

# 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**

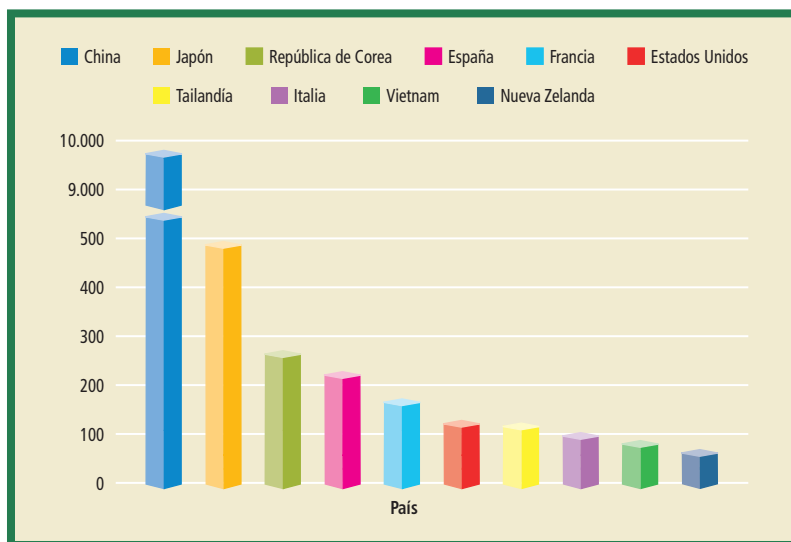
La producción de la acuicultura mundial ha alcanzado recientemente cifras muy elevadas (51,7 millones de toneladas) y un 27% (14,1 millones toneladas) de esta producción pertenece al cultivo de moluscos bivalvos (FAO, 2006). Con respecto a la acuicultura europea, la producción de moluscos bivalvos constituye 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.

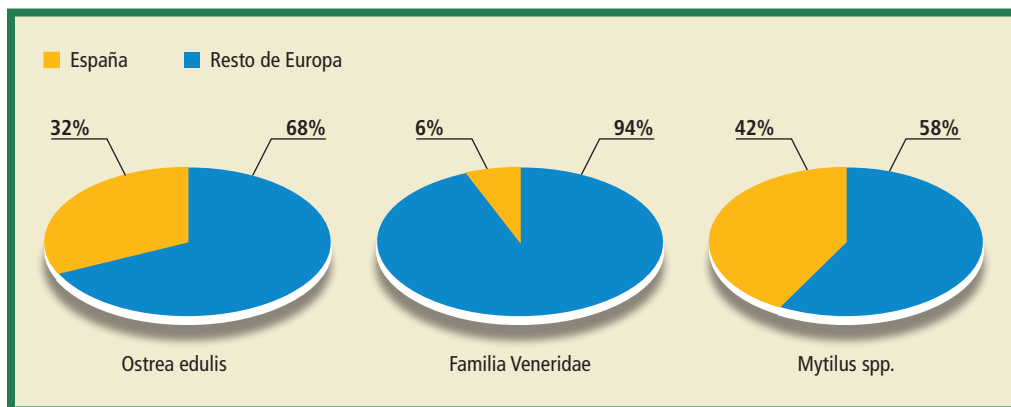
Especies de moluscos	Toneladas
<b>Mejillones</b> <i>Mytilus galloprovincialis</i> <i>Mytilus edulis</i>	247.229,49 t
<b>Berberechos</b> <i>Cerastoderma edule</i> <i>Acanthocardia taculeata</i>	4.784,04 t
<b>Almejas</b> <i>Ruditapes philippinarum</i> <i>Venerupis pullastra</i> <i>Ruditapes decussatus</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
<b>Ostras</b> <i>Ostrea edulis</i> <i>Crassostrea gigas</i>	287,24 t
<b>Solénidos</b>	246,8 t
<b>Otros</b>	43 t
<b>Producción total de bivalvos</b>	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  $\mu\text{m}$ . 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 las 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.