N. COCHENNEC y B. CHOLLET 1995 Marteilirosis in American oysters *Crassostrea virginica* reared in France. Diseases of Aquatic Organisms. **23**: 161-164.
- ROBERT, R., M. BOREL, Y. PICHOT y G. TRUT 1991 Growth and mortality of the european oyster *Ostrea edulis* in the Bay of Arcachon (France). Aquatic Living Resources **4**: 265-274.
- ROBLEDO J. A. F. y A. FIGUERAS 1995 The effects of culture-site, depth, season and stock source on the prevalence of *Marteilia refringens* in cultured mussels (*Mytilus galloprovincialis* LMK) from Galicia. Journal of Parasitology **81**: 354-363.
- ROBLEDO, J. A. F., V. BOULO, E. MIALHE, M. DESPRES y A. FIGUERAS 1994 Monoclonal antibodies against sporangia and spores of *Marteilia* sp. (Protozoa: Ascetosporea). Diseases of Aquatic Organisms. **18**: 211-216.
- ROBLEDO, J. A. F., E. MIALHE y A. FIGUERAS 1995 Purification of several phases of the parasite *Marteilia* (Protozoa: Ascetosporea) from mussels (*Mytilus galloprovincialis*). En: STOLEN JS, FLETCHER TC, SMITH SA, ZELIKOFF JT, KAATARI SL, ANDERSON RS, SODERHALL K, WEEKS-PERKINS BA (Eds.), Techniques in Fish Immunology. vol. 4, S.O.S. Publications, Fair Haven (E.E.U.U.), pp.117-121.
- ROUBAL, F. R., J. MASEL, y R. J. G. LESTER 1989 Studies on *Marteilia sydneyi*, agent of QX disease in the Sydney rock oyster, *Saccostrea commercialis*, with implications for its life cycle. Australian Journal of Marine and Freshwater Research **40**: 155-167.
- SPRAGUE, V., 1982 Ascetosporea. In: Synopsis and classification of living organisms, Volume 1 (Ed. Parker, S.P.). McGraw-Hill Book Company, New York, pp. 599-601.
- STILLER, J. W. y B. D. HALL 1999 Long branch attraction and the rDNA model of eukaryotic evolution. Molecular Biology and Evolution **16**: 1270-1279.
- TAVEEKIJAKARN, P., G. NASH, T. SOMSIRI, y S. PUTINAOWARAT 2002 *Marteilia*-like species: first record in Thailand. The aquatic Animal Health Research Institute Newsletter **11**: 1-2.
- THOESON, J. C. 1994 Suggested Procedures for the Detection and Identification of Certain Finfish and Shellfish Pathogens, Fifth Edition. *Bluebook*, American Fisheries Society, Bethesda, USA.
- TIGÉ, G. y M. A. RABOUIN 1976 Etude d'un lot de moules transférées dans un centre touché par l'épizootie affectant l'huître plate. Conseil International pour l'Exploration de la Mer C.M.; K21, 1-10.
- TISCAR, P. G., M. TEMPESTA and M. COMPAGNUCCI 1993 Peroxidase conjugated polyclonal antibody against *Marteilia* sp. purified from infected mussels (*Mytilus galloprovincialis*, Lmk) cultivated in Apulia, southern Italy. Bulletin of The European Association of Fish Pathology. **13(2)**: 53-55.



- VAN BANNING, P. J. 1988 Management strategies to control diseases in the Dutch culture of edible oysters. In: Advances in Fisheries Science: Pathobiology of marine and estuarine organisms (Eds. Couch, J.A. and Fournie, J.W.). Boca Raton, CRC Press, pp. 243-245.
- VILLALBA, A., M. C. LÓPEZ y M. J. CARBALLAL 1993a Parasites and pathologic conditions of three clam species, *Ruditapes decussatus*, *Venerupis pullastra*, and *Venerupis rhomboides*, in the galician rias. Actas del IV Congreso Nacional de Acuicultura. Centro de Investigaciones Mariñas, Pontevedra, España, pp. 551-556.
- Villalba, A., S. G. Mourelle, M. J. Carballal y M. C. LÓPEZ 1993b Effects of infection by the protistan parasite *Marteilia refringens* on the reproduction of cultured mussels *Mytilus galloprovincialis* in Galicia (NW Spain). Diseases of Aquatic Organisms. **17**: 205-213.
- VILLALBA, A., S. G. MOURELLE, M. C. LÓPEZ, M. J. CARBALLAL y C. AZEVEDO, 1993c Marteiliasis affecting cultured mussels *Mytilus galloprovincialis* of Galicia (NW Spain). 1. Etiology, phases of the infection, and temporal and spatial variability in prevalence. Diseases of Aquatic Organisms **16**: 61-72.
- WALKER, P. y R. P. SUBASINGHE 2000 DNA-based Molecular Diagnostic Techniques. Research needs for standardization and validation of the detection of aquatic animal pathogens and diseases. FAO Fisheries Technical Paper, n° 395, 93 pp.
- WESCHE, S. J. 1995 Outbreaks of *Marteilia sydneyi* in Sydney rock oysters and their relationship with environmental pH. Bulletin of the European Association of Fish Pathology **15 (1)**: 23-27.
- WESCHE, S. J., R. D. ADLARD, y R. J. G. LESTER 1999 Survival of spores of the oyster pathogen *Marteilia sydneyi* (Protozoa, Paramyxea) as assessed using fluorogenic dyes. Diseases of Aquatic Organisms **36**: 221-226.
- WOLF, P. H. 1979 Life cycle and ecology of *Marteilia sydneyi* in the Australian oyster, *Crassostrea commercialis*. Marine Fishery Review **41**: 70-72
- WOLF, P. H. 1977 An unidentified protistan parasite in the ova of the black-lipped oyster, *Crassostrea echinata*, from Northern Australia. Journal of Invertebrate Pathology. **29**: 244-246.
- ZRNIC, S., F. LE ROUX, D. ORAIC, B. SOSTARIC y F. BERHTE 2001 First record of *Marteilia* sp., in mussels *Mytilus galloprovincialis* in Croatia. Diseases of Aquatic Organisms. **44**: 143-148.

8

ENFERMEDADES CAUSADAS POR PARÁSITOS DEL GRUPO HAPLOSPORIDIA



ENFERMEDADES CAUSADAS POR PARÁSITOS DEL GRUPO HAPLOSPORIDIA

Abollo E.¹ y Villalba A.²

¹Centro Tecnológico del Mar – Fundación CETMAR

Eduardo Cabello s/n, 36208 Vigo, España

²Centro de Investigacións Mariñas (CIMA). Consellería do Mar.

Pedras de Corón s/n. 36620 Vilanova de Arousa, España

Resumen

Los protozoos del filo Haplosporidia son parásitos obligados o hiperparásitos de una amplia variedad de hospedadores invertebrados. Actualmente, se aceptan como válidos 4 géneros dentro del grupo: *Haplosporidium*, *Urosporidium*, *Minchinia* y *Bonamia*. En general, los haplosporidios se caracterizan por presentar dos estadios dentro de los hospedadores: un estadio de plasmodio, que se multiplica por plasmotomía, y un estadio de espora, probablemente de resistencia; no obstante en tres especies del género *Bonamia*, *B. ostreae*, *B. exitiosa* y *B. roughleyi*, nunca se han observado esporas y los plasmodios son poco frecuentes, siendo su estadio más frecuente el de microcélulas uninucleadas que al dividirse generan dos células hijas. Este capítulo aborda más detalladamente la revisión de las tres especies parásitas de mayor relevancia, debido a las importantes mortandades y pérdidas económicas que ocasionan al sector marisquero en todo el mundo: *Haplosporidium nelsoni*, *Bonamia ostreae* y *Bonamia exitiosa*. *H. nelsoni* es causante de mortandades masivas de la ostra *Crassostrea virginica* de la costa atlántica de los EE.UU; además se ha detectado en ostras *Crassostrea gigas* en EE.UU, Corea, Japón y Francia. A *B. ostreae* se le



responsabiliza de mortalidades muy altas de la ostra plana *Ostrea edulis* en la costa atlántica Europea y en el litoral pacífico y atlántico de los EE.UU; también se ha detectado en Canadá y en Marruecos. *B. exitiosa* ha causado mortandades masivas de la ostra *Ostrea chilensis* en Nueva Zelanda y también se ha detectado su presencia en ostras *Ostrea angasi* de Australia y *O. edulis* de España. La dinámica de la enfermedad causada por *H. nelsoni* está muy influida por la temperatura y la salinidad, lo que determina una marcada estacionalidad de la adquisición de nuevas infecciones, intensificación de la enfermedad y mortalidad de las ostras; en el caso de la bonamiosis, las infecciones nuevas pueden adquirirse en cualquier mes del año y se hacen más intensas en los meses cálidos. El diagnóstico se ha basado tradicionalmente en el examen de cortes histológicos. Con el reciente desarrollo de las herramientas moleculares, basadas en la PCR y en sondas de ADN, se ha logrado mejorar la especificidad y rapidez de las identificaciones de estas especies patógenas, pero también se han abierto nuevos campos que están permitiendo ampliar el conocimiento de aspectos tan diversos de la biología de estos parásitos como son su distribución geográfica, rango hospedador, epidemiología, ciclo de vida o formas de transmisión.

Abstract

The protozoans of the phylum Haplosporidia are obligate parasites or hyperparasites of a wide range of invertebrate hosts. Nowadays 4 genera are included in the phylum: Haplosporidium, Urosporidium, Minchinia y Bonamia. Two stages of the haplosporidians are known within the host: the plasmodial stage, which multiplies through plasmotomy, and the spore, probably a dormant stage. Nevertheless, spores have never been observed in 3 species of the genus Bonamia, B. ostreae, B. exitiosa and B. roughleyi; in these 3 species, the plasmodia are not common and the most frequent stage is uninucleated microcell, which divides producing two uninucleated cells. This chapter is focused on the 3 species with the highest relevance, because of the important mortality and economic losses they cause to the shellfish industry world round: Haplosporidium nelsoni, Bonamia ostreae y Bonamia exitiosa. H. nelsoni causes mass mortalities of the oyster Crassostrea virginica in the Atlantic coast of the USA; in addition, it has been detected in oysters



Crassostrea gigas in the USA, Korea, Japan and France. *B. ostreae* is blamed for flat oyster *Ostrea edulis* high mortality in the Atlantic coast of Europe and the Pacific and Atlantic coast of the USA; it also has been reported from Canada and Morocco. *B. exitiosa* has caused mass mortalities of the oyster *Ostrea chilensis* in New Zealand and it has been detected in oysters *Ostrea angasi* of Australia and *O. edulis* of Spain. The dynamics of the disease caused by *H. nelsoni* is strongly influenced by temperature and salinity, which entails marked seasonality of new infections, disease intensification and oyster mortality. In the case of bonamiosis, the new infections can be acquired throughout the year and intensify in warm months. Traditionally, diagnosis has been based on the examination of histological sections. Diagnosis specificity and quickness have been improved with the implementation of molecular tools, based on PCR and DNA probes. The molecular tools have contribute to open new experimental fields thus allowing to increase knowledge on various aspects of these parasites such as geographic distribution, host species range, epidemiology, life cycle or transmission ways.

1. INTRODUCCIÓN

Desde el descubrimiento de las primeras especies a finales del siglo XIX, los Haplosporidia han sido un grupo problemático para taxónomos y filogenetistas. Históricamente, el taxón fue un cajón de sastre que incluía aquella diversidad de parásitos que no eran fácilmente clasificables y que tenían dos estadios en su ciclo de vida: un estadio de plasmodio y un estadio de resistencia como espora (SPRAGUE 1979). Los haplosporidios constituyen un pequeño grupo de endoparásitos histozoicos y celozoicos, que forman esporas e infectan mayoritariamente a invertebrados marinos (PERKINS 2000). Actualmente, se reconocen como válidas 39 especies, aunque otras muchas fueron descritas, pero no identificadas a nivel de especie, en numerosos hospedadores invertebrados. De las 40 especies descritas 17 infectan moluscos bivalvos, siendo tres de ellas, *Bonamia ostreae*, *B. exitiosa* y *Haplosporidium nelsoni*, causantes de enfermedades de declaración obligatoria para la Organización Mundial de Sanidad Animal, debido a los importantes eventos de mortalidad que ocasionan en las poblaciones de moluscos bivalvos que infectan. Este trabajo revisa la filogenia del grupo, así como de los



taxones actualmente incluidos en el mismo, enfatizando la importancia de los resultados obtenidos mediante el análisis de filogenias moleculares. Dada la importancia de las enfermedades causadas por *B. ostreae*, *B. exitiosa* y *H. nelsoni* en las poblaciones de ostra, este trabajo se centrará en la revisión de los siguientes aspectos: distribución geográfica y rango hospedador, ciclo de vida y vías de transmisión, epidemiología, patología y métodos diagnósticos aplicables a dichas enfermedades. En otro capítulo del libro se aborda con más detalle las estrategias de lucha contra las enfermedades de moluscos bivalvos.

2. FILOGENIA DE LOS HAPLOSPORIDIOS

Los esquemas taxonómicos propuestos para la clasificación de este grupo han sido numerosos. CAULLERY y MESNIL (1899) establecieron el género *Aplosporidium*, posteriormente enmendado por LÜHE (1900) como *Haplosporidium*, para la clasificación de dos nuevas especies *H. scolopli* y *H. heterocirri*, parásitas de anélidos marinos. Este nuevo género fue ubicado en un nuevo orden Haplosporidia perteneciente a la clase Sporozoa. En los años sucesivos, la clasificación interna de los Haplosporidia sufrió varias modificaciones (KUDO 1931; CAULLERY 1953; SPRAGUE 1966; SPRAGUE 1970), pero el principal cambio vino de la mano de SPRAGUE en 1979, quien creó el filo Ascetospora incluyendo dos clases: la clase Stellatosporea con las familias Marteiliidae, Haplosporidiidae y Urosporidiidae, y la clase Paramyxea con la familia Paramyxidae. En esta nueva clasificación, la familia Haplosporidiidae incluía los géneros *Haplosporidium* y *Minchinia*. Posteriormente, DESPORTES y NASHED (1983) incluyeron la familia Marteiliidae en la clase Paramyxea. Actualmente la clasificación de SPRAGUE (1979) está en desuso, desapareciendo el filo Ascetospora, y elevando a nivel de filo los taxones Haplosporidia y Paramyxea (DESPORTES y PERKINS 1990; PERKINS 1990, 1991; CAVALIER-SMITH 1993).

Los primeros trabajos de filogenia molecular de los Haplosporidia ubicaron al filo como un grupo monofilético dentro de los Alveolata y como un taxón de igual rango que los otros filos incluidos en los Alveolata (SIDALL *et al.* 1995; FLORES *et al.* 1996). Análisis más recientes, empleando un mayor número de secuencias y de taxones, localizaron



los Haplosporidia como un taxón hermano de los Dictyosteliidae (BERTHE *et al.* 2000). Este trabajo también apoyó la separación a nivel de filo de los Haplosporidia y los Paramyxea. CAVALIER-SMITH (2002) y CAVALIER-SMITH y CHAO (2003) hipotetizaron la inclusión del género *Marteilia* en los Haplosporidia y su proximidad filogenética a los Cercozoa. El análisis de filogenia molecular realizado por REECE *et al.* (2004), incluyendo en su estudio genes ribosomales y de la actina, apoyó la monofilia de los haplosporidios y su proximidad filogenética a los Cercozoa, y también rechazó la inclusión de los Paramyxea dentro de los Haplosporidia. La reciente clasificación de los eucariotas realizada por ADL *et al.* (2005) ubica los Haplosporidia en el super-grupo de los Rhizaria, el cual incluye como taxones próximos filogenéticamente los Cercozoa, Foraminifera, Radiolaria y *Gromia*.

3. TAXONES INCLUIDOS EN EL FILO HAPLOSPORIDIA

Dentro de los Haplosporidia se reconocen 3 géneros como válidos: *Urosporidium*, *Minchinia* y *Haplosporidium*; no obstante, trabajos recientes de filogenia molecular apoyan la inclusión del género *Bonamia* en este filo (CARNEGIE *et al.* 2000; COCHENNEC-LAUREAU *et al.* 2003; REECE *et al.* 2004; BURRESON y REECE 2006).

Históricamente, el grupo se caracteriza por presentar dos estadios en su ciclo de vida: un estadio de plasmodio y un estadio de resistencia como espora. Los plasmodios pueden presentar hasta unos 100 núcleos y un diámetro de 5 a 20 μm , aunque pueden alcanzar los 50 μm o más (Fig. 1). Los plasmodios de todas las especies son similares, por lo que su morfología no se puede emplear con fines taxonómicos (BURRESON, 2005). Las esporas presentan un tamaño que varía entre 4 y 12 μm de longitud, dependiendo de las especies (Figs. 2-4), siendo la ornamentación de la espora el principal criterio morfológico para la asignación de género y para la identificación de especies en los Haplosporidia (BURRESON 2005). La morfología ultraestructural de las esporas del género *Urosporidium* se caracteriza por tener una pestaña interna derivada de la pared de la espora tapando el orificio de la misma. *Haplosporidium* y *Minchinia* se caracterizan por presentar un orificio

FIG. 1.
Micrografía de un corte histológico de la glándula digestiva de ostra *Crassostrea virginica* en cuyo tejido conjuntivo se observan numerosos plasmodios de *Haplosporidium nelsoni* (flechas) así como infiltración hemocitaria. Tinción: hematoxilina-eosina.

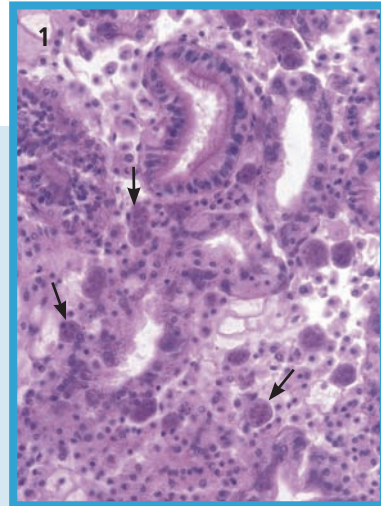
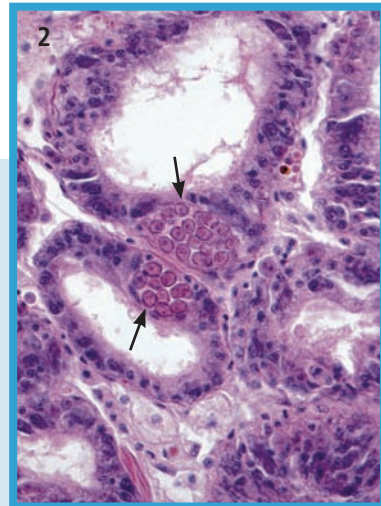


FIG. 2.
Micrografía de un corte histológico de la glándula digestiva de ostra *Crassostrea virginica* en que se observan esporas de *Haplosporidium nelsoni* (flechas) en el epitelio de dos cortes de túbulos digestivos contiguos. Tinción: hematoxilina-eosina.



cubierto por un opérculo articulado (Fig. 5). La principal diferencia entre las esporas de ambos géneros es la presencia/ausencia de ornamentos unidos a la pared de la espora. La carencia de una definición precisa y detallada de los términos empleados para describir estas estructuras ha originado algunos problemas taxonómicos (McGOVERN y BURRESON

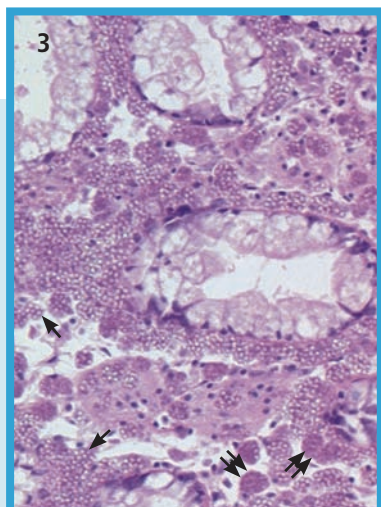


FIG. 3.

Micrografía de un corte histológico de la glándula digestiva de berberecho *Cerastoderma edule* cuyo tejido conjuntivo aparece invadido por esporas de *Haplosporidium edule* (flechas); también se observan algunos plasmodios (flechas dobles) en proceso de esporulación. Tinción: hematoxilina-eosina.



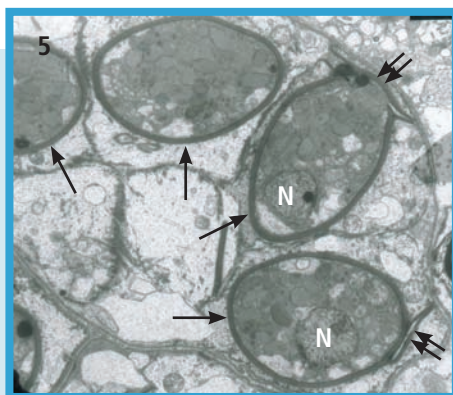
FIG. 4.

Micrografía de un corte histológico de la glándula digestiva de almeja *Ruditapes decussatus* cuyo tejido conjuntivo aparece invadido por esporas de *Minchinia tapetis*, teñidas de rojo. Tinción: tricrómica de Gomori.

1990; FLORES *et al.* 1996; AZEVEDO 2001; BURRESON 2001). La inconsistencia terminológica se vio agravada por la carencia de una descripción precisa de la ornamentación de la espora de la especie tipo del género *Haplosporidium*, *H. scolopli*. SPRAGUE (1970) sugirió que la presencia o ausencia de filamentos o colas en la espora podía emplearse para distinguir ambos

géneros. ORMIÈRES (1980) fue el primer autor que consideró el origen estructural de la ornamentación de la espora y estableció la distinción entre extensiones de la pared de la espora y extensiones del citoplasma de la epispora. En trabajos posteriores, PERKINS (1990, 1991) agrupó las especies que tenían esporas con extensiones visibles con microscopía óptica, sin considerar el origen de la estructura, en el género *Haplosporidium*, y las especies con esporas sin extensiones visibles en el género *Minchinia*. PERKINS (1991) estableció que la distinción hecha por ORMIÈRES (1980) quedaba invalidada debido a la morfología de *Minchinia armoricana* descrita por PERKINS y VAN BANNING (1981). Sin embargo, un estudio posterior de esta especie realizado por AZEVEDO *et al.* (1999) documenta que la ornamentación de la espora de *M. armoricana* deriva de la pared de la espora, por lo que siguiendo la clasificación establecida por ORMIÈRES (1980), los autores transfieren la especie al género *Haplosporidium*. La propuesta taxonómica de Perkins no ganó demasiados adeptos y de forma general se tiene en consideración el origen ontogénico de la ornamentación. Por ello, a pesar de la controversia, el género *Haplosporidium* engloba aquellas especies cuyas esporas presentan colas o filamentos derivados de la pared de la espora (SPRAGUE 1979; ORMIÈRES 1980; HINE y THORNE 1998; AZEVEDO *et al.* 1999, 2003; CIANCIO *et al.* 1999; BURRESON 2001) (Fig. 6), mientras que las esporas del género *Minchinia* se caracterizan por carecer de colas o por poseer ornamentaciones derivadas del citoplasma de la epispora, las cuales son efímeras y desaparecen durante el periodo de maduración de la espora (ORMIÈRES

FIG. 5.
Micrografía, obtenida con microscopio electrónico de transmisión, de un corte ultrafino en que se observan esporas de *Minchinia tapetis* (flechas). Las flechas dobles señalan el opérculo de la espora; N. núcleo.



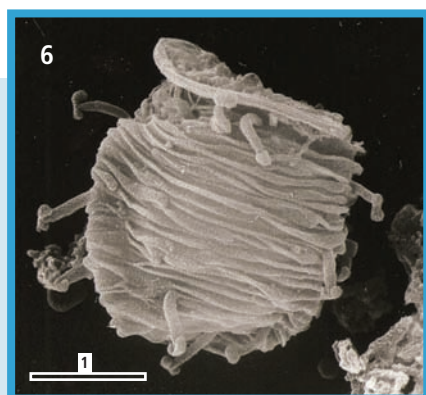


FIG. 6.

Micrografía, obtenida con microscopio electrónico de barrido, de una espora de *Haplosporidium edule* en que se aprecian los filamentos de la pared de la espora. Micrografía cedida por el Prof. Carlos Azevedo.

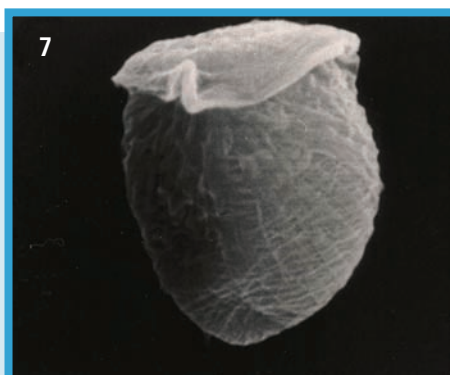


FIG. 7.

Micrografía, obtenida con microscopio electrónico de barrido, de una espora de *Minchinia tapetis* en que se observa que la pared de la espora está desprovista de filamentos. Micrografía cedida por el Prof. Carlos Azevedo.

y DE PUYTORAC 1968; MARCHAND y SPRAGUE 1979; DESPORTES y NASHED 1983; AZEVEDO 2001) (Figs. 5-7).

Trabajos recientes de filogenia molecular apoyan la importancia de origen ontogénico de la ornamentación de la espora (REECE *et al.* 2004; BURRESON y REECE 2006). En sus análisis, todas las especies del género *Minchinia*, cuyas ornamentaciones derivan del citoplasma de la epispora, constituyen un clado monofilético, mientras que las especies del género *Haplosporidium* forman un clado parafilético (Fig. 9). Estos resultados sugieren que los criterios taxonómicos actualmente en vigor no se pueden aplicar a aquellas especies cuyas ornamentaciones deriven de la pared de la espora, lo que indicaría la necesidad de un mayor número de géneros para clasificar la diversidad morfológica de

especies incluidas actualmente en el género *Haplosporidium* (REECE *et al.* 2004; BURRESON y FORD 2004; BURRESON y REECE 2006).

La complejidad taxonómica del filo se vio incrementada cuando los primeros trabajos de filogenia molecular revelaron que el género *Bonamia* y la especie *Mikrocytos roughleyi* (actualmente *Bonamia roughleyi*) también debían incluirse en los Haplosporidia (CARNEGIE *et al.* 2000; COCHENNEC-LAUREAU *et al.* 2003) (Fig. 9). En ese momento, aunque se habían observado estadios plasmodiales, no se conocía para ninguna de las especies de *Bonamia* descritos estadios de resistencia en forma de espora, siendo una célula uninucleada el tipo celular más comúnmente observado. La afinidad taxonómica de *Bonamia* spp. a los Haplosporidia había sido argüida en 1980 por PICHOT *et al.* En su descripción de *Bonamia ostreae*, señalan la presencia en esta especie de un orgánulo común a todos los Haplosporidia, los haplosporosomas (Fig. 8). El descubrimiento en 1982 por BREHÉLIN *et al.* de verdaderas formas plasmodiales del parásito claramente lo relacionó con los Haplosporidia. PERKINS (1987, 1988) también ubicó el género *Bonamia* en los Haplosporidia y enfatizó la ausencia de células dentro de células como evidencia para excluirlas de los Paramyxia, ya que estos también presentan haplosporosomas. En un reciente trabajo de filogenia molecular, REECE *et al.* (2004) mostraron que las especies de *Bonamia* formaban un clado monofilético dentro de los tradicionales taxones de los Haplosporidia, siendo un taxón hermano del género *Minchinia*.

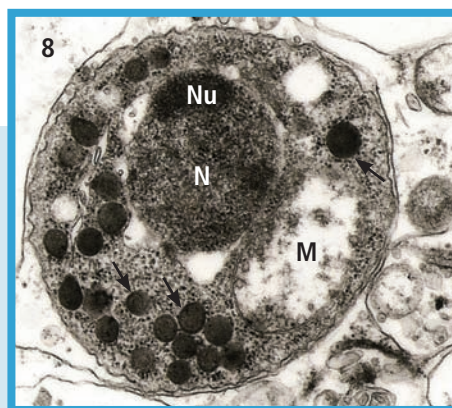


FIG. 8.

Micrografía, obtenida con microscopio electrónico de transmisión, de un corte ultrafino que muestra una microcélula uninucleada de *Bonamia ostreae*, en cuyo citoplasma aparecen numerosos haplosporosomas (flechas). M: mitocondria; N: núcleo; Nu: Nucleolo.

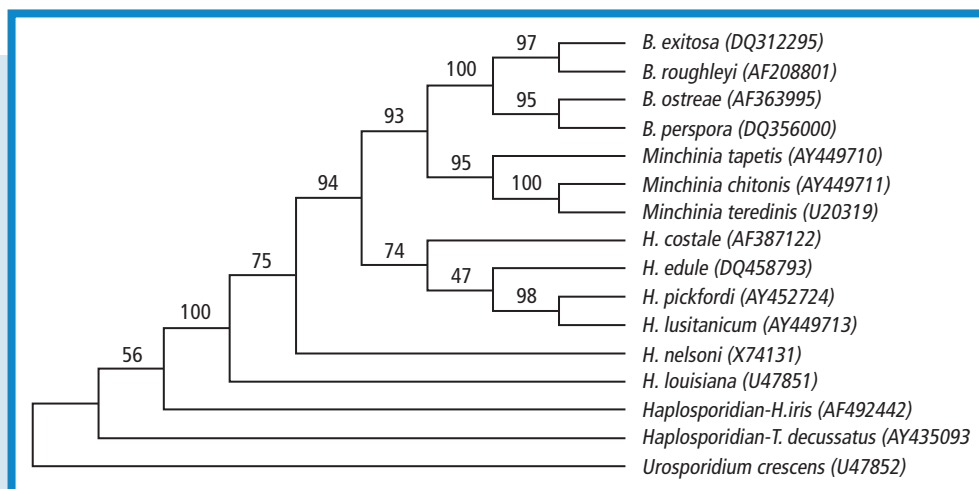


FIG. 9.

Análisis de Máxima Parsimonia mostrando la posición taxonómica y las relaciones filogenéticas de los diferentes géneros incluidos actualmente en el Phylum Haplosporidia. Los números en el nudo de las ramas indican los valores porcentuales de confianza del bootstrap.

La proximidad filogenética a un género que desarrolla esporas sugería que las especies del género *Bonamia* podrían formar esporas, y que probablemente los estadios conocidos (microcélulas) no eran más que estadios intermedios de un complejo ciclo de vida, en el cual las esporas se podrían encontrar infectando algún otro hospedador todavía desconocido (BURRESON y REECE 2004; REECE *et al.* 2004). En 2006, CARNegie *et al.* publicaron el descubrimiento de una nueva especie, *Bonamia perspora*, la cual se caracteriza por presentar plasmodios y esporas con un opérculo externo y ornamentación derivada de la pared de la espóra. La confirmación de que al menos una especie del género *Bonamia* desarrolla esporas con características morfológicas propias del género *Haplosporidium*, ha ocasionado un nuevo problema taxonómico en la diagnosis de los géneros *Haplosporidium* y *Bonamia*, ya que actualmente ambos géneros no se pueden diferenciar en base a caracteres morfológicos. *Bonamia* queda definido como género en base a la monofilia observada en los análisis de filogenia molecular, mientras que *Haplosporidium* forma un grupo parafilético. El género



Haplosporidium es difícil de definir tanto por la falta de información sobre la ornamentación de la espora en la especie tipo como por la carencia de datos de secuencias de ADN para otras especies del género. BURRESON y REECE (2006) señalaron que la ornamentación de la espora puede ser un carácter válido para definir especies pero no para la asignación de especies a géneros. Sin embargo, recomiendan que aquellas especies con ornamentaciones derivadas de la pared de la espora que no se agrupen con *Bonamia* spp. en los análisis de filogenia molecular, deberían asignarse a *Haplosporidium*, hasta que se resuelvan las incógnitas existentes sobre la especie tipo, *H. scolopli*, y se establezcan unos criterios morfológicos sólidos para la descripción de los diferentes géneros de haplosporidios.

En la revisión de los Haplosporidia realizada por BURRESON y FORD (2004) reconocen 36 especies como válidas. Desde entonces, se han descrito 4 nuevas especies: *Bonamia perspora* infectando la ostra *Ostreola equestris* (CARNEGIE et al. 2006), *Haplosporidium montforti* infectando la oreja de mar *Haliotis tuberculata* (AZEVEDO et al. 2006), *Haplosporidium hinei* parasitando la ostra perlífera *Pinctada máxima* (BEARHAM et al. 2008a) y *Minchinia occulta* infectando poblaciones de *Saccostrea cucullata* (BEARHAM et al. 2007; 2008b). De estas 40 especies 17 infectan a moluscos bivalvos o, como en el caso de *Urosporidium*, son especies hiperparásitas de trematodos parásitos de bivalvos (Tabla 1). Además, existe otro grupo de unos 18 haplosporidios que no han sido asignados a especies o incluso a género, de ellos 12 infectan moluscos bivalvos. *Haplosporidium* sp. se identificó parasitando poblaciones de *Crassostrea gigas* (COMPS y PICHOT 1991) y *Ostrea angasi* (BACHERE et al. 1987) en Francia. HINE y THORNE (2002) también identificaron *Haplosporidium* sp. infectando poblaciones de *Saccostrea cucullata* en la costa occidental de Australia y lo asociaron con un evento de mortalidad masiva en los años 90. Recientemente, BEARHAM et al. (2007; 2008b) han caracterizado molecularmente este mismo parásito y lo han ubicado filogenéticamente como perteneciente al género *Minchinia*, creando la nueva especie *Minchinia occulta*. *Minchinia* sp. también ha sido identificada infectando al mejillón *Mytilus galloprovincialis* en Francia (COMPS y TIGÉ 1997). Recientemente, CARBALLAL et al. (2005) describieron la ultraestructura de la espora de *Urosporidium*



TABLA 1.

Especies de Haplosporidia aceptadas como válidas que infectan moluscos bivalvos.

Género <i>Urosporidium</i>	Género <i>Minchinia</i>
<p>Especie: <i>U. pelseneeri</i> (Caullery y Chappellier 1906) Hospedador: esporoquistes de trematodos en las almejas <i>Donax vittatus</i>, <i>Barnea candida</i> Localización: Canal de Inglaterra, Francia</p> <p>Especie: <i>U. constantae</i> (Howell 1967) Hospedador: <i>Bucephalus longicornutus</i> (esporoquiste, trematodo) en la ostra <i>Ostrea lutaria</i> Localización: Nueva Zelanda</p> <p>Especie: <i>U. jiroveci</i> (Omières et al. 1973) Hospedador: <i>Gymnophallus nereicola</i> (esporoquiste, trematodo) en la almeja <i>Abra ovata</i> Localización: Mar Mediterráneo, Francia</p> <p>Especie: <i>U. spisuli</i> (Perkins et al. 1975) Hospedador: nematodos en la almeja <i>Spisula solidissima</i> Localización: costa este de EE.UU</p>	<p>Especie: <i>M. tapetis</i> (Vilela 1951) Hospedador: <i>Ruditapes decussatus</i> (almeja) Localización: Portugal, noroeste de España</p> <p>Especie: <i>M. teredinis</i> (Hillman et al. 1990) Hospedador: <i>Teredo</i> spp. (broma) Localización: costa este de EE.UU</p> <p>Especie: <i>M. occulta</i> (Bearham et al. 2008) Hospedador: <i>Saccostrea cucullata</i> (ostras) Localización: costa noroeste de Australia</p>
Género <i>Haplosporidium</i>	Género <i>Bonamia</i>
<p>Especie: <i>H. costale</i> (Wood y Andrews 1962) Hospedador: <i>Crassostrea virginica</i> (ostra) Localización: costa este de EE.UU</p> <p>Especie: <i>H. nelsoni</i> (Haskin et al. 1966) Hospedador: <i>Crassostrea virginica</i>, <i>Crassostrea gigas</i> (ostra) Localización: costa este de Norte América; California, EE.UU; Japón; Corea; Francia</p> <p>Especie: <i>H. tumefacientis</i> Taylor 1966 Hospedador: <i>Mytilus californianus</i> (mejillón) Localización: California, USA</p> <p>Especie: <i>H. armoricanum</i> (van Banning 1977) Hospedador: <i>Ostrea edulis</i>, <i>Ostrea angasi</i> (ostra) Localización: Europa</p> <p>Especie: <i>H. edule</i> Azevedo et al. 2003 Hospedador: <i>Cerastoderma edule</i> (berberecho) Localización: noroeste de España Cita bibliográfica: Azevedo et al 2003</p> <p>Especie: <i>H. hinei</i> Bearham et al. 2008 Hospedador: <i>Pinctada maxima</i> (ostra perlífera) Localización: oeste de Australia</p>	<p>Especie: <i>B. ostreae</i> (Pichot et al. 1979; especie tipo) Hospedador: <i>Ostrea edulis</i> (ostra plana) Localización: Europa; California, Maine (EE.UU); Canadá; Marruecos</p> <p>Especie: <i>B. exitiosa</i> (Hine et al. 2001) Hospedador: <i>Ostrea chilensis</i>, <i>Ostrea angasi</i>, <i>Ostrea edulis</i>, <i>O. puelchana</i>, <i>Crassostrea ariakensis</i> (ostras) Localización: Nueva Zelanda, Australia, noroeste de España, Argentina, Chile, Carolina del Norte (EE.UU)</p> <p>Especie: <i>B. roughleyi</i> (Farley et al. 1988) Hospedador: <i>Saccostrea commercialis</i> (ostra) Localización: Nueva Gales del Sur (Australia)</p> <p>Especie: <i>B. perspora</i> (Carnegie et al. 2006) Hospedador: <i>Ostreola equestris</i> (ostra) Localización: Carolina del Norte (EE.UU)</p>



sp. infectando al turbelario *Paravortex cardii*, localizado en el lumen digestivo de un berberecho, *Cerastoderma edule*, en Galicia (España). Otros parásitos tipo Haplosporidia se han descrito infectando las ostras *C. gigas* en California (EE.UU) (KATKANSKY y WARNER 1970) y *Ostrea lurida* en Oregón (EE.UU) (MIX y SPRAGUE 1974); las almejas *Tresus capax* en Oregón (ARMSTRONG y ARMSTRONG 1974), *Ruditapes decussatus* en Galicia (NOVOA *et al.* 2004) y *Ruditapes philippinarum* en Japón (ITO *et al.* 2005); la vieira *Argopecten irradians* en China (CHU *et al.* 1996); el longueirón *Ensis minor* en Italia (CESCHIA *et al.* 2001); los mejillones *Mytilus edulis* en Maine (EE.UU), Nueva Escocia (Canadá) (FIGUERAS *et al.* 1991; STEPHENSON *et al.* 2002) e Inglaterra (Reino Unido) (BIGNELL *et al.* 2008) y *Mytilus galloprovincialis* en Galicia (FUENTES *et al.* 2002) e Inglaterra (BIGNELL *et al.* 2008); y el mejillón cebra *Dreissena polymorpha* en Francia y Alemania (BURRESON y FORD 2004).

La mayoría de las especies de estos géneros no son patógenos importantes para las poblaciones hospedadoras que parasitan, debido a los bajos valores de prevalencia que presentan. Sin embargo tres de ellas, *H. nelsoni*, *B. ostreae* y *B. exitiosa*, tienen especial relevancia debido a los graves efectos que provocan en las poblaciones de moluscos que infectan (CARNEGIE 2005). Las mortandades asociadas a estas especies han afectado gravemente al desarrollo socio-económico del sector marisquero en muchos países, convirtiéndose en una seria restricción para el crecimiento y la sostenibilidad del mismo. Dada la importancia de estas enfermedades, incluidas en la lista de enfermedades notificables de la Organización Mundial de Sanidad Animal, a lo largo del desarrollo de los siguientes epígrafes de este capítulo, nos centraremos en la revisión de diferentes aspectos de la biología y diagnóstico de estas especies, así como de los efectos patológicos que causan.

4. DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA Y RANGO DEL HOSPEDADOR

H. nelsoni, también denominado MSX (*multinucleate sphere X*), fue identificado como el agente causal de las mortalidades masivas de la ostra americana *Crassostrea virginica* en la bahía de Delaware (EE.UU) en 1957. Dos años mas tarde se descubrió la enfermedad en



la bahía de Chesapeake, y a lo largo de los años 60, se identificó *H. nelsoni* infectando la ostra americana en aguas costeras de Carolina del Norte, Virginia, Maryland, Delaware, Nueva Jersey, Connecticut y Nueva York. Los muestreos periódicos realizados desde mediados de los años 60 hasta principios de los 80, no detectaron el parásito al sur de Carolina del Norte. Sin embargo, en 1984 el rango geográfico de la enfermedad se amplió desde el río Damariscotta (Maine) a la Bahía de Byscaine (Florida). En 1991, se describe una epidemia de *H. nelsoni* en el estuario del río Piscataqua en Maine/New Hampshire (USA) (BARBER *et al.* 1991a). En el otoño de 2002 STEPHENSON *et al.* (2003) identifican por primera vez *H. nelsoni* en Bras d'Or Lakes en Cape Breton (Nueva Escocia, Canadá). *H. nelsoni* también ha sido identificado infectando la ostra japonesa *Crassostrea gigas* en California, Corea, Japón y Francia (BURRESON *et al.* 2000; RENAULT *et al.* 2000; KAMAISHI y YOSHINAGA 2002). Entre 1989 y 1993, más del 10% de las semillas de *C. gigas* procedentes de Japón, que fueron examinadas para importación en California, estaban infectadas por *H. nelsoni* (FRIEDMAN *et al.* 1991; FRIEDMAN 1996). En Junio de 2007, también se detectó *H. nelsoni* infectando algunos individuos de *C. gigas* en unas instalaciones de cultivo en la Columbia Británica (Canadá) (BOWER 2007).

La bonamiosis causada por *B. ostreae* y *B. exitiosa*, es la responsable de las mortalidades masivas de ostras en el hemisferio norte y sur, respectivamente. Los primeros registros de *B. ostreae* fueron en EE.UU, tanto en la costas oeste (California y Washington) como este (Maine) infectando la ostra plana *Ostrea edulis* (KATKANSKY *et al.* 1969; FRIEDMAN *et al.* 1989; ELSTON *et al.* 1986; BARBER y DAVIS 1994; FRIEDMAN y PERKINS 1994). *B. ostreae* también se ha descrito infectando la ostra plana a lo largo de la costa europea, desde España hasta Dinamarca, incluyendo Irlanda y Gran Bretaña (PICHOT *et al.* 1980; BUCKE *et al.* 1984; MONTES y MELÉNDEZ 1987; McARDLE *et al.* 1991). Existen evidencias que sugieren que la introducción de este parásito se produjo a finales de los años 70 en Maine, Washington y Europa desde California, debido a los movimientos comerciales de ostras planas infectadas (ELSTON *et al.* 1986, FRIEDMAN y PERKINS 1994, CIGARRÍA y ELSTON 1997). En el otoño de 2004, MARTY *et al.* (2006) detectaron *B. ostreae* infectando la ostra plana por primera vez en la Columbia Británica (Canadá), y en el año 2005, se



confirmó por primera vez la presencia de este protozoo infectando *O. edulis* en Marruecos (OIE 2005). Además de la ostra plana, mediante exposición experimental se ha constatado que son susceptibles a *B. ostreae* las ostras *Ostrea angasi*, *Ostrea chilensis*, (= *Tiostrea chilensis*, = *T. lutaria*, = *Ostrea lutaria*), *Ostrea puelchana*, *Ostrea denselamellosa*, *Crassostrea ariakensis* (= *C. rivularis*) y *Crassostrea angulata* (CARNEGIE y COCHENNEC-LAUREAU 2004). *B. exitiosa* se describió parasitando *O. chilensis* en el estrecho de Foveaux y otras localizaciones alrededor de la isla sur en Nueva Zelanda (HINE *et al.* 2001; BERTHE y HINE 2003). CORBEIL *et al.* (2006) también describieron y caracterizaron molecularmente *B. exitiosa* infectando *Ostrea angasi* en Australia. Recientemente, ABOLLO *et al.* (2008) han registrado la presencia de *B. exitiosa* infectando la ostra plana *O. edulis* en Galicia (NO España), lo que amplía tanto el rango geográfico de esta especie, previamente descrita solo en el hemisferio sur, como el rango hospedador. Existen diferentes registros de *Bonamia* sp. parasitando *O. chilensis* en Chile (KERN 1993; CAMPALANS *et al.* 2000), *O. puelchana* en Argentina (KROECK y MONTES, 2005) y *C. ariakensis* en Carolina del Norte (BURRESON *et al.*, 2004). Recientemente, el laboratorio de Referencia de la OIE para la bonamiosis ha incluido todos estos registros de *Bonamia* sp. de localidades tan dispares en la misma especie, *B. exitiosa* (LÓPEZ-FLORES *et al.*, 2007).

5. CICLOS DE VIDA Y TRANSMISIÓN

En los Haplosporidia tradicionales que forman esporas, los plasmodios se dividen por plasmotomía y eventualmente tienen una esporulación simultánea. Las esporas (forma de resistencia) son liberadas al medio, normalmente, después de la muerte del hospedador. El destino de las esporas se desconoce, pero no parecen ser infectivas para el hospedador en el que se desarrollan.

Los estadios plasmodiales de *H. nelsoni* se localizan infectando intracelularmente el tejido conjuntivo (Fig. 1) y epitelial, mientras que las esporas se observan únicamente infectando el epitelio de los túbulos digestivos (Fig. 2). El proceso de esporulación se observa en rara ocasión en las poblaciones de ostras adultas, pero es bastante frecuente en ostras juveniles infectadas (BARBER *et al.* 1991b). Actualmente, el



estadio infectivo de *H. nelsoni* todavía se desconoce. FARLEY (1967) estudiando series histológicas durante 5 años, propuso un ciclo de vida para esta especie. Farley hipotetizó que de la espora debía emerger un esporoplasma uninucleado con capacidad infectiva. Debido a que la observación de esporas en esta especie es poco frecuente, algunos investigadores consideran que *H. nelsoni* debe tener un ciclo indirecto, en el cual exista un hospedador intermediario que facilite la transmisión y propagación de la enfermedad (ANDREWS 1968; BURRESON 1988; HASKIN y ANDREWS 1988; FORD y TRIPP 1996). Los primeros experimentos diseñados para estudiar el ciclo biológico de *H. nelsoni* se centraron en el estudio de la transmisión de la enfermedad en condiciones controladas, pero siempre con resultados negativos (CANZONIER 1968, 1974; ANDREWS, 1979). En el estudio realizado por POWELL *et al.* (1999), para establecer un modelo matemático de la dinámica de la infección, destacaron las características que debía cumplir el posible hospedador intermediario, las cuales son muy similares a las propuestas previamente por HASKIN y ANDREWS (1988): (1) debe liberar gran número de partículas infectivas rápida y continuamente durante los meses de verano; (2) no se puede ver afectado por variaciones de temperatura y salinidad; (3) puede verse afectado por las temperaturas del invierno, pero con capacidad para recuperarse en 1 ó 2 años; (4) debe producir partículas infectivas independientemente del nivel de infección de *H. nelsoni* en las poblaciones de ostra; y 5) debe vivir en un nivel de salinidad relativamente alto.

En *B. ostreae* y *B. exitiosa* los estadios que se observan rutinariamente son células uni o binucleadas tanto intra como extracelulares, denominadas microcélulas (Figs. 10-11), y más esporádicamente estadios plasmiales multinucleados. En *B. ostreae* los estadios uninucleados tienen un diámetro de 1 a 2.5 μm , con núcleo en posición periférica mientras que en *B. exitiosa* el diámetro es de 2 a 5 μm y el núcleo suele ser central o subcentral (ABOLLO *et al.* 2008). Cuando las células de *B. ostreae* se examinan con microscopio electrónico de transmisión, pueden aparecer como formas densas a los electrones, siendo el núcleo más pequeño y condensado, o como formas claras. La importancia de estos estadios no está todavía clara. Las formas densas a los electrones de *B. ostreae* son más numerosas en ostras fuertemente

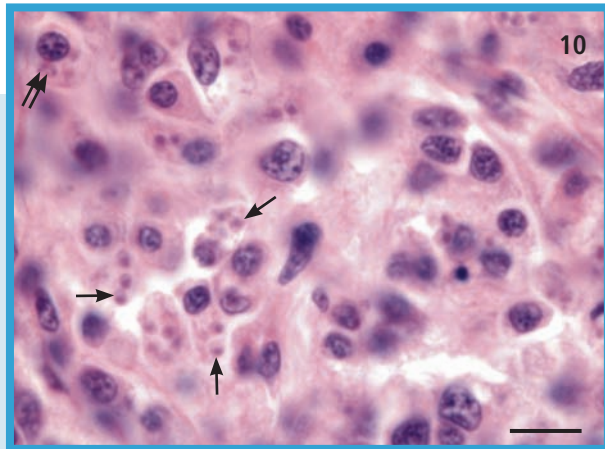


FIG. 10.
Micrografía de un corte histológico de ostra *Ostrea edulis* infectada por *Bonamia ostreae* (flechas). Obsérvese el tamaño reducido de las microcélulas y la posición periférica del núcleo. Tinción: hematoxilina – eosina. Barra: 10 μ m.

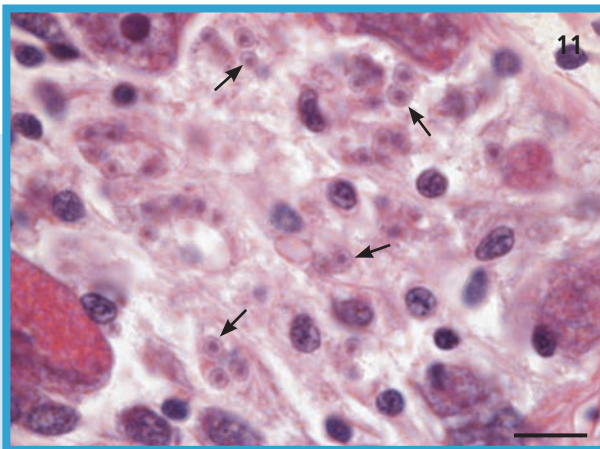


FIG. 11.
Micrografía de un corte histológico de ostra *Ostrea edulis* infectada por *Bonamia exitiosa* (flechas). Obsérvese el tamaño mayor de las microcélulas y la posición central del núcleo. Tinción: hematoxilina – eosina. Barra: 10 μ m.

infectadas, y las claras son más frecuentes en ostras con infecciones leves. PICHOT *et al.* (1980) propusieron que la forma densa podía ser el estadio infectivo de *B. ostreae*; sin embargo, en la actualidad no existen suficientes evidencias que apoyen esta propuesta. Las células binucleadas representan estados intermedios de división celular. En *B. exitiosa*, HINE (1991) observó cambios estacionales en las frecuencias de formas densas y binucleadas en las infecciones de *Ostrea chilensis* de Nueva Zelanda, distinguiendo una fase de incubación (Septiembre



a Noviembre) caracterizada por formas densas escasas, una fase de proliferación de las formas densas (Diciembre a Mayo), que coincide con el pico de mortalidad, y una fase de predominio de células binucleadas (Junio a Agosto). Los estadios plasmodiales de más de dos núcleos se observan frecuentemente en *B. exitiosa*, mientras que en *B. ostreae* se encuentran esporádicamente y sólo en ostras moribundas o post-mortem (BREHÉLIN *et al.* 1982). Los factores que favorecen el desarrollo de los estadios plasmodiales son desconocidos. BREHÉLIN *et al.* (1982) lanzaron una hipótesis, todavía sin verificar, en la que decían que a partir de los estadios plasmodiales que se desarrollaban en algunas ostras muertas, se producía un gran número de células infectivas, siendo está la razón por la que *B. ostreae* proliferaba explosivamente en una población de ostras. A diferencia de lo que ocurre con *H. nelsoni*, la transmisión de la bonamiosis puede producirse directamente de ostra a ostra por cohabitación (ELSTON *et al.* 1986; CULLOTY *et al.* 1999) o por inoculación de microcélulas (MIALHE *et al.* 1988a; HERVIO *et al.* 1995). Este hecho constituye una evidencia de que las esporas no son imprescindibles en el proceso de transmisión (REECE *et al.* 2004), y también podría explicar la rápida propagación de la enfermedad en los bancos de ostras. Previo al desarrollo de la infección, existe un periodo de latencia, en el cual no ha sido posible la detección del parásito en los tejidos empleando técnicas histológicas (MONTES 1991; CULLOTY y MULCAHY 1996; CULLOTY *et al.* 2001). Se cree que el parásito penetra en la ostra durante el proceso de filtración del agua o la respiración (BUCKE 1988; MONTES *et al.* 1994). Después de atravesar el epitelio branquial, el parásito es fagocitado por los hemocitos, donde se multiplica por fisión binaria hasta romper el hemocito. Entonces, los parásitos, otra vez libres, pueden infectar nuevos hemocitos. Los parásitos, tanto intra- como extracelulares, son liberados del hospedador con las heces, quizás también por diapédesis de hemocitos infectados y/o cuando el hospedador muere. La fase de vida libre del parásito en el medio se desconoce, incluso existen razones que hacen sospechar que el ciclo de vida de *Bonamia* spp. puede tener otros hospedadores o vectores, en los cuales se encuentre otros estadios de desarrollo como la espora. Esta sospecha se ha acrecentado con el reciente descubrimiento de una especie del género *Bonamia* que produce esporas, *B. perspora*,

(CARNEGIE *et al.* 2006). Se han realizado diferentes estudios de transmisión, con el objetivo de aclarar el posible papel de otras especies de moluscos como transportadores o reservorios de *B. ostreae*. La ostra japonesa *C. gigas*, los mejillones *Mytilus edulis* y *M. galloprovincialis*, las almejas *Ruditapes decussatus* y *R. philippinarum* y el berberecho, *Cerastoderma edule* no pudieron ser infectados en experimentos realizados en el campo y en el laboratorio tanto empleando infecciones naturales como experimentales (VAN BANNING 1987; FIGUERAS y ROBLEDO 1994; RENAULT *et al.* 1995; CULLOTY *et al.* 1999). Todos estos estudios se realizaron empleando como técnicas diagnósticas la citología y la histología, ya que las técnicas moleculares no se encontraban desarrolladas en ese tiempo. CULLOTY *et al.* (1999) señalan que aunque *B. ostreae* no se detectó en el estudio realizado con las diferentes especies de bivalvos, no se puede concluir que dichas especies no sean transportadores de *B. ostreae*, hasta que el ciclo vital del parásito se conozca en detalle. Recientemente, LYNCH *et al.* (2007) demostraron que 8 invertebrados bentónicos y 19 muestras de zooplancton agrupadas daban resultados positivos a *B. ostreae* empleando la PCR como técnica diagnóstica. En los experimentos de transmisión que realizaron en el laboratorio también obtuvieron resultados positivos en dos ostras cohabitando con la estrella de mar *Ophiothrix fragilis*. Sin embargo, este resultado tampoco es concluyente, ya que puede ser indicativo tanto de parasitismo como de transporte o ingestión de *B. ostreae* por el equinodermo.

6. EPIDEMIOLOGÍA

El ciclo anual de infección de *H. nelsoni* fue descrito por FORD y HASKIN (1982) en la Bahía de Delaware. La infección se adquiere a comienzos de junio y a lo largo del verano la prevalencia e intensidad de la infección van aumentando, alcanzando el mayor nivel de infección a finales del otoño. Los valores de prevalencia permanecen relativamente estables hasta finales del invierno, siendo entonces cuando se produce la muerte de las ostras fuertemente infectadas y deja de detectarse la infección en la población restante. Los valores demográficos de la infección vuelven a incrementarse de nuevo en Abril y Mayo,



coincidiendo con el incremento de las temperaturas, resurgiendo de nuevo la infección, que parecía estar suprimida como consecuencia de las bajas temperaturas del invierno (FORD 1985a). En el caso de la infección de *Crassostrea virginica* por *H. nelsoni* está bien documentado el efecto de variables ambientales como temperatura y salinidad. En los primeros trabajos de campo se sugirió que la infección por el parásito estaba limitada por la salinidad, ya que las infecciones son extremadamente raras a salinidades por debajo de 10 ppt y no es epidémica a salinidades inferiores a 15 ppt (ANDREWS 1964; HASKIN y FORD 1982; ANDREWS 1983). FORD (1985b) observó que cuando se producía una disminución de la salinidad media desde 15 a 5 ppt también se producía una rápida pérdida de parásitos. Sin embargo, cuando la salinidad era superior a 20 ppt se producía una elevada actividad parasitaria (HASKIN y FORD 1982; ANDREWS 1983). FORD (1985b) propuso que una limitación fisiológica podía afectar a la distribución de *H. nelsoni* en aguas de baja salinidad. En estudios *in vitro* se observó que la tolerancia de los estadios plasmodiales a cambios bruscos de salinidad mostraba un comportamiento similar a lo observado en la naturaleza. La reducida prevalencia de *H. nelsoni* en áreas de baja salinidad probablemente se deba a la incapacidad fisiológica del parásito para tolerar salinidades reducidas más que a un aumento de la eficacia en la respuesta inmune frente a la infección (FORD y HASKIN 1988).

Muchos de los datos generados a lo largo de estos años se integraron en un modelo matemático de interacciones hospedador-parásito-medio ambiente (FORD *et al.* 1999; PARASO *et al.* 1999; POWELL *et al.* 1999). Empleando este modelo se observó que bajo condiciones de salinidad elevada, la temperatura era el factor dominante; sin embargo, la salinidad era un factor clave cuando las simulaciones se realizaban con datos de áreas donde los regímenes de salinidad variaban. Las simulaciones realizadas empleando las series temporales recogidas a lo largo del gradiente de salinidad de la Bahía de Delaware, reprodujeron la dinámica poblacional de *H. nelsoni* bajo condiciones de mayor y menor aporte de agua dulce. Los resultados del modelo indicaron que la intensidad de infección del parásito bajo condiciones cambiantes de salinidad era más compleja que el simple resultado de un cambio salino que pudiese afectar a la proliferación del parásito y



a sus tasas de mortalidad en las ostras, y que la tasa de infección era probablemente mas reducida a bajas salinidades. El modelo también se construyó para reflejar las variaciones en la dinámica de la infección de *H. nelsoni* en relación a las variaciones de temperatura del invierno tomadas en la Bahía de Delaware (FORD y HASKIN 1982). Las diferentes simulaciones realizadas apoyan la hipótesis que atribuyen los recientes brotes epidémicos de la enfermedad en el noreste de Estados Unidos (BARBER *et al.* 1997; SUNILA *et al.* 1999) y en el este de Canadá (STEPHENSON *et al.* 2003) a la tendencia mundial de calentamiento global registrada desde hace mas de una década y que conlleva la aparición de inviernos más cálidos (COOK *et al.* 1998). Los resultados de la simulación demostraron la capacidad del modelo para reproducir medidas de campo y su utilidad para elucidar la asociación entre la magnitud y el calendario de descarga del río Delaware, sus variaciones asociadas con la salinidad, y el ciclo anual de *H. nelsoni*.

Desde el descubrimiento de la bonamiosis, la elevada prevalencia de *B. ostreae* se ha relacionado con picos de mortalidad, que se producen en los últimos periodos de crecimiento, cuando las ostras llegan a su talla comercial (BAUD *et al.* 1997; DA SILVA *et al.* 2005). La infección por *Bonamia* se produce a lo largo de todo el año, pero los valores demográficos de la infección se incrementan en las estaciones cálidas (GRIZEL 1985; HINE 1991; CULLOTY y MULCAHY 1996). En el caso de *B. ostreae* existen mayores valores de prevalencia a finales de la primavera y durante el verano (TIGÉ *et al.* 1982; DA SILVA *et al.* 2005); mientras que en el hemisferio sur, *B. exitiosa* muestra una mayor prevalencia desde enero a abril, siendo raramente detectable el parásito en septiembre y octubre. *B. ostreae* prolifera y se transmite dentro de un amplio rango de temperaturas del agua. Las temperaturas altas promueven la expansión de la enfermedad mientras que las bajas ralentizan la transmisión de la enfermedad (GRIZEL *et al.* 1988). También se ha comprobado que inviernos fríos seguidos de veranos suaves limitan la propagación de la enfermedad (ZABALETA y BARBER 1996). El efecto de la salinidad en el desarrollo de la enfermedad no se ha estudiado con detenimiento, aunque se han observado infecciones en tanques con salinidades de hasta un 39‰ (GRIZEL *et al.* 1988). El periodo prepatente para ambas especies de *Bonamia* es



usualmente de 3-4 meses, pero puede llegar a ser hasta de 5 meses (TIGÉ y GRIZEL 1984; ELSTON *et al.* 1987; MONTES, 1991); sin embargo, empleando técnicas moleculares de diagnóstico, se han detectado infecciones en ostras transcurridos 2 meses desde su introducción en un área enzoótica (LYNCH *et al.* 2005). La infección por *B. ostreae* también está relacionada con factores intrínsecos del propio hospedador, como son la edad (TIGÉ *et al.* 1982; CULLOTY y MULCAHY 1996) y la talla (FIGUERAS 1991; CÁCERES-MARTÍNEZ *et al.* 1995); aunque también se sabe que la variabilidad en los valores demográficos de la infección está relacionada con efectos sinérgicos negativos como la postpuesta o la disminución del alimento (CULLOTY y MULCAHY 1996).

7. INTERACCIÓN HOSPEDADOR-PARÁSITO

La enfermedad MSX fue reconocida por primera vez como causante de mortalidades masivas en la bahía de Delaware en la primavera de 1957. Aproximadamente la mitad de las ostras sembradas en los bancos de Nueva Jersey murieron en un periodo de 6 semanas (HASKIN *et al.* 1966). El síntoma macroscópico más obvio de la infección por *H. nelsoni* son las anomalías en la concha de *C. virginica* (FARLEY 1968). En las ostras más fuertemente infectadas se ha descrito retracción del manto; mientras que en las ostras de mayor edad, que sobreviven a la infección, se han observado depósitos de conquiolina en la cara interna de la superficie de las valvas, aunque no es un síntoma conservado en todas las poblaciones estudiadas. Las ostras infectadas son típicamente delgadas y acuosas con la glándula digestiva pálida. FARLEY (1968) describió 5 etapas progresivas de la enfermedad. Una etapa *inicial* en la que los plasmodios se localizan en el epitelio del palpo, branquias o sifones. Las infecciones en la etapa *intermedia* afectan al tejido conjuntivo y a los epitelios de la masa visceral, observándose infiltraciones masivas por hemocitos del tipo hialinocito. La etapa *avanzada* de la infección se caracteriza por una invasión masiva del parásito con diseminación por el torrente circulatorio, así como por infiltración masiva de hialinocitos en el tejido conjuntivo. En esta etapa de la infección se pudo constatar que se producían procesos de reparación, tanto en el epitelio de las branquias como del palpo, por lo que



se estableció que la destrucción mecánica no era la causa directa de la muerte del molusco. La etapa *terminal* se caracteriza histológicamente por la necrosis tanto de las células hospedadoras como parásitas. En esta etapa se observa debilitamiento del músculo aductor, imposibilitando el cierre de las valvas. La última etapa descrita por Farley es la de *remisión*, que se caracteriza por reducción de la infiltración en los tejidos, y por presencia de gran número de parásitos moribundos y de células pigmentarias en el tejido conjuntivo. En general, se observa una reducción del número de parásitos, así como localización de los mismos en el tejido epitelial o en su proximidad. También se observa la presencia de parásitos y células fagocíticas en el lumen intestinal. *H. nelsoni* consigue evadir el sistema inmunitario de la ostra evitando ser fagocitado por los hemocitos de la ostra (FORD *et al.* 1993; FORD y ASHTON-ALCOX 1998). La presión de MSX durante años sobre la población de ostras de la Bahía de Delaware ha dado lugar a un aumento notable de la tolerancia a la enfermedad en la población por selección natural (FORD 2002). Un programa pionero de selección genética de resistencia a una enfermedad de moluscos bivalvos se desarrolló con éxito para hacer frente a *H. nelsoni* en la Bahía de Delaware (FORD y HASKIN 1987); las estirpes de ostras producidas no son resistentes en sentido estricto, pues adquieren la infección, pero consiguen que ésta no progrese, manteniendo los plasmodios confinados en el epitelio branquial durante años, de forma que las ostras superan ampliamente el tamaño comercial mucho antes de sufrir los efectos letales de la enfermedad (FORD y HASKIN 1987).

Las mortandades masivas atribuidas a *B. ostreae* a partir de 1979, ocasionaron el desplome de la producción de ostra plana en Europa. Así, en Francia, la bonamiosis unida al brote epidémico causado por *Marteilia refringens*, ocasionó una reducción drástica en la producción de ostra plana, pasando de las 20.000 Tm por año en 1970 a las 1.800 Tm en 1995. El impacto negativo de *B. ostreae* sobre las poblaciones de ostra plana también se ha observado en otros países europeos, sin embargo existen discrepancias de cómo afecta la infección al crecimiento o al índice de condición de las ostras. En Galicia se ha constatado una influencia negativa de la bonamiosis sobre el crecimiento y el índice de condición de las ostras (MONTES y MELÉNDEZ 1987; MONTES *et al.*



1991); sin embargo, en otros países como Irlanda y Estados Unidos el índice de condición no se ve fuertemente afectado por la bonamiosis (ROGAN *et al.* 1991; ZABALETA y BARBER 1996), mientras que en Francia las ostras apenas muestran síntomas de la infección (BALOUET *et al.* 1983). El síntoma macroscópico más obvio es la formación de hendiduras en el borde de las láminas branquiales, que llegan a ser profundas en los casos más avanzados de la enfermedad. *B. ostreae* es un protozoo intrahemocitario, pero también puede ser observado extracelularmente entre células intersticiales en branquia y estómago o en áreas de tejido conjuntivo necrosado. También se describió en el interior de células epiteliales de branquia (MONTES *et al.* 1994). Aunque la mayoría de las ostras infectadas parecen normales, algunas veces la infección va acompañada por decoloración amarilla y amplias lesiones en el tejido conjuntivo de branquias, manto y glándula digestiva. La patología está relacionada con la destrucción de los hemocitos y la intensa infiltración hemocitaria de los órganos afectados, lo que ocasiona una destrucción de la arquitectura normal de tejidos y órganos y su consecuente disfunción. Probablemente la intensa proliferación hemocitaria puede ocasionar la oclusión del sistema circulatorio. Las infecciones leves suelen ser focales, mientras que las infecciones avanzadas normalmente tienen carácter sistémico y provocan la muerte de la ostra, que puede ser más o menos rápida en función de las condiciones ambientales. La interacción entre la célula hospedadora y el parásito fue estudiada comprobándose que los hemocitos de la ostra plana son capaces de reconocer y fagocitar al parásito, pero no lo destruyen (MONTES *et al.* 1994). Sin embargo, en el caso de *Crassostrea gigas* (especie resistente a la bonamiosis) se han observado signos de destrucción del parásito dentro de los hemocitos (CHAGOT *et al.*, 1992). Diversos estudios han abordado la interacción entre el parásito y el sistema inmunitario del hospedador, pero todavía no se ha aclarado definitivamente cómo las microcélulas consiguen eludir el sistema de defensa de la ostra. *B. ostreae* provoca un incremento significativo de los hemocitos circulantes, más marcado en el caso de los hialinocitos (probablemente el tipo más favorable para que en su interior se multipliquen las microcélulas), y una infiltración hemocitaria intensa del conjuntivo de distintos órganos (DA SILVA *et al.* 2008); *B. ostreae* ingresa en el citoplasma



hemocitario mediante un proceso de fagocitosis activa (CHAGOT *et al.* 1992); todos los tipos hemocitarios fagocitan al parásito (MOURTON *et al.* 1992); según HERVIO *et al.* (1991) la actividad fosfatasa ácida de *B. ostreae* podría interferir en el estallido respiratorio del hemocito (proceso por el que los hemocitos producen radicales tóxicos de oxígeno que contribuyen a destruir patógenos), lo que facilitaría la supervivencia de las microcélulas dentro de los hemocitos. Se han constatado diferencias cualitativas y cuantitativas en niveles enzimáticos entre la hemolinfa de ostras infectadas y no infectadas (XUE y RENAULT 2000; DA SILVA *et al.* 2008).

Bonamia exitiosa es también un parásito intrahemocitario que prolifera rápidamente, originando igualmente infecciones sistémicas que se detectan en el tejido conjuntivo de las branquias, manto y gónada. Las mortandades masivas causadas por *B. exitiosa* también constituyen una característica recurrente en la dinámica de la población de ostras de Foveaux Strait en Nueva Zelanda (DOONAN *et al.* 1994; CRANFIELD *et al.* 2005). A finales de 1985, se confirmó un brote epidémico de *B. exitiosa*, con evidencias de mortalidad anormal hasta Marzo de 1995. La pesquería se clausuró en 1993 para permitir la recuperación de la población de ostras, con el consiguiente impacto negativo sobre la economía local. En el periodo indicado, la población de ostras se redujo a menos del 10% de los efectivos presentes antes del brote (DOONAN *et al.* 1994). Entre los años 2000 y 2006 se confirmó otro brote epidémico, con valores de mortalidad en torno al 72% de las ostras reclutadas hasta el 2005 (ANÓNIMO 2006).

8. MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO

Para un control efectivo de las enfermedades en moluscos es necesario disponer de métodos de diagnóstico que sean rápidos, fiables y altamente sensibles. Tradicionalmente, la técnica histopatológica ha sido el método de elección para el diagnóstico de las enfermedades de moluscos en general, ya que proporcionan mucha información sobre el estado general de salud de los individuos, y también permite la detección de un amplio rango de patógenos. Sin embargo, presenta algunas limitaciones, ya que es una metodología que no permite



hacer un diagnóstico a nivel de especie y muchos patógenos pueden ser difíciles de diagnosticar cuando las intensidades de infección en los tejidos son bajas. Además del examen de cortes histológicos, para el diagnóstico de bonamiosis se utilizan otras técnicas de microscopía óptica, más rápidas y más baratas, basadas en el examen de frotis o improntas de diferentes órganos así como el examen citológico de muestras de hemolinfa (Fig. 12), siendo mayor la sensibilidad con el examen de frotis de corazón o de hemolinfa que con los cortes histológicos (DA SILVA y VILLALBA 2004). En general, las especies de haplosporidios son muy difíciles de identificar en secciones histológicas si sólo se dispone de estadios plasmodiales. Cuando se identifican esporas en un corte histológico, *H. nelsoni* puede ser *presuntamente* identificado en las ostras si las esporas son del tamaño correcto (6-8 μm de longitud) y si aparecen infectando exclusivamente el epitelio de los túbulos digestivos. La presencia de plasmodios multinucleados ovales de 4-50 μm de diámetro infectando ostras en zonas de estuario con una salinidad inferior a 25 ppt, también indica que *presuntamente* la infección es causada por *H. nelsoni*. En el caso de *Bonamia* un resultado positivo consiste en la detección, en los frotis o en las preparaciones histológicas, de hemocitos de ostra infectados por microcélulas con núcleo eosinófilo y con forma esférica u ovoide, de entre 2 y 5 μm . Según la bibliografía (BOWER 2007; VALLAT 2006) no resulta posible

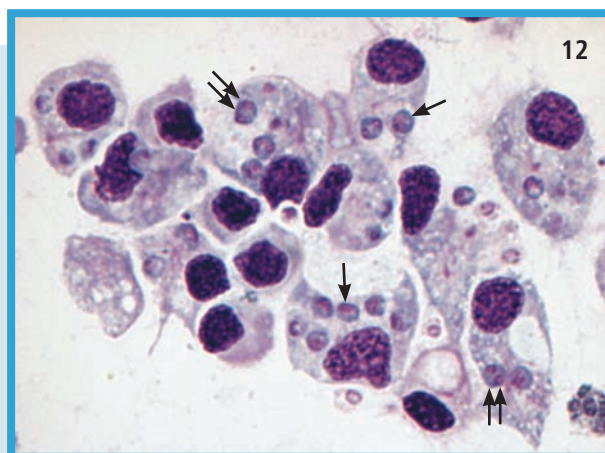


FIG. 12. Micrografía de una capa de hemocitos sobre un portaobjetos obtenida por citocentrifugación de la hemolinfa de una ostra *Ostrea edulis*. Se observan numerosas microcélulas uninucleadas (flechas) y binucleadas (flechas dobles) de *Bonamia ostreae* en el citoplasma de los hemocitos. Tinción: Hemacolor®.

la distinción de *Bonamia ostreae* y *B. exitiosa* mediante microscopía óptica, aunque ABOLLO *et al.* (2008) indican algunas diferencias morfológicas entre ambas especies (Figs 10–11). Sí existen diferencias a nivel ultraestructural entre ambos parásitos (HINE *et al.* 2001), pero el empleo de microscopía electrónica de transmisión no es viable en programas de monitoreo y control, quedando esta técnica reservada para trabajos de investigación. La especie hospedadora y el rango geográfico puede ser un buen indicativo para saber de qué especie se trata; sin embargo, cuando estos rangos se solapan pueden producirse identificaciones erróneas. Tal fue el caso de *H. nelsoni* y *H. costale* en la costa este de Norte América (STOKES y BURRESON 2001) o el reciente hallazgo de las co-infecciones de *B. exitiosa* y *B. ostreae* en Galicia (NO España) (ABOLLO *et al.* 2008).

Para la detección de *B. ostreae* se desarrollaron varios inmuno-enayos que, aunque inicialmente eran muy prometedores, actualmente no están en vigor (MIALHE *et al.* 1988; BOULO *et al.* 1989; ROGIER *et al.* 1991; COCHENNEC *et al.* 1992). Las técnicas moleculares basadas en la PCR y la hibridación *in situ* también se han desarrollado para muchas de las especies de haplosporidios. Está bien documentado, en diferentes estudios de validación, que las técnicas de diagnóstico molecular son más sensibles que la histología cuando las infecciones son de baja intensidad, especialmente si el parásito es pequeño (DIGGLES *et al.* 2003; BALSEIRO *et al.* 2006). Sin embargo, hay que tener siempre en consideración que un resultado positivo de PCR aunque puede indicar la presencia de un agente infeccioso, no verifica la existencia de una infección. Los resultados obtenidos por PCR deberían ser siempre *confirmados* por histología o hibridación *in situ*, ya que ambas técnicas permiten la visualización del parásito (BURRESON 2008).

Para la detección de *H. nelsoni* se diseñó una pareja de cebadores para PCR (MSX-A y MSX-B), que se unen a la subunidad pequeña del ADN ribosomal y amplifican un fragmento de 564 pares de bases (STOKES *et al.* 1995). La especificidad y la sensibilidad de estos cebadores fue demostrada por STOKES *et al.* (1995) y RENAULT *et al.* (2000). Las regiones hipervariables del gen 18S del ARNr también se emplearon para diseñar sondas de hibridación *in situ* (FONG *et al.* 1993; STOKES y BURRESON 1995). FONG *et al.* (1993) probaron la sonda diseñada en células de *H.*



nelsoni realizando frotis de corazón. La oligosonda diseñada por STOKES y BURRESON (1995), denominada MSX1347, se probó para valorar tanto su sensibilidad como especificidad y permite la identificación específica de los estadios plasmodiales de *H. nelsoni* (STOKES y BURRESON 2001).

Para la identificación molecular de *B. ostreae* se han desarrollado dos protocolos de PCR, con dos parejas de cebadores diferentes, que amplifican un fragmento de la subunidad pequeña del ADN ribosomal. Basándose en la similitud de la secuencia de los cebadores Bo-Boas diseñados por COCHENNEC *et al.* (2000), con las secuencias del gen 18S ARNr de otras especies de haplosporidios, se cree que dichos cebadores deben amplificar todas las microcélulas de haplosporidios; mientras que los cebadores C_F-C_R diseñados por CARNEGIE *et al.* (2000) se cree que al menos amplifica *B. ostreae* y *B. exitiosa*. La falta de cebadores específicos de PCR obliga a que la identificación de *B. ostreae* y *B. exitiosa* se realice empleando un protocolo de RFLPs aplicado a los productos de PCR amplificados con los cebadores Bo-Boas. El producto de PCR digerido con la enzima *Bgl*I produce dos perfiles de restricción: una banda de 300 bp para *B. exitiosa* y dos bandas, de 120 y 180 bp, para *B. ostreae* (Fig. 13); sin embargo, esta técnica aún no fue validada. Recientemente, también se han publicado dos protocolos de PCR a tiempo real para *Bonamia* spp. (MARTY *et al.* 2006; CORBEIL *et al.* 2006).

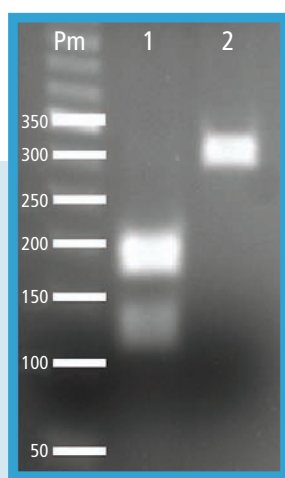


FIG. 13.

Ensayo diagnóstico para *Bonamia ostreae* y *B. exitiosa* mediante análisis de PCR-RFLP. La amplificación se realizó empleando los cebadores Bo-Boas y para el análisis de restricción se empleó la endonucleasa *Bgl*I. Carril: Pm marcador de peso molecular de 50 pb; 1, *B. ostreae*; 2, *B. exitiosa*.



Para la identificación de *B. ostreae* también se han desarrollado dos protocolos de ISH. Una de las sondas se realizó marcando con digoxigenina el producto de PCR generado por los primers Bo-Boas (COCHEN-NEC *et al.* 2000) (Fig. 14); no obstante, esta sonda no es específica ya que hibrida con *B. exitiosa* y *H. nelsoni*. El protocolo diseñado por CARNEGIE *et al.* (2003) se basó en el empleo combinado de 3 oligonucleótidos marcados con fluoresceína (UME-BO-1, UME-BO-2 Y UME-BO-3). La especificidad de la oligosonda se probó frente a *H. nelsoni*, pero probablemente hibrida con otras microcélulas, incluyendo *B. exitiosa*.

La comparación reciente de técnicas microscópicas y moleculares para el diagnóstico de *B. ostreae* (LYNCH *et al.* 2008) ha demostrado la necesidad de mejorar la sensibilidad de las técnicas de diagnóstico. Brevemente podríamos concluir que aunque existe un cierto número de métodos basados en sondas de ADN para la detección de las principales enfermedades causadas por haplosporidios en moluscos bivalvos, sería necesario un mayor esfuerzo con el fin de (1) mejorar o implementar nuevas sondas específicas y (2) validar y estandarizar los protocolos ya existentes, mediante el trabajo conjunto de diferentes grupos de investigación.

9. REFERENCIAS

- ABOLLO, E., A. RAMILO, S. M. CASAS, P. COMESANA, A. CAO *et al.*, 2008 First detection of the protozoan parasite *Bonamia exitiosa* (Haplosporidia) infecting flat oyster *Ostrea edulis* grown in European waters. *Aquaculture* **274**: 201-207.
- ADL, S. M., A. G. B. SIMPSON, M. A. FARMER, R. A. ANDERSEN, O. R. ANDERSON *et al.*, 2005 The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. *Journal of Eukaryotic Microbiology* **52**: 399-451.
- ANDREWS, J. D., 1964 Oyster mortality studies in Virginia. IV. MSX in James River public seed beds. *Proceedings of the National Shellfisheries Association* **53**: 65-84.
- ANDREWS, J. D., 1968 Oyster mortality studies in Virginia. VII. Review of epizootiology and origin of *Minchinia nelsoni*. *Proceedings of the National Shellfisheries Association* **58**: 23-26.
- ANDREWS, J. D., 1979 Oyster diseases in Chesapeake Bay. *Marine Fisheries Review* **41**: 45-53.

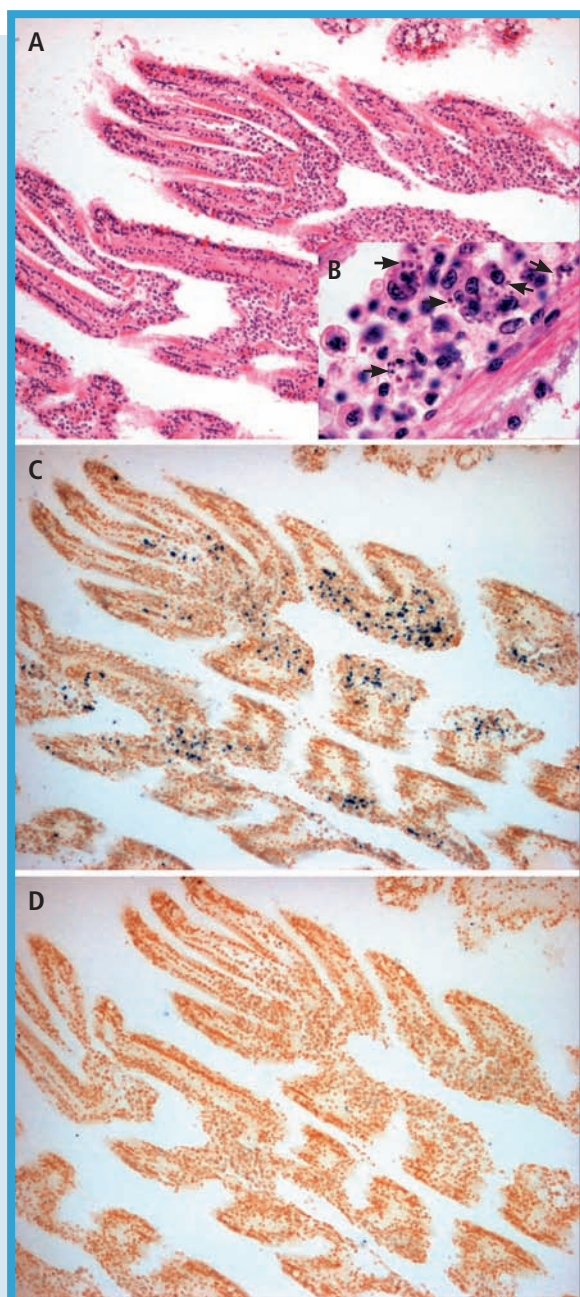


FIG. 14.

Prueba de hibridación *in situ* para la detección de la infección por *Bonamia ostreae* en la branquia de la ostra plana (*Ostrea edulis*). Las imágenes corresponden a cortes seriados del mismo tejido. (A) Micrografía de un corte histológico teñido con hematoxilina-eosina. (B) Detalle a más aumentos del mismo corte histológico mostrando las células de *B. ostreae*. (C) Sección hibridada utilizando como sonda el fragmento amplificado con los cebadores Bo-Boas. El parásito se identifica por la coloración más oscura. (D) Control negativo (sin sonda) donde se observa la falta de reacción de hibridación positiva.



- ANDREWS, J. D., 1983 *Minchinia nelsoni* (MSX) infections in the James river seed-oyster area and their expulsion in spring. *Estuarine Coastal and Shelf Science* **16**: 255-269.
- ANÓNIMO, 2006 Dredge oyster (OYU5)- Foveaux Strait. Fisheries working group report to NZ Ministry of Fisheries. http://services.fish.govt.nz/fishresourcespublic/Plenary2006/OYU_5_06.pdf. pp. 164-179.
- ARMSTRONG, D. A. y J. L. ARMSTRONG, 1974 A haplosporidan infection in gaper clams, *Tresus capax* (Gould), from Yaquina Bay, Oregon. *Proceedings of the National Shellfisheries Association* **64**: 68-72.
- AZEVEDO, C., 2001 Ultrastructural description of the spore maturation stages of the clam parasite *Minchinia tapetis* (Vilela, 1951) (Haplosporida: Haplosporidiidae). *Systematic Parasitology* **49**: 189-194.
- AZEVEDO, C., J. MONTES y L. CORRAL, 1999 A revised description of *Haplosporidium armoricanum*, parasite of *Ostrea edulis* L. from Galicia, northwestern Spain, with special reference to the spore-wall filaments. *Parasitology Research* **85**: 977-983.
- AZEVEDO, C., P. BALSEIRO, G. CASAL, C. GESTAL, R. ARANGUREN *et al.*, 2006 Ultrastructural and molecular characterization of *Haplosporidium montforti* n. sp., parasite of the European abalone *Haliotis tuberculata*. *Journal of Invertebrate Pathology* **92**: 23-32.
- BACHERE, E., D. CHAGOT, G. TIGE y H. GRIZEL, 1987 Study of a Haplosporidian (Ascetospora), parasitizing the Australian flat oyster *Ostrea angasi*. *Aquaculture* **67**: 266-268.
- BALOUET, G., M. PODER y A. CAHOUR, 1983 Haemocytic parasitosis: morphology and pathology of lesions in the French flat oyster, *Ostrea edulis* L.. *Aquaculture* **34**: 1-14.
- BALSEIRO, P., R. F. CONCHAS, J. MONTES, J. GOMEZ-LEON, B. NOVOA *et al.*, 2006 Comparison of diagnosis techniques for the protozoan parasite *Bonamia ostreae* in flat oyster *Ostrea edulis*. *Aquaculture* **261**: 1135-1143.
- BARBER, B. J., 1997 Impacts of bivalve introductions on marine ecosystems: a review. *Bulletin of National Research Institute of Aquaculture Suppl.* **3**: 141-153.
- BARBER, B. J. y C. V. DAVIS, 1994 Prevalence of *Bonamia ostreae* in *Ostrea edulis* populations in Maine. *Journal of Shellfish Research* **13**: 298.
- BARBER, R., S. KANALEY y S. FORD, 1991a Recent observations on the spore state of *Haplosporidium virginica* MSX in the eastern oyster *Crassostrea virginica*. *Journal of Shellfish Research* **10**: 276.
- BARBER, R. D., S. A. KANALEY y S. E. FORD, 1991b Evidence for regular sporulation by *Haplosporidium nelsoni* (MSX) (Ascetospora, Haplosporidiidae) in spat



- of the American oyster, *Crassostrea virginica*. Journal of Protozoology **38**: 305-306.
- BAUD, J., A. GERARD y Y. NACIRI-GRAVEN, 1997 Comparative growth and mortality of *Bonamia ostreae*-resistant and wild flat oysters, *Ostrea edulis*, in an intensive system. I. First year of experiment. Marine Biology **130**: 71-79.
- BEARHAM, D., Z. SPIERS, S. RAIDAL, J. B. JONES y P. K. NICHOLLS, 2007 Molecular characterisation of a haplosporidian parasite infecting rock oysters *Saccostrea cucullata* in north Western Australia. Journal of Invertebrate Pathology **95**: 33-40.
- BEARHAM, D., Z. SPIERS, S. RAIDAL, J. B. JONES, E. M. BURRESON *et al.*, 2008a Spore ornamentation of *Haplosporidium hinei* n. sp (Haplosporidia) in pearl oysters *Pinctada maxima* (Jameson, 1901). Parasitology **135**: 521-527.
- BEARHAM, D., Z. SPIERS, S. R. RAIDAL, J. B. JONES y P. K. NICHOLLS, 2008b Spore ornamentation of *Minchinia occulta* n. sp (Haplosporidia) in rock oysters *Saccostrea cucullata* (Born, 1778) Parasitology **135**: 1271-1280.
- BERTHE, F. C. J. y P. M. HINE, 2003 *Bonamia exitiosa* Hine *et al.*, 2001 is proposed instead of *B. exitiosus* as the valid name of *Bonamia* sp. infecting flat oysters *Ostrea chilensis* in New Zealand. Diseases of Aquatic Organisms **57**: 181-181.
- BERTHE, F. C. J., F. LE ROUX, E. PEYRETAILLADE, P. PEYRET, D. RODRIGUEZ *et al.*, 2000 The existence of the phylum Paramyxia Desportes and Perkins, 1990 is validated by the phylogenetic analysis of *Martellia refringens* small subunit ribosomal RNA. Journal of Eukaryotic Microbiology **47**: 288-293.
- BIGNELL, J. P., M. J. DODGE, S. W. FEIST, B. LYONS, P. D. MARTIN *et al.*, 2008 Mussel histopathology: effects of season, disease and species. Aquatic Biology **2**: 1-15.
- BOULO, V., E. MIALHE, H. ROGIER, F. PAOLUCCI y H. GRIZEL, 1989 Immunodiagnosis of *Bonamia ostreae* (Asctospora) infection of *Ostrea edulis* L. and subcellular identification of epitopes by monoclonal-antibodies. Journal of Fish Diseases **12**: 257-262.
- BOWER, S. M., 2007 Synopsis of Infectious Diseases and Parasites of Commercially Exploited Shellfish: *Bonamia ostreae* of Oysters. URL: http://www-sci.pac.dfo-mpo.gc.ca/shellfish/pages/bonostoy_e.htm, pp.
- BREHELIN, M., J. R. BONAMI, F. COUSSERANS y C. P. VIVARES, 1982 True plasmodial forms exist in *Bonamia ostreae*, a pathogen of the European flat oyster *Ostrea edulis*. Comptes Rendus De L Academie Des Sciences Serie Iii-Sciences De La Vie-Life Sciences **295**: 45-48.
- BUCKE, D., 1988 Pathology of bonamiasis. Parasitology Today **4**: 174-176.



- BUCKE, D., B. HEPPER, D. KEY y R. C. A. BANNISTER, 1984 A report on *Bonamia ostreae* in *Ostrea edulis* in the UK. International Council for the Exploration of the Sea C.M. **1984/K:9**: 1-7.
- BURRESON, E. M., 1988 Use of immunoassays in haplosporidian life cycle studies. American Fisheries Society Special Publication **18**: 298-303.
- BURRESON, E. M., 2001 Spore ornamentation of *Haplosporidium pickfordi* Barrow, 1961 (Haplosporidia), a parasite of freshwater snails in Michigan, USA. Journal of Eukaryotic Microbiology **48**: 622-626.
- BURRESON, E. M., 2005 Haplosporidia (haplosporidians), pp. 23-25 in *Marine Parasitology*, edited by K. ROHDE. CSIRO; Collingwood, Victoria, Australia.
- BURRESON, E. M., 2008 Misuse of PCR assay for diagnosis of mollusc protistan infections. Diseases of Aquatic Organisms **80**: 81-83.
- BURRESON, E. M. y S. E. FORD, 2004 A review of recent information on the Haplosporidia, with special reference to *Haplosporidium nelsoni* (MSX disease). Aquatic Living Resources **17**: 499-517.
- BURRESON, E. M. y K. S. REECE, 2006 Spore ornamentation of *Haplosporidium nelsoni* and *Haplosporidium costale* (Haplosporidia), and incongruence of molecular phylogeny and spore ornamentation in the haplosporidia. Journal of Parasitology **92**: 1295-1301.
- BURRESON, E. M., N. A. STOKES y C. S. FRIEDMAN, 2000 Increased virulence in an introduced pathogen: *Haplosporidium nelsoni* (MSX) in the eastern oyster *Crassostrea virginica*. Journal of Aquatic Animal Health **12**: 1-8.
- BURRESON, E. M., N. A. STOKES, R. B. CARNEGIE y M. J. BISHOP, 2004 *Bonamia* sp. (Haplosporidia) found in nonnative oysters *Crassostrea ariakensis* in Bogue Sound, North Carolina. Journal of Aquatic Animal Health **16**: 1-9.
- CÁCERES-MARTÍNEZ, J., J. A. F. ROBLEDO y A. FIGUERAS, 1995 Presence of *Bonamia* and its relation to age, growth-rates and gonadal development of the flat oyster, *Ostrea edulis*, in the Ria de Vigo, Galicia (NW Spain). Aquaculture **130**: 15-23.
- CAMPALANS, M., P. ROJAS y M. GONZALEZ, 2000 Haemocytic parasitosis in the farmed oyster *Tiostrea chilensis*. Bulletin of the European Association of Fish Pathologists **20**: 31-33.
- CANZONIER, W. J., 1968 Present status of attempts to transmit *Minchinia nelsoni* under controlled conditions. Proceedings of the National Shellfisheries Association **58**: 1.
- CANZONIER, W. J., 1974 Tissue grafts in the American oyster *Crassostrea virginica*. Proceedings of the National Shellfisheries Association **64**: 92-101.



- CARBALLAL, M. J., S. DIAZ y A. VILLALBA, 2005 *Urosporidium* sp hyperparasite of the turbellarian *Paravortex cardii* in the cockle *Cerastoderma edule*. Journal of Invertebrate Pathology **90**: 104-107.
- CARNEGIE, R. B., 2005 Effects in mollusc culture, pp. 391-398 in *Marine parasitology*, edited by K. ROHDE. CSIRO; Collingwood, Victoria, Australia.
- CARNEGIE, R. B. y N. COCHENNEC-LAUREAU, 2004 Microcell parasites of oysters: Recent insights and future trends. Aquatic Living Resources **17**: 519-528.
- CARNEGIE, R. B., B. J. BARBER, S. C. CULLOTY, A. J. FIGUERAS y D. L. DISTEL, 2000 Development of a PCR assay for detection of the oyster pathogen *Bonamia ostreae* and support for its inclusion in the Haplosporidia. Diseases of Aquatic Organisms **42**: 199-206.
- CARNEGIE, R. B., B. J. BARBER y D. L. DISTEL, 2003 Detection of the oyster parasite *Bonamia ostreae* by fluorescent *in situ* hybridization. Diseases of Aquatic Organisms **55**: 247-252.
- CARNEGIE, R. B., E. M. BURRESON, P. M. HINE, N. A. STOKES, C. AUDEMARD *et al.*, 2006 *Bonamia perspora* n. sp (Haplosporidia), a Parasite of the Oyster *Ostreola equestris*, is the First *Bonamia* Species Known to Produce Spores. Journal of Eukaryotic Microbiology **53**: 232-245.
- CAULLERY, M., 1953 Appendice aux Sporozoaires: Classe des haloposporidies (Haplosporidia Caullery et Mesnil 1899). Traité de Zoologie I **2**: 922-934.
- CAULLERY, M. y F. MESNIL, 1899 Sur le genre *Aplosporidium* (nov) et l'ordre nouveau des Aplosporidies. . Comptes Rendus des Séances de la Societé de Biologie et de Ses Filiales **51**: 789-791.
- CAVALIER-SMITH, T., 1993 Kingdom Protozoa and its 18 phyla. Microbiological Reviews **57**: 953-994.
- CAVALIER-SMITH, T., 2002 The phagotrophic origin of eukaryotes and phylogenetic classification of Protozoa. International Journal of Systematic and Evolutionary Biology **52**: 953-994.
- CAVALIER-SMITH, T. y E. E. Y. CHAO, 2003 Phylogeny and classification of phylum Cercozoa (Protozoa). Protist **154**: 341-358.
- CESCHIA, G., S. ZANCHETTA, M. SELLO, F. MONTESI, P. ANTONETTI *et al.*, 2001 Presenza di parassiti in cannolicchi (*Ensis minor* e *Ensis siliqua*) pescati nell'area costiera del Mar Tirreno meridionale e del mar Adriatico. Bolletino della Società Italiana de Patologia Ittica **30**: 20-27.
- CHAGOT, D., V. BOULO, D. HERVIO, E. MIALHE, E. BACHERE *et al.*, 1992 Interactions between *Bonamia ostreae* (Protozoa, Ascetospora) and hemocytes of *Ostrea edulis* and *Crassostrea gigas* (Mollusca, Bivalvia) - entry mechanisms. Journal of Invertebrate Pathology **59**: 241-249.



- CHU, F. L. E., E. M. BURRESON, F. ZHANG y K. K. CHEW, 1996 An unidentified haplosporidian parasite of bay scallop *Argopecten irradians* cultured in the Shandong and Liaoning provinces of China. *Diseases of Aquatic Organisms* **25**: 155-158.
- CIANCIO, A., S. SCIPPA y C. IZZO, 1999 Ultrastructure of vegetative and sporulation stages of *Haplosporidium ascidiarum* from the ascidian *Ciona intestinalis* L. *European Journal of Protistology* **35**: 175-182.
- CIGARRIA, J. y R. ELSTON, 1997 Independent introduction of *Bonamia ostreae*, a parasite of *Ostrea edulis*, to Spain. *Diseases of Aquatic Organisms* **29**: 157-158.
- COCHENNEC, N., D. HERVIO, B. PANATIER, V. BOULO, E. MIALHE *et al.*, 1992 A direct monoclonal-antibody sandwich immunoassay for detection of *Bonamia ostreae* (Asctospora) in hemolymph samples of the flat oyster *Ostrea edulis* (Mollusca, Bivalvia). *Diseases of Aquatic Organisms* **12**: 129-134.
- COCHENNEC, N., F. LE ROUX, F. BERTHE and A. GERARD, 2000 Detection of *Bonamia ostreae* based on small subunit ribosomal probe. *Journal of Invertebrate Pathology* **76**: 26-32.
- COCHENNEC-LAUREAU, N., K. S. REECE, F. C. J. BERTHE y P. M. HINE, 2003 *Mikrocytos roughleyi* taxonomic affiliation leads to the genus *Bonamia* (Haplosporidia). *Diseases of Aquatic Organisms* **54**: 209-217.
- COMPS, M. y Y. PICHOT, 1991 Fine spore structure of a haplosporidan parasitizing *Crassostrea gigas*. Taxonomic implications. *Diseases of Aquatic Organisms* **11**: 73-77.
- COMPS, M. y G. TIGE, 1997 Fine structure of *Minchinia* sp., a haplosporidan infecting the mussel *Mytilus galloprovincialis* L. *Systematic Parasitology* **38**: 45-50.
- COOK, T., M. FOLLI, J. KLINCK, S. FORD y J. MILLER, 1998 The relationship between increasing sea-surface temperature and the northward spread of *Perkinsus marinus* (Dermo) disease epizootics in oysters. *Estuarine Coastal and Shelf Science* **46**: 587-597.
- CORBEIL, S., I. ARZUL, M. ROBERT, F. BERTHE, N. BESNARD-COCHENNEC *et al.*, 2006 Molecular characterisation of an Australian isolate of *Bonamia exitiosa*. *Diseases of Aquatic Organisms*: 81-85.
- CRANFIELD, H. J., A. DUNN, I. J. DOONAN y K. P. MICHAEL, 2005 *Bonamia exitiosa* epizootic in *Ostrea chilensis* from Foveaux Strait, southern New Zealand between 1986 and 1992. *Ices Journal of Marine Science* **62**: 3-13.
- CULLOTY, S. C. y M. F. MULCAHY, 1996 Season-, age-, and sex-related variation in the prevalence of bonamiasis in flat oysters (*Ostrea edulis* L) on the south coast of Ireland. *Aquaculture* **144**: 53-63.



- CULLOTY, S. C., B. NOVOA, M. PERNAS, M. LONGSHAW, M. F. MULCAHY *et al.*, 1999 Susceptibility of a number of bivalve species to the protozoan parasite *Bonamia ostreae* and their ability to act as vectors for this parasite. *Diseases of Aquatic Organisms* **37**: 73-80.
- CULLOTY, S. C., M. CRONIN y M. MULCAHY, 2001 An investigation into the relative resistance of Irish flat oysters *Ostrea edulis* L. to the parasite *Bonamia ostreae* (Pichot *et al.*, 1980). *Aquaculture*: 229-244.
- DA SILVA, P. M. y A. VILLALBA, 2004 Comparison of light microscopic techniques for the diagnosis of the infection of the European flat oyster *Ostrea edulis* by the protozoan *Bonamia ostreae*. *Journal of Invertebrate Pathology* **85**: 97-104.
- DA SILVA, P. M., J. FUENTES y A. VILLALBA, 2005 Growth, mortality and disease susceptibility of oyster *Ostrea edulis* families obtained from brood stocks of different geographical origins, through on-growing in the Ria de Arousa (Galicia, NW Spain). *Marine Biology* **147**: 965-977.
- DA SILVA, P. M., P. COMESAÑA, J. FUENTES y A. VILLALBA, 2008 Variability of haemocyte and haemolymph parameters in European flat oyster *Ostrea edulis* families obtained from brood stocks of different geographical origins and relation with infection by the protozoan *Bonamia ostreae*. *Fish and Shellfish Immunology* **24**: 551-563.
- DESPORTES, I. y N. N. NASHED, 1983 Ultrastructure of sporulation in *Minchinia dentali* (Arvy), an haplosporean parasite of *Dentalium entale* (Scaphopoda, Mollusca): taxonomic implications. *Protistologica* **19**: 435-460.
- DESPORTES, I. y F. O. PERKINS, 1990 Phylum Paramyxea, pp. 30-35 in *Handbook of Protoctista*, edited by C. J. O. MARGULIS L, MELKONIAN M., CHAPMAN D.J. Jones and Bartlett Publishing, Boston, MA.
- DIGGLES, B. K., N. COCHENNEC-LAUREAU y P. M. HINE, 2003 Comparison of diagnostic techniques for *Bonamia exitiosus* from flat oysters *Ostrea chilensis* in New Zealand. *Aquaculture* **220**: 145-156.
- DOONAN, I. J., H. J. CRANFIELD y K. P. MICHAEL, 1994 Catastrophic reduction of the oyster, *Tiostrea chilensis* (Bivalvia, Ostreidae), in Foveaux Strait, New Zealand, due to infestation by the protistan *Bonamia* sp. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research* **28**: 335-344.
- ELSTON, R. A., C. A. FARLEY y M. L. KENT, 1986 Occurrence and significance of bonamiasis in European flat oysters *Ostrea edulis* in North America. *Diseases of Aquatic Organisms* **2**: 49-54.
- ELSTON, R. A., M. L. KENT y M. T. WILKINSON, 1987 Resistance of *Ostrea edulis* to *Bonamia ostreae* infection. *Aquaculture* **64**: 237-242.



- FARLEY, C. A., 1967 A proposed life cycle of *Minchinia nelsoni* (Haplosporida, Haplosporidiidae) in the American oyster *Crassostrea virginica*. Journal of Protozoology **14**: 616-625.
- FARLEY, C. A., 1968 *Minchinia nelsoni* (Haplosporida) disease syndrome in the American oyster *Crassostrea virginica*. Journal of Protozoology **15**: 585-599.
- FIGUERAS, A. y J. A. F. ROBLEDO, 1994 *Bonamia ostreae* present in flat oysters (*Ostrea edulis*) does not infect mussels (*Mytilus galloprovincialis*). Bulletin of the European Association of Fish Pathologists **14**: 98-100.
- FIGUERAS, A. J., 1991 *Bonamia* status and its effects in cultured flat oysters in the Ria de Vigo, Galicia (NW Spain). Aquaculture **93**: 225-233.
- FIGUERAS, A. J., C. F. JARDON y J. R. CALDAS, 1991 Diseases and parasites of mussels *Mytilus edulis* Linnaeus 1758 from two sites on the east coast of the United States. Journal of Shellfish Research **10**: 89-94.
- FLORES, B. S., M. E. SIDDALL y E. M. BURRESON, 1996 Phylogeny of the Haplosporidia (Eukaryota: Alveolata) based on small subunit ribosomal RNA gene sequence. Journal of Parasitology **82**: 616-623.
- FONG, D., M. M. Y. CHAN, R. RODRIGUEZ, C. C. CHEN, Y. LIANG *et al.*, 1993 Small subunit ribosomal RNA gene sequence of the parasitic protozoan *Haplosporidium nelsoni* provides a molecular probe for the oyster MSX disease. Molecular and Biochemical Parasitology **62**: 139-142.
- FORD, S. E., 1985a Chronic infections of *Haplosporidium nelsoni* (MSX) in the oyster *Crassostrea virginica*. Journal of Invertebrate Pathology **45**: 94-107.
- FORD, S. E., 1985b Effects of salinity on survival of the MSX parasite *Haplosporidium nelsoni* Haskin Stauber and Mackin in oysters. Journal of Shellfish Research **5**: 85-90.
- FORD, S. E., 2002 Development of high resistance in a wild oyster population. Journal of Shellfish Research **21**: 387
- FORD, S. E. y H. H. HASKIN, 1982 History and epizootiology of *Haplosporidium nelsoni* (MSX), an oyster pathogen in Delaware Bay, 1957-1980. Journal of Invertebrate Pathology **40**: 118-141.
- FORD, S. E. y K. A. ASHTON-ALCOX, 1998 Altered response of oyster hemocytes to *Haplosporidium nelsoni* (MSX) plasmodia treated with enzymes or metabolic inhibitors. Journal of Invertebrate Pathology **72**: 160-166.
- FORD, S. E. y H. H. HASKIN, 1987 Infection and mortality patterns in strains of oysters *Crassostrea virginica* selected for resistance to the parasite *Haplosporidium nelsoni* (MSX). Journal of Parasitology **73**: 368-376.
- FORD, S. E. y H. H. HASKIN, 1988 Comparison of *in vitro* salinity tolerance of the oyster parasite, *Haplosporidium nelsoni* (MSX) and hemocytes from



- the host, *Crassostrea virginica*. Comparative Biochemistry and Physiology A-Physiology **90**: 183-187.
- FORD, S. E. y M. R. TRIPP, 1996 Diseases and defense mechanisms in *The eastern oyster Crassostrea virginica*., edited by K. V. S., N. R.I.E. and E. A.F. Maryland Sea Grant College, University of Maryland System, College Park, MD.
- FORD, S. E., K. A. ASHTON-ALCOX y S. A. KANALEY, 1993 *In vitro* interactions between bival hemocytes and the oyster pathogen *Haplosporidium nelsoni* (MSX). Journal of Parasitology **79**: 255-265.
- FORD, S. E., E. M. POWELL, J. KLINCK y E. HOFMANN, 1999 Modeling the MSX parasite in eastern oyster (*Crassostrea virginica*) populations. I. Model development, implementation, and verification. Journal of Shellfish Research **18**: 475-500.
- FRIEDMAN, C. S., 1996 Haplosporidian infections of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), in California and Japan. Journal of Shellfish Research **15**: 597-600.
- FRIEDMAN, C. S. y F. PERKINS, 1994 Range extension of *Bonamia ostreae* to Maine, USA. Journal of Invertebrate Pathology: 179-181.
- FRIEDMAN, C. S., T. McDOWELL, J. M. GROFF, J. T. HOLLIBAUGH, D. MANZER *et al.*, 1989 Presence of *Bonamia ostreae* among populations of the European flat oyster *Ostrea edulis* Linne in California USA. Journal of Shellfish Research **8**: 133-138.
- FRIEDMAN, C. S., D. F. CLONEY, D. MANZER y R. P. HEDRICK, 1991 Haplosporidiosis of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. Journal of Invertebrate Pathology **58**: 367-372.
- FUENTES, J., J. L. LÓPEZ, E. MOSQUERA, J. VÁZQUEZ, A. VILLALBA *et al.*, 2002 Growth, mortality, pathological conditions and protein expression of *Mytilus edulis* and *Mytilus galloprovincialis* crosses cultures in the Ría de Arousa (NW of Spain). Aquaculture **213**: 233-251.
- GRIZEL, H., 1985 Étude des récentes épizooties de l'huîtres plate *Ostrea edulis* L. et de leur impact sur l'ostreiculture Bretonne. Thèse de Doctorat, pp. 145. Université des Sciences Techniques du Languedoc, Montpellier.
- GRIZEL, H., E. MIALHE, D. CHAGOT, V. BOULO y E. BACHERE, 1988 Bonamiasis: a model study of diseases in marine molluscs. American Fisheries Society Special Publication **18**: 1-4.
- HASKIN, H. H. y J. D. ANDREWS, 1988 Uncertainties and speculations about life cycle on the eastern oyster pathogen *Haplosporidium nelsoni* (MSX), pp. 5-22 in *Diseases Processes in Marine Bivalve Molluscs*, edited by W. S. FISHER. American Fish Society Special Publication, 18.



- HASKIN, H. H. y S. E. FORD, 1982 *Haplosporidium nelsoni* (MSX) on Delaware Bay seed oyster beds - a host-parasite relationship along a salinity gradient. *Journal of Invertebrate Pathology* **40**: 388-405.
- HASKIN, H. H., L. A. STAUBER y J. A. MACKIN, 1966 *Minchinia nelsoni* n sp (Haplosporidia, Haplosporidiidae) - causative agent of Delaware Bay oyster epizootic. *Science* **153**: 1414-8.
- HERVIO, D., D. CHAGOT, P. GODIN, H. GRIZEL y E. MIALHE, 1992 Localization and characterization of acid phosphatase activity in *Bonamia ostreae* (Ascetospora), an intrahemocytic protozoan parasite of the flat oyster *Ostrea edulis* (Bivalvia). *Diseases of Aquatic Organisms* **12**: 67-70.
- HERVIO, D., E. BACHERE, V. BOULO, N. COCHENNEC, V. VUILLEMIN ET AL., 1995 Establishment of an experimental-infection protocol for the flat oyster, *Ostrea edulis*, with the intrahaemocytic protozoan parasite, *Bonamia ostreae* - application in the selection of parasite-resistant oysters. *Aquaculture*: 183-194.
- HINE, P. M., 1991 The annual pattern of infection by *Bonamia* sp in New Zealand flat oysters, *Tiostrea chilensis*. *Aquaculture* **93**: 241-251.
- HINE, P. M., N. COCHENNEC-LAUREAU y F. C. J. BERTHE, 2001 *Bonamia exitiosus* n. sp (Haplosporidia) infecting flat oysters *Ostrea chilensis* in New Zealand. *Diseases of Aquatic Organisms* **47**: 63-72.
- HINE, P. M. y T. THORNE, 1998 *Haplosporidium* sp. (Haplosporidia) in hatchery-reared pearl oysters, *Pinctada maxima* (Jameson, 1901), in north Western Australia. *Journal of Invertebrate Pathology* **71**: 48-52.
- HINE, P. M. y T. THORNE, 2002 *Haplosporidium* sp (Alveolata : Haplosporidia) associated with mortalities among rock oysters *Saccostrea cucullata* in north Western Australia. *Diseases of Aquatic Organisms* **51**: 123-133.
- ITOH, N., K. MOMOYAMA y K. OGAWA, 2005 First report of three protozoan parasites (a haplosporidian, *Marteilia* sp. and *Marteilioides* sp.) from the Manila clam, *Venerupis* (= *Ruditapes*) *philippinarum* in Japan. *Journal of Invertebrate Pathology* **88**: 201-206.
- KAMAISHI, T. y T. YOSHINAGA, 2002 Detection of *Haplosporidium nelsoni* in Pacific oyster *Crassostrea gigas* in Japan. *Fish Pathology* **37**: 193-195.
- KATKANSKY, S. C. y R. W. WARNER, 1970 Sporulation of a haplosporidian in a Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) in Humboldt Bay, California. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* **27**: 1320-1321.
- KATKANSKY, S. C., W. A. DAHLSTROM y R. W. WARNER, 1969 Observations on survival and growth of the European flat oyster, *Ostrea edulis*, in California. *California Fish and Game* **55**: 69-74.
- KERN, F. G., 1993 Shellfish health inspections of Chilean and Australian oysters. *Journal of Shellfish Research* **12**: 366.



- KROECK, M. A. y J. MONTES, 2005 Occurrence of the haemocyte parasite *Bonamia* sp in flat oysters *Ostrea puelchana* farmed in San Antonio Bay (Argentina). Diseases of Aquatic Organisms **63**: 231-235.
- KUDO, R. R., 1931 *Handbook of Protozoology*. Thomas, Springfield, Illinois.
- LOPEZ-FLORES, I., V. N. SUAREZ-SANTIAGO, D. LONGET, D. SAULNIER, B. CHOLLET *et al.*, 2007 Characterization of actin genes in *Bonamia ostreae* and their application to phylogeny of the Haplosporidia. Parasitology **134**: 1941-1948.
- LÜHE, M., 1900 Ergebnisse der neueren Sporozoenforschung. Zusammenfassende Darstellung mit besonderer Berücksichtigung der Malariaparasiten und ihrer nächsten Verwandten. Zentralblatt für Bakteriologie Abt 1 **28**: 323-324.
- LYNCH, S. A., D. V. ARMITAGE, S. WYLDE, M. F. MULCAHY y S. C. CULLOTY, 2005 The susceptibility of young prespawning oysters, *Ostrea edulis*, to *Bonamia ostreae*. Journal of Shellfish Research **24**: 1019-1025.
- LYNCH, S. A., D. V. ARMITAGE, J. COUGHLAN, M. F. MULCAHY y S. C. CULLOTY, 2007 Investigating the possible role of benthic macroinvertebrates and zooplankton in the life cycle of the haplosporidian *Bonamia ostreae*. Experimental Parasitology **115**: 359-368.
- LYNCH, S. A., M. F. MULCAHY y S. C. CULLOTY, 2008 Efficiency of diagnostic techniques for the parasite, *Bonamia ostreae*, in the flat oyster, *Ostrea edulis*. Aquaculture **281**: 17-21.
- MARCHAND, J. y V. SPRAGUE, 1979 Ultrastructure de *Minchinia cadomensis* sp.n. (Haplosporida) parasite du décapode *Rhithropanopeus harrisii tridentatus* Maitland dans le canal de Caen à la mer. Journal of Protozoology **26**: 179-185.
- MARTY, G. D., S. M. BOWER, K. R. CLARKE, G. MEYER, G. LOWE *et al.*, 2006 Histopathology and a real-time PCR assay for detection of *Bonamia ostreae* in *Ostrea edulis* cultured in western Canada. Aquaculture **261**: 33-42.
- MCCARDLE, J., F. MCKIERNAN, H. FOLEY y D. JONES, 1991 The current status of *Bonamia* disease in Ireland. Aquaculture: 273-278.
- MCGOVERN, E. R. y E. M. BURRESON, 1990 Ultrastructure of *Minchinia* sp. spores from shipworms (*Teredo* spp.) in the western North Atlantic, with a discussion of the taxonomy of the Haplosporidiidae. Journal of Protozoology **37**: 212-218.
- MIALHE, E., E. BACHERE, D. CHAGOT y H. GRIZEL, 1988a Isolation and purification of the protozoan *Bonamia ostreae* (Pichot *et al* 1980), a parasite affecting the flat oyster *Ostrea edulis* L. Aquaculture **71**: 293-299.



- MIALHE, E., V. BOULO, R. ELSTON, B. HILL, M. HINE *et al.*, 1988b Serological analysis of *Bonamia* in *Ostrea edulis* and *Tiostrea lutaria* using polyclonal and monoclonal antibodies. *Aquatic Living Resources* **1**: 67-69.
- MIX, M. C. y V. SPRAGUE, 1974 Occurrence of a haplosporidian in native oysters (*Ostrea lurida*) from Yaquina Bay and Alsea Bay, Oregon. *Journal of Invertebrate Pathology* **23**: 252-254.
- MONTES, J., 1991 Lag time for the infestation of flat oyster (*Ostrea edulis* L) by *Bonamia ostreae* in estuaries of Galicia (NW Spain). *Aquaculture* **93**: 235-239.
- MONTES, J. y M. MELENDEZ, 1987 Data on the parasitism of *Bonamia ostreae* in the flat oyster of Galicia, Northwest coast of Spain. *Aquaculture*: 195-198.
- MONTES, J., A. VILLALBA, M. LOPEZ, M. CARBALLAL y S. MOURELLE, 1991 Bonamiasis in native flat oysters (*Ostrea edulis* L) from 2 intertidal beds of the Ortigueira estuary (Galicia, NW Spain) with different histories of oyster culture. *Aquaculture*: 213-224.
- MONTES, J., R. ANADON y C. AZEVEDO, 1994 A possible life-cycle for *Bonamia ostreae* on the basis of electron-microscopy studies. *Journal of Invertebrate Pathology* **63**: 1-6.
- MOURTON, C., V. BOULO, D. CHAGOT, D. HERVIO, E. BACHÈRE *et al.*, 1992 Interactions between *Bonamia ostreae* Protozoa: Ascetospora) and hemocytes of *Ostrea edulis* and *Crassostrea gigas* (Mollusca: Bivalvia): in vitro system establishment. *Journal of Invertebrate Pathology* **59**: 235-240.
- NOVOA, B., P. BALSEIRO y A. FIGUERAS, 2004 Molecular detection of a haplosporidian parasite in carpet shell clam *Ruditapes decussatus* from Spain. *Diseases of Aquatic Organisms* **61**: 89-93.
- OIE (Office Internationale d'Epizootie) 2005. *Disease information*, 18 (47): 450.
- ORMIÈRES, R., 1980 *Haplosporidium parisi* n.sp an haplosporidian parasite of *Serpula vermicularis* L ultrastructural study of the spore. *Protistologica* **16**: 467-474.
- ORMIÈRES, R. y DEPUYTOR, P., 1968 Ultrastructure of Haplosporidia spores (*Haplosporidium ascidiarum* endoparasite of *Tunicier sydnium elegans* Giard). *Comptes Rendus Hebdomadaires Des Seances De L Academie Des Sciences Serie D* **266**: 1134-&.
- PARASO, M. C., S. E. FORD, E. N. POWELL, E. E. HOFMANN y J. M. KLINCK, 1999 Modeling the MSX parasite in eastern oyster (*Crassostrea virginica*) populations. II. Salinity effects. *Journal of Shellfish Research* **18**: 501-516.
- PERKINS, F. O., 1987 Protistan parasites of commercially significant marine bivalve mollusks - life-cycles, ultrastructure, and phylogeny. *Aquaculture* **67**: 240-243.



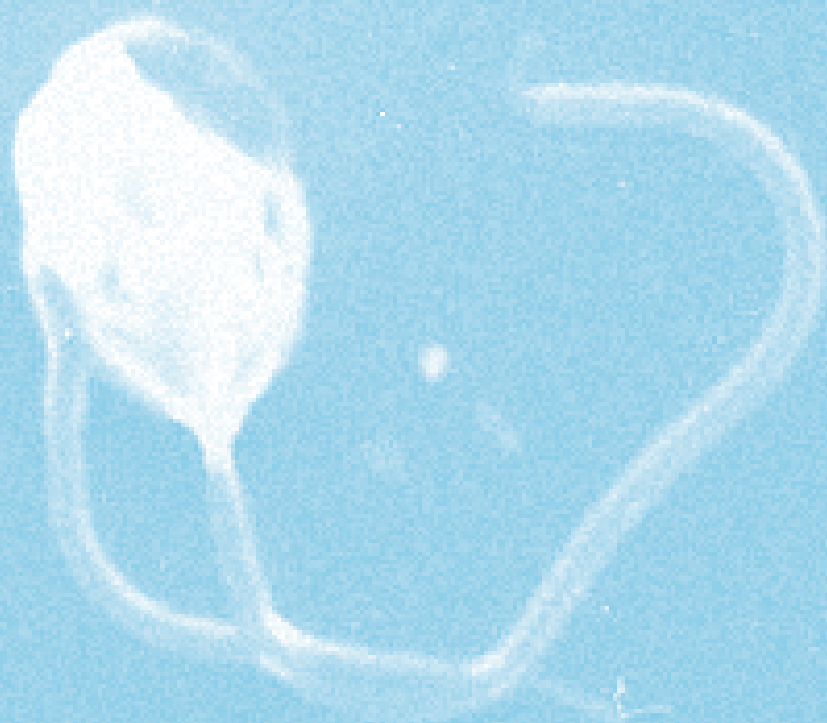
- PERKINS, F. O., 1988 Structure of protistan parasites found in bivalve molluscs. American Fisheries Society Special Publication **18**: 93-111.
- PERKINS, F. O., 1990 Phylum Haplosporidia, pp. 19-29 in *Margulis, L., Et Al. (Ed.). Jones and Bartlett Series in Life Sciences: Handbook of Protoctista. 914p. Jones and Bartlett Publishers, Inc.: Boston, Massachusetts, USA. Illus.*
- PERKINS, F. O., 1991 Sporozoa, Apicomplexa, Microsporidia, Haplosporidia, Paramyxea, Myxosporidia and Actinosporidia, pp. 261-332 in *Harrison, F. W. And J. O. Corliss (Ed.). Microscopic Anatomy of Invertebrates, Vol. 1. Protozoa. Xiv+493p. Wiley-Liss: New York, New York, USA; Chichester, England, Uk. Illus.*
- PERKINS, F. O., 2000 Phylum Haplosporidia Caullery & Mesnil, 1899, pp. 1328-1341 in *The illustrated guide to the Protozoa: organisms traditionally referred to as Protozoa, or newly discovered groups. Volume II. 2nd edition., edited by J. J. LEE, G. F. LEEDALE and P. BRADBURY. Society of Protozoologists, Lawrence, KS.*
- PERKINS, F. O. y P. VAN BANNING, 1981 Surface ultrastructure of spores in three genera of Balanosporida, particularly in *Minchinia armoricana* van Banning, 1977 - the taxonomic significance of spore wall ornamentation in the Balanosporida. The Journal of Parasitology **67**: 866-874.
- PICHOT, Y., M. COMPS, H. GRIZEL y M. A. RABOUIN, 1980 Recherches sur *Bonamia ostreae*, gen. n. sp. n., parasite nouveau de l'huître plate *Ostrea edulis* L. Revue des travaux de l'Institut des pêches maritimes **43**: 131-140.
- POWELL, E. N., J. M. KLINCK, S. E. FORD, E. E. HOFMANN y S. J. JORDAN, 1999 Modeling the MSX parasite in eastern oyster (*Crassostrea virginica*) populations. III. Regional application and the problem of transmission. Journal of Shellfish Research **18**: 517-537.
- REECE, K., M. SIDDALL, N. STOKES y E. BURRESON, 2004 Molecular phylogeny of the Haplosporidia based on two independent gene sequences. Journal of Parasitology: 1111-1122.
- RENAULT, T., N. COCHENNEC y H. GRIZEL, 1995 *Bonamia ostreae*, parasite of the European flat oyster, *Ostrea edulis*, does not experimentally infect the Japanese oyster, *Crassostrea gigas*. Bulletin of the European Association of Fish Pathologists **15**: 78-80.
- RENAULT, T., N. A. STOKES, B. CHOLLET, N. COCHENNEC, F. BERTHE *et al.*, 2000 Haplosporidiosis in the pacific oyster *Crassostrea gigas* from the French Atlantic coast. Diseases of Aquatic Organisms **42**: 207-214.
- ROGAN, E., S. C. CULLOTY, T. F. CROSS and M. F. MULCAHY, 1991 The detection of *Bonamia ostreae* (Pichot *et al* 1980) in frozen oysters (*Ostrea edulis* L) and the effect of the parasite on condition. Aquaculture **97**: 311-315.



- ROGIER, H., D. HERVIO, V. BOULO, C. CLAVIES, E. HERVAUD *et al.*, 1991 Monoclonal-antibodies against *Bonamia ostreae* (Protozoa, Asctospora), an intra-haemocytic parasite of flat oyster *Ostrea edulis* (Mollusca, Bivalvia). *Diseases of Aquatic Organisms* **11**: 135-142.
- SIDDALL, M. E., N. A. STOKES y E. M. BURRESON, 1995 Molecular phylogenetic evidence that the Phylum Haplosporidia has an alveolate ancestry. *Molecular Biology and Evolution* **12**: 573-581.
- SPRAGUE, V., 1966 Position of haplosporidians in a revised classification of Phylum Protozoa. *Journal of Protozoology* **5** **13**: 11-8.
- SPRAGUE, V., 1970 Recent problems of taxonomy and morphology of Haplosporidia. *Journal of Parasitology* **56**: 327-328.
- SPRAGUE, V., 1979 Classification of the Haplosporidia. *Marine Fisheries Review* **41**: 40-44.
- STEPHENSON, M. F., S. E. MCGLADDERY y N. A. STOKES, 2002 Detection of a previously undescribed haplosporidian-like infection of a blue mussel (*Mytilus edulis*) in Atlantic Canada. *Journal of Shellfish Research* **21**: 389.
- STEPHENSON, M. F., S. E. MCGLADDERY, M. MAILLET, A. VENIOT y G. MEYER, 2003 First reported occurrence of MSX in Canada. *Journal of Shellfish Research* **22**: 355.
- STOKES, N. A. y E. M. BURRESON, 1995 A sensitive and specific DNA probe for the oyster pathogen *Haplosporidium nelsoni*. *Journal of Eukaryotic Microbiology* **42**: 350-357.
- STOKES, N. A. y E. M. BURRESON, 2001 Differential diagnosis of mixed *Haplosporidium costale* and *Haplosporidium nelsoni* infections in the eastern oyster, *Crassostrea virginica*, using DNA probes. *Journal of Shellfish Research* **20**: 207-213.
- STOKES, N. A., M. E. SIDDALL y E. M. BURRESON, 1995 Detection of *Haplosporidium nelsoni* (Haplosporidia, Haplosporidiidae) in oysters by PCR amplification. *Diseases of Aquatic Organisms* **23**: 145-152.
- SUNILA, I., J. KAROLUS y J. VOLK, 1999 A new epizootic of *Haplosporidium nelsoni* (MSX), a haplosporidian oyster parasite, in Long Island Sound, Connecticut. *Journal of Shellfish Research* **18**: 169-174.
- TIGÉ, G. y H. GRIZEL, 1984 Essai de contamination d'*Ostrea edulis* Linné par *Bonamia ostreae* (Pichot et al. 1979) en Rivière de Crach (Morbihan). *Revue des travaux de l'Institut des pêches maritimes* **46**: 307-317.
- TIGÉ, G., H. GRIZEL, M. A. RABOUIN, N. COCHONNEC, G. AUDIC *et al.*, 1982 Maladie hémogtaire de l'huitre plate causée par *Bonamia ostreae*: évolution de la situation épizootologique en Bretagne au cours de l'année 1981. *Science et Pêche*: 3-13.

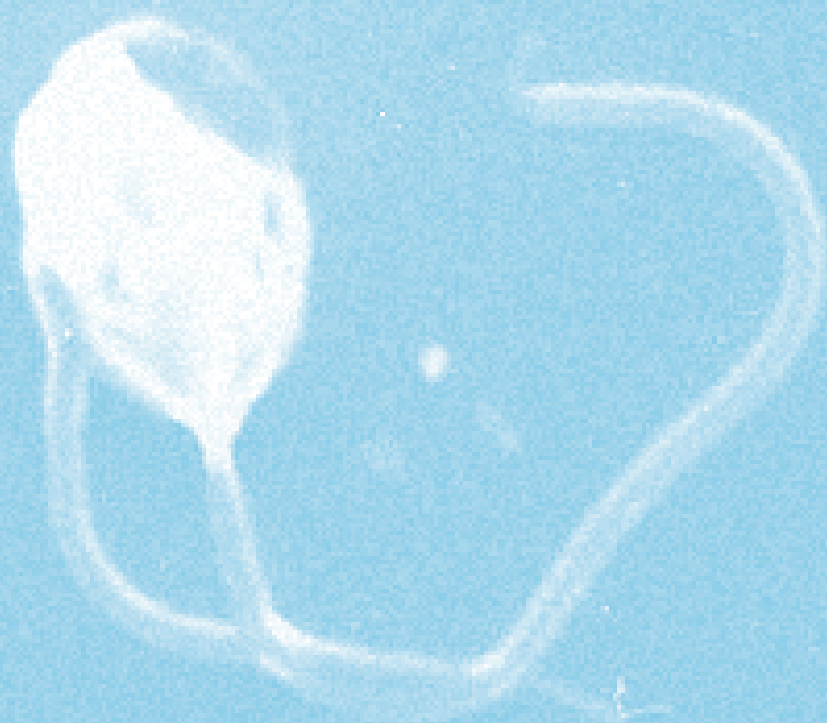


- VALLAT, B., 2006 *Office Internationale d'Epizootie. Manual of Diagnostic Test for Aquatic Animals. 5th Edition.*
- VAN BANNING, P., 1987 Further results of the *Bonamia ostreae* challenge tests in Dutch oyster culture. *Aquaculture* **67**: 191-194.
- XUE, Q. y T. RENAULT, 2000 Enzymatic activities in European flat oyster, *Ostrea edulis*, and Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, hemolymph. *Journal of Invertebrate Pathology* **76**: 155-163.
- ZABALETA, A. I. y B. J. BARBER, 1996 Prevalence, intensity, and detection of *Bonamia ostreae* in *Ostrea edulis* L in the Damariscotta River area, Maine. *Journal of Shellfish Research* **15**: 395-400.



9

ENFERMEDADES DE MOLUSCOS BIVALVOS DE INTERÉS COMERCIAL CAUSADAS POR METAZOOS



ENFERMEDADES DE MOLUSCOS BIVALVOS DE INTERÉS COMERCIAL CAUSADAS POR METAZOOS

Cremonte F.

Laboratorio de Parasitología, Unidad de Biología
y Manejo de Recursos Acuáticos, Centro Nacional Patagónico,
Boulevard Brown 2915, U9120ACF Puerto Madryn,
Provincia del Chubut, Argentina (fcremont@cenpat.edu.ar)

Resumen

Los metazoos que causan perjuicios en los bivalvos sometidos a explotación son muy diversos. Dentro de los organismos que excavan las valvas se encuentran los poríferos de la familia Clionaidae, los poliquetos principalmente de la familia Spionidae y algunas especies de bivalvos, contándose los dos primeros grupos entre los más perjudiciales para la acuicultura debido a su diversidad, abundancia y ubicuidad. La patología ocasionada puede ser severa dependiendo de la masividad de la invasión. Cuando los túneles excavados por alguno de estos organismos alcanzan la superficie interna de la valva, se observan pústulas de color amarronado que representan capas de conquiolina depositadas por el bivalvo. En el caso de los poliquetos polidóridos, en ocasiones, se forman en el interior de las valvas ampollas de paredes delgadas que suelen contener lodo y desechos de los poliquetos. El aspecto de las valvas perforadas disminuye el valor comercial del bivalvo. Dentro de los helmintos parásitos, turbelarios de las familias Urastomidae (*Uras-toma cyprinae*) y Graffillidae (*Graffilla* spp. y *Paravortex* spp.) se hallan

principalmente en branquias y en intestino respectivamente. Algunos estudios revelaron a *U. cyprinae* como patógeno en las branquias, mientras que para *Paravortex* spp. no hay evidencia de que causen efectos deletéreos, a pesar de conocerse que se alimentan a expensas de su hospedador. Cestodes en estado larval, representantes de cuatro órdenes, han sido reportados en bivalvos, cuyos adultos parasitan a elasmobranquios. Los metacestodes se han hallado en la cavidad paleal, en tejido conectivo del manto, en el lumen del intestino o en la masa visceral, con diferentes grados de reacción del hospedador. En general no causan daños severos en bivalvos sometidos a acuicultura. Los Digenea en estado larval son los principales parásitos metazoos de los bivalvos marinos: en estadio esporocisto castran al hospedador al ocupar la gónada, pero muy raramente se presentan en altas prevalencias. Es como metacercarias, ocupando diversos órganos, donde ejercen sus efectos más patógenos, ya que suelen estar en altas prevalencias e intensidades. Las metacercarias que producen efectos más conspicuos son aquellas de las familias Echinostomatidae (enquistan en diversos tejidos) y Gymnophallidae (ocurren sin enquistar entre el manto y la valva, erigiendo muy variadas respuestas que comprometen al manto y a la valva). Algunas metacercarias de estas familias son parásitos potenciales del hombre. Aunque los nematodos no son parásitos frecuentes de los bivalvos marinos, unas pocas especies de Ascaridoidea y Spirurida pueden hallarse en estado larval y sin gran especificidad por el sitio de infestación. Asimismo, estos suelen presentarse en bajas prevalencias o intensidades y provocan encapsulaciones de distintos tipos. Algunas especies de Ascaridoidea son potencialmente peligrosas para la salud humana. Otros organismos parásitos de los bivalvos son los gasterópodos de la familia Pyramidellidae. Estos comprenden un grupo diverso de heterobranquios de pequeño tamaño que viven como ectoparásitos en los bivalvos. Los bivalvos marinos son importantes hospedadores de los copépodos (la mayor parte del Orden Poecilostomatoida y unos pocos Harpacticoida), quienes habitan principalmente la cavidad del manto. Son los *Mytilicola* spp., al habitar en el intestino, los que causan entonces más perjuicios. Los cangrejos Pinnotheridae habitan la cavidad del manto de los bivalvos, quienes constituyen sus hospedadores preferidos. Aunque originalmente considerados como



comensales, se conoce causan daños en los palpos labiales y branquias y disminuyen la capacidad de filtración. Asimismo, el valor comercial de bivalvos albergando cangrejos en su interior se ve reducido. Otros habitantes de la cavidad del manto de los bivalvos son los nemertinos de la familia Malacobdellidae (*Malacobdella* spp.), siendo al parecer inocuos para sus hospedadores.

En general, las infestaciones por metazoos se ven reducidas cuando los cultivos se hallan suspendidos o alejados del sustrato. En el caso de helmintos con ciclos de vida complejos (cestodes, trematodes digeneos y nematodos), los bivalvos deben ser cultivados lejos de aquellos peces o aves que actúen como hospedadores definitivos.

Abstract

*The metazoans which are prejudicial to commercially exploited bivalves are very diverse. Among excavating organisms, there are Porifera of family Clionaidae, Polychaeta mainly belonging to the family Spionidae and some species of bivalves. The first two groups are within the most prejudicial to aquaculture given their diversity, abundance and ubiquity. The pathology caused can be severe depending upon massivity of infection. When galleries excavated reach the internal surface of the valves, bivalves reacting depositing conchiolin material. In the cases of polidorids, in occasions, mud blisters are formed. In all cases, perforated valves' appearance reduces the commercial value of the bivalves. Among helminthes parasites, the Turbellaria species belonging to the families Urastomidae (*Urastoma cyprinae*) and Graffillidae (*Graffilla* spp. y *Paravortex* spp.) are found mainly in branches and intestine respectively. Some studies revealed that *U. cyprinae* is pathogenic, but for *Paravortex* spp. there is not evidence of a deleterious effect despite they feed upon their hosts. Larval Cestoda representing four different orders had been reported in marine bivalves; whose adults parasite elasmobranches. Metacestodes had been found in mantle connective tissue, intestine lumen or in the visceral mass with different levels of host reaction. In general, they do not tend to cause important damage in cultured bivalves. Larval Digenea are the main metazoan parasites in marine bivalves. As sporocysts they castrate their hosts by replacing gonadal tissues, but only rarely they became a severe pathogen in aquaculture because they usually occur in*



low prevalences. Instead, as metacercariae, digenens are quite pathogenic by occupying different organs and by occurring in high prevalences and intensities. In particular, metacercariae belonging to the families Echinostomatidae (encysted in different organs) and Gymnophallidae (unencysted between mantle and valve) are among the most pathogenic. Some of them are also pathogenic for humans. Although nematodes are uncommon as bivalve parasites, few species of Ascaridoidea and Spirurida Nematoda could be found as larval stages without specificity for their site infection. Indeed, they frequently appear in low prevalences and intensities of infection, eliciting different kind of capsules. Some ascaridoids are potentially pathogenic to human health. Other organisms which parasite bivalves are gastropods of the family Pyramidellidae which live as ectoparasites. Marine bivalves are significant hosts for Copepoda (most belonging to the Order Poecilostomatoida and some others to Harpacticoida), who inhabit the mantle cavity. Species of Mytilicola cause the most severe damage by obstructing the intestine. Also, bivalves are the preferred host for Pinnotheridae crabs, who live in their mantle cavity. Although frequently considered as commensals, it is known that they cause damage in the labial palps and branches and reduce the filtering capacity. In addition, the commercial value of bivalves parasitized by crabs is reduced. Other habitants of mantle cavity are Nemetrea worms of the family Malacobdellidae (Malacobdella spp.), but are apparently innocuous for their host.

In general, infections by metazoans can be reduced or avoided when cultured bivalves are hanging or far from the substrate. In the case of helminthes with complex life cycles (cestods, trematods and nematods), bivalves must be cultured far away of those fishes or birds that act as their definitive hosts.

1. INTRODUCCIÓN

Los metazoos que poseen una relación de tipo parásita con los bivalvos marinos pertenecen a grupos muy diversos. Resulta difícil establecer cuando un organismo es parásito en el sentido estricto, ya que depende de la definición que se aplique y debe conocerse el tipo de relación que exhiben con su hospedador (i.e., si existe dependencia metabólica o si pueden potencialmente causar enfermedad) (BUSH *et al.* 2001; SCHMIDT y ROBERTS 2000; SMYTH 1994). De todas maneras,



aquellos metazoos que causen cualquier tipo de patología, ocasionando una disminución del valor comercial del bivalvo o la muerte, y que sean capaces de presentarse en altas prevalencias¹, revisten interés desde el punto de vista de la acuicultura.

Han sido varios los autores que han realizado revisiones que incluyen a los metazoos parasitando bivalvos, entre ellas, las efectuadas por BOWER *et al.* (1994), CHENG (1967b), LAUCKNER (1983) y SINDERMANN (1990), de las cuales la más exhaustiva es sin dudas la de LAUCKNER (1983). Actualizado periódicamente, el sitio de Internet creado y mantenido por BOWER y MCGLADDERY (2003) contiene valiosa información sobre enfermedades infecciosas de moluscos comercialmente explotados en Canadá y otras partes del mundo. Asimismo, el libro sobre parasitología marina editado por ROHDE (2005) incluye, aunque de forma general y sintética, capítulos de metazoos causantes de enfermedades en bivalvos marinos escritos por reconocidos especialistas de cada grupo.

2. ORGANISMOS EXCAVADORES

2.1. Esponjas

Los Porífera son un grupo muy diverso de metazoos primitivos, dentro del cual existen algunas especies capaces de excavar sustratos calcáreos. La mayoría de aquellas que resultan patogénicas para los bivalvos sometidos a explotación pertenecen al Orden Hadromerida (Demospongia), encontrándose mayormente en la Familia Clionidae. Esta familia aloja a los géneros *Pione*, *Volzia*, *Clionaopsis*, *Cliona*, *Cliothisa*, *Thoosa*, *Sphaciospongia* y *Cervicornia*. Las especies de estos géneros poseen la capacidad de excavar galerías en sustratos calcáreos, las cuales habitan quedando luego conectadas con el exterior por medio de papilas (ostia y óscula), a lo que se denomina estadio alfa (RÜTZLER 2002). En algunas especies se halló que la fusión de papilas

¹ La terminología referente a los índices parasitarios (prevalencia, intensidad y abundancia) utilizada en el presente trabajo es la acordada por BUSH, A. O., K. D. LAFFERTY, J. M. LOTZ y A. W. SHOSTAK, 1997 Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis *et al.* revisited. *Journal of Parasitology* **83**: 575-583.



da lugar a la forma incrustante (estadio beta), incluso alcanzando un hábito masivo al crecer más allá de su sustrato original (estadio gamma) (RÜTZLER 2002).

Las esponjas Clionidae perforan distintos sustratos calcáreos, incluyendo las valvas de los bivalvos, y obtienen sus nutrientes del agua, al igual que el resto de los organismos filtradores. La determinación taxonómica de las especies se basa principalmente en los tipos de espículas que posean, las dimensiones y características de éstas y su ubicación y disposición. También se toma en cuenta el color de la esponja en vivo y la geometría de las papilas, entre otras características. Cuando están vivas poseen colores brillantes, siendo amarillas, naranjas, rojas o verdes (LAUCKNER 1983; ROHDE 2005; VAN SOEST *et al.* 2005).

Cliona es el género con mayor número de especies y *Cliona celata*, la especie tipo, es la más citada en bivalvos y se cree de distribución cosmopolita (LAUCKNER 1983). Sin embargo, los registros de ocurrencia «confiables» son a ambos lados del Océano Atlántico Norte, el Mar Mediterráneo y el Arrecife de la Gran Barrera en Australia (RÜTZLER 2002). Los estadios alfa (i.e., los tejidos alojados en el interior del sustrato se conectan al exterior por medio de papilas) son comunes y también obvios en valvas, principalmente de ostras, entre el intermareal y los 10 m de profundidad; los estadios gamma ocurren libres en los sedimentos a 40 m de profundidad (RÜTZLER 2002).

Dentro de los bivalvos sometidos a explotación, las esponjas perforantes se han hallado en aquellos que presentan hábitos epifaunales como *Crassostrea virginica*, *Crassostrea gigas*, *Ostrea edulis*, *Pinctada maxima* y muchas otras especies de ostras, así como también en *Placopecten magellanicus*, *Patinopecten yessoensis* y otros pectínidos y, además, en mitílidos (BOWER y MCGLADDERY 2003; LAUCKNER 1983).

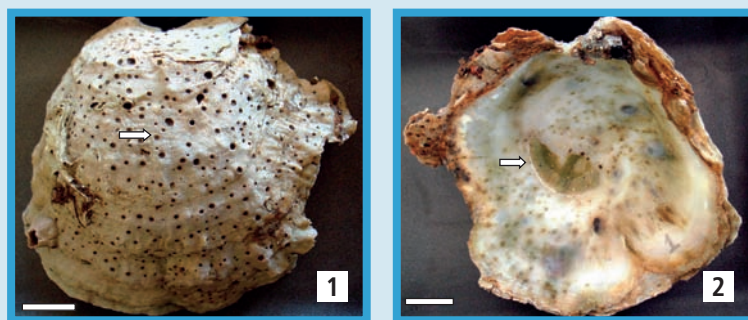
El mecanismo de excavación consiste en un proceso celular de dos etapas, una química y otra mecánica. Los pseudópodos de células especializadas secretan fosfatasa ácida, la cual está regulada por anhidrasa carbónica, que, junto a la acción de una enzima lisosomal disuelven la materia orgánica. De este modo desprenden pequeños fragmentos de forma aproximadamente hemisférica, los cuales son expulsados al exterior a través del canal excurrente de la esponja. RÜTZLER y RIEGER (1973) y WARBURTON (1958) estimaron que la componente quí-



mica de este proceso corresponde al 2%-3% de la erosión total. Sin embargo, estudios recientes (ZUNDELEVICH *et al.* 2007) concluyen que la erosión química corresponde al 75%. Posteriormente, la esponja crece ocupando las cámaras excavadas y mantiene contacto con el exterior por medio de las papilas inhalantes (ostia) y exhalantes (óscula).

La patología ocasionada puede ser severa dependiendo de la masividad de la invasión. Las esponjas penetran en el periostraco formando hoyos circulares de 1-4 mm de diámetro en la superficie (dependiendo de la especie involucrada) (Fig. 1) y excavan una red de cámaras o galerías interconectadas dentro de la valva. Muchas veces alcanzan la superficie interna, donde se observan pústulas de color amarillado (Fig. 2) (BOWER y MCGLADDERY 2003; LAUCKNER 1983; ROHDE 2005). En casos severos, el bivalvo se debilita al verse afectada la inserción del músculo aductor, por lo que la filtración se ve impedida y resulta en mortalidad (LAUCKNER 1983).

Además, el aspecto de las valvas como panal de abejas y los túneles formados por la esponja que pueden ser habitados por otros organismos (e.g., poliquetos) disminuyen el valor comercial del bivalvo (BOWER y MCGLADDERY 2003; LAUCKNER 1983; ROHDE 2005). Asimismo, en el caso



FIGURAS 1 Y 2.

Valvas de *Ostrea puelchana* (Ostreidae) procedentes de Patagonia, Argentina, afectadas por *Cliona celata* (Porifera). **1.** Hoyos en la superficie externa (flecha). **2.** Pústulas amarilladas (flecha) en la superficie interna formadas como reacción a los túneles excavados por la esponja (fotografías tomadas por Nuria Vázquez). Barras de escala: 1 cm.



que el bivalvo infectado por esponjas alcanzara el mercado, su valor comercial se verá considerablemente reducido, ya que la coloración del porífero se torna oscura y sus tejidos se encuentran usualmente putrefactos, generando un olor desagradable (WARBURTON 1958). En el caso de las ostras, las pequeñas parecen ser menos susceptibles que los individuos de valvas más gruesas (BOWER y McGLADDERY 2003).

La esponja *Cliona* sp., que invade las valvas de *Pinctada maxima* en Australia, es capaz de penetrar la capa externa prismática y la interna nacarada, resultando en altas mortalidades de las ostras perlíferas en un período de tiempo relativamente corto. En estadios de invasión avanzados, la resistencia estructural de las valvas se ve afectada (STACHOWITSCH 1980; STEFANIAK *et al.* 2005) de forma tal que provee menor protección a los tejidos blandos. Si el avance de la esponja continúa, el manto se retrae causando la muerte de la ostra (BOWER y McGLADDERY 2003). A su vez, la producción de perlas se ve seriamente afectada, debido a que las ostras invierten más energía en depositar una gruesa capa de nácar para protegerse de la invasión en lugar de hacerlo sobre el núcleo de la perla que le fuera insertada (BOWER y McGLADDERY 2003).

Las respuestas a los daños resultan siempre energéticamente costosas, a la vez que reducen el volumen dentro de la valva (STEFANIAK *et al.* 2005), lo que es perjudicial para cualquier bivalvo. Por otra parte, la irritación crónica de los tejidos blandos puede resultar en una infestación secundaria bacteriana o fúngica (BOWER y McGLADDERY 2003). En el caso de la vieira, las lesiones en los tejidos blandos resultan visibles en el músculo aductor, convirtiendo a las vieras afectadas en un producto sin valor comercial (BOWER y McGLADDERY 2003).

No se conocen métodos de erradicación una vez que se establecen las poblaciones. La colonización por contacto se considera el mecanismo principal de dispersión de estas esponjas dentro de la población de bivalvos (BOWER y McGLADDERY 2003), por lo que los daños ocasionados en las valvas pueden reducirse si se utilizan sistemas de cultivo alejados del fondo.

2.2. Poliquetos

Los Polychaeta comprenden numerosos anélidos que ocupan la mayoría de los hábitats marinos, desde el intermareal hasta los fondos



más profundos. Aunque la mayor parte de los poliquetos son de vida libre, el parasitismo como forma de vida evolucionó considerablemente dentro del grupo (ROHDE 2005). Al menos han sido citadas tres familias perforadoras de valvas de moluscos, Spionidae, Sabellidae y Cirratulidae (MORENO *et al.* 2006).

Si bien la mayor parte de las especies de Sabellidae y Cirratulidae se han registrado en el abalone y otros gasterópodos, el sabélido *Terebrasabella heterouncinata* ha sido hallado en el pectínido *Placopecten megellanicus* y el cirratúlido *Dodecaceria choromytilicola* en los mitílidos *Choromytilus chorus* y *Aulacomya atra* (MORENO *et al.* 2006).

Sin dudas, la principal familia que afecta a bivalvos es la Spionidae, en particular las especies de los géneros *Polydora*, *Dipolydora* y *Boccardia*. Estas, junto a otras de géneros relacionados, se denominan vulgarmente polidóridos y se caracterizan por poseer el quinto segmento modificado, con quetas robustas en forma de gancho (RADASHEVSKY *et al.* 2006). Las tres especies más ampliamente reportadas como perforadoras de moluscos bivalvos en el mundo son *Polydora ciliata*, *P. hoplura* y *P. websteri* (RADASHEVSKY *et al.* 2006). Sin embargo, la taxonomía de *P. ciliata* ha sido revisada recientemente e incluye actualmente sólo poliquetos constructores de tubos. Consecuentemente, el nombre *P. calcarea* fue restituido para incluir aquellos espionidos que son perforantes (RADASHEVSKY *et al.* 2006).

Muchas especies de polidóridos son ampliamente conocidas por su capacidad de perforación en sustratos calcáreos, tales como valvas de moluscos, corales y algas coralinas (MARTIN y BRITAYEV 1998). Poseen una distribución global en zonas costeras, aunque algunas especies están restringidas a ciertas áreas (ROHDE 2005).

Numerosos bivalvos de importancia comercial han sido hallados afectados por polidóridos (principalmente por *Polydora* spp.); entre ellos, los ostreidos *Crassostrea* spp., *Ostrea* spp., *Saccostrea commercialis*, *Tiostrea chilenses*, el mejillón *Mytilus edulis*, las almejas *Ruditapes philippinarum*, *Chione* spp., *Mesodesma donacium*, *Mulinia* sp. y los pectínidos, *Patinopecten yessoensis*, *Crassedoma giganteum*, *Placopecten magellanicus*, *Argopecten purpuratus* y *Aequipecten tehuelchus* (BOSCOLO y GIOVANARDI 2002; BOWER y MCGLADDERY 2003;



CÁCERES-MARTÍNEZ *et al.* 1999; CIOCCO 1990; LAUCKNER 1983; MURINA y SOLONCHENKO 1991; OLIVA y SÁNCHEZ 2005; RADASHEVSKY *et al.* 2006).

Gran parte de las infecciones causadas por polidóridos son inocuas, en particular cuando la intensidad es baja y las perforaciones se hallan confinadas a la valva. En ocasiones, los tubos alcanzan el interior de la valva y entonces los moluscos infestados reaccionan secretando capas de conquiolina en su intento por aislar al poliqueto. Se denominan «blisters» a las cámaras de paredes delgadas formadas de esta manera, las cuales suelen contener lodo y desechos de los poliquetos (Fig. 5). Se desconoce cuál es el gasto energético que conlleva este mecanismo, pero se cree que repercutiría en la condición del bivalvo, debido a que éste invierte menos energía en el desarrollo de las partes blandas (MARTIN y BRITAYEV 1998). Asimismo, los polidóridos causan el debilitamiento de las valvas, haciendo a los bivalvos infectados más susceptibles de ser presas que los bivalvos no afectados. Se conoce que puede causar mortalidades al descomponerse el contenido del interior del tubo que resulta en producción de sulfuro de hidrógeno, tóxico para el bivalvo. Su presencia, además, hace menos atractivos a los bivalvos en términos comerciales y puede interferir con el cerramiento de las valvas y reducir el valor del molusco cuando es servido en la media valva (BOWER y MCGLADDERY 2003; MARTIN y BRITAYEV 1998).

Los Spionidae exhiben un amplio rango de mecanismos reproductivos; sin embargo, la mayoría depositan sus huevos en cápsulas que unen a la pared interna del túnel (ROHDE 2005). Presentan ciclos de vida cortos, de aproximadamente un año, una maduración rápida y una intensa actividad reproductiva. Se transmiten muy fácilmente por poseer larvas planctónicas. En general presentan estacionalidad, reproduciéndose preferentemente cuando la temperatura del agua es mayor (LAUCKNER 1983; MARTIN y BRITAYEV 1998).

En la mayoría de los poliquetos perforadores se conoce que su disposición espacial es agrupada (MARTIN y BRITAYEV 1998). Este patrón podría ser el resultado de hábitos gregarios de las larvas que se asientan o por la existencia de mecanismos de reproducción asexual que incrementan su número sobre el hospedador una vez que la infestación comenzó con 1 ó 2 fundadores (MARTIN y BRITAYEV 1998). La estrategia de reproducción asexual asegura que una vez colonizado



el sustrato por la larva, la población puede mantenerse y expandirse (BLAKE y ARNOFSKY 1999).

En Europa se han registrado mortalidades de mejillones, bajos índices de condición y pérdida del valor comercial debidos a infestaciones con *P. calcaria* (= *P. ciliata*) (BOWER y McGLADDERY 2003; LAUCKNER 1983). Las perforaciones, no sólo causan blisters conteniendo lodo compactado, sino que además debilitan las valvas. Los blisters formados en respuesta a *P. calcaria* pueden resultar en la atrofia del músculo aductor y posiblemente interfieran en la producción de gametas cuando las crestas calcáreas se originan en las áreas adyacentes a estos órganos. En Noruega, la introducción de polidóridos en un criadero de cultivo del pectínido *Pecten maximus*, ocasionó la pérdida de un tercio de la producción total de este país por las pérdidas económicas producidas por las altas mortalidades (MORTENSEN 2000).

En Japón, MORI *et al.* (1985) sugirieron que la infestación por *Polydora* sp. sería responsable de una disminución en las tasas de crecimiento de los pectínidos. Además, el engrosamiento de la valva como reacción a la penetración de los polidóridos puede reducir la capacidad de nado de los pectínidos haciéndolos más asequibles para los depredadores (i.e., estrellas de mar). En *P. magellanicus* la perforación de la valva puede inducir a la infiltración de sedimento (utilizado por los poliquetos para recubrir sus túneles) y formación de blisters de lodo en la superficie interna de las valvas.

En Australia, se consideró que esta enfermedad ha puesto en peligro de extinción los bancos naturales de ostras (SKEEL 1977 en HANDLEY 1995). También en Australia, serios daños en las valvas de *M. edulis*, *S. commercialis* y *C. gigas* han sido atribuidos a *Polydora websteri* (PREGENZER 1983). En Nueva Zelanda, *Triostrea chilensis* ha sido hallada infestada por *Boccardia* spp. (DUNPHY *et al.* 2005).

En la costa este de Norte América, *P. websteri* y *Polydora ligni* pueden causar blisters de lodo en la valva y abscesos de color amarillento en el músculo aductor de *C. virginica* cuando la perforación toma contacto con el músculo. En la Columbia británica, el engrosamiento anormal de las valvas y altas mortalidades causadas por *P. websteri* han imposibilitado el cultivo del pectínido introducido, *P. yessoensis*, en algunas localidades (BOWER y McGLADDERY 2003). En Baja California,

México, la almeja negra, *Chione fluctifraga*, fue hallada infestada por *Polydora* sp., que excava sus túneles principalmente en el área de los sifones; la intensidad de infestación se incrementa con el tamaño de la almeja. Los tubos en forma de U resultan en una valva muy porosa y las almejas muy infestadas a menudo pierden su habilidad para cerrar sus valvas. Asimismo, para la misma almeja, TINOCO-ORTA y CÁCERES-MARTÍNEZ (2003) determinaron, mediante experimentación en laboratorio, que la infestación fue similar en todos los tipos de sustratos y para todas las condiciones de turbulencia. Sin embargo, la infestación fue más abundante en almejas previamente habitadas por *Polydora* sp. (TINOCO-ORTA y CÁCERES-MARTÍNEZ 2003).

En Brasil, blisters de lodo causados principalmente por *Polydora* spp. han sido registrados en las valvas de *C. gigas*, *C. brasiliensis* y *C. rhizophorae* (RADASHEVSKY *et al.* 2006). En Chile, *Polydora biocipitalis* forma blisters en la zona umbonal de la valva de las almejas *Mesodesma donacium* y *Mulinia* sp. y en el pectínido *A. purpuratus* (CAÑETE y CÁRDENAS 2004). En la Patagonia argentina, *P. websteri* ha sido registrada en *A. tehuelchus* (CIOCCO 1990; ORENSANZ *et al.* 1989). La intensidad de infestación se incrementa con la edad de los bivalvos y, además, varía significativamente entre los diferentes bancos de la viera (CIOCCO 1990). En la misma región, altas prevalencias e intensidades de polidóridos afectan severamente a *O. puelchana* (N. VÁZQUEZ com. pers.).

En Chile, MORENO *et al.* (2006) efectuaron una revisión de las especies de poliquetos perforadores presentes en dicho país, habiendo hallado 9 que afectan tanto a los moluscos nativos como los introducidos para su cultivo. Dichos autores señalan que las actividades acuícolas son el principal vector de introducción de poliquetos perforantes en dicho país, no difiriendo esto con lo que ocurre en otras partes del mundo y aún con otros patógenos.

Las prevalencias e intensidades de infestación pueden ser reducidas evitando las localidades donde se conoce que los polidóridos son muy abundantes y también realizando cultivos alejados del fondo (al menos 0,5 m sobre el sustrato) y en ambientes intermareales. Diferentes tratamientos para eliminar a los poliquetos han sido propuestos; su efectividad y posibilidad de aplicación varía dependiendo de la especie de bivalvo involucrada. MacKENZIE y SHEARER (1961) reportaron que una



inmersión en solución saturada por 10 a 15 min seguidos de 15 min o más de secado al aire eliminaron al menos el 87% de *P. websteri* en las valvas de ostras vivas. Otros métodos de control, tanto químicos como físicos, se han aplicado con distintos grados de éxito (e.g., tratamientos hiper e hiposalinos, rociado de fenol salino 5%, ácido acético u otros vermicidas, radiación ultravioleta, ultrasonido, temperatura, luz) (CAÑETE y CÁRDENAS 2004; DUNPHY *et al.* 2005; MACKENZIE y SHEARER 1961). Asimismo, se han propuesto diferentes métodos de manejo, tales como selección de áreas para la compra de semillas según la abundancia de polidóridos o el diseño de calendarios de siembra de acuerdo a la disponibilidad de larvas planctónicas de polidóridos. Con esta última metodología se puede predecir cual es el momento de sembrar para prevenir el asentamiento y determinar eventuales cambios en los períodos de cosecha.

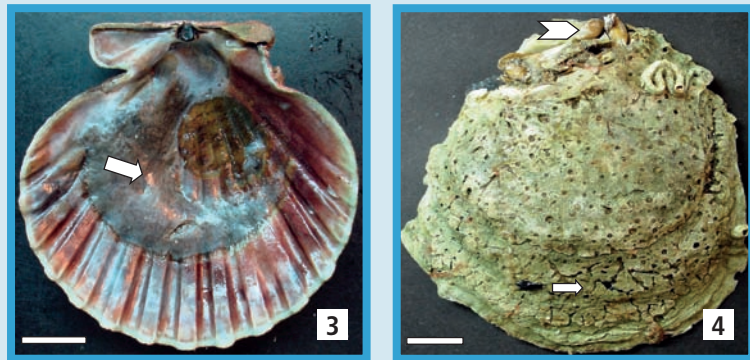
2.3. Moluscos bivalvos

Diversos bivalvos excavadores utilizan gran variedad de sustratos calcáreos incluyendo corales y valvas de otros bivalvos. Sin embargo, sólo aquellos bivalvos que poseen valvas gruesas, como las ostras, constituyen sustratos adecuados (LAUCKNER 1983).

En general, las patologías ocasionadas se corresponden con las de los otros organismos excavadores. Los bivalvos se hallan usualmente dentro de la valva en una cavidad que se incrementa a medida que el bivalvo crece en su interior. Cuando la perforación alcanza el interior de las valvas, el bivalvo hospedador deposita conquiolina en su intento por aislar al organismo excavador, provocando pústulas amarronadas (Figs. 3 y 4). Las perforaciones, al ser numerosas, debilitan la estructura de la valva.

Crassostrea virginica puede ser afectada por el folólido *Diplothyra smithii*. Este bivalvo excavador es muy abundante en las costas de Texas, en América del Norte (LAUCKNER 1983).

En Argentina, bivalvos mitílidos de la especie *Litophaga patagonica* afectan a *Ostrea puelchana* ocupando principalmente la zona del umbo y también en el zócalo, donde compiten por el espacio con los machos neoténicos de la ostra (Figs. 3 y 4) (MAUNA *et al.* 2005; N. VÁZQUEZ com. pers.). Se presentan en prevalencias cercanas al 40% y



FIGURAS 3 Y 4.

Valvas de *Ostrea puelchana* (Ostreidae) procedentes de Patagonia, Argentina, afectadas por *Cliona celata* (Porifera), *Polydora websteri* (Polychaeta) (flecha) y *Litophaga patagonica* (Mollusca) (cabeza de flecha) 3. Superficie interna de la valva de *Aequipecten tehuelchus* (Pectinidae) procedente de Patagonia, Argentina, con un gran blister de lodo (flecha) rodeando al músculo aductor causado por *Polydora websteri* (Polychaeta). Barra de escala: 1 cm.

4. Aspecto de la superficie externa de la valva.

con intensidades de hasta 10 individuos por ostra, ocupando preferentemente la valva cóncava (N. VÁZQUEZ com. pers.).

3. HELMINTOS PARÁSITOS

3.1. Turbellarios

Los Turbellaria, antes incluidos como un taxón dentro del phylum Platyhelminthes, son actualmente considerados como un grupo diverso y polifilético de platelmintos basales (ROHDE 2005; TYLER *et al.* 2006). Las especies que se han hallado asociadas a bivalvos son rhabdocoeles pertenecientes a las familias Urastomidae y Graffillidae (LAUCKNER 1983; ROHDE 2005). Poseen en común con otros turbelarios que también exhiben relaciones simbióticas con organismos marinos, su pequeño tamaño y el cuerpo blando, cilíndrico y cubierto con una epidermis ciliada (Figs. 6 a 10) (ROHDE 2005).



FIGURA 5.

Pústulas amarronadas en la superficie interna formadas como reacción a los túneles excavados por *L. patagonica* (cabeza de flecha) y machos neoténicos en el zócalo (flecha) (fotografías tomadas por Nuria Vázquez). Barra de escala: 1 cm.

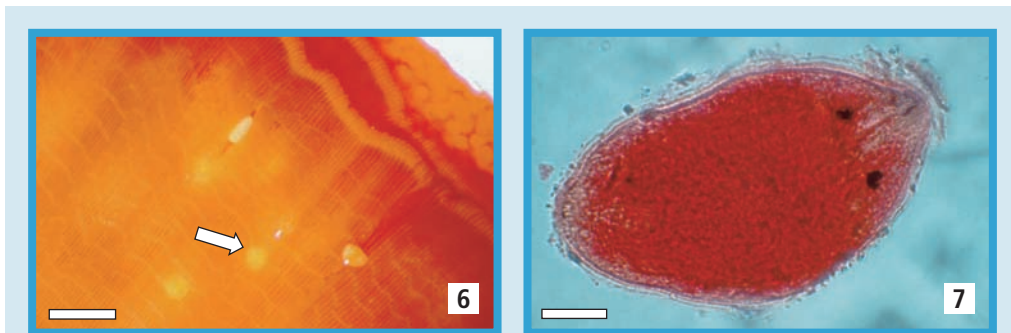
Los bivalvos en los que se han hallado turbelarios incluyen especies de interés en acuicultura como *Crassostrea virginica*, *Crassostrea gigas*, *Ostrea edulis* y también pectínidos, mejillones y almejas, habitando principalmente las branquias o el tracto digestivo (BOWER y McGLADDERY 2003).

Dentro de los Urastomidae, la única especie válida es *Urastoma cyprinae* (Fig. 7) (ROHDE 2005) y la más ampliamente reportada en las branquias de una amplia variedad de bivalvos. Fue considerada en un principio un parásito facultativo, al haber sido hallado también libre en el sustrato (LAUCKNER 1983; ROHDE 2005). Sin embargo, CRESPO GONZÁLEZ *et al.* (2005) concluyeron que su ciclo de vida involucraría una fase de maduración sexual en las branquias del bivalvo y un período reproductivo que incluye la secreción de un cócon, la postura y eclosión de los huevos en el sustrato.

La distribución de *U. cyprinae* incluye Europa, las costas Atlántica y Pacífica de Norte América, Brasil y Australia (BOWER y McGLADDERY 2003), no habiendo sido citada en otras regiones quizá por falta de conocimiento sobre las enfermedades que afectan a los bivalvos en dichas áreas. Las especies de bivalvos en las cuales se ha reportado *U. cyprinae* incluyen *Cyprina islandica* (Cyprinidae), *Solen vagina* (Solenidae), *Tridacna maxima* y *T. gigas* (Tridacnidae), la ostra *Crassostrea virginica*, los mejillones *Mytilus edulis*, *M. galloprovincialis*, *M. californianus* y *Modiola modiolus* (BOWER y McGLADDERY 2003; BURT y DRINNAN 1968; FLEMING 1986; GOGGIN y CANNON 1989; MURINA y SOLONCHENKO 1991; ROBLED0 *et al.* 1994; TEIA DOS SANTOS y COIMBRA 1995).

Si bien en un principio se consideró a *U. cyprinae* como un comensal inocuo (e.g., BURT y DRINNAN 1968; JENNINGS 1971), investigaciones posteriores revelaron que es claramente patogénico y resulta activamente atraído por su hospedador (e.g., BRUN *et al.* 1999a; BRUN *et al.* 1999b; ROBLEDO *et al.* 1994). Las primeras observaciones realizadas por FLEMING (1986) sugirieron que *U. cyprinae* se alimenta del mucus de las branquias de la ostra hospedadora. Asimismo, MURINA y SOLONCHENKO (1991) y TEIA DOS SANTOS y COIMBRA (1995) sugirieron que *U. cyprinae* induce patologías en los mejillones *M. galloprovincialis* y *M. edulis*. ROBLEDO *et al.* (1994) señalan a *U. cyprinae* como una amenaza potencial para los cultivos de mejillones *M. galloprovincialis*, ya que demostraron claramente los efectos patológicos de este parásito. El área de las branquias afectada por *U. cyprinae* (Figs. 6 y 7) exhibe un desarreglo de los filamentos, el espacio entre lamelas se observa reducido y el tamaño de los senos sanguíneos incrementado, existiendo además infiltración hemocítica y subsiguiente necrosis de los tejidos branquiales (ROBLEDO *et al.* 1994). Los turbelarios vivos se observan como puntos blancos sobre la branquia cuando se encuentran en gran número (Fig. 6).

Resultados obtenidos por BRUN *et al.* (1999a) y BRUN *et al.* (1999b) indican que este turbelario es fototáctico negativo y que resulta fuer-



FIGURAS 6 Y 7.

Urastoma cyprinae (Turbellaria) en *Mytilus galloprovincialis* (Mytilidae) procedente de Galicia, España. 6. Obsérvense varios ejemplares entre las laminillas branquiales (flecha).

7. Ejemplar teñido y montado (fotografías tomadas por JAF Robledo y Antonio Figueras).

Barras de escala: 800 y 200 μ m respectivamente.



temente atraído por la ostra *C. virginica* (el mucus branquial aislado o la branquia) en comparación con otras especies de moluscos tales como mejillones y almejas. Asimismo, se conoce que altera la composición de proteasas del mucus secretado por las branquias (BRUN *et al.* 1999a).

Debido a que *U. cyprinae* es suficientemente grande como para ser visible a los consumidores, se han realizando investigaciones conducentes a hallar algún método rápido de depuración que elimine estos parásitos antes que los bivalvos alcancen el mercado. BATALLER y BOGHEN (2000) sugieren que una combinación de temperatura cálida con baja salinidad lo eliminaría a *U. cyprinae* de las ostras infectadas. Asimismo, se ha comprobado que las ostras que crecen en cultivos suspendidos poseen menores intensidades de *U. cyprinae* que las que lo hacen en el fondo (MURINA y SOLONCHENKO 1991). De la misma manera, los mejillones *M. galloprovincialis* que viven sobre fondos areno-fangosos poseen un mayor número de turbelarios por hospedador que los que lo hacen sobre fondos rocosos (MURINA y SOLONCHENKO 1991; ROBLED0 *et al.* 1994). En Galicia, España, *M. galloprovincialis* exhibió un patrón estacional en la tasa de infestación con las mayores prevalencias observadas durante las temperaturas más bajas (ROBLED0 *et al.* 1994). Sin

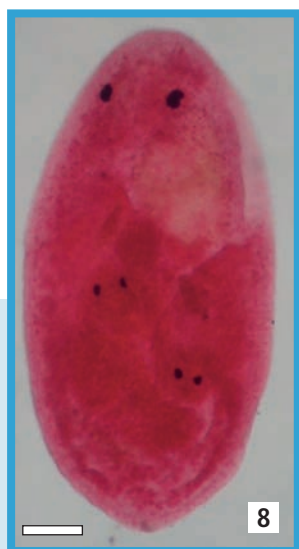


FIGURA 8.

Turbelario *Paravortex* sp. hallado en el intestino de *Panopea abbreviata* (Hiatellidae) procedente de Patagonia, Argentina, ejemplar teñido con carmín y montado (fotografía tomada por Francisco Brusa). Barra de escala: 20 μ m.

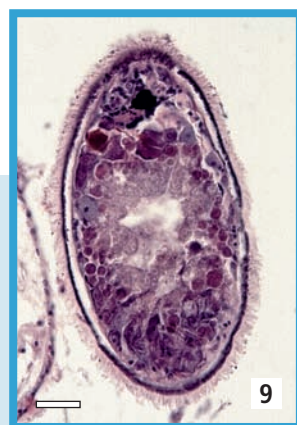
embargo, FLEMING (1986) halló un mayor número de parásitos durante la estación cálida del año en *C. virginica* en el Atlántico canadiense.

Dentro de la familia Graffillidae, las especies que parasitan moluscos están incluidas en dos géneros, *Graffilla* y *Paravortex* (ROHDE 2005). Las especies de *Graffilla* viven en los nefridios y ductos nefridiales de varios gasterópodos, aunque también pueden habitar la cavidad del manto e intestino (JENNINGS 1971). Poco se conoce acerca de la biología de estas especies, aunque no hay evidencia de que su presencia posea efectos deletéreos para su hospedadores, se conoce que se alimentan a expensas de éste (JENNINGS 1971; LAUCKNER 1983).

Una revisión bibliográfica de las especies de *Paravortex* asociadas a bivalvos fue realizada recientemente por BRUSA *et al.* (2006), quiénes listan los hospedadores y localidades de cada una de las 7 especies del género reconocidas; éstas habitan principalmente el tracto digestivo. Las especies más conocidas son *Paravortex scrobiculariae* y *P. cardii* en Europa y *P. gemellipara* en la costa atlántica de Norte América. La mayor parte de las especies de *Paravortex* exhiben distribuciones Paleárticas, aunque esto parecería ser más un reflejo del conocimiento de las enfermedades de los bivalvos en dichas regiones que una característica intrínseca del género (BRUSA *et al.* 2006).

Entre los bivalvos sometidos a explotación pesquera que han sido hallados parasitados por *Paravortex* sp., se encuentran los mejillones *Mytilus edulis* y *M. galloprovincialis*, las almejas *Cerastoderma edule*,

FIGURA 9.
Corte histológico (H & E) de un turbelario en las branquias de *Ostrea puelchana* (Ostreidae) procedente de Patagonia, Argentina (fotografía tomada por Nuria Vázquez). Barra de escala: 20 µm.





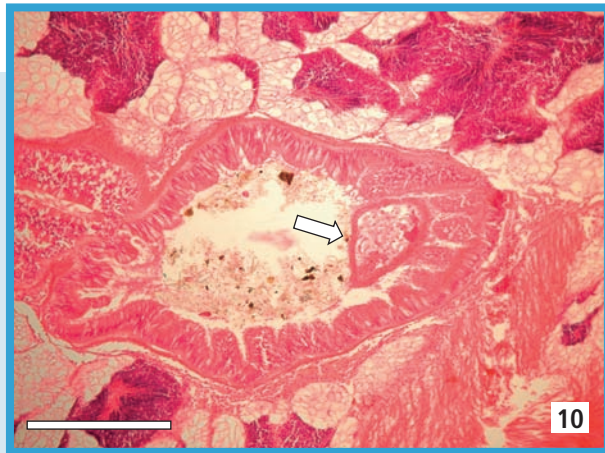
Ruditapes decussatus, *Mesodesma mactroides*, *Panopea abrupta*, *P. abbreviata*, y el pectínido *Pecten novaezelandiae* (BOWER y McGLADDERY 2003; BRUSA *et al.* 2006; CREMONTE Y FIGUERAS 2004; LAUCKNER 1983).

Existen muchos reportes de turbelarios no identificados asociados con bivalvos, debido a que se requiere de un especialista para realizar una correcta identificación a nivel específico. En este sentido, VILLALBA *et al.* (1997) reportan la presencia de un turbelario similar a *Paravortex* en el lumen intestinal de *M. galloprovincialis* procedente de Galicia, España, sin efectos patogénicos asociados. Datos aportados por WOODS y HAYDEN (1998) sugieren que *Paravortex* sp. en el tracto digestivo de *Pecten novaezelandiae* en Nueva Zelanda poseería hábitos carroñeros más que de tipo parasitario. Por otra parte, un turbelario no identificado ha sido hallado en branquias y palpos labiales del pectínido *Placopecten magellanicus* del Atlántico canadiense y ocasionalmente en estómago e intestino; las observaciones, basadas en cortes histológicos revelan prevalencias menores al 10% y 1-2 individuos por sección histológica (BOWER y McGLADDERY 2003). MARSHALL *et al.* (2003) hallaron turbelarios en el intestino de la almeja *Venerupis philippinarum* en la costa pacífica de Canadá sin observar efectos patológicos. En costas del Atlántico Sudoccidental, en el intestino de la almeja *Panopea abbreviata*, la falsa ostra *Pododesmus rudi*, *Aequipecten tehuelchus* y *M. edulis* procedente de bancos naturales y de cultivo respectivamente, se hallaron turbelarios rabdocelos que pertenecerían a distintas especies del género *Paravortex* (N. VÁZQUEZ, F. CREMONTE Y F. BRUSA, datos no publicados). En todos los casos se observaron altas prevalencias y una fuerte distribución agrupada. Asimismo, se destaca la especificidad de éstos por sus hospedadores, ya que los turbelarios en el intestino de la falsa ostra *P. rudi* son abundantes pero raramente infectan a la ostra puelche *Ostrea puelchana*, siendo que ambos bivalvos viven cementados entre sí (N. VÁZQUEZ, com. pers.).

En el epitelio del intestino de los individuos parasitados por turbelarios no se observan daños a nivel histológico (Fig. 10) (CREMONTE *et al.* 2005b). Sin embargo, en bivalvos con estrés físico o debilitamiento, la presencia en gran cantidad de estos parásitos puede ser deletérea para el hospedador por competencia del alimento. Se ha demostrado que algunas especies de *Paravortex* se alimentan de los nutrientes ya

FIGURA 10.

Corte histológico (H & E) del intestino de *Mesodesma mactroides* (Mesodesmatidae) procedente de Argentina, donde se observa un ejemplar de *Paravortex mesodesma* (Turbellaria) (flecha) sin daño aparente en el epitelio intestinal. Barra de escala: 100 μ m.



digeridos por el bivalvo (JENNINGS 1971). WOODS y HAYDEN (1998), reportaron que la presencia de estos turbelarios en la glándula digestiva de *Pecten novaezelandiae* reduciría la absorción de alimento digerido a través de un bloqueo mecánico.

El ciclo de vida completo no se conoce para ninguna de las especies de *Paravortex*, pero al ser vivíparas (JENNINGS 1971), la transmisión sería directa. En este sentido, para *P. gemmellipara* se halló que la densidad de bivalvos está correlacionada positivamente con la intensidad de infestación (WARDLE, 1980). Dado que los turbelarios del género *Paravortex* poseen ocelos bien desarrollados desde su «nacimiento» y un sistema locomotor eficiente formado por el epitelio ciliado, se infiere que es capaz de sobrevivir considerables períodos de tiempo fuera de su hospedador (JENNINGS 1971). El comportamiento de natación observado en individuos juveniles (e.g., en el caso de *P. gemmellipara* (WARDLE 1980) y N. VÁZQUEZ, F. CREMONTE Y F. BRUSA, datos no publicados en *Paravortex* sp. de *Panopea abbreviata*) proveería los medios de transmisión a nuevos hospedadores. El mecanismo exacto de transmisión necesita ser corroborado experimentalmente, así como la especificidad que exhiben por su hospedador. Se requieren futuros estudios para determinar si existen posibles efectos patogénicos cuando los turbelarios se hallan en altas prevalencias e intensidades en bivalvos bajo condiciones de estrés.



3.2. Céstodes larvales

Céstodes en estado larval han sido reportados en una gran variedad de invertebrados y también en peces en diversas partes del mundo; los adultos parasitan a elasmobranquios demersales (CAKE 1976; CAKE 1977; CAKE 1979; CHENG 1967a; LAUCKNER 1983). Los bivalvos como hospedadores intermediarios son poco conocidos; sin embargo, la literatura al respecto es cada vez más abundante, con más de 20 especies reportadas en el mundo (BOWER y McGLADDERY 2003; CAKE 1976; CAKE 1977; CAKE 1979; CARVAJAL 1976; CARVAJAL 1977; CARVAJAL *et al.* 1982; CARVAJAL y MELLADO 2007; CHENG 1967a; LAUCKNER 1983).

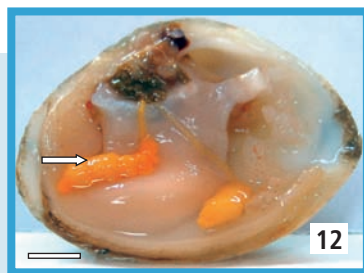
Al presente se han reportado representantes de cuatro órdenes de Eucestoda parasitando a bivalvos, Tetraphyllidea, Trypanorhyncha, Lecanicephalidea y Diphyllidea (CAKE 1976; CAKE 1977; CAKE 1979; LAUCKNER 1983). La mayor parte de los registros corresponden a los Tetraphyllidea (Figs. 11 a 16), aunque a menudo se los ha designado con la denominación de «*Scolex pleuronectis*» (CARVAJAL y MELLADO 2007; LAUCKNER 1983). La taxonomía de los eucestodes está basada en la morfología del escolex y del sistema reproductor de lo adultos (KHALIL 1994). Debido a que el escolex de las larvas experimenta cambios al alcanzar el estadio adulto y éstas no poseen sistema reproductor, no es posible identificarlas con más precisión que a nivel de familia o género (CAKE 1976; 1977; 1979; CARVAJAL y MELLADO 2007). Métodos de cultivo *in vitro* han permitido conocer la identidad a nivel específico de algunos Tetraphyllidea (e.g., CAMPBELL y CARVAJAL 1975; CARVAJAL *et al.* 1982).



FIGURA 11.

Ejemplar de *Mesodesma donacium* (Mesodesmatidae) procedente de Chile, parasitado por una larva merocercoides de *Rhodobothrium mesodesmatum* (Cestoda: Tetraphyllidea) (flecha); en la valva se observan dos poliquetos polidóridos (cabeza de flecha) (fotografía tomada por Juan Carvajal). Barra de escala: 1 cm.

FIGURA 12.
Ejemplar de *Mulinia* sp. (Mactridae) procedente de Chile, parasitado por dos larvas merocercoides de *Rhodobothrium* sp. (Cestoda: Tetraphyllidea) (flecha) (fotografía tomada por Juan Carvajal). Barra de escala: 1 cm.



Se conocen muy pocos ciclos de vida; sin embargo, hasta donde se sabe, los bivalvos actuarían como primer hospedador intermediario. De manera de evitar confusiones sobre el estadio larval reportado y su denominación, se suele utilizar el término metacestode para designar cualquier estadio comprendido entre el huevo y el adulto. La terminología aplicada a cada estadio larval (o metacestode) fue revisada recientemente por CHERVI (2002), quien define cada estadio sobre la base de los caracteres morfológicos que presentan.

Entre los bivalvos de importancia comercial que han sido hallados parasitados por metacestodes, se citan a las ostras *Ostrea edulis*, *Crassostrea* spp., *Saccostrea commercialis*, *Pinctada* spp., los pectínidos *Argopecten irradians*, *Aequipecten tehuelchus* y *Argopecten purpuratus* y las almejas *Mercenaria mercenaria*, *Tapes semidecussata*, *Mactra solida*, *Venerupis staminea*, *Mesodesma donacium* y *Protothaca antiqua* (CAKE 1976; 1977; 1979; CARVAJAL 1977; CARVAJAL y MELLADO 2007; CREMONTE *et al.* 2005b; HINE y THORNE 2000; LAUCKNER 1983; OLIVA *et al.* 2004; SPARKS y CHEW 1966; WOLF 1976).

Las larvas de cestodes que parasitan a bivalvos se han hallado en diversas partes del mundo; sin embargo, son más abundantes en aguas someras tropicales y subtropicales, donde los elasmobranquios hospedadores definitivos constituyen una importante proporción de la fauna de vertebrados (LAUCKNER 1983).

CAKE (1976; 1977; 1979) realizó una exhaustiva prospección de larvas de cestodes en moluscos así como una revisión bibliográfica de los hallazgos en el este del Golfo de México. Este autor brinda en detalle los registros realizados hasta el momento en dicha área, así como una clave para su identificación; registra representantes



de cuatro órdenes, siete familias y nueve géneros incluyendo a Trypanorhyncha (*Eutetrarhynchus* sp. y *Parachristianella* sp.); Lecanicepalidea (*Polypocephalus* sp. y *Tylocephalum* sp.), Tetraphyllidea (*Dioecotaenia* sp., *Rhinebothrium* sp., *Anthobothrium* sp., *Acanthobothrium* sp. y «*Scolex pleuronectis*») y Diphyllidea (*Echinobothrium* sp.) en bivalvos.

En el Golfo de México, el 76% de los pectínidos *A. irradians* fueron hallados infestados por metacestodes de *Polypocephalus* sp., con una intensidad media de 18 (entre uno y 75) (CAKE 1979). La mayoría de los metacestodes, plerocercoides en este caso, se hallaron encapsulados individualmente en el manto, en sacos translúcidos y delgados. El mismo pectínido se halló infectado además por otras 6 especies de metacestodes (CAKE 1979).

En la costa oeste de Norte América, SPARKS y CHEW (1966) reportaron numerosos metacestodes encapsulados en el pie y en el manto de la almeja *V. staminea* y las asignaron al género *Echeneibothrium* (Tetraphyllidea). Las almejas fueron halladas expuestas sobre la superficie y contenían más de 35 larvas por sección histológica. Cada cápsula rodeaba a una larva y estaba formada por una red compacta de fibras de colágeno y numerosos hemocitos (SPARKS y CHEW 1966). Sin embargo, CHENG y RIFKIN (1970), al efectuar una revisión sobre las reacciones celulares de los helmintos en moluscos, dudan del hecho que las fibras de dicha cápsula sean de colágeno.

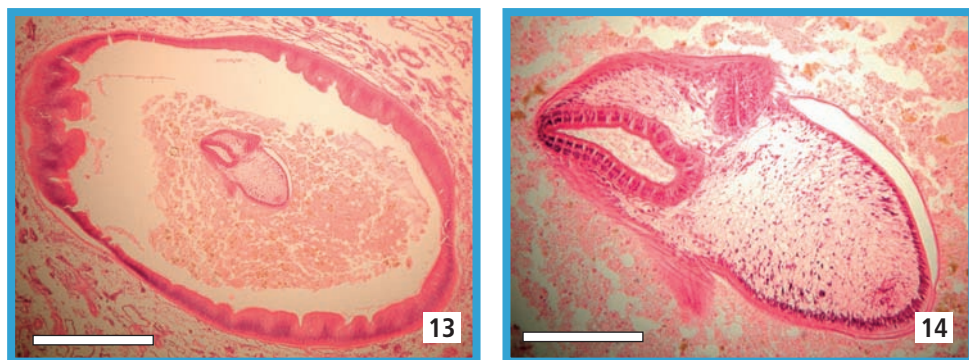
En la costa pacífica de Sudamérica, CARVAJAL (1976, 1977) y CARVAJAL *et al.* (1982) reportaron dos metacestodes tetrafilideos diferentes, parasitando uno la masa visceral (Fig. 11) y el otro el intestino de la almeja macha *Mesodesma donacium* (Mesodesmatidae). Este autor cultivó experimentalmente *in vitro* a las larvas hasta obtener los estadios adultos, *Rhodobothrium mesodesmatum* y *Caulobothrium myliobatidis* y, además, los halló en sus hospedadores definitivos (CAMPBELL y CARVAJAL 1975; CARVAJAL 1977; CARVAJAL *et al.* 1982).

En Australia, HINE y THORNE (2000) hallaron metacestodes de *Tylocephalum* sp. parasitando 10 de las 12 especies de bivalvos examinados, incluyendo ostreidos como *Saccostrea* spp. y ostras perlíferas *Pinctada* spp., con prevalencias de hasta el 54%. En algunos de los bivalvos estudiados, como *Malleus* spp. y *Pinna* spp., las larvas fueron

halladas principalmente en el tejido conectivo de la glándula digestiva y viables dentro de granulomas (HINE y THORNE 2000).

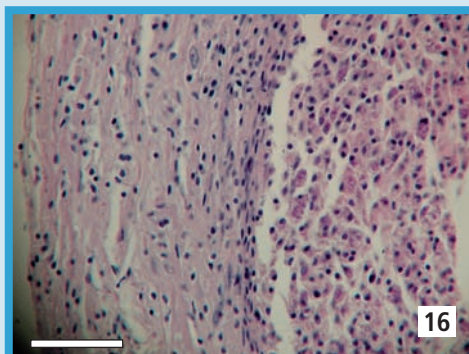
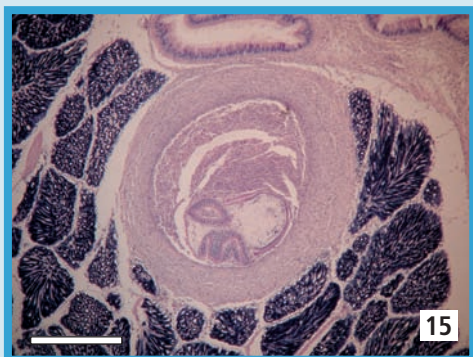
En la viera *Aequipecten tehuelchus* y en la almeja rayada *Protothaca antiqua* sometidas a explotación pesquera en la costa Atlántica de Sudamérica, CREMONTE *et al.* (2005b) hallaron larvas plerocercoides de tetrafilídeos. En *A. tehuelchus*, los metacestodes fueron hallados en el lumen intestinal sin aparente reacción del hospedador (Figs. 13 y 14). En el caso de *P. antiqua*, se observó una gruesa cápsula formada por dos capas; la interna constituida por hemocitos densamente agrupados y la externa, más gruesa, formada por células del tipo de fibroblastos dispuestas en forma concéntrica (Figs. 15 y 16). En ambos casos la prevalencia e intensidad de infestación resultaron bajas (CREMONTE *et al.* 2005b).

En la costa pacífica de Sudamérica, OLIVA *et al.* (2004) comunican la presencia a larvas de *Acanthobothrium* sp. y *Rhinebothrium* sp. libres (no encapsuladas) en la porción femenina de la gónada del pectínido *A. purpuratus*. Las prevalencias en los pectínidos procedentes de bancos naturales fueron altas, mientras que aquellos procedentes de cultivos suspendidos no se hallaron infectados. Estas diferencias de infestación se explican teniendo en cuenta los hábitos bentónicos



FIGURAS 13 Y 14.

Cortes histológicos (H & E) del intestino *Aequipecten tehuelchus* (Pectinidae) procedente de Patagonia, Argentina, parasitado por una larva de cestode tetrafilídeo. 13. Epitelio intestinal sin daño aparente. 14. Detalle de la larva donde se observa uno de los botridios musculares divididos por septos. Barras de escala: 600 y 200 μ m respectivamente.



FIGURAS 15 Y 16.

Cortes histológicos (H & E) del tejido conectivo de la gónada de *Protothaca antiqua* (Veneridae) procedente de Patagonia, Argentina, parasitado por una larva de cestode tetrafilideo. **15.** Vista general de la larva encapsulada. **16.** Detalle de la cápsula, la capa externa (izquierda) está formada por células tipo fibroblastos y la interna (derecha) por una densa agregación de hemocitos. Barras de escala: 200 y 50 μ m respectivamente.

de los elasmobranquios hospedadores definitivos, quiénes liberan los estadios infectivos (OLIVA *et al.* 2004).

Los órganos parasitados por los metacestodes en los bivalvos son diversos; se han hallado en la cavidad paleal, en el tejido conectivo del manto, en el lumen del intestino o en la masa visceral, con diferentes grados de reacción del hospedador (CAKE 1977; CREMONTE *et al.* 2005b; CHENG y RIFKIN 1970; LAUCKNER 1983; SPARKS y CHEW 1966). La mayoría de los trabajos sólo describen o reportan la presencia de los metacestodes; pocos estudian la patología ocasionada (LAUCKNER 1983). En el norte de Australia, WOLF (1976) reporta dos especies de ostras, *C. commercialis* y *C. echinata* parasitadas por *Tylocephalum* con la misma reacción de encapsulación descrita por CHENG y RIFKIN (1970). Asimismo, WOLF (1976) señala que las ostras altamente parasitadas presentan una condición acuosa. CAKE (1977) concluye que altas infecciones causan estrés fisiológico, el cual podría afectar el crecimiento y la reproducción. Hasta el presente, el estudio histológico más detallado sobre la reacción a las larvas de cestodes fue realizado por CHENG y RIFKIN (1970) sobre *Tylocephalum* en *C. virginica* y *Tapes semidecussata*. Estos autores reportan la larva infestante como al coracidio, quién



penetraría a través de la pared del intestino dando lugar al proceso de encapsulación. La encapsulación en este caso es de tipo fibroblástica; fue descrita en cuatro etapas sucesivas y culminaría con la reabsorción del parásito. Por otra parte, CAKE y MENZEL (1980) señalan que ninguna de las ostras *C. virginica* presentó una disminución significativa en su condición, a pesar de estar altamente parasitadas por metacestodes encapsulados.

No se conocen métodos de control. Aunque aún no ha sido demostrado, se cree que los bivalvos se infectarían al ingerir huevos, proglótides grávidas o coracidios, liberados a través del tracto intestinal del hospedador definitivo (CAKE 1976). Los bivalvos sometidos a cultivos suspendidos se hallan por lo general libres de estas infestaciones (e.g., HINE y THORNE; LAUCKNER 1983; OLIVA *et al.* 2004).

3.3. Trematodos digeneos

Sin duda alguna, los Digenea en estado larval son los principales parásitos metazoos de los bivalvos marinos, tanto en número como en los daños que son capaces de provocar. Prácticamente todos los bivalvos estudiados han sido hallados parasitados por digeneos larvales (BARTOLI 1984; CREMONTE 1999; LAUCKNER 1983). Existen pocas dudas acerca de que los digeneos fueron originalmente parásitos de los moluscos y que subsecuentemente adoptaron segundos hospedadores intermediarios y definitivos, por lo que existe un marcado vínculo originado por una larga historia co-evolutiva (GALAKTIONOV y DOBOVLSKIY 2003).

Los bivalvos pueden cumplir las funciones de primer o de segundo hospedador intermediario, o de ambos al mismo tiempo. En el caso que actúen como primeros hospedadores intermediarios, albergan los estadios que se reproducen asexualmente. En el caso de los bivalvos, se encuentran esporocistos, nunca redias, como ocurre en los gasterópodos (LAUCKNER 1983). El segundo hospedador intermediario alberga el estadio de metacercaria, usualmente enquistada. En un ciclo de vida típico, las cercarias que se originan en el interior de los esporocistos emergen de los bivalvos infectados e ingresan al mismo o a otro hospedador intermediario (un molusco o cualquier otro invertebrado o vertebrado). Asimismo, dependiendo de la especie de digeneo involucrada, las cercarias pueden 1) enquistarse dentro del esporocisto sin



emerger, 2) emerger y enquistarse en el sustrato donde son ingeridas por el hospedador definitivo o 3) ingresar directamente en el hospedador definitivo. Se denomina hospedador definitivo al vertebrado que alberga el estadio que se reproduce sexualmente (adulto).

En los casos en los que el bivalvo actúa como primer hospedador, la infestación suele acarrear la muerte biológica del mismo, debido a que los esporocistos reemplazan los tejidos del hospedador (principalmente la gónada) provocando su castración (Figs. 17 y 18). En el caso en que actúen como segundo hospedador intermediario, la patología ocasionada depende de las especies de hospedador y parásito involucradas y de la intensidad parasitaria, variando desde la ausencia de efectos patológicos hasta la muerte.

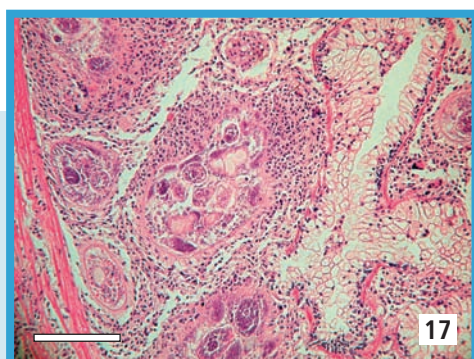


FIGURA 17.

Corte histológico (H & E) de *Pitar rostrata* (Veneridae) procedente de Uruguay parasitado por esporocistos de trematodes digeneos, en este caso se observa una infiltración de hemocitos. Barra de escala: 100 μ m.

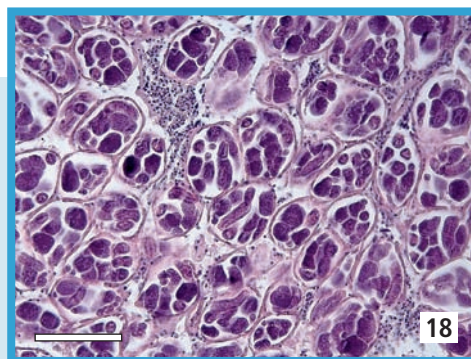


FIGURA 18.

Corte histológico (H & E) de *Ensis macha* (Pharidae) procedente de Patagonia, Argentina, donde se observa el reemplazo de los tejidos gonadales por esporocistos de trematodes digeneos con cercarias en distintos estadios de desarrollo. Barra de escala: 100 μ m.

LAUCKNER (1983) señaló que la principal razón por la que el «problema de los trematodes» ha sido ignorado es, probablemente, debido al hecho que estos parásitos causan una lenta pero constante remoción del número de bivalvos adultos, más que mortalidades epizóóticas espectaculares. Este mismo autor (LAUCKNER 1983), en su revisión sobre las enfermedades de los bivalvos, recopiló la información existente sobre los aspectos taxonómicos, ciclos de vida, dinámica poblacional y patologías ocasionadas de todos los digeneos que parasitan a bivalvos.

Las familias de digeneos registradas hasta el presente utilizando a los bivalvos como primeros hospedadores intermediarios son los Buccerphalidae, Sanguinicolidae, Monorchidae y Fellodistomidae, cuyos hospedadores definitivos son peces, y los Gymnophallidae con aves marinas como hospedadores definitivos (LAUCKNER 1983). Una excepción corresponde al digeneo *Proctoeces maculatus*, que es una especie de la familia Fellodistomidae, de distribución cosmopolita y utiliza un amplio espectro de bivalvos hospedadores, siendo capaz de completar su ciclo de vida en ellos.

Las patologías causadas por los esporocistos están bien documentadas. Los estadios dentro del molusco tienen lugar en el hemocel y ocupan principalmente la gónada y también la glándula digestiva. Debido a que estos estadios se reproducen asexualmente, los bivalvos se encuentran infectados con numerosos esporocistos, los cuales contienen cercarias en desarrollo en su interior (Figs. 17 y 18). Estos estadios pueden ocupar cerca de la mitad del volumen normal de la glándula digestiva y reemplazar la gónada por completo causando castración y debilitamiento (ROHDE 2005). La castración se ha atribuido a causas tanto mecánicas (necrosis de los tejidos del hospedador por la presión ejercida por los esporocistos), como químicas (los parásitos secretan sustancias que inhiben la espermatogénesis u oogeneis) (GALAKTIONOV y DOBOVOLSKI 2003). En infecciones severas, los esporocistos se infiltran en prácticamente todos los tejidos del bivalvo, reduciendo considerablemente la resistencia a condiciones de estrés, pudiendo afectar a los bivalvos de varias maneras. Típicamente, los moluscos permanecen infectados de por vida.

La importancia de la infestación de los bivalvos a nivel poblacional depende de su prevalencia. Esta varía en gran medida con las especies



involucradas, el tipo de ambiente y la estación del año, desde más del 50% hasta menos de un 1%, siendo, en general, bajas. La abundancia de los hospedadores definitivos en la zona constituye, asimismo, un factor determinante para la transmisión del patógeno (GALAKTIONOV y DOBOVOLSKIY 2003; ROHDE 2005). La prevalencia de infestación de los bivalvos suele incrementarse con la edad. Este incremento es el esperado por efecto del azar, ya que a mayor tiempo transcurrido, mayor probabilidad de que los individuos se infecten. Esta explicación es aplicada también al efecto del tamaño (generalmente a mayor edad mayor tamaño) al que se le suma una mayor capacidad de filtración de los individuos más grandes, que tienen entonces mayor probabilidad de que el estadio infectivo (miracidio) ingrese (LAUCKNER 1983; CREMONTE 1999; GALAKTIONOV y DOBOVOLSKIY 2003).

La infestación por esporocistos puede interferir con el estado de condición del molusco (e.g., habilidad de enterramiento), siendo entonces éste más susceptible a la depredación o a la muerte por estrés fisiológico. Por ejemplo, en las costas del Reino Unido, se observó que los berberechos *Cerastoderma edule* arribados a la playa, presentaban una prevalencia de infestación insólitamente alta del bucefálico *Labratema minimus*. Se asume que los bivalvos se hallaban debilitados por las infecciones y por esto resultaron más susceptibles a las condiciones ambientales adversas (BOWERS 1969). La misma explicación fue propuesta por CREMONTE *et al.* (2001) para el caso de las almejas *Amiantis purpurata* que normalmente habitan el submareal en la costa Atlántica de Sudamérica. Ejemplares de estas almejas fueron hallados expuestos sobre la superficie en el intermareal con 100% de parasitismo por un monorquído. De la misma manera, en las costas del Mar Mediterráneo, las almejas *Tapes* spp., parasitadas por felodistómidos presentaban una consistencia flácida debido al consumo de las reservas del bivalvo por parte del parásito, hallándoselas, además, expuestas sobre el sedimento en lugar de enterradas (LAUCKNER 1983; PALOMBI 1934). Es bien conocido que los moluscos infectados con larvas de trematodes que se reproducen asexualmente exhiben un incremento en la actividad de la fosfatasa, la cual está directamente correlacionada con la utilización del glucógeno por parte del parásito (LAUCKNER 1983).

En general, en las invasiones por esporocistos no se observan reacciones celulares, lo cual sugiere ausencia de respuesta inmune a la presencia de estos estadios larvales (CHENG y RIFKIN 1970; PERKINS 1993). DA SILVA *et al.* (2002) hallaron que el número total de hemocitos de los mejillones *Perna perna* procedentes de cultivos en Brasil, era menor en los individuos infectados que en los no parasitados. Sin embargo, la concentración total de proteínas plasmáticas no varió entre ambos grupos. Otro efecto patológico que ha sido reportado además de la castración, es una aceleración en el crecimiento de los moluscos infectados, referido a menudo con el término «gigantismo» (LAUCKNER 1983).

Las familias de digeneos registradas hasta el presente utilizando a los bivalvos como segundos hospedadores son los Monorchidae, Lepocreadiidae, Zoogonidae y Fellodistomidae, cuyos hospedadores definitivos son peces, los Gymnophallidae, Echinostomatidae, Psilostomatidae y Rencolidae, con aves marinas como hospedadores definitivos (LAUCKNER 1983).

Cuando los bivalvos actúan como segundos hospedadores intermedios al albergar el estadio de metacercaria, las parasitosis producen efectos difíciles de apreciar en los casos en que las intensidades son bajas. Sin embargo, cuando la intensidad del parasitismo es elevada, se aprecian desórdenes en los tejidos debido a la reacción del bivalvo frente a la agresión. Las metacercarias pueden habitar cualquiera de los órganos del bivalvo y son capaces de erigir una gran variedad de respuestas fisiológicas, bioquímicas, morfológicas y comportamentales en sus respectivos hospedadores (Figs. 19 a 28) (BARTOLI 1974; CREMONTE *et al.* 2005a; LAUCKNER 1983).

Entre los efectos patológicos, se han registrado debilitamiento general, deformidad de valvas (incluyendo anomalías en el cierre de las mismas), erosión química de las valvas, formación de crestas y blisters en la superficie interna de las valvas, producción de perlas o simil-perlas, hipertrofia o atrofia de los tejidos parasitados, alteraciones del comportamiento que favorecen la depredación por parte de los hospedadores definitivos, incremento en el consumo de oxígeno y tasa metabólica, disminución en la tolerancia al estrés ambiental, autotomía de sifones y, en casos de infecciones severas, la muerte del bivalvo (LAUCKNER 1983).

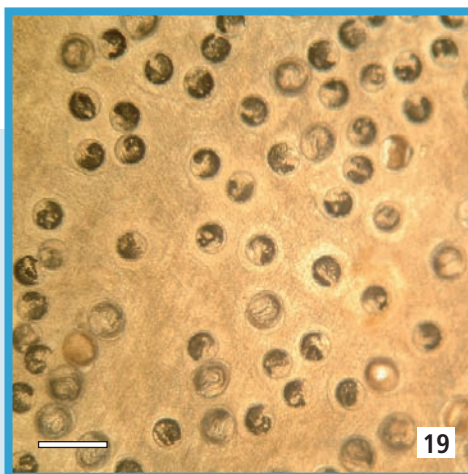


Aquellas metacercarias que producen efectos más conspicuos tanto a nivel individual como poblacional en bivalvos sometidos a explotación, son las pertenecientes a las familias Echinostomatidae y Gymnophallidae. Los equinostomátidos se encuentran enquistados en varios tejidos, mientras que los gimnofálidos se alojan sin enquistar en la cavidad extrapaleal (entre el manto y la valva), erigiendo muy variadas respuestas que comprometen al manto y a la valva.

Uno de los géneros de Echinostomatidae mas abundantes es *Himasthla*, tanto por el número de especies que comprende como por su ubicuidad en los ambientes marinos costeros. Las metacercarias de *Himasthla* spp. exhiben una especificidad muy laxa por su bivalvo hospedador; sin embargo tienen preferencia por el órgano que infectan. En este sentido, si bien *Cerastoderma edule* y *M. edulis* son los segundos hospedadores intermediarios favoritos de *H. elongata* en el Mar del Norte, su cercarias también invaden otros bivalvos (LAUCKNER 1983). Estas metacercarias ocupan en *C. edule* la porción distal de la musculatura pedal; la respuesta incluye acumulación de hemocitos y tejido fibroso alrededor del quiste causando distorsión de células y ductos, hipertrofiando el órgano afectado. *H. elongata* interfiere gravemente con la actividad de enterramiento por un efecto mecánico. La habilidad de enterrarse rápidamente y la permanencia en posición adecuada en el sedimento son consideradas de vital importancia para la vida de los bivalvos en los ambientes intermareales, donde son a menudo barridos fuera del sedimento y arrastrados lejos por las corrientes. Asimismo, son más fácilmente detectados y depredados por las aves marinas (LAUCKNER 1983; MONTAUDOUIN *et al.* 1998). En *M. edulis*, la infestación con *H. elongata* impide la secreción del biso, por lo que los mejillones más parasitados son más fácilmente desprendidos por la acción del oleaje o de los depredadores. De la misma manera, el normal enterramiento del berberecho *Austrovenus stutchburyi* en Nueva Zelanda, se ha observado alterado por el efecto mecánico que producen las metacercarias del equinostomátido *Curtuteria australis* en el pie (Fig. 19) (MOURITSEN 2004; MOURITSEN 2002). La distribución geográfica y la abundancia de estos parásitos han sido correlacionadas con la abundancia del gasterópodo que actúa como primer hospedador intermediario. Asimismo, se ha registrado que las inten-

FIGURA 19.

Frotis del pie de *Austrovenus stutchburyi* (Veneridae) procedente de Nueva Zelanda donde se observan metacercarias de dos especies de la familia Echinostomatidae, *Curtuteria australis* (levemente más grandes y refringentes) y *Acanthoparyphium* sp. (más numerosas, pequeñas y oscuras) (fotografía tomada por Tommy L. F. Leung). Barra de escala: 300 µm.



sidades de infestación son menores en mejillones de costas rocosas y berberechos de planicies de mareas amplias y muy expuestas, que en bivalvos procedentes de áreas más protegidas. La transmisión de las cercarias es generalmente más exitosa en ambientes cerrados y de baja energía (LAUCKNER 1983).

Sin embargo, son los Gymnophallidae los principales digeneos parásitos de los bivalvos, tanto por el número de especies como por su ubicuidad; además, los utilizan casi exclusivamente como hospedadores, con los que exhiben relaciones muy estrechas. Sus efectos dependen de las especies de parásito y de hospedador involucrados y del hábitat ocupado; en general, alteran de manera muy conspicua la superficie interna de la valva (Figs. 20 a 26). Los daños causados incluyen acumulación de material calcáreo en forma de concreciones, presencia de coloración anormal, blisters y crestas, estructuras de tipo igloo, perlas o simil- perlas, múltiples hoyos en la cara interna de la valva, alteraciones del comportamiento y anomalías en la inserción del borde del manto (con las consecuentes deformidades en las valvas y/o en la posición de los sifones que altera la posición de vida) (Figs. 20 a 26) (BARTOLI 1974; CREMONTE e ITUARTE 2003; ITUARTE *et al.* en prensa; ITUARTE *et al.* 2005; ITUARTE *et al.* 2001; LAUCKNER 1983).

Entre las alteraciones de las valvas, la almeja navaja *Tagelus plebeius* de la costa Argentina, presenta en la superficie interna de las mismas,

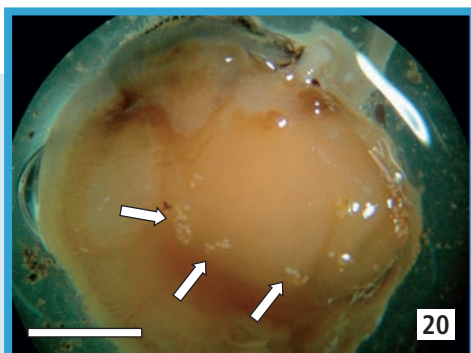


FIGURA 20.

Ejemplar sin valva de *Austrovenus stutchburyi* (Veneridae) procedente de Nueva Zelanda donde se observan cúmulos de metacercarias Gymnophallidae en la cavidad extrapaleal (flechas) (fotografía tomada por Tommy L. F. Leung). Barra de escala: 1 cm.

FIGURA 21.

Metacercaria de *Gymnophallus australis* (Gymnophallidae) hallada en la cavidad extrapaleal de *Mytilus edulis* (Mytilidae) procedente de Patagonia, Argentina. Obsérvense la capa acelular, translúcida y gelatinosa que la rodea, cuyo origen se supone del hospedador, las dos ventosas y los gránulos de excreción refringentes. Barra de escala: 50 μ m.

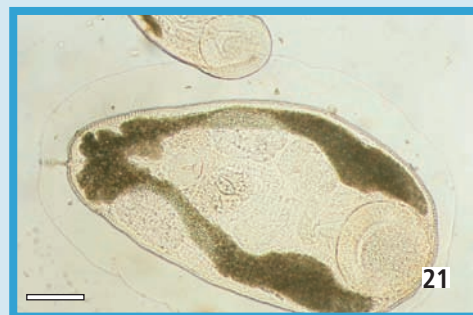


FIGURA 22.

Superficie interna de la valva de *Mytilus edulis* (Mytilidae) de Patagonia, Argentina donde se observan anomalías calcáreas provocadas por la presencia de metacercarias *G. australis* (Gymnophallidae). Barra de escala: 1 cm.

una fuerte coloración anaranjada en el sitio donde se encuentran los parásitos (Figs. 23 a 25) (ITUARTE *et al.* 2009; VÁZQUEZ *et al.* 2006). En las costas de Europa, una coloración amarillenta fue registrada en almejas *Tellina* spp. por GIARD (1897) y material amarronado en *Ruditapes aureus* por BARTOLI (1974), ambas infectadas por metacercarias de la familia Gymnophallidae. El origen de los pigmentos podría corres-

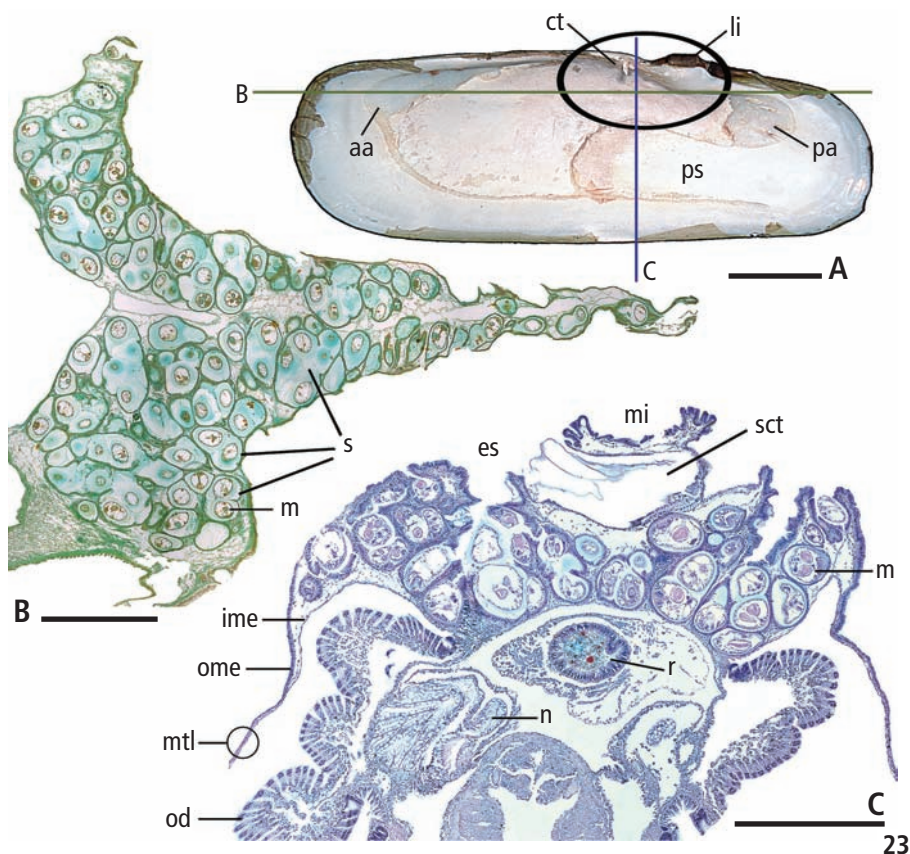


FIGURA 23.

Características generales de la infestación de *Tagelus plebeius* (Psammobiidae) procedente de Argentina parasitada por metacercarias de *Parvatrema* sp. (Gymnophallidae).

A. Superficie interna de la valva mostrando el sitio típico de infestación (área dentro del óvalo) y los niveles de la sección que figuran en B (línea verde) y C (línea azul). **B.** Sección frontal de la masa visceral dorsal mostrando la extensión de la infestación (trícromo de Gomori). **C.** Sección transversal (azul de Toluidina). Barras de escala: 1 cm, 1 mm y 250 μm respectivamente. Referencias: (aa, músculo aductor anterior; ct, dientes cardinales; es, espacio extrapaleal; ime, epitelio del manto interno; li, ligamento; m, metacercaria; mtl, manto; mi, istmo del manto; n, nefridio; od, demibranchia externa; ome, epitelio del manto externo; pa, músculo aductor posterior; ps, seno paleal; r, recto; s, sacos conteniendo metacercarias; sct, espacio correspondiente a los dientes cardinales (fotografías tomadas por Cristián Ituarte).

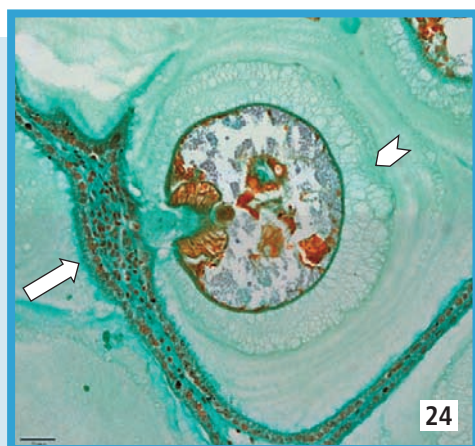


FIGURA 24.

Sección sagital (tricrómico de Gomori) de una metacercaria de *Parvatrema* sp. (Gymnophallidae) parasitando a *Tagelus plebeius* (Psammobiidae) procedente de Argentina donde se observa un estado avanzado de secreción alveolar (cabeza de flecha), la diferencia en la altura del epitelio frente a la ventosa oral (flecha) y el material secretado por el manto que es ingerido por la larva (fotografía tomada por Cristián Ituarte). Barra de escala: 200 μ m.



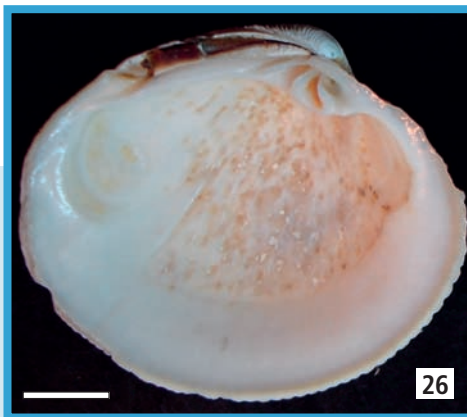
FIGURA 25.

Superficie interna de la valva de *Tagelus plebeius* (Psammobiidae) procedente de Argentina donde se observan la coloración anaranjada y las alteraciones calcáreas provocadas por la presencia de metacercarias de *Parvatrema* sp. (Gymnophallidae). Barra de escala: 1 cm.

ponder, o bien a procesos degenerativos que afectan a los parásitos de más edad o a desechos metabólicos del parásito. Asimismo, LOMOVASKY *et al.* (2005) registraron, en *T. plebeius* de la costa oeste de América, un incremento de la masa valvar de hasta un 100% causado por altas intensidades de infestación de metacercarias Gymnophallidae, con la consecuente disminución en la condición de este bivalvo.

Entre las alteraciones de comportamiento, los bivalvos *Cerastoderma glaucum* y *Venerupis aurea* de las costas de Europa que están parasitados por metacercarias Gymnophallidae, exhiben una conspicua

FIGURA 26. Superficie interna de la valva de *Protothaca antiqua* (Veneridae) procedente de Patagonia, Argentina, donde se observan los «pits» o cavidades provocados por la presencia de metacercarias *Gymnophallidae*. Barra de escala: 1 cm.



alteración en el borde de las valvas. Las metacercarias, que habitan el borde del manto, alteran su inserción y por lo tanto su crecimiento, impidiendo que las valvas se cierren de manera normal, cambiando la posición de vida en el sustrato (BARTOLI 1973; 1978; BOWERS *et al.* 1996).

Las metacercarias *Gymnophallidae* se conocen desde hace mucho tiempo como «trematodes perla». Han sido reportados repetidamente en *Mytilus edulis* del Atlántico en Europa y América (CREMONTE 1999; CREMONTE *et al.* 2008; DUBOIS 1901; JAMESON 1902; STUNKARD y UZMANN 1958). Un caso extremo de interferencia de larvas de digeneos con la pesquería de mariscos, ha sido mencionado por DUBOIS (1901), donde *M. edulis* fue hallado tan altamente invadido por gimnofálicos productores de perlas que los mejillones no eran aptos para el consumo humano.

Las metacercarias *Gymnophallidae* suelen ocurrir en mayor número y con mayores prevalencias que aquellas de otras familias. La prevalencia e intensidad de estas larvas suelen estar correlacionadas con la edad (y talla) del bivalvo (BARTOLI 1974; CREMONTE 1999; LAUCKNER 1983). Se ha sugerido que las altas intensidades de metacercarias gimnofálicos son probablemente la causa de mortalidad de los individuos de mayor edad, debido a que la mayor clase de talla de la población suele hallarse menos parasitada que la clase anterior; los individuos más grandes y más parasitados serían removidos de la población (CREMONTE 1999).

Algunas metacercarias de las familias Echinostomatidae y *Gymnophallidae* revisten importancia sanitaria por ser parásitos potenciales

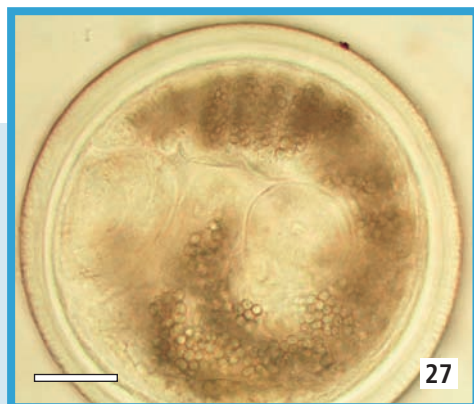


FIGURA 27.

Metacercaria Renicolidae enquistada sobre la glándula digestiva de *Mytilus edulis* (Mytilidae) procedente de Patagonia, Argentina. Obsérvense la gruesa pared del quiste, las dos ventosas y los gránulos de excreción refringentes. Barra de escala: 50 µm.

del hombre (LAUCKNER 1983). En Corea existe una zoonosis endémica causada por el consumo de la ostra *Crassostrea gigas* cruda parasitada por una metacercaria Gymnophallidae (LEE *et al.* 1993; LEE *et al.* 1996).

No se conocen métodos de control para los esporocistos o metacercarias de los digeneos. Sin embargo, aquellos bivalvos cultivados en las cercanías de peces o que resulten accesibles a las aves que actúen como hospedadores definitivos estarán más parasitados.

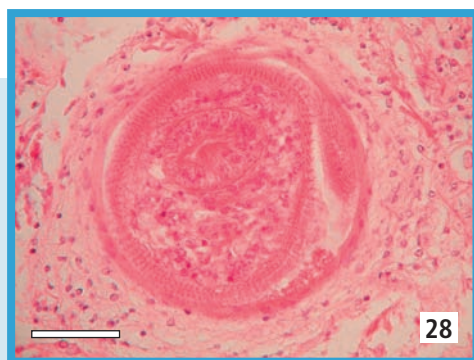


FIGURA 28.

Corte histológico (H & E) de *Pitar rostrata* (Veneridae) procedente de Uruguay. Metacercaria de trematode digenico enquistada en el manto; se observa la superficie del cuerpo fuertemente espinosa y una ligera infiltración de hemocitos rodeando al quiste. Barra de escala: 500 µm.

3.4. Nematodos larvales

Los Nematoda constituyen uno de los grupos más diversos y exitosos del reino animal; sin embargo, no son parásitos frecuentes de



los bivalvos marinos. Unas pocas especies de Ascaridoidea y Spirurida utilizan a estos organismos como hospedadores intermediarios (e.g., CHENG 1967b; CHENG 1975; Ko 1976; Ko *et al.* 1975; LAUCKNER 1983). Según CHENG (1967 a, b), existen pocos registros de nematodos parasitando moluscos debido a la dificultad para identificarlos al estado larval, y la mayor parte de éstos son en bivalvos de importancia comercial. La patología ocasionada en los bivalvos suele ser moderada (CHENG 1973b; Ko *et al.* 1975; PAYNE 1980); sin embargo, algunas especies son potencialmente peligrosas para la salud humana (Ko 1976; NORRIS 1976).

Dentro de los Ascaridoidea, la única especie registrada parasitando a bivalvos pertenece a la familia Anisakidae. *Sulcascaris sulcata* es, además, la única especie del género y fue hallada en varios moluscos, incluyendo la ostra perlífera *Pinctada margaritifera*, los ostreidos *Creassostrea virginica*, *Crassostrea gigas*, los pectínidos *Amusium balloti*, *Chlamys* sp., *Argopecten gibbus*, *A. irradians* y la almeja *Spisula solidissima* (LAUCKNER 1983; LICHTENFELS *et al.* 1978; LICHTENFELS *et al.* 1980).

Sulcascaris sulcata se halla distribuida en aguas cálidas. Su ciclo de vida fue desarrollado en forma experimental por CANNON (1981 en LAUCKNER 1983); los huevos se hunden y adhieren al sustrato, ocurren dos mudas antes de que eclosione la larva 3 que infecta al molusco. Los adultos parasitan el estómago de las tortugas *Caretta caretta* y *Chelonia mydas*, las cuales se infectan al depredar sobre los bivalvos (ANDERSON 2000).

Las prevalencias de *S. sulcata* varían considerablemente con la localidad y el hospedador; la intensidad de infestación suele ser baja. La distribución de las larvas en la población de hospedadores, al igual que para la mayor parte de los helmintos, es de tipo agregada (LAUCKNER 1983). No se han hallado fluctuaciones estacionales en las cargas parasitarias, indicando que hay acumulación de parásitos en los bivalvos (LAUCKNER 1983). Los ejemplares de la almeja *Spisula solidissima* (Macridae) procedentes de latitudes altas en la costa Atlántica de América del Norte, estuvieron menos parasitados que aquellos que habitan a bajas latitudes, correspondiéndose con la distribución geográfica de su hospedador definitivo (LAUCKNER 1983).



En los pectínidos, *S. sulcata* ocurre normalmente en el músculo aductor, donde se produce una infiltración celular que sería responsable de la coloración que se observa; la presencia de una o más larvas causa una disminución de la tonicidad del músculo (CHENG 1973a; LAUCKNER 1983). Sin embargo, también la coloración amarronada de las larvas, y por consiguiente de parte del músculo aductor infectado, ha sido atribuida a la presencia de un hiperparásito protista, *Urosporidium spissuli* en el nematodo (LAUCKNER 1983). En *Argopecten gibbus* de la costa este de América del Norte, *S. sulcata* ocurre en las gónadas; las prevalencias fueron cercanas al 35% y más altas en los ejemplares de mayor tamaño (LAUCKNER 1983).

En el oeste de Australia, JONES and CREEPER (2006) registraron hasta un 64% de parasitismo en el pectínido *Amusium balloti*. En estos casos, las larvas ocurrieron en cápsulas amarronadas de 3 a 7 mm de diámetro.

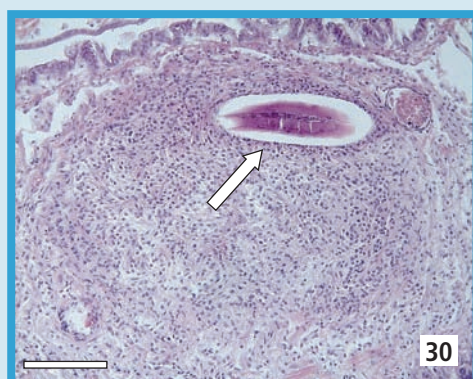
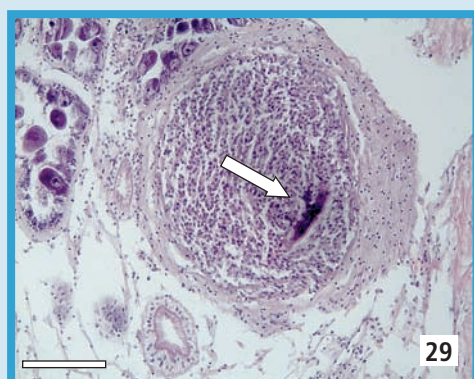
Dentro de los Spirurida, el gnatostómido *Echinocephalus* sp. (Gnathostomoidea: Gnathostomidae) ha sido hallado en ostras perlíferas, ostreidos *Crassostrea gigas*, pectínidos *Amusium balloti* y abalones (CÁCERES-MARTÍNEZ 2001; CHENG 1975; LAUCKNER 1983; MILLEMANN 1963). Sus adultos parasitan a elasmobranquios que se alimentan de los bivalvos infectados en aguas tropicales y subtropicales (HOBERG *et al.* 1998; Ko 1976; Ko *et al.* 1975; LAUCKNER 1983; MILLEMANN 1963).

Los sitios de infestación de los nematodos larvales han mostrado ser muy variables en los bivalvos. *Echinocephalus uncinatus* fue hallado en el músculo aductor de la ostra perlífera *Margaritifera vulgaris*, *E. crassostreae* en los gonoductos de *C. gigas* y *E. pseudouncinatus* en el pie del abalone *Haliotis corrugata* (CHENG 1975; MILLEMANN 1963).

La patogenicidad de las larvas de los nematodos varía desde la ausencia de reacción hasta una fuerte respuesta tisular (CHENG y RIFKIN 1970; Ko *et al.* 1975). Larvas del segundo y tercer estadio de *Echinocephalus crassostreae* ocurren en *C. gigas* procedente de cultivos en la costa de Hong Kong y las costas adyacentes de China (CHENG 1975). *E. crassostreae* provoca una reacción de los elementos de la túnica que rodean el gonoducto donde se halla la larva (CHENG 1975). Si este nematodo es ingerido por humanos puede causar lesiones gástricas granulomatosas (BOWER y MCGLADDERY 2003; Ko 1976).



Existe un tercer grupo de nematodos parasitando bivalvos que aún no ha sido identificado más allá del nivel de orden. En este sentido, las larvas halladas en la almeja navaja *Tagelus plebeius* en la costa Atlántica de América del Sur, fueron identificadas como pertenecientes al orden Spirurida por poseer 2 pseudolabios y el esófago dividido en porciones muscular y glandular (VÁZQUEZ *et al.* 2006). Sin embargo, no son gnatostómidos porque carecen de pseudolabios trilobados y del bulbo en la extremidad anterior, característicos de este grupo (CHAUBAUD 1975). Los altos valores de prevalencia hallados (90%), sugieren que *T. plebeius* actuaría como hospedador intermediario o paraténico (i.e., en este último caso el parásito no cambia de estadio pero permanece infectivo, cumpliendo un rol fundamental en el ciclo de vida), al albergar larvas del tercer estadio (VÁZQUEZ *et al.* 2006). Cabe destacar que los valores de prevalencia e intensidad están subestimados cuando se calculan a partir de secciones histológicas y no mediante disecciones de rutina. Incluso mediante las disecciones de rutina estos índices pueden estar subestimados, debido que las larvas son incoloras y de pequeño tamaño (VÁZQUEZ *et al.* 2006). La larva de nematodo descrita en *T. plebeius* no es específica respecto de su sitio de infestación, ocurriendo en el 48% de los casos en la pared muscular de la masa visceral y el resto en palpos labiales, músculos retractores del sifón, aductores y músculo del borde del manto (VÁZQUEZ *et al.* 2006). Se han observado, asimismo, diferentes grados de reacción tisular que podrían corresponder o bien a la reacción de los diferentes tejidos infectados o al tiempo de infestación (Figs. 29 a 31). Futuros estudios que involucren infecciones experimentales dilucidarán sobre las causas de los distintos tipos de respuesta observados. La reacción del hospedador a nivel histológico consiste en una cápsula formada por una densa agregación de hemocitos (denominada hemocitosis según CHENG y RIFKIN (1970) (Figs. 29 a 31). Macroscópicamente, en ejemplares frescos, se visualiza como una cápsula de color amarronado de 1 a 3 mm de diámetro, donde la larva permanece viable (VÁZQUEZ *et al.* 2006). A pesar del alto número de casos estudiados, nunca fueron observadas cápsulas formadas por fibras, tal como fueron descriptos por HARRIS (1975) para el caso del nematodo *Angiostrongylus cantonensis* (Metastrongylidae) en *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda: Basommatophora).



FIGURAS 29 A 31.

Cortes histológicos (H & E) de *Tagelus plebeius* (Psammobiidae) procedentes de Argentina.

29. Obsérvense la cápsula formada por hemocitos en tejido conectivo y una sección del nematode (flecha). 30. Mayor detalle de la cápsula y una sección sagital del nematode (flecha). 31. Cuatro secciones transversales (flecha) de una larva nematode en tejido conectivo donde se observa una un estado inicial de desarrollo de la cápsula. Barras de escala: 100, 50 y 100 μm respectivamente.

Otra larva no identificada fue hallada parasitando *Donax serra* (Donacidae) en la costa oeste del sur de África; los autores no brindan una descripción del nematodo ni de la patología ocasionada (THARME *et al.* 1996). Asimismo, también en el Golfo de México, un nematodo larval no identificado fue registrado en *Crassostrea virginica* (BOWER y MCGLADDERY 2003).

No se conocen métodos de control. Sin embargo, se debe tener en cuenta la proximidad de hospedadores definitivos infectados (tortugas en el caso de *S. sulcata* y elasmobranquios en el de *Echinocephalus* sp.) en los cultivos de bivalvos, a fin de evitar la infestación o disminuir su abundancia.



4. OTROS ORGANISMOS PARÁSITOS O HABITANTES DE LA CAVIDAD DEL MANTO

4.1. Moluscos gasterópodos

Los Gastropoda de la familia Pyramidellidae comprenden un grupo muy diverso de heterobranquios de pequeño tamaño que viven como ectoparásitos principalmente en gasterópodos, bivalvos y poliquetos (LAUCKNER 1983).

La familia incluye más de 6000 especies agrupadas en aproximadamente 350 géneros (SCHANDER *et al.* 2003). Las valvas son de tipo turriteliformes o cónicas, y miden entre 0,5 mm y 3,5 cm de longitud, aunque la mayoría de las especies son menores a 13 mm (SCHANDER *et al.* 2003). Todas las especies estudiadas se alimentan de los fluidos corporales de sus hospedadores por medio de una larga proboscis, ya que no poseen rádula. Los gasterópodos se ubican generalmente en el borde del manto; la penetración en el tegumento del hospedador está facilitada por un estilete protusible (LAUCKNER 1983).

La familia Pyramidellidae es cosmopolita. Entre los bivalvos de importancia comercial afectados se hallan los ostreidos *Ostrea edulis* y *Crassostrea virginica*, el mejillón *Mytilus edulis*, el pectínido *Argopecten irradians* y las almejas *Cerastoderma* spp. y *Tridacna gigas* (LAUCKNER 1983; LESTER 1989).

El grado de especificidad que exhiben los Pyramidellidae aún está en discusión y parece variar entre especies. Por ejemplo, ROBERTSON y MAU-LASTOVICKA (1979) estudiaron dos especies que viven en simpatria y determinaron que ocupan distintos hábitats y poseen diferencias en cuanto a sus preferencias por el hospedador. Así, *Boonea seminuda* se alimenta preferentemente de *A. irradians* y *B. impressa* de *C. virginica* (ROBERTSON y MAU-LASTOVICKA 1979). Estos gasterópodos ectoparásitos son hermafroditas y ponen sus huevos en masas gelatinosas sobre la valva de sus hospedadores (ROBERTSON y MAU-LASTOVICKA 1979).

Ejemplares de *O. edulis* procedentes de Inglaterra, han sido hallados altamente parasitados por *Odostomia eulimoides*. Los gasterópodos se hallaban ubicados de a pares en pequeños pliegues justo dentro del margen ventral de las valvas. En estos pliegues o bolsillos, formados en respuesta a la presencia de los parásitos, se hallaron asimismo puestas



de los gasterópodos. En este mismo bivalvo procedente de la misma localidad, se ha registrado un efecto acumulativo, donde las ostras de más edad exhiben serias deformaciones valvares (LAUCKNER 1983). Deformaciones similares han sido también registradas en *M. edulis* en áreas cercanas (LAUCKNER 1983).

Se ha observado que las almejas gigantes *Tridacna gigas*, sometidas a cultivo en Australia, se hallan infectadas con altas intensidades de Pyramidaellidae que matan a los juveniles (LESTER 1989). Asimismo, se ha señalado que estos moluscos reducen la tasa de crecimiento de *C. virginica* y pueden transmitir al protozooario *Perkinsus marinus* de un individuo a otro (WHITE *et al.* 1987).

4.2. Copépodos

Los copépodos son crustáceos acuáticos típicamente pequeños e inconspicuos, aunque extremadamente abundantes. Aproximadamente la mitad de las especies descritas poseen asociaciones simbióticas con otros organismos, probablemente de tipo parásita. Sin embargo, la naturaleza de tal asociación aún no está dilucidada para la gran mayoría de las especies (ROHDE 2005).

Los bivalvos marinos poseen más copépodos parásitos que cualquier otro grupo de invertebrados, habiéndose descrito más de 430 especies (HUMES 1994; LAUCKNER 1983). La mayor parte de ellas pertenecen al Orden Poecilostomatoida y unos pocos son Harpacticoida (familia Tisbidae, e.g., *Tisbe celata* (HUMES 1954)). Dentro de los Poecilostomatoida, las familias registradas en bivalvos son los Mycolidae (e.g., *Myicola* spp., *Ostricola* spp., *Pseudomyicola* spp.), Clausidiidae (e.g., *Conchyliurus* spp.), Anthessidae (e.g., *Anthessius* spp.), Lichomolgidae (e.g., *Lichomolgus* spp., *Philoconcha* spp., *Modiolicola* spp., *Herrmannella* spp.) y Mytilicolidae (*Mytilicola* spp. y *Pectenophilus* sp.) (HUMES 1994; HUYS *et al.* 2006; KIM 2004). Cabe destacar que los Poecilostomatoida están actualmente incluidos en los Cyclopoida (BOXSHALL Y HALSEY 2004 en HUYS *et al.* 2007).

La mayor parte de los copépodos asociados a bivalvos poseen el cuerpo ligeramente modificado para parasitar las branquias. Sin embargo, algunos de ellos, como las especies del género *Mytilicola*, poseen cuerpos elongados y la segmentación y los apéndices del cuerpo

se hallan reducidos, adaptados para habitar el intestino de los bivalvos (Figs. 32 y 33) (Ho 1980; ROHDE 2005; YAMAGUTI 1936). El máximo grado de modificación se ha observado en *Pectenophilus ornatus*, parásito de las branquias de los pectínidos *Patinopecten yessoensis* y *Chlamys farreri nipponensis* en Japón (NAGASAWA *et al.* 1988). Este enigmático copépodo fue en un principio confundido con un rizocéfalo (crustáceo cirripedio altamente modificado que parasita braquiuros) ya que su morfología se le asemeja. Análisis moleculares recientes lo ubican dentro de los Mytilicolidae (Huys *et al.* 2006).

Los bivalvos de importancia comercial que han sido hallados parasitados por copépodos abarcan las ostras *Ostrea* spp., *Crassostrea gigas*, los mejillones, *Mytilus* spp., los pectínidos *Patinopecten yessoensis*, *Chlamys* spp., *Pinctada maxima* y las almejas *Macoma* spp., *Solen* spp., *Tapes* spp., *Panopea japonica*, *Macoma baltica*, *Tridacna* spp., *Cerastoderma edule* y *Meretrix meretrix* (BOWER y MCGLADDERY 2003; HUYS *et al.* 2007; JONES y CREEPER 2006; KIM 2004; LAUCKNER 1983; NAGASAWA *et al.* 1988). En Korea se han reconocido 27 especies de copépodos asociados a 40 especies de bivalvos, muchos de ellos procedentes de cultivo. La mayor parte de las especies parecen ser endémicas de los mares de China, Japón y Corea; sólo cinco se conocen además para otras

FIGURA 32.
Mytilicola intestinalis
(Copepoda:
Mytilicolidae) en
Mytilus galloprovincialis
(Mytilidae) procedente
de Galicia, España
(fotografía tomada por
Antonio Figueras). Barra
de escala: 1 mm.





localidades (KIM 2004). Entre ellas, *Pseudomyicola spinosus* posee una distribución cosmopolita en aguas tropicales y subtropicales y se la ha registrado en más de 50 bivalvos hospedadores (Ho 1992 en KIM 2004). *Mytilicola intestinalis* parece estar confinada a aguas europeas (LAUCKNER 1983). *Mytilicola orientalis* y *Myicola ostreae*, ambas asociadas a *Crassostrea gigas*, han sido dispersadas involuntariamente con las introducciones de la ostra para su cultivo (HOLMES Y MINCHIN 1995 en KIM 2004). *M. orientalis* ha colonizado posteriormente a almejas autóctonas en el este del Pacífico (BERNARD 1969 en KIM 2004).

La especificidad por el hospedador depende de la especie de copépodo involucrada. Por ejemplo, en Korea, 20 de las 27 especies registradas habitan sólo una o dos especies de bivalvos, mientras que otras como *P. spinosus* habita 11 en la misma área de estudio y *Ostrincola koe*, 10 (KIM 2004).

La patología ocasionada por los copépodos es, en general, leve; sin embargo, varias mortalidades masivas han sido atribuidas sobre todo a *Mytilicola* sp., debido a que parasita el intestino causando su obstrucción cuando se presenta en altas intensidades (Fig. 33) (LAUCKNER 1983). En Europa, *M. intestinalis* ha sido el causante de efectos catastróficos sobre los cultivos de *M. edulis*, por afectar tanto el crecimiento como la robustez del bisco (FIGUERAS Y FIGUERAS 1981). En general, no se han hallado variaciones en la abundancia de *Mytilicola* spp. al incrementarse la densidad de los mejillones. Las tallas menores no están usualmente infectadas; sin embargo, la abundancia aumenta

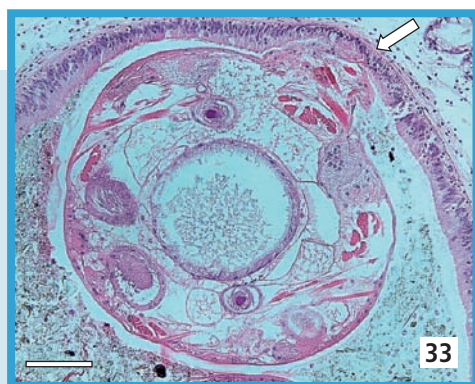


FIGURA 33.

Corte histológico (H & E) del intestino de *Mytilus galloprovincialis* (Mytilidae) parasitado por *Mytilicola intestinalis* (Copepoda: Mytilicolidae) procedente de Galicia, España, obsérvese la obstrucción del intestino y el daño en el epitelio causado por el apéndice del copépodo (flecha). Barra de escala: 100 µm.

en las tallas subsiguientes de manera exponencial (DAVEY 1989; GOATER y WEBER 1996). Tanto *M. intestinalis* como *M. orientalis* habitan principalmente en estuarios protegidos y con sustratos lodosos (DAVEY 1989; GOATER y WEBER 1996).

En China, HO Y ZENG (1994 en KIM 2004) registraron a *O. koe* como el responsable de la mortandad masiva de la almeja *Meretrix meretrix* en los años 1988 y 1989. En Japón, NAGASAWA *et al.* (1993) observaron que las hembras de *P. ornatus* se alimentan de la hemolinfa del pec-tínido hospedador, por lo que en infecciones severas ocasionan una reducción del índice de condición. Además, afecta la condición de los pectínidos reduciendo su aceptación en el mercado. Este copépodo presenta prevalencias de hasta el 100% y está presente todo el año con reclutamientos máximos en otoño (NAGASAWA *et al.* 1993).

En la costa este de Sudamérica, sólo se conoce la presencia de dos especies habitando la cavidad del manto de *M. edulis*, *Ostrincola patagonianus* y otra aún no identificada pero que estaría estrechamente relacionada a *Tisbe celata* (CREMONTE 1999; HUMES 1988).

Modiolicola gracilis y *Pseudomyicola spinosus* han sido registrados en los mejillones *Mytilus galloprovincialis* y *Mytilus californianus* en Baja California, México. Ambos copépodos estuvieron presentes a los largo de todo el año, con un máximo en otoño. La prevalencia e intensidad de los copépodos estuvieron positivamente correlacionadas con la talla de los bivalvos (CÁCERES-MARTÍNEZ *et al.* 1996). Aproximadamente el 90% de los individuos de *P. spinosus* se hallaron en las branquias y el resto en el tracto digestivo de *M. galloprovincialis*. En las branquias no se observaron daños histológicos; sin embargo, cuando los copépodos se ubicaron en el tracto digestivo, se registró una obstrucción del intestino, ruptura del epitelio y encapsulación alrededor de los tejidos digestivos (OLIVAS-VALDÉZ y CÁCERES-MARTÍNEZ 2002). Asimismo, se registró una reducción del índice de condición de los mejillones parasitados por *P. spinosus* (CÁCERES-MARTÍNEZ *et al.* 1996).

4.3. Cangrejos brachiuros

La familia Pinnotheridae incluye crustáceos decápodos adaptados a la vida dentro de otros invertebrados marinos (bivalvos, poliquetos, equinodermos, holoturoideos y urocordados), siendo los bivalvos sus



hospedadores preferidos. Más de 252 especies han sido descritas, muchas de ellas afectando a bivalvos de importancia comercial (LAUCKNER 1983; SINDERMAN 1990). Las especies de Pinnotheridae asociadas a bivalvos marinos se hallan incluidas principalmente en los géneros *Pinnotheres*, *Tumidothere*, *Fabia* y *Pinnixa*. También se han citado especies de *Juxtafabia*, *Zaops* y *Arcotheres* habitando bivalvos marinos (BEZERRA et al. 2006; LAUCKNER 1983; SINDERMAN 1990).

Entre las especies de bivalvos de importancia comercial en las que han sido registrados cangrejos Pinnotheridae, se encuentran ostras *Crassostrea* spp., *Saccostrea palmula*, *Ostrea* spp., mejillones *Mytilus* spp., *Aulacomya atra*, pectínidos *Aequipecten* spp., *Chlamys nipponensis*, *Placopecten magellanicus* y almejas *Mya arenaria*, *Meretrix lusoria*, *Modiolus modiolus* y *Tapes philippinarum* (BEZERRA et al. 2006; GÓMEZ-SIMES 1993; LAUCKNER 1983; NARVARTE y SAIZ 2004; SINDERMAN 1990).

La diversidad y abundancia de los Pinnotheridae es mayor en aguas tropicales y subtropicales y decrece de manera significativa con la latitud. En aguas europeas, *Pinnotheres pisum* es la especie más común invadiendo bivalvos (LAUCKNER 1983). Por otra parte, *Tumidothere maculatus* (Figs. 34 y 35) habita la costa atlántica en Norte y Sudamérica, habiéndose registrado en al menos 15 especies de bivalvos (GÓMEZ-SIMES 1993; LAUCKNER 1983; NARVARTE y SAIZ 2004).



FIGURAS 34 Y 35.

Tumidothere maculatus (Brachiura: Pinnotheridae) procedente de la cavidad del manto de *Mytilus edulis* (Mytilidae) de Argentina. 34. Macho. 35. Hembra. Barras de escala: 5 mm y 0,5 cm respectivamente.



Aunque originalmente fueron considerados como comensales, varios estudios han confirmado que producen efectos adversos en sus hospedadores. Estos incluyen daños en los palpos labiales y branquias, disminución en la capacidad de filtración y por consiguiente, en la tasa de crecimiento e índice de condición. Asimismo, el valor comercial de bivalvos albergando cangrejos en su interior se reduce notablemente (BIERBAUM y SHUMWAY 1988; BIERBAUM y FERNON 1986; CHENG 1967a; LAUCKNER 1983; NARVARTE y SAIZ 2004; SINDERMAN 1990; SUN *et al.* 2006; TABLADO y LÓPEZ GAPP 1995).

El ciclo de vida generalizado de un Pinnotheridae comprende varios estadios planctónicos sucesivos. El primer estadio como cangrejo invade la cavidad del manto del bivalvo donde sufre varias mudas. El estadio resultante para ambos sexos posee un exoesqueleto endurecido (por esto, los estadios anteriores son llamados «pre-duros») que pueden o no dejar al hospedador y copular. Los machos mueren mientras que las hembras vuelven a invadir al bivalvo, sufren cuatro mudas y ya no abandonan al hospedador, dado que la apertura de los sifones no es lo suficientemente grande como para permitirles salir. Estos cangrejos poseen exoesqueletos delgados y flexibles; se ubican sobre las branquias, en donde recogen con sus quelas los cordones de mucus que allí se forman para alimentarse (BIERBAUM y FERNON 1986). En América del Norte, las hembras de *T. maculatus* no producen huevos hasta el verano y se conoce que viven dentro del hospedador durante dos o tres años (PEARCE 1964).

PEARCE (1966) halló una correlación positiva entre el ancho del caparazón de *T. maculatus* y la longitud de los ejemplares de *Modiolus modiolus*. Asimismo, determinó que la prevalencia de este pinotérico varía considerablemente con la profundidad y también entre localidades, pudiendo alcanzar valores cercanos al 100%.

En China, SUN *et al.* (2006) observaron una prevalencia de infestación de *Pinnotheres sinensis* en *M. galloprovincialis* entre 1,9 y 62%. Asimismo, el 53,8% de los mejillones estuvo parasitado por un solo individuo hembra, el 21,4% por un individuo macho y el 18,1 por una pareja. Sólo las hembras del cangrejos produjeron un impacto significativo sobre el índice de condición de los mejillones (SUN *et al.* 2006).



En Australia, *Pinnotheres hickmani* es frecuente en *M. edulis* de cultivo, reduciendo el peso de las partes blandas de los animales infectados hasta un 26% (LESTER 1989).

En Argentina, *T. maculatus* fue registrado en bancos de *M. edulis* de 30 a 60 m de profundidad con prevalencias de entre 54 y 73% (Figs. 34 y 35) (TABLADO y LÓPEZ GAPPA 1995). Los ejemplares de mejillón que albergan el último estadio de la hembra adulta tuvieron una longitud de valva y un peso seco de las partes blandas significativamente menor con respecto a aquellos no parasitados (TABLADO y LÓPEZ GAPPA 1995). Asimismo, en el mencionado país, *T. maculatus*, ha sido registrado en la ostra *Ostrea puelchana* y en el mitílido *Aulacomya atra* en bancos de más de 40 m de profundidad (FENUCCI 1975; GÓMEZ-SIMES 1993). En el norte de la Patagonia argentina, NARVARTE y SAIZ (2004) estudiaron los efectos de *T. maculatus* sobre *Aequipecten tehuelchus* procedentes de bancos entre 11 y 26 m de profundidad. Estos autores hallaron que la prevalencia de infestación varió entre 14 y 50%, sin diferencias significativas entre las distintas profundidades; la mayoría de los pecetínidos albergó un solo cangrejo, generalmente hembra. El índice de condición fue significativamente menor en los individuos infectados que en los no infectados (NARVARTE y SAIZ 2004).

4.4. Nemertinos

El Phylum Nemertea comprende más de 1100 especies y cerca de 250 géneros. La mayor parte de ellas se hallan en hábitats bentónicos y pelágicos; unas pocas habitan en agua dulce o son terrestres. Hasta ahora, al menos 40 especies han sido registradas viviendo relaciones simbióticas, en todos los casos con invertebrados marinos. La naturaleza de dicha asociación es desconocida, aunque actualmente se considera que la mayoría sería de tipo comensal (ROHDE 2005).

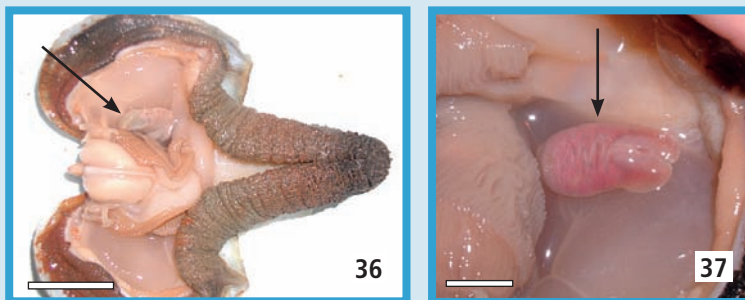
En particular, la familia Malacobdellidae posee un único género, *Malacobdella*, con seis especies válidas; todas ellas endocomensales en la cavidad del manto de bivalvos (ROHDE 2005). Poseen un cuerpo aplanado y su extremo posterior porta una ventosa simple con la que se sujetan dentro de la cavidad del manto. Se alimentan por suspensión, utilizando su epidermis ciliada y una papila faringea para atrapar organismos microscópicos. Típicamente se halla un adulto por bivalvo

hospedador. Para *M. grossa* se ha sugerido una longevidad de hasta 20 años (SUNDET y JOBLING 1985).

Los bivalvos parasitados por *Malacobdella* spp. pertenecen principalmente a la subclase Heterodonta, aunque también a los Protobranchia y Pteriomorphia (ROHDE 2005). Las especies de bivalvos de importancia comercial registradas como hospedadores de nemertinos incluyen la ostra *Crassostrea virginica* y las almejas *Mercenaria mercenaria*, *M. campechensis*, *Cerastoderma edule*, *Venus casina*, *Arctica islandica*, *Mya arenaria*, *Hiatella arcaica* y *Panopea abbreviata* (GIBSON 1994; LAUCKNER 1983; ROHDE 2005).

La familia posee una distribución cosmopolita. Cinco de las seis especies válidas han sido registradas para una única especie de bivalvo hospedador, exhibiendo además una distribución geográfica limitada. Por otra parte, *M. grossa* ha sido hallada en al menos 27 especies de bivalvos diferentes y está ampliamente distribuida en las costas de Europa y en las costas atlántica y pacífica de América del Norte (GIBSON 1994; IVANOV et al. 2002; ROHDE 2005).

En la costa este de Patagonia, *M. arrokeana* estuvo presente entre el 86 y el 100% de los ejemplares de *Panopea abbreviata* a lo largo de todo el año (Figs. 36 a 40). En el 90% de los casos se halló un solo in-



FIGURAS 36 Y 37.

Panopea abbreviata (Hiatellidae) procedente de Patagonia, Argentina, parasitada por un ejemplar macho de *Malacobdella arrokeana* (Nemertea: Mallacobdellidae) (flecha) fijado por la ventosa posterior en la cavidad del manto (fotografías tomadas por Gregorio Bigatti).
Barras de escala: 5 y 1 cm respectivamente.



dividuo maduro, siendo la proporción de sexos 1:0,64 con dominancia de hembras (Figs. 36 a 38) (Teso *et al.* 2006). No se ha investigado el mecanismo por el cual se halla habitualmente sólo un nemertino por hospedador, habiéndose sugerido que algún tipo de secreción química del nemertino adulto impida el establecimiento de los reclutas (Teso *et al.* 2006).

Al parecer, son inocuos para sus hospedadores, por lo que se los considera como comensales (LAUCKNER 1983; ROHDE 2005). Sin embargo, SUNDET y JOBLING (1985) argumentan una relación de tipo parásita entre *M. grossa* y *Arctica islandica*, ya que en este hospedador provoca una disminución, leve pero significativa, del crecimiento del bivalvo. Asimismo, SUNDET y JOBLING (1985) determinaron que los individuos parasitados poseen un índice de condición menor que aquellos no parasitados. Considerando el gran tamaño de los nemertinos, cabría esperar cierta disminución en las funciones vitales tales como la actividad de filtración, que, excepto el caso de *M. grossa* en *A. islandica* (SUNDET y JOBLING 1985), poco se ha investigado hasta el presente. Hasta donde se ha reportado, no causan daños severos en los tejidos al fijarse en el manto con la ventosa terminal. No causarían daños severos en los tejidos al fijarse en el manto con la ventosa terminal. Para el caso de *P. abbreviata*, se ha observado que en la zona donde la ventosa de *M. akorreana* establece un contacto más estrecho con el manto del bivalvo, se encuentra infiltrado por hemocitos en el tejido conectivo y algún tipo de secreción en la luz entre ambos organismos

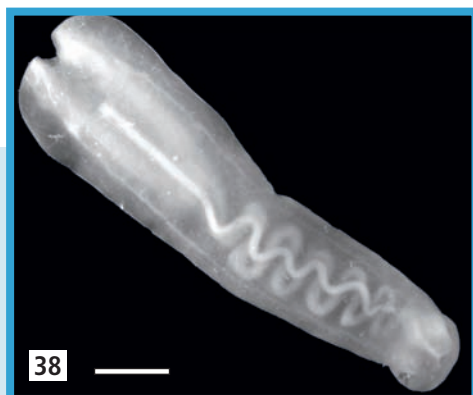


FIGURA 38.

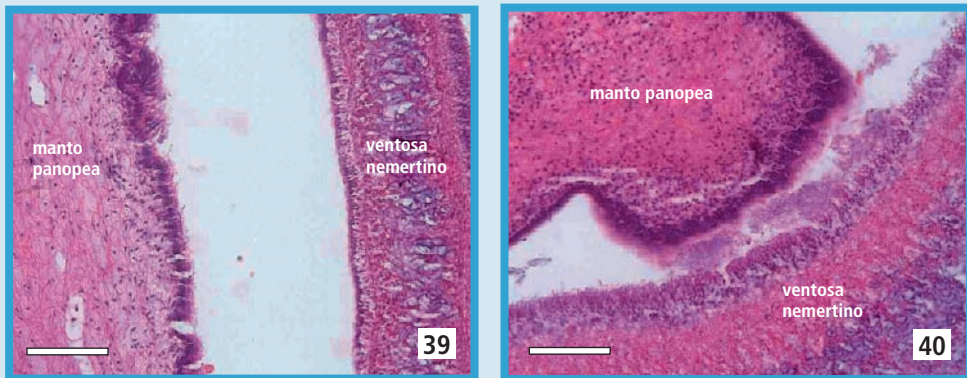
Ejemplar entero, hembra de *Malacobdella akorreana* (Nemertea: Mallacobdellidae) procedente de la cavidad del manto de *Panopea abbreviata* (Hiatellidae) en Patagonia, Argentina (fotografía tomada por Gregorio Bigatti). Barra de escala: 30 mm.

(Figs. 39 y 40) (VÁZQUEZ *et al.*, 2009). Asimismo, el epitelio no sufre alteraciones (e.g., de tipo hiperplasia o metaplasia) como suele ocurrir en la caso de las ventosas de los digeneos (Figs. 39 y 40).

Otro nemertino que no pertenece a la familia Malacobdellidae y que ha sido hallado en la cavidad del manto de la almeja *Scrobicularia plana* en España es *Tetrastemma fozensis* (Tetrastemmatidae) (ROHDE 2005).

5. AGRADECIMIENTOS

Mi sincero agradecimiento a Juan Carvajal, Francisco Brusa, Diego Urteaga, Gregorio Bigatti, Maximiliano Cledón, Emilia Diez y Nuria Vázquez por las valiosas contribuciones que realizaron al efectuar una lectura crítica de parte o de todo el manuscrito. Asimismo agradezco las fotografías enviadas por Antonio Figueras, Juan Carvajal, Cristián Ituarte, Robert Poulin, Gregorio Bigatti, Francisco Brusa, Diego Urteaga y Nuria Vázquez. Florencia Cremonte es miembro del CONICET y agradece el apoyo financiero recibido del Consejo Nacional



FIGURAS 39 Y 40.

Cortes histológicos (H & E) de *Malacobdella arrokeana* (Nemertea: Mallacobdellidae) sujeto al manto de *Panopea abbreviata* (Hiatellidae) en Ptagonia, Argentina. 39. Región donde el contacto entre el nemertino y la almeja no es tan estrecho. 40. Obsérvese que al estar la ventosa del nemertino en estrecho contacto con el manto, este se encuentra infiltrado por numerosos hemocitos. Barras de escala: 100 µm.



de Investigaciones Científicas y Técnicas (PIP), Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (PIC 01374).

6. REFERENCIAS

- ANDERSON, R. C., 2000 *Nematode parasites of vertebrates: their development and transmission*. CAB Internacional, Wallingford. UK.
- BARTOLI, P., 1973 La pénétration et l'installation des cercaires de *Gymnophallus fossarum* P. Bartoli, 1965 (Digenea, Gymnophallidae) chez *Cardium glaucum* Bruguière. Bulletin du Muséum d' Histoire Naturelle (3^e série Zoologie) **91**: 319-334.
- BARTOLI, P., 1974 Recherches sur les *Gymnophallidae* F.N. Morozov, 1955 (Digenea) parasites d'oiseaux des côtes de Camargue: systématique, biologie et ecologie, pp. 338. Université des Sciences Aix-Marseille, Marseille.
- BARTOLI, P., 1978 Modification de la croissance et du comportement de *Venerupis aurea* parasité par *Gymnophallus fossarum* P. Bartoli, 1965 (Trematoda, Digenea). Haliotis **7**: 23-28.
- BARTOLI, P., 1984 Distomatosis des lamellibranches marins sur le littoral mediterranean Francais. Haliotis **14**: 98-107.
- BATALLER, E. y A. D. BOGHEN, 2000 Elimination of the gill worm *Urastoma cypri-nae* (Graff) from the eastern oyster *Crassostrea virginica* (Gmelin) using different salinity-temperature combinations. Aquaculture **182**: 199-208.
- BEZERRA, L. E. A., A. O. DE ALMEIDA y P. A. COELHO, 2006 Occurrence of the family Pinnotheridae De Haan (Crustacea, Decapoda, Brachyura) on the coast of Ceará State, Brazil. Revista Brasileira de Zoologia **23**: 1038-1043.
- BIERBAUM, R. y S. F. SHUMWAY, 1988 Filtration and oxygen consumption in mussels, *Mytilus edulis*, with and without pea crabs, *Pinnotheres maculatus*. Estuaries **11**: 264-271.
- BIERBAUM, R. M. and S. FERSON, 1986 Do symbiotic pea crabs decrease growth rate in mussels? Biological Bulletin **170**: 51-61.
- BLAKE, J. A. y P. L. ARNOFSKY, 1999 Reproduction and larval development of the spioniform Polychaeta with application to systematics and phylogeny. Hydrobiologia **402**: 57-106.
- BOSCOLO, R. y O. GIOVANARDI, 2002 *Polydora ciliata* shell infestation in *Tapes philippinarum* Manila clam held out of the substrate in the Adriatic sea, Italy. Journal of Invertebrate Pathology **79**: 197-198.



- BOWER, S. M. y S. E. MCGLADDERY, 2003 Synopsis of Infectious Diseases and Parasites of Commercially Exploited Shellfish **URL:** http://www-sci.pac.dfo-mpo.gc.ca/shelldis/title_e.htm.
- BOWERS, E. A., 1969 *Cercaria bucephalopsis haimeana* (Lacaze-Duthiers, 1854) (Digenea: Bucephalidae) in the cockle, *Cardium edule* L. in South Wales. *Journal of Natural History* **3**: 409-422.
- BOWERS, E. A., P. BARTOLI, F. RUSSELL-PINTO y B. L. JAMES, 1996 The metacercariae of sibling species of *Meiogymnophallus*, including *M. rebecqui* comb. nov. (Digenea: Gymnophallidae), and their effects on closely related *Cerastoderma* host species (Mollusca: Bivalvia). *Parasitology Research* **82**: 505-510.
- BRUN, N. T., A. D. BOGHEN y J. ALLARD, 1999a Attraction of *Urastoma cyprinae* (Turbellaria: Urastomidae) to the eastern oyster *Crassostrea virginica*. *Diseases of Aquatic Organisms* **37**: 139-144.
- BRUN, N. T., A. D. BOGHEN y J. ALLARD, 1999b Distribution of the turbellarian *Urastoma cyprinae* on the gills of the eastern oyster *Crassostrea virginica*. *Journal of Shellfish Research* **18**: 175-179.
- BRUSA, F., R. PONCE DE LEÓN Y C. DAMBORENEA, 2006 A new *Paravortex* (Platyhelminthes, Dalyellioida) endoparasite of *Mesodesma mactroides* (Bivalvia, Mesodesmatidae) from Uruguay. *Parasitology Research* **99**: 566-571.
- BURT, M. D. B. y R. E. DRINNAN, 1968 A microturbellarian found in oysters off the coast of Prince Edward Island. *Journal of Fisheries Research Board of Canada* **25**: 2521-2522.
- BUSH, A. O., J. C. FERNANDEZ, G. W. ESCH y J. R. SEED, 2001 *Parasitism: the diversity and ecology of animal parasites*. Cambridge University Press, Cambridge.
- BUSH, A. O., K. D. LAFFERTY, J. M. LOTZ y A. W. SHOSTAK, 1997 Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis et al. revisited. *Journal of Parasitology* **83**: 575-583.
- CÁCERES-MARTÍNEZ, J., 2001 Parasites and diseases of pectinids in Iberoamérica, pp. 23 in *13th International Pectinid Workshop*, Coquimbo, Chile.
- CÁCERES-MARTÍNEZ, J., G. D. TINOCO, M. L. UNZUETA- BUSTAMANTE e I. M. GÓMEZ-HUMARAN, 1999 Relationship between the burrowing worm *Polydora* sp. and the black clam *Chione fluctifraga* Showerby. *Journal of Shellfish Research* **18**: 85-89.
- CÁCERES-MARTÍNEZ, J., R. VÁSQUEZ-YEOMANS y E. SUÁREZ MORALES, 1996 Two parasitic copepods, *Pseudomyicola spinosus* and *Modiolicola gracilis*, associated with edible mussels, *Mytilus galloprovincialis* and *Mytilus californianus*, from Baja California, Nw Mexico. *Journal of Shellfish Research* **15**: 667-672.



- CAKE, E. W. y R. W. MENZEL, 1980 Infections of *Tylocephalum* metacestodes in commercial oysters and three predaceous gastropods of the eastern Gulf of Mexico. *Proceeding of Natural Shellfish Association* **70**: 94-104.
- CAKE, E. W. J., 1976 A key to larval cestodes of shallow-water, benthic mollusks of the northern Gulf of Mexico. *Proceedings of the Helminthological Society of Washington* **43**: 160-171.
- CAKE, E. W. J., 1977 Larval cestodes parasites of edible mollusks of the north-eastern gulf of Mexico. *Gulf Research Reports* **6**: 1-8.
- CAKE, E. W. J., 1979 *Polypocephalus* sp. (Cestoda; Lecanicephalidae): a description of tentaculo- plerocercoids from bay scallops of the Northeastern gulf of Mexico. *Proceedings of the Helminthological Society of Washington*. **46**: 165-170.
- CAMPBELL, R. A. y J. CARVAJAL, 1975 A revision of some trypanorhynchs from the western North Atlantic described by Edwin Linton. *Journal of Parasitology* **61**: 1016-1022.
- CAÑETE, J. y C. CÁRDENAS, 2004 Medidas de prevención, manejo y control de poliquetos plagas en cultivos de moluscos marinos, pp. 34. Facultad de Ciencias-Universidad de Magallanes, Punta Arenas.
- CARVAJAL, J., 1976 Machas infestadas con larvas de cestodos tetrafilididos en Coquimbo. *Chile Pesquero* **9**: 9-10.
- CARVAJAL, J., 1977 Description of the adult and larva of *Caulobothrium myliobatidis* sp. n. (Cestoda, Tetracystidae) from Chile. *Journal of Parasitology* **63**: 99-103.
- CARVAJAL, J., C. BARROS y G. SANTANDER, 1982 In vitro culture of *Rhodobothrium mesodesmum* (Cestoda: Tetracystidae), parasite of a Chilean clam. *Proceedings of the Helminthological Society of Washington*. **49**: 226-230.
- CARVAJAL, J. y A. MELLADO, 2007 Utilización de la morfología de las larvas me- roceroides presentes en molusco, en la dilucidación de la taxonomía de las especies de *Rhodobothrium* (Cestoda: Tetracystidae). *Gayana* **71**: 114-119.
- CIOCCO, N. F., 1990 Infestación de la vieyra tehuelche (*Chlamys tehuelcha* (d'Orbigny)) por *Polydora websteri* Hartman (Polychaeta: Spionidae) en el golfo San José (Chubut, Argentina): un enfoque cuantitativo. *Biología Pesquera* **19**: 9-18.
- CREMONTE, F., 1999 Estudio parasitológico de bivalvos que habitan ambientes marinos y mixohalinos en Argentina, pp. 196. Universidad Nacional de La Plata, La Plata.
- CREMONTE, F. y A. FIGUERAS, 2004. Parasites as possible cause of mass mortalities of the presently critically endangered clam *Mesodesma mactroides* on the



- Southwest Atlantic coast. Bulletin of European Association of Fish Pathologist **24**: 166-171.
- CREMONTE, F., P. BALSEIRO y A. FIGUERAS, 2005a Occurrence of *Perkinsus olseni* (Protozoa: Apicomplexa) and other parasites in the venerid commercial clam *Pitar rostrata* from Uruguay, southwestern Atlantic coast. Diseases of Aquatic Organisms **64**: 85-90.
- CREMONTE, F., A. FIGUERAS y E. M. BURRESON, 2005b A histopathological survey of some commercially exploited bivalve molluscs in northern Patagonia, Argentina. Aquaculture **249**: 23-33.
- CREMONTE, F. y C. F. ITUARTE, 2003 Pathologies elicited by the gymnophallid metacercariae of *Bartolius pierrei* in the clam *Darina solenoides*. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom **83**: 311-318.
- CREMONTE, F., M. A. KROECK y S. R. MARTORELLI, 2001 A new monorchiid (Digenea) cercaria parasitising the purple clam *Amiantis purpurata* (Veneridae) from the Southwest Atlantic Ocean, with notes on its gonadal effect. Folia Parasitologica **48**: 217-223.
- CREMONTE, F., N. VÁZQUEZ y C. ITUARTE, 2008 The development of *Gymnophallus australis* Szidat, 1962 (Digenea: Gymnophallidae) from the Patagonian coast (Argentina) from metacercaria to adult, with an amended diagnosis of *Gymnophallus Odhner*, 1905. Systematic Parasitology **69**: 23-31.
- CRESPO- GONZÁLEZ, C., R. M. REZA -ÁLVAREZ, H. RODRÍGUEZ -DOMÍNGUEZ, M. SOTO- BÚA, R. IGLESIAS *et al.*, 2005 In vitro reproduction of the turbellarian *Urostoma cyprinae* isolated from *Mytilus galloprovincialis*. Marine Biology **147**: 755-760.
- CHAUBAUD, A. G., 1975 Keys to genera of the Order Spirurida. Part. 2. Spiruroidea, Habronematoidea and Acuarioidea, pp. 29-58 in *CIH Keys to the Nematode Parasites of Vertebrates*, editado por R. C. ANDERSON, A. G. CHABAUD y S. WILLMONT. CAB International, Wallingford. UK.
- CHENG, T., 1967a Marine molluscs as hosts for symbioses with a review of know parasites of commercially important species. *Advances in Marine Biology*.
- CHENG, T. C., 1967b *Marine molluscs as hosts for symbiosis with a review of known parasites of commercially important species*. Academic Press Inc, London.
- CHENG, T. C., 1973a *General Parasitology*. Academic Press, New York.
- CHENG, T. C., 1973b Human parasites transmissible by seafood -and related problems, pp. 163-189 in *Microbial Safety of Fishery Products*, editado por C. O. CHICHESTER y H. D. GRAHAM. Academic Press, New York, New York.



- CHENG, T. C., 1975 *Echinocephalus crassostreai* sp. nov., a larval nematode from oyster *Crassostrea gigas* in the orient. Journal of Invertebrate Pathology **26**: 81-90.
- CHENG, T. C. y E. RIFKIN, 1970 Cellular reactions in marine molluscs in response to helminth parasitism, pp. 443-496 in *A symposium on diseases of fishes and shellfishes*, editado por S. F. SNIESZKO. American Fisheries Society.
- CHERVI, L., 2002 The terminology of larval cestodes or metacestodes. Systematic Parasitology **52**: 1-33.
- DA SILVA, P. M., A. R. M. MAGALHAES y M. A. BARRACCO, 2002 Effects of *Bucephalus* sp. (Trematoda: Bucephalidae) on *Perna perna* mussels from a culture station in Ratones Grande Island, Brazil. Journal of Invertebrate Pathology **79**: 154-162.
- DAVEY, J. T., 1989 *Mytilicola intestinalis* (Copepoda: Cyclopoida): A ten year survey of infested mussels in a Cornish estuary, 1978-1988. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom **69**: 823-836.
- DUBOIS, R., 1901 Sur le mécanisme de la formation des perles fines dans le *Mytilus edulis*. Compte Rendus hebdomaire Séance Académie Sciences, Paris **133**: 603-605.
- DUNPHY, B. J., R. M. G. WELLS y A. G. JEFFS, 2005 Polydorid infestation in the oyster, *Tiostrea chilensis*: hyposaline treatment for an aquaculture candidate. Aquaculture International **13**: 351-358.
- FENUCCI, J. L., 1975 Los cangrejos de la familia Pinnotheridae del litoral argentino (Crustacea, Decapoda, Brachyura). Physis, Sección A **34**: 165-184.
- FIGUERAS, A. y A. J. FIGUERAS, 1981 *Mytilicola intestinalis* Steuer en el mejillón de la Ría de Vigo (NO de España). Investigación Pesquera **45**: 263-278.
- FLEMING, L. C., 1986 Occurrence of symbiotic turbellarians in oyster, *Crassostrea virginica*. Hydrobiologia **132**: 311-315.
- GALAKTIONOV, K. V. y A. A. DOBOVLSKIJ, 2003 *The Biology and Evolution of Trematodes. An essay on the biology, morphology, life cycles, transmissions, and evolution of digenetic trematodes*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London.
- GIARD, A. M., 1897 Sur une cercaire sétigère (*Cercaria lutea*) parasites des pélecypodes. Compte rendu Societe Biologie **49**: 956-957.
- GIBSON, R., 1994 *Nemertean. Keys and notes for identifications of the species*. The Linnean Society of London, The Estuarine and Coastal Sciences Association.
- GOATER, C. P. y A. E. WEBER, 1996 Factors affecting the distribution and abundance of *Mytilicola orientalis* (Copepoda) in the mussel, *Mytilus trossulus*, in Barkley sound, B.C. Journal of Shellfish Research **15**: 681-684.



- GOGGIN, C. L. y L. R. G. CANNON, 1989 Occurrence of a turbellarian from Australian tridacnid clams. *International Journal for Parasitology* **19**: 345-346.
- GÓMEZ-SIMES, E., 1993 *Pinnixa brevipollex* y *Pinnotheres maculatus* (Crustacea: Brachyura: Pinnotheridae) en el Golfo San José, Chubut, Argentina. *Physis, Sección A* **48**: 25-28.
- HANDLEY, S. J., 1995 Spionid polychaetes in Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg) from Admiralty Bay, Marlborough Sounds, New Zealand. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research* **29**: 305-309.
- HARRIS, K. R., 1975 The fine structure of encapsulation in *Biomphalaria glabrata*. *Annals of the New York Academy of Sciences* **266**: 446-464.
- HINE, P. M. y T. THORNE, 2000 A survey of some parasites and diseases of several species of bivalve mollusc in northern Western Australia. *Diseases of Aquatic Organisms* **40**: 67-78.
- Ho, J., 1980 Origin and dispersal of *Mytilus edulis* in Japan deduced from present status of copepod parasitism. *Publications of the Seto Marine Biological Laboratory* **25**: 293-313.
- HOBERG, E. P., D. R. BROOKS, H. MOLINA-UREÑA y E. ERBE, 1998 *Echinocephalus janzeni* n. sp. (Nematoda: Gnathostomatidae) in *Himantura pacifica* (Chondrichthyes: Myliobatiformes) from the Pacific coast of Costa Rica and Mexico, with historical biogeographic analysis of the genus. *Journal of Parasitology* **84**: 571-581.
- HUMES, A. G., 1954 *Tisbe celata* n. sp., a Harpacticoid copepod from the mantle cavity of the edible mussel in new Brunswick. *Journal of Fisheries Research Board of Canada* **11**: 816-826.
- HUMES, A. G., 1988 *Ostrinicola patagonianus* n. sp. (Copepoda: Poecilostomatoida: Mycicolidae) associated with intertidal bivalve mollusks on the Patagonian coast of Argentina. *Transactions of the American Microscopical Society* **107**: 232-239.
- HUMES, A. G., 1994 How many copepods? *Hydrobiologia* **292/293**: 1-7.
- HUYS, R., J. LLEWELLYN-HUGHES, S. CONROY-DALTON, P. D. OLSON, J. N. SPINKS *et al.*, 2007 Extraordinary host switching in siphonostomatoid copepods and the demise of the Monstrilloidea: Integrating molecular data, ontogeny and antennular morphology. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **43**: 368-378.
- HUYS, R., J. LLEWELLYN-HUGHES, P. D. OLSON y K. NAGASAWA, 2006 Small subunit rDNA and Bayesian inference reveal *Pectenophilus ornatus* (Copepoda *incertae sedis*) as highly transformed Mytilicolidae, and support assignment of Chondracanthidae and Xarifiidae to Lichomolgoidea (Cyclopoida). *Biological Journal of the Linnean Society* **87**: 403-425.



- ITUARTE, C., F. CREMONTE y A. SCARANO, 2009 Tissue reaction of *Tagelus plebeius* Lightfoot (Bivalvia, Psammobiidae) against larval digeneans in mixohaline habitats connected to the Southwestern Atlantic Ocean. *Journal of Marine Biological Association of the United Kingdom*.
- ITUARTE, C., F. CREMONTE y D. G. ZELAYA, 2005 Parasite-mediated shell alterations in Recent and Holocene sub-Antarctic bivalves: the parasite as modeler of host reaction. *Invertebrate Biology* **124**: 220-229.
- ITUARTE, C. F., F. CREMONTE y G. DEFERRARI, 2001 Mantle-shell complex reactions elicited by digenean metacercariae in *Gaimardia trapesina* (Lamarck, 1819) (Bivalvia: Gaimardiidae) from the Magellan Strait. *Diseases of Aquatic Organisms* **48**: 47-56.
- IVANOV, V. A., G. BIGATTI, P. E. PENCHASZADEH y J. L. NORENBURG, 2002 *Malacobdella arrokeana* (Nemertea: Bdellonemertea), a new species of nemertean from the Southwestern Atlantic Ocean entocommensal in *Panopea abbreviata* (Bivalvia, Heterodonta, Hiatellidae) in Argentina. *Proceedings of the Biological Society of Washington* **115**: 359-367.
- JAMESON, H. L., 1902 On the origin of pearls. *Proceedings of the Zoological Society of London* **1**: 140-165.
- JENNINGS, J. B., 1971 Parasitism and commensalism in the Turbellaria. *Advances in Parasitology* **9**: 1-32.
- JONES, A. y J. CREEPER, 2006 Diseases of pearl oysters and other molluscs: a Western Australian perspective. *Journal of Shellfish Research* **25**: 233-238.
- KHALIL, L. F. J., A. Y R. A. BRAY, 1994 *Key to de Cestode Parasite of Vertebrates*. CAB Internacional, Wallingford. UK.
- KIM, I. I.-H., 2004 Poecilostomatoid Copepods Associated with Bivalves in Korea and their Distribution. *Zoological Studies* **43**: 187-192.
- KO, R. C., 1976 Experimental infection of mammals with larval *Echinocephalus sinensis* (Nematoda: Gnathostomatidae) from oysters (*Crassostrea gigas*). *Canadian Journal of Zoology* **54**: 597-609.
- KO, R. C., B. MORTON y P. S. WONG, 1975 Prevalence and histopathology of *Echinocephalus sinensis* (Nematoda: Gnathostomatidae) in natural and experimental hosts. *Canadian Journal of Zoology* **53**: 550-559.
- LAUCKNER, G., 1983 *Diseases of Mollusca: Bivalvia Diseases of Marine Animals*. Biologische Anstalt Helgoland, Hamburg.
- LEE, S. H., J. Y. CHAI y S. T. HONG, 1993 *Gymnophalloides seoi* n. sp. (Digenea: Gymnophallidae), the first report of human infection by a gymnophallid. *Journal of Parasitology* **79**: 677-680.



- LEE, S. H., W. M. SOHN, S. J. HONG, S. HUN, M. SEO *et al.*, 1996 A nationwide survey of naturally produced oysters for infection with *Gymnophalloides seoi* metacercariae. Korean Journal of Parasitology **34**: 107-112.
- LESTER, R. J. G., 1989 Ecology of marine parasites, pp. 165-184 in *Current concepts in parasitology*, editado por R. C. Ko. University Press, Hong Kong.
- LICHTENFELS, J. R., J. W. BIER y P. A. MADDEN, 1978 Larval Anisakid (*Sulcascaris*) nematodes from atlantic molluscs with marine turtles as definitive hosts. Transactions of the American Microscopical Society **97**: 199-207.
- LICHTENFELS, J. R., T. K. SAWYER y G. C. MILLER, 1980 New hosts for larval *Sulcascaris* sp. (Nematoda: Anisakidae) and prevalence in the Calico Scallop (*Argopecten gibbus*). Transactions of the American Microscopical Society **99**: 448-451.
- LOMOVASKY, B., J. GUTIÉRREZ y O. IRIBARNE, 2005 Identifying repaired shell damage and abnormal calcification in the stout razor clam *Tagelus plebeius* as a tool to investigate its ecological interactions. Journal of Sea Research **54**: 163-175.
- MACKENZIE, C. L. y L. W. SHEARER, 1961 Chemical control of *Polydora websteri* and other annelids inhabiting oyster shells. Proceedings of the National Shellfisheries Association **50**: 105-111.
- MARSHALL, W., S. BOWER y G. MEYER, 2003 A Comparison of the parasite and symbiont fauna of cohabiting native (*Protothaca staminea*) and introduced (*Venerupis philippinarum* and *Nuttalia obscurata*) clams in British Columbia Journal of Shellfish Research **22**: 185-192.
- MARTIN, D. y T. BRITAYEV, 1998 Symbiotic Polychaetes: Review of known species. Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev. **36**: 217-340.
- MAUNA, C., S. CASADÍO, A. PARRAS y M. PASCUAL, 2005 Abundance and distribution of *Lithophaga* (Mytilidae) in extant and fossil oysters: taphonomic and paleobiological implications. Ameghiniana **42**: 395-405.
- MILLEMANN, R. E., 1963 Studies on the Taxonomy and Life History of Echinocephalid Worms (Nematoda: Spiruroidea) with a Complete Description of *Echinocephalus pseudouncinatus* Millemann, 1951. Journal of Parasitology **49**: 754-764.
- MONTAUDOUIN, X. D., A. M. WEGEBERG, K. T. JENSEN y P. G. SAURIAU, 1998 Infection characteristics of *Himasthla elongata* cercariae in cockles as a function of water current. Diseases of Aquatic Organisms **34**: 63-70.
- MORENO, R. A., P. E. NEILL y N. ROZBACZYLO, 2006 Poliquetos perforadores nativos y no indígenas en Chile: una amenaza para moluscos nativos y comerciales. Revista Chilena de Historia Natural **79**: 263-278.



- MORI, K., W. SATO, T. NOMURA y M. IMAJIMA, 1985 Infestation of the Japanese scallop *Patinopecten yessoensis* by the boring polychaetes, *Polydora*, on the Okhotsk Sea coast of Hokkaido, especially in Abashiri waters. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries **51**: 371-380.
- MORTENSEN, S., 2000 Scallop introductions and transfers, from an animal health point of view. Aquaculture International **8**: 123-138.
- MOURITSEN, K., 2004 Intertidal facilitation and indirect effects: causes and consequences of crawling in the New Zealand cockle. Marine Ecology Progress Series **270**: 207-220.
- MOURITSEN, K. N., 2002 The parasite-induced surfacing behaviour in the cockle *Austrovenus stutchburyi*: a test of an alternative hypothesis and identification of potential mechanisms. Parasitology **124**: 521-528.
- MURINA, G. V. y A. I. SOLONCHENKO, 1991 Commensals of *Mytilus galloprovincialis* in the Black Sea: *Urastoma cyprinae* (Turbellaria) and *Polydora ciliata* (Polychaeta). Hydrobiologia **227**: 385-387.
- NAGASAWA, K., J. BRESCIANI y J. LÜTZEN, 1988 Morphology of *Pectenophilus ornatus*, new genus, new species, a copepod parasite of the Japanese scallop *Patinopecten yessoensis*. Journal of Crustacean Biology **8**: 31-42.
- NAGASAWA, K., K. TOMITA, N. FUJITA y R. SASAKI, 1993 Distribution and bivalve hosts of the parasitic copepod *Pectenophilus ornatus* Nagasawa, Bresciani and Lützen in Japan. Journal of Crustacean Biology **13**: 544-550.
- NARVARTE, M. A. y M. N. SAIZ, 2004 Effects of the pinnotherid crab *Tumidotheres maculatus* on the Tehuelche scallop *Aequipecten tehuelchus* in the San Matías Gulf, Argentina. Fisheries Research **67**: 207-214.
- NORRIS, D. E. y R. M. OVERSTREET, 1976 The public health implications of larval *Thynnascaris* nematodes from shellfish. Journal of Milk and Food Technology **39**: 47-54.
- OLIVA, M. y M. SÁNCHEZ, 2005 Metazoan parasites and commensals of the northern Chilean scallop *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819) as tools for stock identification. Fisheries Research **71**: 71-77.
- OLIVA, M. E., L. CASTILLO y M. SÁNCHEZ, 2004 Metazoan parasites in wild and farmed populations of the scallops, *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819) from northwter Chile. Acta Parasitologica **49**: 153-155.
- OLIVAS-VALDÉZ, J. A. y J. CÁCERES-MARTÍNEZ, 2002 Infestation of the blue mussel *Mytilus galloprovincialis* by the copepod *Pseudomyicola spinosus* and its relation to size, density, and condition index of the host. Journal of Invertebrate Pathology **79**: 65-71.



- ORENSANZ, J. M., M. PASCUAL Y M. FERNÁNDEZ, 1989 *Fisheries and aquaculture. Argentina*. En: Shumway, S. (ed.). *Scallops: Biology, Ecology and Aquaculture*, Elsevier, Amsterdam y New York.
- PALOMBI, A., 1934 Gli stadi larvali dei trematodi del Golfo de Napoli, 1° Contributo allo studio della morfologia, biologia, e sistematica delle cercarie marine. Publicatione di la stazione Zoologique de Napoli **14**: 51-94.
- PAYNE, W. L. G., T. A.; DENT, R. G.; BIER, J. W Y G. J. JACKSON, 1980 Survey of the U. S. Atlantic coast surf clam, *Spisula solidissima*, and clam products for anisakine nematodes and hiperparasitic Protozoa. *Journal of Parasitology* **66**: 150-153.
- PEARCE, J. B., 1964 On reproduction in *Pinnotheres maculatus* (Decapoda: Pinnotheridae). *Biological Bulletin* **127**: 238.
- PEARCE, J. B., 1966 The biology of the mussel crab, *Fabia subquadrata*, from the waters of the San Juan Archipelago, Washington. *Pacific Sciences* **20**: 3-35.
- PERKINS, F. O., 1993 Infectious diseases of molluscs, pp. 255-287 en *Pathobiology of marine and estuarine organisms*, editado por J. A. COUCH y J. W. FOURNIE. CRC Press, Boca Raton, Ann Arbor, London, Tokyo.
- PREGENZER, C., 1983 Survey of metazoan symbionts of *Mytilus edulis* (Mollusca: Pelecypoda) in Southern Australia. *Aust. J. Mar. Freshw. Res.* **34**: 387-396.
- RADASHEVSKY, V. I., P. C. LANA y R. C. NALESSO, 2006 Morphology and biology of *Polydora* species (Polychaeta: Spionidae) boring into oyster shells in South America, with the description of a new species. *Zootaxa* **1353**: 1-39.
- ROBERTSON, R. y T. MAU-LASTOVICKA, 1979 The ectoparasitism of *Bonnea* and *Fargoa* (Gastropoda: Pyramidellidae). *Biological Bulletin* **157**: 320-333.
- ROBLEDO, J. A. F., J. CÁCERES-MARTÍNEZ, R. SLUYS y A. FIGUERAS, 1994 The parasitic turbellarian *Urastoma cyprinae* (Platyhelminthes: Urastomidae) from blue mussel *Mytilus galloprovincialis* in Spain: occurrence and pathology. *Diseases of Aquatic Organisms* **18**: 203-210.
- ROHDE, K., 2005 *Marine Parasitology*. Cabi Publishing, Wallingford.
- RÜTZLER, K., 2002 Family Clionidae D'Obrigny, 1851.
- RÜTZLER, K. y G. RIEGER, 1973 Sponge burrowing: Fine structure of *Clione lampas* penetrating calcareous substrata. *Marine Biology* **21**: 144-162.
- SCHANDER, C., K. M. HALANYCH, T. DAHLGREN y P. SUNDBERG, 2003 Blackwell Publishing, Ltd Test of the monophyly of Odostomiinae and Turbonillinae (Gastropoda, Heterobranchia, Pyramidellidae) based on 16S mtDNA sequences. *Zoologica Scripta* **32**: 243-254.



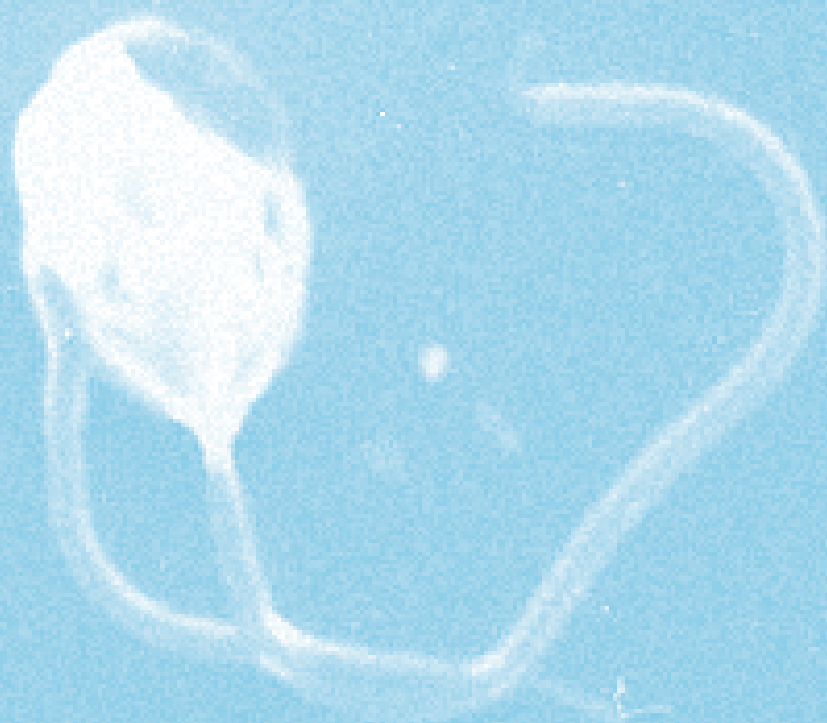
- SCHMIDT, G. D. y L. S. ROBERTS, 2000 *Foundations of Parasitology*. Michael D. Lange.
- SINDERMAN, C. J., 1990 *Principal diseases of marine fish and shellfish. Vol. 2: Diseases of marine shellfish*. Academic Press, Inc, San Diego, California.
- SMYTH, J. D., 1994 *Introduction to Animal Parasitology*. Cambridge University Press, Cambridge.
- SPARKS, A. K. y K. K. CHEW, 1966 Gross infestation of littleneck clam, *Venerupis staminea*, with a larval cestode (*Echeneibothrium* sp.). *Journal of Invertebrate Pathology* **8**: 413-416.
- STACHOWITSCH, M., 1980 The epibiotic and endolithic species associated with the gastropod shells inhabited by the hermit crabs *Paguristes oculatus* and *Pagurus cuanensis*. *Marine Ecology* **1**: 73-101.
- STEFANIAK, L. M., J. McATEE y M. J. SHULMAN, 2005 The cost of being bored: Effects of a clonid sponge on the gastropod *Littorina littorea* (L). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **327**: 103-114.
- STUNKARD, H. W. y J. R. UZMANN, 1958 Studies on digenetic trematodes of the genera *Gymnophallus* and *Parvatrema*. *Biological Bulletin* **115**: 276-302.
- SUN, W., S. SUN, W. YUQI, Y. BAOWEN y S. WEIBO, 2006 The prevalence of the pea crab, *Pinnotheres sinensis*, and its impact on the condition of the cultured mussel, *Mytilus galloprovincialis*, in Jiaonan waters (Shandong Province, China). *Aquaculture* **253**: 57- 63.
- SUNDET, J. H. y M. JOBLING, 1985 An investigation of the Interactions between the nemertine, *Malacobdella grossa*, and its bivalve host, *Arctica islandica*, pp. 185-197 in *18 th European Marine Biology Symposium*, editado por J. S. GREY y M. E. CHRISTIANSEN. *Marine Biology of Polar Regions and effects of stress of Marine of Marine Organisms*.
- TABLADO, A. y J. LÓPEZ GAPPA, 1995 Host-parasite relationships between the mussel, *Mytilus edulis* L., and the pea crab, *Tumidotheres maculatus* (Say), in the southwestern Atlantic. *Journal of Shellfish Research* **14**: 417-423.
- TEIA DOS SANTOS, A. M. y J. COIMBRA, 1995 Growth and production of raft-cultured *Mytilus edulis* L. in Ria de Aveiro: gonad symbiotic infestation. *Aquaculture* **132**: 195-211.
- TESO, S. V., G. BIGATTI, N. CIOCCO y P. PENCHASZADE, 2006 The reproductive cycle of the entocommensal nemertean *Malacobdella arrokeana* and its symbiosis with the geoduck *Panopea abbreviata*. *Invertebrate Biology* **125**: 314-324.
- THARME, R. E., S. C. WEBB y A. C. BROWN, 1996 Organisms associated with the sandy-beach bivalve *Donax serra* Röding, with a description of *Cercaria serrae* sp. nov. (Trematoda). *South African Journal of Zoology* **31**: 86-90.



- TINOCO-ORTA, G. y J. CÁCERES-MARTÍNEZ, 2003 Infestation of the clam *Chione fluc-tifraga* by the burrowing worm *Polydora* sp. nov. in laboratory conditions. Journal of Invertebrate Pathology **83**: 196-205.
- TYLER, S., S. SCHILLING, M. HOOGE y L. F. BUSH, 2006 Turbellarian taxonomic data-base, URL: <http://turbellaria.umaine.edu>.
- VAN SOEST, R., N. BOURY-ESNAULT, D. JANUSSEN y D. HOOPER, 2005 World Porifera database, URL: <http://www.marinespecies.org/porifera>.
- VÁZQUEZ, N., C. ITUARTE, G. T. NAVONE y F. CREMONTE, 2006 Parasites of the stout razor clam *Tagelus plebeius* (Psammobiidae) from the southwestern Atlantic Ocean. Journal of Shellfish Research **25**: 877-886.
- VÁZQUEZ, N., G. BIGATTI, C. ITUARTE & F. CREMONTE. 2009. Attachment of the nemertean *Malacobdella arrokeana* to the mantle of the geoduck *Panope-a abbreviata* and survival outside the host. Journal of Shellfish Research **28** (4): 759-761.
- VILLALBA, A., S. G. MOURELLE, M. J. CARBALLAL y C. LÓPEZ, 1997 Symbionts and diseases of farmed mussels *Mytilus galloprovincialis* throughout the culture process in the Rías of galicia (NW Spain). Diseases of Aquatic Organisms **31**: 127-139.
- WARBURTON, F. E., 1958 Boring sponges, *Cliona* species, of eastern Canada, with a note on the validity of *C. lobata*. Canadian Journal of Zoology **36**: 123-125.
- WARDLE, W. J., 1980 Occurrence of the symbiotic Rhabdocoele flatworm *Paravortex gemellipara* in Chesapeake bay and gulf of Mexico molluscs, with notes on its biology and geographic range. Estuaries **3**: 64-88.
- WHITE, M. E., E. N. POWELL, S. M. YAR y E. A. WILSON, 1987 Host to host transmission of *Perkinsus marinus* in oyster (*Crassostrea virginica*) populations by the ectoparasitic snail *Boonea impressa* (Pyramidellidae). Journal of Shellfish Research **6**: 1-5.
- WOLF, P. H., 1976 Occurrence of larval stages of *Tylocephalum* (Cestoda: Lecanicephaloidea) in two oyster species from northern Australia. Journal of Invertebrate Pathology **27**: 129-131.
- WOODS, C. M. C. y B. J. HAYDEN, 1998 An observation of the turbellarian *Paravortex* sp. in the New Zealand scallop *Pecten novaezelandiae* (Bivalvia: Pectinidae). New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research **32**: 551-553.
- YAMAGUTI, S., 1936 Parasitic copepoda from mollusk of Japan, I. Japanese Journal of Zoology **7**: 113-127.
- ZUNDELEVICH, A., B. LAZAR y M. ILAN, 2007 Chemical versus mechanical bioerosion of coral reefs by boring sponges-lessons from *Pione cf. vastifica*. The Journal of Experimental Biology **210**: 91-96.

10

RESPUESTA INMUNE DE MOLUSCOS



RESPUESTA INMUNE DE MOLUSCOS

Novoa B., Costa M. M., Prado M., Gestal C. y Figueras A.

Instituto Investigaciones Marinas. IIM-CSIC.
Eduardo Cabello 6, 36208 Vigo, España

Resumen

La alta densidad de cultivo a la que se ven sometidos los moluscos incrementa la posibilidad de que se vean afectados por algún organismo patógeno. Para hacer frente a estos patógenos, los invertebrados, a diferencia de los vertebrados, tan sólo poseen mecanismos de defensa inespecíficos (la conocida como inmunidad innata). Dentro de estos mecanismos de defensa inespecíficos se encuentran los mecanismos de defensa humorales y los celulares, los primeros se llevan a cabo por proteínas que se encuentran disueltas en la hemolinfa y los segundos están mediados por hemocitos.

Dentro de las proteínas disueltas en la hemolinfa que actúan como mecanismo de defensa se encuentran la lisozima, las lectinas, las opsoninas, las hemolisinas, las hemaglutininas, los péptidos antimicrobianos, etc.

Dentro de las respuestas inmunes de los hemocitos destacan: la respuesta inflamatoria, la fagocitosis, la agregación, la encapsulación y la liberación de radicales tóxicos (de oxígeno y de nitrógeno).

Abstract

The high density in which molluscs are cultured increases the possibility of being affected by pathogens. In order to fight against these pathogens, invertebrates, unlike vertebrates, have only an innate immunity (non specific)

of humoral and cellular responses. Proteins dissolved in the hemolymph are responsible of humoral responses and the cellular processes are mediated by hemocytes.

Lysozyme, lectins, opsonins, hemolysins, the hemagglutinins, antimicrobial peptides and several others can be mentioned among the proteins dissolved in the hemolymph that act against pathogens.

Immune responses of hemocytes include: the inflammatory response, phagocytosis, aggregation, encapsulation and release of toxic radicals (oxygen and nitrogen).

1. INTRODUCCIÓN

La explotación de moluscos es una actividad importante económicamente en todo el mundo, y se ha visto intensificada en el último siglo. El confinamiento y la alta densidad a la que se ven sometidos los moluscos en cultivo incrementan la importancia de los organismos patógenos y de la respuesta frente a los mismos.

El mejillón, al igual que el resto de los invertebrados, sólo posee mecanismos de defensa inespecíficos, es decir no presenta memoria inmunológica. Los mecanismos de defensa humorales se llevan a cabo por proteínas que se encuentran disueltas en la hemolinfa mientras que el componente de la inmunidad celular está mediado por células sanguíneas o hemocitos.

2. EL HEMOCITO

El término hemocito fue propuesto por Farley en 1968 y desde ese momento se acuñó este nombre para designar a las células circulantes de la hemolinfa de moluscos bivalvos (FARLEY 1968). Los hemocitos están implicados en numerosas funciones tanto fisiológicas (digestión y excreción) (NARAIN 1973) como de tipo inmune, siendo responsables de la defensa frente a patógenos (BAYNE 1980; FENG 1988).

A pesar de la diversidad de criterios para intentar clasificar los hemocitos, según la naturaleza de los orgánulos citoplasmáticos o en función de la tinción y morfología del núcleo (FENG 1971), hasta el momento se sigue manteniendo en vigor la clásica clasificación en



función del tipo y número de granulocitos del citoplasma, propuesta por Cheng en 1981 y basada en observaciones a través del microscopio electrónico de transmisión. Según este esquema, en la población celular de los hemocitos se diferencian hialinocitos, con un citoplasma claro y pocos o ningún gránulo y hemocitos granulares o granulocitos con un citoplasma bien desarrollado y con numerosos gránulos. Se han considerado, a mayores, otras acepciones para clasificar los hemocitos de bivalvos, los «agranulares» que provienen de la misma línea hematopoyética que los hemocitos granulares pero no tienen gránulos visibles y los «no granulares» que describen a los hemocitos cuyo citoplasma contiene pocos o ningún gránulo (AUFFRET 1988). Sin embargo, este criterio no consigue consensuar la clasificación de los hemocitos de diferentes bivalvos, ya que parece haber una gran diversidad entre familias e incluso entre especies dentro de la misma familia (AUFFRET 1988). En términos generales, se considera que los bivalvos tienen dos tipos de hemocitos: los granulares y los no granulares. La presencia de estos dos tipos celulares se confirmó en *Mya arenaria* y *Mytilus galloprovincialis* (CAJARAVILLE *et al.* 1995).

Además de técnicas morfológicas y citoquímicas se ha utilizado también la técnica de separación de poblaciones usando gradientes de densidad que consigue diferenciar más subpoblaciones de hemocitos en *Crassostrea virginica* (CHENG *et al.* 1980), en *Crassostrea gigas* (BACHERE *et al.* 1988) y en *Ostrea edulis* (XUE *et al.* 2000). La identificación de subpoblaciones mediante la utilización de anticuerpos monoclonales se consiguió en *Mytilus edulis* (DYRYNDA *et al.* 1997; PIPE *et al.* 1997) pero no en *Ruditapes decussatus* cuyas poblaciones de granulocitos fueron diferenciadas en función de la acidificación de los gránulos, (LÓPEZ *et al.* 1997) técnica que se utilizó también para distinguir las subpoblaciones de la almeja *Tridacna crocea* (NAKAYAMA *et al.* 1997).

La reciente aplicación de técnicas de citometría de flujo utilizando marcadores fluorescentes permitió además de la identificación, la caracterización funcional de cada una de las subpoblaciones de hemocitos (XUE *et al.* 2001; ALLAM *et al.* 2002; HEGARET *et al.* 2003; LAMBERT *et al.* 2003; GOEDKEN y DE GUISE 2004; BUGGE *et al.* 2007; GARCÍA-GARCÍA *et al.* 2008).



2.1. Funciones inmunes de los hemocitos

Respuesta inflamatoria

En el proceso inflamatorio intervienen tanto componentes humorales como celulares. Este mecanismo se define como el reclutamiento hemocitario y la extravasación de proteínas plasmáticas hacia el lugar de la infección (ABBAS y LICHTMAN 2000). La respuesta inflamatoria empieza tras una lesión tisular que en ocasiones se encuentra acompañada de la entrada de un agente extraño cuya naturaleza puede ser diversa (biológica, física o química). Este proceso puede terminar con la destrucción del tejido dañado, el aislamiento del organismo invasor o la completa reparación del tejido (FENG 1988).

Las primeras barreras que deben de atravesar los patógenos para acceder al interior de un organismo, son las físico-químicas. En el caso de los moluscos bivalvos estas barreras se encuentran formadas por la concha y el mucus que posee enzimas con actividad bactericida (GLINSKI y JARROS 1997; RATCLIFFE *et al.* 1985). Una vez superadas las barreras físico-químicas, son los componentes celulares y humorales los que participan en la eliminación del agente exógeno. Los hemocitos juegan un papel protagonista en la reparación tisular que se lleva a cabo, según algunos autores, siguiendo seis etapas (DES VOIGNE y SPARKS 1968; 1969; RUDELL 1971). La primera de ellas consiste en una migración de los hemocitos hasta el lugar de la herida (FISHER 1986; LAUCKNER 1983). En la segunda se lleva a cabo la formación de un tapón tras la agregación hemocitaria; en la tercera de las etapas se reemplaza el tejido dañado mediante el traslado de los hemocitos desde el interior de la lesión hacia el sitio de la herida; en cuarto lugar se produce una deposición de colágeno por parte de los fibroblastos (RUDELL 1971), en quinto lugar se eliminan los restos celulares mediante la acción fagocítica de los granulocitos y ya finalmente, en una sexta etapa se reestructura la arquitectura tisular (RATCLIFFE *et al.* 1985; FISHER 1986; SPARKS y MORADO 1988).

Fagocitosis

El término *fagocitosis* fue definido por primera vez por METCHNIKOFF (1891) como un mecanismo por el cual las células tienen la capacidad de absorber partículas alimenticias. Los organismos unicelulares más



primitivos utilizan este sistema como método de ingestión de nutrientes y también está presente en procesos inflamatorios en vertebrados superiores. Se puede afirmar, por lo tanto, que la fagocitosis es un proceso conservado a lo largo de la evolución que se da de manera universal en todo el reino animal desde protozoos hasta animales superiores (FENG 1988). En moluscos bivalvos, la fagocitosis se ha detectado en diferentes especies como la vieira europea, *Pecten maximus*, (MORTENSEN y GLETTE 1996), la almeja fina y americana, *Ruditapes decussatus* y *Mercenaria mercenaria* (LÓPEZ *et al.* 1997; TRIPP 1992) y también en el mejillón del Mediterráneo, *Mytilus galloprovincialis* (CARBALLAL *et al.* 1997). Este proceso puede dividirse en cinco etapas que consisten en el reconocimiento de la partícula no propia, adhesión, ingestión, destrucción y eliminación. Las dos primeras se pueden dar por el encuentro al azar entre la célula fagocítica y la partícula extraña o bien activamente mediante quimiotaxis. Los mecanismos por los cuales los hemocitos se ven atraídos hacia partículas no propias parecen estar mediados por pequeñas moléculas de naturaleza peptídica liberadas por los organismos patógenos o bien por componentes de la pared celular (HOWLAND y CHENG 1982; FAWCETT y TRIPP 1994). El reconocimiento de las partículas extrañas se produce a través de la interacción entre el hemocito (probablemente receptores celulares) y diversos PAMPs (FAWCETT y TRIPP 1994; FENG 1988). Los procesos de adhesión constituyen la siguiente etapa del proceso fagocítico. En este paso juegan un papel primordial proteínas presentes en el suero, como las aglutininas que median la unión del agente extraño a los posibles receptores presentes en la superficie celular de los hemocitos. Sin embargo, no son los únicos factores humorales descritos en invertebrados que pueden llevar a cabo esta función (RATCLIFFE *et al.* 1985). Tras la actuación de los mecanismos de adhesión se produce la ingestión de las partículas extrañas por parte de los hemocitos. Estos procesos de adhesión se pueden llevar a cabo mediante diferentes vías. Normalmente los hemocitos emiten pseudópodos englobando y atrapando a los microorganismos (RATCLIFFE *et al.* 1985). A veces no se emiten pseudópodos pero sí se producen invaginaciones de la membrana plasmática para la internalización de las partículas (RATCLIFFE *et al.* 1985; FISHER 1986; LÓPEZ *et al.* 1997). La inhibición de la polimerización de la actina reveló



que el citoesqueleto juega un papel primordial en los procesos de internalización (CHENG y HOWLAND 1982). Los últimos pasos del proceso fagocítico vienen determinados por la destrucción y digestión del patógeno. Independientemente del mecanismo de internalización utilizado, se producen vacuolas fagocíticas conocidas como fagosomas que interaccionan con los lisosomas presentes en los hemocitos (FISHER 1986). El interior del lisosoma está repleto de enzimas hidrolíticas ácidas que atacan a las vacuolas recién formadas liberando su contenido al interior de las mismas y destruyendo al agente patógeno (RATCLIFFE *et al.* 1985; FISHER 1986; CARBALLAL *et al.* 1997; LÓPEZ *et al.* 1997). Tras la destrucción intracelular de un patógeno se forman gránulos de glucógeno que o bien son utilizados en procesos metabólicos del hemocito o bien se liberan al suero (FISHER 1986). En ocasiones las bacterias se pueden destruir en el medio extracelular utilizando enzimas y productos intracelulares que son liberados al plasma. La liberación de estas moléculas viene determinada por los procesos de degranulación donde la lisozima y otros productos acumulados en gránulos en el citoplasma se liberan al medio mediante procesos de exocitosis (FISHER 1986).

Agregación

La agregación o formación de nódulos no es un proceso aislado, sino que aparece asociado a los mecanismos de fagocitosis. Suele ocurrir cuando la hemolinfa se encuentra invadida por un elevado número de agentes extraños y la fagocitosis por sí sola no puede eliminarlos (RATCLIFFE *et al.* 1985). Los hemocitos, junto con otras células no fagocíticas se unen por sus filopodios que, posteriormente, se acortan para formar una maraña tisular donde quedan atrapadas las partículas no propias (DREW 1910). El proceso termina con la eliminación del patógeno y el posterior depósito de melanina. No se conocen exactamente los mecanismos por los cuales estos nódulos son capaces de combatir a los microorganismos patógenos pero se cree que la inanición que sufren dentro de los propios agregados, la producción de la melanina y de sus precursores, altamente tóxicos, junto con la liberación de enzimas intracelulares como la lisozima, pueden ser los responsables (RATCLIFFE *et al.* 1985).



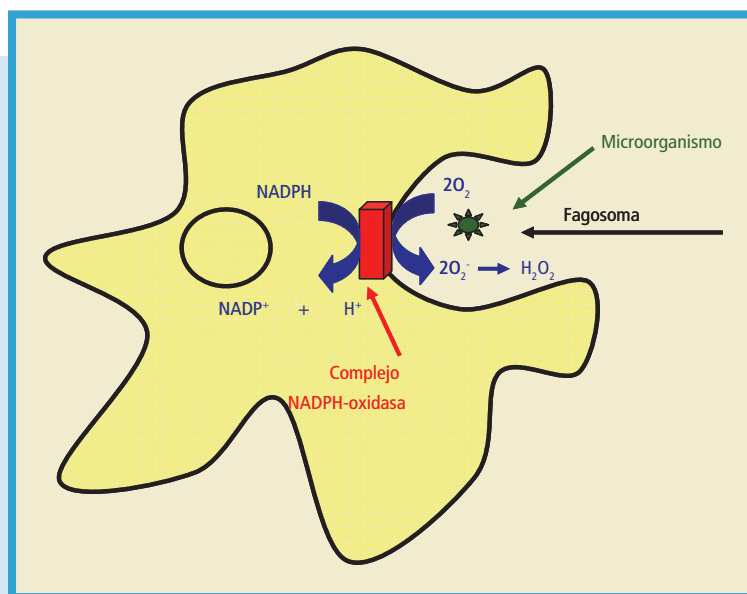
Encapsulación

Cuando un agente exógeno es capaz de superar las barreras de fagocitosis y agregación, los invertebrados ponen en marcha el proceso de encapsulación para paralizar la entrada de microorganismos (FISHER 1986; FENG 1988). Aquellas partículas cuyo tamaño supera en exceso al de un hemocito y, por lo tanto, no pueden ser fagocitadas, se ven rodeadas de hemocitos produciéndose posteriormente un depósito de fibroblastos (TRIPP 1961). Se constituyen una serie de capas concéntricas donde las más internas están formadas por fibroblastos y residuos mucopolisacáridicos, y las más externas están constituidas por materiales fibrosos formando un retículo en asociación con glicoproteínas (CHENG y RIFKIN 1970). La actividad primera del hemocito se centra en intentar fagocitar a la partícula extraña. Tan sólo cuando este mecanismo fracasa se produce el depósito de fibroblastos (FISHER 1986).

Liberación de radicales tóxicos

– Radicales de oxígeno:

En los procesos de fagocitosis se produce una elevada producción de radicales de oxígeno que se conoce como estallido respiratorio y que no está asociado a la cadena mitocondrial ya que el uso de inhibidores de la misma como la azida sódica o el cianuro, no consiguen reducirlo. Este consumo de oxígeno se debe a la acción del complejo multiproteico conocido como NADPH-oxidasa, que es capaz de transferir electrones desde el NADPH al oxígeno molecular. Tras el contacto de un hemocito con una partícula no propia se producen pequeñas perturbaciones en la membrana celular que hacen que los componentes del sistema NADPH oxidasa se ensamblen para formar el complejo funcional que forma el sistema enzimáticamente activo (TORREILLES *et al.* 1996). La enzima reduce el oxígeno molecular a intermediarios de oxígeno reactivos (ROIs) como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), radical hidroxilo (OH^\cdot), el anión superóxido (O_2^\cdot), el ácido hipocloroso ($HOCl$) y el oxígeno simple (1O_2) (Fig. 1). Los ROIs son moléculas efectoras que pueden actuar por sí mismas o bien interaccionando con los enzimas hidrolíticos que se liberan en el proceso de fagocitosis (ADEMA *et al.* 1991). La detección de ROIs se puede llevar a cabo utilizando diferen-


FIGURA 1.

Representación esquemática de un hemocito fagocitando a una partícula extraña y los mecanismos moleculares que explican el estallido respiratorio.

tes técnicas: mediante la oxidación del *nitroblue tetrazolium* (NBT) que mide la producción intracelular (PIPE 1992), mediante la reducción del citocromo C espectroscópicamente que mide la liberación de ROIs al exterior celular (PIPE *et al.* 1997) y mediante quimioluminiscencia (QL) que permite cuantificar al mismo tiempo ambos tipos de liberación. Los ROIs son moléculas que se encuentran en un estado excitado por haber recibido electrones, por lo tanto son inestables y tienden a regresar a su estado basal, proceso en el que se liberan los electrones sobrantes acompañados de una emisión de fotones. Sin embargo, esta emisión de luz es muy débil y se emplean determinadas moléculas como el luminol hidrazido cíclico (5-amino-2,3-dihidro-1,4-ftalazinediona) (ALLEN y LOOSE 1976) para amplificar la señal. El luminol se reduce al recibir los electrones liberados por los ROIs y cuando regresa a su estado basal emite nuevamente luz y fotones, pero en esta ocasión la señal



luminosa es unas 1.000 veces más intensa y por lo tanto, detectable en un luminómetro (Fig. 2). Como el luminol tiene la capacidad de entrar en la célula se puede cuantificar tanto la producción intra como extracelular (ADEMA *et al.* 1991; NOËL *et al.* 1993). Actualmente se ha desarrollado una nueva técnica que también permite ambos tipos de medición y que se basa en la utilización de sondas fluorescentes debido a la presencia del compuesto 2,7-diclorodihidrofluoresceína-diacetato (DCFH-DA). Como el diacetato es un grupo apolar, estas sondas difunden fácilmente a través de la membrana plasmática. Una vez en el interior celular las esterasas del citosol hidrolizan el grupo acetato dejando libre la molécula de DCFH, que ahora presenta características polares. Las especies reactivas de oxígeno pueden ser detectadas por la diclorofluoresceína que cuando reacciona con ellas se oxida convirtiéndose en un producto fluorescente, pasando de DCFH a 2,7-diclorofluoresceína (DCF). Esta fluorescencia se puede cuantificar mediante diferentes técnicas como la citometría de flujo (LAMBERT *et al.* 2003; GOEDKEN y DE GUISE 2004; BUGGÉ *et al.* 2007). La producción de ROIs se ha detectado en varias especies de moluscos bivalvos como en la ostra americana (*Crassostrea virginica*) (ANDERSON 1994; AUSTIN y PAYNTER 1995), la ostra japonesa (*Crassostrea gigas*) y la ostra plana (*Ostrea edulis*) (BACHÈRE *et al.* 1991), la vieira europea (*Pecten maximus*) (LE GALL *et al.* 1991), la almeja americana (*Mercenaria mercenaria*)

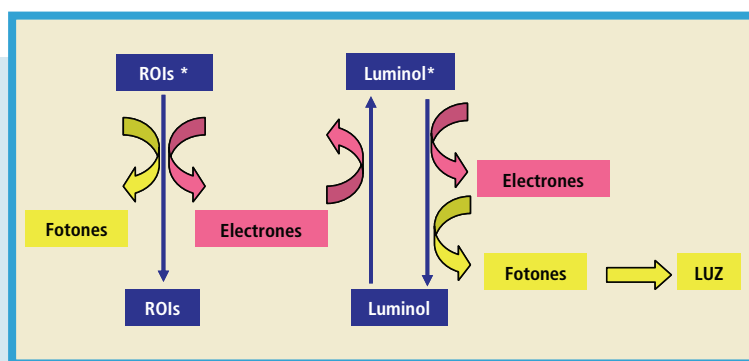


FIGURA 2.

Representación esquemática del proceso de quimioluminiscencia.

(BUGGÉ *et al.* 2007), el mejillón azul (*Mytilus edulis*) (PIPE 1992) y en el mejillón del Mediterráneo (*Mytilus galloprovincialis*) (TORREILLES *et al.* 1996; ORDÁS *et al.* 2000).

– Radicales de nitrógeno:

La mayoría de los organismos son capaces de producir pequeñas cantidades de óxido nítrico (NO) a partir del aminoácido arginina. En esta reacción catalizada por la Óxido Nítrico Sintasa (NOS) se genera un intermediario inestable que es el N^G-hidroxiarginina, que da lugar a los dos productos finales: la citrulina y el NO (Fig. 3) (NATHAN y XIE 1994). Sin embargo, el NO es un gas inestable que se transforma

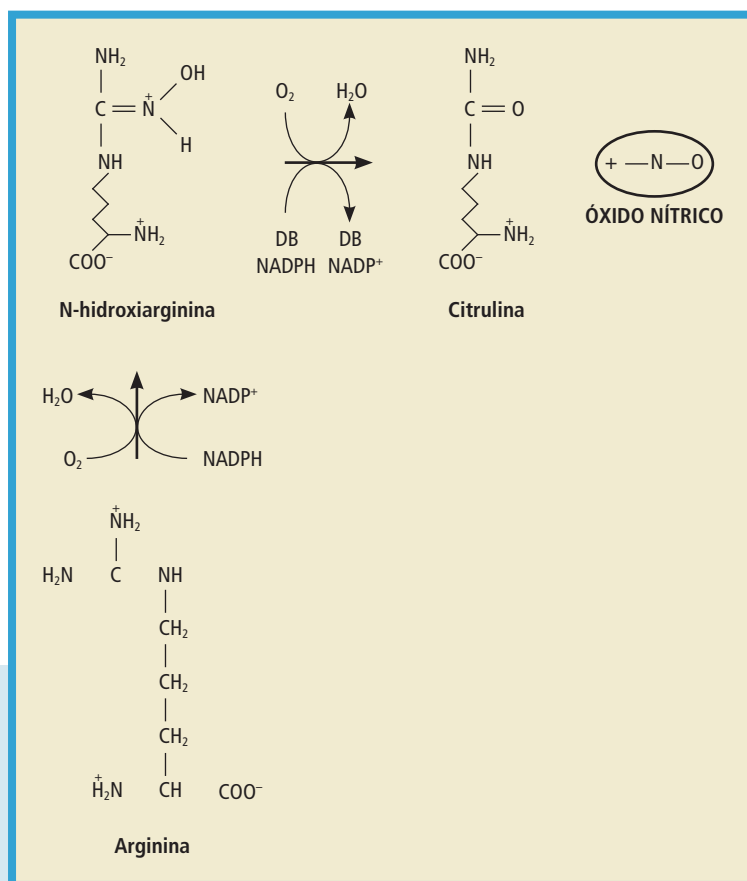


FIGURA 3.
Representación
de la reacción
enzimática
mediada por la
NOS.



rápida en nitrito (NO_2^-) y nitrato (NO_3^-), que constituyen los productos estables de la reacción. Existen tres isoformas de la NOS, dos de ellas se consideran constitutivas y dependientes del calcio (cNOS): la endotelial y la neuronal, las cuales sintetizan NO en condiciones basales. La tercera de ellas es inducible e independiente del calcio (iNOS) y no se expresa o lo hace muy débilmente en condiciones fisiológicas (FÖRSTERMANN *et al.* 1991).

Entre los ROIs generados tras el proceso del estallido respiratorio se encuentra el O_2^- tal y como se ha descrito en el apartado anterior. Este radical presenta una potente actividad bactericida ya de por sí pero además puede combinarse con el óxido nítrico (NO) para generar peroxinitrito (ONOO^-), un radical de nitrógeno con un elevado poder oxidante así como una gran actividad citotóxica (ROSEN *et al.* 1995) contra bacterias como *Escherichia coli* (HURST y LYMAR 1997), parásitos como *Trypanosoma cruzi* (DENICOLA *et al.* 1996) o incluso hongos como *Candida albicans* (VÁZQUEZ-TORRES *et al.* 1996).

En moluscos se ha demostrado la presencia de actividad de sintasas de óxido nítrico y la liberación de NO_2^- y NO_3^- en hemocitos de diferentes especies como *Crassostrea gigas* (TORREILLES y ROMESTAND 2001; NAKAYAMA y MARUYAMA 1998), *Crassostrea virginica* (VILLAMIL *et al.* 2007), *Ruditapes decussatus* (TAFALLA *et al.* 2003), *Mytilus edulis* (OTTAVIANI *et al.* 1993) y *Mytilus galloprovincialis* (ARUMUGAM *et al.* 2000; GOURDON *et al.* 2001; TORREILLES y ROMESTAND 2001; TAFALLA *et al.* 2002; NOVAS *et al.* 2004). En la mayoría de los casos, los radicales de nitrógeno se generan y liberan tras la estimulación de los hemocitos con diferentes partículas tanto solubles como no solubles entre las que destacan el forbol-miristato-acetato (PMA) (NAKAYAMA y MURAYAMA 1998; TAFALLA *et al.* 2002), la laminarina (ARUMUGAM *et al.* 2000), el lipopolisacárido (LPS) (OTTAVIANI *et al.* 1993) o el zimosán (TAFALLA *et al.* 2003). Aunque la mayoría de estas moléculas son consideradas como PAMPs por tratarse de constituyentes estructurales de microorganismos, son todas ellas partículas inertes. La producción de radicales de nitrógeno no sólo se ha relacionado con la estimulación de esta clase de partículas sino que también existen datos que confirman que la liberación de NO puede verse modulada por organismos vivos como el protozoo *Perkinsus marinus* en la ostra americana, *Crassostrea virginica* (VILLAMIL *et al.* 2007).

Existen varias técnicas para la medición de la producción de NO en hemocitos de moluscos. Como ya hemos indicado previamente, el NO puede combinarse con el O_2^- para formar $ONOO^-$. Este peroxinitrito es un radical inestable que tiende a regresar a su estado basal. Al igual que ocurría en el caso de los ROIs se puede utilizar la quimioluminiscencia mediada por luminol para detectar esta producción (RADI *et al.* 1993; GOURDON *et al.* 2001), siguiendo el mismo esquema mostrado en la Figura 2. La determinación de radicales de nitrógeno también se puede medir utilizando una reacción colorimétrica conocida como reacción de Griess (GREEN *et al.* 1982). Durante este proceso los NO_3^- formados como consecuencia de la transformación del NO reaccionan con la sulfanilamida (añadida durante el proceso) dando lugar a una sal de diazonio. Esta sal puede acoplarse a otro de los compuestos empleados en la reacción (naftil-etilenediamina) para dar lugar a un producto con un determinado espectro de absorción. Es una reacción indirecta donde la cantidad de color obtenida (calculada mediante una recta patrón) es proporcional a la cantidad de NO producido (TAFALLA *et al.* 2002). Las técnicas inmunológicas basadas en el inmunoensayo acoplado a enzimas (ELISA) también se han empleado utilizando anticuerpos que reconocen a la nitrotirosina, molécula que se forma tras la reacción entre el NO y residuos de tirosina de las proteínas celulares (TORREILLES y ROMESTAND 2001). Además de los métodos previamente descritos se han llevado a cabo técnicas basadas en la fluorescencia para estudiar la producción de radicales de nitrógeno. Algunas de ellas emplean la reacción de Misko (1993) que se basa en la formación de un compuesto fluorescente, el 2,3-diamino-naftotriazol a partir del NO_2^- , pudiendo ser medido mediante un lector (ARUMUGAM *et al.* 2000; NAKAYAMA y MARUYAMA 1998), o bien aquellas técnicas que usan sondas como la diaminofluoresceína-diacetato (DAF-DA). Al igual que ocurría con la DCF-DA, estas sondas pueden acceder al interior de la célula y una vez dentro, el grupo diacetato se pierde formándose DAF. La transformación en fluorescentes se produce cuando las diaminas aromáticas que forman parte de su estructura reaccionan con el NO en presencia de oxígeno (KOJIMA *et al.* 1998). Esta fluorescencia puede ser cuantificada mediante técnicas como la citometría de flujo (GARCÍA-GARCÍA *et al.* 2008).



3. COMPONENTES DEL SISTEMA INMUNE DE LOS MOLUSCOS

3.1. Lisozima

La lisozozima es una proteína hidrolítica que rompe el enlace glucosídico de los peptidoglucanos de la pared celular de bacterias. Las enzimas lisosomales son elementos importantes de defensa y digestión en moluscos bivalvos. Estas enzimas participan en la destrucción y degradación de microorganismos dentro y fuera de los hemocitos. Modifican la conformación molecular de la superficie del patógeno y favorecen su reconocimiento por las células fagocíticas. Las enzimas lisosomales se acumulan en lisosomas en los granulocitos fagocíticos (RODRICK y CHENG 1974). Los lisosomas se fusionan con los fagosomas donde se produce la degradación de las partículas fagocitadas. A su vez, asociado al proceso de fagocitosis, se produce la liberación de enzimas lisosomales (arilsulfatasa, β -glucoronidasa y lisozima) por los granulocitos por el proceso denominado degranulación que no implica rotura de la membrana plasmática de la célula (PIPE 1990). Las enzimas hidrolíticas están también presentes en el estilo cristalino y en diversículos digestivos dentro de la célula (LUNA-GONZÁLEZ *et al.* 2004). Hasta hace poco se creía que la lisozima podría estar implicada tanto en procesos de defensa como de digestión; sin embargo, recientemente se han descrito lisozimas implicadas únicamente en procesos de digestión en *C. virginica* (XUE *et al.* 2007) y *C. gigas* (ITOY y TAKAHASHI 2007) cuyas secuencias nucleótídicas tienen gran similitud con las descritas anteriormente implicadas en defensa.

Tradicionalmente la presencia de enzimas lisosomales se ha demostrado mediante técnicas colorimétricas y de determinación de actividad enzimática tanto en hemocitos como en plasma. Así se ha descrito actividad lisozima en numerosos bivalvos: *C. virginica* (MCDADE y TRIPP 1967), *Mercenaria mercenaria* (CHENG *et al.* 1975), *Mya arenaria* (CHENG y RODRICK 1974), *Ostrea edulis* (CRONIN *et al.* 2001), *C. gigas* (LUNA-GONZÁLEZ *et al.* 2004), *Mytilus galloprovincialis* (CARBALLAL *et al.* 1997), *M. edulis* (MCHENERY y BIRKBECK 1982) y *Ruditapes decussatus* (LÓPEZ *et al.* 1997). Las enzimas hidrolíticas se encuentran tanto en el suero de la hemolinfa como en el extracto celular, en unos organismos



aparece mayor concentración de lisozima en las células que en el suero pero se sabe que la producción de esta enzima se ve regulada por la edad, es altamente variable entre individuos (CRONIN *et al.* 2001) y su liberación está asociada a los cambios fisiológicos, al estrés (LÓPEZ *et al.* 1997) y a la infección frente a bacterias (LI *et al.* 2008).

3.2. Lectinas, hemaglutininas y opsoninas

Las lectinas son proteínas que reconocen carbohidratos y aparecen en fluidos corporales, tejidos y células. Basándose en su estructura y sus propiedades de unión han sido clasificadas en varias familias, las tipo C, P, F e I, ficolinas, pentraxinas y galectinas y se encuentran muy ampliamente distribuidas en el reino animal (VASTA *et al.* 2004).

En un principio las proteínas que hoy conocemos como lectinas en bivalvos, se designaron hemaglutininas, término que hacía referencia a la capacidad funcional de la proteína de aglutinar eritrocitos. Las hemaglutininas son glicoproteínas con receptores multivalentes para ciertos carbohidratos específicos. Tenían además una estructura con subunidades de peso molecular muy similar. Las hemaglutininas se inhiben con la presencia de ciertos oligosacáridos como N-acetil D glucosamina, D-glucosamina (ARIMOTO y TRIPP 1977), se inactivan con calor a partir de 65 °C y necesitan iones de calcio para la termoestabilización y una eficaz aglutinación de partículas extrañas. Desde finales de la década de los 60 se identificaron proteínas en el plasma de moluscos bivalvos con capacidad de aglutinar eritrocitos en *Mytilus edulis* (BROWN *et al.* 1968 y HARDY *et al.* 1976), *Crassostrea virginica* (TRIPP 1966) y en *Crassostrea gigas* (HARDY *et al.* 1977). Más tarde se demostró que tanto en este organismo como en otros bivalvos, la almeja *Mercenaria mercenaria* (ARIMOTO y TRIPP 1977) y la ostra *Crassostrea virginica*, estas proteínas aglutinantes tenían capacidad de aglutinar no sólo eritrocitos sino también otro tipo de células como algas y bacterias (aglutininas de bacterias). En 1980, fue Lackie quien introdujo la idea de que las hemaglutininas caracterizadas hasta el momento parecían ser lectinas (LACKIE 1980), ya que eran proteínas de unión divalente o multivalente a carbohidratos y aglutinan células y otras superficies. Y sugirió que las lectinas en invertebrados podrían actuar como moléculas de reconocimiento del sistema inmune, de forma que para que



sean funcionalmente efectivas deben al menos, inactivar bacterias invasoras por aglutinación, actuar como opsoninas reconociendo a la vez la partícula extraña y el fagocito o formar parte de la superficie de células inmunes como molécula de reconocimiento de membrana. Cualquiera de los dos últimos mecanismos favorecen la fagocitosis de partículas extrañas, creando un efecto opsonizante del plasma (CHU 1988). La principal función inmune de las aglutininas, según Vasta, es el reconocimiento de partículas extrañas como bacterias y parásitos que entran en contacto con la hemolinfa y median su fagocitosis, melanización y encapsulación. No sólo aparecen en forma soluble en la hemolinfa, también se han descrito lectinas de membrana en *Crasostrea virginica* (VASTA *et al.* 1982 y 1984).

Aunque los términos lectina, aglutinina y opsonina son diferentes por definición, hasta que se identificaron las características específicas de cada proteína, la terminología utilizada creaba confusión en su identificación y funcionalidad. Finalmente, Chu en 1988, ante la imposibilidad de poder distinguir aglutinina de lectina llegó a la conclusión de que las aglutininas de invertebrados parecían ser lectinas y los términos aglutinina y opsonina parecían acuñar características funcionales de una misma proteína (CHU 1988).

Se han descrito procesos de aglutinación de bacterias en *C. virginica* (FISHER y DINUZZO 1991), en *C. gigas* (OLFASEN 1995), *Calyptogena magnifica* (FISHER y DINUZZO 1991), *Modiolus modiolus* (TUNKIJANUIJ *et al.* 1997), *Mytilus galloprovincialis* (CANESI *et al.* 2002), *Mercenaria mercenaria* (TRIPP 1992), *Pinctada maxima* (FLOWER 1985) y en *M. edulis* (MULLAINADHAN 1986). Y existen también claras evidencias de efectos opsonizantes en la hemolinfa de moluscos bivalvos en *C. gigas* (OLFASEN 1995), *Modiolus modiolus* (TUNKIJANUIJ *et al.* 1998), *M. edulis* (KUMAZAWA *et al.* 1993) y *M. galloprovincialis* (CANESI *et al.* 2001).

La presencia de lectinas en bivalvos se ha confirmado mediante la identificación de la proteína purificada en *Saxidomus purpuratus* (TATSUMI *et al.* 1982), en la almeja *Anadara granosa* (DAM *et al.* 1994), en la almeja gigante *Hippopus hippopus* (PUANGLARP *et al.* 1995) y en el mejillón *Modiolus modiolus* (TUNKIJANUKIJ *et al.* 1997) y mediante la caracterización de la proteína o dominios con homología a aquellos presentes en lectinas. Hasta el momento se han secuenciado y caracte-



rizado dominios distintivos de lectinas en los siguientes bivalvos: en la ostra *Ostrea chilensis* (MINAMIKAWA 2004), en la almeja *R. philippinarum* (BULGAKOV *et al.* 2004; KANG *et al.* 2006; KIM *et al.* 2008; TAKAHASHI *et al.* 2008), en la ostra *Pteria penguin* (NAGANUMA *et al.* 2006), en *Argopecten irradians irradians* (SONG *et al.* 2006), en la almeja tropical *Codakia orbicularis* (GOURDINE y SMITH-RAVIN 2007), en *Chlamys farreri* (WANG *et al.* 2007), y en *C. virginica* (TASUMI *et al.* 2007).

3.3. Hemolisinas

La lisis de eritrocitos por moléculas liberadas por hemocitos, molécula denominada hemolisina, se detectó en *Mercenaria mercenaria* (ANDERSON 1981), en *Mytilus edulis* (HARDY *et al.* 1976; WITKE y RENWRANTZ 1984), en *Corbicula fluminea* (YOSHINO y TUAN 1985). La hemolisina se inactiva a 47 °C, es dependiente de la concentración de iones de calcio e inducible tras una infección (ANDERSON 1981). Varios autores coinciden en afirmar que la molécula causante de la lisis de eritrocitos es liberada por los hemocitos (WITKE y RENWRANTZ 1984) y se trata de un potente mecanismo de defensa que junto con las aglutininas colabora en la encapsulación y eliminación de patógenos (LEIPPE 1988).

3.4. Sistema de complemento

El sistema de complemento está formado por más de 30 proteínas solubles del plasma autorregulables y que colaboran en reconocimiento de partículas extrañas. El componente central del sistema de complemento es el C3 que se activa proteolíticamente por una C3 convertasa a través de las rutas clásica, de las lectinas y la alternativa en vertebrados (NONAKA y YOSHIZAKI 2004). En la ruta de activación clásica las inmunoglobulinas son reconocidas por la proteína C1 y la ruta de las lectinas comienza con el reconocimiento de carbohidratos de membrana por las lectinas de unión a manosa y ficolinas (NONAKA y KIMURA 2006). Estas dos rutas comparten los siguientes componentes de la cascada el C2 y el C4, que finalmente activan el C3. Sin embargo, la ruta de activación alternativa se activa espontáneamente por hidrólisis mediante unión covalente a superficies cercanas sin distinción de lo propio (SMITH 1999). En la vía alternativa es necesaria la presencia de



factores que regulen la función del C3, como son el factor B que activa más C3 sobre superficies de partículas extrañas y los factores H e I que inactivan el C3 cuando reconoce los propios tejidos (DODDS 2002).

Una vez que el C3 es activado la proteólisis libera dos péptidos, el C3a y el C3b cuyas funciones son la eliminación directa del patógeno o la facilitación de la respuesta immune. Estos mecanismos incluyen fagocitosis de partículas opsonizadas (ZAKARDIS *et al.* 2001), inflamación y lisis de membrana celular del patógeno mediante activación del componente C5 y las proteínas terminales del complemento que forman el complejo de ataque a la membrana (MAC) (BOSHRA y SUNYER 2006).

El origen de la subfamilia del C3 en deuteróstomos se consideró que era una alfa2-macroglobulina sin función immune (NONAKA 2001) que tras evolución gradual dio lugar a las proteínas del complemento con función immune (BARTL *et al.* 2003). El C3 parece que se perdió varias veces en la evolución de los organismos protóstomos ya que tras la revisión total de los genomas de la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* y del nematodo *Caenorhabditis elegans* no apareció ningún gen relacionado con el sistema del complemento (NONAKA 2006).

Los bivalvos poseen mecanismos de defensa como lisis celular y aglutinación-opsonización que se engloban dentro de funciones de complemento. En 1988 Chu introdujo ya la idea de la posible analogía de la hemolisina del suero con un rudimentario sistema de complemento en mejillón (CHU 1988). Estos procesos pueden ser igualmente atribuibles a otros factores humorales sin implicación de un sistema de complemento. Sin embargo, en los últimos años con el desarrollo de nuevas técnicas moleculares se han descrito nuevas proteínas relacionadas con el sistema de complemento, como la adiponectina con dominio C1q en la almeja *Ruditapes decussatus* (PRADO-ALVAREZ *et al.* 2009a), la C-lectina con función immune y proteínas pertenecientes a la superfamilia las TEP (proteína con enlace tioester) en la vieira *Chlamys farreri* (WANG *et al.* 2007) (MA *et al.* 2005; ZHANG *et al.* 2007).

No obstante, la certeza de que los bivalvos poseen un sistema de complemento se confirmó con la descripción del componente central C3 y de la proteína reguladora, factor B en la almeja fina *Ruditapes decussatus* (PRADO-ALVAREZ *et al.* 2009b). El C3 de la almeja fina posee



3 cadenas al igual que el C3 de otros organismos invertebrados y se incluye dentro del grupo de los proto-C3, ancestro común de los 3 componentes de la subfamilia de las proteínas del complemento C3, C4 y C5 (NONAKA y YOSHIZAKI 2004).

El factor B de almeja posee la característica distintiva de poseer una estructura de dominios en mosaico diferente a cualquier otro organismo descrito hasta la fecha. A pesar de que existe gran diversidad en la disposición de los dominios en el factor B de invertebrados, todos ellos se consideran un grupo ortólogo al grupo de factor B y C2 de mamíferos (NONAKA y KIMURA 2006). La presencia del componente central del complemento C3 y de la proteína reguladora de factor B es suficiente para que este sistema de complemento arcaico sea funcional (LACHMANN y HOBART 1979). La efectividad del sistema de complemento de la almeja fina se demostró en estudios de inhibición del C3 en ensayos de lisis de eritrocitos y de opsonización. Los resultados obtenidos demostraron la implicación de esta proteína en dichos procesos y permiten afirmar la existencia de un primitivo y efectivo sistema de complemento en moluscos. (PRADO-ALVAREZ *et al.* 2009).

3.5. Receptores Toll-like (TLRs)

Los TLRs son una familia de proteínas de membrana que actúan como receptores de patrones de reconocimiento (PRRs) al estar implicados en el reconocimiento de diferentes PAMPs (MEDZHITOV *et al.* 1997). Son moléculas transmembrana que poseen un dominio extracelular con motivos ricos en repeticiones de leucina (LRR), un motivo flanqueante de cisteína, un dominio transmembrana (TM) y un dominio intracelular conocido como receptor Toll/IL-1 (TIR) (ABBAS y LICHTMAN 2000) (Fig. 4). Hasta la fecha, se han descrito 10 tipos de TLRs en mamíferos (TAKEDA y AKIRA 2001) donde cada uno de ellos reconoce una determinada estructura patrón presente en los microorganismos. La unión de un determinado ligando al motivo LRR desencadena una cascada de transducción de señales que, en último término, activa a factores de transcripción que dan lugar a la expresión de genes implicados en respuesta inmune (TAKEDA y AKIRA 2004; ADEREM y ULEVITCH 2000). En moluscos bivalvos, se han identificado varias ESTs con homología a TLR en la ostra americana, *Crassostrea gigas* (TANGUY *et al.*

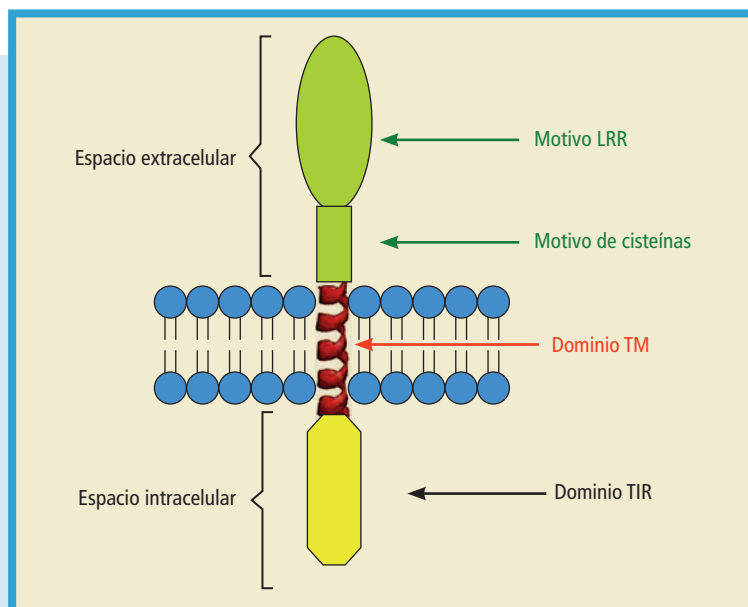


FIGURA 4.

Representación esquemática de la estructura de un TLR.

2004) y en la vieira *Argopecten irradians* (SONG *et al.* 2006). Además, en la vieira de Alaska, *Chlamys farreri*, se ha llevado a cabo la caracterización molecular completa de un receptor con homología al Toll de *Drosophila* y denominado CfToll-1 cuya expresión se ve modulada por LPS (QIU *et al.* 2007).

3.6. Sistema profenol-oxidasa (proPO)

La fenoloxidasa (PO) es una enzima dependiente de cobre, que cataliza la reacción que convierte sustancias fenólicas como la 3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA) a quinonas inestables como la dopaquinona. Esta última puede polimerizar para formar melanina mediante una reacción no enzimática (SÖDERHALL 1982; SÖDERHALL y SMITH 1986). Existen al menos dos tipos de enzimas PO: la O-difenoloxidasa (E.C. 1.10.3.1) y la tirosinasa (E.C.1.14.18.1). La enzima se presenta inicialmente inactiva en su forma de pro-enzima (proPO) y pasa a su estado activo tras la activación mediante una serie de estímulos, entre

los que destacan componentes de la pared celular de levaduras y bacterias como los β -glucanos, el LPS o los peptidoglicanos (SÖDERHALL y HALL 1984; SÖDERHALL y SMITH 1986; RATCLIFFE *et al.* 1991). El paso del precursor proPO a la forma activa requiere una cascada de señales mediadas por serín proteasas. Finalmente, se produce una reacción proteolítica mediada por la enzima activadora de la proPO (ppA) que da lugar a la PO en su forma enzimáticamente funcional mediante un proceso muy similar a lo que ocurre en la cascada del complemento (SÖDERHALL 1982; SÖDERHALL y SMITH 1986). La existencia del sistema proPO se ha demostrado en varios tipos celulares pertenecientes a diferentes especies y su principal papel se centra en los procesos de melanización y en la síntesis de adrenalina (COLES y PIPE 1994). Además de estas implicaciones, la PO puede activar diferentes procesos inmunes como la fagocitosis y la encapsulación (SÖDERHALL y SMITH 1986). La presencia de esta enzima se ha demostrado en diferentes especies de moluscos, como en la ostra japonesa, *Crassostrea gigas*, (HELLIO *et al.* 2007), en la ostra neozelandesa, *Saccostrea glomerata*, (ALADAILEH *et al.* 2007), en la almeja japonesa, *Ruditapes philippinarum*, (CONG *et al.* 2005), en el mejillón verde, *Perna viridis*, (ASOKAN *et al.* 1997) y en el mejillón azul (COLES y PIPE 1994). En todas estas especies, la presencia de la proPO se ha detectado tanto en la hemolinfa como en el interior de los hemocitos (ASHIDA *et al.* 1983; SAUL *et al.* 1987; HERNÁNDEZ-LÓPEZ *et al.* 1996). Además, la expresión de la proPO se puede modular por estímulos como bacterias o parásitos (HONG *et al.* 2006; MUÑOZ *et al.*, 2006; BEZEMER *et al.* 2006).

3.7. Proteasas e inhibidores de proteasas

Las proteasas son enzimas que se encuentran en la mayoría de los organismos vivos. Poseen funciones reguladoras en diferentes procesos fisiológicos, como la coagulación (TAKADA *et al.* 1994), el desarrollo (KONRAD *et al.* 1998), la embriogénesis (HONG y HASHIMOTO 1995), la digestión (NEURATH 1984), la inflamación (HIEMSTRA 2002) y la respuesta inmune (GORMAN *et al.* 2000). Sin embargo, una actividad exagerada de estas enzimas puede ser fatal para las células y para el organismo en su conjunto. Las proteasas, también están presentes en los organismos patógenos y son utilizadas por ellos como herramientas para



combatir los mecanismos de defensa presentes en el hospedador (McKerrow 1989; Oliver *et al.* 1999; La Peyre y Faisal 1995; Brown y Reece 2003; Ordás *et al.* 2001). Estas proteínas facilitan la invasión del patógeno entre los tejidos del hospedador y pueden llegar a reducir la actividad lisozima y aglutinante del hemocito (La Peyre *et al.* 1996) así como a causar alteraciones en la permeabilidad de la membrana celular (Paynter *et al.* 1995). Debido a la presencia de estas proteasas exógenas y a la necesidad de un control de la actividad de las endógenas, multitud de organismos han desarrollado unas enzimas inhibitoras conocidas como Inhibidoras de Proteasas (PI) (Laskowski y Kato 1980). Con respecto al sistema inmune, la característica principal de las PI, se centra en la lucha contra microorganismos patógenos para evitar su propagación (Ellis 1987; Calkins y Sloane 1995; Freedman 1991). La presencia de proteínas PI se ha demostrado en varios moluscos como el caracol, *Biomphalaria glabrata*, (Bender y Bayne 1996) y el pulpo, *Octopus vulgaris*, (Thøgersen *et al.* 1992) por citar algunos ejemplos. Concretamente, en moluscos bivalvos, se ha detectado la presencia de estas enzimas en las ostras *Crassostrea gigas* y *Crassostrea virginica* (Faisal *et al.* 1998; Oliver *et al.* 1999; Montagnani *et al.* 2001; Xue *et al.* 2006) y en la vieira de *Argopencten irradians* (Zhu *et al.* 2006).

3.8. Péptidos antimicrobianos (AMPs)

Los AMPs son pequeñas moléculas proteicas altamente conservadas en la evolución, que están presentes desde los organismos más primitivos como los protozoos y procariotas (Leippe 1999; Pag y Sahl 2002; Nes *et al.* 2002) hasta los más evolucionados como los mamíferos (Jenssen *et al.* 2006), donde curiosamente han sido de los últimos en descubrirse. Actualmente se conocen casi 800 tipos de AMPs distribuidos por todo el reino animal, según la base de datos de AMP (APD) (<http://aps.unmc.edu/AP/main.php>). El descubrimiento de estas moléculas se produjo en las décadas de los 80-90 mediante dos líneas de investigación independientes: estudiando los factores antimicrobianos presentes en la hemolinfa de insectos estimulados y mediante el análisis de la fagocitosis en mamíferos (Boman 1995; 1996; 2000). Normalmente estos péptidos poseen bajo peso molecular que ronda los 10 kDa y suelen ser catiónicos por su elevado contenido en aminoácidos bási-



cos como lisina y arginina. Poseen características anfipáticas que les permite tener estabilidad tanto en medios hidrofóbicos como acuosos. Algunos de ellos presentan modificaciones postraduccionales como glicosilaciones o amidaciones (BOMAN 1995; NISSEN-MEYER y NES 1997). La clasificación de los AMPs suele hacerse en función de su estructura, así se dividen en ricos en cisteínas, en α -hélices y en prolina o glicina (BULET *et al.* 1999). El mecanismo de acción comienza con la unión de los AMPs a las membranas plasmáticas de los microorganismos mediante fuerzas electrostáticas de manera que las cargas positivas de los AMPs atraen a las cargas negativas presentes en las cabezas fosfolipídicas de las membranas celulares. La inserción de los AMPs en la membrana altera la permeabilidad de la misma provocando incluso la lisis celular mediada por la poración (HUANG 2000; MATSUZAKI 1998; NISSEN-MEYER y NES 1997).

Son varios los moluscos bivalvos donde se han caracterizado a nivel molecular varios AMPs. En el caso de la ostra, los AMPs identificados han sido varios tipos de defensinas conocidos como Cg-def (GUEGUEN *et al.* 2006), Cg-Defh1 y Cg-Defh2 (GONZÁLEZ *et al.* 2007). En la almeja fina se han identificado tres isoformas con similitud a las miticinas descritas en el mejillón mediterráneo y que se han descrito con el nombre de *clam myticin* 1, 2 y 3, y un AMP parecido a mitilina conocido como *clam-mytilin* (GESTAL *et al.* 2007). En el caso de la vieira, *Argopecten irradians*, se ha descrito un tipo de defensina conocida como AiBD (ZHAO *et al.* 2007). Pese a la caracterización molecular de AMPs en varias especies de bivalvos, es en el mejillón, *Mytilus galloprovincialis*, donde se han llevado a cabo más estudios. En este caso, los AMPs descritos son todos ricos en cisteínas y se pueden dividir en tres grupos en función del número y posición de estos residuos aminoacídicos. El primero de ellos está formado por dos moléculas con una gran homología a las defensinas descritas previamente en artrópodos (BULET *et al.* 1999), de ahí que el nombre adoptado haya sido *Mytilus galloprovincialis* Defensin (MGD-1 y MGD-2) para las dos isoformas detectadas (MITTA *et al.* 1999b). El segundo de los grupos está constituido por las mitilinas y está formado por 4 isoformas diferentes (B, C, D y G1) (MITTA *et al.* 2000a) ya que la forma A se ha detectado en *M. edulis* pero no en *M. galloprovincialis* (CHARLET *et al.* 1996). El tercer y último



grupo está compuesto por tres isoformas de miticina: miticina A, B y C (MITTA *et al.* 1999a; PALLAVICINI *et al.* 2008). Las miticinas A y B y las defensinas son esencialmente activas contra bacterias Gram-positivas (MITTA *et al.* 1999a; MITTA *et al.* 1999b) incluyendo algunos patógenos asociados a invertebrados marinos (JOHNSON 1981; FRIEDMAN *et al.* 1991). Sin embargo, las mitilinas tienen una actividad más diversificada ya que su rango de acción abarca desde actividades antifúngicas hasta acciones microbicidas contra bacterias Gram-negativas (MITTA *et al.* 2000a; 2000b). Sin embargo, la expresión de los péptidos antimicrobianos no parece verse incrementada tan sólo tras una estimulación bacteriana, ya que se ha visto que estímulos físicos o de estrés térmico son capaces de aumentar la expresión de las defensinas (MITTA *et al.* 2000b). A pesar de que el papel microbicida de la miticina C no ha sido determinado hasta la fecha, la elevada presencia de transcritos diferencialmente expresados tras estimulaciones de diversa naturaleza, junto con su expresión ubicua y temprana en el desarrollo (PALLAVICINI *et al.* 2008), sugieren que la miticina C debe de jugar un papel clave dentro del sistema inmune de estos organismos. Además se ha encontrado una elevada variabilidad de formas que parecen ser exclusivas e inherentes a cada individuo, siendo compartidas solamente en el caso de mejillones hermanos (COSTA *et al.* 2009). Pese a que se han encontrado AMPs en otras especies de bivalvos, incluso algunos con similitud a miticina o a mitilina, los niveles de polimorfismos encontrados en el caso del mejillón son significativamente más elevados (PALLAVICINI *et al.* 2008; PADHI y VERGHESE 2008), sugiriendo que, al igual que ocurre con otros genes relacionados con el sistema inmune, la miticina C se ha visto sometida a elevadas presiones selectivas que le han hecho mutar hasta generar el enorme repertorio de formas diferentes que existen. Quizá este elevado abanico de isoformas pueda ser el responsable de que el mejillón del Mediterráneo sea una especie tan altamente resistente a la manifestación de enfermedades.

El mecanismo de acción de los AMPs parece estar mediado por la permeabilización de la membrana plasmática de los microorganismos a los que atacan (KAGAN *et al.* 1990; COCIANCICH *et al.* 1993). Sin embargo, esta permeabilización requiere un paso inicial de unión entre el péptido y el agente patógeno, previa a la despolarización de

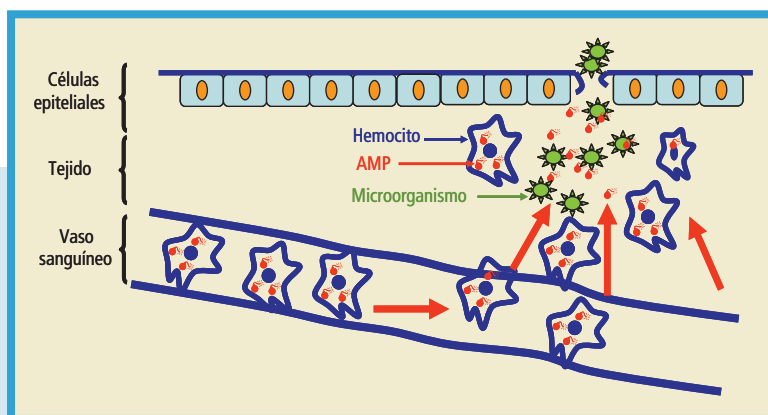
la membrana celular. Se cree que estas moléculas son sintetizadas y almacenadas en el interior de los hemocitos granulares y tras recibir un estímulo se liberan al plasma para ejercer su función (MITTA *et al.* 1999b; 2000c) tal y como se indica en la Figura 5.

4. GENÓMICA DE LA RESPUESTA INMUNE EN LOS MOLUSCOS

A pesar de que la aplicación de métodos genómicos en los moluscos está en sus comienzos, la importancia de estos organismos en la acuicultura hace que se avance de forma rápida.

Numerosas especies de moluscos están siendo objeto de proyectos orientados a la obtención de genotecas de cDNAs y colecciones de ESTs «Expressed sequence tags». Entre ellas, la ostra japonesa (*C. gigas*) y el mejillón *Mytilus galloprovincialis*. Existen bases de datos específicas en las que se almacenan las secuencias producidas por proyectos, como la GigasBase de ostra en Francia (<http://www.ifremer.fr/GigasBase>) o la base de datos Marine Genomics americana (www.marinegenomics.com). En breve estarán disponibles más de 9.000 ESTs de las almejas fina (*Ruditapes decussatus*) y japonesa (*R. philippinarum*), producidas a través de la colaboración de varios centros de investigación europeos en el marco de la red Marine Genomics Europe (<http://www.marine-genomics-europe.org>). Esta red también está con-

FIGURA 5.
Representación
esquemática de
la liberación de
AMPs tras una
estimulación
bacteriana.





tribuyendo a incrementar las colecciones de ESTs de mejillón y de ostra japonesa (SAAVEDRA y BACHERE 2006; SAAVEDRA *et al.* 2007).

La secuenciación de ESTs de librerías génicas substractivas está considerada como una técnica robusta y relativamente barata empleada hoy en día para la identificación de proteínas codificadas por genes que se encuentran expresados en diferentes tejidos. En el caso de moluscos bivalvos, actualmente hay más de 50.000 ESTs depositadas en bases de datos públicas, y su número continúa creciendo diariamente. Los primeros datos fueron de la ostra *C. virginica*, con la que se construyeron dos librerías de ESTs, una de hemocitos de un único individuo (de la que se obtuvieron 363 singletons o secuencias diferentes), y otra a partir de un grupo de 200.000 embriones (de la que se obtuvieron 286 singletons) (JENNY *et al.* 2002). Solamente un 5% de estos genes resultaron relacionados con funciones inmunes. Entre los 710 singletons, 20 de ellos podrían estar implicados en funciones inmunes (GUEGUEN *et al.* 2003). Un estudio de genes expresados en respuesta a una infección por *Perkinsus marinus* llevada a cabo en *C. virginica* y *C. gigas*, dio como resultados un total de 500 ESTs singletons, de las cuales 19 pudieron ser caracterizadas como involucradas en inmunidad y comunicación celular, como receptores toll-like, proteínas de unión a metales y proteínas asociadas al receptor de TNF entre otras (TANGUY *et al.* 2004). Las ESTs identificadas en *C. gigas* afectada por mortalidades de verano proporcionaron un 16% de ESTs relacionadas con funciones inmunes (HUVERT *et al.* 2004). La tecnología de ESTs aplicada al manto de *C. gigas* permitió la identificación del primer péptido antimicrobiano en ostra, perteneciente a la familia de las defensinas (GUEGUEN *et al.* 2006). Se han construido librerías génicas a partir de extractos de distintos tejidos. En el caso del mejillón, se utilizaron hemolinfa, branquias, glándula digestiva, pie, músculo aductor y manto de un grupo de mejillones no estresados para construir una librería de ESTs. Los resultados permitieron la identificación de péptidos antimicrobianos de la familia de las miticinas, metalotioneinas, y proteínas de choque térmico, entre un total de 426 singletons (VENIER *et al.* 2003). En otro trabajo, las secuencias de ESTs obtenidas de branquia y gónada de un grupo de ostras adultas (*C. virginica*) dio como resultado un total de 1.916 singletons, incluyendo secuencias que codifican para varias



proteínas de choque térmico, proteínas inducidas por estrés y péptidos antimicrobianos de la familia de las defensinas (PEATMAN *et al.* 2004). Las EST obtenidas a partir del tejido de un individuo completo de vieira *A. irradians irradians*, excepto tracto digestivo e intestino, permitió la identificación de 2.779 secuencias únicas, incluyendo 131 genes relacionados con la defensa del hospedador, como lectinas, defensinas, proteasas, inhibidores de proteasas, proteínas de choque térmico, antioxidantes y receptores tipo Toll (SONG *et al.* 2006b). También se ha aplicado esta tecnología de SSH para el estudio de genes expresados en almeja *Ruditapes decussatus* frente a distintos patógenos, como bacterias (GESTAL *et al.* 2007), y parásitos como *Perkinsus olseni* (PRADO-ALVAREZ *et al.* 2009). La utilización de ambas técnicas, SSH y librerías de cDNA permitió la identificación de importantes genes sobreexpresados en mejillón *M. galloprovincialis* y su comparación tras una infección por bacterias y tras una infección por poly I:C (simulando una infección vírica) (PALLAVICINI *et al.* 2008). En este mismo trabajo, se describe una nueva clase de péptido antimicrobiano denominado Miticina C, demostrándose su importante papel como gen relacionado con la respuesta inmune. También se han publicado trabajos con esta metodología relacionados con la presencia de contaminantes. Por ejemplo, tras la exposición experimental a varios contaminantes, se encontraron sobre expresados un total de 242 genes de mejillón cebra, *Dreissena polymorpha* (BULTELLE *et al.* 2002) y 258 genes de la ostra, *C. gigas* (BOUTET *et al.* 2004). Todas estas observaciones indican que es necesaria una tecnología de mayor eficiencia, y en este sentido, se están haciendo importantes avances en lo referente a proteómica en bivalvos.

Además, los distintos factores ambientales pueden afectar al sistema hospedador-patógeno, y así, por ejemplo, la presencia de contaminantes, junto con otros factores de estrés, pueden ser en parte responsables de la disminución de los mecanismos de defensa y por lo tanto del incremento de la susceptibilidad a enfermedades. Algunos estudios llegan incluso a encontrar un nexo de unión entre presencia de contaminantes ó factores estresantes, y susceptibilidad a enfermedades en bivalvos (CHOU *et al.* 1998; CHU *et al.* 2002).

Actualmente se pueden llevar a cabo grandes cantidades de secuenciación mediante la pirosecuenciación. Recientemente se ha



publicado un trabajo donde se describe una de estas técnicas de secuenciación en ostra pacífica (*C. gigas*), generándose 8.6 millones de secuencias (HEDGECOCK *et al.* 2007).

La tecnología de microarray de DNA es un método cerrado que es capaz de identificar un elevado número de secuencias o genes predeterminados ya conocidos. En la tecnología de microarrays, las moléculas de DNA (desde oligonucleótidos hasta cDNAs completos) representan transcritos específicos que son fijados en un soporte sólido. De este modo se puede analizar la expresión simultánea de un importante número de genes.

Los mejillones, por su condición de filtradores intermareales, acumulan componentes xenobióticos, y por lo tanto se emplean como biosensores de contaminación costera. Recientemente, VENIER *et al.* (2006) han producido el primer *microarray* de cDNA de mejillón *M. galloprovincialis* (*MytArray* 1.0) que contiene un total de 1800 sondas diferentes, obtenidas de distintos tejidos. La hibridación de los clones impresos en el microarray con cDNA de mejillón expuesto a diferentes metales y contaminantes orgánicos permitió la identificación de 27 genes potencialmente marcadores de contaminantes orgánicos, y 16 genes potencialmente marcadores de metales pesados. Además, DONDERO *et al.* (2006) produjeron también un *microarray* de oligonucleótidos de baja densidad (48 oligonucleótidos), denominado (*Mytox-chip*), para estudio de genes candidatos a marcadores de contaminación y genes relacionados con la respuesta al estrés producida por la acción de xenobióticos.

5. REFERENCIAS

- ABBAS, A. K. y A. H. LICHTMAN, 2000 General properties of immune responses. En: «Cellular and molecular immunology». Interamericana McGraw Hill.
- ADEMA, C. M., W. P. W. VAN DER KNAAP y T. SMINIA, 1991 Molluscan hemocyte-mediated cytotoxicity: the role of reactive oxygen intermediates. *Rev. Aquat. Sci.* **4**: 201-23.
- ADEREM, A. y R. J. ULEVITCH, 2000 Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* **406**: 782-7.
- ALADAILEH, S., P. RODNEY, S. V. NAIR y D. A. RAFTOS, 2007 Characterization of phenoloxidase activity in Sydney rock oysters (*Saccostrea glomerata*). *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* **148**: 470-80.



- ALLAM, B., K. A. ASHTON-ALCOX y S. E. FORD, 2002 Flow cytometric comparison of haemocytes from three species of bivalve molluscs. *Fish Shellfish Immunol.* **13**: 141-58.
- ALLEN, R. C. y L. D. LOOSE, 1976 Phagocytic activation of a luminol-dependent chemiluminescence in rabbit alveolar and peritoneal macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **69**: 245-52.
- ANDERSON, R. S., 1981 Inducible haemolytic activity in *Mercenaria mercenaria* hemolymph. *Dev. Comp. Immunol.* **5**: 575-85.
- ANDERSON, R. S., 1994 Hemocyte-derived reactive oxygen intermediate production in four bivalve mollusks. *Dev. Comp. Immunol.* **18**: 89-96.
- ARIMOTO, R. y M. R. TRIPP, 1977 Characterization of a bacterial agglutinin in the hemolymph of the hard clam, *Mercenaria mercenaria*. *J. Invertebr. Pathol.* **30**: 406-13.
- ARUMUGAM, M., B. ROMESTAND, J. TORREILLES y P. ROCH, 2000 *In vitro* production of superoxide and nitric oxide (as nitrite and nitrate) by *Mytilus galloprovincialis* haemocytes upon incubation with PMA or laminarin or during yeast phagocytosis. *Eur. J. Cell Biol.* **79**: 513-9.
- ASHIDA, M., ISHIZAKI y H. IWAHANA, 1983 Activation of pro-phenoloxidase by bacterial cell walls or beta-1,3-glucans in plasma of the silkworm, *Bombyx mori*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **113**: 562-8.
- ASOKAN, R., M. ARUMUGAM y P. MULLAINADHAN, 1997 Activation of prophenoloxidase in the plasma and haemocytes of the marine mussel *Perna viridis* Linnaeus. *Dev. Comp. Immunol.* **21**: 1-12.
- AUFFRET, M., 1988 Bivalve hemocyte morphology. *Am. Fish Soc. Spec. Publ.* **18**: 169-77.
- AUSTIN, K. A. y K. T. PAYNTER, 1995 Characterization of the chemiluminescence measured in hemocytes of the Eastern oyster, *Crassostrea virginica*. *J. Exp. Zool.* **273**: 461-71.
- BACHERE, E., D. CHAGOT y H. GRIZEL, 1988 Separation of *Crassostrea gigas* hemocytes by density gradient centrifugation and counterflow centrifugal elutriation. *Dev. Comp. Immunol.* **12**: 549-59.
- BACHÈRE, E., D. HERVIO y E. MIALHE, 1991 Luminol-dependent chemiluminescence by haemocytes of two marine bivalves, *Ostrea edulis* and *Crassostrea gigas*. *Dis. Aquat. Org.* **11**: 173-80.
- BARTL, S., M. BAISH, L. IRVING, WEISSMAN y M. DIAZ, 2003 Did the molecules of adaptive immunity evolve from the innate immune system? *Integr. Comp. Biol.* **43**: 338-346.



- BAYNE, C. J., T. SMINIA y W. P. W. VAN DER KNAAP, 1980 Immunological memory: status of molluscan studies. En: «Phylogeny of immunological memory». Amsterdam: M. J. Manning.
- BENDER, R. C. y C. J. BAYNE, 1996 Purification and characterization of a tetrameric alpha-macroglobulin proteinase inhibitor from the gastropod mollusc *Biomphalaria glabrata*. *Biochem. J.* **15**: 893-900.
- BEZEMER, B., D. BUTT, J. NELL, R. ADLARD y D. RAFTOS, 2006 Breeding for QX disease resistance negatively selects one form of the defensive enzyme, phenoloxidase, in Sydney rock oysters. *Fish Shellfish Immunol.* **20**: 627-36.
- BOMAN, H. G., 1995 Peptide antibiotics and their role in innate immunity. *Annu. Rev. Immunol.* **13**: 61-92.
- BOMAN, H. G., 1996 Peptide antibiotics: holy or heretic grails of innate immunity? *Scand. J. Immunol.* **43**: 475-82.
- BOMAN, H. G., 2000 Innate immunity and the normal microflora. *Immunol. Rev.* **173**: 5-16.
- BOSHRA, H., J. LI y J. O. SUNYER, 2006 Recent advances on the complement system of teleost fish. *Fish Shellfish Immunol.* **20**: 239-62.
- BOUTET, I., A. TANGUY y D. MORAGA, 2004 Response of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* to hydrocarbon contamination under experimental conditions. *Gene* **329**: 147-157.
- BROWN, R., L. R. ALMONDOVAR, H. M. BHATIA y W. C. BOYD, 1968 Blood group specific agglutinins in invertebrates. *J. Immunol.* **100**: 214-6.
- Brown, G. D. y K. S. REECE, 2003 Isolation and characterization of serine protease gene(s) from *Perkinsus marinus*. *Dis. Aquat. Organ.* **57**: 117-26.
- BUGGÉ, D. M., H. HÉGARET, G. H. WIKFORS y B. ALLAM, 2007 Oxidative burst in hard clam (*Mercenaria mercenaria*) haemocytes. *Fish Shellfish Immunol.* **23**: 188-96.
- BULET, P., C. HETRU, J. L. DIMARCO y D. HOFFMANN, 1999 Antimicrobial peptides in insects; structure and function. *Dev. Comp. Immunol.* **23**: 329-44.
- BULTELE, F., M. PANCHOUT, F. LEBOULENGER y J. M. DANGER, 2002 Identification of differentially expressed genes in *Dreissena polymorpha* exposed to contaminants. *Mar. Environ. Res.* **54**: 385-389.
- BULGAKOV, A. A., K. I. PARK, K. S. CHOI, H. K. LIM y M. CHO, 2004 Purification and characterisation of a lectin isolated from the Manila clam *Ruditapes philippinarum* in Korea. *Fish Shellfish Immunol.* **16**: 487-99.
- CAJARAVILLE, M. J. y S. G. PAL, 1995 Morphofunctional study of the haemocytes of the bivalve mollusc *Mytilus galloprovincialis* with emphasis on the endolysosomal compartment. *Cell Struct. Funct.* **20**: 355-67.



- CALKINS, C. y B. SLONAE, 1995 Mammalian cysteine protease inhibitors: biochemical properties and possible role in tumour progression. *Biol Chem. Hoppe-Seyler* **376**: 71-80.
- CANESI, L., G. GALLO, M. GAVIOLI y C. PRUZZO, 2002 Bacteria-hemocyte interactions and phagocytosis in marine bivalves. *Microsc. Res. Tech.* **57**: 469-76.
- CANESI, L., C. PRUZZO, R. TARSÌ y G. GALLO, 2001 Surface interactions between *Escherichia coli* and hemocytes of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* lam. leading to efficient bacterial clearance. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 464-8.
- CARBALLAL, M. J., C. LOPEZ, C. AZEVEDO y A. VILLALBA, 1997 Enzyme involved in defense functions of hemocytes of mussel *Mytilus galloprovincialis*. *J. Invertebr. Pathol.* **70**: 96-105.
- CARBALLAL, M. J., C. LÓPEZ, C. AZEVEDO y A. VILLALBA, 1997 *In vitro* study of the phagocytic of *Mytilus galloprovincialis* Lmk. Haemocytes. *Fish Shellfish Immunol.* **7**: 403-16.
- CHARLET, M., S. CHERNYSH, H. PHILIPPE, C. HÉTRU y D. HOFFMANN, 1996 Innate immunity. Isolation of several cysteine-rich antimicrobial peptides from the blood of a mollusc, *Mytilus edulis*. *J. Biol. Chem.* **271**: 21808-13.
- CHENG, T. C. y K. H. HOWLAND, 1982 Effects of colchicine and cytochalasin B on chemotaxis of oyster (*Crassostrea virginica*) hemocytes. *J. Invertebr. Pathol.* **40**: 150-2.
- CHENG, T.C. y E. RIFKIN, 1970 En: «A symposium on diseases of fishes and shellfishes» Spc. Publ. 5 Am Fish Soc.
- CHENG, T. C. y G. A. RODRICK, 1974 Identification and characterization of lysozyme from the hemolymph of the soft-shelled clam, *Mya arenaria*. *Biol. Bull.* **147**: 311-20.
- CHENG, T. C., 1981 Bivalves. En: «Invertebrate blood cells». London: Ratcliffe y A. F. Rowley.
- CHENG, T. C., J. W. HUANG, H. KARADOĞAN, L. R. RENWRANTZ y T. P. YOSHINO, 1980 Separation of oyster hemocytes by density gradient centrifugation and identification of their surface receptors. *J. Invertebr. Pathol.* **36**: 35-40.
- CHENG, T. C., G. E. RODRICK, D. A. FOLEY y S. A. SHERRY, 1975 Release of lysozyme from the hemolymph cells of *Mercenaria mercenaria* during phagocytosis. *J. Invertebr. Pathol.* **25**: 261-5.
- CHOU, H. Y., S.-J. CHANG, H. Y. LEE y Y. C. CHIOU, 1998 Preliminary evidence for the effect of heavy metal cations on the susceptibility of Hard Clam (*Meretrix lusoria*) to clam birnavirus infection. *Fish Pathol.* **33**: 213-219.
- CHU F. L., 1988 Humoral defense factors in marine bivalves. *Am. Fish Soc. Spec. Publ.* **18**: 178-88.



- CHU, F. L., A. K. VOLETY, R. C. HALE y Y. HUANG, 2002 Cellular responses and disease expression in oysters (*Crassostrea virginica*) exposed to suspended field contaminated sediments. *Mar. Env. Res.* **53**: 17-35.
- COCIANCICH, S., A. GHAZI, C. HETRU, J. A. HOFFMANN y L. LETELLIER, 1993 Insect defensin, an inducible antibacterial peptide, forms voltage-dependent channels in *Micrococcus luteus*. *J. Biol. Chem.* **268**: 19239-45.
- COLES, J. A. y R. K. PIPE, 1994 Phenoloxidase activity in the haemolymph and haemocytes of the marine mussel *Mytilus edulis*. *Fish Shellfish Immunol.* **4**: 337-52.
- CONG, R., W. SUN, G. LIU, T. FAN, X. MENG, y col, 2005 Purification and characterization of phenoloxidase from clam *Ruditapes philippinarum*. *Fish Shellfish Immunol.* **18**: 61-70.
- COSTA, M. M, S. DIOS, J. ALONSO-GUTIERREZ, A. ROMERO, B. NOVOA, y col, 2008 Myticin C variability in mussel: ancient defence mechanism or self/non self discrimination? *Dev. Comp. Immunol.* **33**: 162-70.
- CRONIN, M. A., S. C. CULLOTY y M. F. MULCAHY, 2001 Lysozyme activity and protein concentration in the haemolymph of the flat oyster *Ostrea edulis* (L.). *Fish Shellfish Immunol.* **11**: 611-22.
- DAM, T. K., P. BANDYOPADHYAY, M. SARKAR, J. GHOSAL, A. BHATTACHARYA y A. CHOUDHURY, 1994 Purification and partial characterization of a heparin-binding lectin from the marine clam *Anadara granosa*. *Biochem Biophys. Res. Commun.* **203**: 36-45.
- DENICOLA, A., B. A. FREEMAN, M. TRUJILLO y R. RADI, 1996 Peroxynitrite reaction with carbon dioxide/bicarbonate: kinetics and influence on peroxynitrite-mediated oxidations. *Arch. Biochem. Biophys.* **333**: 49-58.
- DES VOIGNE, D. M. y A. K. SPARKS, 1968 The process of wound healing in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg). *J. Invertebr. Pathol.* **12**: 23-65.
- DES VOIGNE, D. M. y A. K. SPARKS, 1969 The reaction of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*, to homologous tissue implants. *J. Invertebr. Pathol.* **14**: 293-300.
- DODDS A.W., 2002 Which came first, the lectin/classical pathway or the alternative pathway of complement? *Immunobio.* **205**: 340-54.
- DONDERO F., L. PIACENTINI, F. MARSANO, M. REBELLO, L. VERGANI, P. VENIER, A. VIARENGO, 2006 Gene transcription profiling in pollutant exposed mussels (*Mytilus* spp.) using a new low-density oligonucleotide microarray. *Gene* **376**: 24-36.
- DREW, G. H., 1910 Some points in the physiology of lamellibranch blood corpuscles. *Q. J. Micr. Sci.* **54**: 605-23.



- DYRYNDA, E. A., R. K. PIPE y N. A. RATCLIFFE, 1997 Sub-populations of haemocytes in the adult and developing marine mussel, *Mytilus edulis*, identified by use of monoclonal antibodies. *Cell Tissue Res.* **289**: 527-36.
- ELLIS, A., 1987 Inhibition of the *Aeromonas salmonicida* extracellular protease by α_2 -macroglobulin in the serum of rainbow trout. *Microb. Pathog.* **3**: 167-77.
- FAISAL, M., E. A. MACINTYRE, K. G. ADHAM, B. D. TALL, M. H. KOTHARY, y col, 1998 Evidence for the presence of protease inhibitors in eastern (*Crassostrea virginica*) and Pacific (*Crassostrea gigas*) oysters. *Comp. Biochem. Physiol.* **B. 121**: 161-8.
- FARLEY, C. A., 1968 *Minchinia nelsoni* (Haplosporida) disease syndrome in the American oyster, *Crassostrea virginica*. *J. Invertebr. Pathol.* **15**: 585-99.
- FAWCETT, L. B. y M. R. TRIPP, 1994 Chemotaxis of *Mercenaria mercenaria* hemocytes to bacteria *in vitro*. *J. Invertebr. Pathol.* **63**: 275-84.
- FENG, S. Y., 1988 Cellular defense mechanisms of oysters and mussels. *Am. Fish Soc. Spec. Publ.* **18**: 153-68.
- FENG, S. Y., J. S. FENG, C. N. BURKE y L. H. KHAIRALLAH, 1971 Light and electron microscopy of the hemocytes of *Crassostrea virginica* (Mollusca-Pelecypoda). *Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie.* **120**: 225-42.
- FISHER, W. S. y A. R. DINUZZO, 1991 Agglutination of bacteria and erythrocytes by serum from six species of marine molluscs. *J. Invertebr. Pathol.* **57**: 380-94.
- FISHER, W. S., 1986 Structure and functions of oyster hemocytes. En «Immunity in invertebrates. Cells, molecules and defense reactions». Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, Tokyo.
- FLOWER, R. L., G. E. WILCOX y D. A. PASS, 1985 Detection of two lectins in haemolymph from the oyster *Pinctada maxima*. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.* **63**: 703-7.
- FÖRSTERMANN, U., H. H. SCHMIDT, J. S. POLLOCK, H. SHENG, J. A. MITCHELL y col, 1991 Isoforms of nitric oxide synthase. Characterization and purification from different cell types. *Biochem. Pharmacol.* **42**: 1849-57.
- FREEDMAN, S., 1991 The role of α_2 -macroglobulin in furunculosis: a comparison of rainbow trout and brook trout. *Comp. Biochem. Physiol.* **98B**: 549-53.
- FRIEDMAN, C. S., J. S. BEATTIE, R. A. ELSTON y R. P. HEDRICK, 1991 Investigation of the relationship between the presence of a Gram-positive bacterial infection and summer mortality of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* Thunberg. *Aquaculture* **94**: 1-15.
- GARCÍA-GARCÍA, E., M. PRADO-ÁLVAREZ, B. NOVOA, A. FIGUERAS y C. ROSALES, 2008 Immune responses of mussel hemocyte subpopulations are differentially



- regulated by enzymes of the PI 3-K, PKC, and ERK kinase families. Dev. Comp. Immunol. **32**: 637-53.
- GESTAL, C., M. M. COSTA, A. FIGUERAS y B. NOVOA, 2007 Analysis of differentially expressed genes in response to bacterial stimulation in hemocytes of the carpet-shell clam *Ruditapes decussatus*: Identification of new antimicrobial peptides. Gene **406**: 134-43.
- GLINSKI, Z. y J. JARROS, 1999 Molluscan immune defenses. Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz) **45**: 149-55.
- GOEDKEN, M. y S. DE GUISE, 2004 Flow cytometry as a tool to quantify oyster defence mechanisms. Fish Shellfish Immunol. **16**: 539-52.
- GONZÁLEZ, M., Y. GUEGUEN, G. DESSERRE, J. DE LORGERIL, B. ROMESTAND, y col, 2007 Molecular characterization of two isoforms of defensin from hemocytes of the oyster *Crassostrea gigas*. Dev. Comp. Immunol. **31**: 332-9.
- GORMAN, M. J., O. V. ANDREEVA y S. M. PASKEWITZ, 2000 Sp22D: a multidomain serine protease with a putative role in insect immunity. Gene **251**: 9-17.
- GOURDINE, J. P. y E. J. SMITH-RAVIN, 2007 Analysis of a cDNA-derived sequence of a novel mannose-binding lectin, codakine, from the tropical clam *Codakia orbicularis*. Fish Shellfish Immunol. **22**: 498-509.
- GOURDON, I., M. C. GUÉRIN, J. TORREILLES y P. ROCH, 2001 Nitric oxide generation by hemocytes of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. Nitric Oxide **5**: 1-6.
- GREEN, L. C., D. A. WAGNER, J. GLOGOWSKI, P. L. SKIPPER, J. S. WISHNOK, y col, 1982 Analysis of nitrate, nitrite and [15N] nitrate in biological fluids. Anal. Biochem. **126**: 131-8.
- GUEGUEN, Y., J. P. CADORET, D. FLAMENT, C. BARREAU-ROUMIGUIÈRE, A. L. GIRARDOT et al, 2003 Immune gene discovery by expressed sequence tags generated from hemocytes of the bacteria-challenged oyster, *Crassostrea gigas*. Gene **303**: 139-145.
- GUEGUEN, Y., A. HERPIN, A. AUMELAS, J. GARNIER, J. FIEVET, y col., 2006 Characterization of a defensin from the oyster *Crassostrea gigas*. Recombinant production, folding, solution structure, antimicrobial activities and gene expression. J. Biol. Chem. **281**: 313-23.
- HARDY, S. W., T. C. FLETCHER y L. M. GERIE, 1976 Factors in hemolymph of the mussel, *Mytilus edulis* L., of possible significance as defense mechanisms. Biochem. Soc. Trans. **4**: 473-5.
- HARDY, S. W., P. T. GRANT y T. C. FLETCHER, 1977 A haemagglutinin in the tissue fluid of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*, with specificity for sialic acid residue in glycoproteins. Experientia **33**: 767-9.



- HEDGECOCK, D., J. Z. LIN, S. DeCOLA, C. D. HAUDENSCHILD, E. MEYER, D. T. MANAHAN y B. BOWEN. 2007 Transcriptomic analysis of growth heterosis in larval Pacific oysters (*Crassostrea gigas*). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **104**: 2313-8.
- HEGARET, H., G. H. WIKFORS y P. SOUDANT, 2003 Flow cytometric analysis of haemocytes from eastern oysters, *Crassostrea virginica*, subjected to a sudden temperature elevation II. Haemocyte functions: aggregation, viability, phagocytosis, and respiratory burst. *J. Exp. Mar. Bio Ecol.* **293**: 249-65.
- HELLIO, C., A. BADO-NILLES, B. GAGNAIRE, T. RENAULT y H. THOMAS-GUYON, 2007 Demonstration of a true phenoloxidase activity and activation of a ProPO cascade in Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg) *in vitro*. *Fish Shellfish Immunol.* **22**: 433-40.
- HERNÁNDEZ-LÓPEZ, J., T. GOLLAS-GALVÁN y F. VARGAS-ALBORES, 1996 Activation of the prophenoloxidase system of the brown shrimp *Penaeus californiensis*, Holmes. *Comp. Biochem. Physiol. C.* **113**: 61-6.
- HIEMSTRA, P. S., 2002 Novel roles of protease inhibitors in infection and inflammation. *Biochem. Soc. Trans.* **30**: 116-20.
- HONG, C. C. y C. HASHIMOTO, 1995 An unusual mosaic protein with a protease domain, encoded by the nudel gene is involved in defining embryonic dorsoventral polarity in *Drosophila*. *Cell.* **82**: 785-94.
- HONG, X. T., L. X. XIANG y J. Z. SHAO, 2006 The immunostimulating effect of bacterial genomic DNA on the innate immune responses of bivalve mussel, *Hyriopsis cumingii* Lea. *Fish Shellfish Immunol.* **21**: 357-64.
- HOWLAND, K. H. y T. CHENG, 1982 Identification of bacterial chemoattractants for oyster (*Crassostrea virginica*) hemocytes. *Invertebr. Pathol.* **39**: 123-32.
- HUANG, H. W., 2000 Action of antimicrobial peptides: two-state model. *Biochem.* **39**: 8347-52.
- HURST, J. K. y S. V. LYMAR, 1997 Toxicity of peroxymytrite and related reactive nitrogen species toward *Escherichia coli*. *Chem. Res. Toxicol.* **10**: 802-10.
- HUVET A., A. HERPIN, L. DÉGREMONT, Y. LABREUCHE, J. F. SAMAIN, C. CUNNINGHAM 2004 The identification of genes from the oyster *Crassostrea gigas* that are differentially expressed in progeny exhibiting opposed susceptibility to summer mortality. *Gene* **343**: 211-20.
- ITO, N. y K. G. TAKAHASHI, 2007 cDNA cloning and in situ hybridization of a novel lysozyme in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Comp. Biochem. Physiol. B.* **148**: 160-6.
- JENNY, M. J., A. H. RINGWOOD, E. R. LACY, A. J. LEWITUS, J. W. KEMPTON, P. S. GROSS, G. W. WARR y R. W. CHAPMAN, 2002 Potential indicators of stress response identified by expressed sequence tag analysis of hemocytes and embryos from the American oyster, *Crassostrea virginica*. *Mar. Biotechnol.* **4**: 81-93.



- JENSSEN, H., P. HAMILL y R. E. HANCOCK, 2006 Peptide Antimicrobial Agents. Clin. Microbiol. Rev. **19**: 491–511.
- JOHNSON, P. T., 1981 Histopathology of *Aerococcus viridans* var. *homari* Infection (Gaffkemia) in the Lobster, *Homarus americanus*, and a comparison with histological reactions to a Gram-Negative Species, *Pseudomonas perolens*. J. Invertebr. Pathol. **38**: 127-48.
- KAGAN, B. L., M. E. SELSTED, T. GANZ y R. I. LEHRER, 1990 Antimicrobial defensin peptides form voltage-dependent ion-permeable channels in planar lipid bilayer membranes. Proc. Natl. Acad. Sci. **87**: 210-4.
- KANG, Y. S., Y. M. KIM, K. I. PARK, S. K. CHO, K. S. CHOI y M. CHO, 2006 Analysis of EST and lectin expressions in hemocytes of Manila clams (*Ruditapes philippinarum*) (Bivalvia: Mollusca) infected with *Perkinsus olseni*. Dev. Comp. Immunol. **30**: 1119-31.
- KIM, J. Y., Y. M. KIM, S. K. CHO, K. S. CHOI y M. CHO, 2008 Novel tandem-repeat galectin of Manila clam *Ruditapes philippinarum* is induced upon infection with the protozoan parasite *Perkinsus olseni*. Dev. Comp. Immunol. **32**: 1131-41.
- KOJIMA, H., N. NAKATSUBO, K. KIKUCHI, S. KAWAHARA, Y. KIRINO, y col, 1998 Detection and imaging of nitric oxide with novel fluorescent indicators: diaminofluoresceins. Anal. Chem. **70**: 2446-53.
- KONRAD, K. D., T. J. GORALSKI, A. P. MAHOWALD y J. L. MARSH, 1998 The gastrulation defective gene of *Drosophila melanogaster* is a member of the serine protease superfamily. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **95**: 6819–24.
- KUMAZAWA N. H., N. MORIMOTO y Y. OKAMOTO, 1993 Luminol-dependent chemiluminescence of hemocytes derived from marine and estuarine molluscs. J. Vet. Med. Sci. **55**: 287-90.
- LACHMANN, P. J. y M. J. HOBART, 1979 The genetics of the complement system. Ciba Found Symp. **66**: 231-50.
- LACKIE, A. M., 1980 Invertebrate immunity. Parasitology **80**: 393-412.
- LAMBERT, C., P. SOUDANT, G. CHOQUET y C. PAILLARD, 2003 Measurement of *Crassostrea gigas* hemocyte oxidative metabolism by flow cytometry and the inhibiting capacity of pathogenic vibrios. Fish Shell Immunol. **15**: 225–40.
- LA PEYRE, J. F. y M. FAISAL, 1995 *Perkinsus marinus* produces extracellular proteolytic factor (s). Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol. **15**: 1-4.
- LA PEYRE, J. F., H. A. YARNALL y M. FAISAL, 1996 Contribution of *Perkinsus marinus* extracellular products in the infection of eastern oysters (*Crassostrea virginica*). J. Invertebr. Pathol. **68**: 312-3.
- LASKOWSKI, M. J. R. y I. KATO, 1980 Protein inhibitors of proteinases. Annu. Rev. Biochem. **49**: 593-626.



- LAUCKNER, G., 1983 Diseases of Mollusca: Bivalvia. En: «Diseases of Marine Animals». Biologische Anstalt Helgoland, Hamburg.
- LE GALL, G., E. BACHÈRE y E. MIALHE, 1991 Chemiluminescence analysis of the activity of *Pecten maximus* haemocytes stimulated with zymosan and host-specific Rickettsiales-like organisms. Dis. Aquat. Org. **11**: 181-6.
- LEIPPE, M. y L. RENWANTZ, 1988 Release of cytotoxic and agglutinating molecules by *Mytilus* hemocytes. Dev. Comp. Immunol. **2**: 297-308.
- LEIPPE, M., 1999 Antimicrobial and cytolytic polypeptides of amoeboid protozoa - effector molecules of primitive phagocytes. Dev. Comp. Immunol. **23**: 267-79.
- LI, H., M. G. PARISI, M. TOUBIANA, M. CAMMARATA y P. ROCH, 2008 Lysozyme gene expression and haemocyte behaviour in the Mediterranean mussel, *Mytilus galloprovincialis*, after injection of various bacteria or temperature stresses. Fish Shellfish Immunol. **25**: 143-52.
- LOPEZ, C., M. J. CARBALLAL, C. AZEVEDO y A. VILLALBA, 1997 Enzyme characterization of the circulating haemocytes of the carpet shell clam, *Ruditapes decussatus* (Mollusca: bivalvia) Fish Shellfish Immunol. **7**: 595-608.
- LÓPEZ, C., M. J. CARBALLAL, C. AZEVEDO y A. VILLALBA, 1997 Morphological characterization of the hemocytes of the clam, *Ruditapes decussatus* (Mollusca: Bivalvia). J. Invertebr. Pathol. **69**: 51-7.
- LUNA-GONZALEZ, A., A. N. MAEDA-MARTINEZ, F. ASCENCIO-VALLE y M. ROBLES-MUNGARA, 2004 Ontogenetic variations of hydrolytic enzymes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. Fish Shellfish Immunol. **16**: 287-94.
- MA, H., K. MAI, W. XU y Z. LIUFU, 2005 Molecular cloning of alpha2-macroglobulin in sea scallop *Chlamys farreri* (Bivalvia, Mollusca). Fish Shellfish Immunol. **18**: 345-9.
- MATSUZAKI, K., 1998 Magainins as paradigm for the mode of action of pore forming polypeptides. Biochem. Biophys. Acta. **1376**: 391-400.
- MCDADE J. E. y M. R. TRIPP, 1967 Lysozyme in the hemolymph of the Oyster *Crassostrea virginica*. J. Invertebr. Pathol. **9**: 531-5.
- MCHEINERY, J. G. y T. H. BIRKBECK, 1982 Characterization of the lysozyme of *Mytilus edulis* (L). Comp Biochem Physiol. **71B(4)**: 583-9.
- McKERRROW, J. H., 1989 Parasite proteases. Exp. Parasitol. **68**: 111-5.
- MEDZHITOV, R., P. PRESTON-HURLBURT y C. A. JANEWAY, 1997 A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. Nature **388**: 394-7.
- METCHNIKOFF, E., 1891 Lectures on the comparative pathology of inflammation. Dover, New York.



- MINAMIKAWA, M., M. HINE, S. RUSSELL, P. HUBER, P. DUIGNAN y J. S. LUMSDEN, 2004 Isolation and partial characterization of a calcium-dependent lectin (chile-tin) from the haemolymph of the flat oyster, *Ostrea chilensis*. Fish Shellfish Immunol. **17**: 463-76.
- MISKO, T. P., R. J. SCHILLING, D. SALVEMINI, W. M. MOORE y M. G. CURRIE, 1993 A fluorometric assay for the measurement of nitrite in biological samples. Anal. Biochem. **214**: 11-6.
- MITTA, G., F. HUBERT, E. A. DYRYNDA, P. BOUDRY y P. ROCH, 2000b Mytilin B and MGD2, two antimicrobial peptides of marine mussels: gene structure and expression analysis. Dev. Comp. Immunol. **24**: 381-93.
- MITTA, G., F. HUBERT, T. NÖEL y P. ROCH, 1999a Myticin, a novel cysteine-rich antimicrobial peptide isolated from haemocytes and plasma of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. Eur. J. Biochem. **265**: 71-8.
- MITTA, G., F. VANDENBULCKE, F. HUBERT y P. ROCH, 1999b Mussel defensins are synthesised and processed in granulocytes then released into the plasma after bacterial challenge. J. Cell Sci. **112**: 4233- 42.
- MITTA, G., F. VANDENBULCKE, F. HUBERT, M. SALZET y P. ROCH, 2000a Involvement of mytilins in mussel antimicrobial defence. J. Biol. Chem. **275**, 12954-62.
- MITTA, G., F. VANDENBULCKE y P. ROCH, 2000c Original involvement of antimicrobial peptides in mussel innate immunity. FEBS Lett. **486**: 185-90.
- MONTAGNANI, C., F. LE ROUX, F. BERTHE y J. M. ESCOUBAS, 2001 Cg-TIMP, an inducible tissue inhibitor of metalloproteinase from the Pacific oyster *Crassostrea gigas* with a potential role in wound healing and defense mechanisms. FEBS Lett. **500**: 64-70.
- MORTENSEN, S. H. y J. GLETTE, 1996 Phagocytic activity of scallop (*Pecten maximus*) haemocytes maintained *in vitro*. Fish Shellfish Immunol. **6**: 111-21.
- MULLAINADHAN, P. y L. RENWRANTZ, 1986 Lectin-dependent recognition of foreign cells by hemocytes of the mussel, *Mytilus edulis*. Immunobiology **171**:263-73.
- MUÑOZ, P., J. MESEGUER y M. A. ESTEBAN, 2006 Phenoloxidase activity in three commercial bivalve species. Changes due to natural infestation with *Perkinsus atlanticus*. Fish Shellfish Immunol. **20**: 12-9.
- NAGANUMA, T., T. OGAWA, J. HIRABAYASHI, K. KASAI, H. KAMIYA y K. MURAMOTO, 2006 Isolation, characterization and molecular evolution of a novel pearl shell lectin from a marine bivalve, *Pteria penguin*. Mol. Divers. **10**: 607-18.
- NAKAYAMA, K. y T. MARUYAMA, 1998 Differential production of active oxygen species in photo-symbiotic and non-symbiotic bivalves. Dev. Comp. Immunol. **22**: 151-9.



- NAKAYAMA, K., A. M. NOMOTO, M. NISHIJIMA y T. MARUYAMA, 1997 Morphological and functional characterization of hemocytes in the giant clam *Tridacna crocea*. J. Invertebr. Pathol. **69**: 105-11.
- NARAIN, A. S., 1973 The amoebocytes of lamellibranch molluscs, with special reference to the circulating amoebocytes. Malacological Review. **6**: 1-12.
- NATHAN, C., y Q. W. XIE, 1994 Regulation of biosynthesis of nitric oxide. J. Biol. Chem. **269**: 13725-8.
- NES, I.F., HOLO, H., FIMLAND, G., HAYGE, H.H., y J. NISSEN-MEYER, 2002. Unmodified peptide-bacteriocins produced by lactic acid bacteria. En: «Peptide Antibiotics: discovery, mode of actions and applications». New York: Marcel Dekker.
- NEURATH, H., 1984 Evolution of proteolytic enzymes. Science **224**: 350-7.
- NISSEN-MEYER, J. y I. F. NES, 1997 Ribosomally synthesized antimicrobial peptides: their function, structure, biogenesis, and mechanism of action. Arch. Microbiol. **167**: 67-77.
- NOËL, D., E. BACHÈRE y E. MIALHE, 1993 Phagocytosis associated chemiluminescence of hemocytes in *Mytilus edulis* (Bivalvia). Dev. Comp. Immunol. **17**: 483-93.
- NONAKA, M. y A. KIMURA, 2006 Genomic view of the evolution of the complement system. Immunogenetics **58**:701-13.
- NONAKA, M. y F. YOSHIZAKI, 2004 Primitive complement system of invertebrates. Immunol. Rev. **198**: 203-15.
- NONAKA, M., 2001 Evolution of the complement system. Curr. Opin. Immunology. **27**: 749-62.
- NOVAS, A., A. CAO, R. BARCIA y J. I. RAMOS-MARTÍNEZ, 2004 Nitric oxide release by hemocytes of the mussel *Mytilus galloprovincialis* Lmk was provoked by interleukin-2 but not by lipopolysaccharide. Int. J. Biochem. Cell Biol. **36**: 390-4.
- OLAFSEN, J. A., 1995 Role of lectins (C-reactive protein) in defense of marine bivalves against bacteria. Adv. Exp. Med. Biol. **371A**: 343-8.
- OLIVER, J. L., T. D. LEWIS, M. FAISAL y S. L. KAATTARI, 1999 Analysis of the effects of *Perkinsus marinus* proteases on plasma proteins of the Eastern oyster (*Crassostrea virginica*) and the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). J. Invertebr. Pathol. **74**: 173-83.
- ORDÁS, M. C., B. NOVOA y A. FIGUERAS, 2000 Modulation of the chemiluminescence response of Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*) haemocytes. Fish Shellfish Immunol. **10**: 611-22.



- ORDÁS, M. C., B. NOVOA, M. FAISAL, S. McLAUGHLIN y A. FIGUERAS, 2001 Proteolytic activity of cultured *Pseudoperkinsus tapetis* extracellular products. Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol. **130**: 199-206.
- OTTAVIANI, E., L. R. PAEMEN, P. CADET y G. B. STEFANO, 1993 Evidence for nitric oxide production and utilization as a bacteriocidal agent by invertebrate immunocytes. Eur. J. Pharmacol.-Environ. Toxicol. Pharmacol. Sec. **248**: 319-24.
- PADHI, A. y B. VERGHESE, 2008 Molecular diversity and evolution of myticin-C antimicrobial peptide variants in the Mediterranean mussel, *Mytilus galloprovincialis*. Peptides **29**: 1094-101.
- PAG, U. y H. G. SAHL, 2002 Lanthionine-containing bacterial peptides. En: «Peptide Antibiotics: discovery, mode of actions and applications». New York: Marcel Dekker.
- PALLAVICINI, A., M. M. COSTA, C. GESTAL, R. DREOS, A. FIGUERAS, y col, 2008 High sequence variability of myticin transcripts in hemocytes of immune-stimulated mussels suggests ancient host-pathogen interactions. Dev. Comp. Immunol. **32**: 213-26.
- PAYNTER, K. T., S. K. PIERCE y E. M. BURRESON, 1995 Free amino acid levels in eastern oysters, *Crassostrea virginica*, infected with *Perkinsus marinus*. Mar. Biol. **122**: 67-72.
- PEATMAN, E. J., X. WEI, J. FENG, L. LIU, H. KUCUKTAS, y col, 2004 Development of expressed sequence tags from Eastern oyster (*Crassostrea virginica*): lessons learned from previous efforts. Mar. Biotechnol. **6**: S491-496.
- PIPE, R. K., 1990 Hydrolytic enzymes associated with the granular haemocytes of the marine mussel *Mytilus edulis*. Histochem. J. **22**: 595-603.
- PIPE, R.K., 1992 Generation of reactive oxygen metabolites by the haemocytes of the mussel *Mytilus edulis*. Dev. Comp. Immunol. **16**: 111-22.
- PIPE, R. K., S. R. FARLEY y J. A. COLES, 1997 The separation and characterisation of haemocytes from the mussel *Mytilus edulis*. Cell Tissue Res. **289**: 537-45.
- PRADO-ALVAREZ, M., C. GESTAL, B. NOVOA y A. FIGUERAS, 2009a Differentially expressed genes of the carpet shell clam *Ruditapes decussatus* against *Perkinsus olseni*. Fish Shellfish Immunol. **26**: 305-315.
- Prado-Alvarez M, J. ROTLLANT, C. GESTAL, B. NOVOA y A. FIGUERAS. 2009b. Characterization of a C3 and a factor B-like in the carpet-shell clam, *Ruditapes decussatus*. Fish Shellfish Immunol. **26(2)**:305-15.
- PUANGLARP, N., D. OXLEY, G. J. CURRIE, A. BACIC, D. J. CRAIK y D. YELLOWLEES, 1995 Structure of the N-linked oligosaccharides from tridacnin, a lectin found in the haemolymph of the giant clam *Hippopus hippopus*. Eur. J. Biochem. **232**: 873-80.



- QIU, L., L. SONG, W. XU, D. NI y Y. YU, 2007 Molecular cloning and expression of a Toll receptor gene homologue from Zhikong Scallop, *Chlamys farreri*. Fish Shellfish Immunol. **22**: 451-66.
- RADI, R., T. P. COSGROVE, J. S. BECKMAN y B. A. FREEMAN, 1993 Peroxynitrite-induced luminol chemiluminescence. Biochem. J. **15**: 51-7.
- RATCLIFFE, N. A., A. F. ROWLEY, S. W. FITZGERALD y C. P. RHODES, 1985 Invertebrate immunity: basic concepts and recent advances. Int. Rev. Cytol. **97**: 183-350.
- RODRICK, G. E. y T. C. CHENG, 1974 Kinetic properties of lysozyme from the hemolymph of *Crassostrea virginica*. J. Invertebr. Pathol. **24**: 41-8.
- ROSEN, G. M., S. POU, C. L. RAMOS, M. S. COHEN y B. E. BRITIGAN, 1995 Free radicals and phagocytic cells. FASEB J. **9**: 200-9.
- RUDELL, C. L., 1971 The fine structure of the granular amebocytes of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. J. Invertebr. Pathol. **18**: 269-75.
- SAAVEDRA, C. y E. BACHÈRE, 2006 Bivalve Genomics. Aquaculture, **256**: 1-14
- SAAVEDRA C., C. GESTAL, B. NOVOA y A. FIGUERAS, 2007 Genómica de moluscos y acuicultura. En: *Genética y Genómica en Acuicultura*. (P Martínez Portela y A Figueras Huerta, eds), pp. 529-571. Publicaciones científicas y tecnológicas del Observatorio Español de Acuicultura, España.
- SAUL, S. J., L. BIN y M. SUGUMARAN, 1987 The majority of prophenoloxidase in the hemolymph of *Manduca sexta* is present in the plasma and not in the hemocytes. Dev. Comp. Immunol. **11**: 479-85.
- SMITH, L. C., K. AZUMI y M. NONAKA, 1999 Complement systems in invertebrates. The ancient alternative and lectin pathways. Immunopharmacology **42**: 107-20.
- SÖDERHALL, K., 1982 The prophenoloxidase activating system and melanisation: a recognition mechanism of arthropods? A review. Dev. Comp. Immunol. **6**: 601-11.
- SÖDERHALL, K. y L. HALL, 1984 Lipopolysaccharide-induced activation of prophenoloxidase activating system in crayfish haemocyte lysate. Biochem. Biophys. Acta **797**: 99-104.
- SÖDERHALL, K. y V. J. SMITH, 1986 The prophenoloxidase activating system: The biochemistry of its activation and role in arthropod cellular immunity, with special reference to crustaceans. En «Immunity in invertebrates». Springer Verlag.
- SONG, L., W. XU, C. LI, H. LI, L. WU, y col, 2006 Development of expressed sequence tags from the bay scallop *Argopecten irradians irradians*. Mar. Biotechnol. **8**: 161-9.



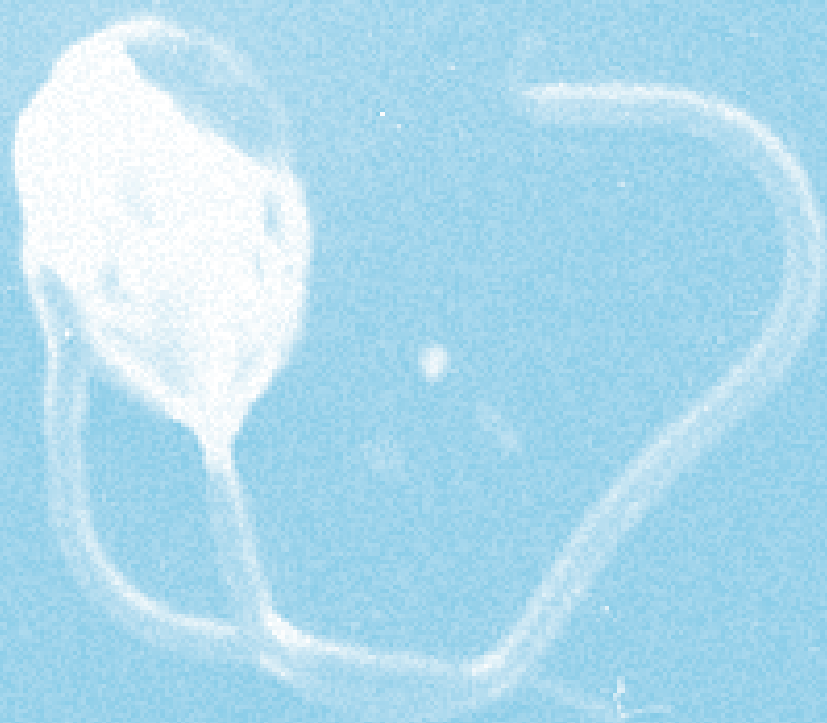
- SPARKS, A.K. y J. F. MORADO, 1988 Inflammation and wound repair in bivalve molluscs. *Am. Fish Soc. Spec. Pub.* **18**: 139-52.
- SUZUKI, T. y K. MORI, 1989 A galactose-specific lectin from the hemolymph of the pearl Oyster, *Pinctada fucata martensii*. *Comp. Biochem Physiol.* **92B**: 455-62.
- TAFALLA, C., J. GÓMEZ-LEÓN, B. NOVOA y A. FIGUERAS, 2003 Nitric oxide production by carpet shell clam (*Ruditapes decussatus*) hemocytes. *Dev. Comp. Immunol.* **27**: 197-205.
- TAFALLA, C., B. NOVOA y A. FIGUERAS, 2002 Production of nitric oxide by mussel (*Mytilus galloprovincialis*) hemocytes and effect of exogenous nitric oxide on phagocytic functions. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* **132**: 423-31.
- TAKADA, A., TAKADA y T. URANO, 1994 The coagulation cascade: initiation, maintenance and regulation. *Thromb. Res.* **76**: 1-31.
- TAKAHASHI, K. G., T. KURODA y K. MUROGA, 2008 Purification and antibacterial characterization of a novel isoform of the Manila clam lectin (MCL-4) from the plasma of the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*. *Comp. Biochem. Physiol.* **150B**: 45-52.
- TAKEDA, K. y S. AKIRA, 2004 TLR signaling pathways. *Semin. Immunol.* **16**: 3-9.
- TANGUY, A., X. GUO y S. E. FORD, 2004 Discovery of genes expressed in response to *Perkinsus marinus* challenge in Eastern (*Crassostrea virginica*) and Pacific (*C. gigas*) oysters. *Gene* **338**: 121-31.
- TASUMI, S. y G. R. VASTA, 2007 A galectin of unique domain organization from hemocytes of the Eastern oyster (*Crassostrea virginica*) is a receptor for the protistan parasite *Perkinsus marinus*. *J. Immunol.* **179**: 3086-98.
- TATSUMI, M., Y. ARAI y T. ITOH, 1982 Purification and characterization of a lectin from the shellfish, *Saxidomus purpuratus*. *J. Biochem.* **91**: 1139-46.
- THØGERSEN, I. B., G. SALVESEN, F. H. BRUCATO, S. V. PIZZO y J. J. ENGHILD, 1992 Purification and characterization of an alpha-macroglobulin proteinase inhibitor from the mollusc *Octopus vulgaris*. *Biochem. J.* **285**: 521-7.
- TORREILLES, J., M. C. GUERIN y P. ROCH, 1996 Espèces oxygénées réactives et systèmes de défense des bivalves marins. *CR Acad. Sci. Paris.* **319**: 209-18.
- TORREILLES, J. y B. ROMESTAND. 2001 *In vitro* production of peroxynitrite by haemocytes from marine bivalves: C-ELISA determination of 3-nitrotyrosine level in plasma proteins from *Mytilus galloprovincialis* and *Crassostrea gigas*. *BMC Immunol.* **2**: 1.
- TRIPP, M. R., 1966 Hemagglutinin in the blood of the oyster *Crassostrea virginica*. *J. Invertebr. Pathol.* **8**: 478-84.



- TRIPP, M. R., 1992 Agglutinins in the hemolymph of the hard clam, *Mercenaria mercenaria*. J. Invertebr. Pathol. **59**: 228-34.
- TRIPP, M. R., 1992 Phagocytosis by hemocytes of the hard clam, *Mercenaria mercenaria*. J. Invertebr. Pathol. **59**: 222-7.
- TRIPP, M. R., 1961 The fate of foreign materials experimentally introduced into the snail *Australorbis glabratus*. J. Parasitol. **47**: 745-51.
- TUNKIJANUKIJ, S., H. GIAEVER, C. C. Q. CHIN y J. A. OLAFSEN, 1998 Sialic acid in hemolymph and affinity purified lectins from two marine bivalves. Comp. Biochem. Physiol. **119B**: 705-13.
- TUNKIJANUKIJ, S., H. V. MIKKELSEN y J. A. OLAFSEN, 1997 A heterogeneous sialic acid-binding lectin with affinity for bacterial LPS from horse mussel (*Modiolus modiolus*) hemolymph. Comp. Biochem. Physiol. **117B**: 273-86.
- VASTA, G. R., AHMED, H. y E. W. ODOM, 2004. Structural and functional diversity of lectin repertoires in invertebrates, protochordates and ectothermic vertebrates. Curr Opin Struct Biol. **14**:617-30.
- VASTA, G.R., T. C. CHENG y J. J. MARCHALONIS, 1984 A lectin on the hemocyte membrane of the oyster (*Crassostrea virginica*). Cell Immunol. **88**: 475-502.
- VASTA, G. R., J. T. SULLIVAN, T. C. CHENG, J. J. MARCHALONIS y G. W. WARR, 1982 A cell membrane associated lectin of the oyster hemocyte. J. Invertebr. Pathol. **40**: 367-77.
- VÁZQUEZ-TORRES, A., J. JONES-CARSON y E. BALISH, 1996 Peroxynitrite contributes to the candidacidal activity of nitric oxide-producing macrophages. Infect. Immun. **64**: 3127-33.
- VENIER, P., A. PALLAVICINI, B. DE NARDI y G. LANFRANCHI, 2003 Towards a catalogue of genes transcribed in multiple tissues of *Mytilus galloprovincialis*. Gene **314**: 29-40.
- VENIER, P., C. DE PITTA, A. PALLAVICINI, F. MARSANO, L. VAROTTO, y col, 2006 Development of mussel mRNA profiling: Can gene expression trends reveal coastal water pollution? Mutat. Res. **602**: 121-34.
- VILLAMIL, L., J. GÓMEZ-LEÓN y M. GÓMEZ-CHIARRI, 2007 Role of nitric oxide in the defenses of *Crassostrea virginica* to experimental infection with the protozoan parasite *Perkinsus marinus*. Dev. Comp. Immunol. **31**: 968-77.
- WANG, H., L. SONG, C. LI, J. ZHAO, H. ZHANG, D. NI y W. XU, 2007 Cloning and characterization of a novel C-type lectin from Zhikong scallop *Chlamys farreri*. Mol. Immunol. **44**: 722-31.
- WITKE, M. y L. RENWRANTZ, 1984 Quantification of cytotoxic hemocytes of *Mytilus edulis* using a cytotoxicity assay in agar. J. Invertebr. Pathol. **43**: 248-53.

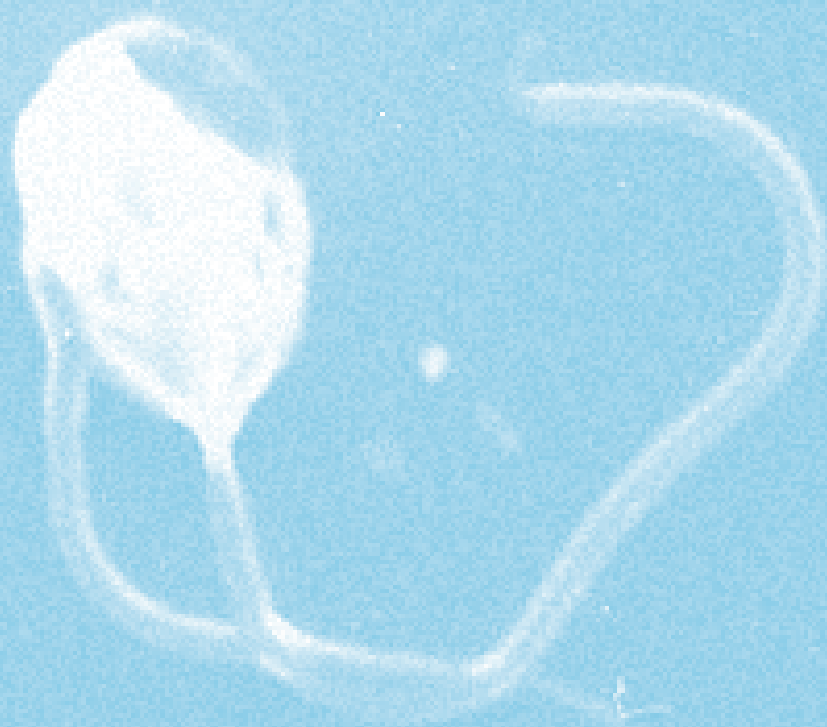


- XUE, Q., RENAULT T. y S. CHILMONCZYK, 2001 Flow cytometric assessment of haemocyte sub-populations in the European flat oyster, *Ostrea edulis*, haemolymph. Fish Shellfish Immunol. **11**: 557-67.
- XUE, Q., T. RENAULT, N. COCHENNEC y A. GERARD, 2000 Separation of european flat oyster, *Ostrea edulis*, haemocytes by density gradient centrifugation and SDS-PAGE characterisation of separated haemocyte sub-populations. Fish Shellfish Immunol. **10**:155-65.
- XUE, Q. G., G. L. WALDROP, K. L. SCHEY, N. ITOH, M. OGAWA, y col, 2006 A novel slow-tight binding serine protease inhibitor from eastern oyster (*Crassostrea virginica*) plasma inhibits perkinsin, the major extracellular protease of the oyster protozoan parasite *Perkinsus marinus*. Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol. **145**: 16-26.
- XUE, Q. G., N. ITOH, K. L. SCHEY, Y. L. LI, R. K. COOPER y J. F. LA PEYRE, 2007 A new lysozyme from the eastern oyster (*Crassostrea virginica*) indicates adaptative evolution of i-type lysozymes. Cell Mol. Life Sci. **64**: 82-95.
- YOSHINO, T. P. y T.-L. TUAN, 1985 Soluble mediators of cytolytic activity in hemocytes of the asian clam, *Corbicula fluminea*. Dev. Comp. Immunol. **9**: 515-522.
- ZAKARDIS, I. K., D. MASTELLOS y J. D. LAMBRIS, 2001 Phylogenetic aspects of the complement system. Dev. Comp. Immunol. **25**: 745-62.
- ZHANG, H., L. SONG, C. LI, J. ZHAO, H. WANG, Q. GAO y W. XU, 2007 Molecular cloning and characterization of a thioester-containing protein from Zhikong scallop *Chlamys farreri*. Mol. Immunol. **44**: 3492-500.
- ZHAO, J., L. SONG, C. LI, D. NI, L. WU, y col, 2007 Molecular cloning, expression of a big defensin gene from bay scallop *Argopecten irradians* and the antimicrobial activity of its recombinant protein. Mol. Immunol. **44**: 360-8.
- ZHU, L., L. SONG, Y. CHANG, W. XU y L. WU, 2006 Molecular cloning, characterization and expression of a novel serine proteinase inhibitor gene in bay scallops (*Argopecten irradians*, Lamarck 1819). Fish Shellfish Immunol. **20**: 320-31.



11

SEÑALIZACIÓN CELULAR EN MOLUSCOS



SEÑALIZACIÓN CELULAR EN MOLUSCOS

Cao A. y Villalba A.

Centro de Investigación Mariñas. Consellería
do Mar, Xunta de Galicia, Apto. 13,
36620 Vilanova de Arousa, Spain

Resumen

La capacidad de las células para recibir y actuar frente a señales o estímulos externos es fundamental para la vida. La conversión de estos estímulos en un cambio químico, llamada transducción de señal, es una propiedad universal de todas las células. Una amplia variedad de estímulos, incluyendo citoquinas, hormonas, neurotransmisores y factores de crecimiento, actúan a través de proteínas receptoras específicas en la membrana plasmática. En invertebrados tales como moluscos, insectos, anélidos, equinodermos y tunicados se ha detectado la presencia de moléculas similares a las citoquinas descritas en vertebrados; al igual que en éstos, están presentes en diferentes tejidos y órganos. Las citoquinas son moléculas funcionalmente conservadas, que durante el proceso evolutivo han mantenido su pleiotropicidad, su redundancia en el modo de acción y una alta promiscuidad de sus receptores, además intervienen y modulan los principales fenómenos inmunes, incluyendo proliferación, diferenciación y muerte celular, apoptosis, citotoxicidad, etc. Las células eucariotas tienen diversos mecanismos de señalización: canales iónicos, receptores, proteínas de membrana que actúan a través de proteínas G, receptores nucleares que se unen a su ligando específico y actúan como factores de transcripción y proteínas de membrana que atraen y activan proteínas quinasas. Los hemocitos de invertebrados son capaces de responder



a diversos estímulos extracelulares tales como interleuquinas, corticotropinas, factores de crecimiento y lipopolisacáridos bacterianos, activando diferentes caminos de transmisión de señales. Estos caminos implican la activación de proteínas tirosina-quinasas (PTK), proteínas Ras, Raf, proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs), factores de transcripción Stat, etc, que desencadenan distintas respuestas celulares. Estudios avanzados sobre la internalización de diferentes señales podrían esclarecer nuestra visión actual de los mecanismos de transducción generados por diferentes inductores.

Abstract

The ability of cells to perceive and to respond to signals or external stimuli is crucial for life. The conversion of these stimuli into biochemical reactions, referred as signal transduction, is an universal property of every cell. A wide variety of stimuli, including cytokines, hormones, neurotransmitters and growth factors act through binding to specific receptor proteins located in the plasma membrane. The occurrence of cytokine-like molecules has been detected in different tissues and organs of invertebrates such as molluscs, insects, annelid worms, echinoderms and tunicates. Cytokines are highly conserved molecules that have kept their pleiotropism, redundancy and a high receptor promiscuity through evolution; moreover, they take part and modulate the main immune phenomena, including proliferation, differentiation and cell death, apoptosis, cytotoxicity, etc. The eukaryotic cells have different signalling mechanisms: ion channels, receptors, membrane proteins that act through G proteins, nuclear receptors that bind to a specific ligand and act as transcription factors and membrane proteins that attract and activate protein kinases. The invertebrate haemocytes are able to respond to different extracellular stimuli such as interleukins, corticotropins, growth factors and bacterial lipopolysaccharides, activating different signal transmission pathways. These pathways involve the activation of tyrosine kinase proteins (TKP), Ras proteins, Raf, mitogen activated protein kinases (MAPKs), transcription factors Stat, etc, which trigger different cell responses. Advanced studies on the internalisation of different signals could elucidate the current view of the transduction mechanisms triggered by different inductors.



1. INTRODUCCIÓN

En el ámbito biológico, se ha extendido el uso de la expresión **señalización celular** como traducción literal del inglés, *cell signalling*, al referirse a la comunicación mediante compuestos (**señales**) que generan respuestas determinadas en células diana. La evolución ha provisto a las células de todos los organismos vivos de mecanismos de señalización que les permite percibir estímulos ambientales y responder adecuadamente a ellos. El éxito de estos mecanismos asegura que el organismo sobreviva a sus cambiantes circunstancias ambientales. Además, en los organismos multicelulares estos mecanismos forman redes de comunicación más complejas, que garantizan que cada célula funcione y responda a una diversidad aún mayor de estímulos y que lo haga coordinadamente con las otras células del organismo. Es gracias a esta comunicación entre células que el organismo mantiene una funcionalidad como entidad unitaria. De esta red de comunicación dependen funciones tan importantes como el desarrollo embrionario, la proliferación y diferenciación celular, las respuestas al estrés, la percepción sensorial, el movimiento, **la respuesta inmune**, la regulación metabólica, etc. (JIMÉNEZ y MERCHANT 2003).

La capacidad de las células para recibir y actuar en respuesta a señales que provienen más allá de la membrana plasmática es fundamental para la vida. La señal representa información que es detectada por un receptor específico y se convierte en una respuesta celular en la que siempre interviene un proceso químico. Esta conversión de información en cambio químico, llamada transducción de señal, es una propiedad universal de las células. A pesar de que el número de señales biológicas es grande, como lo es la variedad de respuestas biológicas a dichas señales, los organismos usan sólo unos pocos mecanismos conservados evolutivamente para detectar las señales extracelulares y transducirlas en cambios intracelulares (NELSON *et al.* 2006).

Cada organismo tiene la capacidad de distinguir entre lo propio y lo extraño. Esta capacidad está determinada genéticamente y las bases de los mecanismos de reconocimiento y respuesta varían según los niveles biológicos de organización. Los invertebrados están dotados

de un sistema inmune innato que incluye componentes humorales y celulares (NAPPI y VASS 1993, 2001; CARTON y NAPPI 1997; NAPPI y OTTAVIANI 2000).

El sistema inmune en todos los animales comprende elementos celulares y humorales que interaccionan para proteger al organismo de potenciales patógenos, parásitos o células neoplásicas. El componente celular de la inmunidad en los invertebrados está mediado por células sanguíneas (hemocitos) que participan en varios mecanismos internos de defensa (RATCLIFFE *et al.* 1985; SMITH 1991).

En moluscos bivalvos, las respuestas celulares son llevadas a cabo por hemocitos circulantes, los cuales representan la primera línea de defensa contra infecciones bacterianas. Aunque estas respuestas han sido ampliamente estudiadas, se conoce poco acerca de los mecanismos de transducción implicados en la respuesta de defensa de estas células (RENWRANTZ 1990).

Las transducciones de señal son específicas y altamente sensibles. La especificidad se consigue por complementariedad molecular precisa entre las moléculas señal y receptor, en la que intervienen el mismo tipo de fuerzas débiles que tienen lugar en las interacciones enzima-sustrato y antígeno-anticuerpo. Los organismos multicelulares tienen un nivel de especificidad adicional ya que los receptores para una señal determinada, o las dianas intracelulares de una determinada señal, solo están presentes en ciertos tipos de células.

Tres factores explican la extraordinaria sensibilidad de los transductores de señal: la elevada afinidad de los receptores por las moléculas señal, la cooperatividad en la interacción entre el ligando y el receptor y la amplificación de la señal por cascadas enzimáticas. La **afinidad** entre la señal (ligando) y el receptor puede expresarse como la constante de disociación K_d , a menudo 10^{-10} M o menos, lo que quiere decir que el receptor puede detectar concentraciones picomolares de una molécula señal.

La **cooperatividad** en las interacciones entre el ligando y el receptor acarrea grandes cambios en la actividad del receptor con pequeños cambios en la concentración del ligando.

La **amplificación por cascadas** enzimáticas tiene lugar cuando un enzima asociado con un receptor de señal se activa, y a su vez, cata-



liza la activación de muchas moléculas de un segundo enzima, cada una de las cuales activa muchas moléculas de un tercer enzima, y así sucesivamente. Estas cascadas dan lugar a amplificaciones de varios órdenes de magnitud en milisegundos.

La sensibilidad de los sistemas de receptores está sujeta a modificación. Cuando una señal está presente continuamente, se produce una **desensibilización** del sistema receptor; cuando el estímulo disminuye por debajo de un determinado umbral, el sistema se vuelve sensible de nuevo.

Un último rasgo notable de los sistemas de transducción de señal es la **integración**, la capacidad del sistema para recibir múltiples señales y producir una respuesta unificada apropiada para las necesidades de la célula o del organismo. Diferentes vías de señalización conversan entre ellas a diferentes niveles, originando una abundancia de interacciones que mantienen la homeostasis en la célula y el organismo. El desencadenante es diferente para cada sistema pero las características generales de la transducción de señal son comunes a todos: una señal interactúa con un receptor; el receptor activado interactúa con la maquinaria celular produciendo una segunda señal o cambio en la actividad de una proteína celular, la actividad metabólica de la célula diana experimenta un cambio y finalmente el fenómeno de transducción se acaba y la célula vuelve al estado anterior del estímulo.

Se han descrito seis mecanismos básicos de señalización:

1. Los canales iónicos de la membrana plasmática que se abren y se cierran en respuesta a la unión de ligandos químicos o cambios en el potencial transmembrana. Éstos son los transductores de señal más sencillos.
2. Enzimas receptores, es decir receptores de membrana plasmática que son también enzimas. Cuando uno de estos receptores es activado por su ligando extracelular, cataliza la producción de un segundo mensajero intracelular.
3. Proteínas receptoras que activan indirectamente (a través de proteínas que unen GTP, o proteínas G) enzimas que producen segundos mensajeros intracelulares.



4. Receptores nucleares que, cuando se unen a su ligando específico, alteran la velocidad a la que genes específicos son transcritos y traducidos en proteínas celulares.
5. Receptores que carecen de actividad enzimática pero atraen y activan enzimas citoplasmáticos que actúan sobre proteínas más alejadas en la vía, bien convirtiéndolas directamente en proteínas reguladoras de genes, bien activando una cascada de enzimas que finalmente activan un gen regulador.
6. Los receptores que interaccionan con componentes macromoleculares de la matriz extracelular y llevan al sistema citoesquelético instrucciones sobre migración celular o adherencia a la matriz (NELSON *et al.* 2006).

En diversas especies eucariotas, desde insectos a seres humanos, los lipopolisacáridos bacterianos (LPS) estimulan la inmunidad innata (ULEVITCH y TOBÍA 1995), activando diferentes caminos de transducción de señal en macrófagos. Estos caminos implican la activación de proteínas-G, tirosina-quinasa, fosfolipasa C, proteína quinasa A (PKA), proteína quinasa C (PKC) y la cascada de quinasa MAP (SWEET y HUME 1996; FUJIHARA *et al.* 1994; LIU *et al.* 1994; SHAPIRA *et al.* 1994; HAZIOT *et al.* 1996).

2. CITOQUINAS EN LA RESPUESTA INMUNE

Las respuestas inmunes son el resultado de una compleja interacción entre una gran variedad de células. Además hay una continua interacción entre los sistemas inmune, nervioso y endocrino.

Moléculas como las hormonas, neuropéptidos y citoquinas están implicadas en la transmisión de señales. Estas últimas se han clasificado según su origen o función. Hoy en día, el término general de «citoquina» se usa para todas estas moléculas señal y sus principales características son las siguientes: (1) son producidas por células del sistema inmune (NISTICÒ 1993), (2) son glucoproteínas de pequeño peso molecular (10-20 kDa) y la mayoría son sintetizadas de novo por células activadas durante la fase eferente de la respuesta inmune, (3) el principal papel de las citoquinas es funcionar como mediadores y moduladores de la respuesta inmune y la inflamación (NISTICÒ 1993;



BLALOCK 1994), (4) desde el punto de vista funcional, las citoquinas se caracterizan por ser pleiotrópicas y redundantes –la misma citoquina puede tener diferentes blancos celulares y diferentes citoquinas pueden realizar una misma función; (5) actúan sobre blancos celulares por mecanismos autocrinos, paracrinos y endocrinos; las citoquinas se unen a receptores específicos de la membrana plasmática, los cuales muestran un cierto grado de promiscuidad (KISHIMOTO *et al.* 1994; OTTAVIANI *et al.* 1994, 1995), (6) en varios tipos celulares, las citoquinas actúan como factores de crecimiento regulando la proliferación e inhibición de la apoptosis (MANFREDINI *et al.* 1993; KROENER 1995).

Las citoquinas están presentes en prácticamente todos los organismos y tejidos del cuerpo, incluyendo además del sistema nervioso, la piel, los intestinos, etc. De este modo, las citoquinas parecen ser más moléculas señal que mediadores inmunes y juegan un papel principal en fenómenos fisiológicos y patológicos (BROZEK y LEY 1991).

Por otra parte, se ha detectado la presencia de moléculas similares a citoquinas en invertebrados tales como moluscos, insectos, anélidos, equinodermos y tunicados. Al igual que en vertebrados estas moléculas están presentes en diferentes tejidos y órganos. Moléculas similares a IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-6 y TNF- α se han encontrado en hemocitos y en la hemolinfa (HUGHES *et al.* 1990, 1991, 1992; STEFANO *et al.* 1991; OTTAVIANI *et al.* 1993; GRANATH *et al.* 1994; OUWE-MISSI-OUKEM-BOYER *et al.* 1994).

2.1. Estructura del receptor de citoquinas y transducción de señales

En general, un receptor funcional se puede dividir en varios componentes: una unidad de unión, un transductor, un efector y una unidad reguladora.

Un receptor hormonal complejo se compone de un receptor de hormonas (con 7 segmentos transmembranales), una proteína G heterotrimérica (subunidades α , β , γ) como transductor, y un efector que genera señales intracelulares (BENOVIC *et al.* 1988).

En otros casos, los receptores de factores de crecimiento como EGF, PDGF y FGF, están constituidos por una cadena polipeptídica sencilla con motivos estructurales comunes: con un gran dominio extracelular



de unión del ligando, un dominio sencillo situado dentro de la membrana, y un gran dominio citosólico con actividad quinasa (ULLRICH y SCHELESSINGER 1990).

Es importante señalar que una misma citoquina puede actuar tanto como señal positiva como negativa, dependiendo del tipo y del estado de desarrollo de la célula blanco (ARAI *et al.* 1990). Igualmente, diferentes citoquinas mediante diferentes receptores dan lugar a aparentemente idénticas respuestas biológicas.

La interacción de las citoquinas con su receptor específico en la superficie celular desencadena la activación de caminos de señalización intracelulares que desencadenan respuestas celulares. Las quinasas Janus (JAKs) son mediadores centrales en la transducción de la señal y fosforilan residuos de tirosina dentro de dominios intracelulares del receptor, creando lugares cercanos para el reclutamiento de componentes adicionales en la señalización, incluyendo el dominio SH2 que contiene transductores de señales y activadores de factores de transcripción (STAT). Un gran número de citoquinas, factores de crecimiento y hormonas activan el camino JAK/STAT. Este camino puede ser regulado por múltiples mecanismos; hay tres principales reguladores negativos en la señalización a través de JAK/STAT; SHP-1, una tirosina fosfatasa, la cual actúa provocando una regulación por degradación proteolítica de la actividad JAK seguida de una autoactivación; proteínas inhibidoras de STATs activadas (PIAS), las cuales se unen a STATs activadas e inhiben su actividad transcripcional; y las proteínas supresoras de la señalización de citoquinas (SOCS), las cuales son blancos transcripcionales en las STATs y funcionan como retroalimentación negativa para atenuar la señalización a través de JAK/STAT (Fig. 1) (KILE *et al.* 2000).

La activación de las quinasas JAK tiene lugar mediante la fosforilación de residuos de tirosina en los receptores a los que se asocian. Estas fosfotirosinas pueden servir como lugares de anclaje para moléculas de señalización incluidas las proteínas STAT (GREENLUND *et al.* 1995). Después de la dimerización del receptor y de la activación de las JAKs, los factores de transcripción STAT son reclutados, activados y translocados al núcleo donde estimulan la transcripción de genes que afectan a la respuesta biológica (DARNELL *et al.* 1994; DARNELL 1997; HORVATH *et al.* 1997).

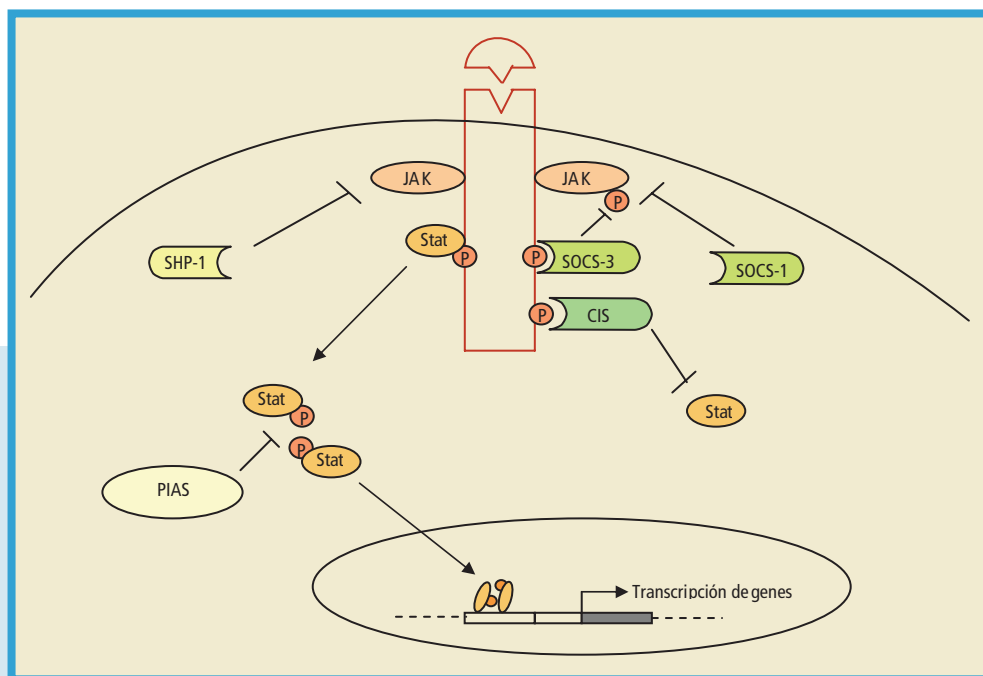


FIGURA 1.

Reguladores negativos en el camino de señalización a través de JAK/STAT. Las líneas en forma de T representan inhibición y las flechas representan activación.

2.2. Mecanismos moleculares de transmisión de señales mediadas por IL-2

Se tiene muy poca información acerca de cuáles son los mecanismos que transmiten las señales mediadas por la IL-2 desde la superficie celular al núcleo.

Cuando la IL-2 se une a su receptor de alta afinidad este complejo se internaliza rápidamente (KUMAR *et al.* 1987). La internalización es un paso necesario pero no suficiente en el proceso de proliferación mediada por IL-2, lo que parece indicar que probablemente esta molécula no interacciona de una forma directa con las vías de transmisión de señales (KONO *et al.* 1990).

Para ejercer su efecto biológico, la IL-2 interacciona con su receptor específico en la superficie celular. Este receptor está formado por

tres subunidades denominadas en función de su peso molecular: p55 (subunidad α), p70 (subunidad β) y p64 (subunidad γ), que al combinarse forman el receptor de baja afinidad (p55, K_d 10^{-8} M), afinidad media (p70/p64, K_d 10^{-9} M) y alta afinidad (p55/p70/p64, K_d 10^{-11} M) (Fig. 2) (LEONARD *et al.* 1984; NIKAIIDO *et al.* 1984; HATAKEYAMA *et al.* 1989a).

La interacción de la IL-2 con su receptor desencadena varios sucesos de señalización intracelular, incluyendo la fosforilación de proteínas en restos de tirosina y la subsiguiente inducción de varios protooncogenes críticos para la proliferación celular (MINAMI *et al.* 1993a; MINAMI *et al.* 1993b; KONO *et al.* 1993).

La IL-2 desencadena la activación de proteína tirosina-quinasa (PTK) e induce la fosforilación en tirosina de una proteína adaptadora

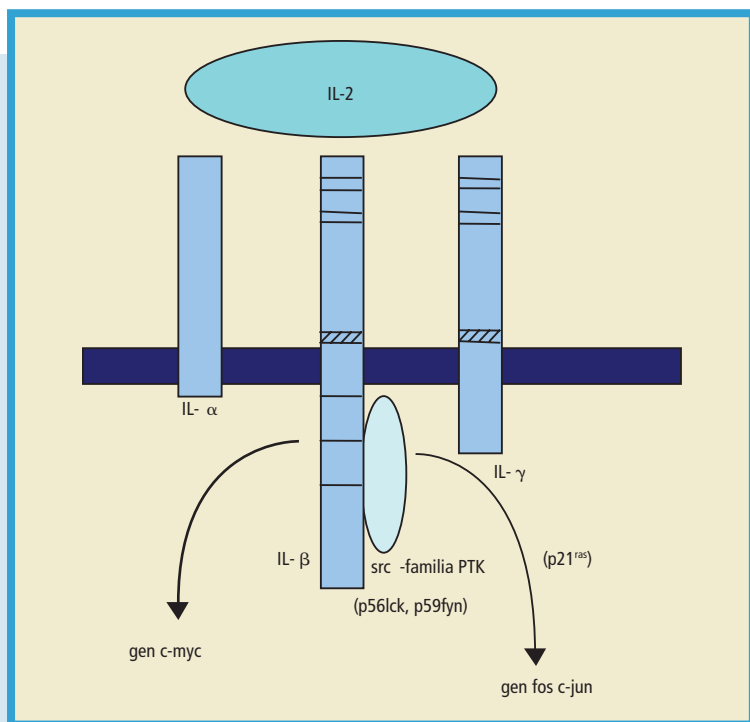


FIGURA 2.
Representación esquemática del receptor de IL-2.



denominada Shc. La fosforilación de Shc crea una región consenso para el dominio SH2 de otra proteína adaptadora, Grb2, la cual está compuesta por un dominio SH2 flanqueado a ambos lados por dominios SH3, esta proteína adaptadora interacciona con SOS, un factor de intercambio de nucleótidos de guanina. Por un mecanismo desconocido, se forma el complejo trimolecular Shc-Grb2-SOS que desencadena la transformación de GDP en GTP provocando la activación de la proteína Ras. La forma activa de Ras desencadena la cascada de serina/treonina quinasas. Aunque la interacción de Ras-Raf es necesaria para la activación de Raf, la interacción no activa la actividad catalítica de Raf. Después de la activación de esta proteína tiene lugar la fosforilación y activación de MEK el cual finalmente fosforila a proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK). Estas fosforilaciones activan a MAPK, la cual retransmite la señal a sistemas efectores por fosforilación de múltiples sustratos citoplasmáticos, incluyendo otras serina/treonina quinasas. Además MAPK se transloca al núcleo y fosforila ciertos factores de transcripción. Por otra parte, Jak también transduce señales directamente al núcleo por fosforilación de Stat3 y/o Stat5. La fosforilación induce la dimerización de STAT, que desencadena la posterior translocación al núcleo (Fig. 3) (KARNITZ y ABRAHAM 1996).

Además de estas proteínas quinasas, la IL-2 provoca la activación de PI3-quinasa (AUGUSTINE *et al.* 1991; MERIDA *et al.* 1991; REMILLARD *et al.* 1991; KARNITZ *et al.* 1994). Una vez activada, esta quinasa fosforila al fosfoinositol (PI) 4,5-P₂ para producir un segundo mensajero lipídico, PI-3,4,5-P₃ el cual activa a otros efectores (KARNITZ y ABRAHAM 1996).

En la hemolinfa de *Mytilus galloprovincialis* se ha detectado un péptido de características inmunógenas similares a la IL-2, mientras que en hemocitos se ha identificado la presencia de un receptor para IL-2, este receptor es similar estructuralmente al de las células de vertebrados; está constituido por tres subunidades (α , β , γ) cuyas masas moleculares son del mismo orden de magnitud que las encontradas en vertebrados (BARCIA *et al.* 1999).

Una misma citoquina puede dar lugar a diferentes respuestas (pleiotropidad), dependiendo del tipo y del estado de desarrollo de la célula blanco (ARAI *et al.* 1990). En hemocitos de *M. galloprovincialis* cada citoquina interacciona con un receptor específico generando diversas

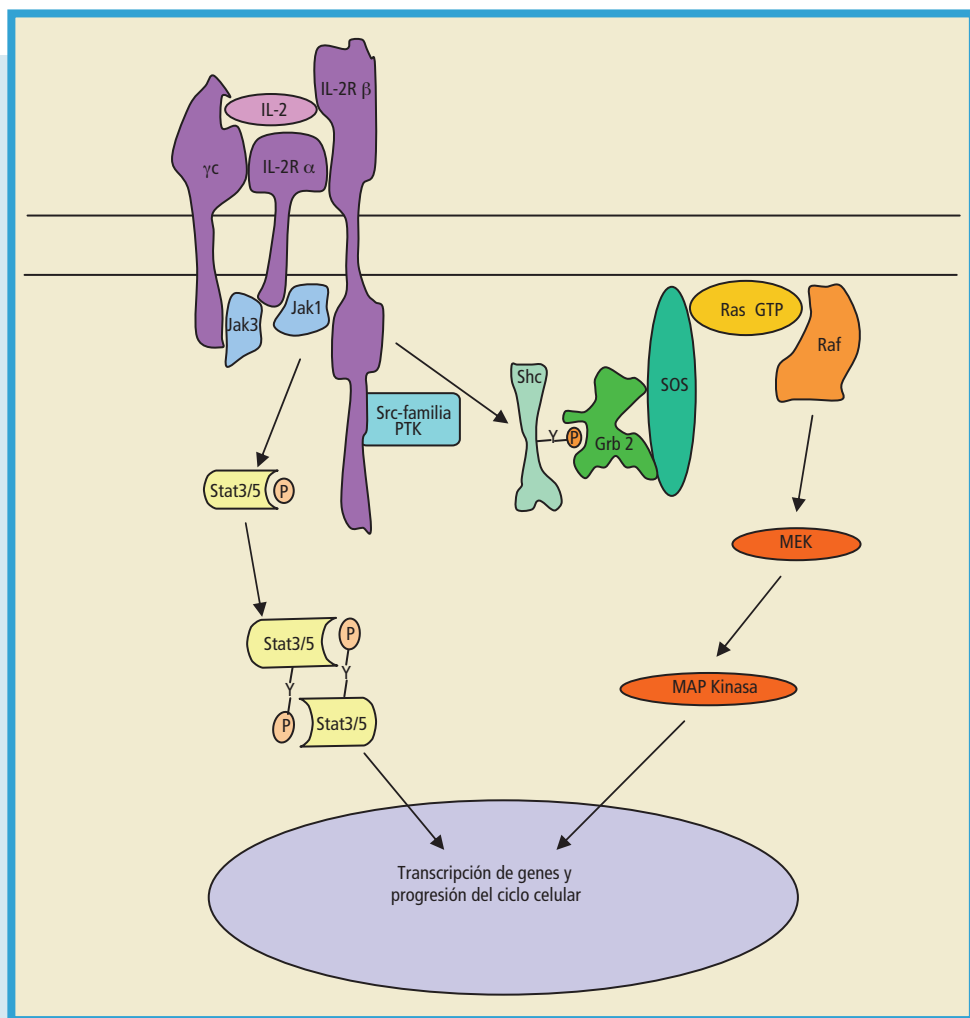


FIGURA 3.

La IL-2 induce la activación de Ras y Stat.

respuestas. Igualmente, diferentes citoquinas mediante diferentes efectores dan lugar a aparentemente idénticas respuestas biológicas (redundancia) (CAO 2002). Parece ser, por tanto, que las citoquinas son moléculas funcionalmente conservadas, que durante el proceso evolutivo han mantenido su pleiotropidad, su redundancia en el modo



de acción y una alta promiscuidad de sus receptores (OTTAVIANI *et al.* 1995; CAO 2002).

3. REGULACIÓN INTRACELULAR DE LAS RESPUESTAS CELULARES

3.1. Corticotropinas y estrógenos

El factor liberador de corticotropinas (CRF) parece ser una molécula señal potencialmente importante en procesos autoinmunoreguladores y neuroinmunes de vertebrados e invertebrados (SMITH *et al.* 1992a).

Ciertos neuropéptidos participan en procesos reguladores en el sistema inmune de vertebrados e invertebrados (VAN EPPS 1984; FISHER y FALKE 1986; STEFANO *et al.* 1989). Además varios neuropéptidos endógenos, estimulan la adherencia, cambios conformacionales, y actividad locomotora en humanos y en inmunocitos de invertebrados (moluscos, insectos) (STEFANO 1989). Por otra parte el CRF parece inducir inmunosupresión celular a través de su propio receptor (SMITH *et al.* 1992b).

Los hemocitos de invertebrados son capaces de responder a CRF y a fragmentos de ACTH (hormona adrenocorticotrópica) proporcionando evidencias de una complejidad en la señalización intracelular dentro del sistema inmune en animales relativamente primitivos (GENEDANI *et al.* 1994).

En hemocitos de *M. galloprovincialis* mantenidos en cultivo, la incubación con CRF provoca la expresión de la cadena α del receptor de IL-2 y la liberación de catecolaminas (CAO *et al.* 2004). Del mismo modo, en hemocitos no cultivados de los caracoles *Viviparus ater* y *Plarnobarius Corneus*, la estimulación con CRF también provoca la liberación de aminas biógenas (OTTAVIANI *et al.* 1994).

Los glucocorticoides y las catecolaminas inducen respuestas secundarias, incluyendo incrementos en los niveles de oxígeno, movilización de sustratos y relocalización de energía ajena a la requerida en los procesos fisiológicos, tales como crecimiento, reproducción y determinadas funciones inmunes (WENDELAAR BONGA 1997).

La ACTH debería de ser considerada un importante inmunoregulador que forma parte del complejo mosaico de relaciones entre el sistema inmune y el neuroendocrino. Esta molécula es capaz de neutralizar



directa o indirectamente agentes que pueden perturbar la homeostasis del cuerpo. El efecto de la ACTH en las células inmunes es complejo y está influenciado por varios factores, tales como su concentración, presencia de citoquinas, etc. Este efector puede ejercer efectos directos o indirectos a varios niveles, modulando la transducción de señales en la membrana plasmática o alterando la producción de factores de crecimiento y la diferenciación celular, ej: $\text{TNF-}\alpha$ (HUGHES y SMITH 1989).

La hormona adrenocorticotrópica (ACTH) induce cambios en la forma de los inmunocitos de moluscos por la vía adenilato ciclasa/ AMP_c /PKA y también provoca la activación de la PKC. Sin embargo estos efectos desaparecen al añadir inhibidores de las proteínas G, de la adenilato ciclasa, o de la PKA. Además se ha demostrado que ACTH induce movilidad en hemocitos fagocíticos de *Viviparus ater* por modificación de componentes del citoesqueleto, también induce la secreción de glucocorticoides adrenales y puede afectar a diferentes sistemas y comportamientos. En concreto está implicada en las funciones del sistema cardiovascular de células inmunocompetentes y juega un papel importante en la inflamación, termorregulación, alimentación y en el comportamiento social y sexual. De este modo, ACTH, puede tener una importancia central en el mantenimiento de la homeostasis del organismo (OTTAVIANI *et al.* 1999).

Los estrógenos no son simplemente hormonas reproductoras, influyen en el funcionamiento de tejidos no reproductivos y en el sistema inmune (HAYNES *et al.* 2000; MENDELSON 2000; RAZANDI *et al.* 2000; GUO *et al.* 2002; STEFANO y PETER 2001).

En hemocitos de mejillón *Mytilus galloprovincialis*, el 17β -estradiol (E_2) induce «in vitro» cambios en la forma celular, en la desestabilización de la membrana lisosomal, en la liberación de enzimas hidrolíticos y en la estimulación de la actividad bacteriana a través de la activación de caminos de transducción de señal mediados por tirosina-quinasas (CANESI *et al.* 2004), en particular, p38 MAPK y STAT. La activación de estas proteínas juegan un papel clave en la respuesta de defensa de hemocitos de mejillón a infecciones bacterianas (CANESI *et al.* 2002 a,b).

MAPKs son una familia de serina-treonina proteína quinazas que se expresan en todas las células eucariotas y que se activan en respuesta a una variedad de estímulos extracelulares (CAFFREY *et al.* 1999; ICHIJU



1999; MARTÍN-BLANCO 2000). Las MAPKs están reguladas por mitógenos y factores de crecimiento a través del camino dependiente de Ras implicado en la activación secuencial de MAPKKK y MAPKK (ICHIJO 1999). Las proteínas STAT son activadas por diferentes estímulos extracelulares (citoquinas, factores de crecimiento, hormonas) y están implicadas en determinados procesos fisiológicos, incluyendo apoptosis y proliferación celular (CALÒ *et al.* 2003). Además son los únicos factores de transcripción conocidos que se activan por fosforilación en tirosina, una vez fosforilado, se dimeriza y se trasloca del citosol al núcleo, la fosforilación en serina es también necesaria para una máxima actividad transcripcional (HORVATH *et al.* 2000).

CANESI *et al.* (2005), han encontrado en hemocitos de mejillón que E_2 induce una rápida y transitoria fosforilación en tirosina de proteínas de la familia STAT: STAT3 y STAT5, modulando la actividad de estos factores de transcripción.

3.2. Factores de crecimiento

3.2.1. Factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF)

Factores de crecimiento, factores de diferenciación y hormonas son componentes importantes en el sistema regulador que coordina el desarrollo de organismos multicelulares. Algunos de estos factores median sus acciones pleiotrópicas por la unión y activación de receptores de la superficie celular con proteínas intrínsecas que presentan actividad tirosina quinasa (ULLRICH y SCHLESSINGER 1990).

Los factores de crecimiento desencadenan una serie de respuestas celulares. Estas incluyen estimulación de intercambio Na^+/H^+ , afluencia de Ca^{2+} , activación de fosfolipasa $C-\gamma$ y estimulación del transporte de glucosa y aminoácidos. La estimulación de la fosfolipasa $C-\gamma$ permite la generación de metabolitos de fosfatidilinositol, tales como inositol 1,4,5-trifosfato, el cual provoca la liberación de Ca^{2+} desde compartimentos intracelulares y la generación de diacilglicerol, un activador natural de la PKC (Fig. 4) (NISHIZUKA 1988).

La fosfatidilinositol 3-quinasa (VARTICOVSKI *et al.* 1989) y las proteínas ras (MOLLOY *et al.* 1989) son sustratos directos de algunos receptores que presentan actividad tirosina quinasa (MORRISON *et al.* 1989).

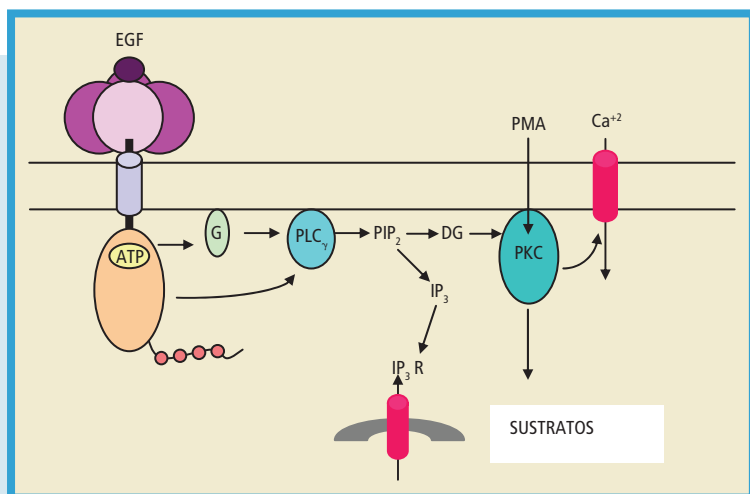


FIGURA 4.

Mecanismo de activación del fosfatidilinositol por receptores de tirosina quinasas. Abreviaturas: PMA, forbol 12-miristoato 13-acetato; PIP₂, fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato, DG, diacilglicerol; IP₃, inositol 1,4,5-trifosfato, IP₃ R, receptor de IP₃.

El factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF) está formado por dos tipos de cadenas: una cadena A y una cadena B. En su forma activa el PDGF es un dímero de dos monómeros que puede presentar todas las combinaciones posibles (ej: PDGF-AA, PDGF-BB, PDGF-AB) (Fig. 5) (BOWEN-POPE *et al.* 1989; HART *et al.* 1990; CLAESSEON-WELSH 1994).

Tanto en vertebrados como en invertebrados, el PDGF-AB provoca cambios en la forma de las células e induce a los hemocitos a migrar de una manera quimiotáctil (OTTAVIANI *et al.* 1997).

En hemocitos cultivados de *M. galloprovincialis*, el PDGF induce un incremento en la expresión de la cadena α del receptor de IL-2 y provoca la liberación de Dopamina y Noradrenalina cuyas concentraciones disminuyen al tratar los hemocitos con bisindolamina (BSM), H-89 o suramina, inhibidores de la PKC, PKA y proteínas G respectivamente, indicando que el efecto del PDGF en hemocitos de mejillón podría estar mediado a través de diferentes caminos de señalización celular (CAO *et al.* 2004).

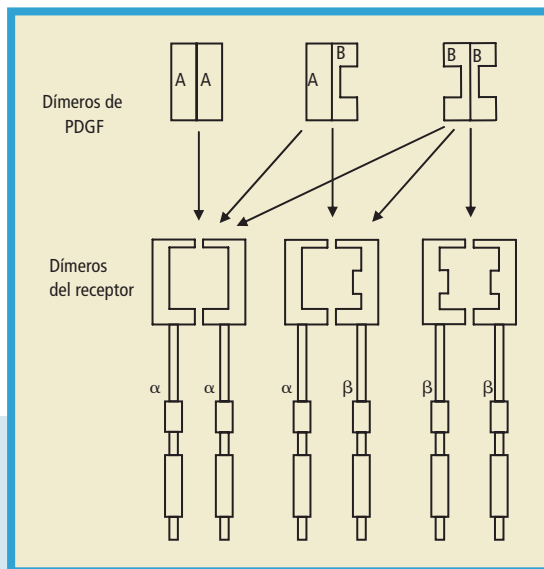


FIGURA 5.
Interacción del
PDGF con su
receptor.

El PDGF inicia un camino definido de transducción de la señal. La unión del ligando a cualquiera de las subunidades induce la autofosforilación del receptor (EK and HELDIN 1982). A su vez, la estimulación del receptor de PDGF activa una cascada de enzimas como PKC, Ras, Raf, MAPK y finalmente desencadena la división celular (BORNFELDT *et al.* 1995; HART *et al.* 1995).

La activación de la cascada Ras-Raf-MAPK induce la proliferación celular (BORNFELDT *et al.* 1995) (Fig. 6). De este modo, MAPK juega un papel crítico en el control del crecimiento y diferenciación celular.

Un camino alternativo para estimular la actividad MAPK es a través de la PKC (SÓZEI *et al.* 1992; KOLCH *et al.* 1993; LI *et al.* 1995).

Cuando el PDGF se une a un receptor, rápidamente estimula un grupo de respuestas «tempranas» que ocurren en minutos. Esto incluye la activación de tirosinas-quinasa, hidrólisis de fosfatidilinositol (PI), alteraciones en el pH celular, incremento en los niveles de calcio citosólico, incremento en la expresión de determinados genes e internalización y degradación del receptor (LEWIS 1989). El factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) estimula la transcripción de c-fos y c-myc a través de al menos dos caminos, uno de ellos está mediado por la

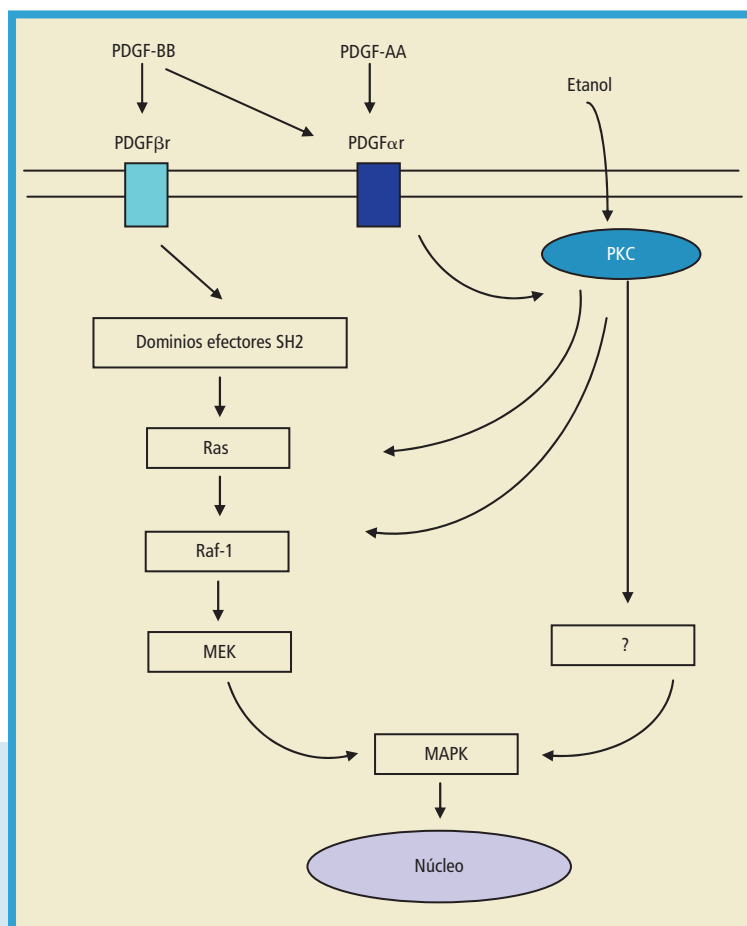


FIGURA 6.
Camino de
transducción de
señales iniciados
por PDGF.

proteína quinasa C y el otro no. Los mecanismos moleculares de estos caminos no han sido aclarados, pero parece que ambos culminan en la modificación covalente de una proteína. Los pasos que intervienen pueden consistir en una cascada de reacciones quinasa en las que estarían implicadas tirosina, serina y treonina quinasa (LEWIS 1989).

3.2.2. Factor de crecimiento transformante β (TGF- β) y factor de crecimiento epidérmico (EGF)

El TGF- β 1 está implicado en la respuesta inmune y en la reparación de procesos deteriorados, tanto en vertebrados como en invertebra-



dos (TETTAMANTI *et al.*, 2006), existiendo una fuerte conexión entre este factor y la liberación de catecolaminas (CAO *et al.* 2007).

Miembros de la familia del factor de crecimiento transformante β (TGF- β) se unen a receptores serina/ treonina quinasas del tipo II y tipo I, los cuales inician señales intracelulares a través de la activación de proteínas Smad. Las funciones de Smads son reguladas por otros caminos de señalización, tales como MAPK. Además, estas proteínas interaccionan y modulan varios factores de transcripción que son blancos de otros caminos de señalización (MIYAZOHO *et al.* 2000).

El factor de crecimiento epidérmico (EGF) es una llave reguladora del crecimiento y diferenciación celular en algunas células de mamíferos (CARPENTER 1987). En células de mejillón, péptidos similares a factores de crecimiento pueden actuar como reguladores fisiológicos del crecimiento celular y del metabolismo, además la señalización celular está íntimamente relacionada con el balance redox e indica que esta relación podría generalizarse a otros grupos (CANESI *et al.* 2000).

Los pasos en la transducción de señales, parecen ser similares en diferentes células: la unión de EGF a su receptor induce la dimerización de éste y la activación de su actividad tirosina-quinasa, la cual es esencial para la transducción de la señal (ULLRICH y SCHLESSINGER 1990; SCHLESSINGER y ULLRICH 1992). Como consecuencia de la activación de EGFR, se desencadenan una variedad de cambios iónicos incluyendo una hiperpolarización pasajera de la membrana, la alcalinización citoplasmática y un incremento en la concentración del calcio citosólico (HESKETH *et al.* 1985; MOOLENAR 1986; SOLTHOFF y CANTLEY 1988; PEPPELENBOSH *et al.* 1991).

3.3. Lipopolisacáridos bacterianos

Los lipopolisacáridos bacterianos (LPS) son los principales componentes de la pared de la mayoría de las bacterias Gram-negativas y actúan como fuertes estimuladores de la inmunidad innata o natural en diversas especies eucarióticas desde insectos a humanos.

El LPS activa macrófagos e induce la secreción de metabolitos de ácido araquidónico, intermediarios del nitrógeno y citoquinas tales con TNF- α , IL-1 e IL-6 (ADAMS *et al.* 1984; MORRISON *et al.* 1987), las cuales juegan un papel importante en la respuesta inmune.

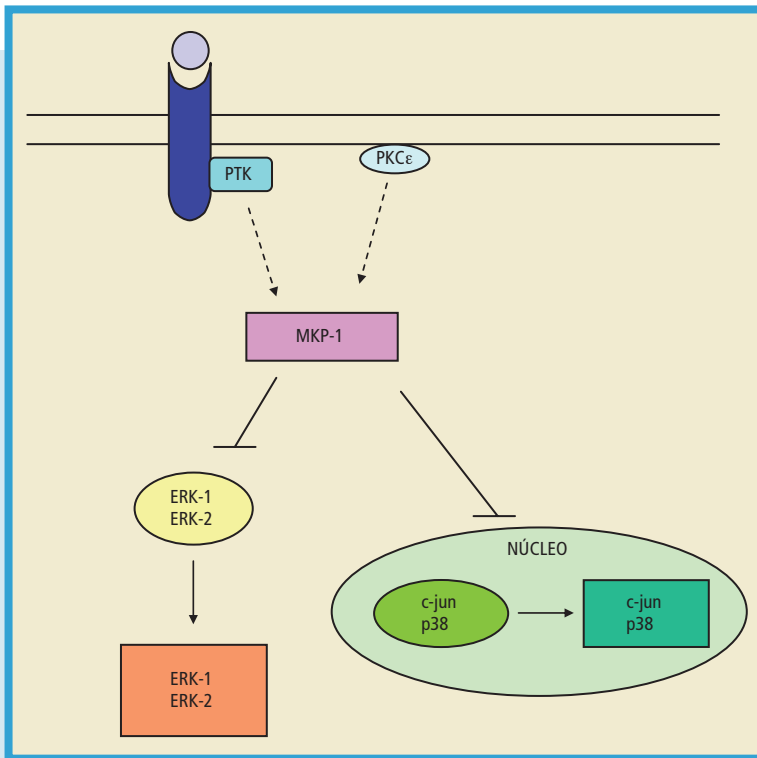
En macrófagos, el LPS desencadena la activación de varios caminos de transducción de señales en los que están implicados proteínas G, tirosina-quinasas, fosfolipasa C (PLC), proteína quinasa A (PKA) y proteína quinasa C (PKC) (SWEET *et al.* 1996; FUJIHARA *et al.* 1994; LIU *et al.* 1994, SHAPIRA *et al.* 1994)

EL LPS también activa diferentes cascadas de proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK), incluyendo las proteínas quinasas reguladas por señales extracelulares (ERK) (REIMANN *et al.* 1994; WEINSTEIN *et al.* 1992). Para la actividad de MAPK es necesaria la fosforilación de residuos de tirosina y treonina (BOULTON *et al.* 1991). ERK activa fosforila y regula varias proteínas quinasas adicionales, componentes del citoesqueleto, fosfolipasa A₂, y factores de transcripción nuclear (c-Jun) (TREISMAN 1996).

MAPK fosfatasa-1 (MKP-1) es un miembro inducible de doble especificidad (CHARLES *et al.* 1993; KEYSE *et al.* 1992; NOGUCHI *et al.* 1993). MKP-1 desfosforila residuos de tirosina y treonina en ERK1/2 (ALESI *et al.* 1993; SUN *et al.* 1993), de este modo permite la inactivación de estas quinasas. MKP-1 desfosforila e inactiva los genes c-Jun y p 38 (CHUN *et al.* 1996). La expresión de MKP-1 no es dependiente de la activación de MAPKs y ERK 1/2 en respuesta al LPS. En cambio, la inducción de esta fosfatasa necesita la activación de tirosina quinasas y de la isoforma ϵ de la PKC. Esto sugiere que, en macrófagos, la PKC ϵ juega un papel importante en el control negativo de la actividad de MAPK a través de la inducción de la fosfatasa MKP-1 (Fig. 7) (VALLEDOR *et al.* 2000).

La PKC puede interaccionar con varios sistemas de señalización incluyendo el camino a través de Ras-Raf-MAP y el dependiente de calcio-calmodulina y puede regular de forma positiva o negativamente la disponibilidad de sus propios cofactores lipídicos. (KEENAN *et al.* 1997).

La hidrólisis de fosfolípidos de membrana es un mecanismo común para la transducción de varias señales extracelulares en la célula como hormonas, neurotransmisores, antígenos y algunos factores de crecimiento. La fosfolipasa C está implicada en la hidrólisis de fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP₂) que produce dos segundos mensajeros: inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃), el cual libera calcio de depósitos intracelulares, (BERRIDGE e IRVINE 1984) y diacilglicerol (DAG) el cual activa la proteína quinasa C (Fig. 8).

**FIGURA 7.**

Control negativo de la actividad de MAPK a través de la inducción de la fosfatasa MKP-1. Las líneas sólidas representan interacción directa y las discontinuas representan la presencia de pasos intermedios. Las líneas en forma de T representan inhibición. Los círculos representan formas activas y los cuadrados formas inactivas.

La proteína quinasa C es una familia multigénica de serina-treonina-quinazas que se agrupa en tres secciones diferentes en base a características estructurales similares y a requisitos de activación (Tabla 1).

Se han asignado algunas funciones fisiológicas a la PKC incluyendo su implicación en la secreción y exocitosis, contracción del músculo liso, expresión de genes y proliferación celular, además la PKC ejerce un control negativo en varias etapas del proceso de señalización celular (NISHIZUKA 1992).

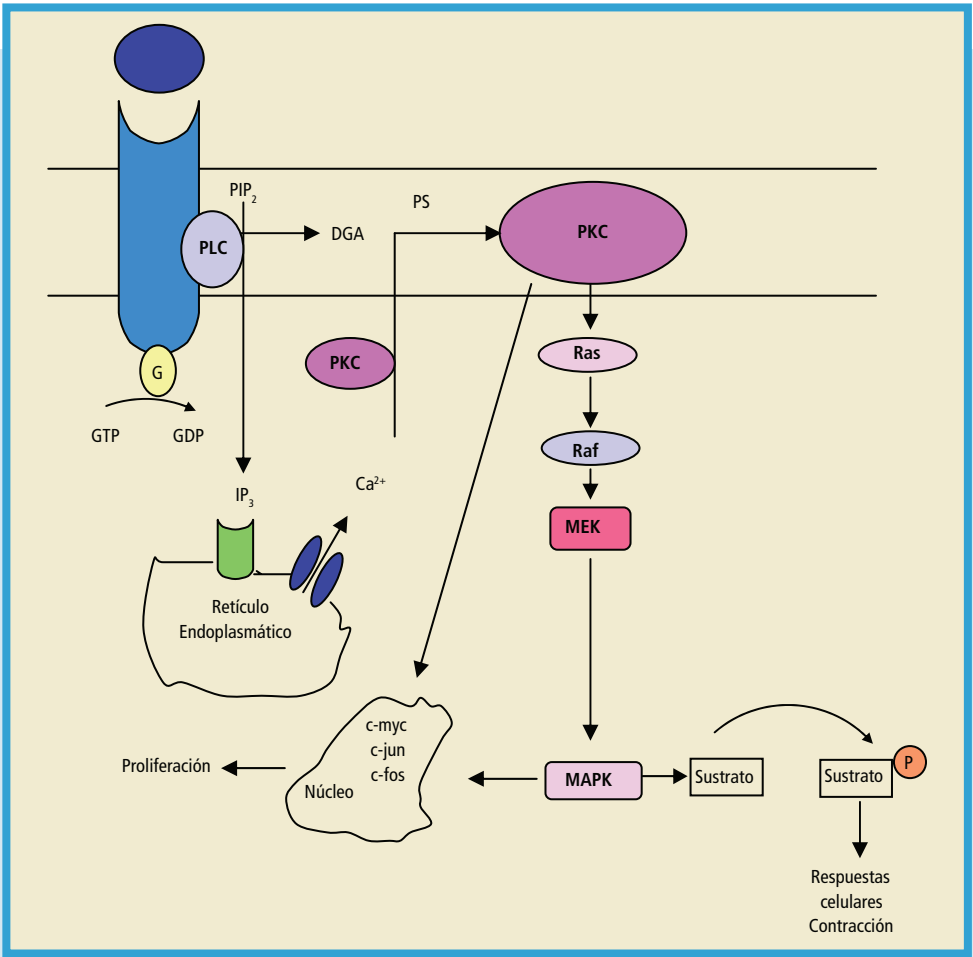


FIGURA 8.

Activación de células diferenciadas e indiferenciadas a través de PKC.

TABLA 1.

Clasificación de las isoenzimas de la familia PKC.

Familia	Isoformas	Cofactores
Clásicas	α , β _I , β _{II} , γ	Ca ²⁺ , DAG, PS, PMA
Nuevas	δ , ϵ , η , θ	PS, DAG, PMA
Atípicas	ζ , λ / ι	PS



La implicación de la PKC en el control del crecimiento y diferenciación es evidente, pues varios efectores de crecimiento incluyendo el factor de crecimiento derivado de plaquetas y en algunos casos EGF pueden involucrar a la PKC en su proceso de transducción de señal (KANASHIRO y KHALIL 1998).

El LPS también induce la activación de varios caminos de transducción de señales en los que está implicada la proteína quinasa A. El complejo LPS-LBP se une a su receptor de membrana, esta asociación induce la expresión de COX-2 (ciclooxigenasa-2), la posterior formación de PGE₂ (prostaglandina E₂), la producción de AMP_c y la activación de la PKA (Fig. 9) (CHEN *et al.* 1999).

La proteína quinasa dependiente de AMP_c (proteína quinasa A, PKA; E.C. 2.7.1.37) fue descubierta por el grupo de Krebs, durante el estudio de la regulación de la glucógeno fosforilasa (WALSH *et al.* 1968; KREBS 1993a, 1993b).

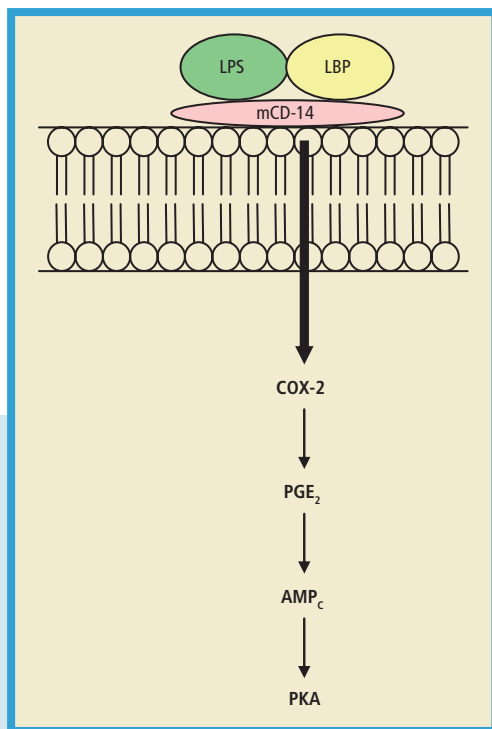


FIGURA 9.

Representación esquemática de la activación de la PKA inducida por LPS. Abreviaturas: LPS, lipopolisacáridos; LBP, proteína que se une al LPS; COX-2, ciclooxigenasa 2; PGE₂, prostaglandina E₂; AMP_c, adenosín monofosfato cíclico; PKA, proteína quinasa A; mCD14, complejo diferenciado de membrana.

En su estado inactivo, la enzima es un tetramero formado por dos subunidades reguladoras (R) y dos subunidades catalíticas (C). La unión de AMP_c a las primeras promueve la disociación de la holoenzima en un dímero de subunidades reguladoras y dos subunidades catalíticas monoméricas y activas que pueden fosforilar restos de serina o treonina de un amplio espectro de proteínas, dependiendo del tipo de célula y de su estado de diferenciación, lo que se traduce en numerosos efectos biológicos (ZETTERQUIST *et al.* 1990).

En relación a los caminos de transducción de señales se ha observado que la IL-1 β y TNF- α pueden activar la PKC o la PKA, vía fosfolipasa C y adenilato ciclasa respectivamente (DINARELLO 1991; VILCEK y LEE 1991). La activación o inhibición de la adenilato ciclasa es una de las funciones mejor estudiadas en cuanto a la modulación de efectores a través de receptores hormonales acoplados a proteínas G (Fig. 10) (HERRERA 1993).

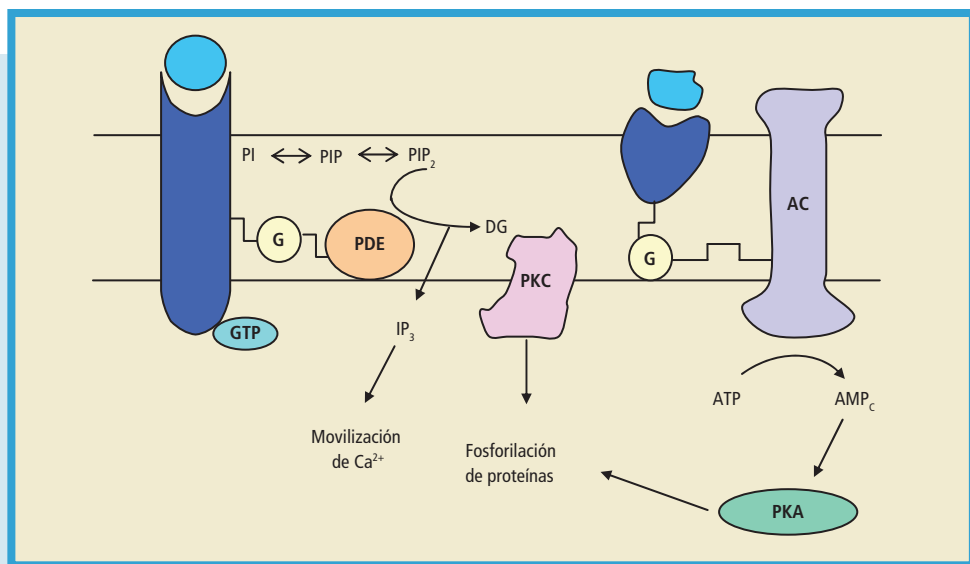


FIGURA 10.

Sistemas de la adenilato ciclasa y del fosfatidilinositol en la respuesta hormonal.

Abreviaturas: PKA y PKC, proteína quinasa A y C; PDE, fosfodiesterasa de fosfatidilinositol; PI, PIP, PIP₂, fosfatidilinositol, fosfatidilinositol 4-fosfato y fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato; IP₃, inositol-1,4,5 trifosfato; DG, diacilglicerol; AC, adenilato ciclasa.



En el manto de *Mytilus galloprovincialis* se ha purificado una proteína de 105 kDa (p105) que presenta actividad quinasa dependiente de fosfatidil L-serina y PMA, e independiente de Ca^{2+} . Los inductores LPS e IL-2 provocan cambios en la expresión de p105, pero no de la subunidad reguladora de la PKA (CAO *et al.* 2007).

Los parámetros cinéticos de esta proteína p105 la asemejan a isoformas de nPKC de mamíferos. Además el Ca^{2+} ejerce una inhibición de tipo mixto sobre la enzima purificada. La proteína p105 es capaz de autofosforilarse, en condiciones de ensayo, sin mediar la presencia de cofactores lipídicos. Esta proteína también se encuentra presente en manto, branquias, pie, músculo aductor, hepatopáncreas y hemocitos de *M. galloprovincialis*. La estimulación de hemocitos con PMA induce la translocación de p105 a la membrana plasmática y se regula por degradación (Down-Regulation) en función del tiempo de exposición. Esta enzima fosforilada contiene residuos de P-Ser. Por otra parte, se obtuvieron anticuerpos policlonales que reconocen específicamente p105 (MERCADO 2001). También se ha caracterizado la proteína quinasa dependiente de AMP_c procedente del mejillón *Mytilus galloprovincialis*. Al igual que ocurre con su homóloga de mamíferos, la enzima del molusco está constituida por dos tipos de subunidades: catalítica y reguladora, que fueron purificadas de forma independiente mediante procesos diferentes.

La subunidad catalítica de la PKA de mejillón mostró unas propiedades tanto físicas como cinéticas y un mecanismo de regulación, esencialmente idénticos a los descritos para la proteína homóloga de mamíferos, lo que sugiere un elevado grado de conservación estructural entre ambas proteínas a pesar de las diferencias en la escala evolutiva.

En extractos de manto de mejillón, se identificaron tres proteínas que unen específicamente AMP_c , con masas moleculares de 54 kDa, 42 kDa y 37 kDa, que posteriormente fueron purificadas mediante cromatografía de afinidad a través de AMP_c -agarosa. Sin embargo, de las tres proteínas, solamente la de 54 kDa fue capaz de reasociarse con la subunidad catalítica de la PKA e inhibir su actividad quinasa, en ausencia de AMP_c , lo que indica que únicamente esta proteína puede actuar como subunidad reguladora de la proteína quinasa A del molusco.



En relación a las proteínas que unen AMP_c de 42 kDa y 37 kDa, incapaces de inhibir la subunidad catalítica de la PKA, probablemente son fragmentos proteolíticos procedentes de la subunidad reguladora, tal como indica el hecho de que sean reconocidas por un anticuerpo generado frente a la proteína de 54 kDa (CAO, 1996).

Todavía queda mucho por hacer hasta que se identifiquen los componentes implicados en la transducción de señales de moluscos y su relación con diversas rutas de señalización intracelular.

4. REFERENCIAS

- ADAMS, D. O. y T. A. HAMILTON, 1984 The cell biology of macrophage activation. *Annu. Rev. Immunol.* **2**: 283-318.
- ALESÍ, D. R., C. SMYTHE y S. M. KEYSE, 1993 The human CL100 gene encodes a Tyr/Thr-protein phosphatase which potently and specifically inactivates MAP kinase and suppresses its activation by oncogenic ras in *Xenopus* oocyte extracts. *Oncogene* **8**: 2015-2020.
- ARAI, K., F. LEE, A. MIYAJIMA, S. MIYATAKE, N. ARAI y T. YOKOTA, 1990 Cytokines: coordinators of immune and inflammatory responses. *Annu. Rev. Biochem.* **59**: 783-836.
- AUGUSTINE, J. A., S. L. SUTOR y R. T. ABRAHAM, 1991 Interleukin-2 and polyomavirus middle T antigen-induced modification of phosphatidylinositol-3-kinase activity in activated T lymphocytes. *Mol. Cell. Biol.* **11**: 4431-4440.
- BARCIA, R., A. CAO, J. ARBETETA y J. I. RAMOS-MARTÍNEZ, 1999 The IL-2 receptor in hemocytes of the sea mussel *Mytilus galloprovincialis* Lmk. *IUBMB Life*, **48**: 419-423.
- BENOVIC, J. L., M. BOUVIER, M. G. CARON y R. J. LEFKOWITZ, 1988 Regulation of adenylyl cyclase coupled β -adrenergic receptors. *Annu. Rev. Cell. Biol.* **4**: 405-428.
- BERRIDGE, M. J. y R. F. IRVINE, 1984 Inositol trisphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. *Nature* **312**: 315-325.
- BLALOCK, J. E., 1994 The syntax of immune-neuroendocrine communication. *Immunol. Today* **15**: 504-511.
- BORNFELDT, K. E., E. W. RAINES, L. M. GRAVES, M. P. SKINNER, E. G. KREBS y R. ROSS, 1995 Platelet-derived growth factor: distinct signal transduction pathways associated with migration versus proliferation. *Ann. NY. Acad. Sci.* **766**: 416-430.



- BOULTON, T. G., S. H. NYE, D. J. ROBBINS, N. Y., E. RADZIEJEWSKA, S. D. MORGENBESSER, R. A. DELINHO, N. PANAYOTATOS, M. H. COBB y D. G. YANCOPOULOS, 1991 ERKs: a family of protein-serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF. *Cell* **65**: 663-675.
- BOWEN-POPE, D. F., C. E. HART y R. A. SEIFERT, 1989 Sera and conditioned media contain different isoforms of platelet-derived growth factor (PDGF) which bind to different classes of PDGF receptor. *J. Biol. Chem.* **264**: 2502-2508.
- BROZEK, C. M. y R. D. LEY, 1991 Production of interleukin-1 in a South American opossum (*Monodelphis domestica*). *Dev. Comp. Immunol.* **15**: 401-412.
- CAFFREY, D. R., L. A. J. O'NEILL y D. C. SHIELDS, 1999 The evolution of the MAPK kinase pathways: coduplication of interacting proteins leads to new signalling cascades. *J. Mol. Evol.* **49**: 567-582.
- CALÒ, V., M. MIGLIAVACCA, V. BAZAN, M. MACALUSO, M. BUSCEMI, N. GEBBIA y A. RUSSO, 2003 STAT proteins: from normal control of cellular events to tumorigenesis. *J. Cell. Physiol.* **197**: 157-168.
- CANESI, L., C. CIACCI, M. BETTI y G. GALLO, 2000 *Comp. Biochem. Physiol.* **125**: 355-363.
- CANESI, L., C. CIACCI, M. BETTI, L. C. LORUSSO, B. MARCHI, S. BURATTINI, E. FALCIERI y G. GALLO, 2004 Rapid effect of 17 β -estradiol on cell signalling and function of *Mytilus* hemocytes. *Gen. Comp. Endocrinol.* **136**: 58-71.
- CANESI, L., M. BETTI, C. CIACCI, A. SCARPATO, B. CITTERIO, C. PRUZZO y G. GALLO, 2002b Bacterial Killing by *Mytilus* hemocytes as a model for investigating the signalling pathways involved in mussel immune defence. *Mar. Environ. Res.* **54**: 547-551.
- CANESI, L., M. BETTI, C. CIACCI, A. SCARPATO, B. CITTERIO, C. PRUZZO y G. GALLO, 2002a Signaling pathways involved in the physiological response of mussel hemocytes to bacterial challenge: the role of stress-activated p38 MAPK. *Dev. Comp. Immunol.* **26**: 325-334.
- CANESI, L., M. BETTI, L. C. LORUSSO, C. CIACCI y G. GALLO, 2005 «In vivo» effects of Bisphenol A in *Mytilus* hemocytes: modulation of kinase-mediated signalling pathways. *Aquatic Toxicology* **71**: 73-84.
- CAO, A. «Aportaciones al estudio de la respuesta inmune en hemocitos de *Mytilus galloprovincialis* Lmk.». Tesis Doctoral. Universidad de Santiago de Compostela 2002.
- CAO, A., J. I. RAMOS-MARTÍNEZ y R. BARCIA, 2004. In vitro effects of LPS, IL-2, PDGF and CRF on haemocytes of *Mytilus galloprovincialis* Lmk. *Fish & Shellfish Immunology* **16**: 215-225.



- CAO, A., J. I. RAMOS-MARTÍNEZ y R. BARCIA, 2007 In hemocytes from *Mytilus galloprovincialis* Lmk., treatment with corticotropin or growth factors conditions catecholamine release. *International Immunopharmacology* **7**: 1395-1402.
- CAO, J., «Purificación y caracterización de la proteína quinasa dependiente de cAMP de *Mytilus galloprovincialis*». Tesis Doctoral. Universidad de Santiago de Compostela. 1996.
- CARPENTER, G., 1987 Receptors for epidermal growth factor and other related polypeptide mitogens. *Annu. Rev. Biochem.* **56**: 881-914.
- CARTON, Y. y A. J. NAPPI, 1997 *Drosophila* cellular immunity against parasitoids. *Parasitol. Today* **13**: 218-227.
- CHARLES, C. H., H. SUN, L. F. LAU y N. K. TONKS, 1993 The growth factor-inducible immanate-early gene 3CH 134 encodes a protein-tyrosine-phosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 5292-5296.
- CHEN, C., K. T. CHIN, Y. T. SUN y W. C. CHEN, 1999 Role of the cyclic AMP-protein kinase A pathway in lipopolysaccharide induced nitric oxide synthase expression in Raw 264.7 macrophages. *J. Biol. Chem.* **274**: 31559-31564.
- CHUN, Y., P. A. SOLSKI, R. KHOSRAVI-FAR, C. J. DER y K. KELLY, 1996 The mitogen-activated protein kinase phosphatases PAC1, MKP-1 and MKP-2 have unique substrate specificities and reduced activity in vivo toward the ERK 2 seenmarker mutation. *J. Biol. Chem.* **271**: 6497-6500.
- CLAESON-WELSH, L., 1994 Platelet-derived growth factor receptor signal. *J. Biol. Chem.* **269**: 32023-32026.
- DARNELL, J. E. Jr., 1997 STATs and gene regulation. *Science* **277**: 1630-1635.
- DARNELL, J. E. Jr., I. M. KER y G. R. STARK, 1994 Jak-Stat pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science* **264**: 1415-1421.
- DINARELLO, C. 1991 Interleukin-1 and interleukin-1 antagonist. *Blood* **77**: 1627-1652.
- EK, B. y C. H. HELDIN, 1982 Characterization of a tyrosine specific kinase activity in human fibroblast membranes stimulated by platelet-derived growth factor. *J. Biol. Chem.* **257**: 10486-10491.
- FISHER, E. G. y N. E. FALKE, 1986 The influence of endogenous opioid peptides on venous granulocytes. In *enkephalins and endorphins, stress and the immune system* (Plotnikoff, N.P., Faith, R.E., Murgo, A.J. and Good, R., Eds) Plenum Press, New York, pp. 263-270.
- FUJIHARA, M., N. CONOLLY, N. ITO y T. SUZUKI, 1994 Properties of protein kinase C isoforms (β II, ϵ and ξ) in a macrophage cell line (J774) and their role in LPS-induced nitric oxide production. *J. Immunol* **152**: 1898-1910.



- FUJIHARA, M., N. CONOLLY, N. ITO y T. SUZUKI, 1994 Properties of protein kinase C isoforms (β II, ϵ and ξ) in a macrophage cell line (J774) and their role in LPS-induced nitric oxide production. *J. Immunol* **152**: 1898-1910.
- GENEDANI, S., M. BERNARDI, E. OTTAVIANI, C. FRANCESCHI, M. K. LEUNG y G. B. STEFANO, 1994 Differential modulation of invertebrate haemocyte motility by CRF, ACTH and its fragments. *Peptides* **15**: 203-206.
- GRANATH, W. O. Jr., V. A. CONNORS y R. L. TARTELON, 1994 Interleukin-1 activity in hemolymph from strains of the snail *Biomphalaria glabrata* varying in susceptibility to the human blood fluke, *Schistosoma mansoni*: Presence, differential expression; and biological function. *Cytokines* **6**: 21-27.
- GREENLUND, A. C., M. O. MORALES, B. L. VIVIANO, H. YAN, J. KROLEWSKI y R. D. SCHREIBER, 1995 Stat recruitment by tyrosine phosphorylated cytokine receptors and ordered reversible affinity driven process. *Immunity* **2**: 677-687.
- GUO, Z., J. KRUCKEN, P. M. BENTEN y F. WUDERLINCH, 2002 Estradiol-induced nongenomic calcium signalling regulates genotropic signaling in macrophages. *J. Biol. Chem.* **277**: 7044-7050.
- HART, C. E., M. BAILEY, D. A. CURTIS, S. OSBORN, E. RAINES, R. ROSS y J. W. FORSTOM, 1990 Purification of PDGF-BB from human platelet extracts and identification of all three PDGF dimers in human platelets. *Biochemistry* **29**: 166-172.
- HART, K. C., B. D. GALVIN y D. J. DONOGHE, 1995 Structure and function of the platelet-derived growth factor family and their receptors. In: *Genetic engineering* (Setlow, J.K., ed.) pp. 181-207. New York: Plenum.
- HATAKEYAMA, M., M. TSUDO, S. MINAMOTO, T. KONO, T. DOI, T. MIYATA, M. MIYASAKA y T. TANIGUCHI, 1989 Interleukin-2 receptor β chain gene: generation of three receptor forms by cloned human α and β chain cDNAs. *Science* **244**: 551-556.
- HAYNES, M. P., L. LI, K. S. RUSSEL y J. R. BENDER, 2002 Rapid vascular cell responses to estrogen and membrane receptors. *Vasc. Pharmacol.* **38**: 99-108.
- HAZIOT, A., E. FERRERO, F. KONTGEN, N. HUIJI y S. YAMAMOTO, 1996 Resistance to endotoxin shock and reduced dissemination of gram-negative bacteria in CD 14 deficient mice. *Immunity* **4**: 407-414.
- HERRERA, E., 1993 «Elementos de Bioquímica». Ed. Interamericana. McGraw-Hill, México.
- HESKETH, T. R., J. P. MOORE, J. D. H. MORRIS, M. V. TAYLOR, J. ROGERS, G. A. SMITH y J. C. METCALFE, 1985 A common sequence of calcium and pH signals in the mitogenic stimulation of eukaryotic cells. *Nature* **313**: 481-484.
- HORVATH, C. M. y J. E. Jr. DARNELL, 1997 The state of the STATs: recent developments in the study of signal transduction to the nucleus. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **9**: 233-239.



- HORVATH, C. M., 2000 STAT proteins and transcriptional responses to extracellular signals. *Trends Biochem. Sci.* **25**: 496-502.
- HUGHES, T. K. y E. M. SMITH, 1989 Corticotropin (ACTH) induction of tumor necrosis factor alpha by monocytes. *J. Biol. Regul. Homeost. Agents* **3**: 163-166.
- HUGHES, T. K., E. M. SMITH, M. K. LEUNG y G. B. STEFANO, 1992 Immunoreactive cytokines in *Mytilus edulis* nervous and immune interactions. *Acta. Biol. Hung.* **43**: 269-273.
- HUGHES, T. K., E. M. SMITH, J. A. BARNETT, R. CHARLES y G. B. STEFANO, 1991 LPS stimulated invertebrate haemocytes: a role for immunoreactive TNF and IL-1. *Develop. Comp. Immunol.* **15**: 117-122.
- HUGHES, T. K., E. M. SMITH, M. K. LEUNG y G. B. STEFANO, 1992 Immunoreactive cytokines in *Mytilus edulis* nervous and immune interactions. *Acta. Biol. Hung.* **43**: 269-273.
- HUGHES, T. K., E. M. SMITH, R. CHIN, P. CADET, J. SINISTERRA, M. K. LEUNG, M. A. SHIPP, B. SCHARRER y G. B. STEFANO, 1990 Interactions of immunoactive monokines (interleukin-1 and tumor necrosis factor) in the bivalve mollusc *Mytilus edulis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **87**: 4426-4429.
- ICHIO, H., 1999 From receptors to stress-activated MAP kinases. *Oncogene* **18**: 6087-6093.
- JIMÉNEZ, L. F y H. MERCHANT, 2003 En «Biología celular y molecular» (Pearson Educación ed) pp.197-198. Mexico.
- KANASHIRO, A. C. y R. A. KHALIL, 1998 Signal transduction by protein kinase C in mammalian cells. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* **25**: 974-985.
- KARNITZ, L. M. y R. T. ABRAHAM, 1996 Interleukin-2 receptor signalling mechanisms. *Adv. Immunol.* **61**: 147-198.
- KARNITZ, L. M., S. L. SUTOR y R. T. ABRAHAM, 1994 The src-family kinase, fyn, regulates the activation of phosphatidylinositol-3-kinase in an interleukin 2 responsive T cell line. *J. Exp. Med.* **179**: 1799-1808.
- KEENAN, C., A. LONG y D. KELLEHER, 1997 Protein kinase C and T cell function. *Biochimica et Biophysica. Acta.* **1358**: 315-325.
- KEYSE, S. M. y E. A. EMSLIE, 1992 Oxidative stress and heart shock induce a human gene encoding a protein-tyrosine phosphatase. *Nature* **359**: 644-647.
- KILE, B. T., A. N. NICOLA y S. W. ALEXANDER, 2000 Negative regulators of cytokine signaling. *Int. J. Hematol.* **73**: 292-298.
- KISHIMOTO, T., T. TOGA y S. AKIRA, 1994 Cytokine signal transduction. *Cell (Cambridge, Mass.)* **76**: 253-262.



- KOLCH, W., G. HEIDECKER, G. KOCHS, R. HUMMEL, H. VAHIDI, H. MISCHAK, G. FINKENZELLER, D. MARMÉ y U. R. RAPP, 1993 Protein kinase C alpha activates raf-1 by direct phosphorylation. *Nature* **364**: 249-252.
- KONO, T., T. DOI, G. YAMADA, M. HATEKEYAMA, S. MINAMOTO y M. TSUDO, 1990 Murine interleukin-2 receptor β chain: dysregulated expression in lymphoma line EL-4 caused by a promotor insertion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 1806-810.
- KONO, T., Y. MINAMI y T. TANIGUCHI, 1993 The interleukin-2 receptor complex and signal transduction: role of the β chain. *Semin. Immunol.* **5**: 299-307.
- KREBS, E.G., 1993a Protein phosphorylation and cellular regulation I. *Biosci. Rep.* **13**: 127-142.
- KREBS, E.G., 1993b Protein phosphorylation and cellular regulation I (Nobel lecture), *Angew- Chem (Engl)* **32**: 1122-1129.
- KROENER, G., 1995 The pharmacology of T cell apoptosis. *Adv. Immunol.* **58**: 211-296.
- KUMAR, A., J. L. MOREAN, M. GIBERT y J. THÉZE, 1987 Internalization of interleukin 2 (IL-2) by high affinity IL-2 receptors required for the growth of IL-2 dependent T cell lines. *J. Immunol.* **139**: 3680-3684.
- LEONARD, W. J., J. M. DEPPER, G. R. CRABTREE, S. RUDIKOFF, J. PUMPHREY y R. J. ROOB, 1984 Molecular cloning and expression of cDNA's for the human interleukin-2-receptor. *Nature* **311**: 626-631.
- LEWIS, T. W., 1989 Signal transduction by the platelet-derived growth factor receptor. *Science* **243**: 1564-1570.
- LI, X., F. ZARINETCHI, R. W. SCHRIER y R. A. NEMEROFF, 1995 Inhibition of MAP kinase by prostaglandin E2 and forskolin in rat renal mesangial cells. *Am. J. Physiol.* **269**: 6986-6991.
- LIU, M. K. P., R. HERRERA-VELIT, W. BROWSEY y N. E. REINER 1994 CD14-dependent activation of protein kinase C and mitogen-activated protein kinases (p42 and p44) in human monocytes treated with bacterial lipopolysaccharide. *J. Immunol.* **153**: 2642-2650.
- LIU, M. K. P., R. HERRERA-VELIT, W. BROWSEY y N. E. REINER, 1994 CD14-dependent activation of protein kinase C and mitogen-activated protein kinases (p42 and p44) in human monocytes treated with bacterial lipopolysaccharide. *J. Immunol.* **153**: 2642-2650.
- MANFREDINI, R., A. GRANDE, E. TAGLIAFICO, D. BARBIERI, P. ZUCCHINI, G. CITRO, G. ZUPI, C. FRANCESCHI, U. TORELLI y S. FERRARI, 1993 Inhibition of c-fos expression by an antisense oligomer causes apoptosis of HL 60 cells induced to granulocytic differentiation. *J. Exp. Med.* **178**: 381-390.



- MARTÍN-BLANCO, E., 2000 P38 MAPK signaling cascades: ancient roles and new functions. *BioEssays* **22**:637-645.
- MENDELSON, M. E., 2000 Nongenomic, estrogen receptor-mediated activation of endothelial nitric oxide synthase. *Circ. Res.* **87**: 956-960.
- MERCADO, L. «Purificación y caracterización de una isoforma de proteína quinasa C de manto de *Mytilus galloprovincialis* Lmk.». Tesis Doctoral. Universidad de Santiago de Compostela. 2001.
- MERIDA, I., E DIEZ y G. N. GAULTON, 1991 IL-2 binding activates a tyrosine-phosphorylated phosphatidylinositol-3-kinase. *J. Immunol.* **147**: 2202-2207.
- MINAMI, Y., T. KONO, K. YAMADA, N. KOBAYASHI, A. KAWAHARA, R. M. PERLMUTTER y T. TANIGUCHI, 1993b Association of p56^{lck} with IL-2 receptor β chain is critical for the IL-2 induced activation of p56^{lck}. *EMBO. J.* **12**: 759-768.
- MINAMI, Y., T. KONO, T. MIYAZAKI y T. TANIGUCHI, 1993a The IL-2 receptor complex: its structure, function, and target genes. *Annu. Rev. Immunol.* **11**: 245-267.
- MIYAZOHO, K., P. T. DIJKE y C.-H. HELDIN, 2000 TGF- β signaling by Smad proteins. *Adv. Immunol.* **75**: 115-157.
- MOLLOY, C. J., D. P. BOLTARO, T. P. FLEMING, M. S. MARSHALL, J. B. GIBBS y S. A. AARONSON, 1989 PDGF induction of tyrosine phosphorylation of GTP ase activating protein. *Nature* **342**: 711-714.
- MOOLENAR, W. H., R. G. AERTS, L. G. L. TERTOOLEN y S. W. DE LAAT, 1986 The epidermal growth factor-induced calcium signal in A431 cells. *J. Biol. Chem.* **264**: 279-284.
- MORRISON, D. C. y J. L. RYAN, 1987 Endotoxins and disease mechanisms. *Annu. Rev. Med.* **38**: 417-432.
- MORRISON, D. K., D. R. KAPLAN, J. A. ESCOBEDO, U. R. RAPP, T. M. ROBERTS y L. T. WILLIAMS, 1989 Direct activation of the serine/threonine kinase activity of Raf-1 through tyrosine phosphorylation by the PDGF β - receptor. *Cell* **58**: 649-657.
- NAPPI, A. J. y E. OTTAVIANI, 2000 Cytotoxicity and cytotoxic molecules in invertebrates. *Bioessays* **22**: 469-480.
- NAPPI, A. J. y E. VASS, 2001 Cytotoxic reactions associated with insect immunity. *Adv. Exp. Med. Biol.* **484**: 329-348.
- NAPPI, A. J. y E. VASS, 1993 Melanogenesis and the generation of cytotoxic molecules during insect cellular immune reactions. *Pigment Cell Res.* **6**: 117-126.
- NELSON, D. L., M. M COX y C. M. CUCHILLO, 2006 En «Lehninger Principios de Bioquímica»(Omega S.A. ed) pp.421-425. Barcelona.



- NIKAIDO, T., A. SHIMIZU, N. ISHIDA, H. SABE, K. TESHIGAWARA y M. MAERO, 1984 Molecular cloning of cDNA encoding human interleukin-2 receptor. *Nature* **311**: 631-635.
- NISHIZUKA, Y., 1988 The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implications for cellular regulation. *Nature* **334**: 661-668.
- NISHIZUKA, Y., 1992 Intracellular signaling by hidrolisis of phospholipids and activation of PKC. *Science* **258**: 607-614.
- NISTICÒ, G., 1993 Communications among central nervous system, neuroendocrine and immune systems: Interleukin-2. *Prog. Neurobiol.* **40**: 463-475.
- NOGUCHI, T., R. METZ, L. CHEM, M.-G. MATTÉI, D. CARRASCO y R. BRAVO, 1993 Structure, mapping, and expression of erp, a growth factor-inducible gene encoding a nontransmembrane protein tyrosine phosphatase, and effect of ERP on cell growth. *Moll. Cell. Biol.* **13**: 5195-5200.
- OTTAVIANI, E., A. FRANCHINI y S. GENEDANI, 1999 ACTH and its role in immune-neuroendocrine functions. A comparative study. *Current Pharmaceutical Desing.* **5**: 673-681.
- OTTAVIANI, E., A. FRANCHINI y C. FRANCESCHI, 1997 Pro-opiomelacortin-derived peptides, cytokines and nitric oxide in immune responses and stress: an evolutionary approach. *Int. Rev. Cytol.* **170**: 79-141.
- OTTAVIANI, E., A. FRANCHINI, E. CASELGRANDI, A. COSSARIZZA y C. FRANCESCHI, 1994 Relationship between corticotropin-releasing factor and interleukin-2: Evolutionary evidence. *FEBS. Lett.* **351**: 19-21.
- OTTAVIANI, E., A. FRANCHINI, S. CASSANELLI y S. GENEDANI, 1995 Cytokines and invertebrate immune responses. *Biol. Cell.* **85**: 87-91.
- OTTAVIANI, E., E. CASELGRANDI, A. FRANCHINI y C. FRANCESCHI 1993 CRF provokes the release of norepinephrine by hemocytes of *Viviparus ater* (Gastropoda: prosobranchia): Further evidence in favour of the evolutionary hypothesis of the mobile immune-brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **193**: 446-452.
- OUWE-MISSI-OUKEN-BOYER, O., E. PORCHET, A. CAPRON y C. DISSOUS, 1994 Characterization of immunoreactive TNF α molecules in the gastrop *Biomphalaria glabrata*. *Dev. Comp. Immunol.* **18**: 211-218.
- PEPPELENBOSH, M. P., L. G. L. TERTOOLEN, J. DE HERTOOG y S. W. DE LAAT, 1991 Epidermal growth factor-activated calcium and potassium currents. *J. Biol. Chem.* **226**: 11938-11944.
- RATCLIFFE, N. A., A. F. ROWLEY, S. W. FITZGERALD y C. P. RHODES, 1985 Invertebrate immunity: basic concepts and recent advances. *Int. Rev. Cytol.* **97**: 183-350.
- RAZANDI, M., A. PEDRAM y E. R. LEVIN, 2000 Estrogen signals to the preservation of endotelial cell form and function. *J. Bio. Chem.* **276**: 38540-38546.



- REIMANN, T., D. BÜSHER, R. A. HIPSKIND, S. KRAUTWALD, M. L. LOHMANN-MATHES y M. BACCARINI, 1994 Lipopolysaccharide induces activation of the Raf-1/MAP Kinase pathway: a putative role for Raf-1 in the induction of the IL-1 β and the TNF- α genes. *J. Immunol.* **153**: 5740-5750.
- REMILLARD, B., R. PETRILLO, W. MALINSKI, M. TSUDO, T. B. STROM, L. CANTLEY y L. VARTICOVSKI, 1991 Interleukin-2 receptor regulates activation of phosphatidylinositol-3-kinase. *J. Biol. Chem.* **266**: 14167-14170.
- RENWRANTZ, L., 1990 Internal defence system of *Mytilus edulis*. In: Stefano, G.B. (ed). *Studies in neuroscience, neurobiology of Mytilus edulis*. Manchester University Press, Manchester, pp. 256-275.
- SCHLESSINGER, J. y A. ULLRICH, 1992 Growth factor signalling by receptor tyrosine kinases. *Neuron* **9**: 383-391.
- SHAPIRA, L., S. TAKASHITA, C. CHAMPAGNE, S. AMAR y T. E. VAN DYKE, 1994 Involvement of protein kinase C and protein tyrosine kinase in lipopolysaccharide-induced TNF- α and IL-1 β production by human monocytes. *J. Immunol.* **153**: 1818-1825.
- SHAPIRA, L., S. TAKASHITA, C. CHAMPAGNE, S. AMAR y T. E. VAN DYKE, 1994 Involvement of protein kinase C and protein tyrosine kinase in lipopolysaccharide-induced TNF- α and IL-1 β production by human monocytes. *J. Immunol.* **153**: 1818-1825.
- SMITH, E. M., T. K. HUGHES, F. HASHAMI y G. B. STEFANO, 1992b Immunosuppressive effects of corticotropin and melanotropin and their possible significance in human immunodeficiency virus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 782-786.
- SMITH, E. M., T. K. HUGHES, P. CADET y G. B. STEFANO, 1992a Corticotropin-Releasing Factor-Induced immunosuppression in human and invertebrate immunocytes. *Cell. Mol. Neurobiol.* **12**: 473-481.
- SMITH, V. J., 1991 Invertebrate Immunology: Phylogenetic, Ecotoxicological and Biomedical. *Comp. Haematol. Int.* **1**: 61-76.
- SOLTOFF, S. P. y L. C. CANTLEY, 1988 Mitogens and ion fluxes. *Annu. Rev. Physiol.* **50**: 207-223.
- SÓZEI, O., K. VOLLMER, M. LIYANAGE, D. FRITH, G. KOUR, G. E. MARK y S. STABLE, 1992 Activation of the c-raf protein kinase by protein kinase C phosphorylation. *Oncogene* **7**: 2259-2262.
- STEFANO, G. B. y D. PETER, 2001 Cell surface receptors coupled to cNOS mediated immune and vascular tissue regulation: therapeutic implications: *Med. Sci. Monit.* **7**: 1066-1074.
- STEFANO, G. B., E. M. SMITH y T. K. HUGHES, 1991 Opioid induction of immunoreactive interleukin-1 in *Mytilus edulis* and human immunocytes: An inter-



- leukin-1 like substances in invertebrate neural tissue. *J. Neuroimmunol.* **32**: 29-34.
- STEFANO, G. B., M. K. LEUNG, X. ZHAO, y B. SCHARRER, 1989 Evidence for the involvement of opioid neuropeptides in the adherence and migration of immunocompetent invertebrate haemocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 626-630.
- SUN, H., E. H. CHARLES, L. F. LAU y N. K. TONKS, 1993 MKP-1 (3CH 134), an immediate early gene product, is a dual specificity phosphatase that dephosphorylates MAK kinase in vivo. *Cell* **75**: 487-492.
- SWEET, M. J. y D. A. HUME, 1996 Endotoxin signal transduction in macrophages. *J. Leukocyte Biol.* **60**: 8-13.
- TETTAMANTI, G., D. MALAGONI, R. BENELLI, A. ALBINI, A. GRIMALDI, G. PERLETTI *et al.* 2006 Growth factors and chemokines: a comparative functional approach between invertebrates and vertebrates. *Curr. Med. Chem.* **13**: 2737-2750.
- TREISMAN, R., 1996 Regulation of transcription by MAP kinase cascades. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **8**: 205-215.
- ULEVITCH, R. J. y P. S. TOBÍA, 1995 Receptor-dependent mechanisms of cell stimulation by bacterial endotoxin. *Annu. Rev. Immunol.* **13**: 437-457.
- ULLRICH, A. y J. SCHLESSINGER, 1990 Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell* **61**: 203-212.
- VALLEDOR, A. F., J. XAUS, M. COMALADA, C. SOLER y A. CELADA, 2000 Protein kinase C ϵ is required for the induction of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 in lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *J. Immunol.* **164**: 29-37.
- VAN EPPS, D. E. y L. C. SALAUD, 1984 Betaendorphin and Met-enkephalin stimulate peripheral blood mononuclear cell chemotaxis. *J. Immunol.* **132**: 3046-3053.
- VARTICOVSKI, L., B. DRUKER, D. MORRISON, L. CAUTLEY y T. ROBERTS, 1989 The colony stimulating factor-1 receptor associates with and activates phosphatidylinositol-3 kinase. *Nature* **342**: 699-702.
- VILCEK, J. y T. H. LEE, 1991 Tumor necrosis factor. *J. Biol. Chem.* **266**: 7313-7316.
- WALSH, D. A., J. P. PERKINS y E. G. KREBS, 1968 An adenosin 3', 5'-monophosphate dependent protein kinase from the rabbit skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* **243**: 3763-3765.
- WEINSTEIN, S. L., J. S. SANGHERA, K. LEMKE, A. L. DE FRANCO y S. L. PELENCH, 1992 Bacterial lipopolysaccharide induces tyrosine phosphorylation and activation of mitogen-activated protein kinases in macrophages. *J. Biol. Chem.* **267**: 14955-14960.

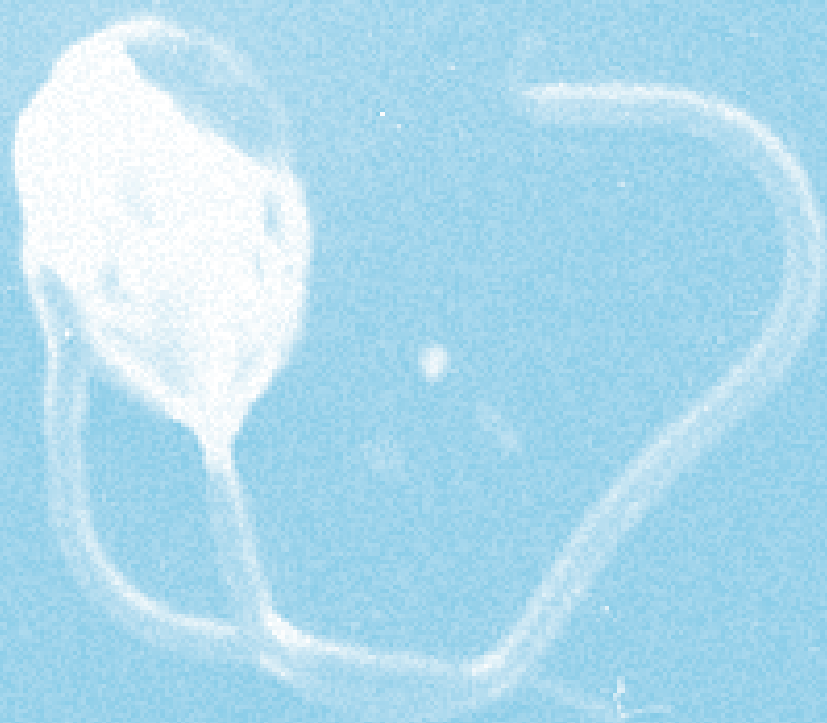


WENDELAAR BONGA, S. E., 1997 The stress response in fish. *Physiol. Rev.* **77**: 591-625.

ZETTERQVIST, Ö., U. RAGHARSSON y ENGSTRÖM, 1990 Substrate specificity of cyclic AMP-dependent protein kinase. *Peptides and protein phosphorylation*. Boca Ratón, Florida, CRC Press, Inc. ed. 171-187.

12

PROBIÓTICOS EN CULTIVOS LARVARIOS DE MOLUSCOS BIVALVOS EN CRIADERO



PROBIÓTICOS EN CULTIVOS LARVARIOS DE MOLUSCOS BIVALVOS EN CRIADERO

Prado S., Romalde J. L. y Barja J. L.

Departamento de Microbiología y Parasitología.
Facultad de Biología. Universidad de Santiago de Compostela.
15782 Santiago de Compostela (A Coruña). España

Resumen

El uso de bacterias probióticas es desde hace algunos años la alternativa más prometedora en acuicultura para la mejora del desarrollo de los cultivos, evitando así los perjuicios derivados de los antibióticos y otros medios de control, que además no han demostrado ser suficientemente eficaces.

En este capítulo se analizan las ventajas de su aplicación concreta en el caso de los criaderos de moluscos bivalvos, en relación con las particularidades de este tipo de cultivos. La necesidad de su utilización viene justificada por los inconvenientes de los diferentes sistemas de control de las enfermedades utilizados habitualmente, como los tratamientos del agua y la quimioterapia. Se profundiza en la definición de 'probiótico' en acuicultura, término sobre el cual todavía no se ha llegado a un acuerdo, describiendo cuáles deben ser sus características ideales. Se indican además, las diferentes especies bacterianas que se han sugerido como potenciales probióticos para cultivos larvarios de bivalvos, sus orígenes, la forma en que han sido seleccionadas, los modos de acción y sus posibles aplicaciones en los criaderos.



Abstract

The use of probiotic bacteria is the most promising alternative in aquaculture for the enhancement of the development of cultures, avoiding the hazards derived from antibiotics and other control measures, that have been proved to be not effective enough.

In this chapter, the advantages of their specific application in bivalve hatcheries are analyzed, considering the special characteristics of this type of cultures. The need of their utilisation is justified by the disadvantages of the different systems of disease control usually applied, like treatment of water and chemotherapy. The definition of 'probiotic' in aquaculture, subjected to controversy about its exact meaning, is discussed in depth, describing their ideal characteristics. The different bacterial species suggested as potential probiotics are considered, as well as the way to selected them, the modes of actions and their possible applications in hatcheries.

1. INTRODUCCIÓN

El cultivo de moluscos bivalvos en criadero, como ya se ha referido en otros capítulos, está afectado frecuentemente por episodios de mortalidades graves, que en muchas ocasiones pueden relacionarse con infecciones microbiológicas, principalmente bacterianas. La consecuencia a gran escala es la pérdida de lotes completos de producción, que implica no sólo problemas económicos sino también una falta de regularidad en el suministro de semilla para el cultivo exterior.

La falta de estudios sistemáticos y rigurosos acerca de las poblaciones bacterianas asociadas a estos cultivos y, por tanto, su desconocimiento, han llevado a la búsqueda de soluciones siempre orientadas a la eliminación total de la microbiota en el punto de control más factible, el agua de cultivo. Los diferentes métodos empleados, desde los tratamientos del agua hasta la quimioterapia, han demostrado no ser suficientes para evitar los episodios de mortalidades. Este hecho, junto con los múltiples inconvenientes que presentan, obligó a la apertura de vías alternativas entre las que destaca claramente el uso de bacterias probióticas. El enfoque cambia hacia la obtención de una población bacteriana equilibrada con capacidad de autorregulación.



2. MÉTODOS CLÁSICOS DE CONTROL DE PATÓGENOS

2.1. Tratamiento del agua

La influencia del medio en los cultivos en criadero es muy importante. Hay que tener en cuenta que las larvas de bivalvos son liberadas en estadios ontogénicos tempranos, especialmente sensibles a potenciales infecciones, que se ven, además, favorecidas por la alimentación filtradora, que conlleva un flujo constante del agua de cultivo a través de su organismo. Otros factores que aumentan los riesgos son la permanencia en circuito cerrado, en una misma agua de cultivo durante períodos de 2-3 días, y el aporte regular al medio de materia orgánica y bacterias a través del alimento. Todo ello ha llevado a que la calidad microbiológica del agua de cultivo sea el principal punto de control para evitar enfermedades bacterianas.

Es habitual que el agua utilizada en los criaderos sea sometida a algún proceso con el objetivo de reducir la población bacteriana asociada. En general suele haber un primer paso de decantación del agua natural bombeada desde el mar. Una vez eliminada buena parte de las partículas sólidas en suspensión se procede a la filtración, un tratamiento caro, cuyo coste se incrementa en función del volumen de agua que se filtre y el grado de filtración que se quiera alcanzar. Este primer inconveniente hace que sólo se llegue al máximo tratamiento en lo que se consideran las secciones más sensibles del criadero, correspondientes en general a los cultivos larvarios y los cultivos de fitoplancton que se mantienen a menor volumen.

La filtración reduce el número de bacterias viables, pero su eficiencia en relación con el número total de bacterias es menos regular (JEATHON *et al.* 1988). Sus estudios con cultivos en criadero de *Pecten maximus* muestran un incremento del recuento de heterótrofas viables en los días siguientes a la filtración, probablemente asociado al aporte diario de fitoplancton. De cualquier manera, resulta una práctica recomendable para reducir los contenidos tanto bacterianos como de materia orgánica, que ofrece mejores resultados que otros sistemas, como la pasteurización. En un estudio realizado por LEWIS *et al.* (1988) en un criadero de *Crassostrea gigas*, comparando ambos tipos de tratamien-

to para el agua empleada para los cultivos de microalgas que sirven de alimento a las larvas, la filtración ofrece mejores resultados. El principal inconveniente de la pasteurización es que en este sistema el largo circuito de tuberías junto con el tiempo que es necesario esperar hasta que el agua enfría, facilitan la contaminación por microorganismos antes de que se lleguen a inocular los cultivos algales.

El filtro de carbón es otra de las opciones aplicadas en algunos casos, pero BROWN (1983) comprueba que aunque se puede ver un efecto inicial positivo en los cultivos de *C. virginica*, al cabo de tres semanas resulta perjudicial si no se cambia a diario el agua. La desinfección por lejía (cloración) también ha sido utilizada, pero presenta grandes problemas entre los que destaca la interferencia en el mecanismo de bombeo, como recogen VASCONCELOS y LEE (1972) para cultivos larvarios de *C. gigas*. Hay algunos estudios que sugieren que reacciones entre la lejía y el nitrógeno orgánico en el agua pueden producir residuos tóxicos para organismos marinos (JORQUERA *et al.* 2002). También se ha utilizado ozono, pero se ha descrito la presencia en el agua de residuos, productos de altas dosis de este tratamiento, que son tóxicos para peces y bivalvos (JORQUERA *et al.* 2002).

Junto con la filtración, el sistema de esterilización más habitual es el tratamiento del agua con radiación ultravioleta (UV), con un indiscutible poder letal sobre las bacterias. Sin embargo, existen discrepancias respecto a sus efectos reales cuando se aplica en el agua de cultivo de criaderos. VASCONCELOS y LEE (1972) encuentran ventajas en su uso, ya que tras el tratamiento del agua con UV disminuyen diferentes poblaciones bacterianas, como *Pseudomonas*, *Vibrio*, coliformes y cocos Gram positivos, entre las que se encuentran algunos potenciales patógenos. De la microbiota estudiada por estos autores, sólo hay un aumento del grupo *Acinetobacter-Moraxella*. Otros autores, como MURCHELANO *et al.* (1975) encuentran importantes variaciones entre diferentes muestras de cultivos larvarios de *C. virginica*, aunque en general haya una reducción significativa del número de bacterias. Con respecto a la composición de la población bacteriana, hay una disminución de *Vibrio*, *Achromobacter* y *Flavobacterium*, pero en este caso se registra un aumento del número de *Pseudomonas* (dominantes también en el agua sin tratar). En general observan una menor



diversidad en el agua tratada y una reducción en la proporción de bacterias pigmentadas. LODEIROS *et al.* (1987) observan la disminución de la población de vibrios en cultivos larvarios de *Ostrea edulis*. Sin embargo, BROWN (1981) encuentra que el mismo tratamiento con UV es efectivo frente a una de las dos cepas de *Vibrio* spp. patógenas que ensaya, mientras que la otra cepa se recupera después de una inhibición inicial.

Por tanto, no sólo el efecto del tratamiento por UV no parece ser homogéneo para todas las poblaciones bacterianas, sino que otros factores como la dosis empleada, el flujo de agua y la eficiencia individual de la unidad de irradiación, añaden variabilidad a los resultados. BROWN y RUSSO (1979) muestran el efecto positivo del tratamiento por UV del agua en que se eclosionan larvas de *C. virginica*, agua que previamente ha sido filtrada e inoculada con bacterias patógenas de los géneros *Vibrio* y *Pseudomonas*. Pero, junto con la disminución de los efectos de los patógenos y de la posibilidad de episodios de mortalidades, apuntan el grave riesgo que supone el que el mismo tratamiento pueda ser bacteriostático en lugar de bactericida, si la dosis empleada no es la adecuada. Este riesgo de una inhibición temporal, con el simple retraso del crecimiento de algunas bacterias, es apuntada en trabajos posteriores (BROWN 1983). LILTVED *et al.* (1995) observan una vez más resultados en esta misma línea, con la necesidad de diferentes dosis para la inactivación de patógenos distintos. La eficiencia del tratamiento puede verse menguada también por el contenido orgánico del agua, por aquellas pequeñas partículas a las que se puedan encontrar unidas bacterias (LILTVED y CRIPPS 1999). En general, estas grandes diferencias de efectividad pueden llevar a la selección de poblaciones no deseadas, dentro de aquellas resistentes al tratamiento, que se encontrarían con un nicho ecológico favorable para su rápido desarrollo. Junto con todo lo expuesto, el UV presenta otros inconvenientes como su elevado coste económico y la imposibilidad del tratamiento de grandes volúmenes de agua.

2.2. Quimioterapia

El uso de antibióticos es un método muy extendido en los criaderos de bivalvos, desde que DAVIS y CHANLEY (1956) demostraran que



su utilización puede reducir las mortalidades larvarias de *Mercenaria mercenaria*. Sin embargo, en paralelo con los trabajos que confirman sus efectos beneficiosos sobre los cultivos larvarios de bivalvos, se han descrito otros efectos tóxicos, así como casos de falta de efectividad o inconsistencia de los resultados obtenidos (ver revisiones D'AGOSTINO 1975; LE PENNEC y PRIEUR 1977; PRADO 2006).

Entre los estudios que ponen de manifiesto los graves riesgos que implica el uso de antibióticos en cultivos larvarios de bivalvos está el trabajo de JEFFRIES (1982), que observa que el tratamiento con cloranfenicol consigue una ligera recuperación de un cultivo larvario de *C. gigas*, pero que al mismo tiempo causa un cese de la natación larvaria, es decir, de la alimentación. En experimentos con *Mytilus edulis* (HILY 1974), el tratamiento con cloranfenicol conlleva una buena supervivencia pero con un desarrollo lento, efecto contrario al uso de la combinación ampicilina-estreptomicina, con desarrollo excelente y baja supervivencia. Hay ejemplos también de un mismo antibiótico que puede tener un efecto variable, tóxico o beneficioso, sobre cultivos de una misma especie, como es el caso de la polimixina B en *C. virginica* (BROWN 1983). Para esta misma ostra, la eritromicina resulta tóxica a la dosis efectiva (BROWN y TETELBACH 1988); mientras que los resultados obtenidos con este antibiótico para *Pecten maximus* son inconsistentes (ROBERT *et al.* 1996). La rifampina, aunque obtiene buenas supervivencias iniciales, causa deformaciones en cultivos de *Tridacna derasa* (FITT *et al.* 1992).

Es interesante el trabajo de HIDU y TUBIASH (1963), con cultivos larvarios de *M. mercenaria* y *C. virginica*, cuya tasa de crecimiento mejora al ser tratados con Combistrep (dihidroestreptomicina+estreptomicina sulfato). Observan una relación entre la carga bacteriana inicial y el efecto obtenido. En agua de mar que presenta recuentos iniciales altos, la mejora del crecimiento es mayor que en agua con contenidos iniciales bajos. Es más, en cultivos sin bacterias el antibiótico no tiene un efecto favorable. Cuando analizan los cambios producidos en las poblaciones bacterianas presentes en el agua, se encuentran con que el número de bacterias aumenta en relación directa con la dosis de antibiótico. Se sugiere, por tanto, que el antibiótico selecciona una determinada población bacteriana que es la que realmente tiene un



efecto positivo sobre el crecimiento larvario, quizá por inhibición de otras especies productoras de toxinas.

A la falta de efectividad o la inconsistencia de los resultados obtenidos, hay que unir otros inconvenientes a la hora de utilizar antibióticos en criaderos de bivalvos derivados de las características de las propias sustancias, como la rápida degradación de la tetraciclina y la penicilina por pH elevado como el del agua del mar, el favorecimiento de la aparición de resistencias por el uso de estreptomycin o la toxicidad para muchos invertebrados de la neomicina a dosis altas (estable en agua de mar y lenta en el desarrollo de resistencias). El cloranfenicol, el antibiótico de uso más extendido en criaderos de bivalvos, aunque tiene una vida media larga, es extremadamente tóxico, pudiendo causar deformidades larvianas y con conocidos riesgos para el ser humano, además de favorecer el desarrollo de resistencias.

Otro gran problema es el coste económico de los tratamientos con antibióticos, que en acuicultura puede igualar al coste del stock (BATICADOS *et al.* 1990). Así, la utilización simultánea de combinaciones de antibióticos estables y de amplio espectro, que sería la mejor opción, es inaplicable en cultivos larvianos de bivalvos (WALNE 1958; FITT *et al.* 1992).

Mención especial merece la aparición de resistencias. La resistencia a un antibiótico es un fenómeno por el que cultivos bacterianos inicialmente sensibles a él dejan de serlo, pudiendo incluso multiplicarse en su presencia. Los plásmidos R, presentes de forma natural en diferentes bacterias marinas (incluyendo vibrios patógenos), confieren resistencia a un amplio espectro de agentes antibacterianos, implicando un riesgo de infección por este tipo de bacterias incluso para criaderos que no utilicen antibióticos (JEFFRIES 1982; BROWN y TETTELBAACH 1988). La aparición de resistencias está favorecida por el uso de los antibióticos como tratamiento rutinario preventivo (LE PENNEC y PRIEUR 1977), al ser las mortalidades larvianas fulminantes e imposibles de tratar una vez se detectan. Una consecuencia inmediata es la aparición y persistencia de enfermedades que no pueden ser tratadas de forma eficiente (MCPHEARSON *et al.* 1991; SPANGGAARD *et al.* 1993; KARUNASAGAR *et al.* 1994).

Existe también la posibilidad de transferencia de factores de resistencia a potenciales patógenos humanos, con el consiguiente riesgo



para los trabajadores de los criaderos (JEFFRIES 1982; MCPHEARSON *et al.* 1991; SPANGGAARD *et al.* 1993). Además, mediante el intercambio de agua que hay entre el criadero y el medio natural, se pueden propagar las bacterias resistentes (MCPHEARSON *et al.* 1991) e incluso depositar en sedimentos marinos, de los que pueden ser liberadas posteriormente (NYGAARD *et al.* 1992).

Por último, la legislación es cada vez más restrictiva con el uso de antibióticos. Es el caso del cloranfenicol, cuyo uso ha sido prohibido en cualquier animal susceptible de ser destinado al consumo humano (Anexo IV del Reglamento de la CEE 2377/90/EEC), debido tanto a sus potenciales efectos tóxicos para humanos como a la imposibilidad de determinar niveles seguros de residuos.

En general, todos los tratamientos expuestos (filtración, ultravioleta, quimioterapia, etc.) buscan la eliminación de la microbiota asociada al agua de los cultivos. Este objetivo no parece razonable, ya que la población bacteriana, o al menos parte de ella, tiene un efecto beneficioso en el desarrollo larvario. HIDU y TUBIASH (1963) relacionan el crecimiento larvario con el número y especies de bacterias existentes en el cultivo, sugiriendo su papel como fuente de nutrientes. Parecen satisfacer requerimientos metabólicos, aportando vitaminas u otros factores de crecimiento (PRIEUR *et al.* 1990). También la producción de enzimas extracelulares puede ayudar en el aprovechamiento del alimento, los procesos digestivos o la eliminación de residuos tóxicos (DOUILLET y LANGDON 1993). De hecho, estudios de supervivencia larvaria de *Argopecten purpuratus* en agua de mar con diferentes grados de filtración muestran que esta es máxima en el agua menos filtrada (5,0 μm), en la que se pueden ver agregados bacterianos, que pueden ser ingeridos y servir como promotores del crecimiento (RIQUELME *et al.* 1997).

Hay que considerar además que la eliminación total de la microbiota facilita la colonización del medio por poblaciones bacterianas que pueden no ser las deseadas. La competencia natural que lleva al equilibrio desaparece, dejando vacío un nicho ecológico muy apetecible, a lo que hay que sumar el aporte regular de materia orgánica y las condiciones de cultivo. Y aunque se elimine la población del agua, las bacterias siguen incorporándose al sistema a través del alimento y



asociadas a las propias larvas. En conjunto es un medio de cultivo idóneo para la proliferación de bacterias con rápidas tasas de crecimiento, como es el caso de los patógenos oportunistas más frecuentes en cultivos larvarios de bivalvos, pertenecientes al género *Vibrio*.

El objetivo a perseguir ha de ser la obtención de una población bacteriana equilibrada y con capacidad para el control de la proliferación de los potenciales patógenos oportunistas asociados al sistema de forma natural.

La vacunación, una alternativa que ha obtenido excelentes resultados en el cultivo de peces (TORANZO *et al.* 1996; ROMALDE *et al.* 2003), no es aplicable a los moluscos, ya que carecen de un verdadero sistema inmunológico.

Por todo lo expuesto hasta el momento, es necesaria la búsqueda de nuevas soluciones para el control de enfermedades bacterianas en los cultivos de bivalvos en criadero.

3. PROBIÓTICOS

3.1. Definición

El término 'probiótico' se utiliza por primera vez en 1965, cuando LILLY y STILLWELL lo definen como «sustancias producidas por un protozoo que estimulan el crecimiento de otro». Posteriormente, PARKER (1974) define 'probiótico' como «organismos y sustancias que contribuyen al balance intestinal». Como esta definición incluiría a antibióticos o ácidos grasos de cadena corta, FULLER (1989) propone una definición más precisa: «un microorganismo vivo que como suplemento alimenticio beneficia al hospedador mejorando su balance microbiano intestinal». TANNOCK (1997) apunta entonces que el efecto en el balance microbiano intestinal no se ha demostrado en muchos casos, proponiendo «células microbianas vivas administradas como suplementos en la dieta con el objeto de mejorar la salud».

Todas estas definiciones responden a la utilización en homeótermos, pero al aplicar el término en acuicultura y considerar el tránsito de los microorganismos en el medio acuático se justificaría la extensión del concepto a aquellos preparados microbianos vivos utilizados



para tratar los tanques de cultivo. MORIARTY (1998) propone ampliar la definición a microorganismos añadidos al agua, pero esto haría muy vaga la definición de TANNOCK (1997).

En 1999, GATESOUE da una definición alternativa para su uso en acuicultura, «células microbianas administradas de forma que penetren en el tracto gastrointestinal y permanezcan vivas, con el objeto de mejorar la salud del hospedador». Considera de este modo el tratamiento con probióticos como un método de ‘control biológico’ o ‘biocontrol’, término que se refiere a la limitación o eliminación de enfermedades mediante la introducción de organismos antagonistas de los agentes etiológicos, ya sean parásitos o patógenos específicos. De hecho, MAEDA *et al.* (1997) proponen denominar como ‘biocontrol’ los métodos de tratamiento utilizando «el antagonismo entre microorganismos (...) por el que los patógenos pueden ser eliminados o reducidos en número en el medio ambiente de la acuicultura».

GRAM *et al.* (1999) amplían la definición de ‘probiótico’ a «un suplemento microbiano vivo que beneficia al hospedador mejorando su balance microbiológico», eliminando la restricción de mejora del balance intestinal. GÓMEZ-GIL *et al.* (2000) apoyan esta definición, diferenciando el término del de ‘control biológico’ ya que un probiótico no necesariamente ataca de forma directa a un patógeno, pudiendo simplemente prevenir los daños causados por este, impedir su unión al hospedador, inhibir su crecimiento, etc. Separan también el concepto del de ‘promotor del crecimiento’, puesto que la acción del probiótico no se limita a la mejora del crecimiento, sino que está asociada a una mejora general de la salud.

Finalmente, VERSCHUERE *et al.* (2000) dan una definición de ‘probiótico’ que recoge la estrecha interacción en la acuicultura del animal con el medio que le rodea, y que resulta la más apropiada para su aplicación a los cultivos larvarios de bivalvos. Un ‘probiótico’ se definiría como un «aditivo microbiano vivo que tiene un efecto beneficioso sobre el hospedador, modificando la microbiota asociada al hospedador o al ambiente, asegurando un uso óptimo del alimento o mejorando su valor nutricional, mejorando la respuesta del hospedador frente a la enfermedad, o mejorando la calidad de su medio ambiente.»



De cualquier manera, la polémica no está resuelta y continúa la publicación de trabajos acerca de la definición de 'probiótico' en relación con su aplicación en acuicultura. Así, IRIANTO y AUSTIN (2002) proponen la definición «un microorganismo entero o un componente(s) que sean beneficiosos para la salud del hospedador», retomando características postuladas anteriormente, como su efectividad en rangos de temperatura y salinidad extremas. Además, diferencian 'probiótico' como aditivo aportado por alimento, frente a 'vacuna', que se referiría a productos veterinarios aplicados por inyección o inmersión. Con ello vuelven las complicaciones para la aplicación del término a la acuicultura de bivalvos, ya que no se puede hablar del establecimiento de una población bacteriana en las larvas diferente a aquella existente en el agua de cultivo (JORQUERA *et al.* 2001), además de no poder determinarse las diferencias que sugieren entre vacunación y probiótico. VINE *et al.* (2006) retoman la definición de GATESOUBE (1999), utilizándola en su revisión de probióticos en larvicultura marina, aunque a pesar de su título se limita a los cultivos larvarios de peces. En una nueva revisión (KESARCODI-WATSON *et al.* 2008) se apoya la definición de IRIANTO y AUSTIN (2002), señalando que al no ser preciso que se trate de un cultivo vivo se permite la inclusión de sustancias, derivados bacterianos, que parecen presentar propiedades inmunoestimulantes. Por otro lado, eliminan como requisito la actuación en el tracto gastrointestinal, apuntando que los efectos deseados, como competición por nutrientes o producción de sustancias inhibidoras, pueden darse en el agua de cultivo.

Considerando todas las definiciones propuestas hasta el momento para su aplicación en acuicultura, y concretamente en cultivos larvarios de bivalvos, la más apropiada sigue siendo la propuesta por VERSCHUERE *et al.* (2000). Incluye la condición de que se trate de un microorganismo vivo, importante ya que es lo que posibilita la obtención de un equilibrio por la propia regulación del sistema, evitando los problemas derivados del uso de sustancias, aunque sean de origen bacteriano, como es el caso de los antibióticos. Además, recoge las particularidades de los cultivos larvarios, tanto en lo que respecta a su estrecha interacción con el medio, como a su falta de un verdadero sistema inmunitario.



3.2. Modos de acción

En la bibliografía son numerosas las referencias a los diferentes modos de acción mediante los que los probióticos consiguen tener un efecto beneficioso sobre los organismos diana, considerados estos como objetivos finales de este beneficio. Este efecto se puede alcanzar a través de diferentes mecanismos: complemento nutricional, mejora del aprovechamiento del alimento, mejora de la respuesta inmunitaria, actividad antibacteriana, competencia por sustancias, energía o espacio de adhesión, estimulación de procesos y mejora de la calidad del agua.

En el caso específico de los cultivos de bivalvos en criadero, los modos de acción recogidos en la bibliografía son sólo algunos de los mencionados (Tabla 1). Pueden actuar como complemento nutricional (DOUILLET y LANGDON 1994) o tener un papel como estimulantes de procesos concretos como la fijación o la metamorfosis (FITT *et al.* 1990; SZEZYK *et al.* 1991; TRITAR *et al.* 1992; LEITZ y WAGNER 1993; WALCH *et al.* 1999), de gran importancia en bivalvos. De cualquier manera, dado que las larvas son liberadas al medio externo en estadios ontogénicos tempranos, estando expuestas a desórdenes asociados a la microbiota cuando su desarrollo no es completo, parece que el modo de acción más interesante para su aplicación en este tipo de cultivos es la actividad antibacteriana, extendida entre bacterias marinas (DOPAZO *et al.* 1988; BARJA *et al.* 1989; LODEIROS *et al.* 1989; LEMOS *et al.* 1991; RIQUELME *et al.* 1996; RIQUELME *et al.* 1997; GIBSON *et al.* 1998; JORQUERA *et al.* 1999; NAKAMURA *et al.* 1999; RUIZ-PONTE *et al.* 1999; RIQUELME *et al.* 2001; PRADO 2006). De esta forma se mejora la calidad del agua, en lo que respecta a la composición de la población bacteriana y el control de especies potencialmente patógenas, a través de la búsqueda de un equilibrio dependiente de las interacciones dentro de la propia microbiota, y evitando los riesgos conocidos del uso de agentes quimioterápicos (Tabla 2, Fig. 1).

Las características deseables de un probiótico, además de su condición de microorganismo vivo, adaptadas para su aplicación en acuicultura de bivalvos, serían:

- a) Origen en el medio en que va a ser utilizado, es decir, una bacteria marina en este caso preferiblemente autóctona de criaderos (RIQUELME *et al.* 1996; VERSCHUERE *et al.* 2000), asegurando de esta



TABLA 1.

Revisión de trabajos sobre probióticos ensayados en cultivos larvarios de bivalvos.

Autores	Fecha	Probiótico	Efecto	Especie acuicultura
Lodeiros <i>et al.</i>	1989	<i>Flavobacterium</i> sp. P14	Actividad antibacteriana	<i>Pecten ziczac</i>
Douillet y Langdon	1993	<i>Alteromonas</i> sp. CA2	Mejora la tasa de crecimiento Mejora la tasa de supervivencia	<i>Crassostrea gigas</i>
Douillet y Langdon	1994	<i>Alteromonas</i> sp. CA2	Mejora la tasa de crecimiento	<i>C. gigas</i>
Riquelme <i>et al.</i>	1996	<i>Alt. haloplanktis</i> ¹ INH	Protección frente a infección Actividad antibacteriana (<i>Vibrio anguillarum</i> -like)	<i>Argopecten purpuratus</i>
Riquelme <i>et al.</i>	1997	<i>Pseudomonas</i> sp. 11	Protección frente a infección Actividad antibacteriana (<i>Vibrio anguillarum</i> -like)	<i>A. purpuratus</i>
		<i>Vibrio</i> sp. C33	Mejora la tasa de supervivencia Actividad antibacteriana (<i>Vibrio anguillarum</i> -like)	<i>A. purpuratus</i>
Gibson <i>et al.</i>	1998	<i>Aeromonas media</i> A199	Mejora la tasa de supervivencia Actividad antibacteriana (<i>Vibrio tubiashii</i>)	<i>C. gigas</i>
Avendaño y Riquelme	1999	<i>Vibrio</i> sp. C33	Actividad antibacteriana (<i>Vibrio anguillarum</i> -like)	<i>A. purpuratus</i>
Nakamura <i>et al.</i>	1999	S21	Mejora la tasa de supervivencia Actividad antibacteriana (<i>Vibrio alginolyticus</i>)	<i>C. gigas</i>
Ruiz-Ponte <i>et al.</i>	1999	<i>Roseobacter gallaeciensis</i> ² BS107	Mejora la tasa de supervivencia Actividad antibacteriana (<i>Vibrio pectenicida</i>)	<i>Pecten maximus</i>
Riquelme <i>et al.</i>	2001	<i>Vibrio</i> sp. C33 <i>Pseudomonas</i> s. 11 <i>Bacillus</i> sp. B2	Mejora la tasa de supervivencia	<i>A. purpuratus</i>
Longeon <i>et al.</i>	2004	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. X153	Mejora la tasa de supervivencia *Disminuye la tasa de crecimiento	<i>P. maximus</i>
Prado	2006	<i>Phaeobacter gallaeciensis</i> 154	Mejora la tasa de supervivencia Actividad antibacteriana	<i>Ostrea edulis</i>

¹ Actualmente *Pseudoalteromonas haloplanktis*.² Actualmente *Phaeobacter gallaeciensis*.

TABLA 2.

Resumen de los trabajos publicados acerca del espectro de actividad de bacterias marinas.

Autor	Cepa y origen	Cepas testigo ^{*,**}
Riquelme et al. 1996	<i>Alteromonas haloplanktis</i> ¹ INH Gónada de reproductor <i>Argopecten purpuratus</i>	<i>V. alginolyticus</i> , <i>V. anguillarum</i> , <i>V. parahaemolyticus</i> , <i>V. damsela</i> ² , <i>V. ordalii</i> <i>Achromobacter</i> sp., <i>A. hydrophila</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Morganella</i> <i>morganii</i> , <i>Proteus vulgaris</i> , <i>Ps. fluorescens</i> , <i>Salmonella</i> <i>typhimurium</i> , <i>Shewanella putrefaciens</i> , <i>S. aureus</i>
Gibson et al. 1998	<i>Aeromonas media</i> A199	<i>V. alginolyticus</i> , <i>V. anguillarum</i> , <i>V. cholerae</i> , <i>V. harveyi</i> , <i>V. parahaemolyticus</i> , <i>V. splendidus</i> , <i>V. tubiashii</i> , <i>V. vulnificus</i> <i>A. caviae</i> , <i>A. hydrophila</i> , <i>A. salmonicida</i> , <i>A. veronii</i> var <i>sobria</i> ³ , <i>Ph. damsela</i> subsp. <i>damselae</i> , <i>Yersinia ruckeri</i> <i>Enterococcus seriolicida</i> ⁴
Jorquera et al. 1999	<i>Vibrio</i> sp. C33 Agua de cultivo <i>A.</i> <i>purpuratus</i>	<i>V. aestuarianus</i> , <i>V. alginolyticus</i> , <i>V. anguillarum</i> , <i>V. damsela</i> ² , <i>V. splendidus</i> , <i>V. ordalii</i> , <i>V. parahaemolyticus</i> , <i>A. hydrophila</i> , <i>Ph. damsela</i> subsp. <i>damselae</i>
Ruiz-Ponte et al. 1999	<i>Roseobacter gallaeciensis</i> ⁵ BS107 Cultivo larvario y colectores <i>Pecten maximus</i>	<i>V. anguillarum</i> , <i>V. alginolyticus</i> , <i>V. damsela</i> ² , <i>V. pelagius</i> , <i>V. splendidus</i> , <i>V. tubiashii</i> , <i>V. vulnificus</i> <i>V. alginolyticus</i> CCM 2578, <i>V. vulnificus</i> ATCC 27562 <i>Acinetobacter</i> sp., <i>A. salmonicida</i> , <i>Pasteurella piscicida</i> ⁶ , <i>Ps. douderoffii</i> ⁷ , <i>S. aureus</i> , <i>Xanthomonas</i> sp.
Robertson et al. 2000	<i>Carnobacterium</i> sp. K1 Digestivo <i>Salmo salar</i>	<i>V. anguillarum</i> , <i>V. ordalii</i> , <i>V. alginolyticus</i> , <i>V. harveyi</i> <i>A. hydrophila</i> , <i>A. salmonicida</i> , <i>Flavobacterium psychrophilum</i> , <i>Ph. damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> , « <i>Streptococcus milleri</i> » <i>Janthinobacterium lividum</i> , <i>Yersinia ruckeri</i>
Chythanya et al. 2002	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> I-2 Agua de mar	<i>V. harveyi</i> , <i>V. vulnificus</i> , <i>V. damsela</i> ² , <i>V. fluvialis</i> , <i>V. parahaemolyticus</i>
Tirola et al. 2002	<i>Pseudomonas</i> sp. MT5 <i>Salmo salar</i> <i>Oncorhynchus mykiss</i> con flavobacteriosis	<i>Cytophaga</i> sp., <i>E. coli</i> , <i>Flavobacterium</i> sp., <i>F. columnare</i> , <i>F. psychrophilum</i> , <i>Bacillus pabuli</i> ⁸ , <i>Rhodococcus erythropolis</i> , <i>Y. ruckeri</i> <i>Bacillus mycoides</i>
Longeon et al. 2004	<i>Pseudoalteromonas</i> X153 Guijarros marinos	<i>V. alginolyticus</i> , <i>V. anguillarum</i> , <i>V. carchariae</i> ⁹ , <i>V. costicola</i> ¹⁰ , <i>V. damsela</i> ² , <i>V. haloplanktis</i> ¹ , <i>V. harveyi</i> , <i>V. mediterranei</i> , <i>V. natriegens</i> , <i>V. parahaemolyticus</i> , <i>V. pectenica</i> , <i>V. pelagius</i> , <i>V. proteolyticus</i> , <i>V. splendidus</i> , <i>V. tapetis</i> , <i>V. vulnificus</i> <i>Cytophaga lytica</i> ¹¹ , <i>C. marinoflava</i> , <i>Deleya marina</i> ¹² , <i>E. coli</i> , <i>Halomonas elongata</i> , <i>Marinobacterium jannaschii</i> ¹³ , <i>Propionibacterium acnes</i> , <i>P. granulosum</i> , <i>Ps. douderoffii</i> , <i>Ps. nautica</i> ¹⁴ , <i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i>

(Continúa)



TABLA 2. (Continuación)

Autor	Cepa y origen	Cepas testigo* **
Prado 2006	<i>Phaeobacter gallaeciensis</i> 154 Criaderos de bivalvos	<i>V. aestuarianus</i> , <i>V. alginolyticus</i> , <i>V. anguillarum</i> , <i>V. fischeri</i> , <i>V. fluvialis</i> , <i>V. harveyi</i> , <i>V. logei</i> , <i>V. mimicus</i> , <i>V. natriegens</i> , <i>V. neptunius</i> , <i>V. parahaemolyticus</i> , <i>V. pelagius</i> , <i>V. proteolyticus</i> , <i>V. splendidus</i> , <i>V. tapetis</i> , <i>V. tubiashii</i> , <i>V. vulnificus</i> , <i>Vibrio</i> sp. <i>Tenacibaculum maritimum</i> , <i>Ph. damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> , <i>Ps. anguilliseptica</i> , <i>Edwardsiella tarda</i> <i>Ps. fluorescens</i>

* los nombres tachados corresponden a bacterias resistentes.

** V = *Vibrio*, A = *Aeromonas*, Ps = *Pseudomonas*, S = *Staphylococcus*, Ph = *Photobacterium*.

Actualmente ¹*Pseudoalteromonas haloplanktis* subsp. *haloplanktis*, ²*Photobacterium damsela* subsp. *damsela*, ³A. *sobria*, ⁴*Lactococcus garvieae*, ⁵*Phaeobacter gallaeciensis*, ⁶*Ph. damsela* subsp. *piscicida*, ⁷*Oceanimonas doudoroffi*, ⁸*Paenibacillus pabuli*, ⁹*V. harveyi*, ¹⁰*Salinivibrio costicola*, ¹¹*Cellulophaga lytica*, ¹²*Cobetia marina*, ¹³*Oceanospirillum jannaschii*, ¹⁴*Marinobacter hydrocarbonoclasticus*.

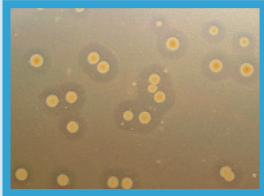
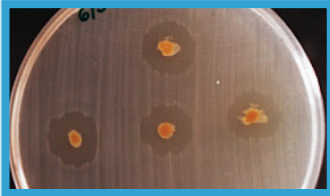


FIGURA 1.

Métodos más utilizados para determinar la actividad antibacteriana de una cepa: acúmulos (izquierda) y doble capa (derecha).

manera su capacidad para desarrollarse en el ambiente y minimizando los riesgos por introducción de organismos alóctonos en el sistema.

- b) Tener un efecto beneficioso sobre el organismo diana, mediante cualquiera de los modos de acción explicados.
- c) No resultar patógeno ni tóxico, no sólo para el organismo diana sino también para otros organismos vivos presentes en el medio, como el fitoplancton. Además, no debe proliferar en el medio de forma que pueda llegar a serlo.

3.3. Aplicación de probióticos al cultivo de moluscos

Los trabajos acerca de probióticos en acuicultura corresponden mayoritariamente a estudios de peces y crustáceos, habiendo poca biblio-



grafía disponible de este tipo de experimentos en moluscos bivalvos.

LODEIROS *et al.* (1989) publican un primer estudio acerca del efecto antibiótico de bacterias marinas en la supervivencia larvaria de la vieira *Pecten ziczac*. Comparan el efecto sobre los cultivos larvarios de tres cepas diferentes, *Alteromonas* sp. x24, *Pseudomonas* sp. P12 y *Flavobacterium* sp. P14, y de sus respectivos extractos antibióticos. Las dos primeras resultan tóxicas de cualquiera de las formas utilizadas, mientras que la tercera no sólo no lo es, sino que es capaz de combatir los efectos del patógeno *Vibrio anguillarum* EPp3. Resulta interesante que los mejores resultados se obtengan al añadir el cultivo bacteriano vivo.

DOUILLET y LANGDON (1993) llevan a cabo una serie de experimentos con cultivos axénicos de larvas de ostra *C. gigas*, alimentados con una dieta monoalgal axénica e inoculados con diferentes bacterias marinas. De todos los aislados ensayados, la mayor parte tienen efecto adverso, neutral o variable, siendo sólo una, la cepa CA2 (*Alteromonas* sp.), la que muestra un efecto beneficioso y consistente en el crecimiento y la supervivencia larvaria. Como modo de acción general apuntan al aporte de suplementos nutricionales que una dieta monoalgal no es capaz de cubrir, ayudando a la fijación de nitrógeno, o en la digestión y asimilación de la microalga ingerida, gracias a la elevada proporción de cepas productoras de enzimas extracelulares en estos cultivos. En experimentos posteriores con esta misma cepa en cultivos no axénicos (DOUILLET y LANGDON 1994), encuentran que el efecto varía con la concentración bacteriana suministrada, siendo nociva a concentraciones de 10^7 células/ml tanto para la supervivencia como para el crecimiento, mientras que valores de 10^4 – 10^6 células/ml no afectan a la supervivencia y mejoran el crecimiento larvario. La concentración óptima, 10^5 células/ml, estaría dentro del rango normal de los cultivos de larvas de bivalvos, entre 10^4 y 10^6 células/ml (JEANTHON *et al.* 1988). Una vez más, sugieren como modo de acción el aporte de nutrientes esenciales no presentes en las microalgas o de enzimas que faciliten los procesos digestivos. Apuntan además al efecto beneficioso que se observa en el porcentaje de larvas que realizan la metamorfosis a semilla y en el tamaño de esta al cabo de 30 días, aunque no formulan ninguna hipótesis sobre el mecanismo de acción en este caso, pudiendo deberse a un efecto indirecto de los beneficios generales sobre el crecimiento y desarrollo.



Los trabajos más amplios sobre la aplicación de bacterias probióticas en cultivos larvarios de bivalvos son los desarrollados con larvas de *Argopecten purpuratus*, por el grupo de Riquelme y colaboradores. Abordan sus estudios ensayando los efectos de la cepa INH, *Pseudoalteromonas haloplanktis* (anteriormente *Alteromonas haloplanktis*), aislada de gónada de reproductores (RIQUELME *et al.* 1996). En primer lugar, determinan *in vitro* su amplio espectro de inhibición frente a diferentes especies bacterianas, incluyendo miembros del género *Vibrio*. El componente(s) con actividad inhibidora, según se desprende de sus experimentos en medio líquido con un *Vibrio anguillarum*-related (VAR) y *V. alginolyticus*, es producido por las células bacterianas vivas y probablemente esté contenido intracelularmente. Se trata de metabolito(s) secundario(s), excretado en la fase estacionaria de crecimiento. La incubación de las larvas en suspensiones de la cepa INH les confiere protección frente a una posterior infección por VAR a concentraciones moderadas (10^3 células/ml). Esto apunta a su uso como medida profiláctica, frente a los niveles bajos en que se suelen hallar inicialmente los patógenos oportunistas en los sistemas de acuicultura. En un trabajo posterior utilizan por primera vez el término probiótico (RIQUELME *et al.* 1997). Parten de una colección de 506 aislados relacionados con los cultivos larvarios de *A. purpuratus*, tanto en laboratorio como en criadero. Por los resultados de los ensayos de actividad antibacteriana en placa frente al patógeno VAR, combinados con experimentos de protección larvaria frente a este mismo patógeno por preincubación en suspensiones del potencial probiótico, seleccionan la cepa 11 (*Pseudomonas* sp.) como el mejor candidato para su uso en cultivos larvarios. Estudian también la utilización de cultivos microalgales axénicos (*Isochrysis galbana*) como vía de incorporación al sistema de bacterias con actividad inhibidora (AVENDAÑO y RIQUELME 1999). Como resultado de sus experimentos, seleccionan la cepa C33, *Vibrio* sp., por su capacidad de crecimiento en presencia de productos extracelulares microalgales, su capacidad de inhibición del patógeno VAR en un medio con este tipo de productos como únicos nutrientes, su estimulación del crecimiento del cultivo de fitoplancton, su conservación de la capacidad inhibidora después de múltiples transferencias del cultivo microalgal, y su ingestión eficiente y significativa por las

larvas de *A. purpuratus* al ser inoculada junto con la microalga. Sin embargo, cuando estudian la incorporación del cultivo bacteriano puro, encuentran que no hay siquiera ingestión por parte de las larvas (RIQUELME *et al.* 2000), aunque sí en adultos (AVENDAÑO-HERRERA *et al.* 2001). Analizan también el espectro de actividad antimicrobiana y la producción de sustancias bactericidas de esta cepa C33 (JORQUERA *et al.* 1999). Completan los estudios con trabajos de adición de bacterias productoras de sustancias inhibidoras a cultivos larvarios masivos (RIQUELME *et al.* 2001). Así, inoculan regularmente mezclas de las cepas *Vibrio* sp. C33, *Pseudomonas* sp. 11 y *Bacillus* sp. B2 (esta última sólo en algunos ensayos), resultando que mediante este tratamiento se puede completar la fase larvaria sin adición de antibiótico. Demuestran además que aunque los antibióticos reducen las bacterias totales en el agua, no impiden su proliferación dentro de las larvas, mientras que es posible una modificación de la microbiota asociada a las larvas mediante la incorporación de las bacterias seleccionadas.

El término probiótico lo emplean también GIBSON *et al.* (1998) en su trabajo acerca de la protección ejercida por la cepa A199 (*Aeromonas media*) sobre larvas de *C. gigas* frente a la infección por *V. tubiashii*. La cepa A199 muestra un amplio espectro de inhibición *in vitro*, incluyendo diferentes patógenos de acuicultura. El acondicionamiento de los cultivos larvarios con la cepa probiótica (10^4 unidades formadoras de colonia [ufc]/ml) permite la supervivencia de los cultivos inoculados con el patógeno (10^2 , 10^3 y 10^5 ufc/ml). También NAKAMURA *et al.* (1999) consiguen la protección de larvas de *C. gigas* frente a la infección por vibrios, en este caso *V. alginolyticus*, mediante el inóculo de la cepa S21. Seleccionan esta cepa, aislada de agua de mar, por su capacidad de inhibición en medio sólido de vibrios patógenos (*Vibrio* sp. ATCC 19107, *V. alginolyticus* ATCC 19108 y *V. tubiashii* ATCC 19109). Confirman esta actividad inhibidora mediante cocultivos en agua de mar de la cepa S21 y el patógeno *V. alginolyticus*. Finalmente, demuestran que la inoculación del probiótico (10^4 y 10^5 ufc/ml) inmediatamente después del patógeno (10^5 ufc/ml) reduce las mortalidades larvarias de un 91,6% al 53,1 y 78,0%, respectivamente.

Basándose en los mismos mecanismos de acción, hay otros estudios con larvas de *Pecten maximus*. LONGEON *et al.* (2004) aíslan una bacteria

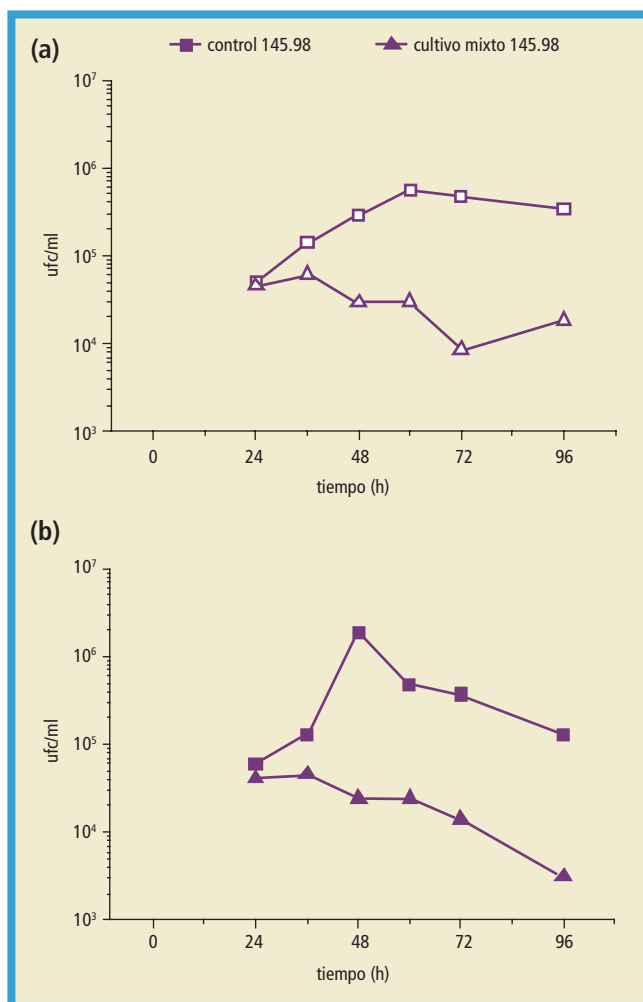


de origen marino, *Pseudoalteromonas* sp. X153, con amplio espectro de actividad inhibidora *in vitro*. Purifican el componente antimicrobiano, P-153, pero la inestabilidad de esta proteína y la dificultad de obtener una cantidad suficiente impiden la realización de ensayos directos con cultivos larvarios. Intentan entonces el uso de la bacteria viva como probiótico. En primer lugar, descartan su toxicidad, a concentraciones de hasta 10^7 células/ml, en un experimento a corto plazo con larvas de *Ruditapes philippinarum*. En otro experimento de larga duración, comparan la evolución de cultivos larvarios de *P. maximus*, bien inoculando la cepa X153, bien añadiendo cloranfenicol o sin aditivo alguno. Los resultados muestran que la supervivencia es mejor en los cultivos inoculados con la bacteria respecto al control, aunque ligeramente peor que con el antibiótico. Sin embargo, la tasa de crecimiento de las larvas inoculadas es menor que en los otros dos casos. También con cultivos larvarios de vieira son los experimentos realizados por RUIZ-PONTE *et al.* (1999). Una vez más aíslan una bacteria marina, *Roseobacter gallaeciensis* BS107 (actualmente *Phaeobacter gallaeciensis*), con capacidad *in vitro* de inhibición de un amplio número de cepas, incluyendo patógenos de acuicultura como *V. pectenecida* A496. Los ensayos en medio líquido demuestran, según estos autores, que la cepa BS107 sólo tiene actividad antibacteriana en presencia de otra bacteria, que liberaría una molécula de naturaleza proteica que actuaría como efectora para inducir la actividad antibacteriana de la cepa BS107. Es necesario comentar aquí que estos experimentos se refieren exclusivamente a la actividad del sobrenadante de cultivos puros o mixtos de la cepa BS107 con vibrios patógenos, considerando que la capacidad de inhibición implica obligatoriamente la liberación masiva de un compuesto al medio. Esto conduce a estudios de utilización de una sustancia, más que de aplicación de una bacteria probiótica propiamente dicha. En los experimentos de supervivencia larvaria la adición de células vivas de *R. gallaeciensis* no sólo no es capaz de reducir las mortalidades por *V. pectenecida*, sino que muestra peores resultados si se compara con cultivos sin inóculo alguno o con adición de cloranfenicol. Sin embargo, el uso de extractos celulares es tan efectivo, a niveles de supervivencia larvaria, como el tratamiento con cloranfenicol, aunque no confiere protección alguna frente al inóculo de *V. pectenecida*.

PRADO (2006) realiza un estudio integral de la microbiota asociada a criaderos de bivalvos. Siguiendo los mismo pasos que otros trabajos mencionados anteriormente, en primer lugar selecciona la cepa 154 (*Phaeobacter gallaeciensis*) de entre una amplia colección de aislados de criaderos de bivalvos. Esta cepa es el candidato idóneo para su empleo como probiótico tanto por mostrar la máxima capacidad de inhibición *in vitro* frente a patógenos conocidos en acuicultura, como por su amplio espectro de actividad. Los resultados de espectro de actividad obtenidos en medio sólido se confirman en agua de mar (Fig. 2), demostrando la inhibición del crecimiento de dos vibrios patógenos de larvas de bivalvos (PRADO *et al.* 2005). En ambos casos se sigue un mismo patrón, es necesario que la cepa 154 se incorpore al sistema previa o simultáneamente a la entrada de los patógenos, no resultando efectiva cuando el patógeno coloniza el medio con anterioridad. Además, con estos experimentos se extrapola la capacidad demostrada anteriormente en medio sólido a aquel medio en que se va a aplicar, el agua de mar. Ensayos *in vivo* permiten establecer la reducción de las poblaciones de vibrios presentes en el agua de cultivos larvarios de *Ostrea edulis*, así como en cultivos de fitoplancton utilizados como alimento en criadero (Fig. 3). Además, demuestran la efectividad para reducir las mortalidades causadas por infecciones naturales, tanto en larvas de *O. edulis* como *R. philippinarum*, cuando la cepa 154 se inocula en el agua de cultivo antes de que aparezcan los primeros signos de enfermedad. Finalmente, la cepa 154 resulta igualmente eficaz para controlar vibriosis inducidas en laboratorio siempre que se cumpla la condición de su presencia en el sistema simultánea o previamente a la del patógeno, siendo los resultados mejores en este último caso. Todo apunta por tanto a su uso potencial como medida de control, permitiendo su actuación antes de que los patógenos alcancen concentraciones elevadas.

3.4. Fijación larvaria y metamorfosis

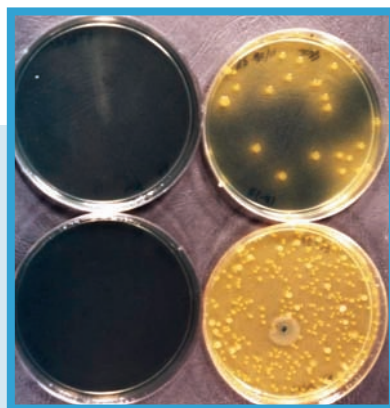
Mención aparte merece la fijación, proceso irreversible de adherencia al sustrato con que finaliza la fase larvaria. Es un momento del desarrollo muy delicado, en el que es frecuente que se registren mortalidades importantes. Está seguida por la metamorfosis, con la adquisición de las estructuras adultas y el paso a la vida bentónica.

**FIGURA 2.**

Crecimiento del patógeno *V. neptunius* 145.98 en monocultivo (control) y en los experimentos con acondicionamiento previo del agua de mar con la cepa 154 (cultivo mixto). Temperatura: (a) 17 ± 1 °C, (b) 23 ± 1 °C.

La implicación de bacterias en los procesos de fijación y metamorfosis en invertebrados marinos es sobradamente conocida. En la mayor parte de los casos hay una inducción mediada por películas bacterianas naturales o incluso películas mono-específicas. Dentro de este campo, y en relación con bivalvos, los estudios más completos comienzan con la publicación de WEINER y COLWELL (1982), en la que demuestran que las biopelículas del aislado LST, una bacteria marina pigmentada (WEINER *et al.* 1985), estimulan la fijación larvaria de *C.*

FIGURA 3.
Reducción de la población
de vibrios, estimada por el
crecimiento en medio TCBS, de
cultivos de mezcla de especies
de fitoplancton inoculados con la
cepa 154 (izquierda) o sin adición
bacteriana (derecha).



virginica. La cepa produce además un exopolisacárido hidrosoluble (ABU *et al.* 1986), tipo PAVE («polysaccharide adhesive viscous exopolymer»), promotor de la adhesión de microorganismos a superficies (ZOBELL 1943). La bacteria, inductora de la fijación también en *C. gigas*, fue descrita como *Alteromonas colwelliana* (WEINER *et al.* 1989) y reclasificada posteriormente como *Shewanella colwelliana* (COYNE *et al.* 1989). El pigmento es del tipo melanina, producto final de la actividad tirosinasa (intermediada por DOPA). Al hacer crecer las células en glucosa, inhibidora de la actividad tirosinasa, y por tanto de la producción de DOPA y melanina, se inhibe la fijación larvaria. Posteriores trabajos demostraron que la fijación se podía inducir también con el sobrenadante de *Sh. colwelliana*, u otras bacterias como *V. cholerae*, tanto salvaje como un mutante pigmentado, *V. cholerae* HTX (FITZ *et al.* 1989), apuntando a una sustancia soluble. El comportamiento de fijación se da como respuesta al sobrenadante de cultivos en el final de la fase logarítmica, posteriormente puede verse inhibido por la liberación de compuestos nocivos relacionados con la lisis celular o la formación del pigmento. Otros trabajos de este grupo demostraron que las biopelículas de *Sh. colwelliana* inducían también la fijación en larvas de *Ostrea edulis*, pero no de *Pecten maximus*, aunque quizá puedan influir las diferentes temperaturas a que se mantienen los cultivos (TRITAR *et al.* 1992). Finalmente, demostraron la efectividad del sobrenadante de *Sh. colwelliana* para inducir la fijación larvaria en criadero de *C. gigas* y *C. virginica*, a gran escala (WALCH *et al.* 1999).



La fijación es muy variable tanto en laboratorio como en criadero (WEINER y COLWELL 1982, WEINER *et al.* 1989). TRITAR *et al.* (1992), en sus ensayos de la efectividad de biopelículas de un mutante de *Sh. colwelliana* de elevada producción de melanina, para la inducción de la fijación en *O. edulis* obtienen resultados muy positivos en un grupo de experimentos, mientras en otra serie de ensayos la fijación en los controles es considerablemente mejor. Son muchas las variables que pueden afectar al proceso de fijación en un sustrato determinado, desde cambios en las condiciones físicas de las larvas a la propia fisiología bacteriana (TRITAR *et al.* 1992). La producción de un inductor se puede ver alterada también por el medio en que se cultive la bacteria, la cantidad de pigmento liberado y la disponibilidad de oxígeno (FRITT *et al.* 1989). Esta variabilidad hace que la inducción de estos procesos y la mejora de los porcentajes de fijación mediante bacterias deba ser tomada en cuenta como un modo de probiosis de especial relevancia en el caso de los cultivos larvarios de bivalvos.

PRADO (2006) ensaya el efecto de la cepa *Ph. gallaeciensis* 154, productora de un pigmento difusible, en la fijación de larvas de *O. edulis*. En los experimentos de fijación en colectores acondicionados en suspensiones de esta cepa, no hay una mejoría significativa. Sí se observa un favorecimiento de la fijación larvaria con la inoculación directa de la bacteria en el agua de cultivo, siempre que la concentración esté por encima de 10^5 ufc/ml. Además, los datos obtenidos muestran un aumento de la supervivencia, incluso con aquellas concentraciones de la cepa que no favorecen la fijación.

4. CONSIDERACIONES FINALES

En los criaderos de bivalvos hay una entrada constante de bacterias a través de los diferentes compartimentos (reproductores, agua de cultivo, fitoplancton, larvas y tanques de cultivo), lo que se traduce en múltiples vías de incorporación de potenciales patógenos al sistema.

El medio, es decir, el agua de mar en que se mantienen los cultivos larvarios, condiciona en gran medida su microbiota. Son animales filtradores, con un flujo constante de agua a través de su organismo, lo que dificulta el establecimiento de una población bacteriana en el

digestivo. Por ello, la colonización del tracto digestivo de los individuos, uno de los requisitos en la mayor parte de las definiciones de probiótico, no parece un factor importante en el caso de las larvas de bivalvos, ya que además, por esto mismo, los problemas no suelen ir ligados al balance de la microbiota del digestivo. La colonización de los patógenos se puede dar en cualquier parte del organismo, incluyendo la concha, y extenderse fácilmente. Resulta por tanto más aconsejable un control de la microbiota del medio, manteniéndola con una composición beneficiosa para el desarrollo y la supervivencia larvarios, o al menos, impidiendo la proliferación de patógenos oportunistas.

Las bacterias potencialmente perjudiciales se pueden incorporar en cualquier momento al cultivo, pero lo suelen hacer a concentraciones bajas, proliferando sólo en condiciones favorables. La presencia de una bacteria, perteneciente al mismo nicho ecológico y capaz de inhibir la proliferación de estos microorganismos, permite un control de la calidad microbiológica del agua sin intrusión de una especie alóctona. Este mecanismo evita recurrir a los tratamientos con agentes quimioterápicos, eludiendo los riesgos de posibles efectos perjudiciales para las larvas y de aparición de resistencias que se puedan transmitir a otras bacterias, además de no eliminar de forma completa e indiscriminada la carga bacteriana asociada a los cultivos. Hay que tener en cuenta que las infecciones en los cultivos larvarios de bivalvos suelen ser fulminantes, de forma que no permiten un tratamiento «curativo» y mucho menos, la identificación del agente etiológico para seleccionar el antibiótico que permita combatir el brote. Además, las larvas de bivalvos precisan de alguna manera la población bacteriana. Los múltiples mecanismos por los que esta puede ayudar en el desarrollo constituyen la base de los probióticos para estos cultivos, siendo la mejor alternativa en estos momentos.

Es necesario profundizar en los estudios de probiosis en cultivos larvarios de bivalvos, estudiando en todos los casos la interacción de las bacterias con otros organismos vivos presentes (fitoplancton), estableciendo su capacidad para mantenerse en el sistema y la dosis necesaria para su máxima efectividad, así como hallando un método que facilite su conservación, almacenamiento y manipulación en los criaderos. Además del control de la población de potenciales patógenos, no hay



que descartar nuevas aproximaciones, buscando beneficios a través de diferentes mecanismos de acción y considerando distintas vías de incorporación de las bacterias al sistema.

5. AGRADECIMIENTOS

Los trabajos del grupo de la Universidad de Santiago fueron posibles gracias a los proyectos PGIDT00MAR2002PR y 2002/PX212 de la Secretaría Xeral de Investigación e Desenvolvemento (Xunta de Galicia).

6. REFERENCIAS

- ABU, G. O., R. M. WEINER, D. B. BONAR y R. R. COLWELL, 1986 Extracellular polysaccharide production by a marine bacterium, pp. 543-549 en *Proc. Sixth Int. Biodet. Sympos.*, editado por S. Barry y D. R. Houghton. Cambrian News LTD. Eng.
- AVENDAÑO, R. E. y C. E. RIQUELME, 1999 Establishment of mixed-culture probiotics and microalgae as food for bivalve larvae. *Aquaculture Res.* **30**: 893-900.
- AVENDAÑO-HERRERA, R. E., M. DEKOVIC y C. E. RIQUELME, 2001 Establecimiento de bacterias benéficas en el tracto digestivo y gónada de adultos de *Argopecten purpuratus* (Lamarck 1819) en cultivo masivo. *Rev. Biol. Mar. Oceanog.* **36**: 31-41.
- BARJA, J. L., M. L. LEMOS y A. E. TORANZO, 1989 Purification and characterization of an antibacterial substance produced by a marine *Alteromonas* species. *Antimicrob. Agents Chemother.* **33**: 1674-1679.
- BATICADOS, M. C. L., C. R. LAVILLA-PITOGO, E. R. CRUZ-LACIERDA, L. D. DE LA PEÑA, y N. A. SUÑAZ, 1990 Studies on the chemical control of luminous bacteria *Vibrio harveyi* and *V. splendidus* isolated from diseased *Penaeus monodon* larvae and rearing water. *Dis. Aquat. Org.* **9**: 133-139.
- BROWN, C., 1981 A study of two shellfish-pathogenic *Vibrio* strains isolated from a Long Island hatchery during a recent outbreak of disease. *J. Shellfish Res.* **1**: 83-87.
- BROWN, C., 1983 Bacterial diseases in bivalve larval cultures and their control, pp. 230-242 en *Culture of marine invertebrates*, editado por C. J. Berg, jr., Hutchinson Ross Publishing Company, Stroudsburg, Pennsylvania.
- BROWN, C. y D. J. RUSSO, 1979 Ultraviolet light disinfection of shellfish hatchery sea water. I. Elimination of five pathogenic bacteria. *Aquaculture* **17**: 17-23.



- BROWN, C. y L. P. TETTELBACH, 1988 Characterization of a nonmotile *Vibrio* sp. pathogenic to larvae of *Mercenaria mercenaria* and *Crassostrea virginica*. *Aquaculture* **74**: 195-204.
- CHYTHANYA, R., KARUNASAGAR, I Y KARUNASAGAR, I. 2002. Inhibition of shrimp pathogenic vibrios by a marine *Pseudomonas* I-2 strain. *Aquaculture* **208**.
- COYNE, V. E., C. J. PILLIDGE, D. D. SLEDJESKI, H. HORI, B. A. ORTIZ-CONDE, *et al.*, 1989 Reclassification of *Alteromonas colwelliana* to the genus *Shewanella* by DNA-DNA hybridization, serology and 5S ribosomal RNA sequence data. *System. Appl. Microbiol.* **12**: 275-279.
- D'AGOSTINO, A., 1975 Antibiotics in cultures of invertebrates, pp. 109-133 en *Culture of marine invertebrate animals*, editado por W. L. Smith y M. H. Chanley. Plenum Press, New York, N.Y., London.
- DAVIS, C. y P. E. CHANLEY, 1956 Effects of some dissolved substances on bivalve larvae. *Proceed. Natl. Shellfish. Assoc.* **46**: 59-47.
- DOPAZO, C. P., M. L. LEMOS, C. LODEIROS, J. BOLINCHES, J. L. BARJA, *et al.*, 1988 Inhibitory activity of antibiotic-producing marine bacteria against fish pathogens. *J. Appl. Bacteriol.* **65**: 97-101.
- DOUILLET, P. y C. J. LANGDON, 1993 Effects of marine bacteria on the culture of axenic oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg) larvae. *Biol. Bull.* **184**: 36-51.
- DOUILLET, P. A. y C. J. LANGDON, 1994 Use of a probiotic for the culture of larvae of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *Aquaculture* **119**: 25-40.
- FITT, W. K., M. P. LABARE, W. C. FUQUA, M. WALCH, S. L. COON, *et al.* 1989 Factors influencing bacterial production of inducers of settlement behavior of larvae of the oyster *Crassostrea gigas*. *Microb. Ecol.* **17**: 287-298.
- FITT, W. K., S. L. COON, M. WALCH, R. M. WEINER, R. R. COLWELL, *et al.* 1990 Settlement behavior and metamorphosis of oyster larvae (*Crassostrea gigas*) in response to bacterial supernatants. *Mar. Biol.* **106**: 389-394.
- FITT, W. K., G. A. HESLINGA, y T. C. WATSON, 1992 Use of antibiotics in the mariculture of giant clams (F. *Tridacnidae*). *Aquaculture* **104**: 1-10.
- FULLER, R., 1989 Probiotics in man and animal. *J. Appl. Bacteriol.* **66**: 365-378.
- GATESOUBE, F.J., 1999 The use of probiotic in aquaculture. *Aquaculture* **180**: 147-165.
- GIBSON, L.F., J. WOODWORTH, y A. M. GEORGE, 1998 Probiotic activity of *Aeromonas media* on the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, when challenged with *Vibrio tubiashii*. *Aquaculture* **169**: 111-120.
- GÓMEZ-GIL, B., A. ROQUE, y J. F. TURNBULL, 2000 The use and selection of probiotic bacteria for use in the culture of larval aquatic organisms. *Aquaculture* **191**: 259-270.



- GRAM, L., J. MELCHIORSEN, B. SPANGGAARD, I. HUBER, y T. F. NIELSEN, 1999 Inhibition of *Vibrio anguillarum* by *Pseudomonas fluorescens* AH2, a possible probiotic treatment of fish. Appl. Environ. Microbiol. **65**: 969-973.
- HIDU, H., y H. S. TUBIASH, 1963 A bacterial basis for the growth of antibiotic-treated bivalve larvae. Proc. Natl. Shellfish. Assoc. **54**: 25-39.
- HILY, C., 1974 Développement larvaire de *Mytilus edulis* en présence d'antibiotiques. Rap. D.E.A. Océanogr. Biol., Brest, 17 pp.
- IRIANTO, A. y B. AUSTIN, 2002 Probiotics in aquaculture. J.Fish Dis. **25**: 633-642.
- JEANTHON, C., C. PRIEUR, y J. C. COCHARD, 1988 Bacteriological survey of antibiotic-treated sea waters in a *Pecten maximus* hatchery. Aquaculture **71**: 1-8.
- JEFFRIES, V. E., 1982 Three *Vibrio* strains pathogenic to larvae of *Crassostrea gigas* and *Ostrea edulis*. Aquaculture **29**: 201-226.
- JORQUERA, M. A., C. E. RIQUELME, L. A. LOYALA, y L. F. MUÑOZ, 1999 Production of bactericidal substances by a marine vibrio isolated from cultures of the scallop *Argopecten purpuratus*. Aquacult. Int. **7**: 433-438.
- JORQUERA, M. A., F. R. SILVA, y C. E. RIQUELME, 2001 Bacteria in the culture of the scallop *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819). Aquacult. Int. **9**: 285-303.
- JORQUERA, M. A., G. VALENCIA, M. EGUCHI, M. KATAYOSE, y C. RIQUELME, 2002 Disinfection of seawater for hatchery aquaculture systems using electrolytic water treatment. Aquaculture **207**: 213-224.
- KARUNASAGAR, I., R. PAI, G. R. MALATHI, y I. KARUNASAGAR, 1994 Mass mortality of *Penaeus monodon* larvae due to antibiotic-resistant *Vibrio harveyi* infection. Aquaculture **128**: 203-209.
- KESARCODI-WATSON, A., H. KASPAR, M. J. LATEGAN, y L. GIBSON., 2008 Probiotics in aquaculture: The need, principles and mechanisms of actions and screening processes. Aquaculture **274**: 1-14.
- LE PENNEC, M., y D. PRIEUR, 1977 Les antibiotiques dans les élevages de larves de bivalves marins. Aquaculture **12**: 15-30.
- LEITZ, T., y T. WAGNER, 1993 The marine bacterium *Alteromonas espejiana* induces metamorphosis of the hydroid *Hydractinia echinata*. Mar. Biol. **115**: 173-178.
- LEMONS, M. L., C. P. DOPAZO, A. E. TORANZO, y J. L. BARJA, 1991 Competitive dominance of antibiotic-producing marine bacteria in mixed cultures. J. Appl. Bacteriol. **71**: 228-232.
- LEWIS, T. E., C. D. GARLAND, T. D. O'BRIEN, M. I. FRASER, P. A. TONG, et al. 1988 The use of 0.2-um membrane-filtered seawater for improved control of bacterial levels in microalgal cultures fed to larval Pacific oysters (*Crassostrea gigas*). Aquaculture **69**: 241-251.



- LILLY, D. M., y R. H. STILLWELL 1965 Probiotics: growth promoting factors produced by microorganisms. *Science* **147**: 747-748.
- LILTVED, J., y S. J. CRIPPS 1999 Removal of particle-associated bacteria by prefiltration and ultraviolet irradiation. *Aquaculture Res.* **30**: 445-450.
- LILTVED H., H. HEKTOEN y H. EFRAIMSEN 1995 Inactivation of bacterial and viral fish pathogens by ozonation or UV irradiation in water of different salinity. *Aquacult. Eng.* **14**: 107-122.
- LODEIROS, C., J. BOLINCHES C. P. DOPAZO y A. E. TORANZO 1987 Bacillary necrosis in hatcheries of *Ostrea edulis* in Spain. *Aquaculture* **65**: 15-29.
- LODEIROS, C., L. FREITES, E. FERNÁNDEZ, A. VÉLEZ, y J. BASTARDO 1989 Efecto antibiótico de tres bacterias marinas en la supervivencia de larvas de la vieira *Pecten ziczac* infectadas con el germen *Vibrio anguillarum*. *Bol. Inst. Oceanogr. Venezuela. Univ. Oriente* **28**: 165-169.
- LONGEON, A., J. PEDUZZI, M. BARTHÉLEMY, S. CORRE, J. L. NICOLAS, *et al.* 2004 Purification and partial identification of novel antimicrobial protein from marine bacterium *Pseudoalteromonas* species strain X153. *Mar. Biotech.* **6**: 633-641.
- MAEDA, M., K. NOGAMI, M. KANEMATSU, y K. HIRAYAMA 1997 The concept of biological control methods in aquaculture. *Hydrobiologia* **358**: 285-290.
- MCPHEARSON, R. M., A. DEPAOLA, S. R. ZYWNO, M. M. MOTES, jr., y A. M. GUARINO, 1991 Antibiotic resistance in Gram-negative bacteria from cultured catfish and aquaculture ponds. *Aquaculture* **99**: 203-211.
- MORIARTY, D. J. W., 1998 Control of luminous *Vibrio* species in penaeid aquaculture ponds. *Aquaculture* **164**: 351-358.
- MURCHELANO, R. A., C. BROWN, y J. BISHOP 1975 Quantitative and qualitative studies of bacteria isolated from sea water used in the laboratory culture of the American oyster, *Crassostrea virginica*. *J. Fish. Res. Board Can.* **32**: 739-745.
- NAKAMURA, A., K. G. TAKAHASHI, y K. MORI 1999 Vibriostatic bacteria isolated from rearing seawater of oyster brood stock: Potentiality as biocontrol agents for vibriosis in oyster larvae. *Fish Pathol.* **34**: 139-144.
- NYGAARD, K., B. T. LUNESTAD, H. HEKTOEN, J. A. BERGE, y V. HORMAZÁBAL 1992 Resistance to oxytetracycline, oxolinic acid and furazolidone in bacteria from marine sediments. *Aquaculture* **104**: 31-36.
- PARKER, R. B., 1974 Probiotics, the other half of the antibiotics story. *Anim. Nutr. Health* **29**: 4-8.
- PRADO 2006. Microbiota asociada a criaderos de moluscos: patogénesis y probiosis. Tesis Doctoral. Universidad de Santiago de Compostela.



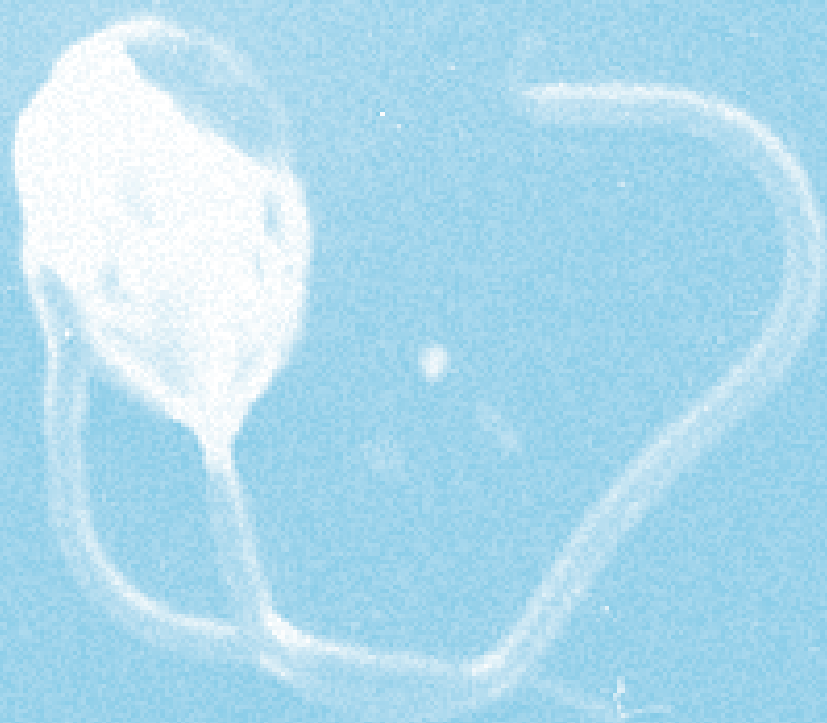
- PRADO, S., J. L. ROMALDE, J. MONTES, y J. L. BARJA, 2005 Pathogenic bacteria isolated from disease outbreaks in shellfish hatcheries. First description of *Vibrio neptunius* as an oyster pathogen. *Dis. Aquat. Org.* **67**: 209-215.
- PRIEUR, D., G. MÉVEL, J. L. NICOLAS, A. PLUSQUELLEC, y M. VIGNEULLE, 1990 Interactions between bivalve molluscs and bacteria in the marine environment. *Oceanogr. Mar. Biol. Annu. Rev.* **28**: 277-352.
- RIQUELME, C., G. HAYASHIDA, R. ARAYA, A. UCHIDA, M. SATOMI, *et al.* 1996 Isolation of a native bacterial strain from the scallop *Argopecten purpuratus* with inhibitory effects against pathogenic vibrios. *J. Shellfish Res.* **15**: 369-374
- RIQUELME, C., R. ARAYA, N. VERGARA, A. ROJAS, M. GUAITA, *et al.* 1997 Potential probiotic strain in the culture of the Chilean scallop *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819). *Aquaculture* **154**: 17-26.
- RIQUELME, C., R. ARAYA, y R. ESCRIBANO 2000 Selective incorporation of bacteria by *Argopecten purpuratus* larvae: implications for the use of probiotics in culturing systems of the Chilean scallop. *Aquaculture* **181**: 25-36.
- RIQUELME, C. E., M. A. JORQUERA, A. I. ROSAS, R. E. AVENDAÑO, N. REYES 2001 Addition of inhibitor-producing bacteria to mass cultures of *Argopecten purpuratus* larvae (Lamarck, 1819). *Aquaculture* **192**: 111-119.
- ROBERTSON, P.A.W., O'DOWD, C., BURRELLS, C., WILLIAMS, P., AUSTIN, B. 2000. Use of *Carnobacterium* sp. as a probiotic for Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). *Aquaculture* **185**: 235-243.
- ROBERT, R., P. MINER, y J. L. NICOLAS 1996 Mortality control of scallop larvae in the hatchery. *Aquaculture Int.* **4**: 305-313.
- ROMALDE, J. L., C. RAVELO, S. LÓPEZ-ROMALDE, R. AVENDAÑO-HERRERA, B. MAGARIÑOS, *et al.* 2003 Vaccination strategies to prevent emerging diseases for Spanish aquaculture, pp. 85-95 en *Progress in Fish Vaccinology*, editado por P. J. Midtlyng. Karger, Basilea, Suiza.
- RUÍZ-PONTE, C., J. F. SAMAIN, J. L. SÁNCHEZ, y J. L. NICOLAS 1999 The benefit of a *Roseobacter* species on the survival of the scallop larvae. *Mar. Biotech.* **1**: 52-59.
- SPANGGAARD, B., F. JORGENSEN, L. GRAM, y H. H. HUSS 1993 Antibiotic resistance in bacteria isolated from three freshwater fish farms and an unpolluted stream in Denmark. *Aquaculture* **115**: 195-207.
- SZEWZYK, U., C. HOLMSTROM, M. WRANGSTADH, M. O. SAMUELSSON, J. S. MAKI, *et al.* 1991 Relevance of the exopolysaccharide of marine *Pseudomonas* sp. strain S9 for the attachment of *Ciona intestinalis* larvae. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **75**: 259-265.



- TIROLA, M., VALTONEN, E.T., RINTAMÄKI-KINNUNEN, P., KULOMAA, M.S. 2002. Diagnosis of flavobacteriosis by direct amplification of rRNA genes. *Dis. Aquat. Org.* **51**, 93-100.
- TANNOCK, G. W., 1997 Modification of the normal microbiota by diet, stress, antimicrobial agents, and probiotics, pp. 434-465 en *Gastrointestinal Microbiology*. Vol. 2. *Gastrointestinal microbes and host interactions*, editado por R. I. Mackie, B. A. With y R. E. Isaacson. Chapman and Hall Microbiology Series, International Thomson Publishing, New York, USA.
- TORANZO, A. E., Y. SANTOS, y J. L. BARJA 1996 Immunization with bacterial antigens: *Vibrio* infections, pp. 93-105 en *Fish Vaccinology*, editado por R. Gudding, A. Lillehaug, P. J. Midtlyng y F. Brown. Karger, Basilea, Suiza.
- TRITAR, S., D. PRIEUR, y R. WEINER 1992 Effects of bacterial films on the settlement of the oysters, *Crassostrea gigas*, and *Ostrea edulis* and the scallop *Pecten maximus*. *J. Shellfish Res.* **11**: 325-330.
- VASCONCELOS, G. J., y J. S. LEE 1972 Microbial flora of Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) subjected to ultraviolet-irradiated seawater. *Appl. Microbiol.* **23**: 11-16.
- VERSCHUERE, L., G. ROMBAUT, P. SORGELOOS, y W. VERSTRAETE 2000 Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64**: 655-671.
- VINE, N.G., W. D. LEUKES, y H. KAISER 2006 Probiotics in marine larviculture. *FEMS Microbiol.Rev.* **30**: 404-427.
- WALCH, M., R. M. WEINER, R. R. COLWELL, y S. L. COON, 1999 Use of L-DOPA and soluble bacterial products to improve set of *Crassostrea virginica* (Gmelin, 1791) and *C.gigas* (Thunberg, 1793). *J. Shellfish Res.* **18**: 133-138.
- WALNE, P. R., 1958 The importance of bacteria in laboratory experiments on rearing the larvae of *Ostrea edulis* (L.). *J. mar. biol. Ass. U.K.* **37**: 415-425.
- WEINER, R. M., y R. R. COLWELL 1982 Induction of settlement and metamorphosis in *Crassostrea virginica* by a melanin-synthesizing bacterium. Technical Report Maryland Sea Grant Program, UM-SG-TS-82-05, pp.1-44.
- WEINER, R. M., A. M. SEGALL, y R. R. COLWELL 1985 Characterization of a marine bacterium associated with *Crassostrea virginica* (the Eastern oyster). *Appl. Environ. Microbiol.* **49**: 83-90.
- WEINER, R. M., M. WALCH, M. P. LABARE, D. B. BONAR, y R. R. COLWELL 1989 Effect of biofilms of the marine bacterium *Alteromonas colwelliana* on set of the oysters *Crassostrea gigas* and *Crassostrea virginica*. *J. Shellfish Res.* **8**: 117-123.
- ZOBELL C. E., 1943 The effect of solid surfaces upon bacterial activity. *J. Bacteriol.* **46**: 39-56.

13

ESTRATEGIAS DE LUCHA FRENTA A ENFERMEDADES DE MOLUSCOS BIVALVOS



ESTRATEGIAS DE LUCHA FRENTE A ENFERMEDADES DE MOLUSCOS BIVALBOS

Villalba A.¹ y Figueras A.²

¹Centro de Investigacións Mariñas, Consellería do Mar,
Xunta de Galicia, Apto. 13,
36620 Vilanova de Arousa, Spain

²Instituto de Investigaciones Marinas, CSIC,
Eduardo Cabello 6, 36208 Vigo, Spain

Resumen

Se revisan las posibles estrategias para hacer frente a enfermedades de moluscos que viven en el medio natural. Para minimizar los riesgos de introducir una enfermedad infecciosa en una zona libre de dicha enfermedad han de seguirse procedimientos rigurosos para impedir la entrada de individuos portadores del agente infeccioso. Cuando una enfermedad ya está establecida en una zona o se prevé probable su entrada, pueden implementarse medidas para que la incidencia de la enfermedad sea reducida o que su gravedad (intensidad) sea limitada. Dentro de este tipo de medidas se incluyen las modificaciones en la gestión de las pesquerías o de los procedimientos de cultivo; otra estrategia es aumentar la tolerancia de los individuos a la enfermedad mediante la potenciación del sistema inmunitario, la producción de estirpes más tolerantes o resistentes a través de modificaciones genéticas y, como caso extremo, la sustitución de especies susceptibles por especies resistentes. El uso de tratamientos terapéuticos para sanar individuos enfermos no se ha generalizado en la acuicultura de moluscos en medio abierto, aunque se han desarrollado algunos protocolos que se han mostrado eficaces en laboratorio o a pequeña escala frente



a determinadas enfermedades y parásitos. Cuando una enfermedad infecciosa de moluscos se ha establecido en el medio natural durante un periodo prolongado, es muy difícil conseguir su erradicación y, de hecho, no hay precedentes de éxito incluso en casos como el intento de erradicación de la bonamiosis de la ostra plana de Holanda, en que se siguió un protocolo riguroso.

Abstract

The feasible strategies to fight against diseases affecting molluscs in the natural environment are reviewed. Rigorous procedures must be applied to avoid the entry of individuals hosting the infective agent, when the objective is to minimise the risk of introducing an infectious disease in a disease-free area. There are measures to reduce the incidence or the severity of a disease that can be applied when the disease occurs or is probable to occur in an area, those including changes of fishery and culture management procedures and increasing the tolerance of the individuals to the disease through stimulating the immune system, producing tolerant strains through genetic handling or replacing susceptible species with resistant ones. Therapeutic measures to cure diseased individuals are not applied to mollusc aquaculture in open environment, although some procedures have been efficient in the laboratory or at reduced scale to face some diseases or parasites. Disease eradication is very difficult when a disease has been established for long time. In fact there is no successful precedent, even in cases as the attempt to eradicate bonamiosis from the Netherlands, in which a rigorous procedure was followed.

1. INTRODUCCIÓN

En este capítulo se revisan diferentes estrategias con las que hacer frente a enfermedades de moluscos que viven en el medio natural. En el caso de las enfermedades propias de criaderos de moluscos, el hecho de que los individuos se encuentren estabulados en medios cerrados o semiabiertos permite el uso de estrategias específicas para esta situación, que ya se han tratado en capítulos previos. Desde el punto de vista económico, las enfermedades más relevantes en las pesquerías y cultivos de moluscos son las infecciosas y es a éstas a las



que se dedica este capítulo. Es obvio que en las explotaciones de moluscos (pesquerías y cultivos), el efecto patogénico de una enfermedad infecciosa con mayor trascendencia es el aumento de la mortalidad, aunque hay efectos subletales de importancia considerable como la disminución de la fecundidad, especialmente cuando el reclutamiento natural es la base de la explotación, ralentización el crecimiento y merma de la calidad, bien por disminución de la proporción de vianda bien por conferir un aspecto repugnante. En los tratados de epidemiología médica y veterinaria, las medidas de lucha contra enfermedades suelen agruparse en prevención primaria, secundaria, terciaria e incluso cuaternaria. Teniendo en cuenta las peculiaridades de los moluscos, de acuerdo con Grizel *et al.* (1986) las medidas de lucha contra enfermedades infecciosas se pueden agrupar en (1) las que se implementan para impedir que una enfermedad llegue a afectar a los individuos de una zona no afectada, (2) las empleadas para minimizar los efectos negativos de la enfermedad en una zona aun en presencia del agente infeccioso, (3) las encaminadas a sanar a los individuos enfermos y (4) las que buscan la erradicación del agente infeccioso de una zona afectada.

2. ACCIONES PARA IMPEDIR QUE UNA ENFERMEDAD INFECCIOSA LLEGUE A UNA ZONA NO AFECTADA

La vía habitual de entrada de las enfermedades infecciosas es la introducción de individuos portadores del agente patógeno, por lo que para minimizar los riesgos de introducir una enfermedad infecciosa en una zona libre de dicha enfermedad es aconsejable limitar las introducciones de individuos de otras zonas a los casos en que sea estrictamente necesario y, en caso de realizarlas, ha de hacerse con un control riguroso para impedir la entrada de individuos portadores del agente infeccioso. El Código Sanitario de Animales Acuáticos, que la Organización Mundial de Sanidad Animal (O.I.E.) actualiza periódicamente, recoge las enfermedades infecciosas que requieren una vigilancia especial, por el peligro que entrañan, incluyendo las metodologías y técnicas aconsejadas para determinar la presencia de individuos portadores del agente



infeccioso respectivo entre los moluscos de una zona. La normativa en materia de sanidad animal de cada país debe recoger los protocolos necesarios para que se mantenga la ausencia de enfermedad en las zonas así caracterizadas. Un ejemplo de dicha normativa es la que se aplica en los países de la Unión Europea (ANÓNIMO 2006), que descansa en dos pilares: (1) mantener un plan de vigilancia para verificar la ausencia de la enfermedad en las zonas reputadas como libres y (2) prohibir la importación de moluscos provenientes de zonas afectadas por la enfermedad o de zonas donde el estado sanitario es desconocido, permitiendo únicamente la entrada de individuos procedentes de zonas reconocidas como libres de la enfermedad. Además de la imprescindible normativa, es importante que cada país cuente con el cuerpo de inspección que garantice el cumplimiento de la normativa. En la toma de decisiones sobre la conveniencia de la introducción de grupos de moluscos es recomendable no restringirse a las enfermedades y técnicas de diagnóstico recogidas en las listas de vigilancia obligatoria y realizar análisis histológicos que podrían permitir la detección de posibles agentes patógenos que no han sido previamente asociados a mortalidades. También ayudaría someter a los moluscos a un proceso de cuarentena, en instalaciones adecuadas, que puede revelar la presencia de algún patógeno que pase a un estado virulento debido al debilitamiento de los portadores durante el transporte.

Nunca se debe permitir la inmersión de una partida o lote de moluscos sobre los que no se tenga suficientes garantías zoonosanitarias.

3. ACCIONES PARA MINIMIZAR LOS EFECTOS DE UNA ENFERMEDAD AUN EN PRESENCIA DEL AGENTE INFECCIOSO

Este grupo de medidas se implementan para que, aun en el caso de que los individuos de una zona puedan entrar en contacto con el agente responsable de una enfermedad infecciosa, bien la incidencia de la enfermedad (el número de individuos sanos que se contagian) sea reducida, bien la gravedad (intensidad) de la enfermedad sea limitada, permitiendo que los individuos afectados se comercialicen sin llegar a sufrir efectos graves. Dentro de este tipo de medidas se inclu-



yen (1) las modificaciones en la gestión de las pesquerías o de los procedimientos de cultivo; (2) otra estrategia es aumentar la tolerancia de los individuos a la enfermedad o incluso utilizar individuos resistentes.

3.1. Cambios en los procedimientos de gestión y cultivo

Un conocimiento epidemiológico detallado de una enfermedad infecciosa puede permitir adaptar los procedimientos de gestión y cultivo para disminuir las pérdidas ocasionadas por una enfermedad infecciosa. Los aspectos epidemiológicos que conviene conocer son cuál es el agente infeccioso, su ciclo de vida, si se transmite directamente entre individuos de la misma especie, si los cadáveres son focos de infección, si hay hospedadores intermediarios, hospedadores reservorio u otros vectores, longevidad de las formas de vida libre del agente infeccioso, si hay estadios de resistencia en su ciclo vital, cuál o cuáles son los estadios infectivos, si hay infección vertical; la duración y localización anatómica/histológica de las distintas etapas en la progresión de la infección en el hospedador (periodos de latencia, prepatencia, incubación, duración de fases clínica y sistémica, tiempo de generación); la influencia de factores del hospedador, como por ejemplo la edad o la variedad (raza), en la susceptibilidad a la enfermedad; la influencia de factores ambientales, en especial temperatura y salinidad, en la dinámica de la enfermedad, bien por que afectan a la viabilidad, capacidad infectiva o virulencia del patógeno, bien porque afectan a la susceptibilidad del hospedador bien por la interacción de ambos efectos; distribución espacio-temporal de la enfermedad. A continuación se exponen los casos de cómo se han tratado de modificar los procedimientos de cultivo tratando de minimizar los efectos de varias enfermedades infecciosas de ostras, con resultados desiguales.

En el caso de la enfermedad del pie o de la concha que afectó a las explotaciones de la ostra plana *Ostrea edulis* en varios países de Europa, con especial dramatismo en Holanda en la década de los 1930s, los estudios epidemiológicos determinaron que el agente causal era el hongo *Ostracobable implexa* y que las conchas de berberecho *Cerastoderma edule*, que se vertían al mar de forma masiva para proporcionar sustrato al reclutamiento natural de las ostras, eran un reservorio para el hongo. Un cambio en el procedimiento de gestión consistente



en la eliminación minuciosa de las conchas de berberecho y de otros moluscos de los parques ostrícolas condujo a la recuperación de la industria ostrícola en Holanda (KORRINGA 1951, LAUCKNER 1983).

En el caso del procedimiento de gestión y cultivo de la ostra americana *Crassostrea virginica* recomendado para luchar contra la infección por el protozoo *Perkinsus marinus* (ANDREWS y RAY 1988), son tres los factores que determinaron las modificaciones de procedimientos de los ostricultores de la Bahía de Chesapeake (EE. UU.): 1) Debido a la influencia de la salinidad en la viabilidad e infectividad de *P. marinus*, los bancos de ostras de las áreas estuáricas de baja salinidad de los ríos tributarios de la bahía se caracterizaron durante mucho tiempo por una baja o nula prevalencia del parásito, aunque el crecimiento de las ostras es muy lento en dichas áreas; sin embargo en las áreas de la bahía con salinidad más alta, la prevalencia de *P. marinus* es elevada y las ostras crecen rápido. 2) La temperatura influye en la dinámica de la infección y en la mortalidad, determinando una dinámica estacional, de forma que la infección progresa tan sólo en los meses cálidos. 3) Las ostras infectadas son fuente de estadios infectivos, tras la muerte en mayor medida que mientras viven. De acuerdo con el primer punto, el procedimiento recomendado a los ostricultores fue recoger semilla de ostra de las áreas de salinidad baja (semilla no infectada) y transplantarla a áreas de salinidad alta para su engorde. De acuerdo con el punto 2.º, la semilla debía ser transplantada inmediatamente después del final del periodo infectivo, a principios del otoño, y la cosecha debía producirse antes del verano de dos años más tarde, el periodo de máxima mortalidad, permitiendo así a las ostras crecer durante un periodo sin infección seguido por un periodo con infección antes de alcanzar el periodo de mortalidad dramática, en el segundo verano de engorde. En la costa del golfo de Méjico donde también existe la enfermedad, el periodo cálido es más largo, por lo que el tiempo de engorde en áreas de salinidad alta ha de ser más corto que en la bahía de Chesapeake. Con este protocolo el tamaño de las ostras comerciales se redujo pero al menos había ostras para vender. De acuerdo con el punto 3.º, la cosecha de ostras debía ser minuciosa, minimizando el número de ostras que quedan sin recoger en los fondos de cultivo para evitar que sirviesen de focos de infección en la siguiente campaña



de engorde. Además, teniendo en cuenta la transmisión directa de la enfermedad, la disminución de la densidad de cultivo y el distanciamiento entre parques de cultivo contribuiría a dificultar el contagio entre ostras y la transmisión entre parques, respectivamente. Sin embargo con el tiempo este procedimiento fue perdiendo eficacia, pues tras años sucesivos de sequía prolongada en invierno y primavera que dieron lugar al aumento de la salinidad en las áreas estuáricas donde *P. marinus* no estaba presente, dichas áreas resultaron invadidas por el parásito, lo que deparó la carencia de semilla no infectada. Por otro lado, la disminución de la talla de captura y la retirada de todas las ostras de tamaño comercial (en especial en las áreas de dominio público) chocaba con la legislación tendente a asegurar la persistencia de un número de reproductores suficiente para asegurar el reclutamiento en la bahía. La situación se complicó aún más con la expansión de una epidemia causada por otro protozoo, *Haplosporidium nelsoni*, en áreas afectadas por *P. marinus*. Las nuevas dificultades llevaron a tener que buscar áreas nuevas para el engorde, incluso algunas de baja salinidad a pesar del periodo tan prolongado requerido para alcanzar tamaño comercial en ellas. La carencia de semilla de ostra de reclutamiento natural libre de *P. marinus* y de *H. nelsoni* incrementó la demanda de semilla libre de estos patógenos producida en criadero, pero precisamente en los años de sequía prolongada, el uso de esa semilla de criadero no supuso una reducción de la incidencia de ambas enfermedades ni de la mortalidad; el éxito de esta estrategia depende en gran medida del régimen de salinidad (ALBRIGHT *et al.* 2007; MCCOLLUGH *et al.* 2007). Por otro lado, la acumulación de series históricas de datos de intensidad de infección, mortalidad y condiciones ambientales recogidas en áreas diferentes permitió la elaboración de modelos que simulan la dinámica de la infección y ayudan a predecir la evolución de la enfermedad, lo que permite proporcionar recomendaciones concretas muy útiles para la gestión de las explotaciones de la ostra *C. virginica*. (HOFMANN *et al.* 1995; POWELL *et al.* 1996, 1997; SONIAT y KORTRIGHT 1998; RAGONE CALVO *et al.* 2000; SONIAT *et al.* 2006).

En el caso de la marteiliosis que ocasionó mortalidades masivas de ostra plana *O. edulis* en varios países europeos a partir de 1968, los estudios epidemiológicos en el litoral atlántico francés demostraron que



(1) el periodo de adquisición de la infección por *Marteilia refringens* es corto, restringiéndose al verano, y que el máximo de mortalidad tiene lugar en el otoño del año siguiente al del inicio de la infección (GRIZEL 1985); (2) se constató que el parásito no se transmite directamente de ostra enferma a ostra sana y es muy probable la implicación de un hospedador intermediario, papel que podría desempeñar el copépodo *Paracartia grani* (AUDEMARD *et al.* 2002). Con esta información, se trató de adaptar el protocolo de gestión y cultivo de las explotaciones ostrícolas del litoral francés, proponiéndose la introducción de semilla procedente de zonas no afectadas en las áreas afectadas justo al acabar del periodo infectivo, procediéndose a la cosecha de las ostras justo antes del periodo de máxima mortalidad. Debido a la vía de transmisión, la reducción de la densidad de las ostras en los parques ostrícolas no tenía efectos significativos en la incidencia de la enfermedad. El desarrollo del engorde en la zona submareal en lugar de la habitual intermareal pareció contribuir a disminuir la prevalencia. Sin embargo, el desarrollo de una nueva epidemia, ocasionada por el protozoo *Bonamia ostreae* a partir de 1979, puso contra las cuerdas a la industria ostrícola europea.

En el caso de la bonamiosis de la ostra plana *O. edulis*, se constató que (1) la infección se transmite durante todo el año, (2) que el periodo desde que la infección es detectable (por histopatología) hasta que se alcanza el máximo de mortalidad en una cohorte es relativamente corto, (3) que el máximo de mortalidad se concentra en el último verano de engorde cuando la ostras están cercanas a alcanzar el tamaño comercial. De acuerdo con los puntos 1.º y 2.º es prácticamente imposible introducir modificaciones relativas al calendario en los procedimientos de gestión y cultivo que sean efectivas para luchar contra la enfermedad. El punto 3º sirvió de base para buscar modificaciones en los procedimientos de cultivo que acelerasen el ritmo de crecimiento de las ostras, permitiéndoles alcanzar el tamaño comercial antes del verano fatídico, para así aumentar las tasas de supervivencia aun a costa de rebajar el tamaño comercial (MONTES *et al.* 2003), aunque esta estrategia no se ha traducido en mejoras sustanciales para el sector ostricultor.

Una medida básica ante cualquier enfermedad es la eliminación lo más minuciosa posible cualquier foco del patógeno.



3.2. Aumento de la tolerancia

Las vías posibles para aumentar la tolerancia o conferir resistencia frente a enfermedades en explotaciones animales son la potenciación del sistema inmunitario, la producción de estirpes más tolerantes o resistentes a través de modificaciones genéticas y, como caso extremo, la sustitución de especies susceptibles por especies resistentes.

- a) Potenciación del sistema inmunitario: los moluscos no tienen sistema inmunitario adaptativo (también llamado específico o clonal) y carecen de memoria inmunológica si como tal se entiende la capacidad de producir anticuerpos específicos tras una primera exposición a un patógeno, para así responder de forma rápida y contundente en exposiciones posteriores. Por tanto, la vacunación no es una opción para luchar contra las enfermedades de los moluscos. Ahora bien, al poseer un sistema inmunitario innato, sí que es posible fortalecer la respuesta inmunitaria de los moluscos. En el caso de la acuicultura de crustáceos, en especial de los peneidos, está extendida la práctica de la potenciación de su sistema inmunitario mediante la estimulación de éste con la exposición a patógenos o a diferentes PAMPs (acrónimo de *pathogen associated molecular patterns*, en español «patrones moleculares propios de patógenos»), lo que refuerza la respuesta inmune frente a patógenos diversos, por tratarse de una respuesta inespecífica, y confiriendo de esta forma una protección frente a patógenos que se mantiene durante un tiempo variable (VAN HAI *et al.* 2009). Los potenciadores de la respuesta inmune suelen administrarse con el alimento. En el caso de los moluscos bivalvos, también se ha constatado que la exposición experimental a bacterias o a PAMPs provoca una estimulación del sistema inmune (HONG *et al.* 2006; COSTA *et al.* 2008, 2009; CONG *et al.* 2009). Sin embargo, la estimulación del sistema inmunitario no se ha aplicado al cultivo industrial de moluscos bivalvos, pues los cultivos se desarrollan en el medio natural. Quizás en el futuro puedan diseñarse estrategias de inmuno potenciación de moluscos bivalvos que sean rentables a nivel industrial. La aplicación de estas estrategias parece más viable en los cultivos



de orejas de mar, pues éstas se cultivan en tanques y la adición y consumo de los productos inmuno-estimulantes son fácilmente controlables. Se ha demostrado el efecto potenciador del sistema inmunitario de orejas de mar y el aumento de su tolerancia frente a patógenos mediante la adición al alimento de bacterias (calificadas como probióticas por su efecto beneficioso) (MACEY y COYNE 2005) o mezclas de compuestos inmuno-estimulantes (XUE *et al.* 2008). En el capítulo sobre la **Respuesta inmune de moluscos** se abordan las bases moleculares y fisiológicas de la estimulación del sistema inmunitario.

- b) Producción de estirpes tolerantes mediante selección o manipulación genética: La modificación de la dotación genética de los moluscos con el fin de conseguir individuos más tolerantes a las enfermedades se ha intentado a través de dos vías, los programas de selección genética mediante el control de cruzamientos y la manipulación cromosómica para variar la ploidía. La vía de la ingeniería genética conducente a la inserción de genes ajenos que confieran tolerancia o resistencia es factible pero las actuales restricciones legales han impedido su implantación industrial.
- *Programas de cruzamientos controlados*. En la actualidad se desarrollan múltiples programas de selección genética, basados en cruzamientos controlados, para mejorar la producción de distintas especies de moluscos en diferentes lugares del mundo. Básicamente son dos los objetivos que persiguen estos programas de selección, aumentar la tasa de crecimiento y aumentar la tasa de supervivencia mediante la tolerancia o resistencia a enfermedades, siendo este segundo grupo el que nos ocupa en este capítulo. La estrategia de desarrollar estirpes tolerantes mediante programas de selección genética basados en cruzamientos controlados ha sido utilizada para minimizar los efectos de las enfermedades de varias especies comerciales de ostras en diferentes países, como es el caso de la lucha contra las infecciones de *Crassostrea virginica* por los protozoos *Haplosporidium nelsoni* y *Perkinsus marinus* en los EE.UU (FORD y HASKIN 1987; GAFFNEY y BUSHEK 1996; RAGONE CALVO *et al.* 2003); el fenómeno de la mortalidad estival de *Crassostrea*



gigas en los EE.UU (HERSHBERGER *et al.* 1984; BEATTIE *et al.* 1988) y en Francia (DEGREMONT *et al.* 2007; SAMAIN *et al.* 2007; SAUVAGE *et al.* 2009; DEGREMONT *et al.* 2010); la enfermedad juvenil de *Crassostrea virginica* causada por la bacteria *Rosseobacter crassostreae* en los EE.UU (DAVIS y BARBER 1999); las infecciones de *Saccostrea glomerata* por los protozoos *Marteilia sydneyi* y *Bonamia roughleyi* en Australia (NELL *et al.* 2000; NELL y HAND 2003; NELL y PERKINS 2006; GREEN *et al.* 2008) y la infección de *Ostrea edulis* por el protozoo *Bonamia ostreae* en Irlanda (CULLOTY *et al.* 2001; 2004), Francia (MARTIN *et al.* 1993; BAUD *et al.* 1997; NACIRI-GRAVEN *et al.* 1998, 1999; LALLIAS *et al.* 2008) y España (DA SILVA *et al.* 2005; VILLALBA *et al.* 2007). Los resultados obtenidos en todos estos programas son muy alentadores y, en mayor o menor medida, se ha conseguido aumentar la tolerancia, con disminución de la prevalencia e intensidad de la enfermedad y de la mortalidad de las estirpes seleccionadas. En general, en estos programas el criterio de selección de reproductores, es decir cómo se juzgaba la idoneidad de un individuo para usarlo como progenitor de la siguiente generación, ha sido tradicionalmente la supervivencia tras exposición prolongada al patógeno en el medio natural o en condiciones experimentales, lo que determina que para conseguir una mejora sustancial se necesiten muchos años (varias generaciones de selección y varios años por generación). El desarrollo de las herramientas moleculares y su aplicación en Biotecnología ha permitido que en la actualidad se estén buscando marcadores moleculares de la tolerancia para usarlos como criterio de selección de reproductores de forma más eficaz, más específica y acortando plazos en los programas de selección. En el caso de la selección de estirpes de *Saccostrea glomerata* tolerantes a *Marteilia sydneyi*, ya se ha comprobado que la fenoloxidasa está implicada en las diferencias de tolerancia a la enfermedad entre cohortes (BEZEMER *et al.* 2006; ALADAILEH *et al.* 2007; BUTT y RAFTOS 2008) y se ha comprobado que hay diferencias de expresión en genes que codifican enzimas antioxidantes en las cohortes seleccionadas para tolerar la enfermedad (GREEN



et al. 2009). La búsqueda de genes marcadores de tolerancia también se está desarrollando en el caso de la selección de tolerancia al fenómeno de la mortalidad estival de *Crassostrea gigas* en Francia (HUVET *et al.* 2004; DAVID *et al.* 2007) y en los EE.UU (LANG *et al.* 2009). La aproximación proteómica para identificar proteínas marcadoras de tolerancia también se está aplicando en programas de selección de tolerancia de *Ostrea edulis* frente a la bonamiosis (CAO *et al.* 2009). Los avances en genómica funcional se complementan con los avances en la construcción de mapas de ligamiento del genoma en particular con caracteres relacionados con la tolerancia a enfermedades, como es el caso de *Crassostrea virginica* frente a la perkinsosis (SOKOLOVA *et al.* 2006; YU y GUO 2006), de *Ostrea edulis* frente a la bonamiosis (LALLIAS *et al.* 2009) y de *Crassostrea gigas* frente al fenómeno de la mortalidad de estival (SAUVAGE *et al.* 2010). Además, estas nuevas herramientas moleculares van a permitir entender las bases fisiológicas y moleculares de la tolerancia y, por tanto, buscar nuevas vías de lucha. En el capítulo sobre la **Respuesta inmune de moluscos** se revisan los avances en la identificación de genes implicados en la respuesta frente a patógenos.

- *Modificación de la ploidía.* La utilización de individuos triploides se ha extendido a varias especies de moluscos bivalvos cultivadas, lo que se ha acrecentado con los protocolos de uso de espermatozoides de individuos tetraploides para fecundar ovocitos de individuos diploides. La razón de la utilización de moluscos triploides en acuicultura es su mayor tasa de crecimiento en comparación con los diploides. Esto se debe a que las células triploides son de mayor tamaño que las diploides y a que, debido a la total o parcial incapacidad de los triploides para completar la gametogénesis, parte de la energía que en los individuos diploides se destinaría a la producción de gametos, en los individuos triploides está disponible para otras funciones, como crecimiento. La ventaja en el crecimiento de los triploides llevó a pensar que, para aquellas enfermedades cuyos efectos letales se concentran en una edad próxima al



tamaño comercial, un crecimiento más rápido de los triploides podría suponer alcanzar el tamaño comercial antes de que la mortalidad fuese alta. Incluso se hipotetizó que la mayor susceptibilidad a enfermedades propia de la estación reproductora en los diploides de algunas especies, en parte debida al debilitamiento del sistema inmunitario, podría minimizarse con la triploidía, al reducirse el gasto energético de la gametogénesis. Sin embargo, no se ha demostrado que la triploidía disminuya significativamente la susceptibilidad a enfermedades. Las ostras *C. virginica* triploides son tan susceptibles a las infecciones por *Perkinsus marinus* (BARBER y MANN 1991; MEYERS *et al.* 1991) y *Haplosporidium nelsoni* (MATTHIESSEN y DAVIS 1992) como las diploides. En el caso de la mortalidad estival de *Crassostrea gigas*, las ostras triploides han mostrado mortalidad más alta que las diploides, tanto en los EE. UU. (CHENEY *et al.* 2000) como en Francia (GOULLETQUER *et al.* 1996). La única información disponible sobre los beneficios de la triploidía en el caso de la infección de *Saccostrea glomerata* por *Bonamia roughleyi* indica una mayor supervivencia de los triploides frente a los diploides cuando las ostras se vieron afectadas por brotes de la enfermedad (HAND *et al.* 1998), pero los autores no recogieron en su estudio datos sobre prevalencia o intensidad de la enfermedad.

- *Producción de individuos transgénicos.* La utilización de organismos transgénicos como medida de lucha frente a enfermedades está ampliamente extendida en agricultura. Sin embargo las restricciones legales para la puesta en el mercado de animales modificados genéticamente ha impedido la aplicación de esta estrategia a la acuicultura de moluscos. No obstante, a nivel experimental ya se han realizado con éxito ensayos de transfección para la inserción de genes ajenos en varias especies de moluscos, de forma que el gen insertado se expresa en embriones o adultos, según el caso, de ostras *C. gigas* y *C. virginica* (CADORET *et al.* 1997a, 1997b; BUCHANAN *et al.* 2001a, 2001b; CADORET *et al.* 2000), caracoles de agua dulce *Biomphalaria glabrata* (YOSHINO *et al.* 1998) y chirlas *Cha-*



melea gallina (GUERRA y ESPONDA 2006). Por tanto, la inserción de genes que confieran actividad antimicrobiana es posible. De hecho se ha patentado un protocolo para insertar el gen del interferón alfa en ostras perlíferas y así conferirles resistencia a virus (N.º patente JP2000245299-A).

c) Sustitución de una especie susceptible por una especie resistente:

Un paradigma de esta estrategia es la reacción de la industria ostrícola francesa ante las sucesivas epidemias que afectaron a sus explotaciones en el último tercio del siglo xx. Previamente, la industria ostrícola francesa se había basado en dos especies, la ostra plana *Ostrea edulis* y el ostión *Crassostrea angulata*, en proporciones variables a lo largo de los años. Las mortalidades masivas ocasionadas por un iridovirus entre 1967 y 1972, acabaron con las explotaciones del ostión y las sucesivas epidemias de marteiliosis y bonamiosis redujeron la producción de ostra plana a una mínima expresión en los setenta y ochenta. El sector ostrícola reaccionó introduciendo una especie exótica, la ostra rugosa del Pacífico *Crassostrea gigas*, que es muy tolerante o incluso resistente a las enfermedades mencionadas, de forma que la producción francesa de ostra, basada ahora casi exclusivamente en la especie introducida, ha aumentado significativamente con respecto a la situación previa a los brotes epidémicos. Las primeras introducciones se realizaron por iniciativa exclusiva de algunos ostricultores, sin autorización oficial, aunque finalmente la administración francesa tomó cartas en el asunto, supervisando y planificando el proceso de implantación de *C. gigas* a partir de 1970 (GRIZEL y HÉRAL 1991). Tal medida que, en principio, se planteó como solución a la mortalidad masiva de *C. angulata*, se extendió como solución a la mortalidad de la ostra plana provocada por marteiliosis y bonamiosis, comprobándose que otras especies exóticas de ostra plana (*Ostrea chilensis*, *O. denselamellosa*, *O. angasi* y *O. puelchana*) no eran alternativa por ser susceptibles a bonamiosis y marteiliosis (GRIZEL *et al.* 1983; LE BORGNE y LE PENNEC 1983; BOUGRIER *et al.* 1986; PASCUAL *et al.* 1991). No obstante, la introducción de una especie alóctona conlleva riesgos que hay que tener en cuenta antes de decidir



su introducción, entre los que destaca la entrada de organismos «acompañantes» de forma inadvertida (patógenos, predadores o competidores) que pueden dar lugar a modificaciones de diferente calado en el ecosistema receptor e incluso afectar a áreas de regiones o países próximos (CARRIKER 1992, SHATKIN *et al.* 1997). Para minimizar los riesgos de la introducción de especies exóticas, el Consejo Internacional para la Exploración del Mar (ICES) desarrolló un código con los procedimientos recomendados, que se actualiza periódicamente (ICES 2004), y que puede resumirse de la siguiente forma: (1) ha de realizarse un estudio inicial minucioso, incluyendo entre otras muchas cuestiones una revisión de la biología y ecología de la especie en el lugar de origen, un análisis de riesgos (impactos genético, ecológico, patológico y económico) de la introducción y una evaluación de los beneficios esperados, que deberá ser remitido al ICES para su consideración y pronunciamiento; (2) en caso de que se decida proceder con la introducción, un grupo de individuos de la especie en cuestión se usarán como reproductores para producir progenie, dentro de instalaciones de cuarentena, y dichos reproductores nunca se llevarán al medio natural; (3) sólo si se prevé que el impacto será mínimo y tras determinar que está libre de patógenos, la progenie se llevará al medio natural en una fase piloto, para evaluar la interacción con las especies autóctonas y contrastar las asunciones del análisis de riesgos, contando con un plan de contingencia por si fuese necesario retirar los individuos de la especie exótica; (4) se desarrollará un programa de seguimiento de la especie introducida en su ambiente nuevo, enviando informes anuales al ICES para su revisión hasta que el proceso se considere finalizado.

En los EE.UU se han desarrollado dos procesos, probablemente ejemplares, para evaluar la conveniencia de la introducción de especies exóticas de ostra como remedio a la dramática situación de la industria ostrícola de la Bahía de Chesapeake tras los efectos devastadores de las enfermedades causadas por los protozoos *Perkinsus marinus* y *Haplosporidium nelsoni* sobre las poblaciones de la ostra autóctona *Crassostrea virginica*. En la dé-



cada de los noventa del siglo pasado se evaluó *Crassostrea gigas* (MANN *et al.* 1991) y en este siglo se está evaluando *Crassostrea ariakensis*. (LUCKENBACH 2008). En ambos casos se han seguido las recomendaciones del ICES y, además, para minimizar el riesgo de que durante la fase de evaluación en el ambiente nuevo las especies exóticas colonizaran la Bahía de Chesapeake, los individuos que se fueron introduciendo en el medio natural eran triploides, por tanto con capacidad reproductiva mínima o nula. Se comprobó que *C. gigas* es susceptible a la infección por *P. marinus* (CALVO *et al.* 1999) y *H. nelsoni* (BURRESON *et al.* 2000) y que no suponía una ventaja significativa con respecto a *C. virginica* en la Bahía de Chesapeake. *C. ariakensis* se ha mostrado susceptible a *P. marinus* (CALVO *et al.* 2001; PAYNTER *et al.* 2008) y a *Bonamia* sp. (BURRESON *et al.* 2004) en el litoral de los EE.UU y su introducción en la Bahía de Chesapeake es todavía objeto de debate.

4. MEDIDAS TERAPÉUTICAS

Las medidas terapéuticas no se aplican en la acuicultura de moluscos bivalvos que se desarrollan en el medio natural, pues la combinación del medio abierto con el mecanismo de captación de alimento de estos organismos hace que no sea rentable el suministro de cualquier tipo de producto para sanar a individuos afectados por patógenos o enfermedades. A pesar de todo se han realizado experimentos para evaluar la eficacia terapéutica de diferentes productos en la infección de la ostra *C. virginica* por el protozoo *Perkinsus marinus* (CALVO y BURRESON 1994; FAISAL *et al.* 1999). Algunos de estos productos, como cicloheximida y bacitracina, se han mostrado eficaces en la reducción de los niveles de infección en ostras vivas sin matar al hospedador, aunque la infección no se elimina completamente. Otros productos inhiben la proliferación o matan células de *Perkinsus* spp. *in vitro* (GAUTHIER y VASTA 1994; KRANTZ 1994; DUNGAN y HAMILTON 1995; ELANDALLOUSSI *et al.*, 2003, 2005a,b; LUND *et al.* 2005; PANKO *et al.* 2008). Quizás se podrían diseñar protocolos para el uso de este tipo de productos u otros en sistemas cerrados por tiempo limitado para eliminar infecciones. MARTÍNEZ MANZANARES *et al.* (1998) evaluaron la eficacia de la



inmersión de lotes de almejas *Ruditapes philippinarum* en baños con diferentes antibióticos, como tratamiento para frenar la proliferación de la bacteria *Vibrio tapetis*, causante de la enfermedad del anillo marrón. También la inmersión de mejillones *Mytilus edulis* en una disolución de dichlorvos en agua de mar (30 mg/l) durante 2 horas es eficaz para la eliminación de los copépodos *Mytilicola intestinalis* alojados en el intestino del mejillón (BLATEAU *et al.* 1992). El método del baño, bien en agua dulce bien en agua caliente bien en una suspensión de hidróxido de calcio en agua dulce, se ha mostrado eficaz para disminuir la intensidad de infestación por gusanos poliquetos perforadores de la ostra *C. gigas* (NEL *et al.* 1996; GALLO-GARCÍA *et al.* 2004).

La situación es diferente en el caso de los cultivo de orejas de mar, que se realizan en tanques. En estos casos, sí podrían ser viables y rentables los procedimientos terapéuticos para tratar individuos enfermos. De hecho, la oxitetraciclina se puede usar para tratar orejas de mar *Haliotis* spp. afectadas por el síndrome de la deshidratación o del marchitamiento (withering syndrome) asociado a una infección rickettsiana (FRIEDMAN *et al.* 2003, 2007; ROSENBLUM *et al.* 2008).

5. ERRADICACIÓN DE ENFERMEDADES

Una posibilidad teórica de lucha frente a una enfermedad establecida en una zona es tratar de hacer desaparecer de dicha zona el patógeno que la causa. En la práctica, cuando una enfermedad transmisible que afecta a moluscos se ha establecido en el medio natural durante un periodo prolongado, es muy difícil conseguir su erradicación y, de hecho, no hay precedentes de éxito. En el caso de la bonamiosis de la ostra plana *O. edulis*, los intentos rigurosos de erradicación mediante el cese absoluto y prolongado de actividades de cultivo y la retirada minuciosa de ostras de las zonas afectadas resultaron infructuosos, tanto en Holanda (VAN BANNING 1988, 1991) como en Francia (GRIZEL *et al.* 1986). La razón de la dificultad es que es prácticamente imposible retirar todos los focos del patógeno pues, aun en el improbable caso de que la retirada de los individuos de la especie afectada sea absoluta y no quede ninguno en el medio, es posible que queden hospedadores reservorio o incluso estados de resistencia libres del patógeno. En el



caso de la bonamiosis, es posible que otros invertebrados además de las ostras alberguen *Bonamia ostreae* (LYNCH *et al.* 2007). Por tanto, es importante reaccionar rápidamente si una enfermedad transcendente se detecta en un lote aislado de moluscos, en un área que previamente se consideraba libre, retirando todos los individuos del lote lo antes posible, para evitar que el patógeno pueda acantonarse en el medio.

6. REFERENCIAS

- ALADAILEH, S., P. RODNEY, S.V. FAIR and D.A. RAFTOS 2007 Characterization of phenoloxidase activity in Sidney rock oysters (*Saccostrea glomerata*). Comparative Biochemistry and Physiology, Part B, **148**: 470-480.
- ALBRIGHT, B.W., G.R. ABBE, C.B. MCCOLLOUGH, L.S. BARKER and C.S. DUNGAN 2007 Growth and mortality of Dermo-disease-free juvenile oysters (*Crassostrea virginica*) at three salinity regimes in an enzootic area of Chesapeake Bay. Journal of Shellfish Research **26**: 451-463.
- ANDREWS, J.D. and S.M. RAY 1988 Epizootiology of the disease caused by the oyster pathogen *Perkinsus marinus* and its effects on the oyster industry. American Fisheries Society Special Publication **18**: 47-63.
- ANÓNIMO, 2006 Directiva 2006/88/CE del consejo de 24 de octubre de 2006 relativa a los requisitos zoonosarios de los animales y de los productos de la acuicultura, y a la prevención y el control de determinadas enfermedades de los animales acuáticos. Diario Oficial de la Unión Europea. L 328/14, 24.11.2006.
- AUDEMARD, C., F. LE ROUX, A. BARNAUD, C. COLLINS, B. SAUTOUR *et al.* 2002 Needle in a haystack: involvement of the copepod *Paracartia grani* in the life cycle of the oyster pathogen *Marteilia refringens*. Parasitology **124**: 315-323.
- BARBER, B.J. and R. MANN 1991 Sterile triploid *Crassostrea virginica* (Gmelin, 1791) grow faster than diploids but are equally susceptible to *Perkinsus marinus* Journal of Shellfish Research **10**: 445-450.
- BAUD, J.P., A. GÉRARD and Y. NACIRI-GRAVEN 1997 Comparative growth and mortality of *Bonamia ostrea*-resistant and wild flat oysters, *Ostrea edulis*, in an intensive system. Marine Biology **130**: 71-79.
- BEATTIE, J.H., J.P. DAVIS, S.L. DOWNING and K.K. CHEW 1988 Summer mortality of Pacific oysters. American Fisheries Society Special Publication. **18**: 265-268.
- BEZEMER, B., D. BUTT, J. NEELL, R. ADLARD and D. RAFTOS 2006 Breeding for QX disease resistance negatively selects one form of the defensive enzyme,



- phenoloxidase, in Sydney rock oysters. *Fish and Shellfish Immunology* **20**: 627-636.
- BATEAU, D., Y. LE COGUIC, E. MIALHE and H. GRIZEL 1992 Mussel (*Mytilus edulis*) treatment against the red copepod *Mytilicola intestinalis*. *Aquaculture* **107**: 165-169.
- BOUGRIER, S., G. TIGÉ, E. BACHÈRE and H. GRIZEL, 1986 *Ostrea angasi* acclimatisation to French coasts. *Aquaculture* **58**: 151-154.
- BUCHANAN, J.T., A.D. NICKENS, R.K. COOPER and T.R. TIERSCH 2001a Transfection of eastern oysters *Crassostrea virginica* embryos. *Marine Biotechnology* **3**: 322-335.
- BUCHANAN, J.T., T.C. CHENG, J.F. LA PEYRE, R.K. COOPER and T.R. TIERSCH 2001b *In vitro* transfection of adult eastern oysters *Crassostrea virginica*. *Journal of the World Aquaculture Society* **32**: 286-299.
- BURRESON, E., N. STOKES, R. CARNEGIE and M. BISHOP 2004 *Bonamia* sp. (Haplosporidia) found in nonnative oysters *Crassostrea ariakensis* in Bogue Sound, North Carolina. *Journal of Aquatic Animal Health* **16**: 1-9.
- BUTT, D. and D. RAFTOS 2008 Phenoloxidase-associated cellular defence in the Sydney rock oyster, *Saccostrea glomerata*, provides resistance against QX disease infections. *Developmental and Comparative Immunology* **32**: 299-306.
- CADORET, J.P., V. BOULO, S. GENDREAU and E. MIALHE 1997a Promoters from *Drosophila* heat shock protein and cytomegalovirus drive transient expression of luciferase introduced by particle bombardement into embryos of the oyster *Crassostrea gigas*. *Journal of Biotechnology* **56**: 183-189.
- CADORET, J.P., S. GENDREAU, J.M. DELECHENEAU, C. ROUSSEAU and E. MIALHE 1997b Microinjection of bivalve eggs: application in genetics. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* **6**: 72-77.
- CADORET, J.P., E. BACHÈRE, P. ROCH, E. MIALHE and V. BOULO 2000 Genetic transformation of farmed marine bivalve molluscs. In: Fingerma M, Nagabhushanam R (eds.) Recent advances in marine biotechnology, vol. 4: Aquaculture, Part A Seaweeds and invertebrates. Science Publishers. pp. 111-126.
- CALVO, G.W. and E.M. BURRESON 1994 *In vitro* and *in vivo* effects of eight chemotherapeutants on the oyster parasite *Perkinsus marinus* (Mackin, Owen, and Collier). *Journal of Shellfish Research* **13**: 101-107.
- CALVO, G.W., M. LUCKENBACH, S.K. ALLEN J.R. and E.M. BURRESON 1999 A comparative field study of *Crassostrea gigas* (Thunberg 1793) and *Crassostrea virginica* (Gmelin 1791) in relation to salinity in Virginia. *Journal of Shellfish Research* **18**: 465-473.
- CALVO, G.W., M. LUCKENBACH, S.K. ALLEN J.R. and E.M. BURRESON 2001 A comparative field study of *Crassostrea ariakensis* (Fujita 1913) and *Crassostrea*



- virginica* (Gmelin 1791) in relation to salinity in Virginia. *Journal of Shellfish Research* **20**: 221-229.
- CAO, A., J. FUENTES, P. COMESAÑA, S.M. CASAS and A. VILLALBA 2009 A proteomic approach envisaged to analyse the bases of oyster tolerance/resistance to bonamiosis. *Aquaculture* **295**: 149-156.
- CARRIKER, M. 1992 Introductions and transfers of molluscs: risk considerations and implications. *Journal of Shellfish Research* **11**: 507-510.
- CHENEY, D.P., B. F. MACDONALD and R.A. ELSTON 2000 Summer mortality of Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg): Initial findings on multiple environmental stressors in Puget Sound, Washington, 1998. *Journal of Shellfish Research* **19**: 353-359.
- COSTA, M.M., B. NOVOA and A. FIGUERAS 2008 Influence of α -glucans on the immune responses of carpet shell clam (*Ruditapes decussatus*) and Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*). *Fish and Shellfish Immunology* **24**:498-505.
- COSTA, M.M., M. PRADO-ÁLVAREZ, C. GESTAL, H. LI, P. ROCH *et al.* 2009 Functional and molecular immune response of Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*) haemocytes against pathogen-associated molecular patterns and bacteria. *Fish and Shellfish Immunology* **26**: 515-523.
- CONG, M., K.L. SONG, L. QIU, C. LI, B. WANG *et al.* 2009 The expression of peti-doglycan recognition protein S-1 gene in the scallop *Chlamys farreri* was enhanced after a second challenge by *Listonella anguillarum*. *Journal of Invertebrate Pathology* **100**: 120-122.
- CULLOTY, S.C., M.A. CRONIN and M.F. MULCAHY 2001 An investigation into the relative resistance of Irish flat oysters *Ostrea edulis* L. to the parasite *Bonamia ostreae*. *Aquaculture* **199**: 229-244.
- CULLOTY, S.C., M.A. CRONIN and M.F. MULCAHY 2004 Potencial resistance of a number of populations of the oyster *Ostrea edulis* to the parasite *Bonamia ostreae*. *Aquaculture* **237**: 41-58.
- DA SILVA, P.M., J. FUENTES and A. VILLALBA 2005 Growth, mortality and disease susceptibility of oyster *Ostrea edulis* families obtained from brood stocks of different geographical origins, through on growing in the Ría de Arousa (Galicia, NW Spain). *Marine Biology* **147**: 965-977.
- DAVID, E., P. BOUDRY, L. DÉGREMONT, A. TANGUY, N. QUÉRÉ *et al.* 2007 Genetic polymorphism of glutamine synthetase and delta-9 desaturase in families of Pacific oyster *Crassostrea gigas* and susceptibility to summer mortality. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **349**: 272-283.



- DAVIS, C.V. and B.J. BARBER 1999 Growth and survival of selected lines of eastern oysters, *Crassostrea virginica* (Gmelin 1791) affected by juvenile oyster disease. *Aquaculture* **178**: 253-271.
- DÉGREMONT, L., B. ERNANDE, E. BÉDIER and P. BOUDRY 2007 Summer mortality of hatchery-produced Pacific oyster spat (*Crassostrea gigas*). I. Estimation of genetic parameters for survival and growth. *Aquaculture* **262**: 41-53.
- DÉGREMONT, L., E. BÉDIER and P. BOUDRY 2010 Summer mortality of hatchery-produced Pacific oyster spat (*Crassostrea gigas*). II. Response to selection for survival and its influence on growth and yield. *Aquaculture* **299**: 21-29.
- DUNGAN, C.F. and R.M. HAMILTON 1995 Use of the tetrazolium-based cell proliferation assay to measure effects of *in vitro* conditions on *Perkinsus marinus* (Apicomplexan) proliferation. *Journal of Eukaryotic Microbiology* **42**: 379-388.
- ELANDALLOUSSI, L.M., R. AFONSO, P.A. NUNES and M.L. CANCELA 2003 Effects of desferrioxamine and 2,2'-bipyridyl on the proliferation of *Perkinsus atlanticus*. *Biomolecular Engineering* **20**: 349-354.
- ELANDALLOUSSI, L.M., P.M. RODRIGUES, R. AFONSO, R. LEITE, P.A. NUNES *et al* 2005a Shikimate and folate pathways in the protozoan parasite, *Perkinsus olseni*. *Molecular and Biochemical Parasitology* **142**: 106-109.
- ELANDALLOUSSI, L.M., R. LEITE, P.M. RODRIGUES, R. AFONSO, P.A. NUNES *et al*. 2005b. Effect of antiprotozoal drugs on the proliferation of the bivalve parasite *Perkinsus olseni*. *Aquaculture* **243**: 9-17.
- FAISAL, M., J.F. LA PEYRE and E.E. ELSAYED 1999 Bacitracin inhibits the oyster pathogen *Perkinsus marinus* in vitro and in vivo. *Journal of Aquatic Animal Health* **11**: 130-138.
- FORD, S.E. and H.H. HASKIN 1987 Infection and mortality patterns in strains of oysters *Crassostrea virginica* selected for resistance to the parasite *Haplosporidium nelsoni* MSX. *Journal of Parasitology* **73**: 386-376.
- FRIEDMAN, C.S., G. TREVELYAN, T.T. ROBBINS, E.P. MULDERD and R. FIELDS 2003 Development of an oral administration of oxytetracycline to control losses due to withering syndrome in cultured red abalone *Haliotis rufescens*. *Aquaculture* **224**: 1-23
- FRIEDMAN C.S., B.B. SCOTT, R.E. STRENGE, B. VADOPALAS and T.B. MCCORMICK 2007 Oxytetracycline as a tool to manage and prevent losses of the endangered white abalone *Haliotis sorenseni*, caused by withering syndrome. *Journal of Shellfish Research* **26**: 877-885.
- GAFFNEY, P.M. and D. BUSHEK 1996 Genetic aspects of disease resistance in oysters. *Journal of Shellfish Research* **15**: 135-140.



- GALLO-GARCÍA, M.C., M. GARCÍA-ULLOA-GÓMEZ and D.E. GODÍNEZ-SIORDIA 2004 Evaluación de dos tratamientos en la intensidad de gusanos poliquetos asociados a las valvas del ostión *Crassostrea gigas* (Thunberg 1873). *Ciencias Marinas* **30**: 455-464.
- GAUTHIER, J.D. and G.R. VASTA 1994 Inhibition of in vitro replication of the oyster parasite *Perkinsus marinus* by the natural iron chelators transferrin, lactoferrin, and desferrioxamine. *Developmental and Comparative Immunology* **18**: 277-286.
- GOULLETQUER, P., J.P. JOLY, A. GÉRARD, E. LE GAGNEUR, J. MORICEAU *et al.* 1996 Performance of triploid oysters *Crassostrea gigas* (Thunberg) reared in high carrying capacity ecosystem: survival, growth and proximate biochemical composition. *Haliotis* **25**: 1-12.
- GREEN, T.J., T.J. DIXON, E. DEVIC, R.D. ADLARD and A.C. BARNES 2009 Differential expression of genes encoding anti-oxidant enzymes in Sydney rock oysters, *Saccostrea glomerata* (Gould) selected for disease resistance. *Fish and Shellfish Immunology* **26**: 799-810.
- GREEN, T.J., B.J. JONES, R.D. ADLARD and A.C. BARNES 2008 Parasites, pathological conditions and mortality in QX resistant and wild caught Sydney rock oysters *Saccostrea glomerata*. *Aquaculture* **280**: 35-38.
- GRIZEL, H. 1985 Étude des recentes épizooties de l'huître plate *Ostrea edulis* Linné et de leur impact sur l'ostreiculture Bretonne. Tesis de Doctorado. Université des Sciences et Techniques du Languedoc.
- GRIZEL, H. and M. HÉRAL 1991 Introduction into France of the Japanese oyster (*Crassostrea gigas*). *Journal du Conseil International pour l'Exploration de la Mer* **47**: 399-403.
- GRIZEL, H., M. COMPS, D. RAGUENNES, Y. LE BORGNE, G. TIGÉ *et al.* 1983 Bilan des essais d'acclimatation d'*Ostrea chilensis* sur les côtes de Bretagne. *Revue des Travaux de l'Institut des Pêches Maritimes* **46** : 209-225.
- GRIZEL, H., E. BACHÈRE, E. MIALHE and G. TIGÉ 1986 Solving parasite-related problems in cultured molluscs. In: M.J. Howell (Ed.) *Parasitology, Quo vadit?* Proc 6th Int Congr Parasitol, Australian Academy of Science, Canberra, pp 301-308.
- GUERRA, R. and P. ESPONDA 2006 Transfection of eggs in the bivalve mollusc *Chamelea gallina* (Bivalvia, Veneridae). *Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology* **38**: 5-10.
- HAND, R.E., J.A. NELL, I.R. SMITH and G.R. MAGUIRE 1998 Studies on triploid oysters in Australia. XI. Survival of diploid and triploid Sydney rock oysters (*Saccostrea commercialis* (Iredale and Roughley)) through outbreaks of winter



- mortality caused by *Mikrocytos roughleyi* infestation. Journal of Shellfish Research **17**: 1129-1135.
- HERSHBERGER, W.K., J.A. PERDUE and J.H. BEATTIE 1984 Genetic selection and systematic breeding in Pacific oyster culture. Aquaculture **39**: 237-245.
- HOFMANN, E.E., E.N. POWELL, J.M. KLINCK and G. SAUNDERS 1995 Modelling diseased oyster populations. I. Modelling *Perkinsus marinus* infections in oysters. Journal of Shellfish Research **14**: 121-151.
- HONG, X.T., L.X. XIANG and J.Z. SHAO 2006 The immunostimulating effect of bacterial genomic DNA on the innate immune responses of bivalve mussel, *Hyriopsis cumingii* Lea. Fish and Shellfish Immunology **21**: 357-364.
- HUVET, A., A. HERPIN, L. DEGREMONT, Y. LABREUCHE and J.F. SAMAIN 2004 The identification of genes from the oyster *Crassostrea gigas* that are differentially expressed in progeny exhibiting opposed susceptibility to summer mortality. Gene **343**: 211-220.
- ICES 2004 ICES code of practice on the introductions and transfers of marine organisms. <http://www.ices.dk/reports/general/2004/icescop2004.pdf>
- KORRINGA, P. 1950 Investigations on shell-disease in the oyster *Ostrea edulis* L. Report V Meeting, ICES, 128: 50-54.
- KRANTZ, G.E. 1994 Chemical inhibition of *Perkinsus marinus* in two *in vitro* culture systems. Journal of Shellfish Research **13**: 131-136.
- LALLIAS, D., I. ARZUL, S. HEURTEBISE, S. FERRAND, B. CHOLLET *et al.* 2008 *Bonamia ostreae*-induced mortalities in one-year old European flat oysters *Ostrea edulis*: experimental infection by cohabitation challenge. Aquatic Living Resources **21**: 423-439
- LALLIAS, D., L. GOMEZ-RAYA, C.S. HALEY, I. ARZUL, S. HEURTEBISE *et al.* 2009 Combining two stage testing and interval mapping strategies to detect QTL for resistance to bonamiosis in the European flat oyster *Ostrea edulis*. Marine Biotechnology **11**: 570-584.
- LANG, R.P., C.J. BAYNE, M.D. CAMARA, C. CUNNINGHAM, M.J. JENNY *et al.* 2009 Transcriptome Profiling of Selectively Bred Pacific Oyster *Crassostrea gigas* Families that Differ in Tolerance of Heat Shock. Marine Biotechnology **11**: 650-668.
- LAUCKNER, G. 1983 Diseases of Mollusca: Bivalvia. En: «Diseases of Marine Animals, Vol.II». Ed. Kinne, O., Biologische Anstalt Helgoland. Hamburg, pp. 477-959
- LE BORGNE, Y. and M. LE PENNEC 1983 Elevage expérimentale de l'huître asiatique *Ostrea denselamellosa* (Lischke). Vie Marine **5**: 23-28.



- LUCKENBACH, M. (Ed.) 2008 The Suminoe oyster, *Crassostrea ariakensis*: biology, ecology and proposed introduction to Chesapeake Bay, USA. *Journal of Shellfish Research*, Special Issue, **27**: 477-623.
- LYNCH, S.A., D.V. ARMITAGE, J. COUGHLAN, M.F. MULCAHY and S.C. CULLOTY 2007 Investigating the possible role of benthic macroinvertebrates and zooplankton in the life cycle of the haplosporidian *Bonamia ostreae*. *Experimental Parasitology* **115**: 359-368.
- MACEY, B.M. and V.E. CONEY 2005 Improved growth rate and disease resistance in farmed *Haliotis midae* through probiotic treatment. *Aquaculture* **245**: 249-261.
- MANN, R., E.M. BURRESON and P.K. BAKER 1991 The decline of the Virginia oyster fishery in Chesapeake Bay: considerations for introduction of a non-endemic species, *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793). *Journal of Shellfish Research* **10**:379-388.
- MARTIN A.G., A. GÉRARD, N. COCHENNEC and A. LANGLADE 1993 Selecting flat oysters, *Ostrea edulis*, for survival against the parasite *Bonamia ostreae*: assessment of the resistance of a first selected generation. En: G. Barnabé, P. Kestemont (Eds.) *Production, Environment and Quality*, Bourdeaux Aquaculture 92. European Aquaculture Society, Ghent, Belgium, pp 547-554 (Spec Publ No. 18)
- MARTÍNEZ-MANZANARES, E., D. CASTRO, J.I. NAVAS, M.L. LÓPEZ-CORTÉS and J.J. BORREGO, 1998 Transmission routes and treatment of brown ring disease affecting Manila clams (*Tapes philippinarum*). *Journal of Shellfish Research* **17**: 1051-1056.
- MATTHIESEN, G.C. and J.P. DAVIS 1992 Observations on growth rate and resistance to MSX (*Haplosporidium nelsoni*) among diploid and triploid eastern oysters (*Crassostrea virginica* Gmeling, 1791) in New England. *Journal of Shellfish Research* **11**: 449-454.
- MCCOLLOUGH, C.B., B.W. ALBRIGHT, G.R. ABBE, L.S. BARKER and C.F. DUNGAN 2007 Acquisition and progression of *Perkinsus marinus* infections by specific-pathogen-free juvenile oysters (*Crassostrea virginica* Gmelin) in a mesohaline Chesapeake Bay tributary. *Journal of Shellfish Research* **26**: 465-477.
- MEYERS, J.A., E.M. BURRESON, B.J. BARBER and R. MANN 1991 Susceptibility of diploid and triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) and eastern oysters, *Crassostrea virginica* (Gmelin, 1791), to *Perkinsus marinus*. *Journal of Shellfish Research* **10**: 433-437.
- MONTES, J., B. FERRO-SOTO, R.F. CONCHAS and A. GUERRA 2003 Determining culture strategies in populations of the European flat oyster, *Ostrea edulis*, affected by bonamiosis. *Aquaculture* **220**: 175-182



- NACIRI-GRAVEN, Y., A.G. MARTIN, J.P. BAUD, T. RENAULT and A. GÉRARD 1998 Selecting the flat oyster *Ostrea edulis* (L.) for survival when infected with the parasite *Bonamia ostreae*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **224**: 91-107.
- NACIRI-GRAVEN, Y., J. HAURE, A. GÉRARD and J.P. BAUD 1999 Comparative growth and mortality of *Bonamia ostreae*-resistant and wild flat oysters, *Ostrea edulis*, in an intensive system. II. Second year of the experiment. *Aquaculture* **171**: 195-208.
- NEL, R., P.S. COETZEE and G. VAN NICKERK 1996 The evaluation of two treatments to reduce mud worm (*Polydora hoplura* Claparède) infestation in commercially reared oysters (*Crassostrea gigas* Thunberg). *Aquaculture* **141**: 31-39.
- NELL, J.A. and R.E. HAND 2003 Evaluation of the progeny of second-generation Sydney rock oyster *Saccostrea glomerata* (Gould, 1850) breeding lines for resistance to QX disease *Marteilia sydneyi*. *Aquaculture* **228**: 27-35.
- NELL, J.A. and B. PERKINS 2006 Evaluation of the progeny of third-generation Sydney rock oyster *Saccostrea glomerata* (Gould, 1850) breeding lines for resistance to QX disease *Marteilia sydneyi* and winter mortality *Bonamia roughleyi*. *Aquatic Research* **37**: 693-700.
- NELL, J.A., I.R. SMITH and C.C. MCPHEE 2000 The Sydney rock oyster *Saccostrea glomerata* (Gould, 1850) breeding programme: progress and goals. *Aquatic Research* **31**: 45-49.
- PANKO, C., V. ENCOMIO, J. BARRETO and A. VOLETY 2008 *In vitro* and *in vivo* evaluation of quinine as potential anti-protozoan for the eastern oyster parasite *Perkinsus marinus*. *Journal of Shellfish Research* **27**: 789-793.
- PASCUAL, M., A.G. MARTIN, E. ZAMPATTI, D. COATANE, J. DESFOSSEZ *et al.* 1991 Testing of the Argentina oyster, *Ostrea puelchana*, in several French oyster farming sites. *International Council for the Exploration of the Sea. Shellfish Committee, CM/K 30*, Copenhagen, Dinamarca.
- PAYNTER, K.T., J.D. GOODWIN, M.E. CHEN, N.J. WARD, M.W. SHERMAN *et al.* 2008 *Crassostrea ariakensis* in Chesapeake Bay: Growth, disease and mortality in shallow subtidal environments. *Journal of Shellfish Research* **27**: 509-515.
- POWELL, E.N., J.M. KLINCK and E.E. HOFMANN 1996 Modelling diseased oyster populations. II. Triggering mechanisms for *Perkinsus marinus* epizootics. *Journal of Shellfish Research* **15**: 141-165.
- POWELL, E.N., J.M. KLINCK, E.E. HOFMANN and S.E. FORD 1997 Varying the timing of oyster transplant: implications for management from simulation studies. *Fisheries Oceanography* **6**: 213-237.



- RAGONE-CALVO, L.M., R.L. WETZEL and E.M. BURRESON 2000 Development and verification of a model for the population dynamics of the protistan parasite, *Perkinsus marinus*, within its host, the eastern oyster, *Crassostrea virginica*, in Chesapeake Bay. *Journal of Shellfish Research* **20**: 231-241.
- RAGONE-CALVO, L.M., G.W. CALVO and E.M. BURRESON 2003 Dual disease resistance in a selectively bred eastern oyster, *Crassostrea virginica*, strain tested in Chesapeake Bay. *Aquaculture* **220**: 69-87
- ROSENBLUM, E.S., T.T. ROBBINS, B.B. SCOTT, S. NELSON and C. JUHASZ *et al.* 2008 Efficacy, tissue distribution, and residue depletion of oxytetracycline in WS-RP infected California red abalone *Haliotis rufescens*. *Aquaculture* **277**: 138-148
- SAMAIN, J.F., L. DÉGREMONT, P. SOLETSCHNIK, J. HAURE, E. BÉDIER *et al.* 2007 Genetically based resistance to summer mortality in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) and its relationship with physiological, immunological characteristics and infection processes. *Aquaculture* **268**: 227-243.
- SAUVAGE, C. J. F. PÉPIN, S. LAPÈGUE, P. BOUDRY and T. RENAULT 2009 Ostreid herpes virus 1 infection in families of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, during a summer mortality outbreak: Differences in viral DNA detection and quantification using real-time PCR. *Virus Research* **142**: 181-187.
- SAUVAGE C., P. BOUDRY, D.J. DE KONING, C.S. HALEY, S. HEURTEBISE *et al.* 2010 QTL for resistance to summer mortality and OsHV-1 load in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *Animal Genetics* **41**:390-399.
- SHATKIN, G., S.E. SHUMWAY and R. HAWES 1997 Considerations regarding the possible introduction of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) to the Gulf of Maine: a review of global experience. *Journal of Shellfish Research* **16**: 463-477.
- SOKOLOVA, I. M., J. D. OLIVER and L.J. LEAMY 2006 An AFLP approach to identify genetic markers associated with resistance to *Vibrio vulnificus* and *Perkinsus marinus* in eastern oysters. *Journal of Shellfish Research* **25**: 95-100.
- SONIAT, T.M. and E. V. KORTRIGHT 1998 Estimating time to critical levels *Perkinsus marinus* in eastern oysters, *Crassostrea virginica*. *Journal of Shellfish Research* **17**: 1071-1080.
- SONIAT, T.M., S.M. RAY, E.V. KORTRIGHT and L. ROBINSON 2006 Dermowatch detects disease hotspots in the Gulf of Mexico. *Journal of Shellfish Research* **25**: 776.
- VAN BANNING, P. 1988 Management strategies to control diseases in the Dutch culture of edible oysters. *American Fisheries Society Special Publication* **18**: 243-245



- VAN BANNING, P. 1991 Observations on bonamiosis in the stock of the European flat oyster, *Ostrea edulis*, in the Netherlands, with special reference to the recent developments in Lake Grevelingen. *Aquaculture* **93**: 205-211.
- VAN HAI, N., N. BULLER and R. FOTEDAR 2009 The use of customised probiotics in the cultivation of western king prawns (*Penaeus latissulcatus* Kishinoue, 1896). *Fish and Shellfish Immunology* **27**: 79-390.
- VILLALBA, A., P.M. DA SILVA and J. FUENTES 2007 La producción de estirpes de *Ostrea edulis* tolerantes a la bonamiosis como solución para el engorde de la ostra plana en Galicia. En: XI Congreso Nacional de Acuicultura, A. Cervoño, A. Guerra, C. Pérez (Eds.), Centro de Investigacións Mariñas, Xunta de Galicia, Vilanova de Arousa. pp: 1499-1504.
- XUE, J., Y. XU, L. JIN, G. LIU, Y. SUN, S. LI and J. ZHANG 2008 Effects of the traditional Chinese medicine on immune responses in abalone, *Haliotis discus hannai* Ino. *Fish and Shellfish Immunology* **24**: 752-758.
- YOSHINO, TP., X.J. WU and H.D. LIU 1998 Transfection and heat-inducible expression of molluscan promoter-luciferase reporter gene constructs in the *Biomphalaria glabrata* embryonic snail cell line. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **59**: 414-420
- YU, Z. N. and X.M. Guo 2006 Identification and mapping of disease-resistance QTLs in the eastern oyster, *Crassostrea virginica* Gmelin. *Aquaculture* **254**: 160-170.

