



UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS (C.S.I.C.)
Instituto de Investigaciones Marinas

Diagnóstico de epizootias en moluscos
de interés comercial cultivados en
Galicia. Contribución al conocimiento
patológico de *Haliotis tuberculata* L.

TESIS DOCTORAL
PABLO BALSEIRO VIGO

2008

Instituto de Investigaciones Marinas
Consejo Superior de Investigaciones Científicas (C.S.I.C)
Vigo

Diagnóstico de epizootias en moluscos de interés
comercial cultivados en Galicia. Contribución al
conocimiento patológico de *Haliotis tuberculata* L.

Memoria que presenta **Pablo Balseiro Vigo** para
optar al grado de Doctor en Biología. **Santiago de
Compostela, 2008**

Dr. Antonio Figueras Huerta, Profesor de Investigación del Instituto de Investigaciones Marinas de Vigo (C.S.I.C.) y **Dra. Beatriz Novoa García**, Investigador Científico del Instituto de Investigaciones Marinas de Vigo (C.S.I.C),

INFORMAN, que la presente Tesis Doctoral titulada **“Diagnóstico de epizootias en moluscos de interés comercial cultivados en Galicia. Contribución al conocimiento patológico de *Haliotis tuberculata* L.”** que presenta Don Pablo Balseiro Vigo para optar al grado de Doctor en Biología, ha sido realizada bajo nuestra dirección, y considerando que se haya concluida, autorizamos su presentación para que pueda ser juzgada por el tribunal correspondiente.

Y para que conste, firmamos el presente informe,
En Vigo, a 11 de Marzo de 2008

Fdo: Antonio Figueras Huerta

Fdo: Beatriz Novoa García

El trabajo realizado ha sido posible tanto gracias a la financiación del proyecto de investigación de la Xunta de Galicia “Validación de la Técnica de PCR para el diagnóstico de los parásitos *Bonamia ostreae*, *Perkinsus atlanticus* y *Marteilia refringens* en moluscos bivalvos de interés comercial cultivados en Galicia” (Código: PGIDT01MAR40203PR), a las empresas Ocean Marítimo S.L. y Gómez y Ordóñez S.L. y al apoyo de la Secretaría General de Sanidad Animal (Ministerio de Agricultura) como a la adjudicación de una beca predoctoral I3P para el desarrollo de Tesis Doctorales en líneas de Investigación con Interés para el Sector Industrial y a la Xunta de Galicia por la concesión de una ayuda para la realización de una estancia en los E.E.U.U.

AGRADECIMIENTOS

Agradecimientos

Es imposible en tan poco espacio agradecer a toda la gente el apoyo recibido a lo largo de estos años. Pero es mi deber intentarlo.

En primer lugar, me gustaría agradecer al Dr. Antonio Figueras y a la Dra. Beatriz Novoa, mis padres científicos, la confianza depositada en mi persona y el apoyo demostrado a lo largo de todos estos años, guiándome y animándome en mi trabajo. Espero haber sido capaz de devolver al menos una parte de este respaldo.

A todos los compañeros del grupo de Patología, pasados y presentes, por aportar su colaboración y apoyo. En especial, tengo que agradecer a Javier su paciencia con mis múltiples interrupciones “dando la joda” con el dichoso microscopio. A Álex por todos los momentos de apoyo y de búsqueda de micrófonos. A Iván por darme otra visión de la ciencia. Y por el servicio de taxi. A Jorge, por su paciencia y aguante conmigo fuera del laboratorio, que tiene especial mérito. Y por el servicio de taxi. A Marimar, por su compañerismo y alegría: ¡Mantén el ánimo! ¡Ah! ¡Y por el servicio de taxi! A Sonia por ayudarme a mantenerme en el suelo y por su disposición permanente. A Dorita, por su energía y ánimo continuo. A Eva y a Vero por todos los buenos momentos. A Bego, por todos esos ratos solucionando el mundo; ¡como si fuera tan fácil! A toda la gente que me dejó en el tintero, por su apoyo y compañerismo. A Laura, María, Ariana, las dos Caminos, Raquel, Luisa, Carolina, Erica, Paola, Isa, Aitor, Rubén, José Ramón...

A todo el personal del Instituto, y muy especialmente a Marigel, por ser capaz de encontrar cualquier cosa que se haya escrito en un papel en cualquier lugar del mundo, en formato electrónico, y además disfrutar con ello, a Juan Luis, siempre dispuesto a socorrerme en cuanto el ordenador se volvía más cabezón que yo y a Susana, por todas las muestras secuenciadas.

A toda la gente del Virginia Institute of Marine Science por haberme recibido de una forma tan acogedora. Al Dr. Gene Burreson y a la Dra. Kim Reece por su gentileza y cooperación. Y especialmente a Ryan, Corinne, Lionel y sobre todo a Jens y Nettan, por todos los buenos momentos en tierras lejanas. A la gente del Departamento de Biología de la Universidad de Trieste, especialmente al Dr. Alberto Pallavicini, por acogerme y regalarme una gran experiencia. Y por el café.

A mi pandilla de Ferrol, que han aportado mucho más de lo que piensan a este trabajo. Siempre fueron capaces de recargarme las pilas en cuanto lo necesitaba. ¡Gracias peña!

A mi familia por darme ánimos para acabar el trabajo en los malos momentos; a Luis, Ana y Miguel, y muy especialmente a mi hermana Pili y el resto de la familia Gil Balseiro: Pablo, Cristina, Álex y la pequeña Sara, por darme mi primera beca de mi investigación. Sin ella no habría llegado a escribir estas líneas. A mis padres, que me han transmitido mucho más que apoyo durante muchos más años de los que ha durado esta tesis y que con su esfuerzo me han permitido dedicarme a lo que más me gusta.

Quiero agradecer especialmente la paciencia y el apoyo recibidos de Irma y del pequeño Roi. Nadie más que yo sabe hasta qué punto esta tesis es obra suya. Siempre han estado cerca, tanto a decenas como a miles de kilómetros, y su empuje me ha llegado día a día. Espero poder compensarles de alguna forma y pasar juntos más tiempo en nuestra próxima etapa.

Por último, quiero disculparme y dar las gracias a todo aquél que de alguna manera se sienta identificado con este trabajo y no esté en estas líneas. Es mucha la gente que me ha apoyado a lo largo de estos cinco años y es imposible citarlos a todos.

ABREVIATURAS Y SIGLAS

Abreviaturas y siglas

A: Adenina

ADH: Arginina dihidrolasa

ARNr: ARN ribosómico

ARNt: Ácido ribonucleico de transferencia

C: Citosina

CNI: Siglas en inglés de *Close Neighbour Interchange* (Intercambio con el vecino más próximo)

dNTP: Desoxinucleótido trifosfato

EDTA: Acrónimo de etilendiaminotetraacético

ETS: Siglas en inglés de *External Transcribed Spacer* (Espaciador transcrito externo)

G: Guanina

h: Horas

IGS: Siglas en inglés de *InterGenic Spacer* (espaciador intergénico)

IPTG: Isopropiltio- β -galactósido

ITS: Siglas en inglés de *Internal Transcribed Spacers* (Espaciadores transcritos internos)

KOH: Hidróxido de potasio

min: Minuto

NaCl: Cloruro de sodio

n. sp.: Nueva especie

NTS: Siglas en inglés de *Non Transcribed Spacer* (Espaciador no transcrito)

O.I.E: Siglas en francés de la *Office International des Epizooties* (oficina internacional de las epizootias)

pb: Pares de bases

PCR: Siglas en inglés de *Polymerase Chain Reaction* (Reacción en cadena de la polimerasa)

RFLP: Siglas en inglés de *Restriction Fragment Length Polymorphism* (Polimorfismo de Longitud de Fragmentos de Restricción)

RFTM: Siglas en inglés de *Ray's Fluid Thioglicollate Medium* (medio tioglicolato de Ray)

S: Svedberg. Unidad de medida del coeficiente de sedimentación empleada en ultracentrifugación no recogida en el Sistema Internacional. Equivale a 10^{-13} s

SEM: Acrónimo en inglés de *Scanning Electron Microscopy* (microscopía electrónica de barrido)

T: Timina

TAE: Acrónimo de tampón Tris-Acetato EDTA

TCBS: Siglas en inglés de agar *Thiosulfate Citrate Bile Sucrose* (tiosulfato citrato bilis sucrosa)

TEM: Acrónimo en inglés de *Transmission Electron Microscopy* (Microscopía Electrónica de Transmisión)

T_m: Temperatura de fusión (en inglés *melting temperature*)

TSA: Agar tristona soja

TSB: Caldo soja triptona

VPN: Valor Predictivo Negativo

VPP: Valor Predictivo Positivo

X-Gal: 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactósido

ÍNDICE

Índice

Agradecimientos _____	ix
Abreviaturas y siglas _____	xv
Índice _____	xix
Introducción General _____	3
- Principales enfermedades de moluscos _____	7
o Enfermedades causadas por virus _____	7
▪ Iridovirus _____	8
▪ Herpesvirus _____	8
▪ Picornavirus _____	9
▪ Papovavirus _____	10
▪ Otros virus _____	11
o Enfermedades causadas por bacterias _____	12
▪ Cianobacterias _____	12
▪ Órdenes Rickettsiales y Chlamydiales _____	13
▪ Micoplasmas _____	15
▪ Bacterias Gram negativas _____	16
▪ Bacterias Gram positivas _____	20
o Enfermedades causadas por protozoos _____	21
▪ Phylum Haplosporidia _____	21
▪ Phylum Microsporidia _____	29
▪ Phylum Apicomplexa _____	30
▪ Phylum Ciliata _____	32
▪ Phylum Dinoflagellata _____	33
▪ Phylum Labyrinthomorpha _____	38
▪ Phylum Zoomastigina _____	38
▪ Phylum Paramyxia _____	38
▪ <i>Protozoa incertae sedis</i> _____	42
o Enfermedades causadas por hongos _____	43
o Enfermedades causadas por metazoos _____	44
▪ Phylum Porifera _____	44
▪ Phylum Platyhelminthes _____	45
▪ Phylum Annelida _____	45
▪ Phylum Arthropoda _____	46
Objetivos _____	49
Capítulo 1: Avances en el diagnóstico de las principales enfermedades de moluscos presentes en Galicia _____	53
o Introducción _____	53
o Materiales y métodos _____	58

▪	Animales y obtención de muestras_____	58
▪	Análisis citológico_____	60
▪	Cultivo en medio RFTM_____	60
▪	Análisis histopatológico_____	61
▪	Aislamiento de ADN y análisis por PCR_____	62
-	Bonamiosis_____	62
-	Perkinsosis_____	63
-	Marteiliosis_____	64
▪	Clonaje y secuenciación del ADN_____	65
▪	Hibridación <i>in situ</i> _____	65
▪	Análisis epizootiológicos_____	66
○	Resultados_____	69
▪	Bonamiosis_____	69
•	Análisis citológico_____	69
•	Análisis histopatológico_____	70
•	Análisis por PCR_____	71
•	Hibridación <i>in situ</i> _____	72
•	Análisis epizootiológicos_____	73
▪	Perkinsosis_____	74
•	Cultivo en medio RFTM_____	74
•	Análisis histopatológico_____	75
•	Análisis por PCR_____	77
•	Hibridación <i>in situ</i> _____	78
•	Análisis epizootiológicos_____	78
▪	Marteiliosis_____	83
•	Análisis citológico_____	83
•	Análisis histopatológico_____	83
•	Análisis por PCR_____	85
•	Análisis epizootiológicos_____	86
○	Discusión_____	89
Capítulo 2: Epizootiología molecular de las principales enfermedades de moluscos bivalvos presentes en Galicia_____		103
○	Introducción_____	103
▪	Género <i>Bonamia</i> _____	104
▪	Género <i>Perkinsus</i> _____	107
▪	Género <i>Marteilia</i> _____	109
▪	Espaciadores Transcritos Internos_____	111
○	Materiales y métodos_____	112
▪	Muestras y aislamiento de ADN_____	112
▪	Amplificación de las regiones <i>ITS</i> _____	114
▪	Clonaje y secuenciación del ADN_____	115
▪	Análisis filogenético_____	117

▪	PCR-RFLP _____	120
○	Resultados _____	122
▪	Bonamiosis _____	122
▪	Perkinsosis _____	129
▪	Marteiliosis _____	138
○	Discusión _____	147
Capítulo 3: Empleo de técnicas de biología molecular en el estudio de la patología de cultivos emergentes: Oreja de Mar _____ 159		
○	Introducción _____	159
○	Materiales y métodos _____	161
▪	Animales _____	161
▪	Aislamiento bacteriano _____	161
▪	Cultivo en medio RFTM _____	164
▪	Infecciones experimentales _____	165
▪	Histopatología _____	166
▪	Análisis ultraestructural _____	166
▪	Caracterización molecular _____	168
•	<i>Candidatus Xenohalio</i> tis californiensis _____	169
•	Bacterias _____	170
•	Haplosporidio _____	171
▪	Clonaje y secuenciación del ADN _____	175
▪	Análisis filogenético _____	176
○	Resultados _____	177
▪	Apariencia externa _____	177
▪	Aislamiento bacteriano _____	178
▪	Cultivo en medio RFTM _____	179
▪	Infecciones experimentales _____	180
▪	Histopatología _____	181
▪	Análisis ultraestructural _____	189
▪	Caracterización molecular _____	194
•	<i>Candidatus Xenohalio</i> tis californiensis _____	194
•	Bacterias _____	196
•	Haplosporidio _____	202
▪	Epizootiología de la infección _____	206
▪	Descripción de <i>Haplosporidium montforti</i> n. sp. _____	207
○	Discusión _____	208
Conclusiones finales _____ 229		
Publicaciones derivadas de la presente tesis doctoral _____ 235		
Bibliografía _____ 239		
Apéndice _____ 305		
A. Procesado citológico _____ 305		

B. Incubación en medio tioglicolato (Ray's Fluid Thioglycollate Medium, RFTM)	305
C. Procesado histológico de tejidos de moluscos	306
D. Cuantificación de ADN	309
E. Clonación de secuencias	310
F. Protocolo de Hibridación <i>in situ</i>	311
G. Secuencias y códigos de acceso	313

INTRODUCCIÓN GENERAL

Introducción General

Acuicultura y patología

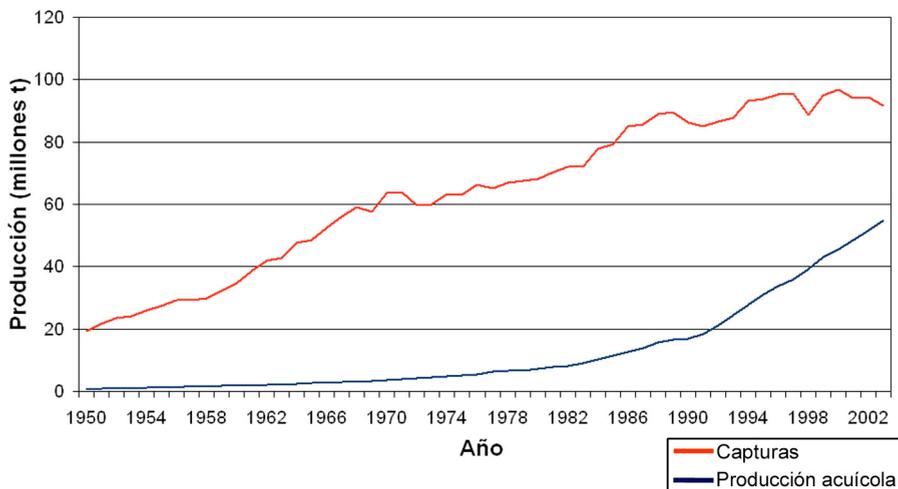
La acuicultura es una ciencia establecida ya en tiempos antiguos, especialmente en Asia, el antiguo Egipto y Centroeuropa. Existen textos describiendo mecanismos de acuicultura comercial en China en el año 500 a. de C. (Pillay, 1997; Castell, 2000).

Se cree que la primera especie acuícola cultivada fue la carpa común *Cyprinus carpio* Linnaeus, 1758 en China, si bien en Egipto existen representaciones de tilapias en un estanque datadas alrededor del año 2500 a. de C. (Pillay, 1997). En Europa, el cultivo de la carpa fue iniciado por los romanos, y mantenido posteriormente en monasterios durante la baja Edad Media (Balon, 1995; Hoffman, 1995). Las especies cultivadas durante estos años eran especies de agua dulce que surtían de pescado fresco a los altos estamentos de las zonas más alejadas de la costa. La ostricultura se piensa que es la forma más antigua de cultivo de moluscos, y de acuicultura costera, y que ya se desarrollaba tanto en Japón como en Grecia o Roma hace más de dos mil años (Pillay, 1997).

En los últimos años, debido al estancamiento de las capturas, la acuicultura se ha desarrollado como una forma de mantener el sustento para la creciente población. En este sentido, la mayor parte de la acuicultura del planeta se desarrolla con el objetivo primero de producir alimento para el ser humano, aunque otros usos de la acuicultura pueden ser la repoblación de ecosistemas, la obtención de subproductos para usos farmacéuticos y/o industriales o la

generación de bienes que poco tienen que ver con la alimentación, como el caso de las ostras perlíferas (Pillay, 1997). En muchos países las explotaciones funcionan bajo régimen de cooperativa con el fin de mejorar las condiciones de vida de las poblaciones rurales (Pillay, 1997). Es el caso de la mayoría de las explotaciones de bivalvos que en Galicia son manejadas por cofradías de mariscadores.

Figura I.1: Producción de alimentos procedentes del mar a nivel mundial desde 1950. Se representa la producción debida a la captura y la debida a la acuicultura por separado. La producción se mide en millones de toneladas. Los datos fueron obtenidos en la base de datos de cantidades de producción de acuicultura *FAO Fishstat* (F.A.O., 2003).



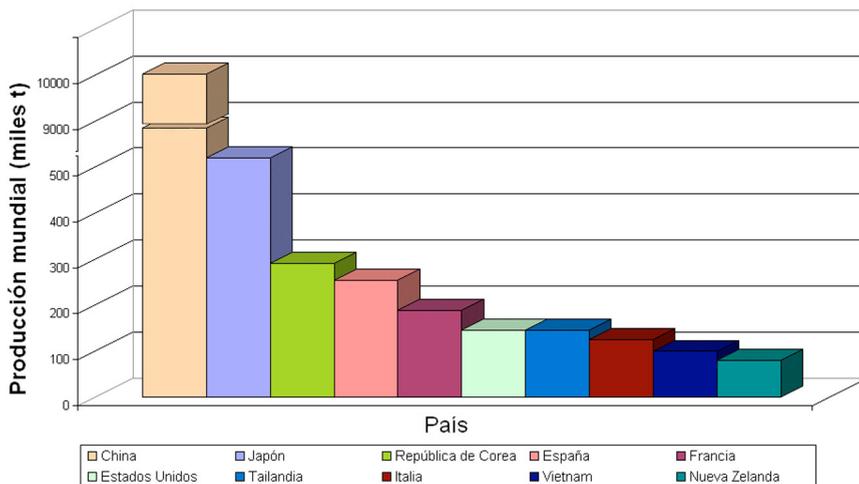
La figura I.1 muestra el desarrollo de la producción marina de los últimos 50 años, tanto de la captura y recolección como de la acuicultura. En esta gráfica podemos observar cómo a pesar de los grandes avances técnicos experimentados en la segunda mitad del siglo XX, el ritmo de capturas ha crecido poco y de manera lineal, incluso con frecuentes caídas. Solo la década de los 50 y 60 presentaron importantes crecimientos, principalmente por la aparición de las fibras sintéticas para la fabricación de redes, de

menor peso y mayor resistencia. La acuicultura sin embargo está a punto de alcanzar los 60 millones de Tm en todo el mundo y ha venido desarrollando un crecimiento exponencial en los últimos 15 años. La implicación de un mayor número de países en proyectos de acuicultura, junto con las mejoras científicas y técnicas y la diversificación de cultivos parecen encontrarse entre las causas de este espectacular crecimiento. La figura I.2 presenta los principales productores mundiales de moluscos en el año 2003.

Una de las ramas de conocimiento de mayor interés en la acuicultura es la patología. 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 el estrés del animal y de la facilidad para la transmisión del agente patógeno. Es importante limitar la aparición de las enfermedades o controlar su desarrollo en las explotaciones acuícolas, 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 limiten 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 puede originar la disminución del valor comercial del mismo como consecuencia de la pérdida de condición del molusco (relación del peso de los tejidos blandos frente a la concha), de la tasa de crecimiento y en último caso por pérdida de aceptación de los consumidores a causa de las malformaciones provocadas.

Figura I.2: Principales productores mundiales de moluscos en el año 2003. 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., 2003).



En ocasiones, la aparición de una enfermedad en un cultivo es debida a la importación de animales procedentes de otro lugar del mundo, bien a causa de intentos de restaurar un cultivo disminuído por una enfermedad o para 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 el caso de la introducción del parásito *Perkinsus olseni* Lester et Davis, 1981 en las costas gallegas junto con ejemplares de almeja japonesa *Ruditapes philippinarum* (Adams et Reeve, 1850), de valor comercial ligeramente menor a la autóctona almeja fina *Ruditapes decussatus* (Linnaeus, 1758), pero de mayor resistencia y superior tasa de crecimiento.

Principales enfermedades de moluscos

Enfermedades causadas por virus

Los virus son posiblemente el grupo biológico menos estudiado en la patología de moluscos hasta la fecha. Sin embargo, esta situación es debida principalmente a limitaciones técnicas como la inexistencia de líneas celulares de moluscos que permitan la replicación *in vitro* de estos agentes. Los estudios sobre virus causantes de enfermedades en moluscos son en su mayoría de tipo morfológico y epizootiológico. Sin embargo, es importante destacar también la presencia de virus no causantes de patologías en moluscos, pero sí en humanos, y que son acumulados en los bivalvos debido a su actividad filtradora, de donde son muy difícilmente eliminables por depuración (Hay y Scotti, 1986). Estos virus también pueden ser causa de pérdidas económicas para el sector en caso de no ser correctamente controlados (Elston, 1997).

Los principales grupos de virus causantes de enfermedades en moluscos han sido recientemente revisados por Renault y Novoa, (2004):

Iridovirus

Son posiblemente el grupo vírico de mayor importancia en patología de moluscos. Dos iridovirus diferentes fueron causa de la práctica extinción de la ostra portuguesa *Crassostrea angulata* (Lamarck, 1819) en aguas francesas. Esta ostra sufrió mortalidades recurrentes en los últimos años de la década de los 60, debidas a la enfermedad de las branquias, *Maladie des branches* (Marteil, 1976), causada por el virus de la necrosis branquial *Gill Necrosis Virus* (GNV). También se detectó un virus similar en las branquias de *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) importada a Francia desde Japón, Corea y Canadá (Comps, 1970, 1972; Comps y Duthoit, 1979). Más mortalidades de la ostra portuguesa fueron originadas por un iridovirus denominado virus de la infección del hemocito, *Hemocyte Infection Virus* (HIV) (Comps y Duthoit, 1976; Comps, 1978). Este virus también afectó a *Crassostrea gigas* (Comps y Bonami, 1977). El virus de la enfermedad del velo de la ostra, *Oyster velar virus disease*, es un iridovirus que causa la necrosis del velo y manto de las larvas pedivelígeras de *Crassostrea gigas* con la consiguiente mortalidad en la costa Oeste de los E.E.U.U. Los iridovirus también se han observado en el citoplasma de células de riñón de cefalópodos (Gregory *et al.*, 2006) y en hemocitos de gasterópodos terrestres (Barthe *et al.*, 1984).

Herpesvirus

La primera descripción de una epizootiología ligada a la presencia de un herpesvirus se refiere a la ostra americana *Crassostrea virginica* (Gmelin, 1791) (Farley *et al.*, 1972). Recientemente, se han asociado mortalidades de larvas de la ostra *Crassostrea gigas* en Francia, Nueva Zelanda y California a la presencia de partículas

víricas pertenecientes a la familia Herpesviridae (Hine *et al.*, 1992; Nicolas *et al.*, 1992). Se ha definido una nueva clase de herpesvirus para estos patógenos de moluscos (Davison *et al.*, 2005). La patología es recurrente, apareciendo en los meses de verano en años consecutivos, y parece estar ligada a la temperatura (Renault *et al.*, 1995). También se han observado herpesvirus ligados a mortalidades de ostra japonesa *Crassostrea gigas* en las costas de California (E.E.U.U.) y en Baja California (México), siendo la patología causada similar a la producida por el GNV en *Crassostrea angulata* (Renault y Novoa, 2004; Vásquez-Yeomans *et al.*, 2004; Friedman *et al.*, 2005b; Burge *et al.*, 2006; Burge *et al.*, 2007). Además, se han detectado herpesvirus en la ostra plana *Ostrea edulis* Linnaeus, 1758 (Comps y Cochenec, 1993; da Silva *et al.*, 2005). La replicación de herpesvirus en ostras también se ha estudiado en Australia en adultos de *Ostrea angasi* Sowerby, 1871 (Hine y Thorne, 1997), y en larvas de *Ostrea chilensis* Philippi in Kuster, 1844 en Nueva Zelanda (Hine *et al.*, 1998), y de *Pecten maximus* (Linnaeus, 1758) y *Ruditapes philippinarum* en Francia (Arzul *et al.*, 2001a; Renault *et al.*, 2001). Todos estos herpesvirus pertenecen posiblemente a la misma especie (Arzul *et al.*, 2001b).

La presencia de un virus de tipo herpesvirus que ataca al sistema nervioso se ha vinculado a fuertes mortalidades de la especie *Haliotis diversicolor supertexta* Lischke, 1870 en Taiwán (Chang *et al.*, 2005).

Picornavirus

En *Mytilus edulis* Linnaeus, 1758 de Dinamarca se detectan lesiones asociadas a pequeñas partículas víricas no envueltas de 27

nm de diámetro presentes en el citoplasma de los hemocitos (Rasmussen, 1986b; 1986a). En Nueva Zelanda, se han relacionado mortalidades de hasta el 100% en el mejillón *Perna canaliculus* (Martyn, 1784) a la presencia de un virus (Jones *et al.*, 1996), presentando además *Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819 de la misma zona daños histológicos similares, consistentes principalmente en importantes infiltraciones y necrosis de las células basales, intersticiales y epiteliales de la glándula digestiva. El pectínido *Pecten novaezelandiae* Reeve, 1852 y la almeja *Paphies ventricosum* (Gray, 1843), también en Nueva Zelanda, presentan un picornavirus en el epitelio de la glándula digestiva (Hine y Wesney, 1997).

Se han detectado también virus similares causando necrosis muscular y mortalidades de la ostra perlífera *Pinctada fucata martensii* (Dunker, 1872) en Japón y de *Pinctada margaritifera* (Linnaeus, 1758) en la Polinesia Francesa (Comps *et al.*, 1999; Miyazaki *et al.*, 1999). La almeja fina *Ruditapes decussatus* en Francia y Galicia ha sufrido mortalidades relacionadas con la presencia de presuntos picornavirus en el citoplasma de las células del tejido conectivo (Novoa y Figueras, 2000).

Papovavirus

Se han encontrado virus de tipo papovavirus en la gónada de la ostra americana, *Crassostrea virginica*, originando una hipertrofia masiva de gónadas y gametocitos en la costa Este de Canadá y de E.E.U.U. (Farley, 1978; McGladdery y Stephenson, 1993; Winstead y Courtney, 2003). También se encuentran en otras especies diversas de bivalvos (Elston, 1997). La ostra perlífera *Pinctada maxima* Jameson, 1901 presenta una hipertrofia del epitelio de los palpos labiales ligada

a un virus de este tipo (Norton *et al.*, 1993b). *Crassostrea gigas* de Corea del Sur manifiesta hipertrofia de la gónada ligada a estos virus (Choi *et al.*, 2004). Esta misma especie en Francia presenta lesiones histológicas parecidas a las de la ovocistis (hipertrofia de oocitos) de *Crassostrea virginica* (Winstead y Courtney, 2003). Recientemente, se han detectado en las costas mediterráneas de España partículas víricas pertenecientes a este grupo causando una infección sistémica en almeja fina *Ruditapes decussatus* afectada de perkinsosis (Montes *et al.*, 2001).

Otros virus

Los reovirus que se han observado en moluscos no se han asociado a ninguna mortalidad (Lupiani *et al.*, 1995). En *Crassostrea virginica* se ha descubierto un virus cuyas características morfológicas y serológicas lo agrupan con los reovirus (Meyers, 1979; Meyers y Hirai, 1980). Se han observado también en *Meretrix lusoria* (Röding, 1798) y *Crassostrea gigas* (Lupiani *et al.*, 1995). Además, se han encontrado birnavirus en bivalvos de Europa, Corea y Taiwán (Underwood *et al.*, 1977; Hill *et al.*, 1982; Lo *et al.*, 1988; Kitamura *et al.*, 2007). La almeja *Mya arenaria* Linnaeus, 1758 presenta infecciones con virus pertenecientes a la familia retroviridae, que han sido aislados de hemocitos neoplásicos (Oprandy *et al.*, 1981). Un virus, posiblemente de la familia retroviridae, parece ser la causa de la atrofia muscular en juveniles de la oreja de mar *Haliotis discus* Reeve, 1846 (Otsu y Sasaki, 1997; Nakatsugawa *et al.*, 1999; Bower y McGladdery, 2003). Se han detectado posibles alfavirus (togavirus) en individuos aparentemente sanos de liebre de mar *Aplysia californica* Cooper, 1863 (Prince, 2003).

Enfermedades causadas por bacterias

Muchas de las enfermedades de bivalvos atribuidas a bacterias se inician mediante lesiones u otras formas de estrés (Elston, 1989), y en general son consideradas como de menor importancia para el acuicultor que, por ejemplo, las causadas por protozoos. La mayoría de las enfermedades bacterianas en moluscos se han descrito en estadios larvarios y han sido asociadas con altas mortalidades en los criaderos (Lauckner, 1983; Sindermann, 1990), pero existen también importantes enfermedades que afectan a adultos. Una correcta higiene de las instalaciones puede ser el método de control más eficaz para las enfermedades de este tipo.

La principal dificultad a la hora de caracterizar una bacteria como causante de enfermedad en un molusco bivalvo se debe a la acumulación por parte del molusco de gran cantidad de microbiota comensal debido a su naturaleza filtradora. Especies de los géneros *Vibrio* Pacini, 1854 y *Pseudomonas* Migula, 1894 se encuentran frecuentemente en moluscos sin provocar enfermedad. Incluso algunos bivalvos, como los mitílidos, son capaces de alimentarse de bacterias (Lauckner, 1983).

Cianobacterias

Diferentes especies de cianobacterias filamentosas (*Plectonema terebrans* Bornet et Flahault, 1892, *Hyella caespitosa* Bornet et Flahault, 1888, *Mastigocoleus testarum* Lagerheim, 1888, *Mastigocoleus* sp. y *Pleurocapsa* sp.) provocan el debilitamiento de la concha de diferentes especies de mitílidos como *Mytilus galloprovincialis*, *Perna perna* (Linnaeus, 1758), *Choromytilus meridionalis* (Krauss, 1848) y *Aulacomya*

ater (Molina, 1782) en las costas de Sudáfrica y Sierra Leona. Estas bacterias endolíticas producen microgalerías, que cuando son abundantes, pueden comprometer la resistencia de la concha a los depredadores o al efecto del oleaje (Webb y Korrubel, 1994; Kaehler, 1999; Kaehler y McQuaid, 1999; Bower y McGladdery, 2003).

Órdenes Rickettsiales y Chlamydiales

Las bacterias de los órdenes Rickettsiales y Chlamydiales no son diferenciables por su aspecto al microscopio óptico con la tinción habitual de hematoxilina y eosina. Se encuentran como acúmulos de bacterias intracelulares, densamente empaquetadas, y se detectan principalmente en el epitelio de las branquias, sifones y manto (Paillard *et al.*, 2004).

Debido a su naturaleza intracelular, estos organismos solo son cultivables en líneas celulares, que como ya se ha dicho, no han sido desarrolladas en el caso de los moluscos bivalvos. Debido a este motivo, la caracterización de los organismos de este grupo es, en la mayoría de las ocasiones, incompleta, apareciendo en la literatura frecuentemente términos como *Rickettsia-like* y *Chamydia-like*, si bien las similitudes entre los dos géneros son de naturaleza homoplásica, no filogenética. La homoplasia es el cambio o conjunto de cambios evolutivos en dos organismos no emparentados y que provoca que ambos organismos presenten el mismo carácter. La convergencia evolutiva es un tipo frecuente de homoplasia.

Se han encontrado organismos de este tipo en la mayoría de las especies de bivalvos analizadas en diferentes partes del mundo si bien no se han vinculado a ninguna mortalidad (Comps *et al.*, 1977;

Comps *et al.*, 1979; Figueras y Villalba, 1988; Bower y McGladdery, 2003). Habitualmente se encuentran formando inclusiones intracelulares basófilas en forma de bola en las células del epitelio branquial y en la glándula digestiva. Se ha vinculado la presencia de organismos tipo riquetsia a la mortalidad masiva de vieiras *Pecten maximus* (Figueras y Villalba, 1988) y a la de *Crassostrea gigas* en Francia (Renault y Cochenne, 1995).

También se han vinculado mortalidades en larvas y juveniles post-metamórficos del pectínido *Argopecten irradians* (Dodge, 1952) a la presencia de inclusiones de bacterias de tipo clamidia (Leibovitz, 1989).

Se ha encontrado un organismo de tipo riquetsial en las branquias de *Crassostrea gigas* en la costa Atlántica de España, caracterizado por su gran tamaño y su carácter extracelular, aunque tampoco se ha relacionado con mortalidades (Azevedo y Villalba, 1991).

Un organismo intranuclear tipo riquetsia es la causa de importantes mortalidades en la navaja *Siliqua patula* (Dixon, 1789) en la costa pacífica de Norteamérica (Oregón y la Columbia Británica) (Elston, 1986; Olson y Pierce, 1988; Bower y McGladdery, 2003). Esta bacteria se sitúa en los núcleos de las células epiteliales de la branquia, produciendo hiperplasia en dichas células, lo que se traduce en nódulos visibles a simple vista.

Una riquetsia, descrita con el nombre de *Candidatus Xenohalotia californiensis* es la causa de una enfermedad conocida como el Síndrome del Marchitamiento, *Withering Syndrome*, y es la

causa de importantes mortalidades de oreja de mar principalmente de las especies negra y roja, *Haliotis cracherodii* Leach, 1814 y *Haliotis rufescens* Swainson, 1822, en las costas pacíficas de E.E.U.U. y México, aunque se ha detectado en otras especies (Haaker *et al.*, 1992; Friedman *et al.*, 2000a; Moore *et al.*, 2000a; 2000b; Álvarez-Tinajero *et al.*, 2002; Moore *et al.*, 2003). El término *Candidatus* indica la descripción parcial de esta bacteria, ya que al no ser cultivable, no ha podido ser caracterizada bioquímica y serológicamente (Murray y Stackebrandt, 1995). Este término no tiene valor de taxón.

Las orejas de mar afectadas muestran reabsorción de la musculatura del pie debido al estado de ayuno inducido por la infección del epitelio digestivo por parte de la riquetsia. Al carecer de musculatura, son incapaces de anclarse correctamente al sustrato, siendo más susceptibles a los ataques de los depredadores o a los efectos del oleaje. Además, ven limitada su capacidad de alimentarse ya que estos animales son ramoneadores y necesitan del anclaje al sustrato (Kismohandaka *et al.*, 1995; Moore *et al.*, 2000a; Moore *et al.*, 2001).

Micoplasmas

Los micoplasmas son un grupo de microorganismos de muy pequeño tamaño (inferior a 1 μm), parásitos intracelulares obligados (no cultivables), carentes de pared celular y con una membrana plasmática modificada respecto a las demás bacterias. Un micoplasma presente en las células epiteliales de las branquias se ha asociado a una importante mortalidad de berberecho *Cerastoderma edule* (Linnaeus, 1758) en la costa atlántica de Portugal (Azevedo, 1993).

Bacterias Gram negativas

Las bacterias pertenecientes al género *Vibrio* son el grupo de bacterias más importantes que afectan a moluscos. El progresivo calentamiento del planeta se encuentra en el origen de muchas enfermedades emergentes de origen bacteriano, enfermedades causadas por diversas especies de bacterias que recientemente se han revelado como causas de mortalidad aunque anteriormente se consideraban microbiota normal (Harvell *et al.*, 1999; Paillard *et al.*, 2004). En general, las enfermedades bacterianas son más importantes en larvas cultivadas en criaderos que en moluscos adultos, ya que las larvas se encuentran en alta densidad y en condiciones estresantes en estas explotaciones comerciales. La habilidad de las especies del género *Vibrio* para degradar la xantina y fermentar la glucosa se ha relacionado con su viruencia en larvas de bivalvos (Jeffries, 1982).

La necrosis bacilar en *Crassostrea gigas* y *Mercenaria mercenaria* (Linnaeus, 1758) está causada por diferentes especies bacterianas, generalmente *Vibrio* spp., afectando a larvas y juveniles de multitud de moluscos normalmente en criaderos (Tubiash *et al.*, 1965; Elston y Leibovitz, 1980). Se caracteriza por la pérdida de células y cilios del epitelio del velo, crecimiento bacteriano alrededor de la cara interna de la concha y manto y comportamiento natatorio anormal de la larva (Paillard *et al.*, 2004). *Vibrio tubiashii* Hada *et al.*, 1984 es la causa de la necrosis bacilar en larvas de *Ostrea edulis*, *Crassostrea gigas* y *Crassostrea virginica* (Tubiash *et al.*, 1965; Hada *et al.*, 1984; Jeffries, 1984; Lodeiros *et al.*, 1987). *Vibrio anguillarum* Bergeman, 1909 afecta a larvas de *Crassostrea virginica*, *Mercenaria mercenaria*, *Ostrea edulis* (Tubiash *et al.*, 1970; DiSalvo *et al.*, 1978; Lodeiros *et al.*, 1987) y se ha

descrito que es capaz de inhibir la capacidad de filtración en *Mytilus edulis* (McHenery y Birkbeck, 1986). También afecta a larvas y juveniles de diferentes especies de oreja de mar, *Haliotis* spp. (Dixon *et al.*, 1991; Anguiano-Beltrán *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 2001). En *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819) y *Crassostrea virginica* se han encontrado bacterias similares (Brown, 1981; Riquelme *et al.*, 1995). *Vibrio alginolyticus* (Miyamoto *et al.*, 1961) Sakazaki, 1968 causa necrosis bacilar en *Crassostrea virginica*, *Crassostrea gigas*, *Ostrea edulis*, *Mercenaria mercenaria*, *Argopecten ventricosus* (Sowerby, 1842), *Nodipecten subnodosus* (Sowerby, 1835), *Atrina maura* (Sowerby, 1835) o *Ruditapes decussatus* (Tubiash *et al.*, 1970; Lodeiros *et al.*, 1987; Luna-González *et al.*, 2002; Gómez-León *et al.*, 2005). *Vibrio pectenecida* Lambert *et al.*, 1998 es patógeno de la especie *Pecten maximus* (Nicolas *et al.*, 1996; Lambert *et al.*, 1998). Además, diferentes especies pertenecientes al género *Vibrio*, pero sin una caracterización específica completa, se han asociado a necrosis bacilar de larvas de bivalvos como *Crassostrea virginica*, *Ostrea edulis*, *Mercenaria mercenaria*, *Argopecten irradians*, *Teredo navalis* Linnaeus, 1758 o *Crassostrea gigas* (revisadas en Paillard *et al.*, 2004).

La mortalidad de verano de los juveniles de ostra japonesa *Crassostrea gigas* en Francia se debe a la bacteria *Vibrio splendidus* (Beijerinck, 1900) Baumann *et al.*, 1981, tanto a la biovar I como a la biovar II, causante de enfermedad al concurrir una serie de variables como las condiciones ambientales, las condiciones fisiológicas y la susceptibilidad genética del hospedador (Paillard *et al.*, 2004). La biovar II ha sido asociada a mortalidades de larvas de *Crassostrea gigas* en Japón y Francia (Sugumar *et al.*, 1998; Waechter *et al.*, 2002) y de *Ruditapes decussatus* en España (Gómez-León *et al.*, 2005).

Se han encontrado bacterias del género *Aeromonas* Stanier, 1943 causando necrosis bacilar en *Crassostrea virginica* y *Mercenaria mercenaria* (Tubiash *et al.*, 1965).

Especies del género *Alteromonas* Baumann *et al.*, 1972 también causan necrosis bacilar en *Crassostrea gigas* (Garland *et al.*, 1983). Diferentes especies de *Pseudomonas* son responsables de la necrosis bacilar en *Crassostrea virginica*, *Ostrea edulis*, *Mercenaria mercenaria* y *Euvola ziczac* (Linnaeus, 1758) (Lodeiros *et al.*, 1987; Paillard *et al.*, 2004).

La enfermedad del anillo marrón es una patología causada por *Vibrio tapetis* Borrego *et al.*, 1996 (Borrego *et al.*, 1996) en especímenes adultos de almeja japonesa *Ruditapes philippinarum* y de almeja fina *Ruditapes decussatus* en las costas de Francia, Irlanda, Inglaterra, España e Italia (Paillard, 2004). Los individuos enfermos muestran un característico depósito marrón en la cara interna de las valvas (Paillard y Maes, 1989). La especie *Vibrio tubiashii* y especies afines podrían ser empleadas para el control de *Vibrio tapetis* debido a su acción antagonista (Castro *et al.*, 2002). Se ha detectado una sintomatología similar asociada a la oreja de mar *Haliotis tuberculata* Linnaeus, 1758 (Huchette *et al.*, 2006). *Vibrio harveyi* (Johnson *et al.*, 1936) Baumann *et al.*, 1981 es capaz de causar mortalidad en moluscos tanto gasterópodos como las orejas de mar *Haliotis* spp. (Nishimori *et al.*, 1998; Handler *et al.*, 2002; Nicolas *et al.*, 2002), cefalópodos como el pulpo *Octopus bimaculoides* Pickford *et al.*, 1949 (Elston y Lockwood, 1983) o bivalvos como la ostra *Pinctada maxima* (Pass *et al.*, 1987). La especie *Vibrio lentus* Macián *et al.*, 2001 causa llagas en la piel e induce mortalidades en

ejemplares adultos de pulpo *Octopus vulgaris* Cuvier, 1797 al colonizar los órganos internos (Farto *et al.*, 2003). La especie *Vibrio fluvialis* Lee *et al.*, 1981 (biovar II) es la causa de la enfermedad de las pústulas en *Haliotis discus hannai* Ino, 1953, cultivada en China, y origina la necrosis de la musculatura del pie (Li *et al.*, 1998; Guo *et al.*, 1999; Bower y McGladdery, 2003).

Bacterias del género *Cytophaga* Winogradsky, 1929 son la causa de la enfermedad conocida como erosión del ligamento, que afecta a juveniles y adultos de *Crassostrea gigas*, *Crassostrea virginica*, *Ostrea edulis*, *Mercenaria mercenaria*, *Ruditapes philippinarum* y *Siliqua patula*. Esta enfermedad induce una progresiva destrucción del ligamento de la charnela, provocando dificultades en el animal para respirar y pudiendo causar infecciones secundarias (Dungan y Elston, 1988; Dungan *et al.*, 1989; Bower y McGladdery, 2003).

La enfermedad juvenil de la ostra, *Juvenile Oyster Disease* (JOD), afecta a *Crassostrea virginica*, en la que causa importantes mortalidades en la costa de Maine (E.E.U.U.) y se caracteriza por un excesivo abombamiento de la valva izquierda y un depósito anormal de conquiolina en el interior de las valvas (Bricelj *et al.*, 1992; Ford y Borrero, 2001). La enfermedad es transmisible y la mortalidad se relaciona con temperaturas elevadas del agua (22-26°C) (Lewis *et al.*, 1996). A pesar de que esta enfermedad ha sido ligada a diversas especies bacterianas como *Vibrio*, *Aeromonas* y *Pseudomonas* (Paillard *et al.*, 2004), parece que la causa es una α -proteobacteria denominada *Roseovarius crassostreae* Boettcher *et al.*, 2005 (Boettcher *et al.*, 2005).

En la sepia, *Sepia officinalis* Linnaeus, 1758, se ha descrito una patología asociada a bacterias pertenecientes a los géneros *Vibrio*, *Pseudomonas* y *Aeromonas*, que infecta de manera secundaria a los animales que desarrollan lesiones en la piel (Sherrill *et al.*, 2000). *Pseudomas fluorescens* Migula, 1895 no causa enfermedad en el berberecho *Cerastoderma edule* por sí sola, pero induce su desenterramiento, lo que disminuye la viabilidad de estos animales (Blanchet *et al.*, 2003).

Una bacteria descrita como similar a *Flavobacterium* sp. se ha vinculado a enfermedad en las orejas de mar *Haliotis rubra* Leach, 1814 y *Haliotis laevigata* Donovan, 1808 cultivadas en el estado de Tasmania (Australia) (Handlering *et al.*, 2002).

Bacterias Gram positivas

La nocardiosis de la ostra pacífica *Pacific Oyster Nocardiosis* o *PON* es la causa de importantes mortalidades en *Crassostrea gigas* adulta en Japón y Norteamérica (Bower y McGladdery, 2003; Paillard *et al.*, 2004). Los animales enfermos muestran lesiones en el manto con focos descoloridos en las infecciones ligeras y con grandes nódulos en las infecciones avanzadas (Friedman *et al.*, 1991b). Esta enfermedad está originada por la especie *Nocardia crassostreae* Friedman *et al.*, 1998 (Friedman *et al.*, 1998).

En el pectínido *Placopacten (Pecten) magellanicus* Gmelin, 1790 se han detectado bacterias gram positivas sospechosas de ser la causa de manchas de color pardo, necrosis y abscesos en el músculo aductor en la costa Atlántica de E.E.U.U. y Canadá (Bower y McGladdery, 2003; Paillard *et al.*, 2004).

Clostridium lituseberense (Laplanche *et* Saissac, 1948) es causa de infección en la oreja de mar *Haliotis midae* Linnaeus, 1758 en las costas de Sudáfrica. Esta infección se manifiesta asociada al estrés del cultivo en una planta industrial y se controla fácilmente con ozono (Dixon *et al.*, 1991).

Enfermedades causadas por protozoos

Los protozoos son un grupo heterogéneo de organismos eucariotas unicelulares o pluricelulares coloniales que está formado por una enorme variedad de tipos celulares, con estructuras diversas y con una amplia variedad de modos de vida, entre los que se encuentran gran cantidad de formas parásitas en moluscos.

La mayoría de las enfermedades de moluscos de declaración obligatoria a la O.I.E son enfermedades causadas por protozoos. En muchos casos, los diferentes protozoos presentan un ciclo complejo, con múltiples hospedadores intermediarios (en el caso de que el parásito necesite tal hospedador para completar su ciclo vital) o reservorios (si simplemente se mantiene sin desarrollarse). Las principales enfermedades de moluscos originadas por protozoos están provocadas por parásitos de los siguientes grupos:

Phylum Haplosporidia

En el phylum Haplosporidia se encuentran muchos parásitos de platelmintos, nematodos nemertinos, anélidos o crustáceos, pero además también incluye alguno de los patógenos más importantes de moluscos (Caullery y Mesnil, 1899a; 1899b; Burreson y Ford, 2004). Se caracteriza por la presencia de haplosporosomas y por la existencia de una espora cuya ornamentación caracteriza a los diferentes

géneros. Los géneros *Minchinia* Labbé, 1896, *Haplosporidium* Caullery et Mesnil, 1899 y *Bonamia* Pichot, Comps, Tigé, Grizel et Rabouin, 1979 pertenecen a este grupo.

Haplosporidium nelsoni (Haskin, Stauber et Mackin, 1966) es la causa de la enfermedad denominada MSX *Multinucleate Sphere X* (esfera multinucleada X) que afecta principalmente a la ostra *Crassostrea virginica* en la costa atlántica de E.E.U.U. y Canadá (Haskin et al., 1966). La ostra *Crassostrea gigas* también se ve afectada en la costa oeste de E.E.U.U. y en Francia, Japón y Corea (Friedman et al., 1991a; Renault et al., 2000; Bower y McGladdery, 2003). No es habitual ver esporas en las ostras, siendo los plasmodios la fase del ciclo de vida que se presenta habitualmente. La esporulación se presenta principalmente en individuos de corta edad (Burreson, 1994), causando la destrucción de los tejidos digestivos. El parásito no puede vivir en salinidades por debajo del 10‰, produciendo mortalidades cercanas al 100% en salinidades superiores al 15‰ e inferiores al 30‰ (Andrews y Frierman, 1974; Ford y Haskin, 1982). Las ostras afectadas presentan una glándula digestiva pálida, un aspecto delgado y un cese del crecimiento. *Haplosporidium costale* (Wood et Andrews, 1962) es conocido como SSO (*Seaside Organism*, nombre que hace referencia al *Seaside*, la parte oceánica del estado de Virginia (E.E.U.U.) donde es más prevalente). Este organismo afecta igualmente a *Crassostrea virginica* en la costa este de E.E.U.U., pero su presencia está limitada a zonas con salinidades oceánicas, de mayor salinidad que las afectadas por MSX. Causa mortalidades en la época de esporulación, entre mayo y junio. En ocasiones, se encuentran ostras coinfectadas con las dos especies, poniendo de manifiesto la importancia de las técnicas de biología molecular en el diagnóstico de

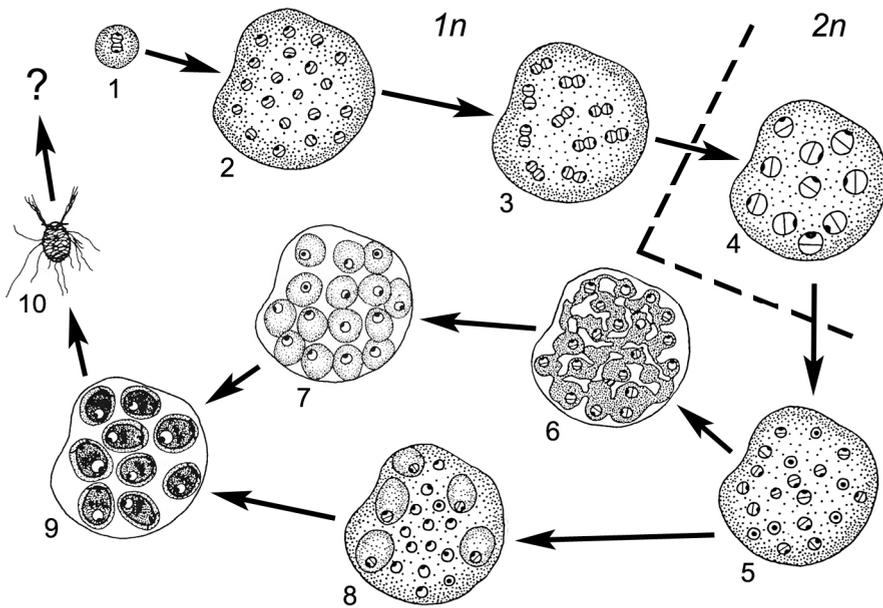
enfermedades en moluscos, ya que mediante histología son virtualmente indistinguibles (Penna *et al.*, 2001; Stokes y Burreson, 2001; Sunila *et al.*, 2002; Russell *et al.*, 2004). La única característica que permite distinguir estas dos especies mediante análisis histopatológico es que el proceso de esporulación, en las raras ocasiones en las que es observado, se da en el epitelio digestivo en el caso de *Haplosporidium nelsoni* y en el tejido conectivo en el caso de *Haplosporidium costale*. Existen otras muchas especies del género *Haplosporidium* que afectan a moluscos como *Haplosporidium pickfordi* Barrow, 1961 y *Haplosporidium lusitanicum* Azevedo, 1984 (Barrow, 1961; Azevedo, 1984), parásitos respectivos de moluscos gasterópodos pulmonados (*Physella parkeri* (Currier, 1881), *Limnaea stagnalis* (Linnaeus, 1758), *Planorbella (Helisoma) campanulata* (Say, 1821)) y gasterópodos prosobranquios (*Patella pellucida* (Linnaeus, 1758)). *Haplosporidium armoricanum* (Van Banning, 1977) es parásito de *Ostrea edulis* en la costa atlántica europea (Van Banning, 1977; Bonami *et al.*, 1985; Azevedo *et al.*, 1999), aunque su prevalencia no es muy elevada. Esporula en el tejido conectivo de los moluscos. *Haplosporidium tumefacientis* Taylor, 1966 es una especie que origina tumefacciones en la glándula digestiva y el riñón del mejillón *Mytilus californianus* Conrad, 1837 (Taylor, 1966). *Haplosporidium edule* Azevedo, Conchas *et* Montes, 2003 se encuentra parasitando al berberecho *Cerastoderma edule* en las costas de Galicia, principalmente en el tejido conectivo de la glándula digestiva, aunque también se observa en branquia, gónada y manto, (Carballal *et al.*, 2001; Azevedo *et al.*, 2003). Otras especies del género *Haplosporidium* parásitas de moluscos se han observado en *Ostrea angasi* y *Crassostrea gigas* en Francia (Bachère *et al.*, 1987; Comps y Pichot, 1991), en *Pinctada*

maxima y *Saccostrea cucullata* (Born, 1778) en Australia (Hine y Thorne, 1998, 2002) o en *Mytilus edulis* de Maine (E.E.U.U.) (Figueras *et al.*, 1991).

Muchas especies del género *Minchinia*, al igual que las del género *Haplosporidium* han sufrido diversos cambios de posición taxonómica debido a la confusa interpretación de las características genéricas (Ormières, 1980; McGovern y Burreson, 1990; Azevedo, 2001; Burreson y Reece, 2006). Cabe destacar las especies *Minchinia chitonis* (Lankester, 1885), causante de una infección sistémica del molusco polioplacóforo *Lepidochitona cinerea* (Linnaeus, 1767) (Ball y Neville, 1979; Ball, 1981; Baxter *et al.*, 1989), *Minchinia dentali* (Arvy, 1949), parásita del molusco escafópodo *Antalis entalis* (= *Dentalium entale*) (Linnaeus, 1758) (Desportes y Nashed, 1983), y los parásitos de moluscos bivalvos *Minchinia tapetis* (Vilela, 1951), que infecta principalmente el tejido conectivo que rodea a los túbulos digestivos y las branquias de *Ruditapes decussatus* y *Minchinia teredinis* Hillman, Ford *et Haskin*, 1990, que causa infección sistémica en varios moluscos del género *Teredo* Linnaeus, 1758 (Chagot *et al.*, 1987b; Hillman *et al.*, 1990; Azevedo, 2001).

La figura I.3 muestra la posible secuencia de desarrollo del haplosporidio *Minchinia* sp. en el cangrejo *Panopeus herbstii* Milne-Edwards, 1834. Probablemente este parásito sea *Haplosporidium louisiana* (Sprague, 1963) (Perkins, 1975; Burreson y Ford, 2004). No se ha conseguido cerrar el ciclo de *Minchinia*, al igual que los de *Haplosporidium* o de *Urosporidium*, por lo que se especula con la existencia de uno o más hospedadores intermedios (Burreson, 1988, 1996; Sunila *et al.*, 2000).

Figura I.3: Posible secuencia de desarrollo del parásito *Minchinia* sp. (seguramente *Haplosporidium lousiana*) según Perkins, (1975). La infección se inicia con un plasmodio (1) que crece y se divide para formar esporontes (2), los núcleos se aparean (3) y se produce la cariogamia (4). En este momento las células pasan de haplofase ($1n$) a diplofase ($2n$). Se produce la meiosis, reduciendo el tamaño nuclear (5). La citocinesis se produce por dos vías alternativas. Una conlleva la formación de un sincitio (6) y la condensación del citoplasma alrededor de cada núcleo formando los esporoblastos (7). En otra vía menos frecuente los esporoblastos se forman por separación del protoplasma del esporonte (8). Los esporoblastos se dividen, con una parte nucleada, endoesporoplasma, y una parte enucleada, exoesporoplasma, formando la pared de la espora en la interfase endoesporoplasma- exoesporoplasma (9), y liberándose la espora tras una maduración de la misma (10). Se desconoce el destino de la espora y se especula con la existencia de uno o más hospedadores intermedios.



El género *Bonamia* está formado por especies con células de pequeño tamaño, denominadas microcélulas, aunque este término también abarca a la especie *Mikrocytos mackini* Farley, Wolf et Elston, 1988, no relacionada filogenéticamente con los haplosporidios. Una característica importante del género *Bonamia* es que las infecciones pueden transmitirse directamente de ostra a ostra sin necesidad de un hospedador intermedio (Bucke, 1988; Montes *et al.*, 1994).

Bonamia ostreae Pichot, Comps, Tigé, Grizel et Rabouin, 1979, causante de la bonamiosis en la ostra plana *Ostrea edulis* y otras especies de ostras, es responsable de importantes mortalidades en la costa atlántica europea (Pichot *et al.*, 1980; Tigé *et al.*, 1982; Balouet y Poder, 1983; Bucke *et al.*, 1984; Polanco *et al.*, 1984; Bucke, 1988). Este parásito se observa también en ambas costas en Norteamérica, de donde se cree que es originario (Elston *et al.*, 1986; Cigarría y Elston, 1997). *Bonamia exitiosa* Hine, Cochenec-Laureau et Berthe, 2001 se encuentra en Nueva Zelanda, y es la causa de la bonamiosis en la ostra *Ostrea chilensis* en esa localización (Dinamani *et al.*, 1987; Hine *et al.*, 2001; Berthe y Hine, 2003). Esta especie ha aparecido recientemente en las costas de Galicia infectando a *Ostrea edulis* (Anónimo, 2007). Se ha descrito en Australia una especie muy similar a *Bonamia exitiosa* en *Ostrea angasi* (Hine y Jones, 1994; Corbeil *et al.*, 2006b; Corbeil *et al.*, 2006a). La especie *Bonamia roughleyi* (Farley, Wolf et Elston, 1988) (Cochennec-Laureau *et al.*, 2003a), descrita bajo el nombre de *Mikrocytos roughleyi* (Farley *et al.*, 1988) origina la enfermedad australiana del invierno en la especie *Saccostrea glomerata* (= *Saccostrea* (*Crassostrea*) *commercialis*) (Gould, 1850). Esta especie fue considerada en su momento como perteneciente al género *Mikrocytos* Farley, Wolf et Elston, 1988 por razones epizootiológicas (no parasitaba a ostras planas) y patológicas (forma abscesos en vez de ser una infección sistémica) (Farley *et al.*, 1988), aunque posteriormente la caracterización molecular la situó como una *Bonamia* (Cochennec-Laureau *et al.*, 2003a; Carnegie y Cochenec-Laureau, 2004). La única especie del género *Bonamia* en la que se ha observado el proceso de esporulación es *Bonamia perspora* Carnegie, Burreson, Hine, Stokes, Audemard, Bishop et Peterson, 2006, parásito

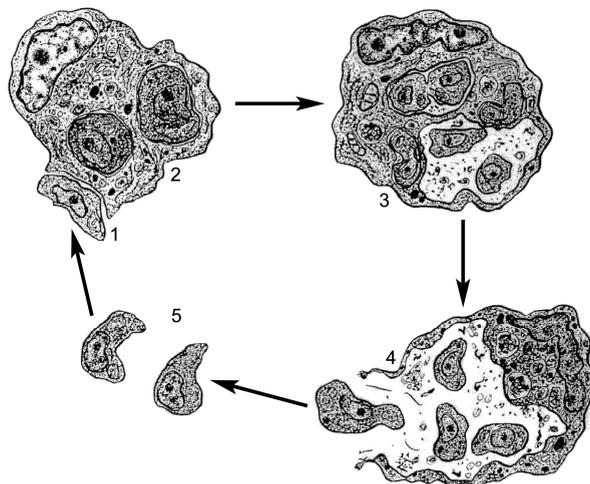
de la ostra *Ostreola equestris* (Say, 1834), (Carnegie *et al.*, 2005; Carnegie *et al.*, 2006). Otras especies del género *Bonamia* afectan a *Crassostrea ariakensis* Fugita, 1913 en la costa este de Norteamérica (Burreson *et al.*, 2004), a *Ostrea chilensis* en Chile (Campalans *et al.*, 2000; Arzul *et al.*, 2005b) o a *Ostrea puelchana* d'Orbigny, 1846 en Argentina (Kroeck y Montes, 2005).

Las poblaciones de *Ostrea edulis* que han estado sometidas a una importante presión selectiva por parte del parásito desde los años 80 han conseguido desarrollar un cierto grado de resistencia a la infección por *Bonamia ostreae*, por lo que se considera la selección genética de las ostras como el mecanismo más importante de control de la enfermedad (Baud *et al.*, 1997; Naciri-Graven *et al.*, 1999; Culloty *et al.*, 2004; da Silva *et al.*, 2005). También se sabe que el método empleado para el crecimiento de las ostras tiene influencia en el desarrollo de la enfermedad, siendo más susceptibles las ostras engordadas en cultivo sobreelevado que en batea (Lama y Montes, 1993; Montes *et al.*, 2003).

La infección está relacionada con el estrés, y es superior en las hembras tras la puesta (Hine, 2002; Hine *et al.*, 2002a). Los hemocitos agranulares grandes son el tipo de hemocito más infectado por *Bonamia ostreae* (Cochennec-Laureau *et al.*, 2003b). Los hemocitos tanto de *Crassostrea gigas* como de *Ostrea edulis* pueden fagocitar *Bonamia ostreae*, aunque el parásito es capaz de sobrevivir en los de ostra plana y no así en los de la ostra japonesa (Chagot *et al.*, 1992; Mourton *et al.*, 1992).

La figura I.4 muestra el ciclo de infección de *Bonamia ostreae* en los hemocitos de ostra plana, *Ostrea edulis*. El parásito se divide en las células epiteliales de una manera análoga al ciclo hemocitario y, finalmente, abandona el molusco a través de las branquias (Montes *et al.*, 1994). También se ha propuesto que el estadio inicial del parásito se encuentra en el tejido ovárico de la ostra (Van Banning, 1990). Otra especie del mismo género, *Bonamia perspora*, presenta un ciclo ligeramente diferente, infectando el tejido conectivo como un pequeño plasmodio y produciendo una esporulación intensa y breve (Carnegie *et al.*, 2006). Aunque la enfermedad es transmisible directamente, no se puede asegurar que el ciclo de vida no sea más complejo y no involucre a reservorios o incluso hospedadores intermediarios (Culloty *et al.*, 1999; Lynch *et al.*, 2006).

Figura I.4: Posible ciclo de infección hemocitaria del parásito *Bonamia ostreae* en los hemocitos de ostra plana *Ostrea edulis* según Montes *et al.*, (1994). La célula libre de *Bonamia ostreae* (1) se adhiere a la superficie del hemocito (2), que lo engloba en un fagolisosoma donde desarrolla una fase proliferativa (3). Conforme aumentan de tamaño las células del parásito, se produce la destrucción del lisosoma y posteriormente del hemocito (4), liberando las células de *Bonamia ostreae* al líquido intersticial (5), que inician nuevamente el ciclo.



Se han vinculado otras especies al phylum Haplosporidia por medio de las técnicas de biología molecular, al no haberse encontrado una fase esporulada que permita la clasificación en alguno de los géneros descritos. Entre estas especies, basales en la filogenia del grupo, destacan como parásitos de moluscos el haplosporidio de la almeja fina *Ruditapes decussatus* encontrado en Galicia (Novoa *et al.*, 2004), el de la oreja de mar *Haliotis iris* Gmelin, 1791 en Nueva Zelanda (Diggles *et al.*, 2002; Hine *et al.*, 2002b; Reece y Stokes, 2003) y el del camarón californiano *Pandalus platyceros* Brandt, 1851 (Reece *et al.*, 2000). Recientemente se ha asociado al phylum Haplosporidia un parásito que ataca al hepatopáncreas del camarón *Penaeus vannamei* Boone, 1931, provocando mortalidades en Belice, y situándolo como taxón hermano a la rama formada por los géneros *Minchinia* y *Bonamia* (Nunan *et al.*, 2006). Mediante filogenia molecular, también se ha vinculado el agente causante de mortalidades en la ostra *Saccostrea cucullata* al género *Minchinia* (Bearham *et al.*, 2007). Además existen multitud de especies de haplosporidios en todo el planeta presentes en moluscos y no caracterizadas específicamente (Lauckner, 1983; Burreson y Ford, 2004).

Phylum Microsporidia

El principal parásito del phylum Microsporidia que afecta a los moluscos son los parásitos pertenecientes al género *Steinhausia* Sprague, Ormieres *et Manier*, 1972. *Steinhausia mytilovum* (Field, 1924) es parásito de *Mytilus edulis* y *Mytilus galloprovincialis* en Europa y la costa este de E.E.U.U. (Farley, 1988a; Hillman, 1991; Comtet *et al.*, 2004). Se han encontrado parásitos del género *Steinhausia* parasitando los ovocitos de multitud de bivalvos en diversas partes del mundo

(Becker y Pauley, 1968; Wolf, 1977; Anderson *et al.*, 1995; Carballal *et al.*, 2001; Olivares, 2005).

Microsporidium rapua Jones, 1981 afecta a la ostra *Ostrea chilensis* en Nueva Zelanda, encontrándose en el tejido conectivo que rodea al intestino (Jones, 1981).

Phylum Apicomplexa

Existen numerosos coccidios que afectan a diferentes especies de bivalvos, normalmente sin producir efectos importantes en el hospedador. Diferentes especies de los géneros *Pseudoklossia* Léger *et* Duboscq, 1915 y *Margolisiella* Desser *et* Bower, 1997 infectan los tejidos renales de multitud de bivalvos a lo largo del mundo. *Pseudoklossia glomerata* Léger *et* Duboscq, 1915 afecta a las especies de almeja *Marcia virginea* (= *Tapes virgineus*) (Linnaeus, 1767) y *Callista florida* (= *Tapes floridus*) (Lamarck, 1818) en el Mar Mediterráneo (Bower y McGladdery, 2003), *Pseudoklossia pelseneeri* (Leger, 1897) a *Tellina* sp. y *Donax* sp. de la costa atlántica francesa, *Pseudoklossia* spp. se encuentra en la *Venerupis pullastra* (Montagu, 1803) de la costa atlántica francesa (Auffret y Poder, 1987) y en el bereberecho *Cerastoderma edule* de las costas de Galicia (Carballal *et al.*, 2001). *Margolisiella tellinovum* (Buchanan, 1979) a *Angulus tenuis* (= *Tellina tenuis*) (Da Costa, 1778) de las costas de Escocia, *Margolisiella kabatai* Desser *et* Bower, 1997 a la almeja *Protothaca staminea* (Conrad, 1837) de la costa pacífica de los estados de la Columbia Británica (Canadá) y Washington (E.E.U.U.). Una especie indeterminada afecta a *Scrobicularia plana* (Da Costa, 1778) en las costas alemanas del Mar del Norte. En *Ostrea edulis* de la costa atlántica francesa también se encuentra un organismo de este grupo.

La oreja de mar *Haliotis* spp. se ve afectada por la especie *Margolisiella haliotis* (Friedman, Gardner, Hedrick, Stephenson, Cawthorn *et Upton*, 1995) (Friedman *et al.*, 1995; Cáceres-Martínez y Tinoco-Orta, 2001) en las costas de los estados de California (E.E.U.U.) y Baja California (México). También se han detectado coccidios renales en *Haliotis midae* de las costas de Sudáfrica, que podrían corresponder a esta especie (Mouton, 2000).

La presencia de cualquiera de estas especies en un hospedador provoca una hipertrofia de las células renales infectadas, aunque los casos de infección masiva son raros y generalmente no se asocian a mortalidades.

En Canadá, *Mytilus edulis* es parasitado por *Pseudoklossia semiluna* Desser, Bower *et Hong*, 1998, aunque no produce lesiones histológicas de importancia y no se relaciona con mortalidades (Desser *et al.*, 1998). Otras especies de *Pseudoklossia* se encuentran en el mejillón *Mytilus galloprovincialis* en Galicia (Robledo *et al.*, 1994a; Anónimo, 2003).

La ostra *Ostrea chilensis* de Nueva Zelanda presenta un parásito del phylum Apicomplexa que no se parece a ningún otro previamente descrito en moluscos. Los zoítos, denominados así provisionalmente porque no se ha podido observar si son formados por merogonia o esporogonia, se encuentran en los senos sanguíneos, la glándula digestiva, tejido de Leydig y sub-epitelio de la branquia y manto. Los ejemplares con fuertes infecciones sufren daños histológicos y castración. Las ostras afectadas con este parásito son

más sensibles a la infección con *Bonamia exitiosa* (Hine, 2002), lo que concede cierta importancia a este parásito.

Las especies del género *Aggregata* Frenzel, 1885 son parásitos habituales de los cefalópodos en todo el mundo, causando trastornos en la absorción de nutrientes en los animales infectados (Poynton *et al.*, 1992; Gestal *et al.*, 2000; Sardella *et al.*, 2000; Gestal *et al.*, 2002a; Gestal *et al.*, 2002b).

En el Algarve (Portugal) se ha encontrado un *Cryptosporidium* sp. en poblaciones de *Ruditapes decussatus* que sufrían mortalidades. En esas mismas poblaciones fue descrita la presencia de *Perkinsus olseni*, por lo que la relación de *Cryptosporidium* sp. con las mortalidades es dudosa (Azevedo, 1989a).

Numerosas especies de gregarinas de la familia Porosporidae (géneros *Porospora* Schneider, 1875 y *Nematopsis* Schneider, 1892) se encuentran habitualmente en moluscos (Lauckner, 1983; Gauthier *et al.*, 1990; Boyles *et al.*, 1991; Villalba *et al.*, 1993a; Soto *et al.*, 1996; Canestri-Trotti *et al.*, 2000; Carballal *et al.*, 2001; Ceschia *et al.*, 2001; Azevedo y Padovan, 2004). Las especies del género *Nematopsis* son especialmente abundantes en las branquias y tejido conectivo de la mayor parte de los moluscos marinos en todo el planeta. El género *Nematopsis* es heteroxeno, empleando diversos crustáceos como hospedadores definitivos (Perkins, 1991; Azevedo y Padovan, 2004).

Phylum Ciliata

En la costa pacífica de E.E.U.U. y en el estado de Nueva Gales del Sur (Australia) se han producido mortalidades de semilla de *Crassostrea gigas* y *Crassostrea sikamea* Amemiya, 1928 ligadas a la

presencia de ciliados del orden Philasteridae. Estos ciliados penetran en la cavidad celómica y causan una infección sistémica que conduce a una alta mortalidad de las semillas (Elston *et al.*, 1999; Bower y McGladdery, 2003).

Numerosos ciliados de la familia Sphenophrydae se encuentran en las branquias de múltiples especies de moluscos en todo el mundo, aunque su función es más de organismo comensal que parásito (Lauckner, 1983; Bower y McGladdery, 2003).

Diversos ciliados pertenecientes a la familia Ancistrocomidae se presentan habitualmente en las branquias de moluscos de todo el mundo. Otro grupo de ciliados frecuentes en las branquias son los pertenecientes a la familia Trichonidae. Estos ciliados son comensales en las branquias y no se asocian a problemas patológicos. Su mayor impacto se puede producir con muy altas densidades de ciliados en semillas, donde pueden llegar a originar alguna mortalidad (Bower y McGladdery, 2003).

Phylum Dinoflagellata

Los principales patógenos de moluscos pertenecientes al phylum Dinoflagellata son los pertenecientes al género *Perkinsus* Levine, 1978.

Los productores de ostra del estado de Louisiana (E.E.U.U.) sufrieron grandes mortalidades de la especie *Crassostrea virginica* a mediados del siglo XX, acusando a las compañías petrolíferas que operaban en la región de ser las responsables de dichas mortalidades (Ray, 1996). Las propias empresas petrolíferas financiaron las investigaciones que acabaron llevando al descubrimiento del

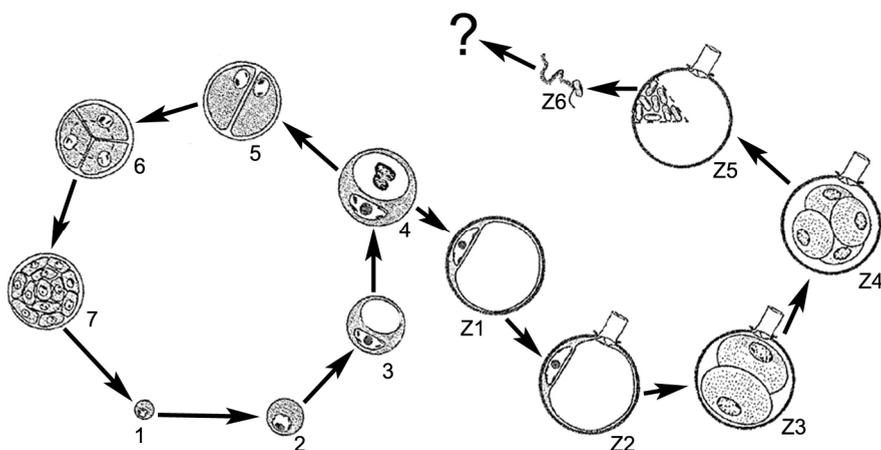
Dermocystidium marinum, posteriormente llamado *Perkinsus marinus* (Macklin, Owen *et al.*, 1950) (Macklin *et al.*, 1950). En un primer momento este organismo fue considerado como un hongo, pasando a considerarse dentro del grupo de los Labyrinthulales con el nombre de *Labyrinthomyxa marina* (Macklin y Ray, 1966). Levine posteriormente lo trasladó al phylum Apicomplexa, y creó la clase Perkinsia (Levine, 1978). Puesto que la estructura del complejo apical de la zoospora es diferente al resto de los apicomplejos y a los datos de secuencias que se obtuvieron, el género *Perkinsus* se trasladó al phylum Dinoflagellata (Goggin y Barker, 1993; Reece *et al.*, 1997b; Siddall *et al.*, 1997; Bushek *et al.*, 2002; Saldarriaga *et al.*, 2003; Gestal *et al.*, 2006). Debido a las características especiales del género *Perkinsus*, se creó el phylum Perkinsozoa (Norén *et al.*, 1999; Brugerolle, 2002), pero los datos de filogenia molecular y serología lo relacionan con el orden Syndiniales del phylum Dinoflagellata. Recientemente se ha descubierto una estructura en *Perkinsus olseni* que podría ser un plasto, de apariencia similar a los presentes en el phylum Apicomplexa (Teles-Grilo *et al.*, 2007). Además se ha comprobado la expresión de una ferredoxina y su reductasa asociada (Stelter *et al.*, 2007). También se ha observado la organización cromosómica del parásito, diferente a la de la mayoría de los dinoflagelados, aunque similar a la de las primeras ramas evolutivas que divergieron tempranamente de los dinoflagelados (Teles-Grilo *et al.*, 2007).

Tanto *Perkinsus marinus*, que parasita principalmente a *Crassostrea virginica*, aunque otras especies como *Crassostrea gigas* también se ven afectadas, como *Perkinsus olseni*, parásito de multitud de especies de moluscos como orejas de mar, almejas, navajas, ostras perlíferas, etc, son parásitos de declaración obligatoria a la O.I.E.

(O.I.E., 2007). La especie *Perkinsus atlanticus*, descrita en una población de almeja fina *Ruditapes decussatus* en el Algarve, Portugal, que presentaba una mortalidad sospechosa, es sinónima de *Perkinsus olseni* (Azevedo, 1989b; Goggin, 1994; Murrell *et al.*, 2002). De la misma forma, *Perkinsus chesapeaki* McLaughlin, Tall, Shaheen, El Sayed *et Faisal*, 2000 y *Perkinsus andrewsi* también se consideran especies sinónimas con preferencia para la primera. Esta especie afecta principalmente a almejas presentes en la bahía de Chesapeake, en los estados de Virginia y Maryland (costa este de E.E.U.U.); *Mya arenaria*, *Macoma balthica* (Linnaeus, 1758), *Macoma mitchelli* Dall, 1895, *Mercenaria mercenaria* y a la ostra *Crassostrea virginica* (Coss *et al.*, 2001; Dungan *et al.*, 2002; Bower y McGladdery, 2003). Las últimas especies descritas fueron *Perkinsus qugwadi* Blackbourn, Bower *et Meyer*, 1998, parásito de la vieira japonesa *Patinopecten yessoensis* (Jay, 1857) (Blackbourn *et al.*, 1998), *Perkinsus mediterraneus* Casas, Grau, Reece, Apakupakul, Azevedo *et Villalba*, 2004 que afecta a *Ostrea edulis* de las islas Baleares (Casas *et al.*, 2004) y *Perkinsus honshuensis* Dungan *et Reece*, 2006 (Dungan *et al.*, 2006), parásito de *Ruditapes philippinarum* en la isla de Honshu (Japón). Este parásito se encuentra conjuntamente con *Perkinsus olseni*, aunque en menor prevalencia.

El ciclo de vida de la especie *Perkinsus marinus* en *Crassostrea virginica* (Perkins, 1996) se encuentra descrito en la figura I.5. Cualquiera de las etapas de este ciclo es infectiva (Goggin *et al.*, 1989; Volety y Chu, 1994). Se ha vinculado al gasterópodo *Boonea impressa* (Say, 1822) con la transmisión del patógeno, pero la distribución del patógeno es más amplia que la del gasterópodo vector (White *et al.*, 1987; Powell *et al.*, 1988).

Figura I.5: Ciclo de vida de la especie *Perkinsus marinus* en *Crassostrea virginica*, adaptado de Perkins, 1996. El trofozoíto inmaduro (1) se transforma en un trofozoíto maduro (2-4), desarrollando una gran vacuola central con vacuoplasto que ocupa casi toda la célula, por lo que el núcleo se encuentra en posición lateral. El trofozoíto maduro da lugar a nuevos trofozoítos inmaduros por un proceso de palintomía (5-7), tras el cual se liberan los trofozoítos por una brecha en la pared de la célula. Alternativamente, en el agua del mar, se puede producir el proceso de zoosporulación. El trofozoíto maduro aumenta significativamente de tamaño, perdiendo el vacuoplasto para formar un prezoosporangio o hipnospora (Z1), y desarrollando un zoosporangio con tubo de descarga (Z2) momento tras el cual se desarrollan las zoosporas por un proceso de palintomía (Z3-Z5) que resulta en la liberación de las zoosporas biflageladas por el tubo de descarga (Z6). Las zoosporas se supone que se pueden desarrollar en un trofozoíto inmaduro, pero este proceso no está confirmado.



La especie *Perkinsus karlssoni*, descrita originalmente en *Argopecten irradians* (McGladdery *et al.*, 1991) no se considera una especie válida del género *Perkinsus*. La descripción de este organismo se realizó erróneamente, combinando estadios de diferentes especies (Goggin *et al.*, 1996).

En Galicia se ha aislado una especie muy similar a *Perkinus olseni*, indistinguible de esta al microscopio óptico y que al igual que las especies del género *Perkinsus* (con la única excepción de *Perkinsus qugwadi*) produce hipnosporas al ser incubada en RFTM (Figueras *et al.*, 2000; Novoa *et al.*, 2002). La secuenciación del gen de la subunidad

ribosómica 18S muestra que este parásito es diferente al resto de las especies del género *Perkinsus* y se relaciona con el grupo de los Mesomycetozoa (Ragan *et al.*, 1996; Herr *et al.*, 1999), en el que curiosamente también se encuentra *Dermocystidium*, género en el que se encuadró la especie *Perkinsus marinus* en el momento de su descripción. Este parásito se conoce con el nombre de *Pseudoperkinsus tapetis*.

La distribución de *Perkinsus marinus* y su patogenicidad parece estar determinada por la temperatura del agua (Wilson *et al.*, 1990; Ford, 1996; Ford y Chintala, 2006; Ford y Smolowitz, 2007). Se vincula la existencia de diferentes cepas, adaptadas a diferentes ambientes para desarrollar la enfermedad (Bushek y Allen, 1996a; 1996b; Reece *et al.*, 1997a; Reece *et al.*, 2001). Las infecciones se desarrollan al final de la primavera, al aumentar la temperatura del agua, con máximos al final del verano. La mortalidad se observa principalmente en los meses de agosto y septiembre (Brousseau, 1996; Burreson y Ragone Calvo, 1996).

Se ha vinculado la proliferación masiva de microalgas de las especies *Karenia cristata* Botes, Sym et Pitcher, 2003 y *Karenia bicuneiformis* Botes, Sym et Pitcher, 2003 con la mortalidad de la oreja de mar *Haliotis midae* en Sudáfrica (Botes *et al.*, 2003). Además, las mareas rojas de la especie *Heterocapsa circularisquama* Horiguchi, 1995 provocan mortalidades en múltiples especies de bivalvos y gasterópodos (Matsuyama *et al.*, 2001; Oda *et al.*, 2001).

Phylum Labyrinthomorpha

La especie *Mercenaria mercenaria* sufre mortalidades en la costa atlántica de E.E.U.U. y Canadá debido a un organismo del phylum Labyrinthomorpha denominado QPX, siglas de *Quahog Parasite X* (Whyte *et al.*, 1994; Maas *et al.*, 1999; Ragan *et al.*, 2000; Bower y McGladdery, 2003). Este parásito causa necrosis en la musculatura del pie y afecta al tejido conectivo del molusco, principalmente el próximo a la glándula digestiva.

En la costa pacífica se ha observado la infección de juveniles de las orejas de mar *Haliotis kamtschatkana* Jonas, 1845 y *Haliotis rufescens* por el labyrinthulido *Labyrinthuloides haliotidis* Bower, 1987 (Bower, 1987a; 1987b) que causa la destrucción del tejido muscular en el pie y del tejido nervioso en la cabeza.

Phylum Zoomastigina

Especies del género *Hexamita* Dujardin, 1838, como *Hexamita nelsoni* Schlicht *et* Mackin, 1968 o *Hexamita inflata* Dujardin, 1841 producen una enfermedad denominada hexamitiasis en múltiples especies de ostras en todo el mundo (Bower y McGladdery, 2003). Normalmente, se encuentra en el tracto digestivo, pero se han asociado infecciones sistémicas con mortalidad (Feng y Stauber, 1968; Schlicht y Mackin, 1968; Van Banning, 1979).

Phylum Paramyxea

Los parásitos de moluscos pertenecientes al phylum Paramyxea se encuentran entre los más importantes que parasitan a moluscos bivalvos en todo el planeta. *Marteilia refringens* Grizel, Comps, Bonami, Cousserans, Duthoit *et* Penneec, 1974 parasita a ostra

plana *Ostrea edulis* y mejillón *Mytilus* spp. del Mar Mediterráneo y del Atlántico Europeo y es la causa de la enfermedad conocida como enfermedad de la glándula digestiva o de Aber (Grizel *et al.*, 1974; Grizel, 1979; Comps y Joly, 1980; Grizel *et al.*, 1983; Bougrier *et al.*, 1986; Figueras y Montes, 1988; Villalba *et al.*, 1993b; Robledo *et al.*, 1994b). Es, junto a *Marteilia sydneyi* Perkins *et* Wolf, 1976 (enfermedad QX), una de las enfermedades de declaración obligatoria para la O.I.E. causadas por una especie del phylum Paramyxea. *Marteilia sydneyi*, la otra enfermedad de declaración obligatoria, es parásita de la especie *Saccostrea glomerata* en Australia (Wolf, 1979; Adlard y Ernst, 1995). *Marteilia maurini* Comps, Pichot *et* Papagianni, 1982 afecta a los mejillones *Mytilus galloprovincialis* y *Mytilus edulis*, solapándose su distribución con la de *Marteilia refringens* en Europa, si bien se cree que podría ser una especie sinónima o una variedad de esta última (Comps *et al.*, 1982; Auffret y Poder, 1985; Da Ros y Massignan, 1985). *Marteilia lengehi* Comps, 1976 es un parásito que afecta a *Saccostrea cucullata* del Golfo Pérsico y nordeste de Australia (Comps, 1976; Hine y Thorne, 2000). *Marteilia christenseni* Comps, 1985 es parásito de *Scrobicularia plana* (= *Scrobicularia piperata*) en Francia (Comps, 1985). Además, diferentes especies del género *Marteilia* Grizel, Comps, Bonami, Cousserans, Duthoit *et* Pennec, 1974 han sido descritas en otros hospedadores: *Cerastoderma edule*, *Venerupis pullastra*, *Venerupis rhomboides* (Pennant, 1777) y *Ruditapes decussatus* (Comps *et al.*, 1975; Auffret y Poder, 1987; Villalba *et al.*, 1993a) en Francia y Galicia, *Argopecten gibbus* (Linnaeus, 1758) del estado de La Florida (E.E.U.U.) (Moyer *et al.*, 1993), *Tridacna maxima* (Röding, 1798) en Fidji (Norton *et al.*, 1993a), *Ruditapes philippinarum*

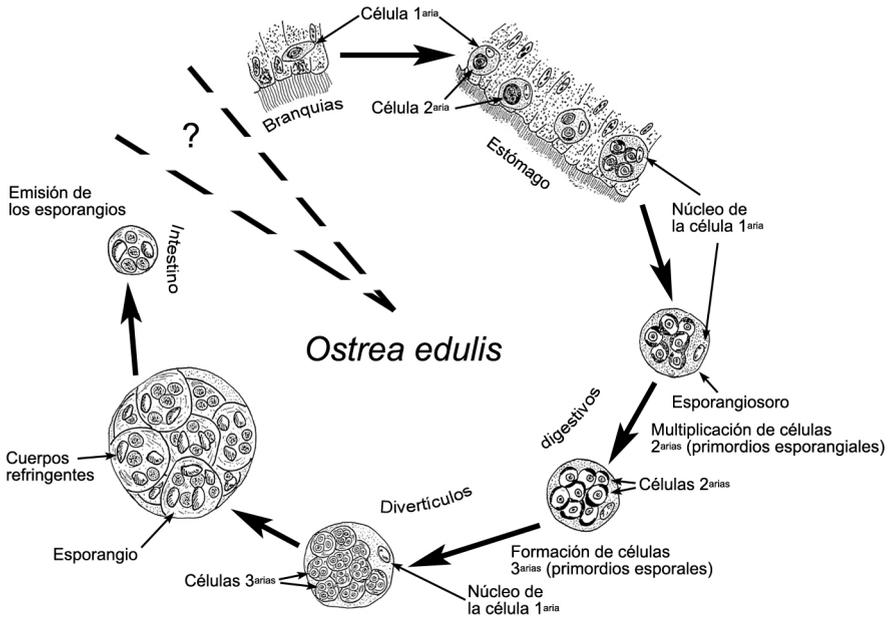
en Japón (Itoh *et al.*, 2005) y *Solen marginatus* Pulteney, 1799 en Galicia (López y Darriba, 2006).

El ciclo de vida de *Marteilia refringens* no se conoce con certeza todavía, aunque se ha demostrado que el copépodo *Acartia grani* (= *Paracartia grani*) (Sars, 1904) es un hospedador intermediario, que es infectado por ostras enfermas pero que no transmite la infección en el sentido contrario (Audemard *et al.*, 2002). La infección provoca, como consecuencia de la esporulación del parásito en la glándula digestiva, la pérdida de las reservas de glucógeno del animal, el cambio de color de la glándula, la detención del crecimiento, la necrosis tisular y, finalmente, la muerte del molusco. Estos efectos se observan en ostra plana, porque en mejillón la presencia de *Marteilia refringens* no está vinculada a mortalidades (Villalba *et al.*, 1993b; Robledo y Figueras, 1995).

La figura I.6 muestra el ciclo de desarrollo del parásito *Marteilia refringens* en ostra plana. La célula primaria o plasmodio infecta células epiteliales, siendo relativamente frecuente en el extremo apical del epitelio del estómago. La esporulación de *Marteilia* es una gemación interna, formando una célula dentro de una célula, siendo un proceso característico del phylum. La primera gemación en el epitelio digestivo da lugar a las células secundarias o primordios esporogénicos, conociéndose el conjunto como esporangiosoro (anteriormente plasmodio), siguiendo la formación de las células terciarias (esporangios, esporontes o primordios de las esporas). Estas células terciarias forman las esporas maduras y son liberadas a la luz intestinal. Además presentan en su citoplasma unas inclusiones

refringentes muy características al microscopio óptico (Grizel *et al.*, 1974; Figueras y Montes, 1988).

Figura I.6: Ciclo de vida de la especie *Marteilia refringens* en ostra plana *Ostrea edulis*, adaptado de Grizel *et al.*, 1974. La célula primaria se encuentra en el epitelio estomacal y, muy ocasionalmente, en la branquia. Conforme avanza el proceso de esporulación, avanza el parásito en el sistema digestivo del molusco, produciendo en el estómago las células secundarias y en los divertículos digestivos las células terciarias. Las células terciarias o esporangios desarrollan en su citoplasma unas inclusiones altamente refringentes que le dan el nombre a la especie.



El desarrollo de la marteiliosis es estacional. Durante el invierno y el comienzo de la primavera, el parásito está ausente o en cantidades muy reducidas. La infección se va desarrollando progresivamente conforme aumentan las temperaturas, alcanzando en verano los mayores niveles. En otoño, los niveles de la infección vuelven a bajar, manteniéndose la infección latente en invierno (Figueras y Montes, 1988; Audemard *et al.*, 2001).

El género *Marteilioides* Comps, Park et Desportes, 1986 presenta también especies parásitas de moluscos. *Marteilioides branchialis* Anderson et Lester, 1992 provoca lesiones en las branquias de *Saccostrea glomerata* (Anderson y Lester, 1992). *Marteilioides chungmuensis* Comps, Park et Desportes, 1986 parasita los ovocitos de *Crassostrea gigas* (Comps et al., 1987; Itoh et al., 2004). Otras especies del género *Marteilioides* infectan a la ostra *Saccostrea echinata* (Quoy et Gaymard, 1835) en Australia y a la almeja japonesa *Ruditapes philippinarum* en Japón (Hine y Thorne, 2000; Itoh et al., 2005).

Protozoa incertae sedis

Mikrocytos mackini es la causa de la enfermedad de la isla de Denman. Afecta a *Crassostrea gigas* en la costa pacífica de Canadá y el estado de Washington (E.E.U.U.). Puede afectar también a las especies *Crassostrea virginica*, *Ostrea edulis* y *Ostrea conchaphila* (Carpenter, 1857) (Bower y McGladdery, 2003). Las ostras afectadas presentan manchas verdosas en el manto y depósitos oscuros en el lado interno de la concha. Presenta un pequeño tamaño, 1- 2 μm de diámetro, y fue relacionada primeramente con la especie *Bonamia roughleyi* (= *Mikrocytos roughleyi*) debido a sus características epizootiológicas (Farley et al., 1988). Se encuentra parasitando las células vesiculares del tejido conectivo. *Mikrocytos mackini* carece de mitocondria y su núcleo se encuentra en posición central. La filogenia realizada con un fragmento de la subunidad ribosómica 18S lo sitúa basal entre los eucariotas (Carnegie et al., 2003).

Enfermedades causadas por hongos

Los hongos juegan un importante papel en las redes tróficas de los ecosistemas como degradadores de los sustratos calcáreos. En ocasiones, los hongos pueden emplear como alimento las conchas de los moluscos, tanto muertos como vivos (Lauckner, 1983).

Ostracoblabe implexa Bornet et Flahault, 1889 es un hongo que causa la denominada enfermedad de la concha. Afecta a las especies *Ostrea edulis*, *Crassostrea gigas*, *Saccostrea cucullata* y *Crassostrea angulata* en Europa, India y Canadá. La enfermedad se limita a la concha, desarrollando puntos blancos en el exterior y depósitos de conquiolina en el interior. Estas malformaciones limitan el valor comercial del molusco. La enfermedad se desarrolla a temperaturas en torno a 22°C. Es importante controlar la presencia de restos calcáreos en las zonas afectadas, que podrían actuar como reservorio del hongo (Lauckner, 1983; Li *et al.*, 1983; Raghukumar y Lande, 1988; Bower y McGladdery, 2003).

El hongo *Sirolopidium zoophthorum* Vishniac, 1955 es la causa de la micosis larvaria en la ostra *Crassostrea virginica* y en la almeja *Mercenaria mercenaria* (Davis *et al.*, 1954). Esta enfermedad afecta a criaderos de la costa este de los E.E.U.U. (Bower y McGladdery, 2003) y ha sido señalada como una posible enfermedad emergente en la bahía de Chesapeake, con posibles efectos adversos en el desarrollo larvario de varias especies de bivalvos (White y Burreson, 2006).

Un hongo de origen desconocido afecta al mejillón *Mytilus edulis* en la costa este de Canadá, degradando el periostraco y

produciendo manchas marrones en la concha (Bower y McGladdery, 2003).

Recientemente, se ha asociado una levadura del orden Chaetothyriales a las mortalidades del mejillón batial *Bathymodiolus brevior* von Cosel, Metivier et Hashimoto, 1994 en una fumarola de la plataforma de las islas Fidji. Origina una importante reacción hemocitaria en los mejillones, llegando a causar la disgregación de los tejidos (Van Dover *et al.*, 2007).

Enfermedades causadas por metazoos

Casi todos los grandes grupos de animales invertebrados presentan alguna forma parásita en moluscos. Habitualmente, los parásitos metazoos no son causa de fuertes mortalidades en moluscos, y en muchas ocasiones, si estas se producen, son derivadas de la menor capacidad de adaptación del molusco parasitado a los cambios ambientales.

Phylum Porifera

El principal problema patológico asociado a las esponjas es el producido por las esponjas perforantes, que colonizan las conchas de los moluscos, y las debilitan, volviendo a los moluscos más susceptibles a los ataques de depredadores (Lauckner, 1983; Figueras y Villalba, 1988; Bower y McGladdery, 2003). Es normal que se originen retrasos en el crecimiento debido al gasto energético que emplea el molusco en la reparación de la concha (Figueras y Villalba, 1988). La competencia por los nutrientes también tiene un papel en esta asociación (Lauer y Spacie, 2000). El reblandecimiento de las conchas de los moluscos causa un importante efecto sobre el aspecto

natural del molusco, lo que conlleva un rechazo por parte del consumidor.

Phylum Platyhelminthes

Entre los platelmintos, cabe destacar los parásitos turbelarios *Urastoma cyprinae* (Graff, 1882) y *Paravortex* sp. (Villalba *et al.*, 1993a; Robledo *et al.*, 1994d; Canestri-Trotti *et al.*, 1998; Figus *et al.*, 2002). Los trematodos digeneos son parásitos de ciclo heteroxeno, que desarrollan parte de su ciclo vital en moluscos y su principal efecto es la castración de los moluscos afectados (Lauckner, 1983; Bower y McGladdery, 2003), aunque en ocasiones, estos trematodos pueden ser causa de infestaciones en el hombre, por lo que su presencia debe ser controlada (Chai *et al.*, 2001).

Phylum Annelida

Los anélidos poliquetos también pueden causar daños importantes en la producción de moluscos, debido a las galerías que habitualmente excavan en las conchas y que pueden provocar malformaciones, además de retraso en el crecimiento debido al gasto energético empleado por el molusco en la reconstrucción de la concha (Lauckner, 1983; Figueras y Villalba, 1988; Bower y McGladdery, 2003). El poliqueto sabélido *Terebrasabella heterouncinata* Fitzhugh *et* Rouse, 1999 es especialmente dañino en la producción de oreja de mar en diferentes partes del mundo provocando retraso del crecimiento y causando debilidad y finalmente mortalidades (Ruck y Cook, 1998; Bower, 2000, 2003; Bower y McGladdery, 2003).

Phylum Arthropoda

Los parásitos del género *Mytilicola* Steuer, 1902, principalmente *Mytilicola intestinalis* Steuer, 1902 en Europa y *Mytilicola orientalis* Mori, 1935 en Asia y Norteamérica son copépodos que se encuentran frecuentemente parasitando la glándula digestiva de múltiples moluscos, principalmente ostras y mejillones. El principal problema asociado es el retraso en el crecimiento del molusco y la pérdida de condición (Lauckner, 1983; Robledo *et al.*, 1994c; Canestri-Trotti *et al.*, 1998; Steel y Mulcahy, 2001; Bower y McGladdery, 2003; Rayyan *et al.*, 2004).

OBJETIVOS

Objetivos

Objetivo general

Profundizar en el desarrollo de técnicas de diagnóstico y caracterizar molecularmente los principales patógenos de moluscos presentes en Galicia.

Objetivos específicos

- Validar la diagnosis por PCR para cada una de las tres principales enfermedades de moluscos bivalvos presentes en Galicia.
- Caracterizar molecularmente las diferentes variedades de los principales parásitos que causan mortalidades en diferentes lugares del mundo.
- Caracterizar las enfermedades que inciden en el cultivo de una nueva especie de molusco de interés empresarial: *Haliotis tuberculata*.

**CAPÍTULO 1: AVANCES EN EL DIAGNÓSTICO
DE LAS PRINCIPALES ENFERMEDADES DE
MOLUSCOS PRESENTES EN GALICIA**

Capítulo 1: Avances en el diagnóstico de las principales enfermedades de moluscos presentes en Galicia

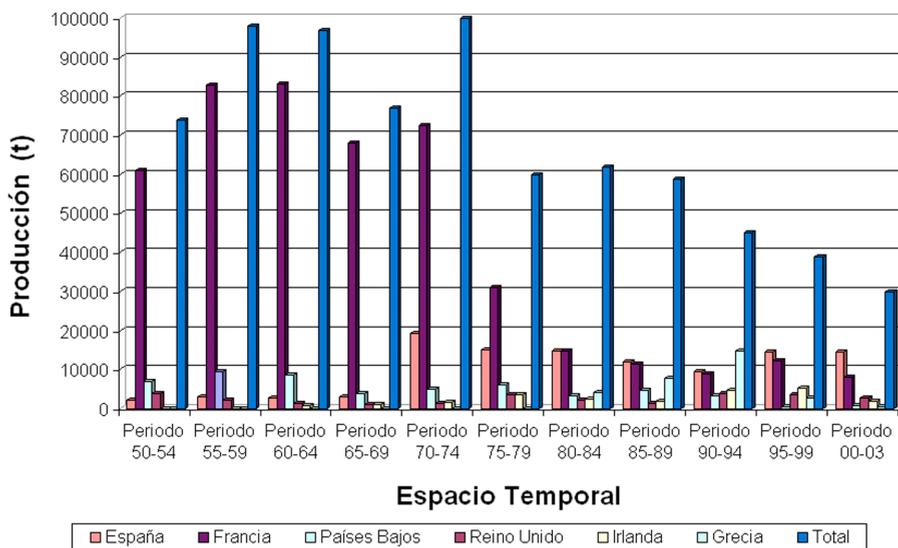
Introducción

La O.I.E (Oficina Internacional de las Epizootias) es el organismo internacional encargado de diseñar la política de control de las distintas enfermedades animales, intentando limitar su dispersión y evitar el origen de severas pérdidas económicas a los productores y/u ocasionar peligro para el ser humano, como ocurre con diversas enfermedades del ganado. Como parte de su estrategia de control, se elabora una lista, donde se incluyen las principales enfermedades animales. Tanto la bonamiosis, como la perkinsosis y la marteiliosis pertenecen a dicha lista, las denominadas enfermedades de declaración obligatoria, lo cual obliga a un estado a notificar los brotes que eventualmente se puedan producir de dichas enfermedades en su territorio y a establecer un sistema de separación entre zonas libres y no libres de la enfermedad (O.I.E., 2007). Las zonas libres pueden exportar molusco vivo para acuicultura a cualquier otra zona y las zonas no libres solamente pueden exportar a otra zona no libre para dicha/s enfermedad/es. La clasificación de una región como zona libre o no libre de una determinada enfermedad tiene por tanto importantes consecuencias económicas para la producción acuícola.

Para el correcto diagnóstico de una enfermedad, la O.I.E. recoge en su *Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals* (Manual de pruebas de diagnóstico para animales acuáticos) una serie de técnicas

de detección para cada patógeno de la lista. Estas técnicas son el análisis histopatológico de los moluscos (tanto en el caso de la bonamiosis, como de la perkinsosis y la marteiliosis), el análisis citológico (tanto para la bonamiosis como para la marteiliosis), la microscopía electrónica de transmisión para la bonamiosis y el cultivo en medio tioglicolato (RFTM) para la perkinsosis (O.I.E., 2006).

Figura 1.1: Producción de la especie *Ostrea edulis* en Europa según los datos obtenidos en la base de datos de cantidades de producción de acuicultura FAO Fishstat (F.A.O., 2003). Los periodos temporales son ciclos de cinco años. El último ciclo solo abarca del 2000 al 2003.



En Europa la producción de ostra plana (*Ostrea edulis*) ha caído desde los años 60 debido en parte a la acción combinada de dos protozoos; *Marteilia refringens* y *Bonamia ostreae*. La producción total de ostra plana en Europa pasó desde prácticamente las 99.914 Tm de la primera mitad de la década de los 70, justo antes de que se presentara el problema de la marteiliosis a las 38.843 Tm de la segunda mitad de los años 90 (Fig. 1.1) (F.A.O., 2003). La producción

conjunta de las almejas de la familia Veneridae en Europa se muestra en la figura 1.2, donde podemos apreciar una estabilización en el crecimiento de la producción en la Península Ibérica, que podría estar influenciado por la aparición del parásito *Perkinsus olseni* (= *Perkinsus atlanticus*) asociado a mortalidades de almeja fina en Portugal y Galicia a finales de los años 80 (González Herrero *et al.*, 1987; Azevedo, 1989b; Figueras *et al.*, 1992; Casas *et al.*, 2002). La producción en Europa de las dos principales especies de mejillones, *Mytilus edulis* y *Mytilus galloprovincialis* se presenta esquematizada en la figura 1.3. La producción de mejillón no se ha visto hasta el momento afectada por ninguna mortalidad de importancia, ya que si bien *Marteilia refringens* aparece en mejillones cultivados en Galicia, su presencia en esta especie no origina las elevadas mortalidades que se pueden observar en la ostra plana (Figueras y Montes, 1988; Figueras y Robledo, 1993; Villalba *et al.*, 1993b).

Figura 1.2: Producción de las almejas de la familia Veneridae en Europa según los datos obtenidos en la base de datos de cantidades de producción de acuicultura FAO Fishstat (F.A.O., 2003). Los periodos temporales son ciclos de cinco años. El último ciclo solo abarca del 2000 al 2003.

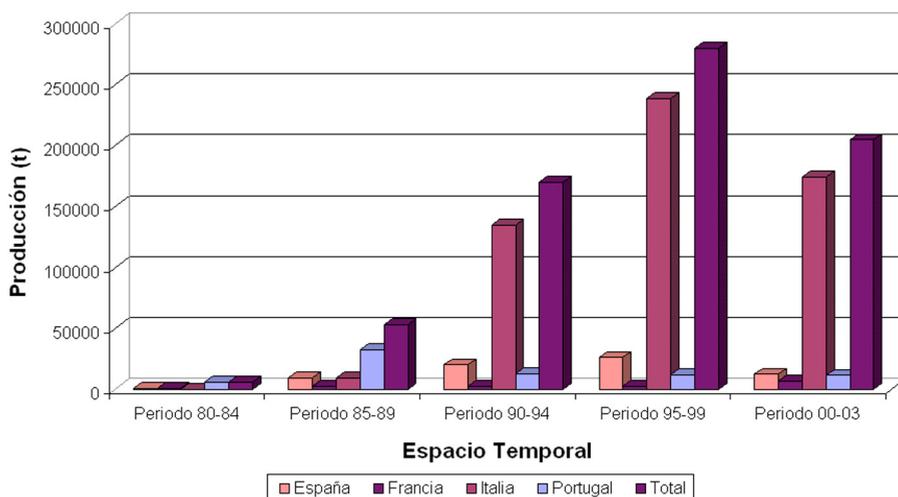
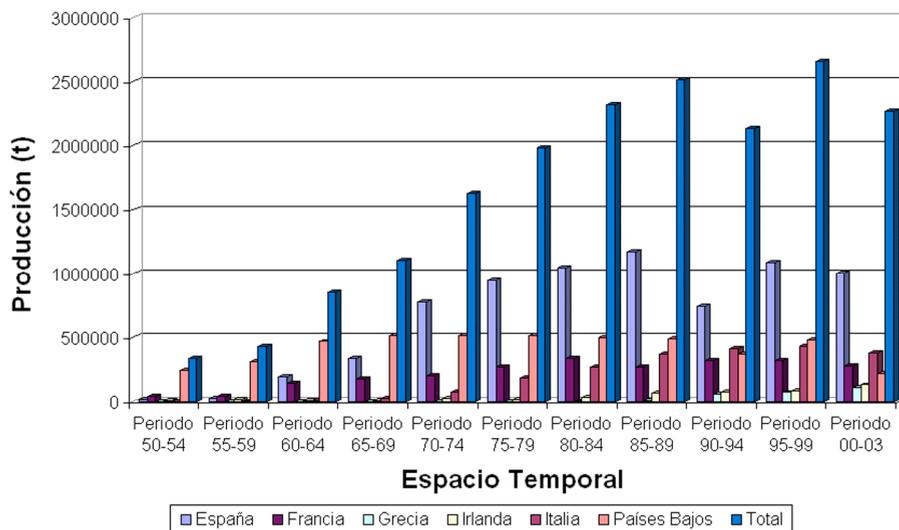
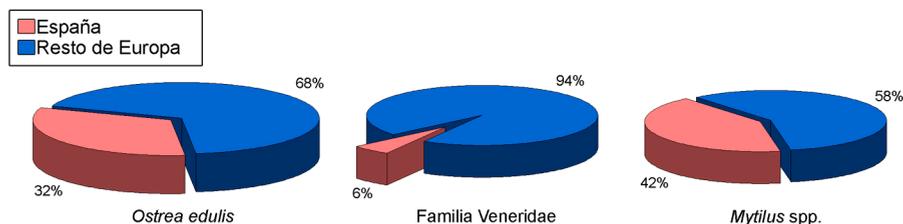


Figura 1.3: Producción de las dos principales especies comerciales de mejillón, *Mytilus edulis* y *Mytilus galloprovincialis*, en Europa según los datos obtenidos en la base de datos de cantidades de producción de acuicultura FAO Fishstat (F.A.O., 2003). Los periodos temporales son ciclos de cinco años. El último ciclo solo abarca del 2000 al 2003.



Durante el año 2003, España fue líder en la producción europea tanto de ostra plana como de mejillón, con un 32% de la ostra plana y un 42% del mejillón producido en toda Europa (Fig. 1.4). De esta producción, un importante porcentaje es cultivado en Galicia. Si bien las diferentes especies de almeja de la familia Veneridae no alcanzan esas cantidades relativas respecto a la producción del resto de Europa, su valor socioeconómico es importante, ya que este recurso en Galicia suele ser explotado por cofradías de mariscadores bajo un régimen de cooperativa, favoreciendo a un gran número de familias.

Figura 1.4: Porcentaje de la producción europea del año 2003 perteneciente a España de ostra plana, mejillón y almejas. Los datos fueron obtenidos en la base de datos de cantidades de producción de acuicultura *FAO Fishstat* (F.A.O., 2003)



Puesto que no es factible la erradicación de los parásitos una vez establecidos en una zona (Van Banning, 1987; Elston, 1990; Goggin y Lester, 1995; Culloty y Mulcahy, 2001), se debe evaluar el estado de salud y los posibles patógenos en los lotes de moluscos importados. Para ello se emplean habitualmente las técnicas de histología, citología y cultivo en medio tioglicolato, pero presentan problemas de aplicabilidad en cuanto a coste, falta de sensibilidad, de especificidad analítica en el caso del RFTM, tiempo de procesado (especialmente en el caso del análisis histológico) y la necesidad de contar con personal correctamente entrenado para la detección del parásito al microscopio óptico. Para poder mejorar este diagnóstico, aumentando la sensibilidad, la velocidad del análisis y disminuyendo el nivel de adiestramiento necesario para el personal encargado de los análisis, son cada vez más habituales las técnicas basadas en la detección del ADN del patógeno (Burreson, 1996; Cunningham, 2002).

Materiales y métodos

Animales y obtención de muestras

La tabla 1.1 y la figura 1.5 recogen las especies, procedencia y análisis realizados con el fin de comparar las técnicas de diagnóstico recomendadas por la O.I.E. con el análisis por PCR. En total, los dos laboratorios participantes; el Laboratorio Nacional de Referencia de Enfermedades de Moluscos Bivalvos del Instituto de Investigaciones Marinas de Vigo y la Unidad de Patología del Instituto Tecnológico para el Control del Medio Mariño de Galicia (INTECMAR) realizaron los mismos análisis sobre los mismos individuos (240 ostras, 270 almejas y 120 mejillones) con el fin de realizar una doble comparación tanto entre técnicas como entre laboratorios para evaluar dichas técnicas.

Los moluscos se abrieron con la ayuda de un cuchillo, separando cuidadosamente el cuerpo de la concha. De cada uno de los animales se tomaron dos muestras para la extracción de ADN, uno para cada laboratorio participante en el trabajo de comparación, un fragmento de tejido para análisis citológico (branquia para el caso de las ostras y glándula digestiva para el caso del mejillón) y el resto del cuerpo se utilizó para el análisis histopatológico. En el caso de las almejas no se realizó citología y en su lugar se tomó una de las láminas branquiales.

Tabla 1.1: Especies, procedencia y análisis realizados en los estudios de comparación de técnicas de diagnóstico de las principales enfermedades de moluscos bivalvos presentes en Galicia.

Especie	Número de muestras	Fecha	Análisis histopatológico	Análisis citológico	Cultivo en RFTM	PCR	Procedencia
<i>Ostrea edulis</i>	30	Nov- 2001	X	X		X	Ría de Arousa
<i>Ostrea edulis</i>	30	Nov- 2001	X	X		X	Ría de Arousa
<i>Ostrea edulis</i>	30	Nov- 2001	X	X		X	Ría de Arousa
<i>Ostrea edulis</i>	30	Nov- 2001	X	X		X	Ría de Ribadeo
<i>Ostrea edulis</i>	30	Nov- 2001	X	X		X	Ría de Arousa
<i>Ostrea edulis</i>	30	Nov- 2001	X	X		X	Ría de Arousa
<i>Ostrea edulis</i>	30	Nov- 2001	X	X		X	Ría de Arousa (Bretaña)
<i>Ostrea edulis</i>	30	Nov- 2001	X	X		X	Ría de Vigo
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	30	Abr- 2002	X	X		X	Ría de Arousa
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	30	Abr- 2002	X	X		X	Ría de Arousa
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	30	May- 2002	X	X		X	Ría de Vigo
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	30	May- 2002	X	X		X	Ría de Vigo
<i>Donax trunculus</i>	30	May- 2002	X		X	X	Ría de Corcubión
<i>Ruditapes decussatus</i>	14	May- 2002	X		X	X	Ría de Muros y Noia
<i>Ruditapes decussatus</i>	46	May- 2002	X		X	X	Ría de Pontevedra
<i>Ruditapes decussatus</i>	30	May- 2002	X		X	X	Ría de Vigo
<i>Venerupis pullastra</i>	30	May- 2002	X		X	X	Ría de Vigo
<i>Venerupis pullastra</i>	30	May- 2002	X			X	Ría de Arousa
<i>Venerupis rhomboides</i>	30	May- 2002	X			X	Ría de Arousa
<i>Ruditapes philippinarum</i>	30	May- 2002	X			X	Ría de Arousa
<i>Ruditapes decussatus</i>	30	Nov- 2003	X			X	Ría de Ferrol

Figura 1.5: Origen de los moluscos empleados en los estudios de comparación de técnicas de diagnóstico de las principales enfermedades de moluscos bivalvos presentes en Galicia.



Análisis citológico

El procedimiento empleado para la realización del análisis citológico está detallado en el apéndice A. El tejido empleado fue branquia para las ostras y glándula digestiva para los mejillones. Se realizaron dos preparaciones de cada uno de los individuos para su análisis en cada uno de los laboratorios participantes en el proyecto.

Cultivo en medio RFTM

Para el análisis por RFTM se pusieron por separado los arcos branquiales de una hemibranchia en cultivo en medio tioglicolato (Cultimed), un arco branquial para cada uno de los laboratorios participantes. Se mantuvieron en dicho medio durante 72 h en la oscuridad. Tras su incubación, las branquias se empaparon en yodo

de lugol sobre un portaobjetos. Las muestras se observaron al microscopio óptico para determinar la presencia o ausencia de prezoosporangios, también denominados hipnosporas, que se observan como células redondeadas de color azul oscuro- negro. Las muestras se clasificaron aplicando el índice de Ray (Ray, 1954) (Tabla 1.2). Este procedimiento está detallado en el apéndice B.

Tabla 1.2: Índice de Ray para la medida semicuantitativa según la técnica de RFTM de la intensidad de infección por *Perkinsus olseni*.

Intensidad de infección	Descripción
0	<u>Negativo:</u> Ninguna hipnospora en la preparación
1	<u>Infección muy ligera:</u> De una a 10 hipnosporas en toda la preparación
2	<u>Infección ligera:</u> De 10 a 100 hipnosporas en toda la preparación
3	<u>Infección moderada:</u> Hipnosporas agrupadas en agregaciones de 25 a 50 células. Áreas libres de hipnosporas presentes
4	<u>Infección media:</u> Algunas zonas se pueden ver teñidas macroscópicamente con el yodo de lugol. Hipnosporas presentes en todos los campos
5	<u>Infección intensa:</u> A nivel macroscópico, se tiñe menos de la mitad del tejido
6	<u>Infección muy intensa:</u> La mayor parte del tejido es de color azul oscuro o negro tras la tinción con yodo de lugol debido a la abundancia de hipnosporas

Análisis histopatológico

Para el análisis histopatológico, el fragmento resultante del molusco una vez tomadas las muestras para los análisis molecular y citológico o RFTM, se introdujo en fijador Davidson (Shaw y Battle, 1957). Tras la fijación, el tejido fue almacenado en solución de Davidson hasta su procesado. Se seccionó el tejido en fragmentos de aproximadamente 5 mm de grosor incluyendo manto, gónada, branquia, glándula digestiva, riñón y pie. Se deshidrataron a través de una serie de pasos en alcoholes de graduación ascendente y finalmente se incluyeron en parafina. Se tomaron secciones de 5 µm de grosor con la ayuda de un microtomo y fueron teñidas con hematoxilina y eosina. El proceso está detallado en el apéndice C.

Aislamiento de ADN y análisis por PCR

El aislamiento de ADN fue realizado con *DNAzol* (Invitrogen Life Technologies) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se midió la concentración en un espectrofotómetro *RNA/DNA calculator GeneQuant* (Pharmacia Biotech), calculándose la concentración según se describe en el apéndice D. La concentración de ADN se ajustó a un rango entre 10 y 50 ng μl^{-1} con NaOH 8mM.

Las secuencias de los cebadores empleados en las PCR de diagnóstico están resumidas en la tabla 1.3.

Tabla 1.3: Cebadores empleados para la detección del ADN de los principales parásitos causantes de enfermedades de moluscos bivalvos presentes en Galicia.

Cebador	Secuencia 5' > 3'	Dirección	Organismo	Tamaño	Referencia
Bo	CATTTAATTGGTCGGGCCGC	Directa	<i>Bonamia</i> spp.	300 pb	Carnegie <i>et al.</i> , 2000
BoAs	CTGATCGTCTTCGATCCCC	Reversa			
Perk-ITS S	CTTAGAGGAAGGAGAAGTCGTAAC	Directa	<i>Perkinsus</i> spp.	826 pb	Kotob <i>et al.</i> , 1999
Perk-ITS As	GCTTACTTATATGCTTAAATTCAG	Reversa			
Pk-ITS1 S	TCTGCGAACTAGCGGTCTT	Directa	<i>Perkinsus olseni</i>	673 pb	Presente tesis
Pk-ITS2 As	ACCGACAAGCGTCTATGAT	Reversa			
2S	CCGCACACGTTCTTCACTCC	Directa	<i>Marteilia refringens</i>	412 pb	Le Roux <i>et al.</i> , 2001
3As	CTCGCGAGTTTCGACAGACG	Reversa			

- Bonamiosis

Para la detección del ADN *Bonamia ostreae*, se emplearon los cebadores *Bo* y *BoAs* (Cochennec *et al.*, 2000) que amplifican un fragmento de unas 300 pb del gen de la subunidad ribosómica pequeña (*18S*). La reacción se realizó en un volumen de 25 μl con 10 mM de Tris, 50 mM de KCl (pH 8.3), 2 mM de MgCl_2 , 0.4 mM de dNTPs, 0.4 μM de cada cebador y 0.05 U de *Taq* polimerasa. Se añadió 1 μl de ADN (entre 10 y 50 ng). La reacción, consistente en una desnaturalización a 95°C durante 5 min, seguida de treinta ciclos formados por una fase de desnaturalización a 94°C durante 1 min,

una fase de hibridación a 55°C durante 1 min y una fase de extensión a 95° durante 1 min con una extensión final a 72°C durante 10 min se programó en un termociclador *Applied Biosystems Gene Amp® PCR system 9700 thermocycler* (Applied Biosystems). En cada ensayo por PCR se incluyó como control positivo una muestra fuertemente parasitada con *Bonamia ostreae* y como control negativo un tubo sin ADN. Los productos de PCR fueron visualizados y fotografiados tras ser separados en un gel de agarosa al 1% (p/v) en tampón TAE (Tris-acetato 40mM; EDTA 1mM) teñido con bromuro de etidio y mientras se iluminaban con luz ultravioleta a 488 nm.

- **Perkinsosis**

La detección por PCR de *Perkinsus olseni* fue realizada mediante una PCR anidada. En la primera PCR se emplearon los cebadores *Perk-ITS S* y *Perk-ITS As* (Kotob *et al.*, 1999a), situados en los extremos 3' y 5' de los genes del ARNr 18S y 28S del parásito, respectivamente. Puesto que esta reacción también amplificaba la misma región del molusco, y siendo ambos fragmentos amplificados de tamaño similar, se diseñaron dos cebadores específicos para *Perkinsus olseni* con la ayuda de las secuencias depositadas en la base de datos *GenBank*. La reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen de 25 µl, con 2.5 µl de tampón 10x (10 mM de Tris, 50 mM de KCl; pH 8.3), 2.5 mM de MgCl₂, 0.2 mM de cada uno de los dNTPs, 0.2 µM de cada cebador, 1 µl de ADN (entre 10 y 50 ng) y 0.025 U de *Taq* polimerasa. Las condiciones empleadas en la amplificación fueron: un ciclo inicial a 94°C durante 4 min, 42 ciclos formados por una desnaturalización a 94°C durante 1 min y 11 s, una fusión a 50°C durante 1 min y 22 s y una extensión a 72°C durante 1 min y 11 s, y

una extensión final durante 10 min. Para la segunda PCR, los cebadores *Pk-ITS1 S* y *Pk-ITS2 As* fueron empleados en una reacción consistente en 2.5 µl de tampón 10x (10 mM de Tris, 50 mM de KCl; pH 8.3), 2 mM de MgCl₂, 0.16 mM de cada uno de los dNTPs, 0.16 µM de cada cebador, 1 µl del producto de la PCR anterior y 0.025 U de *Taq* polimerasa. Las temperaturas programadas en el termociclador fueron las siguientes: un ciclo inicial de desnaturalización a 95°C durante 5 minutos, 35 ciclos formados por una desnaturalización a 94°C durante 1 min y 30 s, una fusión a 50°C durante 1 min y 30 s y una extensión a 72°C durante 1 min y 30 s con una fase de extensión final a 72°C durante 10 min. En cada ensayo por PCR se incluyó ADN de una almeja fuertemente parasitada con *Perkinsus olseni* como control positivo y la mezcla de reacción sin ADN como control negativo. Los productos de PCR fueron visualizados en un gel de agarosa al 1% en tampón TAE (p/v) de la misma manera que en el caso de *Bonamia ostreae*.

- **Marteiliosis**

Para la amplificación del ADN de *Marteilia* sp. procedente de *Mytilus galloprovincialis*, se emplearon unos cebadores descritos en la región ITS de *Marteilia* (Le Roux *et al.*, 2001; O.I.E., 2006). Las reacciones de PCR se realizaron en volúmenes finales de 25 µl, con 2.5 µl de tampón 10x (10mM de Tris, 50 mM de KCl; pH 8.3), 2.5 mM de MgCl₂, 0.4 mM de dNTPs, 0.4 µM de cada uno de los cebadores, 0.05U de enzima *Taq* polimerasa y 1 µl de ADN (entre 10 y 50 ng). El perfil de temperaturas fue: 5 min a 94°C de desnaturalización inicial, 30 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 1 min, fusión a 55°C durante 1 min y extensión a 72°C durante 1 min y una extensión final

de 5 min a 72°C. En cada ensayo por PCR se incluyó como control positivo ADN de un mejillón fuertemente parasitado con *Marteilia* sp. y como control negativo una mezcla de reacción sin ADN. Los productos de PCR fueron visualizados en un gel de agarosa al 1% (p/v) en tampón TAE de la misma manera que en el caso de *Bonamia ostreae* y *Perkinsus olseni*.

Clonaje y secuenciación del ADN

Los productos de PCR obtenidos fueron secuenciados tras su ligación en vector p-GEM T (Promega) o pCR 2.1 (Invitrogen Life Technologies). En el caso de *Bonamia ostreae*, se cortó del gel la banda del tamaño esperado con la ayuda de un bisturí y se purificó con el sistema *Microcon PCR* (Millipore) siguiendo las instrucciones del fabricante. En el caso de *Perkinsus olseni* y *Marteilia refringens*, el producto de PCR se ligó en el vector sin purificación previa. El clonaje y selección de clones se realizó como está descrito en el apéndice E.

Los clones del tamaño esperado se seleccionaron y fueron secuenciados en un secuenciador *ABI Prism 377 DNA sequencer* (Applied Biosystems). Las secuencias obtenidas en nuestro laboratorio fueron comparadas con las existentes en la base de datos *GenBank* empleando el programa BLASTn (Altschul *et al.*, 1990).

Hibridación *in situ*

La hibridación *in situ* está basada en la capacidad de los ácidos nucleicos de hibridar con una sonda de secuencia complementaria. Esta sonda se realiza sintetizándola junto con un marcador que

podamos detectar posteriormente. Los ácidos nucleicos de las células presentes en el tejido original se encuentran conservados en las preparaciones histológicas fijadas, de tal forma que tras la rehidratación y permeabilización del tejido y la desnaturalización de los ácidos nucleicos del mismo, se puede hibridar la sonda con su ácido nucleico diana y detectar posteriormente su presencia en la región de interés del tejido mediante microscopía óptica. Aunque los ácidos nucleicos se conserven, siempre hay un cierto grado de daño, por lo que es interesante diseñar sondas que hibriden con una diana que presente múltiples copias en el genoma.

En este caso, la hibridación *in situ* se realiza incorporando digoxigenina al producto de PCR amplificado mediante el kit *PCR Dig Labelling Mix* (Roche) siguiendo el protocolo detallado en el apéndice F.

Análisis epizootiológicos

Los parámetros epizootiológicos calculados están resumidos en la tabla 1.4. La sensibilidad de cada ensayo fue calculada como la proporción de muestras diagnosticadas positivas por la prueba objeto de estudio, de las muestras diagnosticadas como positivas por el test de oro. Mide el porcentaje de verdaderos positivos de una población. De una manera análoga, la especificidad de un ensayo fue calculada como la proporción de muestras diagnosticadas como negativas por el ensayo objeto de estudio, de las muestras diagnosticadas como negativas por el test de oro. Mide el porcentaje de verdaderos negativos de una población (Jacobson, 1996; Knottnerus *et al.*, 2002; Stevenson, 2005). En epizootiología, test de oro se considera aquella

prueba de diagnóstico que es considerada como definitiva, aunque su empleo se vea limitado en diagnosis debido a su coste, al tiempo necesario para su desarrollo o a la dificultad de realizarla. En muchas ocasiones, no existe tal prueba definitiva.

Tabla 1.4: Tabla de contingencia y parámetros epizootiológicos calculados para la comparación de las diferentes técnicas de diagnóstico de las principales enfermedades de moluscos bivalvos presentes en Galicia.

Test evaluado	Test de oro	
	Positivo	Negativo
	A	B
	Positivo	Negativo
	C	D

Test positivo	A+B
Test negativo	C+D
Sanos	A+C
Enfermos	B+D
Total (N)	A+B+C+D
Sensibilidad	A/(A+C)
Especificidad	D/(B+D)
VPP	A/(A+B)
VPN	D/(C+D)
Índice κ	$\frac{(((A+D)/N) - (((A+B)/N) \times ((A+C)/N)) + (((C+D)/N) \times ((B+D)/N))}{1 - (((A+B)/N) \times ((A+C)/N) + (((C+D)/N) \times ((B+D)/N))}$

El valor predictivo positivo (VPP) se calcula como la proporción de positivos inequívocos divididos por el número de positivos diagnosticados por el ensayo evaluado. Mide la probabilidad de que un animal cuyo análisis es positivo, realmente sea portador de la enfermedad, lo que da una idea de la probabilidad de obtener un falso positivo. De una manera análoga, el valor predictivo negativo (VPN) se calcula como la proporción de negativos inequívocos divididos por el número de negativos diagnosticados por el ensayo evaluado. Mide la probabilidad de que un animal cuyo análisis es negativo realmente no tenga la enfermedad, lo que indica la probabilidad de obtener un falso

negativo aplicando la técnica de diagnóstico evaluada (Pfeiffer, 2002; Stevenson, 2005).

El índice κ (Fegan, 2000) se emplea para medir el nivel de concordancia entre el análisis por PCR y la combinación de los métodos clásicos de diagnóstico en el caso de los análisis de bonamiosis y de marteiliosis, y para medir dicho nivel entre el análisis por PCR y el análisis histopatológico en el caso de la perkinsosis. El resultado obtenido fue comparado con una serie de umbrales arbitrarios recogidos en la tabla 1.5. Para la comparación entre laboratorios y entre métodos, se empleó el coeficiente de coincidencia simple, el cual da una medida de la similitud de dos métodos considerando que tanto un resultado positivo como uno negativo aportan la misma cantidad de información (Dunn y Everitt, 1982).

$$s_{ij} = \frac{a + d}{p}$$

dónde a es el número total de coincidencias, d el de diferencias y p el de caracteres evaluados.

Tabla 1.5: Umbrales arbitrarios para valorar el índice κ de acuerdo a Fegan (2000).

Valor de κ	Evaluación
>0.81	Concordancia muy buena
0.61-0.80	Concordancia buena
0.41-0.60	Concordancia moderada
0.21-0.40	Concordancia aceptable
0.01-0.20	Concordancia débil
0.00	Concordancia pobre

Resultados

Bonamiosis

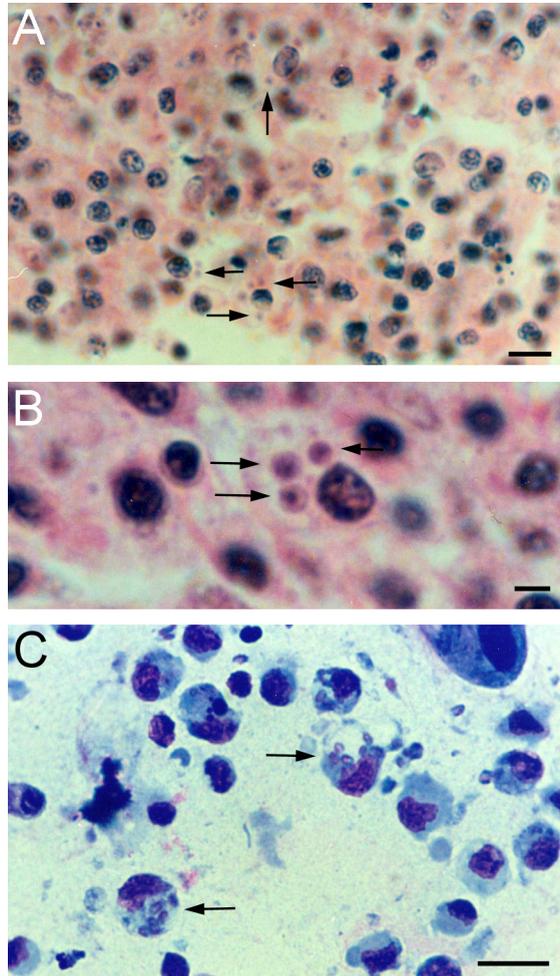
Análisis citológico

El aspecto de *Bonamia ostreae* en frotis citológicos es de un tamaño ligeramente mayor que en preparaciones histológicas (Fig. 1.6 C). En frotis, *Bonamia ostreae* se detecta en un 10.4% (25/240) y en un 14.2% (34/240) de las ostras analizadas en los laboratorios A y B, respectivamente. El análisis histológico revela que entre un 12.5 y un 8.3% de (30/240 y 20/240) de las muestras certificadas como negativas por frotis citológico son de hecho positivas (Tabla 1.6) y solo una muestra es diagnosticada como negativa por histología y positiva por citología en el laboratorio B.

Tabla 1.6: Resultados de los análisis histopatológico, citológico y por PCR realizados en los dos laboratorios participantes sobre los mismos ejemplares de *Ostrea edulis*. También se expresan los resultados de los dos métodos oficiales de la O.I.E. integrados. En cada casilla está señalado el número de muestras (arriba) y el porcentaje (abajo) obtenido en cada uno de los laboratorios. n=240. NA: No aplicable.

		PCR		Análisis citológico	
		Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
Análisis histopatológico	Positivo	51-50 (21.3-20.8)	4-3 (1.7-1.3)	25-33 (10.4-13.8)	30-20 (12.5-8.3)
	Negativo	23-28 (9.6-11.7)	162-159 (67.5-66.3)	0-1 (0-0.4)	185-186 (77.1-77.5)
Análisis citológico	Positivo	24-33 (10-13.8)	1-1 (0.4-0.4)	NA	
	Negativo	50-45 (20.8-18.8)	165-161 (68.8-67.1)		
Combinación de los análisis histopatológico y citológico	Positivo	51-50 (21.3-20.8)	4-4 (1.7-1.7)	NA	
	Negativo	23-28 (9.6-11.7)	162-158 (67.5-65.8)		

Figura 1.6: *Bonamia ostreae* (flechas) en *Ostrea edulis*. **A.** Preparación histológica de una muestra fuertemente parasitada. **B.** Detalle de un hemocito con tres células de *B. ostreae* en su interior. **C.** Frotis citológico de branquia de una ostra fuertemente infectada con *Bonamia ostreae*. Barra en A y C: 10 μm , barra en B: 3 μm .



Análisis histopatológico

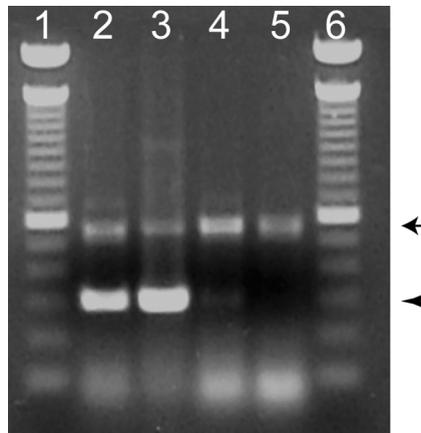
De acuerdo con el análisis histopatológico, *Bonamia ostreae* se observa como una inclusión citoplasmática con un diámetro que oscila entre 1 y 3 μm (Fig. 1.6 A,B). Es posible distinguir en estas inclusiones el propio núcleo y citoplasma del parásito, perfectamente diferenciado del citoplasma del hospedador (Fig. 1.6 B). *Bonamia*

ostreae se detecta en un 22.9% (55/240) y un 22.1% (53/240) de las ostras en los laboratorios A y B, respectivamente.

Análisis por PCR

La electroforesis de los productos de PCR amplificados con los cebadores *Bo/BoAs* revela una banda de 300 pb (Fig. 1.7) que pertenece a *Bonamia ostreae*, según desvela el programa BLASTn al comparar nuestra secuencia con las depositadas en la base de datos del *GenBank*. Esta banda se detecta en un 30.8% (74/240) de las muestras en el laboratorio A y en un 32.5% (78/240) de las muestras en el laboratorio B.

Figura 1.7: Gel de agarosa mostrando la detección del parásito *Bonamia ostreae* por PCR. Calle 1 y 6, marcador de ADN en escalera de 100 pb (Invitrogen Life Technologies); calle 2 y 3, ostras infectadas por *Bonamia ostreae* y positivas por las tres técnicas; calle 4, ostra positiva por PCR y negativa por análisis histológico y citológico; calle 5, ostra negativa por todos los análisis. La banda perteneciente a *Bonamia ostreae* está indicada con una cabeza de flecha y la perteneciente a *Ostrea edulis* con una flecha.



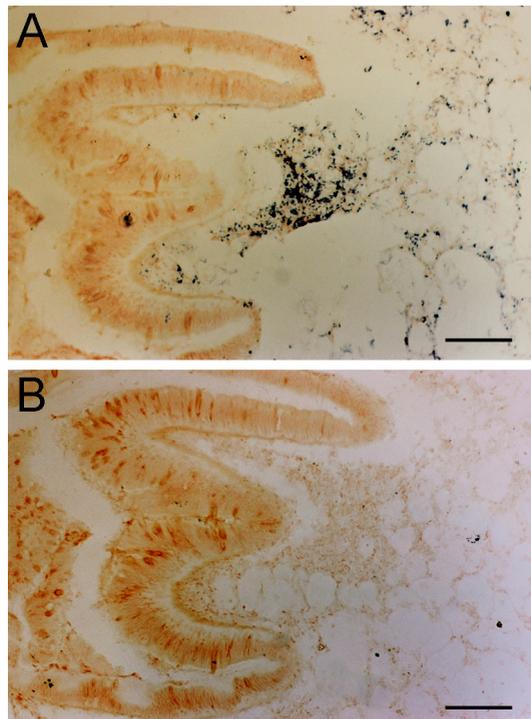
Entre el 9.6 y el 11.7% (23/240 y 28/240) de las muestras certificadas como negativas por el análisis histológico fueron diagnosticadas como positivas por la prueba de PCR y entre un 20.8 y un 18.8% (50/240 y 45/240) de las ostras catalogadas como negativas

por el análisis citológico de las branquias son clasificadas como positivas por PCR en los laboratorios A y B, respectivamente. La comparación de la PCR con la combinación de los análisis histológicos y citológicos implica una mayor detección de *Bonamia ostreae* (entre un 9.6 y un 11.7%) mediante la prueba de PCR que por los métodos habituales de diagnóstico.

Hibridación *in situ*

La hibridación *in situ* confirma la unión de la sonda *Bo/BoAs* con las células de *Bonamia ostreae* presentes en los tejidos fijados de *Ostrea edulis* (Fig. 1.8).

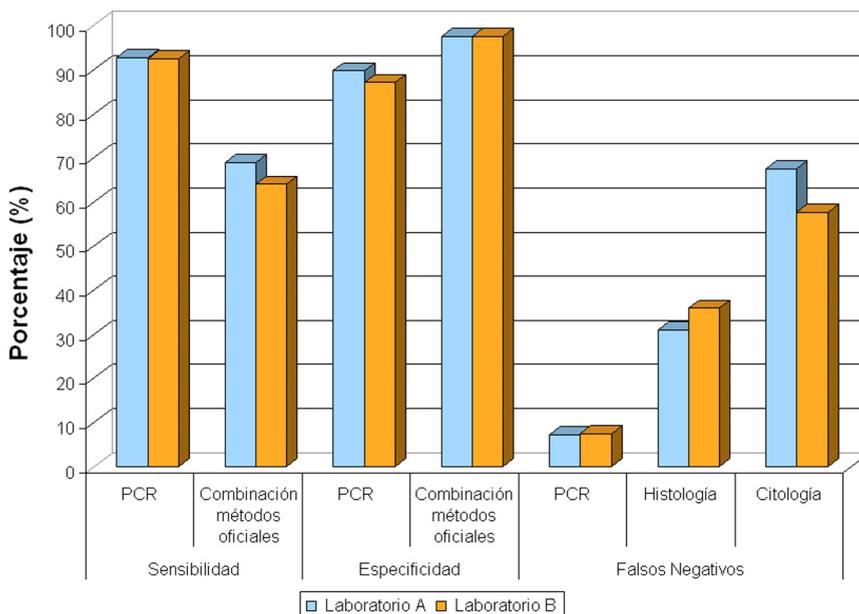
Figura 1.8: Hibridación *in situ* de tejidos de ostra plana, *Ostrea edulis*, infectada con *Bonamia ostreae* con una sonda construida con los cebadores empleados en la PCR diagnóstico de *Bonamia ostreae* y marcada con digoxigenina. **A.** Hibridación positiva. **B.** Control negativo con la sonda sin marcar. Barra en A y B: 200 μ m.



Análisis epizootiológicos

La sensibilidad de la técnica es mayor para el análisis por PCR (92.7% en el laboratorio A y 92.6% en el laboratorio B) que para la combinación de los métodos clásicos de diagnóstico, la histología y la citología (68.9 y 64.1%). La especificidad de la combinación de la histología y la citología es mayor que la de la técnica de PCR (97.6 y 97.5% contra 89.7 y 84.9%). En cambio, el porcentaje de falsos negativos para la PCR es el menor de todas las técnicas evaluadas (7.3 y 7.4%), mientras que la histología produce un 31.1 y un 35.9% y la citología llega a alcanzar un 67.6 y un 57.7% en los laboratorios A y B respectivamente (Fig. 1.9).

Figura 1.9: Sensibilidad, especificidad y falsos negativos de las técnicas empleadas para el diagnóstico de *Bonamia ostreae* en *Ostrea edulis* expresados en forma de porcentaje para los dos laboratorios participantes.



El VPP del análisis por PCR oscila entre un 68.9 y un 64.1% y el VPN entre un 97.6 y un 97.5%. El VPP de la combinación de las técnicas clásicas es 92.7 y 92.6% y el VPN alcanza un 87.6 y un 84.9% en los laboratorios A y B, respectivamente.

El valor del índice κ para el laboratorio A es 0.72 y para el laboratorio B es 0.67, lo cual revela una buena concordancia de acuerdo a los umbrales arbitrarios previamente establecidos (Tabla 1.5). La similitud entre laboratorios es de 0.94 y entre técnicas está resumida en la tabla Tabla 1.7. La similitud entre laboratorios para una técnica dada supera en todos los casos el 0.90. Comparando entre diferentes técnicas, este valor solo se supera en el laboratorio B en el caso de la comparación entre los resultados de histología y de citología.

Tabla 1.7: Comparativa entre técnicas para el diagnóstico de *Bonamia ostreae* en *Ostrea edulis* y entre los laboratorios participantes en este estudio de acuerdo al coeficiente de coincidencia simple (Dunn y Everitt, 1982).

	Similitud entre técnicas					
	PCR A	PCR B	Histología A	Histología B	Citología A	Citología B
PCR A	1.00					
PCR B	0.92	1.00				
Histología A	0.89	0.86	1.00			
Histología B	0.89	0.87	0.97	1.00		
Citología A	0.79	0.77	0.88	0.88	1.00	
Citología B	0.83	0.81	0.88	0.91	0.95	1.00

Perkinsosis

Cultivo en medio RFTM

Los resultados preliminares de RFTM son muy discordantes entre laboratorios, principalmente en las muestras con baja intensidad de infección. Para poder reajustar dichos datos, solo las

almejas con grados de infección de 2 a 6 en la escala de Ray (Tabla 1.2) se consideran como verdaderamente positivas y se emplean en los análisis comparativos. Las hipnosporas de *Perkinsus olseni* (Fig. 1.10 B) son detectadas en el 12.7 y el 10% de las 150 almejas analizadas por cultivo en tioglicolato en los laboratorios A y B, respectivamente. Según la combinación de las técnicas recomendadas por la O.I.E, en las 150 almejas evaluadas por todas las técnicas un 12.7 y un 10% de las almejas son positivas para la presencia de *Perkinsus olseni* en los laboratorios A y B, respectivamente (Tabla 1.8).

Tabla 1.8: Resultados de los análisis histopatológicos, de cultivo en RFTM y por PCR realizados en los dos laboratorios participantes sobre 150 almejas pertenecientes a diferentes especies (ver tabla 1.1). También se expresan los resultados de los dos métodos oficiales de la O.I.E. integrados (análisis histopatológico y cultivo en RFTM). En cada casilla está señalado el número de muestras (arriba) y el porcentaje (abajo) obtenido en cada uno de los laboratorios. NA: No aplicable.

		PCR		RFTM	
		Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
Análisis histopatológico	Positivo	2-2 (1.3-1.3)	1-0 (0.7-0)	1-2 (0.7-1.3)	2-0 (1.3-0)
	Negativo	5-4 (3.3-2.7)	142-144 (94.7-96)	18-13 (12-8.7)	129-135 (86-90)
Cultivo en RFTM	Positivo	2-2 (1.3-1.3)	17-13 (11.3-8.7)	NA	
	Negativo	5-4 (3.3-2.7)	126-131 (84-87.3)		
Combinación de los análisis histopatológico y cultivo en RFTM	Positivo	3-2 (2-1.3)	18-13 (12-8.7)	NA	
	Negativo	4-4 (2.7-2.7)	125-131 (83.3- 87.3)		

Análisis histopatológico

Mediante análisis histopatológico, *Perkinsus olseni* se puede observar normalmente asociado a lesiones histológicas como las infiltraciones de los tejidos (Fig. 1.10 A). Se detectan diferentes estadios del parásito, aunque la forma más característica son los trofozoítos maduros, células de forma esférica que presentan una

gran vacuola central y con el citoplasma en forma de anillo alrededor de dicha vacuola. Es frecuente observar las células de *Perkinsus* en grupos encapsulados de dos a más células, rodeados de una fuerte infiltración. Considerando todas las muestras analizadas, se detecta *Perkinsus olseni* en el 6.7 y el 5.9% de las 270 almejas analizadas en los laboratorios A y B, respectivamente (Tabla 1.9).

Figura 1.10: *Perkinsus olseni* (flechas) en branquia de almeja fina, *Ruditapes decussatus*. **A.** Preparación histológica de una muestra fuertemente parasitada. **B.** Branquia teñida con yodo de lugol tras su incubación en RFTM. Los diferentes estadios de desarrollo del parásito son fácilmente observables: trofozoíto inmaduro (A), trofozoíto maduro (B), grupo de trofozoítos maduro producido por la división de estos (C), disgregación del racimo de trofozoítos maduros (D), hiposporas (E). Se puede observar una importante infiltración hemocitaria (IH) en el tejido. Barra en A: 10 μm , barra en B: 100 μm .

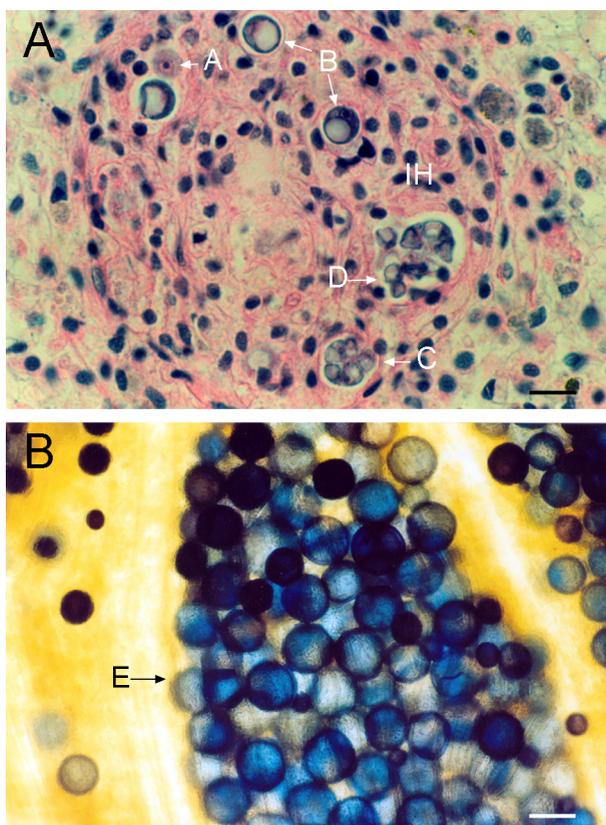


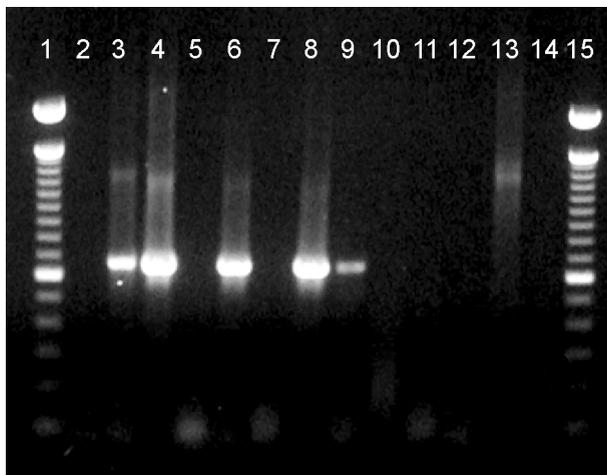
Tabla 1.9: Resultados de los análisis histopatológico y por PCR realizados en los dos laboratorios participantes sobre 270 almejas pertenecientes a diferentes especies (ver tabla 1.1). En cada casilla está señalado el número de muestras (arriba) y el porcentaje (abajo).

		PCR	
		Positivo	Negativo
Histología	Positivo	17-14 (6.3-5.2)	1-2 (0.4- 0.7)
	Negativo	6-9 (2.2-3.3)	246-245 (91.1-90.7)

Análisis por PCR

El producto de PCR de 673 pb, cuya secuencia corresponde a *Perkinsus olseni* tras la comparación por medio del programa BLASTn con las secuencias depositadas en el *GenBank*, se detecta en el 8.5% de las muestras en ambos laboratorios (Fig. 1.11; Tabla 1.9).

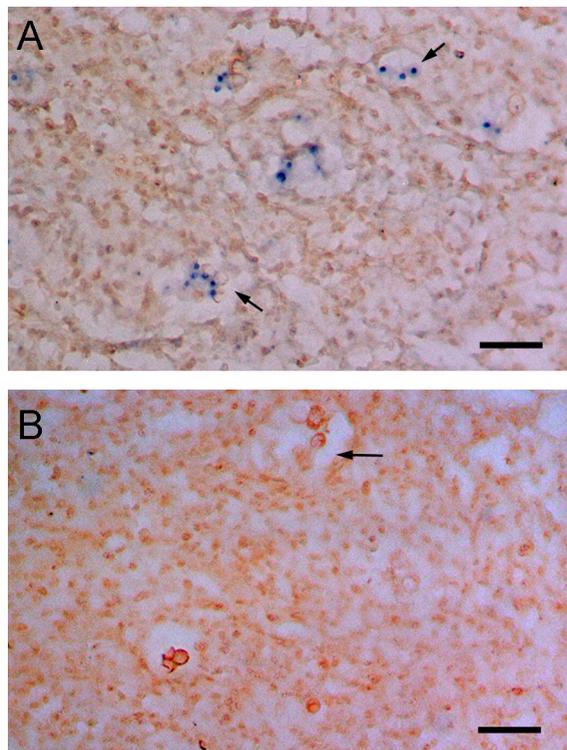
Figura 1.11: Gel de agarosa mostrando la detección del parásito *Perkinsus olseni* por PCR. Calles 1 y 15, marcador de ADN en escalera de 100 pb (Invitrogen Life Technologies); calle 2, control negativo sin ADN; calle 3, control positivo con ADN de una almeja fuertemente parasitada; calles 4, 6, 8 y 9, almejas parasitadas con *P. olseni*; calles 5, 7, 10, 11, 12, 13 y 14, almejas no infectadas.



Hibridación *in situ*

La hibridación *in situ* muestra que la sonda realizada con los cebadores diseñados para la PCR anidada (Tabla 1.3) hibrida con las células de *Perkinsus olseni* (Fig. 1.12).

Figura 1.12: Hibridación *in situ* de tejidos de almeja fina, *Ruditapes decussatus*, infectada con *Perkinsus olseni* con una sonda construida con los cebadores empleados en la PCR diagnóstico de *Perkinsus olseni* y marcada con digoxigenina. La flecha indica diferentes células de *Perkinsus olseni*. **A.** Hibridación positiva. **B.** Control negativo con la sonda sin marcar. Barra en A y B: 50 μm .



Análisis epizootiológicos

Los resultados de la sensibilidad y de la especificidad de las diferentes pruebas para la detección de *Perkinsus olseni* están resumidos en las tablas 1.10 y 1.11. La sensibilidad de la PCR y de la

histología se ve seriamente reducida al considerar en los cálculos de la comparación los resultados de RFTM.

La sensibilidad de la PCR, considerando la histología únicamente como test de oro es 94.4 y 87.5% (Tabla 1.11) en los laboratorios A y B. Si consideramos la combinación de la histología y el RFTM como test de oro, la sensibilidad decrece de 14.3 a 13.3% (Tabla 1.10). De manera análoga, considerando únicamente el cultivo en RFTM como test de oro, los valores de sensibilidad son 10.5 y 13.3% en los laboratorios A y B (Tabla 1.10). La sensibilidad de la histología, con la PCR como test de oro es 73.9 y 60.9% (Tabla 1.11). Aplicando el cultivo en RFTM como test de oro, la sensibilidad de la histología cae a 5.3 y 13.3% en los laboratorios A y B (Tabla 1.10). La sensibilidad del cultivo en RFTM comparada con la histología como test de oro, varía de 33.3 a 100% en los laboratorios A y B. Si consideramos la PCR como test de oro, los valores de sensibilidad son 28.6 y 33.3% (Tabla 1.10). La sensibilidad de la combinación de las técnicas recomendadas por la O.I.E., histología y RFTM, comparadas con la PCR como test de oro es 42.9 y 33.3% (Tabla 1.10).

Tabla 1.10: Resultados de sensibilidad, especificidad y falsos negativos de las diferentes técnicas para el diagnóstico de la perkinsosis considerando las muestras sobre las que se realizaron los análisis de PCR, histología y RFTM (n=150).

Técnica evaluada	Sensibilidad						Especificidad						Falsos negativos															
	PCR		Histología		RFTM		PCR		Histología		RFTM		Combinación métodos oficiales		PCR	Histología	RFTM											
Test de oro	Combinación métodos oficiales	14.3	RFTM	10.5	RFTM	5.3	Histología	33.3	PCR	28.6	PCR	42.9	Combinación métodos oficiales	96.9	RFTM	96.2	RFTM	98.5	Histología	87.8	PCR	88.1	PCR	87.4	12.0	3.3	3.3	
Laboratorio A	13.3	13.3	13.3	100.0	33.3	33.3	33.3	97.0	97.0	100.0	91.2	91.0	91.0	8.7														
Laboratorio B																												

Tabla 1.11: Resultados de sensibilidad, especificidad y falsos negativos de las diferentes técnicas para el diagnóstico de la perkinsosis considerando las muestras sobre las que se realizaron los análisis de PCR e histología (n=270). La PCR fue evaluada frente a la histología como test de oro y de forma complementaria la histología fue evaluada frente a la PCR como test de oro.

	Sensibilidad		Especificidad		Falsos negativos	
	PCR	Histología	PCR	Histología	PCR	Histología
Laboratorio A	94.4	73.9	97.6	99.6	0.4	1.9
Laboratorio B	87.5	60.9	96.5	99.2	0.7	4.1

La especificidad de la PCR con la histología funcionando como test de oro es 97.6 y 96.5% en los laboratorios A y B (Tabla 1.11). Si consideramos el cultivo en RFTM como test de oro, la especificidad de la PCR es 96.2 y 97.0% (Tabla 1.10). La comparación con la combinación de histología y cultivo en RFTM como test de oro resulta en valores de 96.9 y 97.0% en los laboratorios A y B, respectivamente (Tabla 1.10). La especificidad de la histología considerando la PCR como test de oro es de 99.6 y 99.2% (Tabla 1.11). Si consideramos el cultivo en RFTM como test de oro, esta especificidad es de 98.5 y 100% (Tabla 1.10). La especificidad del cultivo en RFTM, con la histología como test de oro es 87.8 y 91.2% y con la PCR como test de oro es 88.1 y 91.0%. La especificidad de las técnicas recomendadas por la O.I.E. combinadas considerando la PCR como test de oro es 87.4 y 91.0% (Tabla 1.10).

Tabla 1.12: Análisis epizootiológicos calculados para las técnicas de PCR y de histología para la diagnosis de *Perkinsus olseni*.

	Laboratorio	%
VPP PCR	A	73.9
	B	60.9
VPP Histología	A	94.4
	B	87.5
VPN PCR	A	99.6
	B	99.2
VPN Histología	A	97.6
	B	96.5

Los valores predictivo positivo (VPP) y predictivo negativo (VPN) se calcularon sobre las 270 almejas que fueron procesadas solamente para histología y PCR y los resultados se presentan resumidos en la tabla 1.12. El VPP del análisis por PCR es 73.9 y 60.9% es los laboratorios A y B. El VPN de la PCR varía entre el 99.6%

del laboratorio A y el 99.2% del laboratorio B. El VPP del análisis histológico es 94.4 y 87.5% y el VPN es 97.6 y 96.5% en los laboratorios A y B, respectivamente.

Tabla 1.13: Comparativa entre todas las técnicas empleadas en este estudio para el diagnóstico de *Perkinsus olseni* en los laboratorios participantes de acuerdo al coeficiente de coincidencia simple (Dunn y Everitt, 1982).

	Similitud entre técnicas					
	PCR A	PCR B	Histología A	Histología B	RFTM A	RFTM B
PCR A	1					
PCR B	0.95	1				
Histología A	0.96	0.97	1			
Histología B	0.97	0.97	0.99	1		
RFTM A	0.85	0.85	0.87	0.87	1	
RFTM B	0.91	0.89	0.91	0.91	0.87	1

Tabla 1.14: Comparativa entre las técnicas empleadas en este estudio para el diagnóstico de *Perkinsus olseni* sobre todas las muestras analizadas en los laboratorios participantes de acuerdo al coeficiente de coincidencia simple (Dunn y Everitt, 1982).

	Similitud entre técnicas			
	PCR A	PCR B	Histología A	Histología B
PCR A	1			
PCR B	0.94	1		
Histología A	0.97	0.95	1	
Histología B	0.97	0.96	0.99	1

Las concordancias entre técnicas y laboratorios se presentan en las tablas 1.13 y 1.14. Los valores se encuentran entre el 0.99 de similitud entre la histología en ambos laboratorios y el 0.85 comparando la PCR en ambos laboratorios con la incubación de branquias en RFTM en el laboratorio A. La comparación entre laboratorios para una técnica dada fue superior al 0.95 en el caso de la PCR y de la histología y del 0.87 para el cultivo en RFTM. La comparación entre técnicas empleando el total de las muestras resulta en unos niveles de concordancia por encima del 0.94 en el caso de la PCR, y del 0.99 en el caso de la histología. El índice κ es 0.82 y 0.70,

demostrando una concordancia muy buena y buena en los laboratorios A y B, respectivamente.

Marteiliosis

Análisis citológico

El análisis citológico revela el aspecto característico de los esporontes teñidos con Hemacolor® (Fig. 1.13 C). En los dos laboratorios se detecta por citología un 4.2% de mejillones infectados con *Marteilia refringens*.

Análisis histopatológico

El análisis histopatológico muestra los esporontes de *Marteilia refringens* normalmente presentes en los túbulos de la glándula digestiva de *Mytilus galloprovincialis* con el clásico aspecto refringente que da nombre a la especie. Los primeros estadios en el desarrollo de esta especie se suelen observar en el estómago, intestino y epitelio de los túbulos digestivos, normalmente en la porción apical (Fig. 1.6). Es relativamente frecuente el observar a *Marteilia refringens* en forma de células primarias en el epitelio digestivo (Fig. 1.13 A). Los esporontes son la forma más característica, porque presentan gránulos refringentes eosinófilos fácilmente detectables al microscopio óptico (Fig. 1.13 B,C). Se observa la presencia de *Marteilia refringens* en un 5 y un 5.9% de las muestras analizadas en los laboratorios A y B, respectivamente.

Figura 1.13: A. Corte histológico de mejillón, *Mytilus galloprovincialis*. Células primarias de *Marteilia refringens* en el epitelio digestivo. B. Aspecto de una infección avanzada, con los túbulos digestivos del mejillón repletos de esporontes refringentes. C. Frotis de glándula digestiva. Barra en A, B y C: 50 μ m.

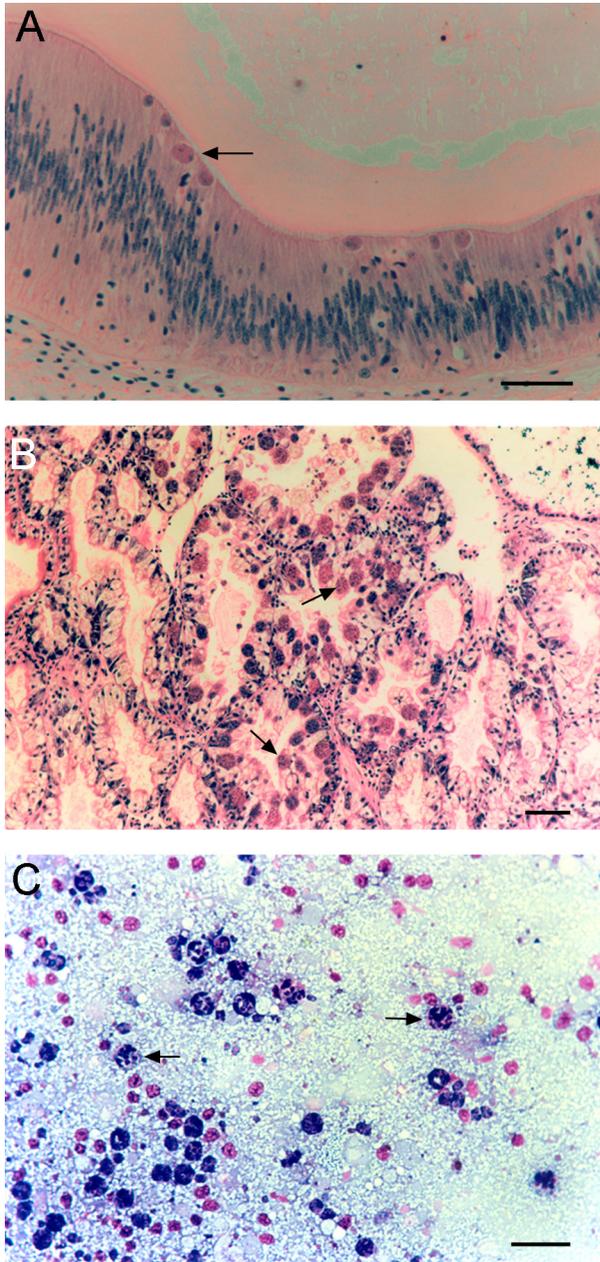


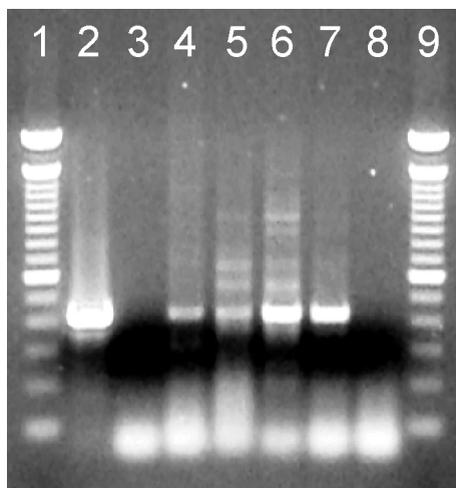
Tabla 1.15: Resultados de los análisis histopatológico, citológico y por PCR realizados en los dos laboratorios participantes sobre los mismos ejemplares de *Mytilus galloprovincialis*. También se expresan los resultados de los dos métodos oficiales de la O.I.E. integrados. En cada casilla está señalado el número de muestras (arriba) y el porcentaje (abajo) de los laboratorios. n=120. NA: No aplicable.

		PCR		Análisis citológico	
		Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
Análisis histopatológico	Positivo	4-5 (3.3-4.2)	2-2 (1.7-1.7)	5-5 (4.2-4.2)	1-2 (0.8-1.7)
	Negativo	1-21 (0.8-17.5)	113-92 (94.2-76.7)	0-0 (0.0-0.0)	114-113 (95.0-94.2)
Análisis citológico	Positivo	4-4 (3.3-3.3)	1-1 (0.8-0.8)	NA	
	Negativo	1-22 (0.8-18.3)	114-93 (95.0- 77.5)		
Combinación de los análisis histopatológico y citológico	Positivo	4-5 (3.3-4.2)	2-2 (1.7-1.7)	NA	
	Negativo	1-21 (0.8-17.5)	113-92 (94.2-76.7)		

Análisis por PCR

El producto de PCR de 412 pb (Fig. 1.14) pertenece a *Marteilia refringens*, como se pudo comprobar por medio del programa BLASTn comparando con las secuencias depositadas en la base de datos *GenBank*, y se detecta en el 4.1% y en el 21.7% de las muestras en los laboratorio A y B, respectivamente, presentando una gran diferencia entre laboratorios. La tabla 1.15 resume los resultados obtenidos en los diferentes laboratorios para cada una de las técnicas de diagnóstico.

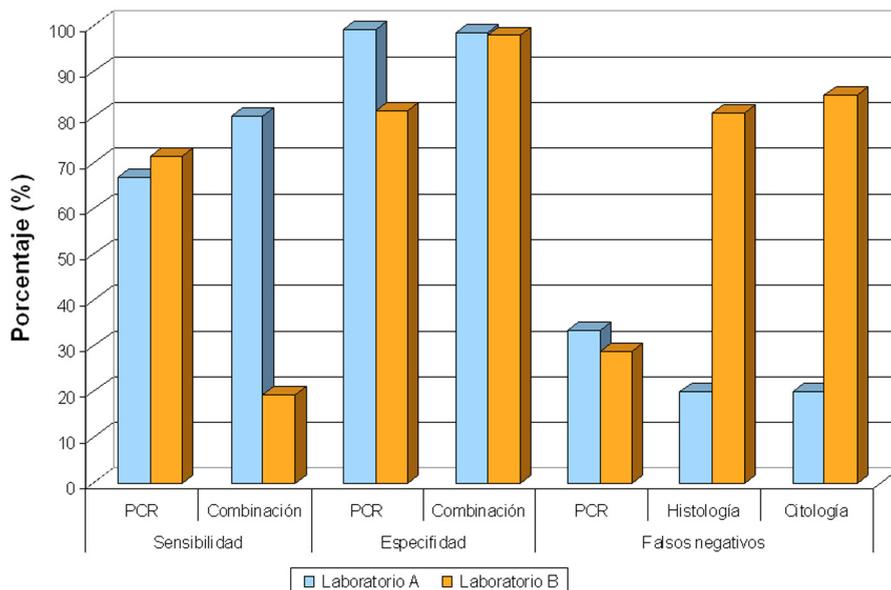
Figura 1.14: Gel de agarosa mostrando la detección del parásito *Marteilia refringens* por PCR. Calles 1 y 9, marcador de ADN en escalera de 100 pb (Invitrogen Life Technologies); calle 2, control positivo con ADN de una muestra fuertemente parasitada; calle 3, muestra negativa; calles 4, 5, 6 y 7, mejillones parasitados con *Marteilia refringens*; calle 8, control negativo sin ADN.



Análisis epizootiológicos

Los resultados de la sensibilidad y especificidad de las diferentes técnicas de diagnóstico están resumidos en la figura 1.15, empleando la PCR como test de oro frente a los análisis histopatológico y citológico y la combinación de estos dos análisis como test de oro frente a la PCR. La sensibilidad de la PCR en el laboratorio A (66.7%) es menor que la de la combinación de las técnicas recomendadas por la O.I.E., el análisis histopatológico y el análisis citológico (80% en todos los casos). En el laboratorio B, sin embargo, la PCR muestra una mayor sensibilidad (71.4%) que la combinación de las técnicas (19.2%). La especificidad de todas las técnicas fue muy elevada en el laboratorio A; 99.1% para la PCR y 98.3% para la combinación de las técnicas histológica y citológica. En el laboratorio B, la especificidad de la PCR se reduce hasta un 81.4%, frente al 97.9% de la combinación de las técnicas oficiales.

Figura 1.15: Sensibilidad, especificidad y falsos negativos de las técnicas empleadas para el diagnóstico de *Marteilia refringens* en *Mytilus galloprovincialis* expresados en forma de porcentaje para los dos laboratorios participantes.



El número de falsos negativos en el laboratorio A oscila entre el 33.3% de la diagnosis por PCR y el 20% de la diagnosis tanto por análisis histológico como citológico. En el laboratorio B, estos falsos negativos aumentan hasta un 28.6% para el diagnóstico por PCR, un 80.8% para el análisis histopatológico y un 84.6% para el análisis citológico.

Los valores predictivos positivo y negativo están resumidos en la tabla 1.16. En líneas generales, el VPP de la PCR es mayor que el de los análisis histopatológico y citológico en el laboratorio A, pero menor en el laboratorio B (19.2% frente a combinación y análisis histológico, 15.4% frente a análisis citológico) y el VPN es en general más alto en las pruebas clásicas de diagnóstico que en la PCR.

Tabla 1.16: Análisis epizootiológicos calculados para las técnicas de PCR, histología y citología para la diagnosis de *Marteilia refringens*.

	Test de oro	Laboratorio	%
VPP PCR	Combinación	A	80.0
		B	19.2
VPN PCR	Combinación	A	98.3
		B	97.9
VPP Histología	PCR	A	66.7
		B	71.4
VPN Histología	PCR	A	99.1
		B	81.4
VPP Citología	PCR	A	80.0
		B	80.0
VPN Citología	PCR	A	99.1
		B	80.9

La comparación entre las diferentes técnicas de diagnóstico está resumida en la tabla 1.17. La comparación entre laboratorios según el coeficiente de coincidencia simple arroja un valor de 0.83. La comparación tanto intra- como interlaboratorios entre la citología e histología muestra una elevada concordancia, superior en cualquier caso al 0.98. Esta concordancia se hace extensible a la comparación con la PCR en el laboratorio A y decae hasta un 0.80- 0.83 en las comparaciones que incluyen la PCR del laboratorio B.

Tabla 1.17: Comparativa entre técnicas para el diagnóstico de *Marteilia refringens* en *Mytilus galloprovincialis* y entre los laboratorios participantes en este estudio de acuerdo al coeficiente de coincidencia simple (Dunn y Everitt, 1982).

	Similitud entre técnicas					
	PCR A	PCR B	Histología A	Histología B	Citología A	Citología B
PCR A	1					
PCR B	0.83	1				
Histología A	0.98	0.80	1			
Histología B	0.98	0.81	0.99	1		
Citología A	0.98	0.81	0.99	0.98	1	
Citología B	0.98	0.81	0.99	0.98	1.00	1

El índice κ en el laboratorio A es de 0.71 al comparar la PCR con la combinación de técnicas de diagnóstico. Muestra por tanto una concordancia buena. En el laboratorio B, el valor del índice κ desciende hasta el 0.23, mostrando una concordancia aceptable.

Discusión

La detección por PCR de *Bonamia ostreae* y *Perkinsus olseni* es más sensible que las técnicas tradicionales de diagnóstico (si no consideramos el cultivo en RFTM en la comparación). La detección de *Marteilia refringens* por PCR sin embargo origina resultados contradictorios entre los laboratorios A y B, ya que en el laboratorio A la PCR es menos sensible que la histología y la citología y en el laboratorio B, sin embargo, la PCR es más sensible. En cualquier caso la prevalencia de *Marteilia refringens* encontrada en la presente tesis es muy baja, corroborando el descenso de este patógeno documentado en los últimos tiempos en Galicia (Robledo *et al.*, 1993; Robledo y Figueras, 1995; Villalba *et al.*, 1997; Anónimo, 2000b, 2001). Para corroborar los resultados, las muestras discordantes se sometieron a una segunda ronda de amplificaciones tras una re-extracción del ADN. En el caso de *Marteilia refringens*, al mantener las sucesivas amplificaciones una importante discrepancia, se produjo un intercambio de los ADN extraídos entre los dos laboratorios. Las PCR realizadas a partir de estas muestras mantienen los resultados ya determinados previamente en el laboratorio de origen de las muestras de ADN. Una posible explicación es que debido al carácter focalizado de la infección por *Marteilia refringens* (Figueras y Montes, 1988) se podría haber tomado una zona infectada en el corte de tejido para un laboratorio, mientras que el otro laboratorio habría recibido

un fragmento de glándula digestiva libre de *Marteilia refringens*. No obstante, en esa situación, se deberían de producir positivos en ambos laboratorios de manera indiscriminada, mientras que en nuestro caso el número de individuos infectados es mayor en el laboratorio B, y los niveles de infección detectados por PCR en el laboratorio A están próximos a los detectados por histología y citología en el mismo laboratorio. Esta situación está claramente ilustrada con los análisis de comparación entre técnicas (Tabla 1.17), cuyos resultados fueron mucho mejores en el laboratorio A (0.98 según el coeficiente de coincidencia simple, comparando con las técnicas oficiales de diagnóstico tanto en el laboratorio A como en el B) que en el laboratorio B. Esta situación podría deberse a un problema de contaminación en la toma de muestras para análisis por PCR. En este supuesto, las muestras contaminadas detectadas deberían considerarse como falsos positivos, por lo que en el caso particular de la PCR para el diagnóstico de la marteiliosis con los cebadores 2S y 3As, las técnicas histológica y citológica serían más sensibles que la PCR.

La sensibilidad de una prueba determinada, también denominada sensibilidad diagnóstica, es la proporción de animales enfermos en la muestra objeto de estudio que son detectados por la prueba evaluada. Una sensibilidad del 100% garantiza que todos los animales enfermos son detectados. La especificidad de una prueba, o especificidad diagnóstica, es la proporción de animales sanos en la muestra objeto de estudio detectados por la prueba evaluada. Tanto la sensibilidad como la especificidad son independientes de la prevalencia de la enfermedad en la población y solo dependen de la propia técnica. La especificidad de la PCR es menor que la de las

técnicas tradicionales en la detección de *Bonamia ostreae*, *Perkinsus olseni* y *Marteilia refringens* en el caso del laboratorio B. El número de falsos negativos detectados por PCR es menor que por las técnicas oficiales con la única excepción de la detección de *Perkinsus olseni* si tenemos en cuenta las muestras analizadas por cultivo en RFTM. Los VPP y VPN sí son dependientes de la prevalencia de la enfermedad en la población y miden, respectivamente, la probabilidad de que un animal diagnosticado como positivo o negativo por la técnica objeto de ensayo sea realmente positivo o negativo. El VPP de la PCR es por regla general menor que el VPP de las técnicas oficiales de diagnóstico y de forma complementaria el VPN es mayor que el de las técnicas oficiales de diagnóstico. El mayor VPN de la técnica por PCR sugiere que esta técnica es la más adecuada si queremos ser conservadores, como en el caso de la introducción de un patógeno, dónde un falso positivo es mucho menos crítico que un falso negativo, ya que este último podría determinar la introducción de una epizootia en una zona libre.

El análisis histopatológico de un individuo no solo nos permite detectar la presencia de un parásito determinado, sino que nos proporciona la posibilidad de evaluar el estado de salud general mediante la presencia de lesiones y/u otros patógenos (Diggles *et al.*, 2003), la intensidad de la infección o el estado fisiológico del molusco, parámetros todos ellos de interés para el acuicultor en cuanto que pueden ayudar a tasar la partida de molusco evaluada. En cualquier caso, la sensibilidad del análisis histopatológico es menor que la sensibilidad de la PCR en la detección de *Bonamia ostreae* y *Perkinsus olseni*, y menor también en el caso de *Marteilia refringens* en el laboratorio B. En el caso particular de la marteiliosis, debido a la

naturaleza de la infección, el proceso de esporulación facilita en gran manera la visualización al microscopio óptico del parásito, con unos esporontes de aspecto llamativo y naturaleza refringente (Fig. I.6, Fig. 1.13 B). El análisis histopatológico se revela más ineficaz en el caso de un patógeno pequeño como *Bonamia ostreae*, que presenta un diámetro en torno a unas 2 μm . En un 9.6 y un 11.7% de las muestras diagnosticadas como negativas mediante el análisis histopatológico se detecta la presencia de *Bonamia ostreae*. En el caso de un patógeno de tamaño mayor, como *Perkinsus olseni*, este porcentaje desciende hasta un 2.2 y un 3.3% de las muestras. En cualquier caso, el análisis histopatológico cuenta con tres principales desventajas frente a la PCR: la necesidad de una alta cualificación para la realización de los análisis, la lentitud en el desarrollo del análisis y el alto coste del procesado, cifrado en nuestro laboratorio en torno al doble que para un análisis por PCR de un lote de 30 moluscos. Además, en muchos casos, la sensibilidad de esta técnica es menor, principalmente en los primeros estadios de una infección (Culloty *et al.*, 2003; Diggles *et al.*, 2003). Debido al mayor VPP de esta técnica, y a la especificidad más elevada, el análisis histopatológico es una técnica más apropiada para un análisis de confirmación de los positivos detectados.

La citología es una técnica rápida y barata, también ampliamente utilizada en el diagnóstico de la bonamiosis (Bachère *et al.*, 1982; Rogan *et al.*, 1991; Cocherneec *et al.*, 1998; Culloty *et al.*, 1999; Culloty *et al.*, 2003; Diggles *et al.*, 2003; da Silva y Villalba, 2004) y la marteiliosis (Adlard y Ernst, 1995; Robledo *et al.*, 1995; Zrncic *et al.*, 2001; Virvilis *et al.*, 2003; O.I.E., 2006). En el caso de la bonamiosis, se emplean habitualmente los frotis de branquia, ya que no hay diferencias significativas en los resultados obtenidos comparados con

los frotis de otros tejidos y puesto que el parásito se encuentra presente en el interior de los hemocitos (Fig. I.4), que están circulando por los tejidos (da Silva y Villalba, 2004) y en las células epiteliales de la branquia (Montes *et al.*, 1994). En el caso de la marteiliosis, se emplean los frotis de glándula digestiva al ser esta el órgano diana de la infección por *Marteilia refringens*. Las principales ventajas del análisis citológico son la rapidez y el bajo coste del procesado y sus inconvenientes la baja sensibilidad de la técnica y la necesidad de un observador experimentado. Habitualmente el diagnóstico de las enfermedades en análisis histopatológicos está ligado a la presencia de alteraciones inflamatorias en los tejidos del hospedador, como es el caso de las infiltraciones, que se pueden relacionar con la presencia de *Bonamia ostreae* o *Perkinsus olseni*. Sin embargo, estas infiltraciones no son visibles con el análisis citológico, perdiendo así un apoyo importante en la diagnosis. Pero la presencia de estas lesiones por sí solas no implica la presencia del patógeno de interés, puesto que pueden ser originadas por otros patógenos diferentes e incluso por compuestos contaminantes (Anderson *et al.*, 1995; Renault y Cochenec, 1995; Weinstein, 1997; Oliver *et al.*, 2001; Kleeman *et al.*, 2002). De una manera similar a la histopatología, esta técnica es mucho más eficaz a la hora de detectar un parásito de tamaño grande como *Marteilia refringens* que uno pequeño como *Bonamia ostreae*. En base a los resultados obtenidos de sensibilidad, especificidad, falsos negativos, VPP y VPN, se puede considerar que la citología es una buena técnica para el manejo rutinario de enfermedades ya establecidas en una determinada localización, pero no es adecuado para el análisis de importaciones.

La técnica de RFTM ha sido ampliamente utilizada en el pasado como método de diagnóstico de la perkinsosis (Ray, 1952; Gauthier y Fisher, 1990; Bushek *et al.*, 1994; Fisher y Oliver, 1996; Almeida *et al.*, 1999; McLaughlin y Faisal, 1999). Las principales ventajas de este método son su bajo coste y la sencillez. También se ha empleado para el análisis de volúmenes de agua (Ellin y Bushek, 2006). Pero sus mayores inconvenientes son la inespecificidad analítica, demostrada en el hecho de que otros protistas además de *Perkinsus* spp. pueden desarrollar hipnosporas en este medio, como es el caso, al menos, de diversos dinoflagelados y de un mesomycetozoo presente en almeja fina de morfología similar a *Perkinsus olseni*, denominado *Pseudoperkinsus tapetis* (Almeida *et al.*, 1999; Figueras *et al.*, 2000; Novoa *et al.*, 2002). Debido a esta falta de especificidad analítica, la diagnosis por RFTM tiende a sobreestimar el número de muestras positivas en los lotes analizados. En los datos aquí presentes, la falta de repetitividad se manifiesta en los dos laboratorios participantes, especialmente en las muestras con un bajo nivel de infección. Las características del análisis por RFTM, en el cual la branquia se incuba en un medio anaeróbico y se tiñe con yodo de lugol para poder ser observada al microscopio óptico, pero no se fija de ninguna forma, impide la revisión de las muestras dudosas, o el cruce de las mismas entre los laboratorios participantes. Esta falta de repetitividad puede ilustrar las dificultades en el diagnóstico correcto de las muestras con baja intensidad de infección debido a la posibilidad de que un fragmento de branquia de un laboratorio presente *Perkinsus* y el otro no, ya que la perkinsosis es una infección focal y no sistémica, en la que las células del parásito se encuentran habitualmente en abscesos limitados por una cápsula (Comps y

Chagot, 1987; Chagot *et al.*, 1987a; Goggin y Lester, 1995; Sagristà *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 2001b). Además, los Venéridos son organismos que habitan en el sustrato, infáunicos, y los granos de arena que se pueden encontrar en las branquias de un molusco pueden ser confundidos con hiposporas teñidas de negro, tanto por forma, tamaño y color (Moore *et al.*, 2002a). Esta falta de repetibilidad se redujo descartando las muestras con un nivel de 1 en la escala de Ray (Tabla 1.2). Los resultados de sensibilidad de esta técnica, siendo los más elevados, deben ser tomados con precaución, debido a que la falta de especificidad analítica nos sugiere que muchos de estos resultados son en realidad falsos positivos. Estos resultados tan poco repetitivos, unidos al análisis de un menor número de muestras por cultivo en RFTM que por histología y PCR, fueron tenidos en cuenta a la hora de comparar las técnicas, no considerando el cultivo en RFTM en las comparaciones epizootiológicas. Si se considera el cultivo en RFTM como test de oro, los resultados obtenidos provocan la caída de los valores de sensibilidad de dichas técnicas (Tabla 1.10). Los valores de especificidad sin embargo no se ven tan dramáticamente afectados puesto que la sensibilidad de una técnica está fuertemente influenciada por el número de falsos positivos del test de oro y poco influenciada por el número de falsos negativos, y la especificidad en cambio está fuertemente influenciada por el número de falsos negativos del test de oro y poco por el número de falsos positivos. En cualquier caso el RFTM no cumple los criterios exigibles a un test de oro ideal, que sería aquel cuyo número de falsos negativos y positivos fuese cero (Stevenson, 2005). Esta circunstancia no es posible en la práctica, puesto que un test muy sensible que produjera una respuesta a partir de una baja intensidad de parasitación tendería a

dar un alto número de resultados como positivos, independientemente de si lo fueran o no. Por otra parte un test que origine una respuesta muy específica y que nos asegure que todas las muestras que certifica como positivas realmente lo son tendería a dar como negativa a alguna muestra que fuera positiva pero no superara el umbral de certeza que la prueba altamente específica determine.

Se han analizado en paralelo en dos laboratorios separados muestras diferentes tomadas del mismo individuo. Los porcentajes de similitud son medidas de concordancia entre técnicas y no nos revelan información sobre la exactitud de una técnica determinada, aunque pueden dar una idea cualitativa de la calidad del método de diagnóstico cuando no se dispone de un test de oro eficaz (Fegan, 2000). En el caso de la bonamiosis, el porcentaje de similitud entre laboratorios está sobre el 90%, sean cuales sean los métodos de diagnóstico comparados y el valor del índice κ mostró una concordancia considerable entre técnicas en ambos laboratorios. En el caso de la perkinsosis, la comparación entre todas las técnicas en los dos laboratorios muestra que la similitud es buena comparando las técnicas de histología y PCR, independientemente del laboratorio considerado, con todos los coeficientes de coincidencia simple sobre el 0.95. La comparación con el cultivo en RFTM disminuye la similitud, oscilando entre 0.85 y 0.91. Estos resultados son producto de la baja repetitividad y el gran número de falsos positivos del cultivo en RFTM. Para la marteiliosis, la comparación entre técnicas de diagnóstico muestra una importante concordancia entre las técnicas de PCR, histología y citología en el laboratorio A. La comparación de la histología frente a la citología revela una

concordancia muy buena, y la de la PCR frente a la combinación de técnicas, a la citología o a la histología se traduce en una concordancia buena en el laboratorio A. El laboratorio B sin embargo presenta unos valores de concordancia menores como consecuencia de la detección de un mayor número de muestras positivas, que podrían tratarse de falsos positivos. En este caso los valores del índice κ se reducen mostrando una concordancia aceptable en el caso de la comparación con la histología o con la combinación de las técnicas de diagnóstico o una débil en la comparación con la técnica de citología.

Si tenemos en cuenta todos estos datos, debemos concluir que la diagnosis de *Marteilia refringens* en *Mytilus galloprovincialis* es adecuada empleando las técnicas oficiales de diagnóstico y que la PCR reduce su ventaja sobre dichas técnicas a la mayor velocidad y precio más barato a la hora de realizar un diagnóstico. La PCR de la región ITS de *Marteilia* spp. (Le Roux *et al.*, 2001; O.I.E., 2006) no es objetivamente más sensible que las otras técnicas oficiales de diagnóstico descritas por la O.I.E. para la diagnosis de la marteiliosis en mejillón.

La necesidad de establecer controles sanitarios para el tráfico mundial de animales vivos para la acuicultura es incuestionable. La directiva 2006/88 de la Unión Europea extiende este control incluso a movimientos más localizados, entre zonas de una misma región, como es el caso de la transferencia entre rías gallegas (Anónimo, 2006). La dispersión de enfermedades desde áreas afectadas a áreas libres de enfermedad ha sido la causa de importantes mortalidades en el pasado (Bower y Figueras, 1989; Alderman, 1996; Bartley y Subasinghe, 1996; Renault, 1996; Yoshimizu, 1996; Friedman y Finley,

2003) y puede en casos extremos acabar con una industria como es la acuicultura, capaz de generar riqueza y empleo en una región. Las técnicas tradicionales de diagnóstico de patologías, basadas en la observación al microscopio óptico, son insuficientes para poder realizar un control eficaz, principalmente debido a la lentitud del proceso, especialmente en el caso de la histopatología.

Sin embargo, y puesto que ninguna de las técnicas evaluadas es exacta al 100%, subsiste todavía un riesgo de introducción de células infectivas de parásito. Para poder mitigar esta situación, es aconsejable el mantener en cuarentena los moluscos en el lugar de introducción y poder repetir el análisis por el método de diagnóstico más sensible del que se disponga, generalmente la PCR, antes de liberarlas al medio. Este método de diagnóstico ha sido ampliamente empleado en acuicultura (Anónimo, 1993a; Ko *et al.*, 1999; Carnegie *et al.*, 2000; Cochenec *et al.*, 2000; Penna *et al.*, 2001) y presenta cuatro ventajas principales que lo dotan de un gran atractivo a la hora de ponerse a disposición de los mecanismos oficiales y de las empresas privadas: primero, la PCR es más barata que la histopatología. El precio del diagnóstico de 30 moluscos por PCR es aproximadamente la mitad que por histopatología. Segundo, la PCR es más rápida que la histopatología y que el cultivo en medio tioglicolato. La técnica de histología se prolonga como mínimo durante cinco días y el cultivo en RFTM necesita de 3 días para la formación de las hipnosporas. Tercero, la PCR es más sensible que las técnicas de histopatología y citología y produce menos falsos positivos que el cultivo en RFTM y finalmente el hecho de que es más fácil entrenar a un técnico en la realización de PCR que en la correcta visualización de preparaciones histológicas o de hipnosporas (prueba del RFTM) al microscopio

óptico. Otra importante ventaja de la PCR es la posibilidad de detectar el patógeno en el agua. De esta manera, la PCR es apropiada para controlar la presencia de patógenos en los efluentes de una depuradora o en el agua de lastrado de los buques, siendo una herramienta importante en la limitación de la dispersión de la enfermedad (Van Banning, 1991; Harvell *et al.*, 1999; Bishop *et al.*, 2006). Desde hace poco tiempo, se están comenzando a optimizar protocolos de PCR en tiempo real, que además de la detección del parásito permiten su cuantificación (Audemard *et al.*, 2004; Corbeil *et al.*, 2006b; Gauthier *et al.*, 2006; Marty *et al.*, 2006). De todas formas, la sensibilidad similar a la PCR tradicional (Corbeil *et al.*, 2006b) y su coste elevado hace de este método una técnica poco apropiada para laboratorios que hagan análisis rutinarios.

Esta es la primera vez que se ha llevado a cabo una comparación de resultados entre laboratorios utilizando técnicas de diagnóstico de patógenos de moluscos (Stokes *et al.*, 1996; O'Neill *et al.*, 1998; Carnegie *et al.*, 2000; Diggles *et al.*, 2003; da Silva y Villalba, 2004; Meyer *et al.*, 2005). Muchos estudios ya habían establecido previamente la mayor sensibilidad del diagnóstico por PCR o de la hibridación *in situ* (Diggles *et al.*, 2003; Thébault *et al.*, 2005), aunque esta última técnica es cara, compleja, costosa y depende de la fijación empleada (Diggles *et al.*, 2003). El empleo del diagnóstico por histología o citología sin embargo está sujeto a mayores controversias, puesto que diferentes trabajos encuentran los frotis citológicos más sensibles que las preparaciones histológicas (Bachère *et al.*, 1982; Diggles *et al.*, 2003) y viceversa (Balouet y Poder, 1983; Zabaleta y Barber, 1996). Existen trabajos que aseguran que no hay diferencias entre la diagnosis por histología y por citología (Culloty y

Mulcahy, 1996; da Silva y Villalba, 2004). Sin embargo, a la vista de los presentes resultados, la histología es de gran valor a la hora de caracterizar el estado de salud de un lote de moluscos, y por consiguiente, es un buen instrumento para tasar las partidas de moluscos vivos destinadas al comercio. La citología es un método rápido y barato para seguir la evolución de una enfermedad, pero su baja fiabilidad no permite recomendarlo para el control sanitario de los lotes a introducir vivos en una determinada región libre de patógenos de declaración obligatoria. El cultivo en RFTM es útil en tanto que nos permite ser conservadores, pero los positivos detectados deben ir siempre acompañados de un análisis confirmatorio, como la secuenciación del producto de PCR, la hibridación *in situ*, o la histología.

**CAPÍTULO 2: EPIZOOTIOLOGÍA MOLECULAR
DE LAS PRINCIPALES ENFERMEDADES DE
MOLUSCOS BIVALVOS PRESENTES EN
GALICIA**

Capítulo 2: Epizootiología molecular de las principales enfermedades de moluscos bivalvos presentes en Galicia

Introducción

La O.I.E recoge en su Código Sanitario para los Animales Acuáticos una serie de enfermedades de moluscos de declaración obligatoria que se resumen en la tabla 2.1 (O.I.E., 2007). Dichas enfermedades han sido causa de importantes mortalidades de moluscos a lo largo del mundo, originando severas pérdidas económicas al sector acuícola (Mackin *et al.*, 1950; Haskin *et al.*, 1966; Grizel *et al.*, 1974; Pichot *et al.*, 1980; Lester y Davis, 1981; Farley *et al.*, 1988; Steinbeck *et al.*, 1992; Friedman *et al.*, 2000b; Moore *et al.*, 2000a; Hine *et al.*, 2001; Burreson y Ford, 2004; Carnegie y Cochenec-Laureau, 2004). En ocasiones, la aparición en alguna región del mundo de alguna de estas enfermedades ha podido ser ocasionada por la introducción incontrolada de animales vivos (Farley, 1988b; Berthe y Boudry, 1999) o por el empleo de una ineficiente técnica de diagnóstico que no ha sido capaz de detectar la presencia de la enfermedad (Alderman, 1996). La toma de contacto de un parásito y un nuevo hospedador susceptible también ha sido la causa de elevadas mortalidades (Bougrier *et al.*, 1986; Harvell *et al.*, 1999; Bower, 2000; Burreson *et al.*, 2000). En ocasiones un parásito no origina un aumento aparente de la mortalidad en una región del mundo, y sin embargo sí es causa de importantes mortalidades en otra (Anónimo, 2004; Villalba *et al.*, 2005).

Tabla 2.1: Patógenos de moluscos considerados de declaración obligatoria por la O.I.E. (O.I.E., 2007)

Patógenos de moluscos de declaración obligatoria a la O.I.E.
<i>Bonamia ostreae</i>
<i>Bonamia exitiosa</i>
<i>Haplosporidium nelsoni</i>
<i>Marteilia refringens</i>
<i>Mikrocytos mackini</i>
<i>Perkinsus marinus</i>
<i>Perkinsus olseni</i>
<i>Candidatus Xenohalictis californiensis</i>

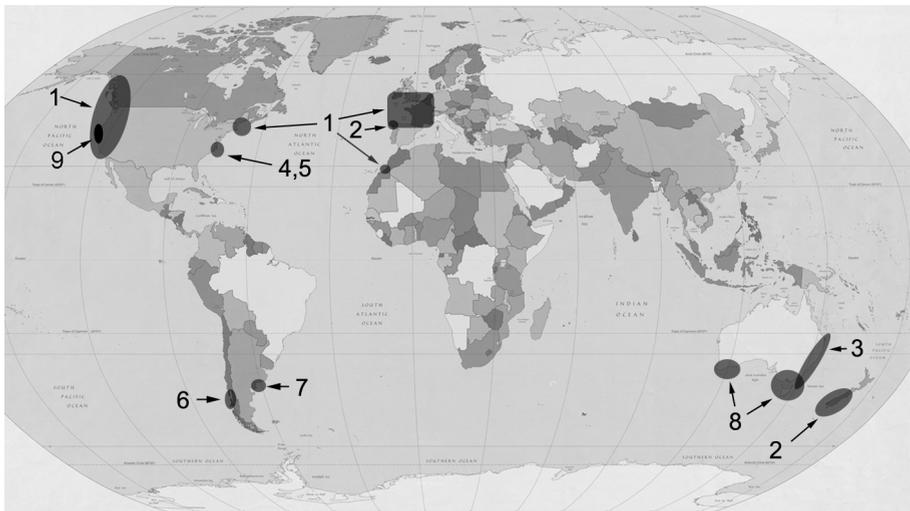
Género *Bonamia*

Las especies del género *Bonamia* parasitan moluscos de la familia Ostreidae y se encuentran distribuidos por todo el planeta (Fig. 2.1). *Bonamia ostreae* es un protozoo citozoico que afecta a *Ostrea edulis* (Pichot *et al.*, 1980; Balouet y Poder, 1983; Bachère y Grizel, 1985), aunque también se ha demostrado la sensibilidad de *Ostrea angasi* introducida en Francia (Bougrier *et al.*, 1986) y de *Ostrea chilensis* (= *Tiostrea lutaria*) (Buroker *et al.*, 1983) en el Reino Unido y en Francia (Tigé *et al.*, 1982; Grizel *et al.*, 1983; Bucke *et al.*, 1984). Otras especies sensibles a la infección por *Bonamia ostreae* son *Ostrea denselamellosa* (Bower y McGladdery, 2003; Carnegie y Cochenec-Laureau, 2004; O.I.E., 2006) y *Crassostrea angulata* (Katkansky *et al.*, 1969). También se ha encontrado una *Bonamia* sp. en *Crassostrea ariakensis*, sinónima de *Crassostrea rivularis* (Wang *et al.*, 2004) mantenida en acuarios de una zona enzoótica para *Bonamia ostreae* (Cochennec *et al.*, 1998), aunque existen dudas de que este parásito fuera en realidad *Bonamia ostreae*. La especie *Bonamia exitiosa* se encuentra en Nueva Zelanda, originando mortalidades de la ostra

Ostrea chilensis (Dinamani *et al.*, 1987; Hine *et al.*, 2001; Hine, 2002; Berthe y Hine, 2003; Cranfield *et al.*, 2005) y recientemente se ha detectado en *Ostrea edulis* de Galicia (Anónimo, 2007). Una *Bonamia* sp. muy similar parasita *Ostrea angasi* en el sur de Australia. La secuencia de este parásito es similar a la de *Bonamia exitiosa*, aunque presenta algunas diferencias en cuanto al gen de la subunidad ribosómica 18S y a 160 pb secuenciadas de la región ITS-1 (Corbeil *et al.*, 2006a). La especie *Bonamia roughleyi* (Cochennec-Laureau *et al.*, 2003a), descrita bajo el nombre de *Mikrocytos roughleyi* (Farley *et al.*, 1988) parasita a la especie *Saccostrea glomerata* (Anderson y Adlard, 1994) en Australia (Roughley, 1926). *Bonamia perspora*, parásito de *Ostreola equestris*, es la única especie de *Bonamia* en la cual está descrito el proceso de esporulación (Carnegie *et al.*, 2005; Stokes *et al.*, 2005; Carnegie *et al.*, 2006). Recientemente se ha notificado la presencia de una nueva *Bonamia* sp. afectando a la ostra de Suminoe, *Crassostrea ariakensis*, que parece próxima filogenéticamente a *Bonamia exitiosa* y *Bonamia roughleyi* de acuerdo a la subunidad ribosómica 18S (Burreson *et al.*, 2004). No se sabe a ciencia cierta si el brote de bonamiosis producido en Francia en esta misma especie fue debido a esta *Bonamia* sp. o a la *Bonamia ostreae* enzoótica en las aguas circundantes a la instalación donde se mantenían las ostras en cuarentena (Cochennec *et al.*, 1998). También se conoce otra especie del género *Bonamia*, pendiente de descripción, en *Ostrea chilensis* de Chile (Campalans *et al.*, 2000; Arzul *et al.*, 2005b). Además, se ha publicado una especie de *Bonamia* en la ostra plana argentina *Ostrea puelchana*, aunque no se conoce con certeza su afiliación específica al carecer de estudios moleculares y/o ultraestructurales (Kroeck y Montes, 2005).

En *Ostrea conchaphila* de California (E.E.U.U.) se ha descrito una microcélula, que no hibridó con pruebas fluorescentes específicas para *Bonamia ostreae*, *Bonamia exitiosa* y *Mikrocytos mackini* (Friedman *et al.*, 2005a). La verdadera identidad de este organismo aún está por esclarecer tanto ultraestructural como molecularmente, aunque la especie *Ostrea conchaphila* no es susceptible a infección por cohabitación con *Ostrea edulis* infectadas con *Bonamia ostreae* (Arzul *et al.*, 2005a).

Figura 2.1: Distribución mundial de las especies del género *Bonamia*. (1) *Bonamia ostreae* (2) *Bonamia exitiosa* (3) *Bonamia roughleyi* (4) *Bonamia perspora* (5) *Bonamia* sp. de *Crassostrea ariakensis* (6) *Bonamia* sp. de *Ostrea chilensis* (7) *Bonamia* sp. de *Ostrea puelchana* (8) *Bonamia* sp. de *Ostrea angasi* (9) Microcélula de *Ostrea conchaphila*.



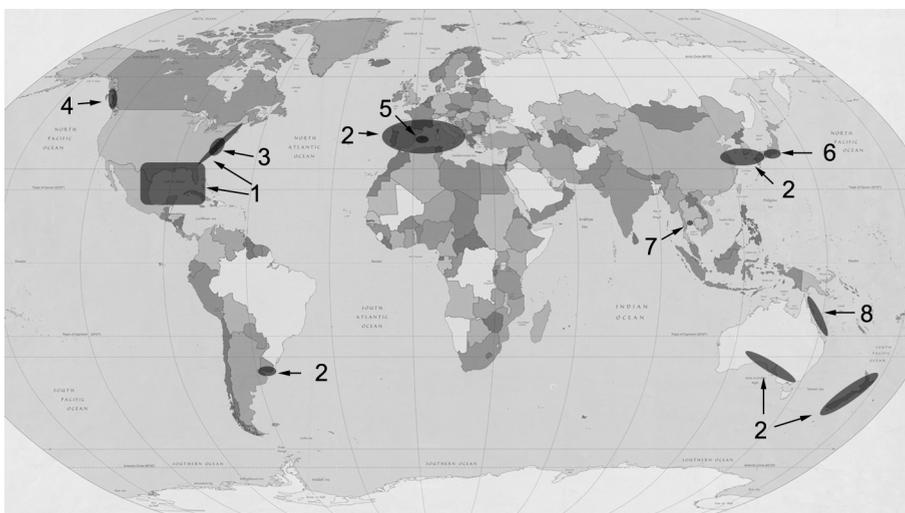
Género *Perkinsus*

Las especies del género *Perkinsus* son parásitas de gran cantidad de moluscos en todo el planeta (Fig. 2.2). *Perkinsus marinus* fue la primera especie del género en ser descrita (Mackin *et al.*, 1950) y es, junto a *Haplosporidium nelsoni*, la principal enfermedad de la ostra *Crassostrea virginica* (Andrews y Hewatt, 1957; Burreson *et al.*, 1994; Ray, 1996; Soniat, 1996). *Perkinsus marinus* también infecta a *Crassostrea gigas*, aunque no desarrolla fuertes infecciones ni es causa de mortalidad (Anónimo, 1996; Chu, 1996; Calvo *et al.*, 1999). *Crassostrea ariakensis* también es susceptible a *Perkinsus marinus* pero en menor medida que *Crassostrea virginica* (Calvo *et al.*, 2001).

Perkinsus olsenii (= *Perkinsus atlanticus*) es probablemente la especie que afecta a un mayor rango de hospedadores. Fue descrita en la oreja de mar *Haliotis rubra* (Lester y Davis, 1981). Otras especies afectadas son las también orejas de mar *Haliotis cyclobates* Péron, 1816, *Haliotis laevigata*, *Haliotis scalaris* (Leach, 1814) (Lester, 1986; Goggin *et al.*, 1989; O'Donoghue *et al.*, 1991; Goggin y Lester, 1995; Herfort, 2004), las almejas *Ruditapes philippinarum*, *Ruditapes decussatus*, *Venerupis pullastra*, *Venerupis aurea* (Gmelin, 1791), *Paphia aurea* (Gmelin, 1791), *Paphia undulada* (Born, 1780), *Protothaca jedoensis* (Lischke, 1874), *Chama postoma* Conrad, 1837, *Chama pacifica* Broderip, 1834, *Chama sulphurea* Poulsen, 1878 y *Tellina (Macoma) liliana* Iredale, 1915 (Da Ros y Canzonier, 1985; Comps y Chagot, 1987; Goggin y Lester, 1987; Navas *et al.*, 1992; Choi y Park, 1997; Hamaguchi *et al.*, 1998; Ordás *et al.*, 2001; Figus *et al.*, 2002; Leethochavalit *et al.*, 2003; Herfort, 2004), las ostras perlíferas *Pinctada sugillata* (Reeve, 1857) y *Pinctada maxima* (Goggin y Lester, 1987; Goggin *et al.*, 1989; Norton *et*

al., 1993c), los berberechos *Austrovenus stutchburyi* Wood, 1828 (Murrell *et al.*, 2002; Dungan *et al.*, 2007), las arcas *Barbatia novaezelandie* Smith, 1915, *Barbatia corallicola* (= *Barbatia foliata*) (Forsskål, 1775), *Barbatia fusca* (Bruguiere, 1789), *Anadara antiquata* (Linnaeus, 1758) y *Anadara trapezia* (Deshayes, 1849) (Goggin y Lester, 1987; Goggin *et al.*, 1989; Murrell *et al.*, 2002; Herfort, 2004), las almejas gigantes *Tridacna gigas* (Linnaeus, 1758) y *Tridacna crocea* Lamarck, 1819 (Lester *et al.*, 1990; Goggin, 1996) y las ostras *Crassostrea ariakensis* y *Crassostrea sikamea* (Anónimo, 2005; Moss y Reece, 2005). En *Callista chione* (Linnaeus, 1758) se detectaron hipnosporas por medio del RFTM que podrían ser de *Perkinsus olseni*, aunque no fueron confirmadas por otros mecanismos (Canestri-Trotti *et al.*, 2000).

Figura 2.2: Distribución mundial de las especies del género *Perkinsus*. (1) *Perkinsus marinus* (2) *Perkinsus olseni* (3) *Perkinsus chesapeaki* (4) *Perkinsus qugwadi* (5) *Perkinsus mediterraneus* (6) *Perkinsus honshuensis* (7) *Perkinsus* sp. de *Paphia undulata* (8) *Perkinsus* spp. de la Gran Barrera.



Otras especies del género son *Perkinsus chesapeaki* (= *Perkinsus andrewsi*), que afecta a las especies *Mya arenaria*, *Macoma balthica*,

Macoma mitchelli, *Mercenaria mercenaria* y *Crassostrea virginica* (Coss *et al.*, 2001; Dungan *et al.*, 2002; Bower y McGladdery, 2003), *Perkinsus qugwadi*, que es parásito de la vieira japonesa *Patinopecten yessoensis* (Blackbourn *et al.*, 1998; Bower *et al.*, 1999), *Perkinsus mediterraneus*, que afecta a *Ostrea edulis* (Casas *et al.*, 2004) y *Perkinsus honshuensis*, que afecta a *Ruditapes philippinarum* en Japón (Dungan *et al.*, 2006). La especie *Perkinsus karlssoni*, descrita originalmente en *Argopecten irradians*, no se considera una especie válida del género *Perkinsus* (McGladdery *et al.*, 1991; Goggin *et al.*, 1996).

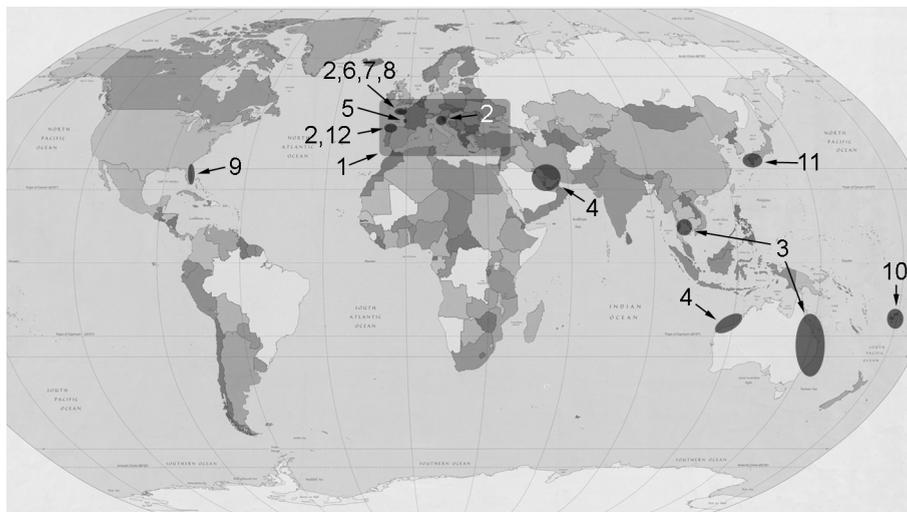
Género *Marteilia*

Los parásitos pertenecientes al género *Marteilia* son uno de los grupos más importantes de patógenos de moluscos bivalvos y su distribución está recogida en la figura 2.3.

Marteilia refringens afecta a la ostra plana *Ostrea edulis* en Europa (Grizel *et al.*, 1974; Grizel, 1979; Figueras y Montes, 1988), aunque ha sido observada en la *Ostrea chilensis*, *Ostrea angasi* o *Mytilus edulis* en Francia y España (Comps y Joly, 1980; Grizel *et al.*, 1983; Bougrier *et al.*, 1986; Villalba *et al.*, 1993b; Robledo *et al.*, 1994b). *Marteilia maurini* afecta a los mejillones *Mytilus galloprovincialis* y *Mytilus edulis*, solapándose su distribución con la de *Marteilia refringens* (Comps *et al.*, 1982; Auffret y Poder, 1985; Da Ros y Massignan, 1985). *Marteilia sydneyi* es parásito de la especie *Saccostrea glomerata* en Australia (Wolf, 1979; Lester, 1990; Anderson *et al.*, 1994; Adlard y Ernst, 1995) y posiblemente *Striostrea mytiloides* (= *Saccostrea* (*Crassostrea*) *echinata*) (Lamarck, 1819) y *Saccostrea cucullata* (= *Saccostrea forskali*) en Tailandia (Bower y McGladdery, 2003).

Marteilia lengehi afecta a *Saccostrea cucullata* del Golfo Pérsico y nordeste de Australia (Comps, 1976; Hine y Thorne, 2000). *Marteilia christenseni* fue descrita en cadelas, *Scrobicularia plana*, en la bahía de Marennes-Oléron (Comps, 1985). Además, diferentes *Marteilia* spp. han sido descritas en otros hospedadores como *Cerastoderma edule*, *Venerupis pullastra*, *Venerupis rhomboides* y *Ruditapes decussatus* (Comps *et al.*, 1975; Auffret y Poder, 1987; Villalba *et al.*, 1993a) en Francia y Galicia, *Argopecten gibbus* de La Florida (E.E.U.U.) (Moyer *et al.*, 1993), *Tridacna maxima* en Fidji (Norton *et al.*, 1993a), *Ruditapes philippinarum* en Japón (Itoh *et al.*, 2005) y *Solen marginatus* en Galicia (López y Darriba, 2006).

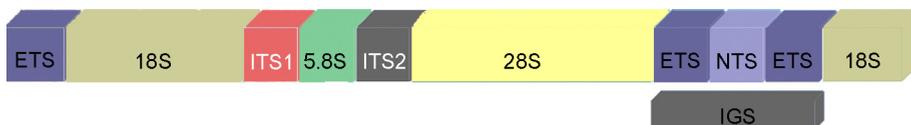
Figura 2.3: Distribución mundial de las especies del género *Marteilia*. (1) *Marteilia refringens* (2) *Marteilia maurini* (3) *Marteilia sydneyi* (4) *Marteilia lengehi* (5) *Marteilia christenseni* (6) *Marteilia* sp. de *Cerastoderma edule* (7) *Marteilia* sp. de *Venerupis pullastra* (8) *Marteilia* sp. de *Venerupis rhomboides* (9) *Marteilia* sp. de *Argopecten gibbus* (10) *Marteilia* sp. de *Tridacna maxima* (11) *Marteilia* sp. de *Ruditapes philippinarum* (12) *Marteilia* sp. de *Solen marginatus*.



Espaciadores Transcritos Internos

Los espaciadores transcritos internos, *ITS-1* e *ITS-2*, son dos regiones de ADN no codificantes pertenecientes al *cluster* del ARNr (Fig. 2.4), que son menos conservadas que los propios genes codificantes del ARNr. Gracias a esta característica son más útiles para estudios comparativos, ya que acumulan un mayor número de diferencias que los genes del ARNr y pueden diferenciar entre grupos de especies similares o incluso entre grupos pertenecientes a la misma especie. Además, el hecho de estar situados entre regiones más conservadas como son los genes del ARNr *28S* y *18S*, altamente representadas en las bases de datos de secuencias públicas, facilita enormemente el desarrollo de cebadores específicos para estos espaciadores, aparte de la ventaja de disponer en un fragmento relativamente pequeño de información útil para posicionar filogenéticamente un determinado organismo y conocer sus posibles variantes. El *cluster* puede estar repetido varios cientos de veces en el genoma y sufre una rápida evolución concertada, lo que homogeniza la variabilidad dentro de un individuo (Baldwin *et al.*, 1995; Page y Holmes, 1998).

Figura 2.4: Representación esquemática del *cluster* del ARNr más habitual en eucariotas. La región IGS (Espaciador Intergénico) se presenta dividida en sus constituyentes. ETS: Espaciador Transcrito Externo, ITS: Espaciador Transcrito Interno, NTS: Espaciador no transcrito, IGS: Espaciador Intergénico.



Los espaciadores transcritos internos se han venido empleando en estudios de filogenia y diagnóstico de parásitos de moluscos en los últimos años, especialmente en especies del género *Perkinsus* (Goggin, 1994; Brown *et al.*, 1999; Kotob *et al.*, 1999a; Figueras *et al.*, 2000; Robledo *et al.*, 2000; Leethochavalit *et al.*, 2003; Abollo *et al.*, 2006). Diferentes especies del género *Marteilia* también han sido caracterizadas por diferencias en esta región (Le Roux *et al.*, 2001; Kleeman *et al.*, 2004; López-Flores *et al.*, 2004; Novoa *et al.*, 2005). Se propuso la existencia de dos perfiles diferentes en las especies del género *Marteilia*, denominados M y O, según fueran procedentes de mejillones u ostras, respectivamente. Cada uno de estos perfiles correspondería a una de las especies, *Marteilia maurini* en el caso del mejillón y *Marteilia refringens* en el de la ostra (Le Roux *et al.*, 2001). Análisis posteriores han sugerido que esta distinción no es correcta en todos los casos (López-Flores *et al.*, 2004; Novoa *et al.*, 2005).

Materiales y métodos

Muestras y aislamiento de ADN

La secuenciación de las regiones *ITS* para el estudio de la epizootiología molecular de los diferentes parásitos se realizó con parásitos de diferentes hospedadores y lugares geográficos como se describe en la tabla 2.2.

El aislamiento de ADN de moluscos fuertemente parasitados fue realizado con *DNAzol* (Invitrogen Life Technologies) siguiendo las instrucciones del fabricante o con *DNeasy Tissue kit* (Qiagen) siguiendo el protocolo de aislamiento de ADN de tejidos animales. Se midió la concentración de ADN como se describe en el apéndice D y

se ajustó la concentración de ADN a entre 10 y 50 ng μl^{-1} con NaOH 8mM.

Tabla 2.2: Origen geográfico y hospedadores de los parásitos empleados en el estudio de epizootiología molecular de las principales enfermedades de moluscos bivalvos.

Especie de Molusco	Especie de parásito	Procedencia
<i>Ostrea edulis</i>	<i>Bonamia ostreae</i>	Maine (E.E.U.U.)
<i>Ostrea edulis</i>	<i>Bonamia ostreae</i>	Galicia
<i>Ostreola equestris</i>	<i>Bonamia perspora</i>	Carolina del Norte (E.E.U.U.)
<i>Crassostrea ariakensis</i>	<i>Bonamia</i> sp.	Carolina del Norte (E.E.U.U.)
<i>Ostrea chilensis</i>	<i>Bonamia</i> sp.	Chile
<i>Ruditapes philippinarum</i>	<i>Perkinsus olseni</i>	Italia
<i>Ruditapes philippinarum</i>	<i>Perkinsus olseni</i>	Corea del Sur
<i>Ruditapes decussatus</i>	<i>Perkinsus olseni</i>	Galicia
<i>Venerupis pullastra</i>	<i>Perkinsus olseni</i>	Galicia
<i>Pitar rostrata</i>	<i>Perkinsus</i> sp.	Uruguay
<i>Ostrea edulis</i>	<i>Marteilia</i> sp.	Kavála (Grecia)
<i>Ostrea edulis</i>	<i>Marteilia</i> sp.	Tesalónica (Grecia)
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	<i>Martelia</i> sp.	La Spezia (Italia)

Los cebadores empleados en la amplificación de las regiones ITS de los diferentes parásitos se encuentran recogidos en la tabla 2.3.

Tabla 2.3: Cebadores empleados para la amplificación de las regiones ITS para el tipado molecular de los principales patógenos de moluscos presentes en Galicia.

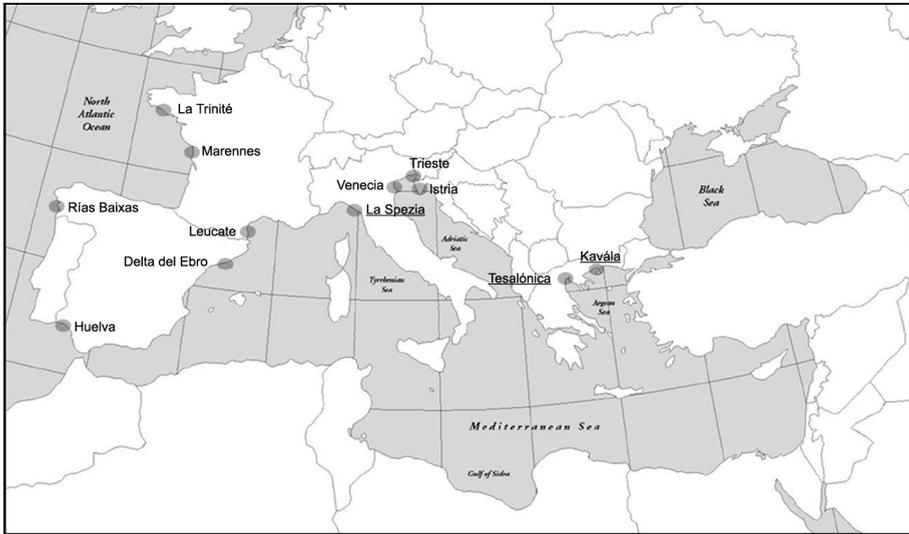
Cebador	Secuencia 5' > 3'	Dirección	Organismo	Tamaños esperados	Referencia
Bon ITS F1	CAGGATGCCCTTAGATGC	Directa	<i>Bonamia</i> spp.	900-916 pb	Presente tesis
Bon ITS R1	GTAACGGCGAGTGAAGC	Reversa			
Bon ITS F2	TGAGGTGAATTAGGTGGATAAG	Directa	<i>Bonamia</i> spp.	689-724 pb	
Bon ITS R3	CCCCAGTAACGGCGAGTGAAG	Reversa			
Perk-ITS S	CTTAGAGGAAGGAGAAGTCGTAAC	Directa	<i>Perkinsus</i> spp.	826 pb	Kotob <i>et al.</i> , 1999
Perk-ITS As	GCTTACTTATATGCTTAAATTCAG	Reversa			
Pk-ITS1 S	TCTGCGAACTAGCGGTCTT	Directa	<i>Perkinsus olseni</i>	673 pb	Presente tesis
Pk-ITS2 As	ACCGACAAGCGTGCTATGAT	Reversa			
2S	CCGCACACGTTCTTCACTCC	Directa	<i>Marteilia refringens</i>	334 pb	Le Roux <i>et al.</i> , 2001
3As	CTCGCGAGTTTCGACAGACG	Reversa			

Amplificación de las regiones ITS

Para la amplificación de las regiones ITS de *Bonamia* spp. se emplearon alternativamente las parejas de cebadores *Bon ITS F1* y *Bon ITS R1* o *Bon ITS F2* y *Bon ITS R3*. La mezcla de reacción se realizó en un volumen de 25 µl y consiste en 2.5 µl de tampón 10x (10 mM de Tris, 50 mM de KCl; pH 8.3), 1.5 mM de MgCl₂ en el caso de la pareja *Bon ITS F1*- *Bon ITS R1* o 1.25 mM en el caso de la pareja *Bon ITS F2*- *Bon ITS R3*, 0.2 mM de cada uno de los dNTPs, 0.5 µM de cada cebador y 0.025 U de *Taq* polimerasa. Se empleó el siguiente ciclo para la amplificación: una desnaturalización inicial a 95°C durante 7 min, 40 ciclos con una desnaturalización a 95°C durante 1 min, una fusión a 55.5°C durante 1 min y una extensión a 72°C durante 1 min y una extensión final a 72°C durante 10 min.

La amplificación de las regiones ITS de *Perkinsus olseni* se realizó con la misma pareja de cebadores y de la misma forma que la detección de *Perkinsus olseni* por PCR (ver sección *Materiales y Métodos* del capítulo I). Igualmente, la amplificación de la región ITS-1 de *Marteilia* spp. también se realizó de la misma forma que la detección de *Marteilia* spp. por PCR como se describe en la sección *Materiales y Métodos* en el capítulo I. Para la caracterización molecular de *Marteilia*, además de las muestras detalladas en la tabla 2.2, se emplearon las secuencias de la región ITS de parásitos de diferentes regiones europeas (Fig. 2.5) y publicadas en la literatura previamente (Le Roux *et al.*, 2001; López-Flores *et al.*, 2004; Novoa *et al.*, 2005).

Figura 2.5: Mapa de Europa meridional mostrando las localidades de procedencia de las diferentes muestras empleadas en el tipado molecular de la región *ITS-1* de *Marteilia* spp. Las localidades caracterizadas en el presente trabajo se presentan subrayadas.



Clonaje y secuenciación del ADN

Todos los productos fueron ligados en el vector pCR2.1 bien con la ayuda de la enzima ligasa o de la topoisomerasa siguiendo las instrucciones del fabricante (Invitrogen Life Technologies). Los productos de las especies del género *Perkinsus* fueron secuenciados directamente.

Se comprobó la presencia del inserto de interés por medio de la amplificación con los cebadores del vector *M13F* y *M13R* y la selección de clones del tamaño adecuado. La PCR se realizó con las siguientes condiciones en un volumen de 25 μ l: 2.5 μ l de tampón 10x (10 mM de Tris, 50 mM de KCl; pH 8.3), 2.75 mM de $MgCl_2$, 0.4 mM de cada uno de los dNTPs, 0.4 μ M de cada cebador y 0.025 U de *Taq* polimerasa. Además se añadió como ADN molde 1 μ l de la solución resultante de hervir a 100°C durante 10 min una parte de la colonia en

100 µl de agua destilada estéril. Las reacciones fueron programadas con una desnaturalización inicial a 94°C durante 5 min, 40 ciclos de una desnaturalización a 94°C durante 30 s, una fusión a 55°C durante 1 min y una extensión a 72°C durante 2 min. Finalmente, se permitió una extensión final a 72°C durante 10 min. Las reacciones se realizaron en un termociclador *Perkin Elmer GeneAmp 9600 thermal cycler* (Applied Biosystems). Posteriormente, los productos de PCR fueron separados en un gel de agarosa al 1% en tampón TAE (p/v) teñido con bromuro de etidio y fotografiados utilizando luz ultravioleta a 488 nm. Los productos del tamaño esperado fueron seleccionados para su posterior secuenciación.

Los productos de PCR fueron secuenciados siguiendo dos métodos alternativos:

- Se crecieron los clones seleccionados en medio LB líquido a 37°C toda la noche y se realizó la extracción del ADN plasmídico (*miniprep*) con la ayuda del kit *Quiaprep Spin Miniprep* (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante. A continuación se llevó a cabo la secuenciación simultánea bidireccional de los productos con la ayuda de cebadores *M13F* y *M13R* marcados cada uno con una molécula de emisión infrarroja diferente, lo que permite la lectura simultánea de las dos hebras de ADN al ser excitadas por un láser. La reacción de secuenciación se preparó con el kit *Thermo Sequenase sequencing kit* (Amersham Life Science) y se secuenció en un secuenciador automático Li-Cor 4200 L (Li-Cor Biosciences).

- Los productos de PCR obtenidos de los clones seleccionados fueron purificados por digestión durante 1 h a 37°C con las enzimas Exonucleasa I (*Exo I*) y fosfatasa alcalina de gamba (*SAP*) (Amersham PharmaciaBiotech). Las enzimas fueron seguidamente desnaturalizadas a 80°C durante 15 min. La reacción de secuenciación fue llevada a cabo con el *Big Dye® Terminator Cycle Sequencing Kit v3.1* (Applied Biosystems) siguiendo las instrucciones del fabricante. El producto resultante fue precipitado y las muestras fueron resuspendidas en tampón de carga con formamida. Las muestras marcadas fueron cargadas en un secuenciador automático *ABI Prism 377 Automated Sequencer* (Applied Biosystems).

Análisis filogenético

Las secuencias obtenidas fueron desprovistas del fragmento de secuencia perteneciente al vector tras ser revisadas manualmente. Una vez limpias, fueron cargadas en el programa BLASTn (Altschul *et al.*, 1990) para su comparación con las secuencias ya depositadas en la base de datos *GenBank* (Benson *et al.*, 2006).

Se crearon secuencias consenso de las secuencias del género *Perkinsus* disponibles en la base de datos *GenBank* con el programa *BioEdit v7.0.4.1* (Hall, 1999) fijando el umbral de frecuencia al 95%. Las secuencias se alinearon mediante el algoritmo Clustal W (Thompson *et al.*, 1994) incluido en el programa MEGA3 (Kumar *et al.*, 2004) con una penalización de apertura de 10 y de extensión de hueco de 4 tanto para alineamientos de pares como de alineamientos

múltiples. Las zonas de alta variabilidad fueron realineadas manualmente.

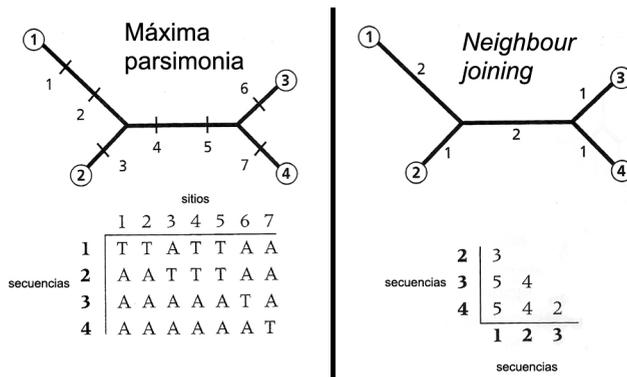
Las secuencias empleadas en el consenso de las diferentes especies del género *Perkinsus* y sus códigos de acceso están descritas en el apéndice G.

En el caso de las secuencias pertenecientes a *Marteilia* spp. procedentes de *Mytilus galloprovincialis* y *Ostrea edulis* solo se realizaron secuencias consenso en el caso de que las secuencias de los diferentes clones coincidieran exactamente (umbral de frecuencia igual al 100%). Se mantuvieron las formas representadas únicamente por un clon debido a su interés en el tipado molecular por RFLP. Las secuencias obtenidas del *GenBank* empleadas en la formación de los diferentes consensos de *Marteilia* spp. están descritas en el apéndice G, junto con sus respectivos códigos de acceso.

Los análisis filogenéticos se realizaron con la ayuda del programa MEGA3 (Kumar *et al.*, 2004). La reconstrucción filogenética de los parásitos de los géneros *Bonamia* y *Perkinsus* se realizó por medio de la técnica de Máxima Parsimonia usando la opción heurística CNI con un factor de búsqueda de 1 y con una adición inicial de árboles de 200 réplicas. Los valores de *bootstrap* (muestreo con reemplazamiento) fueron calculados sobre 100 replicados. Como grupo externo (*outgroup*) en la filogenia del género *Bonamia* se empleó el cercozoo *Bigelowiella natans* Moestrup, 2001 (AF289035) en el árbol 5.8S y la *Bonamia* sp. situada más basal en este análisis para los análisis de la región ITS (*ITS-1* e *ITS-2*). Como grupo externo en la filogenia de *Perkinsus* se empleó *Perkinsus qugwadi*, de posición basal

en anteriores filogenias (Casas *et al.*, 2004; Villalba *et al.*, 2004). Se realizaron diferentes análisis considerando el fragmento *ITS-1*, *5.8S* e *ITS-2* de forma global, y la subunidad *5.8S* y las regiones *ITS* (*ITS-1* e *ITS-2*) por separado. La reconstrucción filogenética a partir del fragmento de la región *ITS-1* de *Marteilia* sp. se realizó por medio de la técnica de *Neighbour Joining*, calculando las distancias por medio del modelo de Kimura de dos parámetros para transiciones y transversiones para cada uno de los genes considerados. No se usó grupo externo y se situó la raíz en el punto medio del filograma. El valor de *bootstrap* (muestreo con reemplazamiento) fue de 10000 replicados.

Figura 2.6: Comparación entre un árbol obtenido por máxima parsimonia y otro obtenido por *Neighbour Joining* para el mismo conjunto de secuencias. El árbol obtenido por máxima parsimonia identifica qué sitio contribuye a la longitud de cada brazo (tomado de Page y Holmes, 1998).



La máxima parsimonia es un método de reconstrucción de filogenias a partir de caracteres que busca el árbol que requiere un menor número de cambios evolutivos, siguiendo el principio filosófico de la “navaja de Ockham” (entre varias alternativas la más sencilla es la verdadera). Su ventaja principal es que emplea un criterio de optimización que resulta en la obtención del mejor árbol

posible. Para cada uno de los sitios comparados, construye el árbol que requiere un menor número de cambios. Problemas de este método son la atracción de la rama larga, que puede hacer que se agrupen dos taxones que son muy divergentes y el tiempo de computación necesario para obtener el árbol, generalmente muy elevado. Además, a partir de cierto número de secuencias es imposible asegurar que se ha obtenido el árbol más parsimonioso, por lo que se usan métodos heurísticos que aproximan la solución. El *Neighbour Joining* es un método de reconstrucción de filogenias a partir de distancias que busca el árbol con una longitud de ramas total menor. Su ventaja principal es que se puede emplear con grandes series de datos y consume poco tiempo y recursos informáticos. Emplea como datos las distancias génicas y construye el árbol mediante un algoritmo de agrupamiento. El resultado final es un único árbol. Su mayor desventaja es la pérdida de información al transformar las secuencias en distancias. La figura 2.6 ilustra las diferencias entre máxima parsimonia y *Neighbour Joining* (Page y Holmes, 1998).

PCR-RFLP

Se realizó el análisis de los polimorfismos de longitud de los fragmentos de restricción de los productos de PCR *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP) en el caso de *Perkinsus* y *Marteilia*.

La técnica de PCR-RFLP consiste en el corte de los productos de PCR con endonucleasas de restricción. Los cortes producidos por las endonucleasas, ya que cortan en dianas específicas, dependen de

Resultados

Bonamiosis

Se obtuvieron un total de 58 clones procedentes de diferentes especies del género *Bonamia*. En el caso de *Bonamia ostreae*, se obtuvieron cuatro tipos génicos; Tipo I (10 clones), Tipo II (6 clones), Tipo III (2 clones) y Tipo IV (4 clones). Además, se obtuvieron otros cuatro tipos encontrados cada uno en un único clon, pero con diferencias que se repiten en alguno de los otros tipos (Fig 2.8); Tipo V, Tipo VI, Tipo VII y Tipo VIII. De todos estos tipos descritos, solamente el Tipo I y el V están presentes únicamente en la costa de Maine (E.E.U.U.), y el VI, VII y VIII únicamente en la costa de Galicia. Los tipos restantes; II, III y IV están presentes tanto en Galicia como en Maine. De *Bonamia perspora* se obtuvieron dos tipos; Tipo I (3 clones) y Tipo II (9 clones), de *Bonamia* sp. de *Crassostrea ariakensis* también se obtuvieron dos tipos; Tipo I (8 clones) y Tipo II (2 clones) y de *Bonamia* sp. de *Ostrea chilensis* se obtuvieron cuatro tipos; Tipo I (4 clones), Tipo II (1 clon), Tipo III (8 clones) y Tipo IV (1 clon).

Considerando las diferentes regiones por separado, se encontraron dos regiones *ITS-1* diferentes para *Bonamia ostreae*, una de 143 nucleótidos de longitud y otra región idéntica, exceptuando una inserción de 13 nucleótidos por lo que presenta una longitud total de 156 nucleótidos. El contenido en GC de la región más larga es de un 42% y el de la más corta de un 43%. La región más larga se encuentra en los tipos I, III, V y VI y la más corta en II, IV, VII y VIII. *Bonamia perspora* presenta una región *ITS-1* más corta, con dos tipos, uno de 110 nucleótidos de longitud y un 28% de contenido en GC y

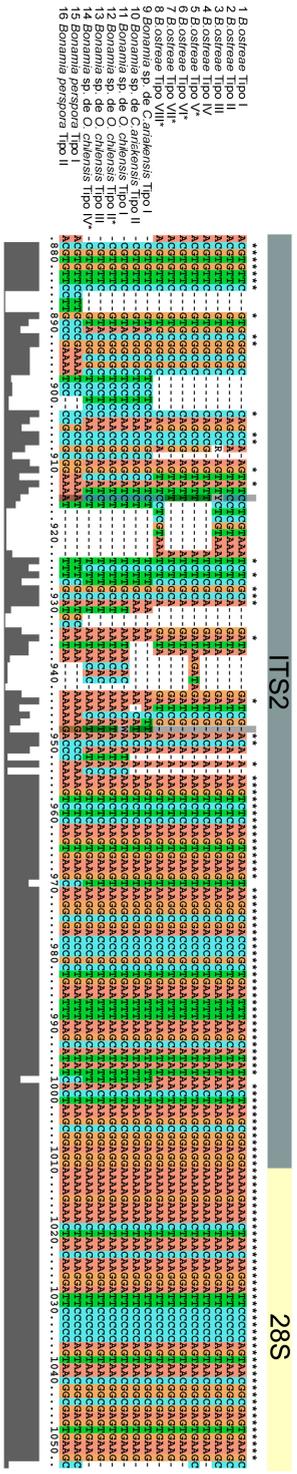
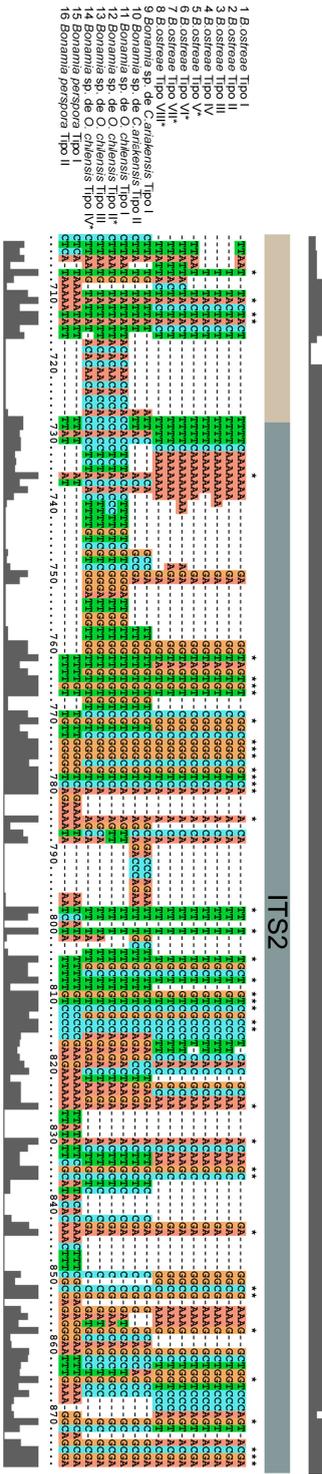
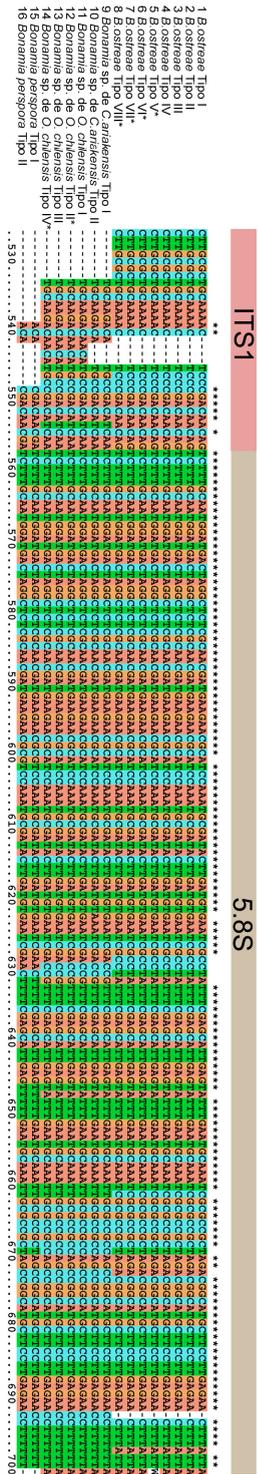
otro de 106 nucleótidos y con un contenido en GC del 29%. La *Bonamia* sp. de *Ostrea chilensis* presenta dos tipos alternativos de región *ITS-1*, una de 146 y otra de 147 nucleótidos de longitud, ambas con un contenido en GC del 32%. La de 146 nucleótidos forma parte de los tipos I y III y la de 147 de los tipos II y IV. *Bonamia* sp. de *Crassostrea ariakensis* presenta un único tipo de región *ITS-1*, con un 31% de contenido en GC y una longitud de 135 nucleótidos.

El gen del ARNr 5.8S de *Bonamia ostreae* también presenta polimorfismo. En este caso hay tres formas de tres longitudes diferentes, 156, 152 y 158 nucleótidos de longitud. El contenido en GC es del 42% excepto para la forma de 152 nucleótidos que contiene un 43%. *Bonamia perspora* presenta una única forma de 158 nucleótidos de longitud con un 42% de contenido en GC, pero cuya secuencia es diferente a la previamente descrita para *Bonamia ostreae*. *Bonamia* sp. de *Ostrea chilensis* presenta dos formas, una de 170 nucleótidos de longitud y presente en los tipos I, II y III, y otra de 169 nucleótidos de longitud, presente en el tipo IV. El contenido en GC es del 44% en ambos casos. *Bonamia* sp. de *Crassostrea ariakensis* presenta una única forma de 158 nucleótidos de longitud y un 42% de contenido en GC.

La región *ITS-2* de *Bonamia ostreae* presenta una gran variedad de formas de diferentes longitudes: 203, 204, 205, 196, 201, 200 y 198 nucleótidos de longitud en los tipos I, II y VIII, III, IV, V, VI y VII, respectivamente. El contenido en GC fue del 50% excepto para los fragmentos de 203, 196 y 198 nucleótidos, que fue del 51%. *Bonamia perspora* presenta una forma de 229 nucleótidos de longitud, con un 42% de contenido en GC. *Bonamia* sp. de *Ostrea chilensis* presenta tres formas diferentes, dos de 235 y una de 236 nucleótidos de longitud

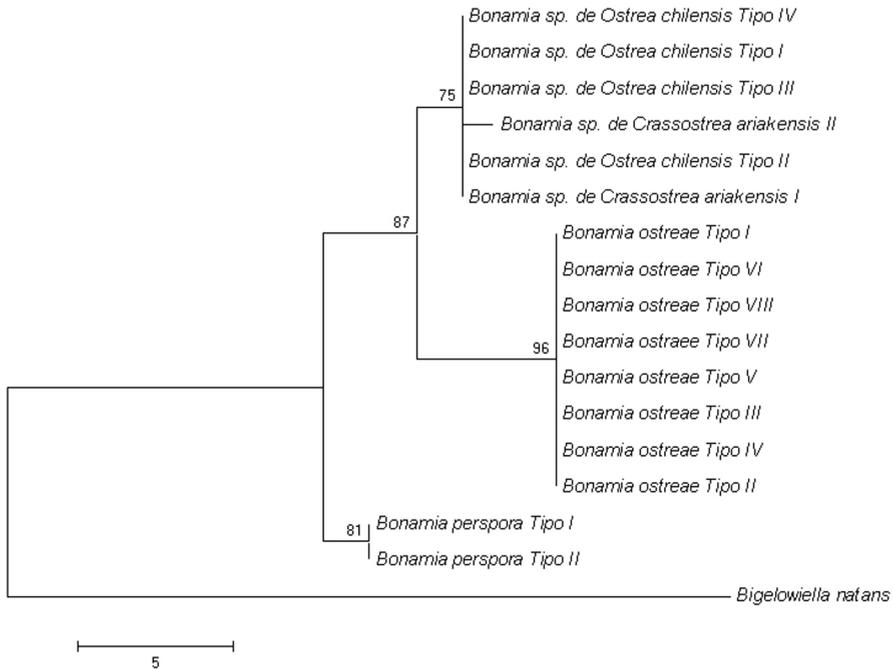
presente en los tipos III y IV. Todas las formas presentan un contenido en GC del 51%. Por último, *Bonamia* sp. de *Crassostrea ariakensis* presenta dos formas, una de 218 nucleótidos de longitud y otra de 217, ambas con un contenido en GC del 54%.

Figura 2.8: (Página siguiente) Alineamiento del fragmento del cluster del ARNr secuenciado en las diferentes *Bonamia* spp. (1) *Bonamia ostreae* Tipo I (2) *Bonamia ostreae* Tipo II (3) *Bonamia ostreae* Tipo III (4) *Bonamia ostreae* Tipo IV (5) *Bonamia ostreae* Tipo V* (6) *Bonamia ostreae* Tipo VI* (7) *Bonamia ostreae* Tipo VII* (8) *Bonamia ostreae* Tipo VIII* (9) *Bonamia* sp. de *Crassostrea ariakensis* Tipo I (10) *Bonamia* sp. de *Crassostrea ariakensis* Tipo II (11) *Bonamia* sp. de *Ostrea chilensis* Tipo I (12) *Bonamia* sp. de *Ostrea chilensis* Tipo II* (13) *Bonamia* sp. de *Ostrea chilensis* Tipo III (14) *Bonamia* sp. de *Ostrea chilensis* Tipo IV* (15) *Bonamia perspora* Tipo I (16) *Bonamia perspora* Tipo II. Los asteriscos indican que las secuencias están representadas únicamente por un clon.



La figura 2.9 ilustra las relaciones evolutivas dentro del género *Bonamia* de acuerdo al gen del ARNr 5.8S mediante la técnica de Máxima Parsimonia. Las secuencias de *Bonamia* spp. de *Ostrea chilensis* y *Crassostrea ariakensis* se agrupan juntas con un elevado valor de *bootstrap* (75%), mientras que estas a su vez se agrupan con un elevado valor de *bootstrap* (87%) con el grupo formado por las secuencias de *Bonamia ostreae* (rama con un 96% de *bootstrap*). *Bonamia perspora* se presenta como la especie más divergente y más próxima al cercozoo *Bigelowiella natans* empleado como grupo externo.

Figura 2.9: Filograma más parsimonioso obtenido a partir de las secuencias del gen 5.8S del ARNr mostrando las relaciones evolutivas del género *Bonamia*. El análisis está realizado sobre 135 nucleótidos alineados de las secuencias obtenidas en el género, con el cercozoo *Bigelowiella natans* como grupo externo. La barra indica la equivalencia entre la distancia y el número de cambios. Se representan en las ramificaciones los valores de *bootstrap* iguales o superiores al 40%. *Bootstrap*: 100 repeticiones. Estadísticas del árbol: Longitud (L): 45; Índice de Consistencia (CI): 0.978; Índice de Retención (RI): 0.979.



Los filogramas obtenidos tanto con las regiones *ITS* (*ITS-1* + *ITS-2*) (Fig. 2.10) como con el fragmento completo *ITS-1+5.8S+ITS-2* (Fig. 2.11) presentan una topología idéntica. Las *Bonamia* spp. procedentes de *Crassostrea ariakensis* y *Ostrea chilensis* se agrupan con un elevado valor de *bootstrap* (93% en ambos filogramas). *Bonamia ostreae* forma una rama con *Bonamia perspora*, que se ha empleado como grupo externo en ambos filogramas.

Figura 2.10: Filograma más parsimonioso obtenido a partir de las secuencias de las regiones *ITS* del *cluster* del ARNr mostrando las relaciones evolutivas en el género *Bonamia*. El análisis está realizado sobre 306 nucleótidos alineados de las secuencias obtenidas del género, con la especie *Bonamia perspora* como grupo externo. La barra indica la equivalencia entre la distancia y el número de cambios. Se representan en las ramificaciones los valores de *bootstrap* iguales o superiores al 40%. *Bootstrap*: 100 repeticiones. Estadísticas del árbol: Longitud (L): 115; Índice de Consistencia (CI): 0.948; Índice de Retención (RI): 0.983.

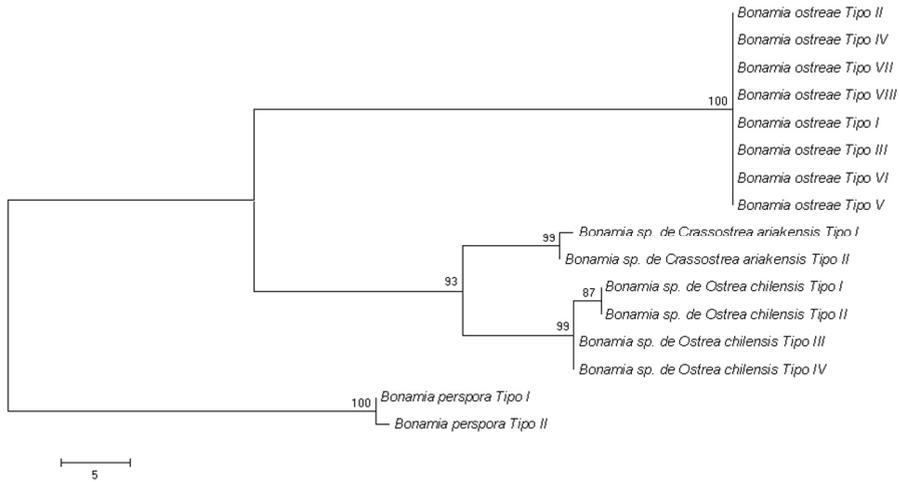
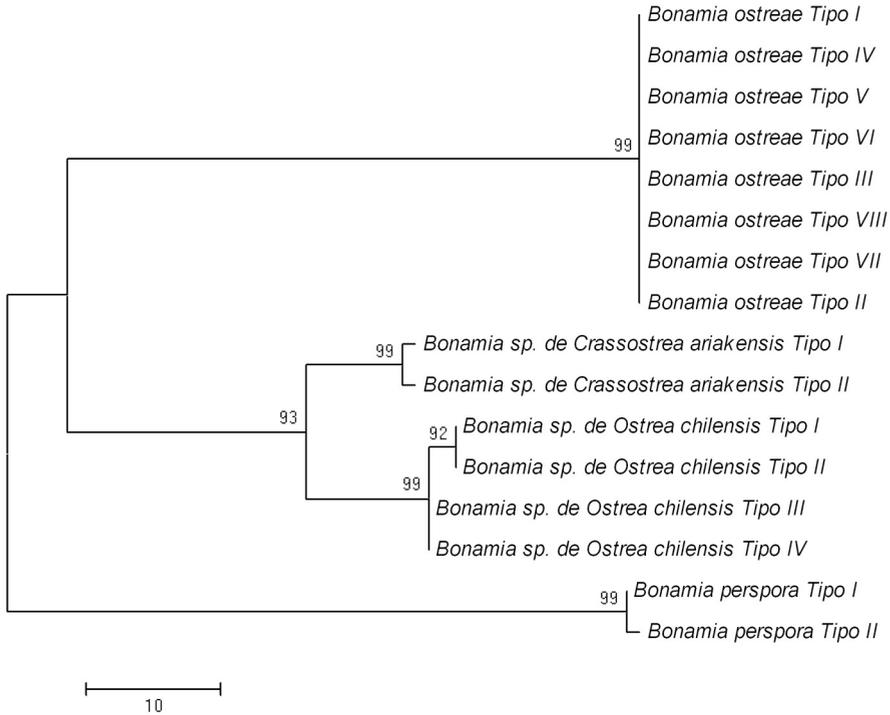


Figura 2.11: Filograma más parsimonioso obtenido a partir de las secuencias del fragmento completo *ITS-1+5.8S+ITS-2* del ARNr mostrando las relaciones evolutivas en el género *Bonamia*. El análisis está realizado sobre 415 nucleótidos alineados de las secuencias obtenidas del género, con la especie *Bonamia perspora* como grupo externo. La barra indica la equivalencia entre la distancia y el número de cambios. Se representan en las ramificaciones los valores de *bootstrap* iguales o superiores al 40%. *Bootstrap*: 100 repeticiones. Estadísticas del árbol: Longitud (L): 132; Índice de Consistencia (CI): 0.955; Índice de Retención (RI): 0.986.



Perkinsosis

Las secuencias obtenidas a partir de *Perkinsus* spp. parásitas de *Ruditapes philippinarum*, *Ruditapes decussatus*, *Venerupis pullastra* y *Pitar rostrata* (Koch, 1844), junto con los consensos formados a partir de las diferentes secuencias del fragmento *ITS-1+5.8S+ITS-2* están recogidas en la figura 2.12.

La longitud de los fragmentos obtenidos de los parásitos procedentes de Corea del Sur, Italia y Galicia fue de 637 pb, mientras que en el caso de Uruguay fue de 622 pb.

El fragmento amplificado a partir del parásito de la almeja *Pitar rostrata* originaria de Uruguay presenta una identidad del 99% y una puntuación (*score*) de 1204 con la secuencia de *Perkinsus olseni* con código de acceso U07701 depositada en el *GenBank* de acuerdo al programa BLASTn.

El fragmento de la región *ITS-1* secuenciado para *Perkinsus olseni* procedente de diferentes localidades geográficas presenta diferentes tamaños (147 nucleótidos los procedentes de Corea del Sur, Italia y Galicia, 130 nucleótidos el procedente de Uruguay) y diferentes contenidos en GC (46% los procedentes de Corea del Sur, Italia y Galicia, 45% el procedente de Uruguay) al consenso obtenido a partir de las secuencias depositadas en el *GenBank*, de 183 nucleótidos de longitud y 47% de contenido en GC. El consenso procedente de Corea del Sur presenta un polimorfismo en la base 42, donde puede alternar una timina o una citosina. *Perkinsus marinus* presenta dos formas de 196 y 200 nucleótidos de longitud con un 41% y un 42% de contenido en GC, respectivamente. *Perkinsus mediterraneus* presenta un fragmento de la región *ITS-1* de 113 nucleótidos de longitud con un contenido en GC del 42%. *Perkinsus chesapeaki* presenta también dos formas con 186 y 188 nucleótidos de longitud y un 42 y 43% de contenido en GC y *Perkinsus qugwadi*, una región *ITS-1* de 204 nucleótidos de longitud y un 47% de contenido en GC.

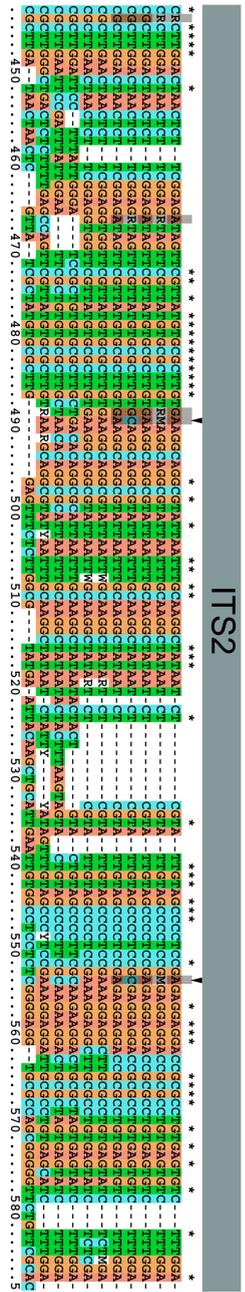
El gen del ARNr 5.8S de *Perkinsus olseni* procedente del consenso de las secuencias depositadas en el *GenBank* de diferentes localidades geográficas, el gen de *Perkinsus mediterraneus* y de *Perkinsus marinus* es casi idéntico y tiene 149 nucleótidos de longitud y un contenido en GC del 47%. Únicamente en la posición 51, la secuencia consenso de *Perkinsus olseni* presenta una purina, tanto adenina como guanina (A o G, simbolizada como R). Los dos tipos de *Perkinsus chesapeakei*, ITS-A e ITS-B, presentan una región de 149 nucleótidos, con la única salvedad de la presencia de una purina (R) en la posición 1 de *Perkinsus chesapeakei* ITS-B. El contenido en GC es del 46-47% según se encuentre una adenina o una guanina en esa posición. *Perkinsus qugwadi* presenta una longitud de 148 nucleótidos y un contenido en GC del 46%.

El fragmento de la región *ITS-2* secuenciado en *Perkinsus olseni*, al igual que el fragmento de la *ITS-1*, presenta diferentes tamaños (341 nucleótidos los procedentes de Corea del Sur, Italia y Galicia, 343 nucleótidos el procedente de Uruguay) y diferentes contenidos en GC (46% los procedentes de Corea del Sur, Italia y Galicia, 47% el procedente de Uruguay). Las secuencias de Corea del Sur y Galicia son iguales al consenso obtenido a partir de las secuencias depositadas en el *GenBank*, aunque presentan algunos loci polimórficos en las posiciones 50 y 64, donde aparecen en los dos casos adenina o guanina (Fig 2.12), de 381 nucleótidos de longitud y 46% de contenido en GC. La secuencia procedente de Uruguay presenta una citosina en la posición 31, frente a la timina del resto de las secuencias, una citosina en la posición 108 y 160 frente a la adenosina presenta en el resto de las secuencias a excepción de algunas muestras de Italia, que también presentan una citosina. La

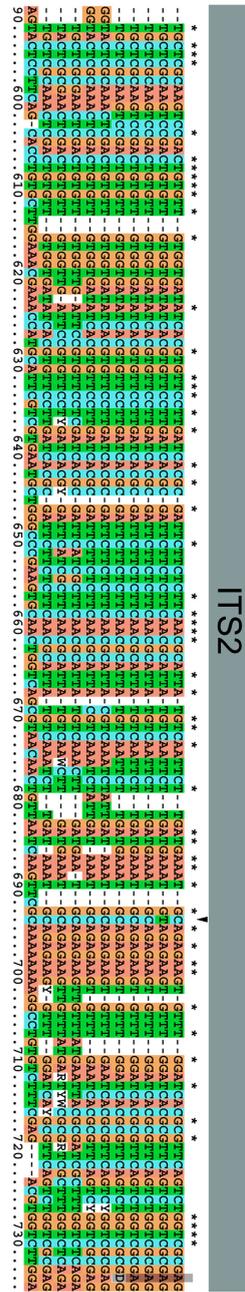
secuencia de Uruguay es polimórfica en las posiciones 45 (adenina o timina) y 85 (adenina o guanina). La secuencia procedente de Italia presenta una timina en la posición 286 frente a la citosina del resto de los *Perkinsus olseni*. Además es la secuencia que presenta más polimorfismos, con la presencia de una purina (adenina o guanina) en las posiciones 50, 64, 85 y 107 y una adenina o citosina en la posición 108 y 160. La secuencia consenso de los diferentes *Perkinsus olseni* publicados en el *GenBank* presenta polimorfismos en las posiciones 50 (adenina o guanina) y en la 324 (adenina, guanina o timina). *Perkinsus marinus* presenta una única forma para la región ITS-2 con 384 nucleótidos de longitud y un 45% de contenido en GC. El fragmento de *Perkinsus mediterraneus* es de 381 nucleótidos de longitud y un 44% de GC. Los tipos de *Perkinsus chesapeakei* presentan dos formas diferentes de la región ITS-2, una de 379 nucleótidos de longitud y 44% de contenido en GC presente en *Perkinsus chesapeakei* ITS-A y otra de 390 nucleótidos de longitud y 43% de contenido en GC presente en *Perkinsus chesapeakei* ITS-B. *Perkinsus qugwadi* presenta un tamaño de 373 nucleótidos de longitud y 49% de contenido en GC.

Figura 2.12: (Página siguiente) Alineamiento del fragmento del *cluster* del ARNr secuenciado en *Perkinsus olseni* de las diferentes localidades. 1-4 Secuencias de *Perkinsus olseni* obtenidas de muestras de diferentes localidades, 5-11 Secuencias consenso a partir de secuencias depositadas en el *GenBank*. (1) *Perkinsus olseni* procedente de Corea del Sur (2) *Perkinsus olseni* procedente de Italia (3) *Perkinsus olseni* procedente de Galicia (4) *Perkinsus* sp. procedente de Uruguay (5) *Perkinsus olseni* (6) *Perkinsus marinus* Tipo I (7) *Perkinsus marinus* Tipo II (8) *Perkinsus chesapeakei* ITS-A (9) *Perkinsus chesapeki* ITS-B (10) *Perkinsus mediterraneus* (11) *Perkinsus qugwadi*. Las posiciones con polimorfismos en las secuencias de *Perkinsus olseni* caracterizadas en la presente tesis están sombreadas y las variaciones únicas ligadas a una zona geográfica están indicadas con una punta de flecha.

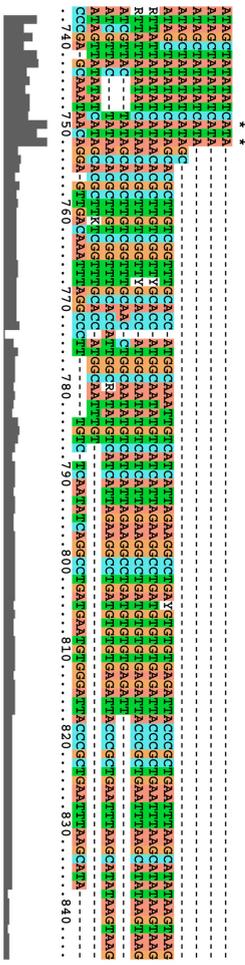
- 1 *Perkinsus olseni* Korea
- 2 *Perkinsus olseni* Italia
- 3 *Perkinsus olseni* Galicia
- 4 *Perkinsus olseni* Uruguay
- 5 *Perkinsus olseni*
- 6 *Perkinsus marinus* Tipo I
- 7 *Perkinsus marinus* Tipo II
- 8 *Perkinsus chesapeakei* ITS A
- 9 *Perkinsus chesapeakei* ITS B
- 10 *Perkinsus mediterraneus*
- 11 *Perkinsus qiywadi*



- 1 *Perkinsus olseni* Korea
- 2 *Perkinsus olseni* Italia
- 3 *Perkinsus olseni* Galicia
- 4 *Perkinsus olseni* Uruguay
- 5 *Perkinsus olseni*
- 6 *Perkinsus marinus* Tipo I
- 7 *Perkinsus marinus* Tipo II
- 8 *Perkinsus chesapeakei* ITS A
- 9 *Perkinsus chesapeakei* ITS B
- 10 *Perkinsus mediterraneus*
- 11 *Perkinsus qiywadi*

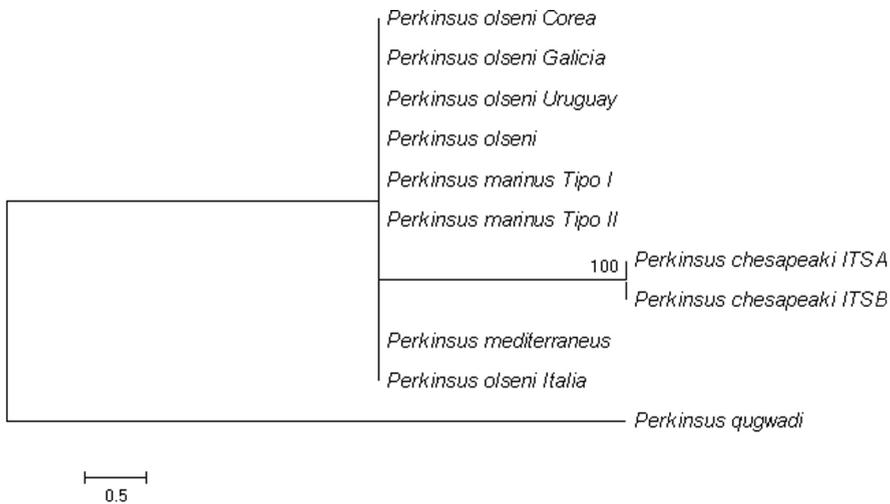


- 1 *Perkinsus olseni* Korea
- 2 *Perkinsus olseni* Italia
- 3 *Perkinsus olseni* Galicia
- 4 *Perkinsus olseni* Uruguay
- 5 *Perkinsus olseni*
- 6 *Perkinsus marinus* Tipo I
- 7 *Perkinsus marinus* Tipo II
- 8 *Perkinsus chesapeakei* ITS A
- 9 *Perkinsus chesapeakei* ITS B
- 10 *Perkinsus mediterraneus*
- 11 *Perkinsus qiywadi*



La figura 2.13 muestra las relaciones evolutivas en el género *Perkinsus* mediante la filogenia del gen del ARNr 5.8S según la técnica de máxima parsimonia. Solamente los dos tipos de *Perkinsus chesapeakei* se muestran agrupados con un alto valor de *bootstrap* (100%) y separados del resto de *Perkinsus* spp.

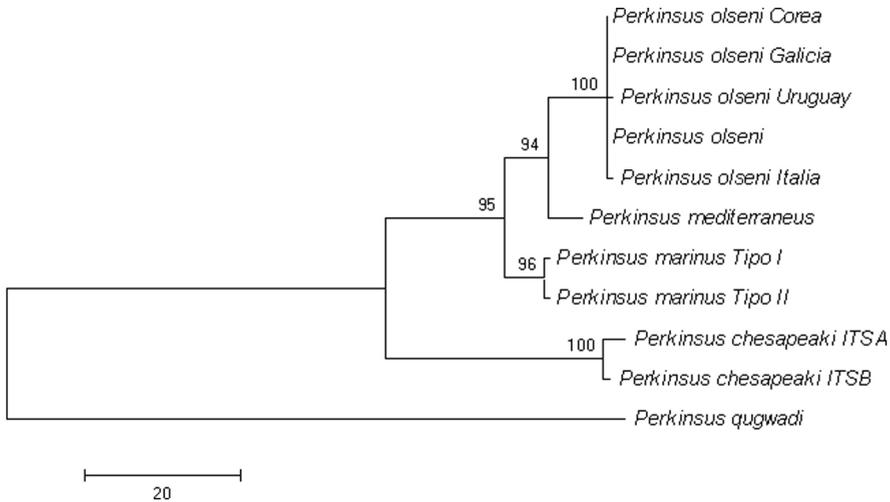
Figura 2.13: Filograma más parsimonioso obtenido a partir de las secuencias del gen 5.8S del ARNr mostrando las relaciones evolutivas en el género *Perkinsus*. El análisis está realizado sobre 145 nucleótidos alineados, con *Perkinsus qugwadi* como grupo externo. La barra indica la equivalencia entre la distancia y el número de cambios. Se representan en las ramificaciones los valores de *bootstrap* iguales o superiores al 40%. *Bootstrap*: 100 repeticiones. Estadísticas del árbol: Longitud (L): 10; Índice de Consistencia (CI): 1; Índice de Retención (RI): 1.



Los filogramas obtenidos tanto con las regiones *ITS* (Fig. 2.14) como con la región completa *ITS-1+5.8S+ITS-2* (Fig. 2.15) presentan una topología idéntica. Las secuencias obtenidas de almejas de Corea del Sur, Italia, Uruguay y Galicia agrupan perfectamente con el consenso de *Perkinsus olsenii* (100% de *bootstrap* en ambos casos) siendo *Perkinsus mediterraneus* la especie más próxima (94% y 95% de *bootstrap* considerando, respectivamente, únicamente las regiones *ITS* o el conjunto de las regiones *ITS* y 5.8S). *Perkinsus marinus* es la

siguiente especie más próxima a esta rama (95% y 96% de *bootstrap*, respectivamente). *Perkinsus chesapeaki* es la especie más próxima a *Perkinsus qugwadi*.

Figura 2.14: Filograma más parsimonioso obtenido a partir de las secuencias de la regiones *ITS* del *cluster* del ARNr mostrando las relaciones evolutivas en el género *Perkinsus*. El análisis está realizado sobre 363 nucleótidos alineados, con la especie *Perkinsus qugwadi* como grupo externo. La barra indica la equivalencia entre la distancia y el número de cambios. Se representan en las ramificaciones los valores de *bootstrap* iguales o superiores al 40%. *Bootstrap*: 100 repeticiones. Estadísticas del árbol: Longitud (L): 202; Índice de Consistencia (CI): 0.955; Índice de Retención (RI): 0.906.



El análisis por RFLP mediante el corte con la enzima *Bsg I* de las diferentes cepas de *Perkinsus olseni* procedentes de Corea del Sur, Italia, Uruguay y Galicia permite diferenciar el *Perkinsus olseni* obtenido a partir de *Perkinsus olseni* de *Pitar rostrata* de Uruguay (Fig. 2.16). Los perfiles de restricción en las muestras de Corea del Sur, Italia y Galicia muestran dos bandas, una de 394 y otra de 243 pb. En el caso de las muestras de Uruguay, el perfil de restricción muestra tres bandas, de 226, 217 y 179 pb.

Figura 2.15: Filograma más parsimonioso obtenido a partir de las secuencias del fragmento completo *ITS-1+5.8S+ITS-2* del ARNr mostrando las relaciones evolutivas en el género *Perkinsus*. El análisis está realizado sobre 508 nucleótidos alineados, con la especie *Perkinsus qugwadi* como grupo externo. La barra indica la equivalencia entre la distancia y el número de cambios. Se representan en las ramificaciones los valores de *bootstrap* iguales o superiores al 40%. *Bootstrap*: 100 repeticiones. Estadísticas del árbol: Longitud (L): 212; Índice de Consistencia (CI): 0.958; Índice de Retención (RI): 0.908.

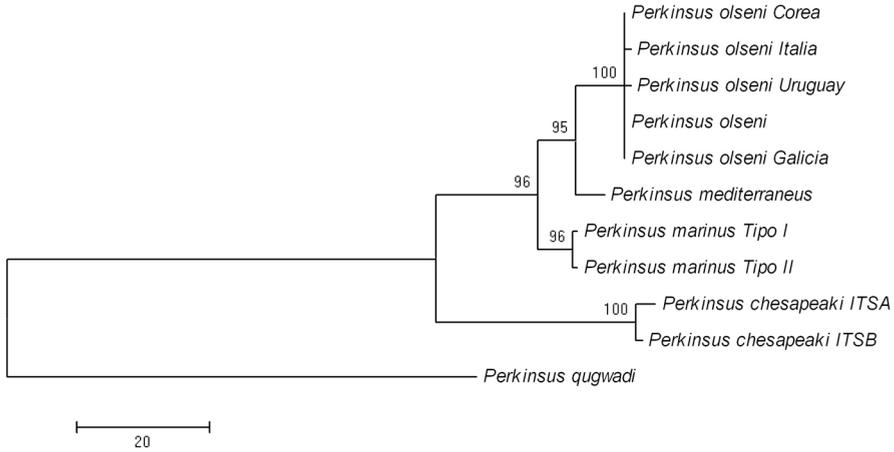
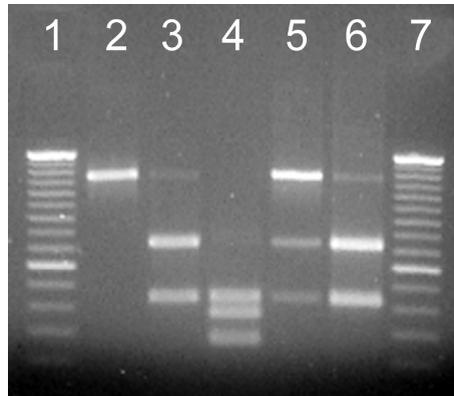


Figura 2.16: RFLP de *Perkinsus olsenii* con la enzima de restricción *BsgI*. Calles 1 y 7: marcador de ADN en escalera de 50 pb (Invitrogen Life Technologies); calle 2, control negativo sin enzima de restricción; calle 3, *Perkinsus olsenii* de Italia, calle 4 *Perkinsus olsenii* de Uruguay; calle 5, *Perkinsus olsenii* de Corea del Sur; calle 6, *Perkinsus olsenii* de Galicia



Marteiliosis

Las secuencias obtenidas a partir de *Marteilia* spp. infectando a *Mytilus galloprovincialis* de Italia y *Ostrea edulis* de Grecia, tras ser sometidas a consenso en caso necesario, están incluidas en la figura 2.17. Las secuencias de los diferentes clones fueron depositadas en la base de datos *GenBank* con los códigos de acceso comprendidos entre DQ426545 y DQ426644.

Tabla 2.4: Tabla mostrando el origen y la cantidad de los clones empleados en la creación de cada una de las secuencias consenso.

Consenso	Nº de clones			Consenso	Nº de clones			Consenso	Nº de clones		
	Total	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	<i>Ostrea edulis</i>		Total	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	<i>Ostrea edulis</i>		Total	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	<i>Ostrea edulis</i>
ITS-A	36	21	15	ITS-AC	1	1	0	ITS-BE	1	1	0
ITS-B	10	10	0	ITS-AD	1	0	1	ITS-BF	1	1	0
ITS-C	10	0	10	ITS-AE	1	1	0	ITS-BG	1	1	0
ITS-D	6	4	2	ITS-AF	1	1	0	ITS-BH	1	1	0
ITS-E	6	5	1	ITS-AG	1	1	0	ITS-BI	1	1	0
ITS-F	4	1	3	ITS-AH	1	1	0	ITS-BJ	1	1	0
ITS-G	3	3	0	ITS-AI	1	1	0	ITS-BK	1	1	0
ITS-H	3	2	1	ITS-AJ	1	0	1	ITS-BL	1	0	1
ITS-I	2	0	2	ITS-AK	1	0	1	ITS-BM	1	0	1
ITS-J	2	2	0	ITS-AL	1	0	1	ITS-BN	1	0	1
ITS-K	2	2	0	ITS-AM	1	1	0	ITS-BO	1	0	1
ITS-L	2	2	0	ITS-AN	1	0	1	ITS-BP	1	0	1
ITS-M	1	0	1	ITS-AO	1	1	0	ITS-BQ	1	0	1
ITS-N	1	0	1	ITS-AP	1	1	0	ITS-BR	1	0	1
ITS-O	1	1	0	ITS-AQ	1	1	0	ITS-BS	1	0	1
ITS-P	1	1	0	ITS-AR	1	1	0	ITS-BT	1	0	1
ITS-Q	1	1	0	ITS-AS	1	1	0	ITS-BU	1	0	1
ITS-R	1	1	0	ITS-AT	1	1	0	ITS-BV	1	0	1
ITS-S	1	1	0	ITS-AU	1	1	0	ITS-BW	1	0	1
ITS-T	1	1	0	ITS-AV	1	1	0	ITS-BX	1	0	1
ITS-U	1	1	0	ITS-AW	1	1	0	ITS-BY	1	0	1
ITS-V	1	1	0	ITS-AX	1	1	0	ITS-BZ	1	0	1
ITS-W	1	1	0	ITS-AY	1	1	0	ITS-CA	1	0	1
ITS-X	1	0	1	ITS-AZ	1	1	0	ITS-CB	1	0	1
ITS-Y	1	1	0	ITS-BA	1	1	0	ITS-CC	1	0	1
ITS-Z	1	0	1	ITS-BB	1	1	0	ITS-CD	1	0	1
ITS-AA	1	1	0	ITS-BC	1	1	0				
ITS-AB	1	1	0	ITS-BD	1	1	0				

Se obtuvieron doce tipos génicos como consenso junto con las secuencias previamente depositadas en la base de datos *GenBank*, mientras que los otros 70 tipos están formados por un único clon. En la tabla 2.4 se resume la procedencia de las secuencias consideradas

en la formación de los consensos. Todos los tipos presentan una longitud entre 306 y 412 nucleótidos de longitud y un contenido en GC entre el 60 y el 57%.

Figura 2.17: (Página siguiente) Alineamiento del fragmento de la región *ITS-1* del ARNr secuenciado en *Marteilia* sp. Las secuencias corresponden tanto a consensos (1-12) obtenidos de la secuenciación de múltiples clones procedentes de *Marteilia* sp. infectando *Mytilus galloprovincialis* de Italia y *Ostrea edulis* de Grecia y de secuencias previamente depositadas en el *GenBank* por otros autores como a clones únicos (13-82). (1) ITS-A (2) ITS-B (3) ITS-C (4) ITS-D (5) ITS-E (6) ITS-F (7) ITS-G (8) ITS-H (9) ITS-I (10) ITS-J (11) ITS-K (12) ITS-L (13) ITS-M (14) ITS-N (15) ITS-O (16) ITS-P (17) ITS-Q (18) ITS-R (19) ITS-S (20) ITS-T (21) ITS-U (22) ITS-V (23) ITS-W (24) ITS-X (25) ITS-Y (26) ITS-Z (27) ITS-AA (28) ITS-AB (29) ITS-AC (30) ITS-AD (31) ITS-AE (32) ITS-AF (33) ITS-AG (34) ITS-AH (35) ITS-AI (36) ITS-AJ (37) ITS-AK (38) ITS-AL (39) ITS-AM (40) ITS-AN (41) ITS-AO (42) ITS-AP (43) ITS-AQ (44) ITS-AR (45) ITS-AS (46) ITS-AT (47) ITS-AU (48) ITS-AV (49) ITS-AW (50) ITS-AX (51) ITS-AY (52) ITS-AZ (53) ITS-BA (54) ITS-BB (55) ITS-BC (56) ITS-BD (57) ITS-BE (58) ITS-BF (59) ITS-BG (60) ITS-BH (61) ITS-BI (62) ITS-BJ (63) ITS-BK (64) ITS-BL (65) ITS-BM (66) ITS-BN (67) ITS-BO (68) ITS-BP (69) ITS-BQ (70) ITS-BR (71) ITS-BS (72) ITS-BT (73) ITS-BU (74) ITS-BV (75) ITS-BW (76) ITS-BX (77) ITS-BY (78) ITS-BZ (79) ITS-CA (80) ITS-CB (81) ITS-CC (82) ITS-CD

La figura 2.18 muestra las relaciones evolutivas de *Marteilia* sp. de acuerdo con la filogenia de la región *ITS-1* obtenida mediante el algoritmo de *Neighbour Joining*. Las secuencias se muestran agrupadas en dos grandes ramas, aunque el valor de *bootstrap* es del 0%.

Figura 2.18: (página siguiente) Filograma obtenido mediante el algoritmo de *Neighbour Joining* empleando la distancia de dos parámetros para transiciones y transversiones de Kimura a partir del fragmento de la región *ITS-1* de las diferentes cepas de *Marteilia* sp. caracterizadas en Europa. El análisis está realizado sobre 284 nucleótidos alineados, situando la raíz del filograma en el punto medio. La barra indica la distancia génica. Se representan en las ramificaciones los valores de *bootstrap* iguales o superiores al 40%. *Bootstrap*: 10000 repeticiones. Longitud del árbol (SBL)=0.2500. Entre paréntesis, al lado del nombre de cada secuencia se encuentra el tipo de perfil mediante el análisis RFLP.

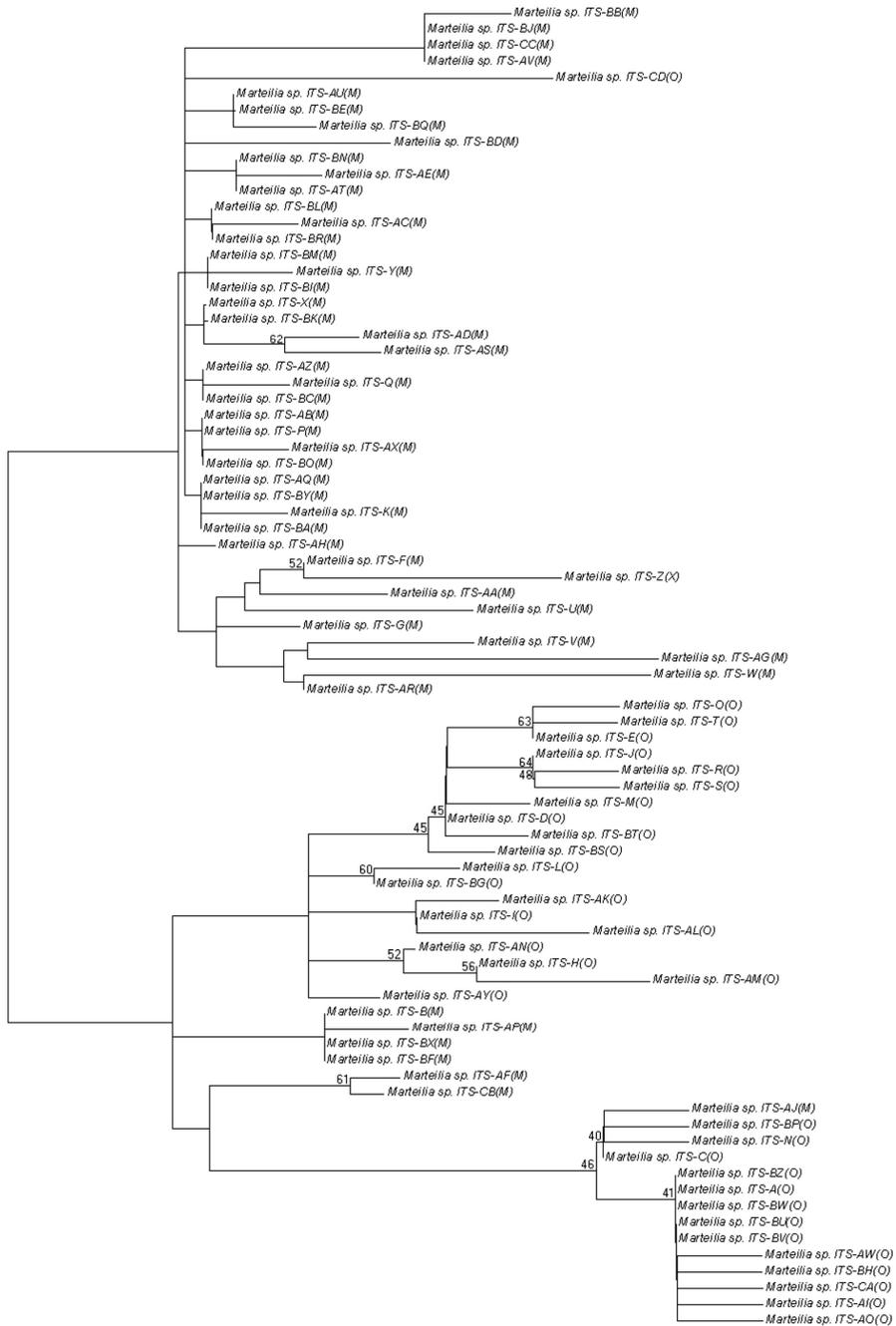
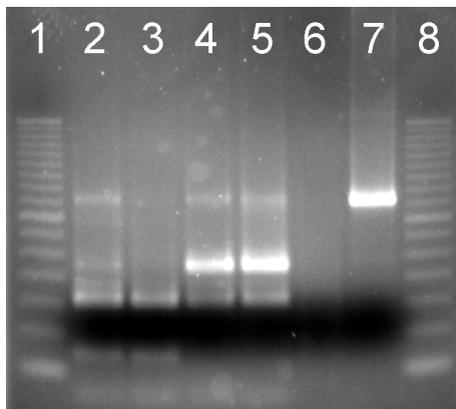


Figura 2.19: RFLP de la región *ITS-1* de *Marteilia* sp. con la enzima de restricción *HhaI*. Calles 1 y 8: marcador de ADN en escalera de 50 pb (Invitrogen Life Technologies); calle 2, perfiles O y M (coinfección); calle 3, perfil M (*Marteilia maurini*), calles 4 y 5, perfil O (*Marteilia refringens*); calle 6, Control negativo sin ADN; calle 7, control negativo sin la enzima de restricción.



Los perfiles de restricción tipo que se observan están representados en la figura 2.19. Los resultados resumidos en la tabla 2.5 muestran que la prevalencia de *Marteilia* sp. es mayor en *Mytilus galloprovincialis* de La Spezia que en *Ostrea edulis* de Kavála. En Tesalónica no se detecta ninguna ostra infectada con *Marteilia* sp. Podemos observar, independientemente de cual sea el molusco hospedador, que el perfil mayoritario es el perfil O. En cualquier caso, casi la mitad de los moluscos infectados lo están por *Marteilia* spp. con ambos perfiles. El perfil M está presente en mayor medida en *Mytilus galloprovincialis* que en *Ostrea edulis*.

Tabla 2.5: Prevalencia de cada tipo de perfil encontrado por RFLP del producto de PCR amplificado directamente del hospedador. *Mytilus galloprovincialis* de La Spezia (Italia) y *Ostrea edulis* de Kavála y Tesalónica (Grecia).

Hospedador	Muestras	Prevalencia (%)	Perfil (%)		
			Tipo O	Tipo M	Coinfectadas
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	18	77.8	35.7	21.4	42.9
<i>Ostrea edulis</i>	30	32.1	44.4	11.1	44.4

La tabla 2.6 resume la literatura existente en el tipado por restricción de la región *ITS-1* en Europa junto con los datos actuales de Grecia e Italia.

En cuanto a las localizaciones de los muestreos, ambos perfiles se encuentran en alta prevalencia tanto en el Océano Atlántico como en el Mar Mediterráneo (Tabla 2.6; Fig. 2.5), alcanzando el 100% ambos perfiles en localidades atlánticas como Marennes y Rías Baixas y mediterráneas como Leucate, Venecia, Trieste o Istria.

Tabla 2.6: (página siguiente) Prevalencia de cada tipo de perfil encontrado por RFLP de los clones y número de moluscos y clones evaluados tanto en la literatura como en los presentes datos. *La coinfección se produjo entre un perfil M y un tercer perfil denominado perfil X.

Francia (La Trinité)							
Hospedador	Moluscos infectados	Clones	Tipo M	Tipo O	Otro	Coinfección	Referencia
<i>Mytilus edulis</i>	15	16	93.75	6.25	0	1	Le Roux <i>et al.</i> , 2001
<i>Ostrea edulis</i>	20	21	4.76	95.24	0	1	Le Roux <i>et al.</i> , 2001
Francia (Marenes)							
Hospedador	Moluscos infectados	Clones	Tipo M	Tipo O	Otro	Coinfección	Referencia
<i>Ostrea edulis</i>	15	15	0	100	0	0	Le Roux <i>et al.</i> , 2001
Francia (Leucate)							
Hospedador	Moluscos infectados	Clones	Tipo M	Tipo O	Otro	Coinfección	Referencia
<i>Ostrea edulis</i>	16	16	0	100	0	0	Le Roux <i>et al.</i> , 2001
España (Rías Baixas)							
Hospedador	Moluscos infectados	Clones	Tipo M	Tipo O	Otro	Coinfección	Referencia
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	4	4	100	0	0	0	Le Roux <i>et al.</i> , 2001
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	1-3	3	0	100	0	0	López-Flores <i>et al.</i> , 2004
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	13	38	79	21	0	0	Novoa <i>et al.</i> , 2005
España (Huelva)							
Hospedador	Moluscos infectados	Clones	Tipo M	Tipo O	Otro	Coinfección	Referencia
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	1-3	4	50	50	0	1	López-Flores <i>et al.</i> , 2004
<i>Ostrea edulis</i>	1-3	4	0	100	0	0	López-Flores <i>et al.</i> , 2004
<i>Ostrea edulis</i>	7	26	61	29	10 (Tipo X)	1*	Novoa <i>et al.</i> , 2005
España (Delta del Ebro)							
Hospedador	Moluscos infectados	Clones	Tipo M	Tipo O	Otro	Coinfección	Referencia
<i>Ostrea edulis</i>	5	16	12	88	0	2	Novoa <i>et al.</i> , 2005
Italia (La Spezia)							
Hospedador	Moluscos infectados	Clones	Tipo M	Tipo O	Otro	Coinfección	Referencia
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	14	60	47	53	0	6	Presente tesis
Italia (Venecia)							
Hospedador	Moluscos infectados	Clones	Tipo M	Tipo O	Otro	Coinfección	Referencia
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	1-3	2	0	100	0	0	López-Flores <i>et al.</i> , 2004
Italia (Trieste)							
Hospedador	Moluscos infectados	Clones	Tipo M	Tipo O	Otro	Coinfección	Referencia
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	1-3	4	0	100	0	0	López-Flores <i>et al.</i> , 2004
Croacia (Istria)							
Hospedador	Moluscos infectados	Clones	Tipo M	Tipo O	Otro	Coinfección	Referencia
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	7	7	100	0	0	0	Le Roux <i>et al.</i> , 2001
Grecia (Kavála)							
Hospedador	Moluscos infectados	Clones	Tipo M	Tipo O	Otro	Coinfección	Referencia
<i>Ostrea edulis</i>	9	40	25	75	0	4	Presente tesis

Discusión

El *cluster* del ARNr es, posiblemente, la región más empleada en estudios de filogenia y biogeografía de eucariotas. Esto se debe a una serie de ventajas de esta región del genoma que incluye las muy diferentes tasas de evolución en un fragmento relativamente corto, el gran número (en ocasiones millares) de copias en el genoma de la unidad básica y la rápida evolución concertada que permite la uniformidad en la secuencia (Baldwin *et al.*, 1995). Los espaciadores transcritos internos (*ITS*) además presentan la ventaja de su pequeño tamaño, de su alta tasa de evolución que permite la diferenciación de grupos muy próximos (Hillis y Dixon, 1991) y de la presencia contigua de dos regiones altamente conservadas, como son los genes *18S* y *28S*, lo que permite el desarrollo de cebadores conservados en un gran número de especies. Estas regiones han sido empleadas en diversos estudios de parasitología de moluscos (Goggin, 1994; Kotob *et al.*, 1999a; de la Herrán *et al.*, 2000; Petkeviciute *et al.*, 2004)

En este trabajo se presenta la caracterización de las regiones *ITS* de varias especies pertenecientes al género *Bonamia*, uno de los géneros con efectos más devastadores en la producción de moluscos bivalvos (Pichot *et al.*, 1980; Burreson *et al.*, 2004; O.I.E., 2007). En concreto, se han establecido las secuencias de *Bonamia ostreae*, *Bonamia perspora* y dos especies diferentes de *Bonamia* pendientes de descripción, una de la ostra *Ostrea chilensis* y otra de *Crassostrea ariakensis*. *Bonamia ostreae* está representada por ocho tipos génicos, si bien cuatro de ellos -los tipos V, VI, VII y VIII- están representados por un único clon y se consideran únicamente porque las diferencias están presentes también en los tipos I a IV. Una situación similar se

da en *Bonamia* sp. de *Ostrea chilensis* con dos tipos representados por un clon -tipos II y IV-. Debemos considerar estas formas con prudencia, ya que podrían ser debidos a errores introducidos por la enzima *Taq* polimerasa, en la secuenciación o a la formación de quimeras. Pero con el fin de no reducir la información disponible, se han considerado en los análisis.

La principal característica de la región *ITS-1+5.8S+ITS-2* en el género *Bonamia* es la variabilidad, tanto de tamaño como de secuencia y tanto inter- como intraspecíficamente. La variabilidad de este grupo es mucho mayor si la comparamos por ejemplo a la de los otros parásitos estudiados, *Perkinsus* y *Marteilia*. Esta alta variabilidad puede indicar una rápida tasa de evolución o una lejana divergencia entre especies. Esta variabilidad también se observa en el contenido en GC de la región *ITS-1*, que es mucho mayor (42-43%) en *Bonamia ostreae* que en las otras *Bonamia* spp. (28-32%). Este resultado es sorprendente habida cuenta de la funcionalidad de la región *ITS-1* en la maduración de los ARNr de las subunidades ribosómicas pequeña y grande. La región se divide en una serie de dominios que se cree que poseen la función de agrupar las diferentes piezas de las subunidades (Musters *et al.*, 1990; van Nues *et al.*, 1994). Esos motivos presentan un grado de conservación mayor y estas regiones suelen ser de igual tamaño en individuos próximos filogenéticamente (Baldwin *et al.*, 1995). El hecho de que se presenten estas diferencias en el género *Bonamia* apoya la hipótesis de una lejana divergencia entre especies.

La región *ITS-2* en *Bonamia* muestra una mayor variabilidad que la región *ITS-1*. Esta variabilidad en longitud registrada en las

secuencias de *Bonamia ostreae* puede estar relacionada con problemas técnicos derivados de la alta repetición de adeninas en el extremo 5' de la región ITS-2. Los consensos se han seleccionado teniendo en cuenta el número de bases más frecuentemente repetido en cada número de clones, pero la resolución de este fragmento de la región ITS-2 está limitada por la capacidad técnica de los secuenciadores empleados (ABI Prism y Li-Cor). El contenido en GC de esta región ITS-2 supera en todas las especies el 50%, a excepción de *Bonamia perspora* que presenta un 42%, apoyando su posible especiación temprana.

La capacidad resolutoria del gen del ARNr 5.8S por separado es bastante baja, tanto en las secuencias de *Bonamia*, donde la mayor parte de esta variabilidad se concentra en el extremo 3', como de *Perkinsus*, donde la variabilidad se reduce a algunos loci puntuales. En *Bonamia*, muestra la secuencia de *Bonamia perspora* como la más divergente, pero falla al discriminar entre las *Bonamia* spp. de *Crassostrea ariakensis* y *Ostrea chilensis*. En *Perkinsus*, agrupa las secuencias de *Perkinsus chesapeakei*, pero falla en la discriminación de *Perkinsus olseni*, *Perkinsus marinus* y *Perkinsus mediterraneus*. La utilidad filogenética de este gen en grupos taxonómicos próximos es muy baja. A pesar de todo, nos permite situar a la especie *Bonamia perspora* como basal y poderla emplear de esta forma como grupo externo en los consiguientes análisis filogenéticos sin necesidad de introducir una secuencia más alejada filogenéticamente que complique la realización del alineamiento. Esta posición basal de *Bonamia perspora* es de sumo interés, ya que se trata de la única especie del género *Bonamia* en la que se conoce el proceso de esporulación (Carnegie *et al.*, 2006). Se ha especulado mucho sobre la

vinculación del género *Bonamia* al phylum Haplosporidia, sobre todo debido a la presencia de los haplosporosomas y, en los últimos tiempos, a los datos moleculares (Pichot *et al.*, 1980; Brehélin *et al.*, 1982; Carnegie *et al.*, 2000; Cochenec *et al.*, 2000; Hine *et al.*, 2001). Los haplosporosomas son orgánulos de función desconocida compartidos por los phyla Haplosporidia, Paramyxia y Myxosporidia (Hine *et al.*, 2002b). Sin embargo, la característica fundamental de los haplosporidios, la presencia de una espora ornamentada característica de cada especie no se había encontrado. Además, con la posible excepción de *Haplosporidium pickfordi* (Barrow, 1961), las especies del phylum Haplosporidia no son transmisibles entre hospedadores de la misma especie, sugiriendo la presencia de un ciclo complejo con uno o varios hospedadores intermedios implicados (Burreson, 1988; Barber y Ford, 1992; Burreson, 1996; Burreson *et al.*, 1997). Sin embargo, especies del género *Bonamia* sí han podido transmitirse entre individuos de la misma especie, cerrando el ciclo aunque sin descartar la posibilidad de un ciclo más complejo (Poder *et al.*, 1982; Bachère y Grizel, 1985; Montes *et al.*, 1994; Culloty *et al.*, 1999). La presencia de esporas en la especie más basal del género *Bonamia*, unida al parecido de estas esporas a las del género *Minchinia*, rama hermana de *Bonamia* en diferentes filogenias (Reece *et al.*, 2004), podría indicar una reducción secundaria de la capacidad de esporulación en este género, siendo la no existencia de esporas un carácter apomórfico (derivado).

La región ITS-1+5.8S+ITS-2 de *Perkinsus olseni* procedente de Corea del Sur, Italia y Galicia fue secuenciada parcialmente, al igual que la del *Perkinsus* sp. de Uruguay, que resulta ser *Perkinsus olseni*. Esa es la razón de la disparidad con la longitud y el contenido en GC

de la secuencia consenso. Esta secuencia puede ser diferenciada de otras secuencias por medio de polimorfismos de restricción (RFLP), técnica empleada en diversas ocasiones para la diferenciación de variedades de *Perkinsus* spp. (Reece *et al.*, 1996; Kotob *et al.*, 1999b; Abollo *et al.*, 2006).

De cualquier manera, el análisis de la secuencia muestra una muy alta identidad entre aislados muy alejados geográficamente, lo que puede indicar que la dispersión de *Perkinsus olseni* se ha producido recientemente, probablemente por el comercio de moluscos infectados para acuicultura. La presencia de dos tipos moleculares de *Perkinsus marinus* y de dos tipos de *Perkinsus chesapeakei* ya ha sido descrita en la literatura (Reece *et al.*, 1997a; Robledo *et al.*, 1999; Dungan *et al.*, 2002; Pecher *et al.*, 2004). En el caso de Dungan *et al.*, 2003, la presencia de más tipos moleculares se ha vinculado a la presencia de quimeras (Pecher *et al.*, 2004).

El hecho de que parásitos tan próximos entre sí como los pertenecientes al género *Perkinsus* sean capaces de colonizar a tantísimas especies de moluscos en todo el planeta, y que la variedad de estos moluscos sea tan grande, incluso pertenecientes a diferentes clases, es un indicativo de la capacidad colonizadora de este parásito.

La prevalencia de *Marteilia* en este análisis fue mayor en *Mytilus galloprovincialis* que en *Ostrea edulis*. A pesar de que en el pasado estén descritas altas prevalencias de *Marteilia* sp. en *Ostrea edulis* de Tesalónica, en el presente análisis no se detectaron en ostras de esta localidad (Virvilis *et al.*, 2003; Virvilis y Angelidis, 2006; Karagiannis y Angelidis, 2007), aunque sí de Kavála. En contraste con

lo presentado por Le Roux *et al.*, (2001), el perfil O es el predominante en *Mytilus galloprovincialis* de las Rías Baixas, Trieste, Venecia (López-Flores *et al.*, 2004) y La Spezia y el perfil M es el predominante en *Ostrea edulis* de Huelva (Novoa *et al.*, 2005).

El análisis de la región *ITS-1* de *Marteilia* sp. infectando diferentes poblaciones de *Mytilus galloprovincialis* y *Ostrea edulis* en Europa nos permite observar la presencia de dos grupos en el análisis por *Neighbour Joining*. Sin embargo, estos dos grupos se separan con un valor de *bootstrap* mínimo, y los grupos no se ajustan ni al patrón de RFLP (perfil O frente a perfil M) ni al molusco hospedador (*Mytilus* spp. frente a *Ostrea edulis*). Además, los consensos empleados para el análisis genético fueron, en muchos casos, elaborados a partir de secuencias procedentes tanto de *Mytilus galloprovincialis* como de *Ostrea edulis* (Tabla 2.4). Aunque la mayoría de las secuencias de una de las ramas presenta perfil M y la de la otra presenta perfil O, las excepciones son frecuentes. Por ejemplo, la secuencia *ITS-CD* de perfil O está agrupada con la mayoría de las secuencias de perfil M y las secuencias *ITS-B*, *ITS-AJ*, *ITS-AF*, *ITS-AP*, *ITS-BF*, *ITS-BX* e *ITS-CB*, todas ellas de perfil M, están agrupadas con la mayoría de perfiles O. Además existe un tercer perfil que no se ajusta a ninguno de los dos perfiles anteriores denominado perfil X (Novoa *et al.*, 2005).

La ultraestructura y especificidad de hospedador se emplearon en el pasado como características diferenciadoras entre *Marteilia refringens* y *Marteilia maurini* (Comps *et al.*, 1982; Auffret y Poder, 1985), aunque se ha descrito *Marteilia refringens* en *Mytilus galloprovincialis* sin aportar datos sobre la ultraestructura (Tigé y

Rabouin, 1976; Gutiérrez, 1977; Comps y Joly, 1980). Además, tras la observación de *Marteilia refringens* en mejillones, la especificidad de hospedador quedó invalidada como argumento (Villalba *et al.*, 1993c; Robledo y Figueras, 1995), quedando la ultraestructura como único argumento de diferenciación específica, a pesar de las enormes dificultades en el empleo del Microscopio Electrónico de Transmisión (TEM) para su uso en el control habitual de importaciones o del estado de salud de los moluscos de una determinada región. Asimismo, es una técnica cara y no está al alcance de la mayoría de laboratorios de patología de moluscos.

Las características ultraestructurales empleadas para la diferenciación de las especies *Marteilia refringens* y *Marteilia maurini* son la forma y longitud de los haplosporosomas y el grosor de la pared del esporonte. Las medidas determinadas en la bibliografía para los haplosporosomas muestran una gran variabilidad tanto para ostras como para mejillones : 230 x 140 (ostra) (Grizel *et al.*, 1974); 175-203 x 71-158 (ostra) (Perkins, 1976); 106-191 x 71-117 (ostra), 107-296 x 41-86 (mejillón) (Longshaw *et al.*, 2001); 230-320 x 70-90 (mejillón) (Comps *et al.*, 1982), 260 x 120 (mejillón) (Auffret y Poder, 1985). El rango de medidas se solapa para *Marteilia* spp. procedentes de ostra y de mejillón. *Marteilia maurini* presenta además una envuelta multimembranosa rodeando la pared de la espora (Comps *et al.*, 1982). Sin embargo, esto podría deberse a distintas causas como variación intraespecífica, morfologías diferentes del parásito o simplemente artefactos en el procesado para microscopía electrónica de transmisión (Longshaw *et al.*, 2001).

El gen del ARNr 18S se ha empleado para situar el género *Marteilia* en el “árbol de la vida”, pero no tiene la suficiente potencia para discriminar entre las presuntas especies *Marteilia refringens* y *Marteilia maurini* (Berthe *et al.*, 2000; Cavalier-Smith y Chao, 2003a; 2003b) ya que este gen presenta una fuerte constricción evolutiva. Aunque este gen haya sido ampliamente empleado en parasitología molecular para distinguir incluso especies pertenecientes al mismo grupo (Kotob *et al.*, 1999b; Stokes y Burreson, 2001; Reece *et al.*, 2004), no es una herramienta útil para la discriminación entre *Marteilia* spp. Por esta razón, el empleo de los diferentes espaciadores del *cluster* del ARNr se muestra como una herramienta válida.

Los patrones obtenidos en los diferentes análisis que han sido publicados hasta la fecha (Le Roux *et al.*, 2001; López-Flores *et al.*, 2004; Novoa *et al.*, 2005) no permiten el encajar ningún perfil al 100% ni con un determinado hospedador ni con una región geográfica determinada, que podría indicar una especiación alopátrica, debida a la separación física de las poblaciones del parásito. Tanto en el Océano Atlántico como en el Mar Mediterráneo se detectaron altas prevalencias de ambos perfiles.

Las diferencias entre el perfil O y el perfil M están reducidas tan solo a la presencia o ausencia de una diana de restricción. Este carácter en una región tan variable puede ser adquirido o perdido más de una vez en el transcurso de la evolución por una simple mutación puntual. Además, la presencia en la secuencia *ITS-AJ* de una diana de restricción próxima a la posición polimórfica que determina los dos grupos de secuencias causa que un perfil O se

convertida en un perfil M al ser visualizada el RFLP en un gel de agarosa (Novoa *et al.*, 2005).

La variación entre las diferentes secuencias de la región *ITS-1* de ostras y de mejillones son de una magnitud similar y podrían corresponder a variación de tipo intraespecífico más que a variación de tipo interespecífico (López-Flores *et al.*, 2004; Novoa *et al.*, 2005).

Además de los datos en la región *ITS-1*, López-Flores *et al.* (2004) han establecido que el espaciador intergénico, *InterGenic Spacer (IGS)*, tampoco puede distinguir perfectamente a las *Marteilia* spp. procedentes de *Mytilus galloprovincialis* y de *Ostrea edulis*, a pesar de la baja restricción evolutiva de esta región.

De acuerdo con las diferencias entre *Marteilia refringens* y *Marteilia maurini* empleando caracteres ultraestructurales, especificidad del hospedador o taxonomía molecular, tanto con el gen del ARNr 18S como con las regiones *ITS-1* o *IGS*, es imposible diferenciar ambos parásitos, que deben ser interpretados como sinónimos con prioridad para la especie *Marteilia refringens* debido a su descripción anterior. La confirmación definitiva de esta identidad debe de conseguirse con la secuenciación de nuevos genes o regiones de alta variabilidad, ya que este asunto presenta importantes consecuencias en el tráfico internacional de animales vivos para la acuicultura. Como *Marteilia refringens* es un patógeno de declaración obligatoria para la O.I.E. y una amenaza para las poblaciones de *Ostrea edulis* (O.I.E., 2007), es deseable una actualización en la política de manejo del mejillón *Mytilus* spp. procedente de áreas contaminadas con *Marteilia refringens*, que no deben ser situadas en

áreas libres de *Marteilia refringens* con el fin de limitar la dispersión de la enfermedad.

**CAPÍTULO 3: EMPLEO DE TÉCNICAS DE
BIOLOGÍA MOLECULAR EN LA
CARACTERIZACIÓN DE LA PATOLOGÍA DE
CULTIVOS EMERGENTES EN GALICIA:
OREJA DE MAR**

Capítulo 3: Empleo de técnicas de biología molecular en el estudio de la patología de cultivos emergentes: Oreja de Mar

Introducción

Las orejas de mar, conocidas también como peneiras en Galicia y abalones o abulones en Latinoamérica, son un grupo de moluscos gasterópodos prosobranquios marinos que comprende 57 especies (Geiger, 1998; Geiger, 2000). Su hábitat natural son los fondos rocosos de aguas someras. Como todos los prosobranquios, presentan una única concha a cuya forma, que recuerda a un pabellón auditivo, se refiere el nombre de oreja de mar (Fig. 3.1). Esta concha es aplanada, bien desarrollada, asimétrica y de forma ovalada. La espira está muy reducida, de tal forma que la práctica totalidad de la concha está compuesta de la última vuelta. Presenta unos orificios denominados trematas a lo largo del lado izquierdo de la concha a través de los cuales fluye la corriente respiratoria y bajo los que se sitúan las branquias. Por los trematas también se produce la liberación de los gametos y la eliminación de las heces y, en caso de peligro, la rápida salida de agua para facilitar una firme sujeción al sustrato. El interior de la concha es nacarado, variando las tonalidades entre diferentes especies, y es la característica que dota a esta especie de valor para la joyería. El pie, que permite la firme adhesión del animal al sustrato, la locomoción por el mismo y la alimentación de tipo ramoneadora del animal, ocupa la mayor parte de la concha y es la parte de mayor interés culinario.

Figura 3.1: Oreja de mar europea, *Haliotis tuberculata*.



La especie de oreja de mar europea, *Haliotis tuberculata*, está distribuida por la costa Sudoeste de Europa desde el Canal de la Mancha y la costa Norte de África hasta las Islas Canarias y Senegal y por todo el Mar Mediterráneo (Clavier, 1992; Geiger, 2000). Su hábitat abarca desde el nivel medio de la bajamar hasta los 40 m de profundidad (Avant, 2005).

Debido a los elevados precios que este molusco alcanza en el mercado, sobre todo en extremo oriente, diferentes empresas se han interesado por cultivar este molusco a escala industrial en Galicia. Como parte de estos estudios, un consorcio empresarial investigó la posibilidad de engordar con fines comerciales la especie autóctona de oreja de mar en Galicia, *Haliotis tuberculata*, en bidones suspendidos en bateas. Los resultados expuestos en la presente tesis se refieren a mortalidades detectadas en este cultivo experimental. Es importante subrayar el hecho de que todas estas eventualidades surgieron como

parte de un estudio de I+D del citado consorcio y nunca tuvieron relación con una explotación comercial establecida.

Materiales y métodos

Animales

Las empresas participantes importaron tres lotes de juveniles de oreja de mar europea, *Haliotis tuberculata*, desde un semillero localizado en Irlanda en tres fechas diferentes (junio de 2003, agosto de 2003 y abril de 2004). Estos juveniles se situaron en barriles suspendidos de bateas en la Ría de Arousa y se alimentaron con algas pardas. Previamente, se habían evaluado histológicamente (n=87) las orejas a introducir para evitar la presencia de patógenos potencialmente indeseables en los lotes importados.

Además se evaluó el estado de salud de juveniles de *Haliotis tuberculata* procedentes de Francia mediante técnicas histológicas (n=30) y de biología molecular (n=40) para evaluar su posible uso como fuente alternativa de animales y de bancos naturales de la Ría de Arousa en verano de 2004.

Aislamiento bacteriano

Se realizaron siembras en medio Triptona Soja Agar (TSA) suplementado con un 1% de cloruro sódico y fueron incubadas a temperatura ambiente. Las bacterias se mantuvieron criopreservadas a -80°C congelándolas en la fase exponencial de crecimiento en medio Triptona Soja (TSB) suplementado con un 1% de cloruro sódico y un 15% de glicerol. Los medios de cultivo empleados fueron suministrados por la empresa Cultimed.

Se identificaron las bacterias mediante las pruebas tradicionales de forma, movilidad, características de la pared bacteriana (Gram), oxidasa, catalasa, capacidad de fermentar la glucosa, la decarboxilación de aminoácidos y los ensayos bioquímicos API 20E (Anónimo, 1994). Los resultados obtenidos se emplearon para la identificación de los aislados basándose en el *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Krieg y Holt, 1984).

- **Forma y movilidad:** se observó directamente en un microscopio de contraste de fases *Nikon Optiphot* una gota de cultivo en fase exponencial.
- **Características de la pared bacteriana:** se determinó la característica Gram de las bacterias de acuerdo con el método del hidróxido potásico (Buck, 1982), colocando sobre un portaobjetos una gota de KOH al 3% y sobre ella una colonia de un cultivo fresco con la ayuda de un asa de siembra. El aumento de la viscosidad del medio determina que las bacterias son Gram negativas mientras que las bacterias Gram positivas mantienen la viscosidad del medio constante.
- **Oxidasa:** se evaluó la existencia de metabolismo oxidativo en la bacteria mediante la presencia de la citocromo c oxidasa (Kovacs, 1956). Se situó una gota del reactivo N,N,N',N'-tetrametil-para-fenilen-diamina (Sigma) al 1% en agua destilada sobre un papel de filtro y se puso en contacto con la bacteria. Cuando el reactivo vira a violeta oscuro en menos de 10 s, la cepa se considera oxidasa positiva.

- **Catalasa:** se colocó un poco de cultivo fresco sobre un portaobjetos y se le echó una gota de peróxido de hidrógeno al 3%. La presencia de la catalasa se revela por la presencia de burbujas fruto de la descomposición del peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno.
- **Oxidación/Fermentación de la glucosa:** se hizo la prueba fermentativa en medio basal O/F de Hugh y Leifson, pH=6.8 (Difco) suplementado con un 1% de glucosa. Se resuspende la bacteria en solución salina (NaCl) al 1% y se inocula en el medio. Se incuba en condiciones de anaerobiosis con aceite de parafina durante 24h. La fermentación de la glucosa se revela debido al cambio de color del tubo a amarillo.
- **Utilización de aminoácidos:** el diagnóstico de la arginina dihidrolasa (ADH) y la decarboxilación de lisina y ornitina se realizó usando el medio base decarboxilasa de Moeller, pH=6.0 (Difco) suplementado con un 1% de cada aminoácido añadido de manera independiente. La presencia de turbidez y alcalinización revelada en el cambio de color a violeta del medio después de 48h de incubación en anaerobiosis indica una reacción positiva, mientras que un color amarillento supone una reacción negativa.
- **Crecimiento en medio TCBS:** se cultiva cada una de las bacterias en medio TCBS (tiosulfato citrato bilis sucrosa) (Cultimed), que es un medio de cultivo selectivo de *Vibrio* spp.

- **Sensibilidad al agente vibriostático O/129:** se sembró la bacteria en medio Müller-Hinton suplementado con un 1% de NaCl y se colocó un disco impregnado comercialmente con el antibiótico O/129 (Oxoid). La sensibilidad se manifiesta en la presencia de un halo sin crecimiento alrededor del disco.
- **Pruebas bioquímicas (API 20E):** se emplearon galerías API 20E (Biomerieux) siguiendo las instrucciones del fabricante (Fig. 3.2). Se incubaron durante 24 h como mínimo a temperatura ambiente y se leyeron si al menos tres pruebas resultaron positivas. En caso contrario, se dejaron incubar durante 24 h más.

Figura 3.2: Tiras API 20E (Biomerieux) para la caracterización bioquímica de los aislados bacterianos.



Cultivo en medio RFTM

Con el fin de descartar la presencia de *Perkinsus* sp. se empleó la técnica del RFTM. A partir de la branquia de cuatro *Haliotis tuberculata* procedentes de un barril que estaba comenzando a sufrir mortalidades se procedió con la técnica como se describe en el

apéndice B. Las muestras se clasificaron aplicando el índice de Ray (Ray, 1954).

Infecciones experimentales

Para poder correlacionar los aislados bacterianos con las mortalidades observadas, se realizaron infecciones experimentales por baño en orejas de mar de aproximadamente unos 25 mm de longitud.

Tabla 3.1: Concentraciones de bacteria empleadas en las infecciones experimentales por baño expresadas en UFC ml⁻¹. NI: No inoculada.

Cepa	Inóculo	
	1ª infección	2ª infección
GK1.1	1.15x10 ⁶	3.35x10 ⁶
GK3.5	1.30x10 ⁶	NI
GK3.7	1.10x10 ⁶	NI
GK3.8	2.00x10 ³	7.00x10 ⁵
GK4.2	2.05x10 ⁶	2.85x10 ⁶

Las orejas de mar (diez por cada cepa bacteriana) fueron alimentadas con algas pardas del orden Laminariales (*Laminaria* spp. y *Saccorhiza polyschides* (Lightfoot) Batters, 1902) y mantenidas en tanques de dos litros con agua de mar en circuito cerrado para su aclimatación. Los tanques se inocularon con 1 ml de cultivo bacteriano a las concentraciones recogidas en la tabla 3.1 y la mortalidad fue registrada diariamente. Durante el experimento de infección, las orejas de mar se mantuvieron en ayunas para evitar la adsorción de las bacterias a la superficie de las algas. La renovación del agua se realizó diariamente reemplazando la mitad del agua del tanque con agua de mar limpia. El experimento de infección se repitió

con las cepas que habían resultado patógenas en la primera infección con el fin de corroborar los resultados.

Histopatología

El cuerpo completo de las orejas de mar se introdujo en fijador de Davidson (Shaw y Battle, 1957) durante 24 h, al cabo de las cuales las muestras se mantuvieron en solución de Davidson hasta su procesamiento a través de una serie creciente de alcoholes (deshidratación) y posterior inclusión en parafina utilizando un procesador automático de tejidos (Reichert- Jung Histokinette 2000) como se describe en el apéndice C. Se cortaron secciones de 5 μm en un microtomo Reichert- Jung 2040, que fueron desparafinadas, rehidratadas y teñidas mediante la tinción hematoxilina-eosina.

Las secciones se examinaron y fotografiaron con un microscopio óptico *Nikon Optiphot* o *Nikon Eclipse E600* para la detección de patógenos y/o alteraciones patológicas; en el caso de las poblaciones de cultivo en verano (julio del 2004), invierno (diciembre del 2004) y primavera (mayo del 2005) y en el caso de las poblaciones naturales en verano (julio del 2004). También se observaron frotis de tejido fresco de animales con síntomas de enfermedad mediante microscopía óptica de contraste de fases (*Nikon Optiphot*).

Análisis ultraestructural

Se realizaron observaciones ultraestructurales por medio de microscopía electrónica de transmisión (*TEM*) y de barrido (*SEM*). Para el *TEM*, tras una selección de los hospedadores muy parasitados mediante la observación de frotis en fresco, se cortaron pequeños

fragmentos de tejido de un volumen aproximado de 1 mm³ con la ayuda de un bisturí. Estos fragmentos de tejido fueron fijados en glutaraldehído al 2.5% tamponado en 0.1 M de tampón cacodilato sódico preparado en agua de mar filtrada (pH 7.4 a 4°C). La fijación se realizó a 4°C durante 4h, se lavó durante 24h a 4°C en el mismo tampón y se fijó de nuevo en tetróxido de osmio tamponado a 4°C durante 2 h. Tras una deshidratación en una serie de etanoles de graduación creciente, el tejido fue incluido en resina Spurr (Sigma). Se obtuvieron secciones semifinas de 0.8 µm de espesor con una cuchilla de vidrio libre de tensiones que fueron teñidas con azul de toluidina y observadas al microscopio óptico para la localización de los parásitos. Tras el tallado de los bloques de resina para exponer la zona de interés, se realizaron cortes ultrafinos con cuchilla de diamante en un ultramicrotomo Reichert Ultracut S. Las secciones ultrafinas fueron teñidas con acetato de uranilo y citrato de plomo, y se observaron en un microscopio electrónico de transmisión Philips CM100 a un voltaje de 60 kV.

Para la observación de la morfología externa de las esporas observadas en los frotis en fresco se recurrió a la microscopía electrónica de barrido (*SEM*). Para ello, se prepararon extractos del tejido del hospedador y se filtraron a través de dos mallas de nylon de 100 y de 53 µm para posteriormente ser purificados en gradientes de Percoll. Una suspensión de esporas aisladas y purificadas fue fijada en glutaraldehído al 2.5% tamponado en 0.1 M de tampón cacodilato sódico preparado en agua de mar (pH 7.4 a 4°C) y se lavó 30 min en el mismo tampón usando filtros Millipore con un diámetro de poro de 1 µm. Los filtros con las esporas purificadas y fijadas fueron deshidratados en una serie de etanoles de concentración

creciente, secados con dióxido de carbono hasta el punto crítico en un Polaron E3000 y recubiertos de oro en un Polaron SC500. Las muestras se observaron en un JEOL JSM 6700F SEM a un voltaje de 5 kV.

Caracterización molecular

El ADN de las orejas de mar fue aislado con *DNeasy Tissue Kit* (Qiagen) siguiendo las instrucciones del protocolo de aislamiento de ADN de tejidos animales o con *DNAzol* (Invitrogen Life Technologies) siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración se midió como se describe en el apéndice D y se ajustó a un rango entre 10 y 50 ng μl^{-1} con NaOH 8mM.

Tabla 3.2: Cebadores empleados en la amplificación del ADN de diferentes patógenos de la oreja de mar europea, *Haliotis tuberculata*, presente en Galicia. Todos los cebadores se encuentran en el gen de la subunidad ribosómica pequeña, *16S* en procariontes y *18S* en eucariotes. Se indica la posición de los cebadores en la secuencia de referencia, con su código de acceso del *GenBank* entre paréntesis.

Cebador	Secuencia 5' > 3'	Dirección	Posición	Secuencia de referencia	Referencia bibliográfica
PSL	AGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCA	Directa	783	<i>Escherichia coli</i> (J01859)	Campbell <i>et al.</i> , 1995
PSR	ACTTAACCCAACATCTCACGACAC	Reversa	1094		
27F	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	Directa	8	<i>Escherichia coli</i> (J01859)	Lane, 1991
1492R	TACGGYTACCTTGTTACGACTT	Reversa	1512		
RA5.1	GTTGAACGTGCCCTCAGTTTAC	Directa	63	<i>Rickettsia bellii</i> (U11014)	Andree <i>et al.</i> , 2000
RA3.6	ACTTGGACTCATTCAAAGCGGA	Reversa	223		
Candidatus A	CCTAGCTCAGAATGAACGC	Directa	20	<i>Rickettsia bellii</i> (U11014)	Balseiro <i>et al.</i> , 2006
Candidatus B	CTTGTTACGACTTCACCCC	Reversa	1463		
18-Euk581-F	GTGCCAGCAGCCGCG	Directa	547	<i>Haplosporidium montforti</i> (DQ219484)	Carnegie <i>et al.</i> , 2003
18-Euk1134-R	TTTAAGTTTCAGCCTTGCG	Reversa	1204		
UroComp280SSU	GCCATGCGATCCGAACARTTA	Reversa	247	Presunto haplosporidio parásito de <i>Haliotis iris</i> (AF492442)	Reece y Stokes, 2003
NZAH-F4	ATTTGGTTACTATCGGAATGAGAAC	Directa	465		
NZAH-R1	CTGTAGAGATGATTGACCTGATTG	Reversa	1514	<i>Haplosporidium montforti</i> (DQ219484)	Medlin <i>et al.</i> , 1988
16SA	AACCTGGTTGATCCTGCCAGT	Directa	1		
16SB	GATCCTTCCGCAGGTTCACTAC	Reversa	1850	<i>Haplosporidium montforti</i> (DQ219484)	Azevedo <i>et al.</i> , 2006
SpHaploF1	TGACTTCCCCAGCACTTTATG	Directa	1146		
SpHaploR1	GATAAAGATCCGAGCACTCC	Reversa	737	<i>Haplosporidium montforti</i> (DQ219484)	Azevedo <i>et al.</i> , 2006
SpHaploF3	GGAGTGCTCCGATCTTTTAC	Directa	737		
SpHaploR3	CTCATAAAGTGCTGGGGGAG	Reversa	1149	<i>Haplosporidium montforti</i> (DQ219484)	Balseiro <i>et al.</i> , 2006
Hap Hal SSU F1	GATTCGGAATGAGTACAACGC	Directa	489		
Hap Hal SSU R1	GCCTGCCTCCAGCACTTCAAC	Reversa	1778	<i>Haplosporidium montforti</i> (DQ219484)	Balseiro <i>et al.</i> , 2006
Hap Hal SSU F3	CCCTCACCGAGATTCGCC	Directa	836		
Hap Hal SSU R2	GCCGAGCTTGTAACAAACGC	Reversa	1468	<i>Haplosporidium montforti</i> (DQ219484)	Balseiro <i>et al.</i> , 2006

Para la amplificación mediante PCR del ADN de los diferentes patógenos, se emplearon diferentes cebadores recogidos en la tabla 3.2.

Candidatus Xenohalictis californiensis

La detección del patógeno *Candidatus Xenohalictis californiensis* por PCR fue realizada siguiendo las recomendaciones de la O.I.E. (Andree *et al.*, 2000; O.I.E., 2006) empleando los cebadores RA5.1 y RA3.6. La reacción de PCR se realizó en un volumen final de 25 μl , con 2.5 μl de tampón 10x (10mM de Tris, 50 mM de KCl; pH 8.3), 2.75 mM de MgCl_2 , 0.6 mM de dNTPs, 0.6 μM de cada uno de los cebadores, 0.025U de enzima *Taq* polimerasa y 1 μl de ADN a una concentración entre 10 y 50 $\text{ng } \mu\text{l}^{-1}$. La amplificación se realizó en un termociclador *Applied Biosystems Gene Amp[®] PCR system 9700 thermocycler* (Applied Biosystems) en el que se había programado una desnaturalización inicial de 5 min a 95°C, 40 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 1 min, fusión a 50°C durante 30 s y extensión a 72°C durante 30 s y una extensión final de 10 min a 72°C. Los productos de PCR fueron visualizados y fotografiados tras ser separados en un gel de agarosa al 2% en tampón TAE (p/v) teñido con bromuro de etidio mientras se iluminaban con luz ultravioleta a 488 nm.

Con el fin de amplificar el gen de la subunidad ribosómica pequeña (16S) de *Candidatus Xenohalictis californiensis* se diseñaron los cebadores Candidatus A y Candidatus B. La reacción de PCR se realizó en un volumen final de 25 μl , con 2.5 μl de tampón 10x (10mM de Tris, 50 mM de KCl; pH 8.3), 1.5 mM de MgCl_2 , 0.2 mM de dNTPs,

0.5 μM de cada uno de los cebadores, 0.03U de enzima *Taq* polimerasa y 1 μl de ADN a una concentración entre 10 y 50 $\text{ng } \mu\text{l}^{-1}$. Todos los reactivos en la mezcla de PCR fueron obtenidos de Invitrogen Life Technologies. La amplificación se realizó en un termociclador *Perkin Elmer GeneAmp 9600 thermal cycler* (Applied Biosystems) en el que se había programado una desnaturalización inicial de 5 min a 94°C, 30 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 1 min, fusión a 54°C durante 1 min y extensión a 72°C durante 1 min y 45 s y una extensión final de 10 min a 72°C.

Los productos de PCR fueron visualizados y fotografiados tras ser separados en un gel de agarosa al 1% en tampón TAE (p/v) teñido con bromuro de etidio.

Bacterias

Las bacterias aisladas en las orejas de mar que empezaron a sufrir mortalidades fueron amplificadas con las parejas de cebadores *PSL-PSR* y *27F-1134R* (Lane, 1991; Campbell *et al.*, 1995). Las condiciones de la PCR fueron exactamente iguales para las dos parejas de cebadores. Las reacciones de PCR se realizaron en volúmenes finales de 25 μl , con 2.5 μl de tampón 10x (10mM de Tris, 50 mM de KCl; pH 8.3), 2.5 mM de MgCl_2 , 0.4 mM de dNTPs, 0.4 μM de cada uno de los cebadores y 0.05U de enzima *Taq* polimerasa. Como molde para las amplificaciones, se introdujo una punta de pipeta de rango 0.5-10 μl con la que previamente habíamos tocado la colonia a amplificar. La reacción se realizó en un termociclador *Applied Biosystems Gene Amp[®] PCR system 9700 thermocycler* (Applied Biosystems) en el que se había programado una desnaturalización

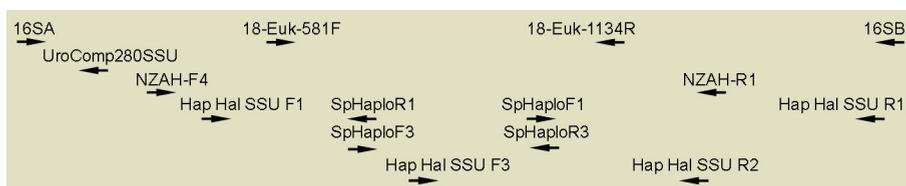
inicial de 5 min a 94°C, 30 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 1 min, fusión a 57°C durante 1 min y extensión a 72°C durante 1 min y 30 s y una extensión final de 10 min a 72°C. Los productos fueron separados en un gel de agarosa al 1% (p/v) en tampón TAE y visualizados como ha sido previamente explicado.

Haplosporidio

La amplificación del ADN del haplosporidio se llevó a cabo empleando los cebadores esquematizados en la figura 3.3. Se emplearon los cebadores diseñados para la amplificación del gen *18S* del presunto haplosporidio parásito de *Haliotis iris* (16SA-UroComp280SSU; NZAHF4- 16SB y 16SA- NZAH-R1). La PCR 16SA-UroComp280SSU incluyó en sus 25 µl de volumen total 2.5 µl de tampón 10x (20mM de Tris-HCl, 50mM de KCl; pH 8.4), 1.5 mM de MgCl₂, 0.2 mM de dNTPs, 1 µM de cada uno de los cebadores, 0.4 mg de seroalbúmina bovina y 0.03 U de la enzima *Taq* polimerasa y 1 µl de ADN a una concentración entre 10 y 50 ng µl⁻¹. Todos los reactivos fueron obtenidos de Invitrogen Life Technologies. La amplificación se realizó en un termociclador *Perkin Elmer GeneAmp 9600 thermal cycler* (Applied Biosystems) en el que se había programado una desnaturalización inicial de 5 min a 95°C, 35 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 1 min, fusión a 48°C durante 1 min y extensión a 72°C durante 2 min y 30 s y una extensión final de 72°C a 7 min. La mezcla de reacción de las PCR con los cebadores NZAH-F4- 16SB y 16SA- NZAH-R1 son iguales a la anterior, diferenciándose en el programa de temperaturas consistente para la pareja NZAH-F4 y 16SB en una desnaturalización inicial a 94°C durante 4 min, seguida de 35 ciclos formados por una desnaturalización a 94°C durante 30 s,

una fusión a 53°C durante 30 s y una extensión a 72°C durante 1 min y 30 s. La extensión final se realizó a 72°C durante 5 min. La única diferencia en la pareja 16SA y NZAH-R1 fue la temperatura de fusión, que en este caso fue de 59°C. En los ensayos por PCR se incluyó como control positivo el ADN del presunto parásito de *Haliotis iris* y como control negativo una mezcla sin ADN. Los productos fueron separados en un gel de agarosa al 1% (p/v) en tampón TAE y visualizados como se describe previamente.

Figura 3.3: Cebadores empleados en la amplificación del gen 18S del parásito del phylum Haplosporidia presente en la oreja de mar europea, *Haliotis tuberculata*.



La amplificación del ADN del haplosporidio detectado se llevó a cabo con la ayuda de una pareja de cebadores diseñados para amplificar un fragmento del gen de la subunidad ribosómica pequeña (18S) de los organismos de tipo protozoo, pero no de los hospedadores (Carnegie *et al.*, 2003; Bower *et al.*, 2004). Los 25 µl de la reacción de PCR con la pareja 18S-Euk-581-F y 18S-Euk-1134-R incluyeron 2.5 µl de tampón 10x (20mM de Tris-HCl, 50mM de KCl; pH 8.4), 1.25 mM de MgCl₂, 0.2 mM de dNTPs, 0.05 µM de cada uno de los cebadores, 0.05 U de la enzima *Taq* polimerasa y 1 µl de ADN a una concentración entre 10 y 50 ng µl⁻¹. Todos los reactivos fueron obtenidos de Invitrogen Life Technologies. La amplificación se realizó en un termociclador *Perkin Elmer GeneAmp 9600 thermal cycler* (Applied Biosystems) en el que se había programado una desnaturalización inicial de 10 min a 94°C, 35 ciclos de

desnaturalización a 94°C durante 1 min, fusión a 49°C durante 1 min y extensión a 72°C durante 1 min y una extensión final de 10 min a 72°C.

Tras la secuenciación e identificación de un clon mediante el programa BLASTn como perteneciente al phylum Haplosporidia, se construyeron cebadores específicos para la amplificación del gen *18S* completo del haplosporidio de la oreja de mar. Los cebadores construídos, *SpHaploR1* y *SpHaploF1*, se combinaron con los cebadores universales *16SA* y *16SB* (Medlin *et al.*, 1988) para obtener, respectivamente, los extremos 5' y 3' del gen *18S*. Posteriormente, y mediante las secuencias obtenidas de estos extremos, se diseñaron los cebadores *SpHaploF3* y *SpHaploR3* para amplificar la región central y completar así la secuencia del gen *18S*. Las reacciones de PCR de las parejas *16SA* y *SpHaploF1* y *SpHaploR1* y *16SB* se llevaron a cabo en un volumen de 25 µl incluyendo 2.5 µl de tampón 10x (20mM de Tris-HCl y 50mM de KCl; pH 8.4), 1.5 mM de MgCl₂, 0.2 mM de dNTPs, 0.5 µM de cada uno de los cebadores, 0.05 U de la enzima *Taq* polimerasa y 1 µl de ADN a una concentración entre 10 y 50 ng µl⁻¹. Todos los reactivos fueron obtenidos de Invitrogen Life Technologies. La amplificación se realizó en un termociclador *Perkin Elmer GeneAmp 9600 thermal cycler* (Applied Biosystems) en el que se había programado una desnaturalización inicial de 5 min a 94°C, 35 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 1 min, fusión a 60.5°C durante 1 min y extensión a 72°C durante 1 min y una extensión final de 10 min a 72°C. La amplificación con la pareja de cebadores *SpHaploF3* y *SpHaploR3* empleó las mismas condiciones que la previamente descrita, con la salvedad de que la concentración de MgCl₂ empleada fue de 1.25 mM y que la temperatura de fusión fue de 57°C. Todos los

ensayos por PCR incluyeron como control positivo el gen *18S* de *Haplosporidium nelsoni* clonado en un plásmido.

Se diseñaron los cebadores *Hap Hal SSU F1*, *Hap Hal SSU R1*, *Hap Hal SSU F3* y *Hap Hal SSU R2* para ser empleados consecutivamente en una PCR anidada que sirviera como método de detección molecular del haplosporidio. Las reacciones de PCR de 25 μ l de volumen se hicieron en un volumen de 25 μ l con 2.5 μ l de tampón 10x (10 mM de Tris, 50 mM de KCl; pH 8.3), 1.75 mM de $MgCl_2$, 0.2 mM de dNTPs, 0.5 μ M de cada cebador y 0.03 U de *Taq* polimerasa. Se añadió 1 μ l de ADN a una concentración entre 10 y 50 ng μ l⁻¹. Todos los reactivos fueron obtenidos de la casa Roche, excepto los dNTPs y los cebadores que fueron obtenidos de Invitrogen Life Technologies. La reacción se programó en un termociclador *PCR 9700 thermocycler* (Applied Biosystems), y consistió en una desnaturalización inicial a 94°C durante 5 min, seguida de treinta ciclos formados por una fase de desnaturalización a 94°C durante 1 min, una fase de hibridación a 56°C durante 1 min y una fase de extensión a 72° durante 1 min con una extensión final a 72°C durante 10 min. Se incluyó como control siempre ADN de al menos una oreja de mar fuertemente parasitada con el haplosporidio. Los productos de PCR fueron visualizados y fotografiados tras ser separados en un gel de agarosa al 1% en tampón TAE (p/v) teñido con bromuro de etidio y mientras se iluminaban con luz ultravioleta a 488 nm.

Clonaje y secuenciación del ADN

Los productos de PCR fueron clonados en un plásmido usando el kit *TOPO TA cloning kit* (Invitrogen Life Technologies) siguiendo el proceso descrito en el apéndice E.

Los productos de PCR del tamaño esperado para el inserto fueron secuenciados mediante dos métodos alternativos:

- Se crecieron los clones seleccionados en medio LB líquido a 37°C toda la noche y se realizó la extracción del ADN plasmídico (*miniprep*) con la ayuda del kit *Quiaprep Spin Miniprep* (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante. A continuación se realiza la secuenciación simultánea bidireccional de los productos con la ayuda de cebadores *M13F* y *M13R* marcados cada uno con una molécula de emisión infrarroja diferente, lo que permite la lectura simultánea de las dos hebras de ADN al ser excitadas por un láser. La reacción de secuenciación se preparó con el kit *Thermo Sequenase sequencing kit* (Amersham Life Science) y se secuenció en un secuenciador automático Li-Cor 4200 L (Li-Cor Biosciences).
- Los productos de PCR obtenidos de los clones seleccionados fueron purificados por digestión durante 1 h a 37°C con las enzimas Exonucleasa I (*Exo I*) y Fosfatasa Alcalina de gamba (*SAP*) (Amersham PharmaciaBiotech). Las enzimas fueron posteriormente desnaturalizadas a 80°C durante 15 min. La reacción de secuenciación fue

llevada a cabo con el *Big Dye® Terminator Cycle Sequencing Kit v3.1* (Applied Biosystems) siguiendo las instrucciones del fabricante. El producto resultante fue precipitado y las muestras fueron resuspendidas en tampón de carga con formamida. Las muestras marcadas fueron cargadas en un secuenciador automático *ABI Prism 377 Automated Sequencer* (Applied Biosystems).

Análisis filogenético

Las secuencias obtenidas, una vez desprovistas del vector tras ser revisadas manualmente, se cargaron en el programa BLASTn (Altschul *et al.*, 1990) para poder ser comparadas con las secuencias presentes en la base de datos *GenBank*. Las secuencias se alinearon mediante el algoritmo Clustal W (Thompson *et al.*, 1994) incluido en el programa MEGA3 (Kumar *et al.*, 2004), con una penalización de apertura de 10 y de extensión de hueco de 4 tanto para alineamientos de pares como para alineamientos múltiples.

Las secuencias empleadas en los análisis filogenéticos fueron obtenidas del *Ribosomal Database Project* (RDP-II) en el caso de las secuencias procariotas o del *GenBank* en el caso de las secuencias eucariotas (Cole *et al.*, 2005; Benson *et al.*, 2006). Los códigos de acceso del *GenBank* y las especies empleadas se describen en el apéndice G.

Los análisis filogenéticos se realizaron por medio del programa MEGA3 (Kumar *et al.*, 2004). El análisis filogenético de las secuencias bacterianas se realizó empleando el algoritmo de *Neighbour Joining* y calculando las distancias por medio del modelo de Kimura de dos parámetros para transiciones y transversiones. Como

grupo externo se emplearon las bacterias *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium* (Loeffler 1892) Castellani *et* Chalmers, 1919 en los árboles globales con representantes de multitud de secuencias de la familia Vibrionaceae, *Vibrio cholerae* Pacini, 1854 y *Vibrio splendidus* en los árboles detallados con las secuencias más próximas a las cepas GK1.1, GK3.5, GK3.7 y GK4.2 y *Vibrio harveyi* y *Vibrio campbellii* (Baumann *et al.*, 1971) Baumann *et al.*, 1981 con las secuencias más próximas a la cepa GK3.8. El valor de *bootstrap* (muestreo con reemplazamiento) fue de 10000 replicados. En el análisis filogenético del haplosporidio se emplearon como grupo externo los presuntos haplosporidios de posición basal en anteriores análisis (Reece y Stokes, 2003; Novoa *et al.*, 2004; Reece *et al.*, 2004). La estima de la distancia fue llevada a cabo usando la matriz de distancias del modelo de dos parámetros para transiciones y transversiones de Kimura. Para la reconstrucción filogenética se empleó un análisis de máxima parsimonia usando la opción heurística CNI con un factor de búsqueda de 2 y con una adición inicial de árboles de 2000 réplicas. Los valores de *bootstrap* fueron calculados sobre 100 replicados.

Resultados

Apariencia externa

Algunas de las orejas de mar que sufrieron una fuerte mortalidad en primavera del año 2004 mostraban como signo externo más característico una coloración anormalmente oscura del pie (Fig. 3.4). Además las orejas enfermas presentaban una pérdida de la capacidad de adhesión y de la habilidad de darse la vuelta al ser colocadas en el sustrato sobre sus conchas. En última instancia, estos

síntomas precedieron a la muerte del animal. No se observó en ningún caso la reabsorción de la musculatura del pie manifestada en una disminución extrema del volumen del pie respecto a la concha, síntoma característico de la enfermedad conocida como síndrome del marchitamiento.

Figura 3.4: Apariencia externa de individuos de oreja de mar europea, *Haliotis tuberculata*, pertenecientes a los lotes que sufren mortalidades. Podemos observar la coloración oscura del pie de las orejas enfermas.



Aislamiento bacteriano

Se aislaron cinco bacterias mayoritarias a partir de las orejas de mar pertenecientes al lote II. Las características principales de cada una de las cepas aisladas están resumidas en la tabla 3.3. Las cepas aisladas se han caracterizado como *Vibrio campbellii* o *Vibrio harveyi*, pero ninguna de las cepas aisladas coincide en un 100% con todos los caracteres de dichas especies. La determinación únicamente por medio de las pruebas bioquímicas de la tira API 20E no muestra resultados concluyentes.

Cultivo en medio RFTM

No se observan hiposporas presuntamente pertenecientes a *Perkinsus* sp. en ninguna de las muestras evaluadas por RFTM.

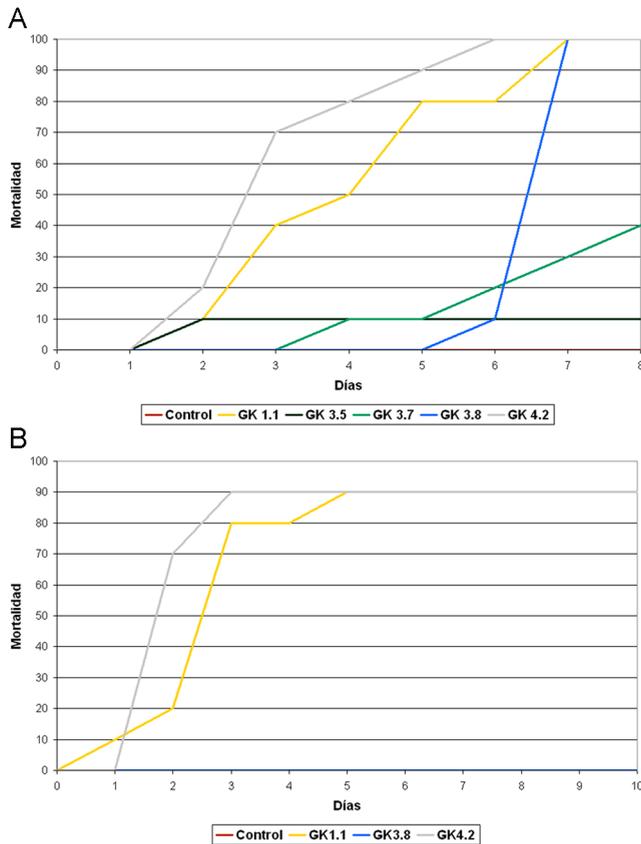
Tabla 3.3: Caracterización morfológica y bioquímica de las principales cepas aisladas de oreja de mar, *Haliotis tuberculata*, cultivadas en la Ría de Arousa.

Cepa		GK1.1	GK3.5	GK3.7	GK3.8	GK4.2
Forma		Bacilo	Bacilo	Bacilo	Bacilo	Bacilo
Movilidad		Inmóvil	Inmóvil	Inmóvil	Inmóvil	Móvil
Gram		-	-	-	-	-
Oxidasa		+	+	+	+	+
Catalasa		+	+	+	+	+
Oxidación/ Fermentación de la glucosa		F	F	F	F	F
Arginina dihidrolasa		-	-	-	-	-
Ornitina decarboxilasa		+	+	+	-	+
Lisina decarboxilasa		+	+	+	-	+
Crecimiento en medio TCBS		+	+	+	+	+
Metabolismo fermentativo en medio TCBS		-	+	+	+	-
Sensibilidad al 0129		Sensible	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible
β- galactosidasa		-	-	-	-	-
API 20E	Arginina dihidrolasa	-	-	-	-	-
	Lisina decarboxilasa	+	+	+	-	+
	Ornitina decarboxilasa	+	+	+	-	+
	Utilización del citrato	-	-	-	-	-
	Producción de SH ₂	-	-	-	-	-
	Ureasa	-	-	-	-	-
	Triptófano desaminasa	+	+	+	+	+
	Producción de Indol	+	+	+	+	+
	Producción de Acetoína (Voges Proskauer)	-	-	-	-	-
	Gelatinasa	+	+	+	+	+
	Utilización de la glucosa	+	+	+	+	+
	Utilización del manitol	+	+	+	+	+
	Utilización del inositol	-	-	-	-	-
	Utilización del sorbitol	-	-	-	-	-
	Utilización de la rhamnosa	-	-	-	-	-
	Utilización de la sacarosa	-	+	+	+	-
Utilización de la melibiosa	-	-	-	-	-	
Utilización de la amigdalina	+	-	-	+	+	
Utilización de la arabinosa	-	-	-	-	-	
Producción de NO ₂	+	+	+	+	+	
Identificación		<i>Vibrio campbellii</i>	<i>Vibrio campbellii</i> / <i>Vibrio harveyi</i>	<i>Vibrio campbellii</i> / <i>Vibrio harveyi</i>	<i>Vibrio campbellii</i> / <i>Vibrio harveyi</i>	<i>Vibrio campbellii</i>

Infecciones experimentales

Los resultados de las infecciones experimentales realizadas están resumidos en la figura 3.5. Las cepas GK1.1 y GK4.2 resultan ser las cepas más patógenas, puesto que la cepa GK3.8, que en el primer experimento logra producir una mortalidad del 100% de las orejas al cabo de 7 días, no llega a causar mortalidad en 10 días de experimento durante el experimento de confirmación. Según las pruebas bioquímicas y morfológicas, las cepas GK1.1 y GK4.2 pertenecen a la especie *Vibrio campbellii*.

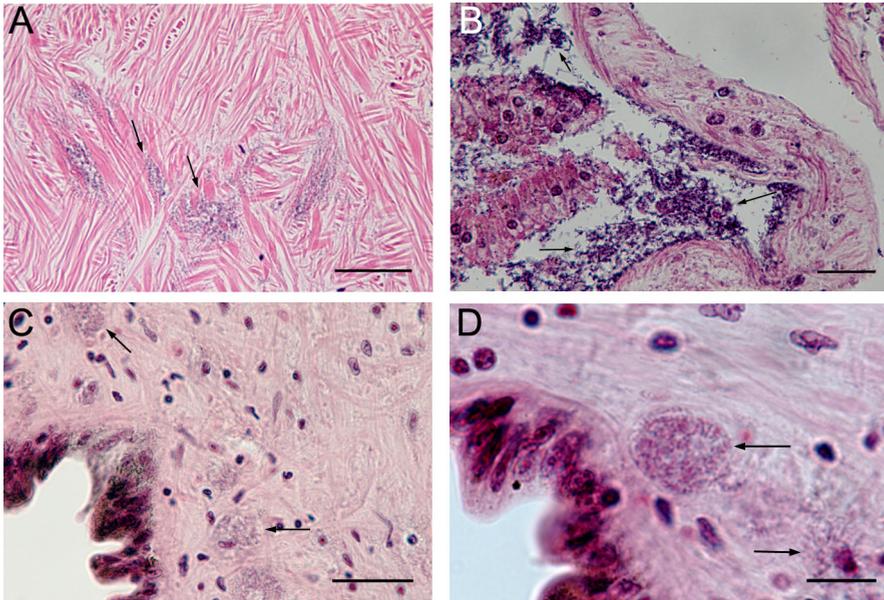
Figura 3.5: Infecciones experimentales realizadas por baño en oreja de mar europea, *Haliotis tuberculata*. **A.** Primera infección. **B.** Comprobación resultados obtenidos



Histopatología

La vibriosis observada se manifiesta principalmente en forma de pequeñas bolsas bacterianas en la musculatura del pie, principalmente bajo la superficie del epipodio (Fig. 3.6 A, C, D) y conllevan desorganización de las fibras musculares (Fig. 3.6 A). Estas lesiones son observadas tanto en individuos pertenecientes al grupo del que se aislaron las bacterias como en individuos sometidos a una infección experimental. También se observan bacterias en el tejido conectivo, en la zona de la glándula digestiva, presentándose en este caso de manera más difusa que en el tejido muscular (Fig. 3.6 B)

Figura 3.6: Bolsas bacterianas (flechas) en los tejidos de oreja de mar europea, *Haliotis tuberculata*. **A.** Bolsas bacterianas intercaladas entre las fibras musculares del pie. **B.** Infección bacteriana difusa en el conectivo próximo a la glándula digestiva. **C.** Bolsas bacterianas en el pie, próximas al epipodio. **D.** Detalle de una bolsa bacteriana. Barra en A: 50 μm , barra en B y C: 25 μm , barra en C: 10 μm .

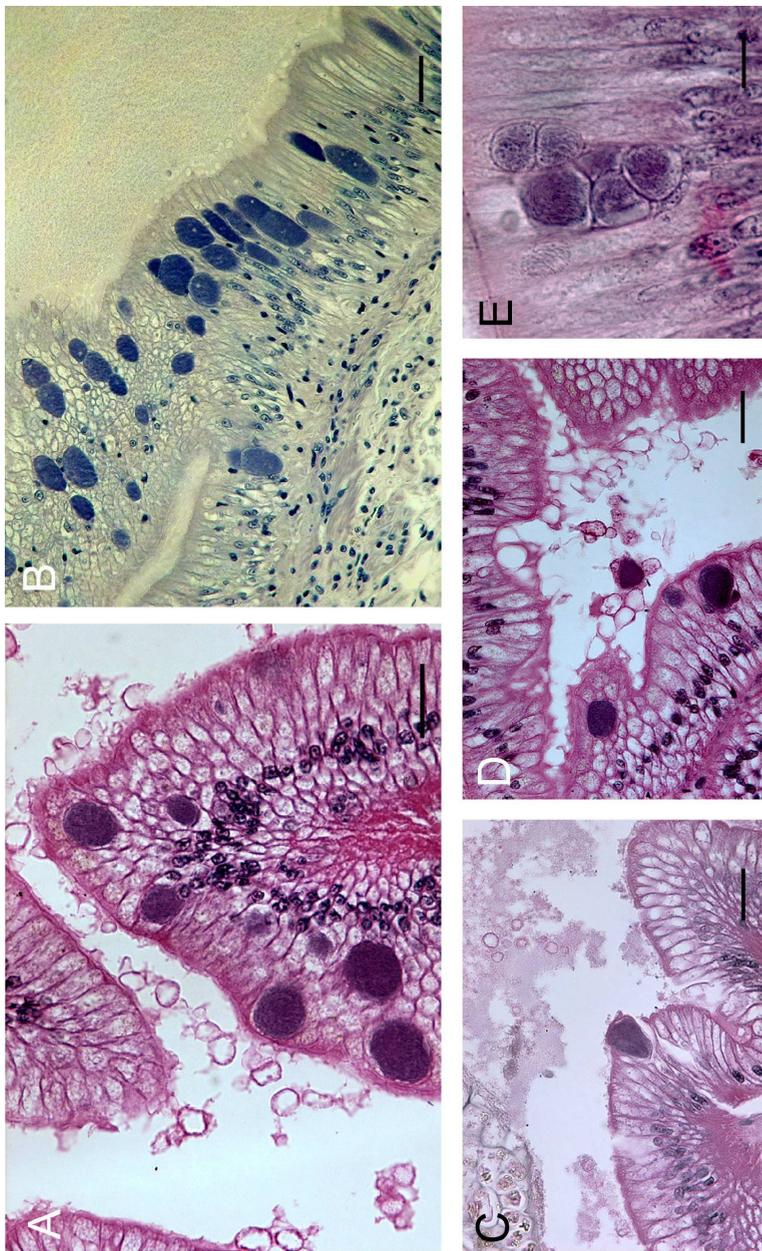


Además de las lesiones producidas por las bacterias citadas, la observación al microscopio óptico de las preparaciones histológicas

revela la presencia de otra bacteria, en este caso de tipo riquetsia, determinada como el patógeno de oreja de mar *Candidatus Xenohaliotis californiensis* (Fig. 3.7) mediante análisis molecular posterior y la de diversas fases de desarrollo de un organismo perteneciente al phylum Haplosporidia (Fig. 3.8). Las esporas y esporontes de este haplosporidio también son fácilmente observables mediante la microscopía de contraste de fases (Fig. 3.9). Mediante observación de las preparaciones histológicas no se detecta en ningún caso la presencia de estadios pertenecientes al parásito *Perkinsus* sp.

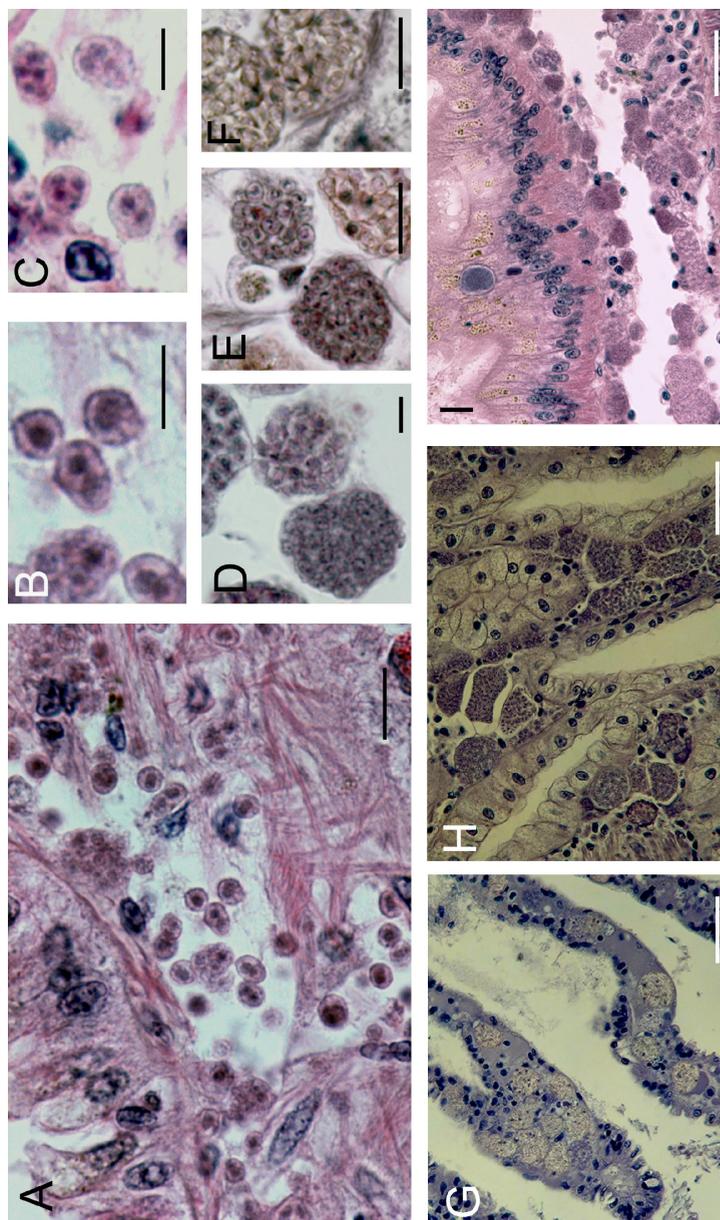
Las preparaciones histológicas revelan la presencia de *Candidatus Xenohaliotis californiensis* en las células del epitelio gastrointestinal de la oreja de mar. Se observan inclusiones de forma esférica a ovalada, en número de uno a cuatro, en el citoplasma de algunas células epiteliales (Fig. 3.7 E). Estas inclusiones están formadas por riquetsias densamente empaquetadas y que se tiñen de color violeta oscuro empleando la tinción hematoxilina-eosina. Las células infectadas presentan metaplasia, comprimiendo las células vecinas. En las infecciones intensas, las membranas de las células infectadas se rompen, liberando las inclusiones de bacterias al lumen digestivo (Fig. 3.7 C, D). No se observa, curiosamente, ningún tipo de reacción inflamatoria por parte del hospedador en ninguna de las muestras analizadas.

Figura 3.7: Células del epitelio gastrointestinal de *Haliotis tuberculata* infectadas con *Candidatus Xenohaliotis californiensis*. **A.** Metaplasia de las células del epitelio intestinal motivada por la presencia de inclusiones esféricas de *Candidatus Xenohaliotis californiensis*. **B.** Fuertedidatús *Xenohaliotis californiensis*. **C.** Proceso de liberación de una inclusión de *Candidatus Xenohaliotis californiensis* al lumen intestinal. **D.** Inclusión de *Candidatus Xenohaliotis californiensis* libre en el lumen intestinal. **E.** Células del epitelio gastrointestinal de *Haliotis tuberculata* mostrando dos y cuatro inclusiones diferentes de *Candidatus Xenohaliotis californiensis*. Barra en A, B, C y D: 25 µm, barra en E: 10 µm.



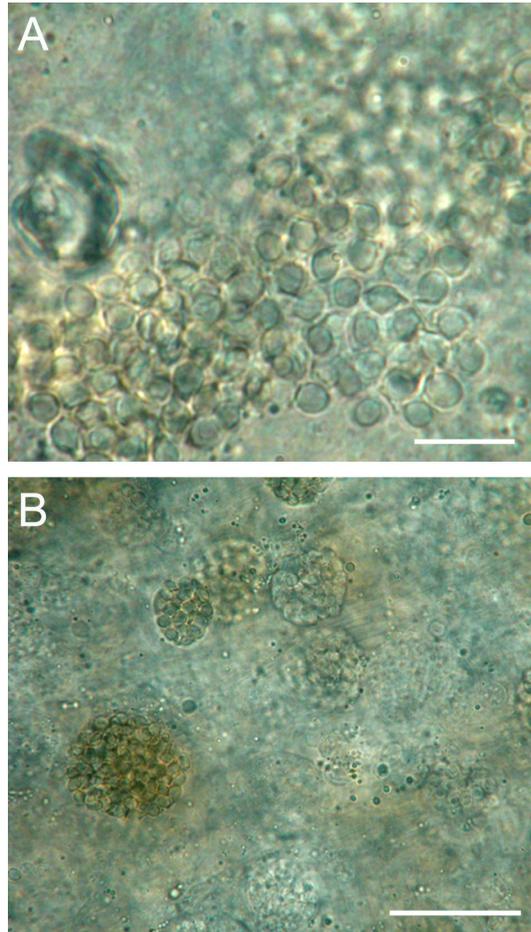
Se observan diferentes estadios del ciclo de vida de un parásito del phylum Haplosporidia en los tejidos de la oreja de mar (Fig. 3.8). A menudo este parásito se encontraba produciendo coinfección con *Candidatus Xenohalictis californiensis* en el mismo hospedador (Fig. 3.8 I). El desarrollo del haplosporidio permite diferenciar diferentes etapas de la esporogénesis en el molusco. Tanto el origen como la ruta de la infección en el hospedador no está clara, sin embargo, las infecciones suaves son observadas durante el invierno y muestran plasmodios uninucleados de forma redondeada en el tejido conectivo de las branquias y del tracto digestivo, lo que sugiere que son los estadios iniciales de la infección. Estos plasmodios tienen un diámetro de $3.2 \pm 0.2 \mu\text{m}$ con un núcleo de $1.3 \pm 0.1 \mu\text{m}$ (Fig. 3.8 A, B). También es posible observar plasmodios binucleados y multinucleados, hasta ocho núcleos durante el desarrollo de la infección (Fig. 3.8 C). Las infecciones más avanzadas muestran plasmodios que han sufrido cariocinesis sin citocinesis, creciendo el plasmodio en diámetro hasta $15.3 \mu\text{m}$ para formar un esporonte, rodeado de una membrana irregular, y adoptando en la mayoría de las ocasiones una forma redondeada (Fig. 3.8 D). Cada esporonte forma cientos de esporas por individualización de sus núcleos y citoplasmas. Las esporas inmaduras están rodeadas por una pared fina y presentan un típico núcleo basofílico (Fig. 3.8 E). Las esporas inmaduras dan lugar a las esporas maduras de característico aspecto refringente por engrosamiento de sus paredes y la formación completa del opérculo (Fig. 3.8 F).

Figura 3.8: Parásito perteneciente al phylum Haplosporidia parasitando la oreja de mar europea, *Haliotis tuberculata*. **A.** Fases iniciales del desarrollo, presentando entre uno y cuatro núcleos, en el tejido conectivo próximo al epitelio digestivo. **B.** Detalle de formas uni y binucleadas del haplosporidio. **C.** Plasmodio tetranucleado del haplosporidio. **D.** Plasmodio mostrando los núcleos en proceso de individualización. **E.** Esporontes ocupados por numerosas esporas inmaduras. **F.** Esporantes con esporas maduras. **G.** Haplosporidio parasitando los senos hemales de las branquias de *Haliotis tuberculata*. **H.** Fuerte infección del haplosporidio en el riñón. **I.** Coinfección de *Candidatus Xenohaliotis californiensis* y del haplosporidio en el mismo individuo. Barra en A, E y F: 10 µm, barra en B, C y D: 5 µm, barra en G y H: 50 µm, barra en I: 25 µm.



Los órganos más afectados son el tejido conectivo del epitelio digestivo, los senos hemales de las branquias, y el tejido muscular del pie, aunque en las infecciones más intensas, la infección también se extiende al riñón (Fig. 3.8 G, H).

Figura 3.9: Frotis de *Haliotis tuberculata* parasitada con un organismo del phylum Haplosporidia. **A.** Esporas libres, con el típico sistema opercular de los géneros *Haplosporidium* y *Minchinia*. **B.** Esperontes cargados de esporas. Barra en A: 10 μm , barra en B: 30 μm .

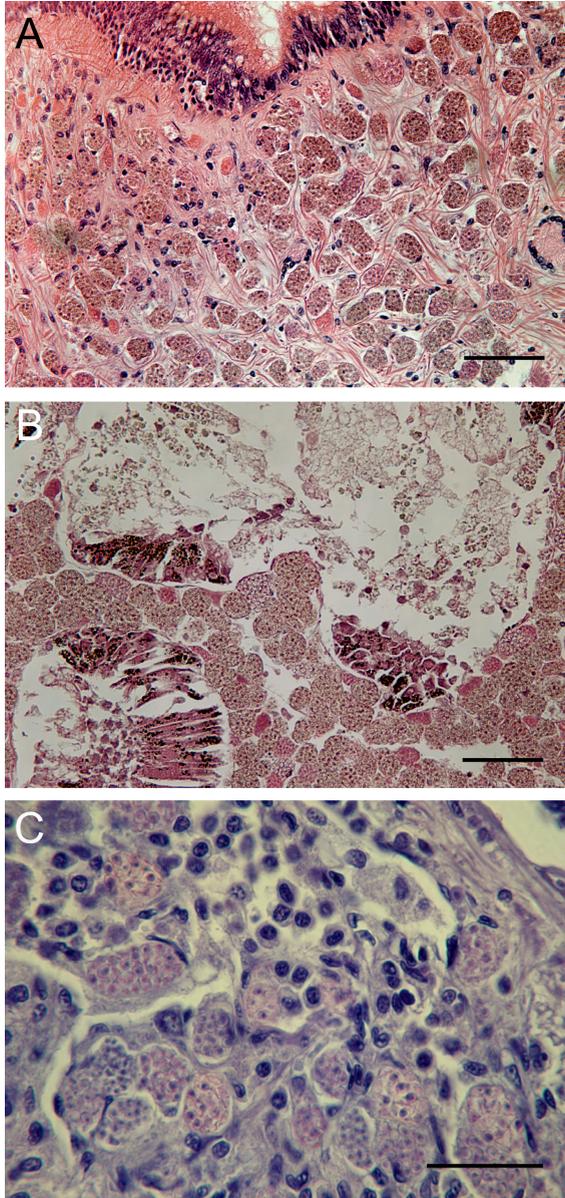


Los frotis de tejidos de la oreja de mar permiten la observación simple y rápida de los esporontes cargados de esporas y de las esporas libres, en las cuales es fácilmente observable la tapa opercular característica de los géneros *Haplosporidium* y *Minchinia*, ambos pertenecientes al phylum Haplosporidia (Fig. 3.9 A,B).

La haplosporidiosis observada está asociada a lesiones inflamatorias en el hospedador. Concretamente se observa infiltración hemocitaria en el músculo del pie, el tejido conectivo del tracto digestivo y las branquias (Fig. 3.10 C). En la musculatura del pie, la infección causa una reducción de las fibras musculares, una pérdida de la orientación de los haces de fibras musculares y una atrofia de la musculatura del pie (Fig. 3.10 A). En las infecciones más intensas, el haplosporidio invade todo el cuerpo del hospedador, causando una destrucción total de la arquitectura normal del órgano (Fig. 3.10 A,B). Las orejas de mar moribundas presentan los túbulos digestivos desorganizados, con las células digestivas en fase de lisis y con una gran cantidad de desechos celulares como consecuencia del proceso de degradación de la glándula digestiva.

Por medio del análisis histológico, no se observa la presencia de la riquetsia ni del haplosporidio tanto en juveniles importados directamente desde Irlanda como en las muestras procedentes de poblaciones naturales de *Haliotis tuberculata* de las aguas gallegas.

Figura 3.10: Patología causada por la infección con el parásito haplosporidio en *Haliotis tuberculata*. **A.** Fuerte infiltración del tejido muscular, con invasión del tejido por parte de los esporontes del haplosporidio y desorganización de las fibras musculares. **B.** Degradación de la glándula digestiva relacionada con las infecciones intensas. **C.** Infiltración hemocitaria ligada a la presencia de plasmodios y/o esporontes. Barra en A y B: 50 μm , barra en C: 25 μm .



Análisis ultraestructural

La microscopía electrónica de transmisión muestra los aspectos ultraestructurales de diversas etapas del desarrollo esporogénico del haplosporidio.

En la etapa inicial, los esporontes forman un plasmodio con múltiples núcleos. A continuación, los esporoblastos uninucleados se originan en el interior de los esporontes por individualización del citoplasma que rodea a cada núcleo. El esporonte está rodeado por una membrana fina e irregular y contiene esporas en el mismo estadio de desarrollo (Fig. 3.11 A,B).

Figura 3.11: Secciones ultrafinas de esporontes del parásito perteneciente al phylum Haplosporidia parasitando *Haliotis tuberculata*. **A.** Esporonte (Es) conteniendo múltiples esporas (Sp) en el mismo estadio inicial de desarrollo. **B.** Esporonte conteniendo esporas en el estadio medio de desarrollo. Barra en A y B: 1 μ m.

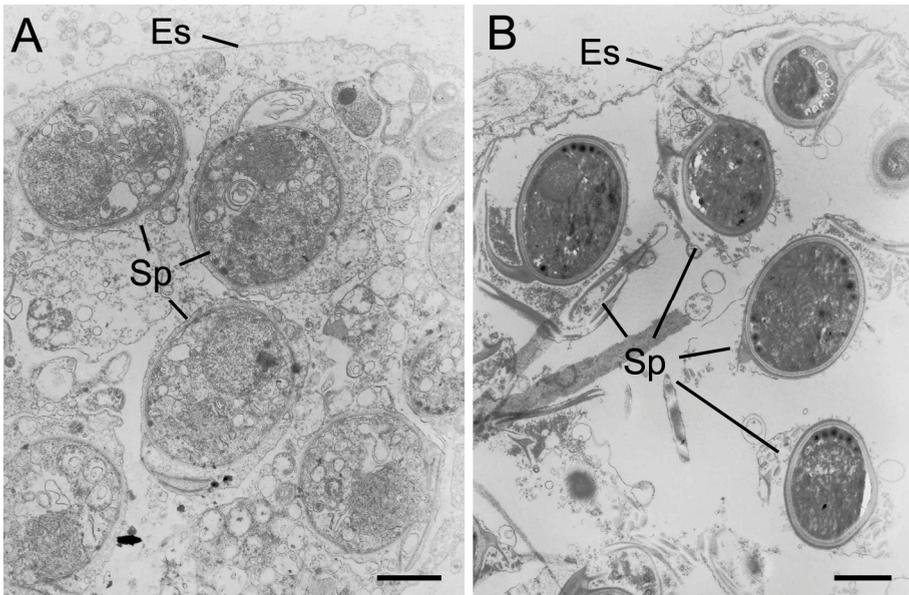
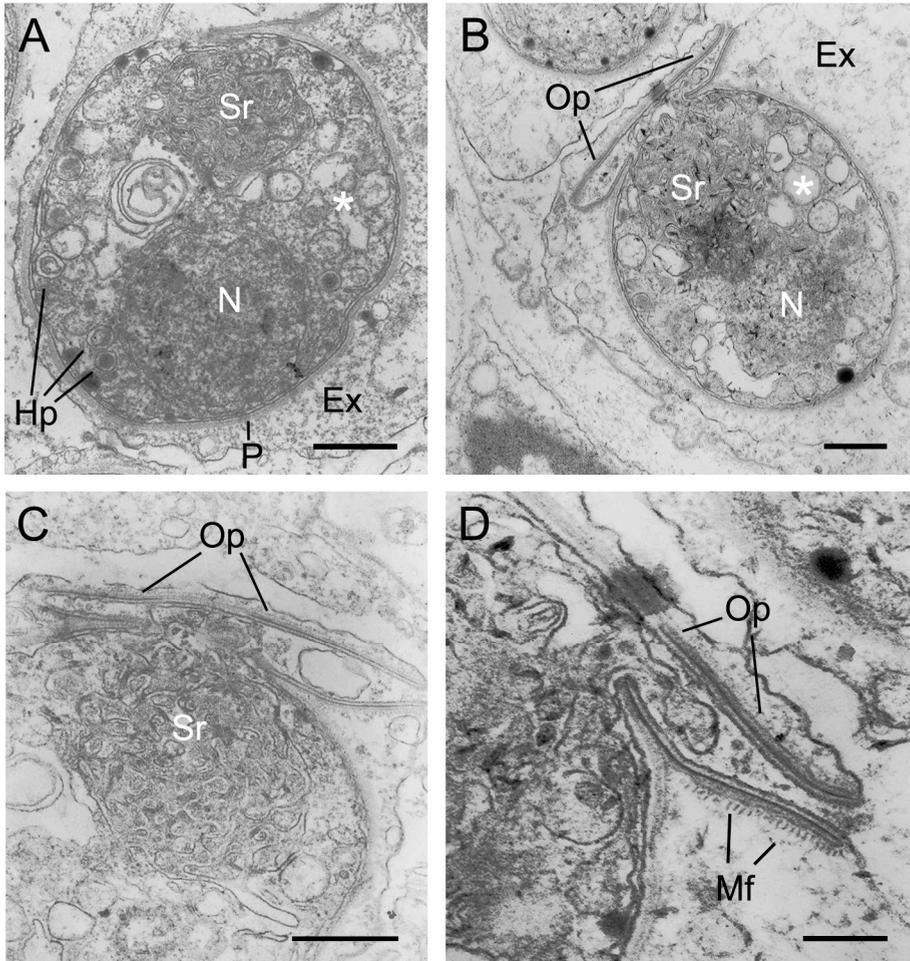


Figura 3.12: Secciones ultrafinas del parásito perteneciente al phylum Haplosporidia mostrando las características de las esporas en la fase inicial de desarrollo. **A.** Espora en fase inicial de desarrollo mostrando el exoesporoplasma (Ex) separado del endoesporoplasma (*) por una fina pared (P). El endoesporoplasma muestra un núcleo prominente (N), la esférula (Sr) y varios haplosporosomas (Hp) en la periferia. **B.** Espora en fase inicial mostrando un opérculo completamente formado (Op), núcleo (N), esférula (Sr) y exoesporoplasma (Ex). **C.** Detalle de la esférula o cuerpo multivesicular (Sr). La pared de la espora está abierta por el extremo apical con un orificio cubierto por el opérculo (Op). **D.** Detalle de la tapa opercular mostrando varios microfilamentos (Mf) proyectados hacia el exoesporoplasma. Barra en A, B y C: 500 nm, barra en D: 200 nm.



En las esporas inmaduras, la pared de la espora está formada por el exoesporoplasma, distinto del endoesporoplasma. La pared tiene un grosor de $0.118 \mu\text{m}$ (Fig. 3.12 A,B). El opérculo, situado en la

zona apical de la célula, está formado por una tapa de forma oval y compuesta de una capa de material electrón-denso de 75.7 (72-78) nm de grosor (Fig. 3.12 B, C y D). Entre el opérculo y la pared hay una zona electrón-clara de 129.1 (129.1-139.7) nm rodeada por una membrana. El opérculo está conectado a la pared en un parte concreta formando una charnela con una longitud de 859.2 (826.4-912.7) nm. La tapa inferior del opérculo muestra varios microfilamentos orientados hacia el exoesporoplasma (Fig. 3.12 D). La parte basal del endoesporoplasma está ocupada por el núcleo de 0.9 (0.8-1.1) μm de diámetro (Fig. 3.12 A,B). En la zona media del endoesporoplasma hay varios haplosporosomas rodeados por una doble membrana, separados por un espacio de 10 nm. También se observa en la parte apical del endoesporoplasma una esférula multivesicular (Fig. 3.12 A, B, C).

En la fase intermedia de desarrollo, el exoesporoplasma de la espora se reduce, el endoesporoplasma se hace más denso y los aspectos ultraestructurales se hacen menos visibles. En sección transversal, los cuatro filamentos se condensan alrededor de la espora. Los filamentos consisten en material amorfo sin una membrana limitante (Fig. 3.13 A, B). Durante esta etapa la pared alcanza un mayor grado de diferenciación, pudiéndose observar claramente las tres capas que la forman: una capa externa electrón-densa de 43.5 (42.6-44.3) nm, una capa media clara a los electrones de 16.0 (15.6-17.5) nm y una capa interna electrón-densa de 49.2 (45.6-56.2) nm de grosor (Fig. 3.13 C). La capa externa, continua con los filamentos, es más densa que la capa interna. El endoesporoplasma está rodeado por dos membranas limitantes en estrecha asociación

con la pared. La microscopía electrónica de barrido en esta etapa muestra los filamentos enrollados alrededor de la espora (Fig. 3.13 D).

Figura 3.13: Esporas del parásito haplosporidio en fase intermedia de desarrollo. **A.** Sección ultrafina longitudinal mostrando un endoesporoplasma denso (*), el opérculo (Op), una pared densa (Pe) y secciones de los filamentos anterior y posterior (F). **B.** Detalle del extremo anterior de la espora mostrando el opérculo (Op) y la pared de la espora en estrecha continuidad con los filamentos (F). **C.** Detalle de las tres capas de la pared de la espora (Pe). El endoesporoplasma muestra una membrana limitante (punta de flecha) estrechamente asociada con la pared de la espora y los haplosporosomas (Hp). **D.** Fotografía de SEM de una espora en fase de desarrollo intermedia mostrando el opérculo (Op), con la charnela opercular (flechas) y los filamentos rodeando la espora. Barra en A: 500 nm, barra en B: 200 nm, barra en C: 100 nm, barra en D: 1 μ m.

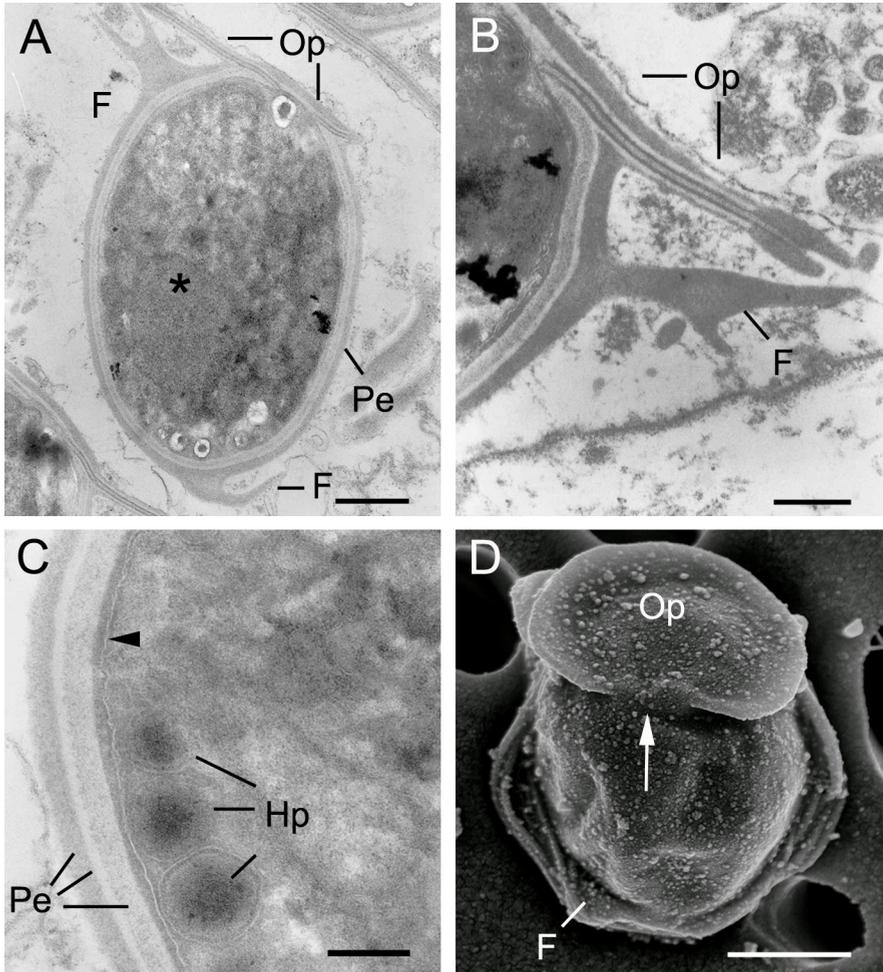
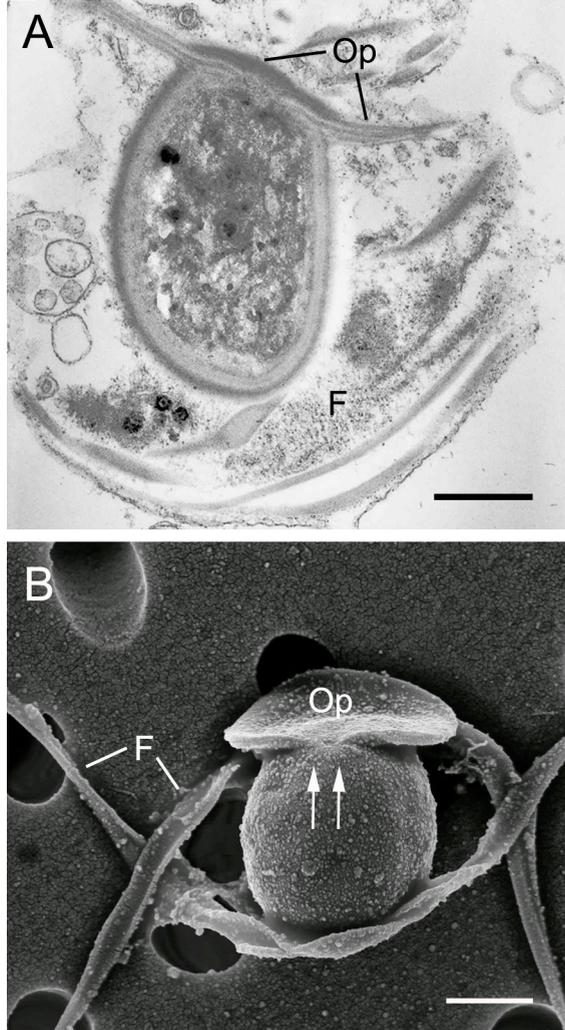


Figura 3.14: Esporas maduras del parásito perteneciente al phylum Haplosporidia. **A.** Sección ultrafina de la espora madura mostrando el opérculo (Op) y los filamentos alrededor de la espora. **B.** Foto de SEM de la espora madura mostrando cuatro filamentos libres (F) anclados a los dos extremos de la espora y el opérculo (Op) con la charnela opercular (flechas). Barra en A: 500 nm, barra en B: 1 μ m.



Las esporas maduras están caracterizadas por la ruptura del exoesporoplasma y el desenrollamiento de los cuatro largos filamentos acintados. Los cuatro filamentos son libres, excepto en el punto de inserción a la espora en sus partes basal y apical. Las esporas presentan una forma elipsoidal en sección transversal. La

pared tiene la misma estructura que en la fase intermedia de desarrollo. El sistema opercular muestra una ligera modificación, ya que la tapa es más aplanada al acercarse al borde de la pared de la espora (Fig. 3.14 A).

En la fase final de la esporogénesis, los esporontes se rompen y liberan las esporas. Las esporas maduras mantienen los cuatro filamentos, como es confirmado por SEM (Fig. 3.14 B). Las esporas son ovoides, midiendo 3.3 (3.1-3.5) μm de longitud y 2.1 (1.9-2.2) μm de ancho. El opérculo presenta un diámetro de 2.7 (2.1-3.7) μm y es inusualmente grande, con un ancho mayor que el ancho de la espora. Los filamentos libres, largos, anclados a puntos opuestos de la espora se sitúan en dos pares, un par anclado al extremo basal y el otro al extremo apical. En ambos casos los filamentos están insertados lateralmente. La base de la parte más ancha del filamento, anclada a la espora, tiene un grosor de 200-300 nm.

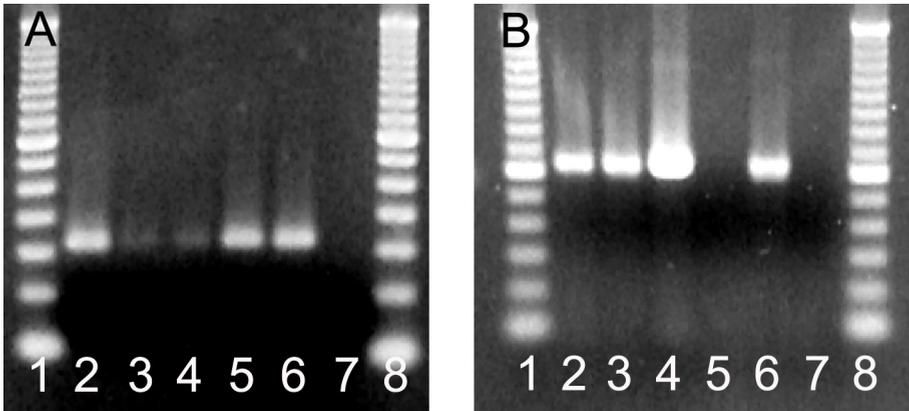
Caracterización molecular

Candidatus Xenohalictis californiensis

Empleando la pareja de cebadores recomendados por la O.I.E para la detección del ADN de *Candidatus Xenohalictis californiensis*, patógeno de diversas especies de oreja de mar, se amplifica un producto de PCR de 160 pb (Fig. 3.15 A). Este producto de PCR es detectado en los lotes de oreja de mar que sufrían mortalidades y en los juveniles importados directamente desde Irlanda, confirmando así su presencia en las muestras introducidas para el cultivo experimental. También se detecta esta riquetsia en las muestras analizadas procedentes de un semillero de Francia así como en los

animales muestreados procedentes de bancos naturales de la Ría de Arousa.

Figura 3.15: Electroforesis en gel de agarosa mostrando los productos de PCR de la amplificación parcial de los genes de la subunidad pequeña ribosómica, *16S* y *18S*, respectivamente en *Candidatus Xenohalictis californiensis* y del parásito perteneciente al phylum Haplosporidia. **A.** Gel de agarosa al 2% mostrando los productos de *Candidatus Xenohalictis californiensis* obtenidos con los cebadores *RA5.1* y *RA3.6*. Marcador de ADN de 50 pb. **B.** Gel de agarosa al 1% mostrando los productos del haplosporidio obtenidos con los cebadores *Hap Hal SSU F3* y *Hap Hal SSU R2*. Marcador de ADN de 100 pb. Calles: (1) y (8) Marcadores de ADN, (2) Juveniles procedentes de Irlanda, (3) Juveniles procedentes de Francia, (4) Adultos procedentes de los lotes que sufren mortalidades, (5) Adultos procedentes de poblaciones naturales de la Ría de Arousa, (6) Control positivo, (7) Control negativo.



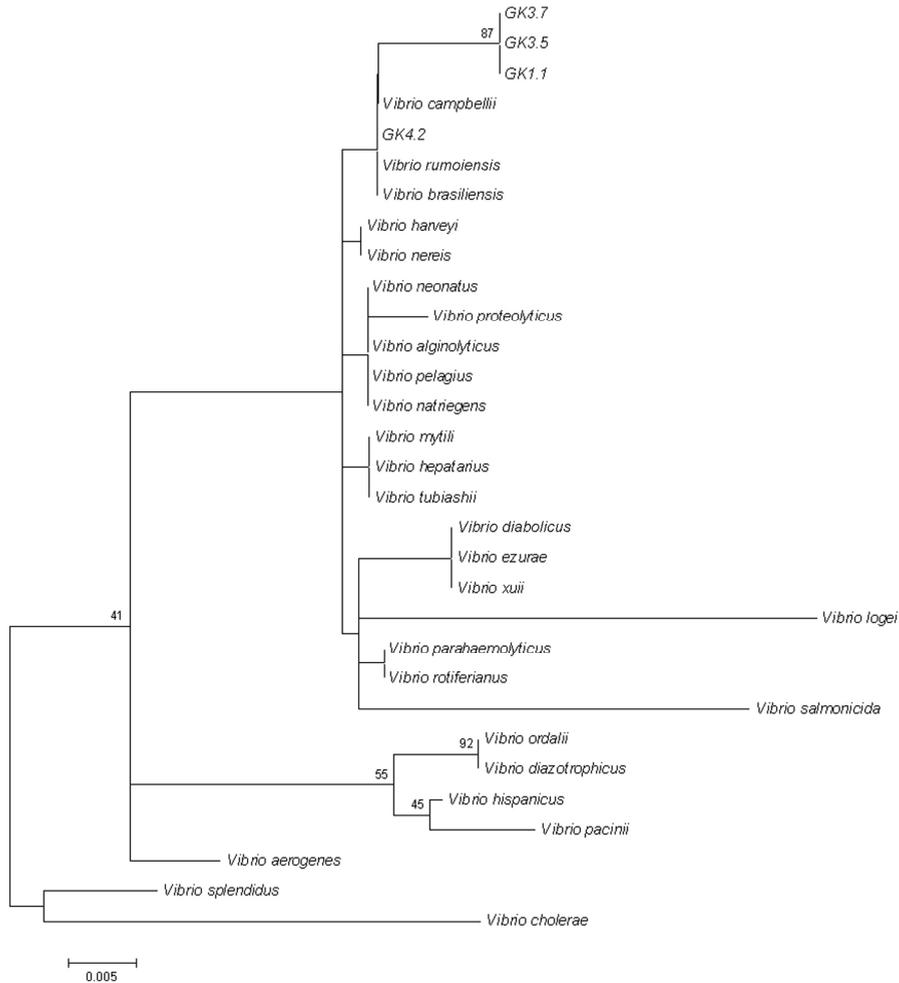
La secuenciación del gen del ARNr *16S* de *Candidatus Xenohalictis californiensis* no muestra diferencias con las secuencias de esta riquetsia ya depositadas en el *GenBank* (AF133090, AF069062), por lo que no se puede emplear este gen para poder tipar las cepas de este patógeno.

Bacterias

Las cepas aisladas fueron caracterizadas en un primer momento por medio del fragmento *PSL-PSR*. El filograma obtenido por medio del algoritmo de *Neighbour Joining* está representado en la figura 3.16. Las cepas GK1.1, GK3.5 y GK3.7 pertenecen al mismo grupo que *Vibrio harveyi* y *Vibrio campbellii*. La cepa GK4.2 aparece agrupada con *Vibrio ezurae* Sawabe *et al.*, 2004 y *Vibrio proteolyticus* (Merkel *et al.*, 1964) Baumann *et al.*, 1982. La cepa GK3.8 pertenece al grupo de *Vibrio lentus*. Un análisis más detallado de la posición de las cepas, empleando solo las secuencias más próximas está detallado en las figuras 3.17 (cepas GK1.1, GK3.5, GK3.7 y GK4.2) y 3.18 (cepa GK3.8).

El análisis más detallado de las secuencias del fragmento *PSL-PSR* perteneciente a las cepas GK1.1, GK3.5, GK3.7 y GK4.2 las presenta agrupadas con *Vibrio campbellii*, *Vibrio rumoiensis* Yumoto *et al.*, 1999 y *Vibrio brasiliensis* Thompson *et al.*, 2003, aunque con un valor de *bootstrap* inferior al 40% (Fig. 3.17). La longitud del subárbol que contiene las cepas aisladas y los grupos de *Vibrio harveyi*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio tubiashii* y *Vibrio parahaemolyticus* (Fujino *et al.*, 1951) Sakazaki *et al.*, 1963 es 0.0159.

Figura 3.17: Filograma obtenido mediante el algoritmo de *Neighbour Joining* empleando la distancia de dos parámetros para transiciones y transversiones de Kimura a partir del fragmento *PSL-PSR* del gen *16S* del ARNr mostrando las relaciones evolutivas más próximas a las cepas GK1.1, GK3.5, GK3.7 y GK4.2. El análisis está realizado sobre 225 nucleótidos alineados de las secuencias más representativas del grupo, con las bacterias *Vibrio splendidus* y *Vibrio cholerae* como grupo externo. La barra indica la distancia génica. Se representan en las ramificaciones los valores de *bootstrap* iguales o superiores al 40%. *Bootstrap*: 10000 repeticiones. Longitud del árbol (SBL)=0.1914.



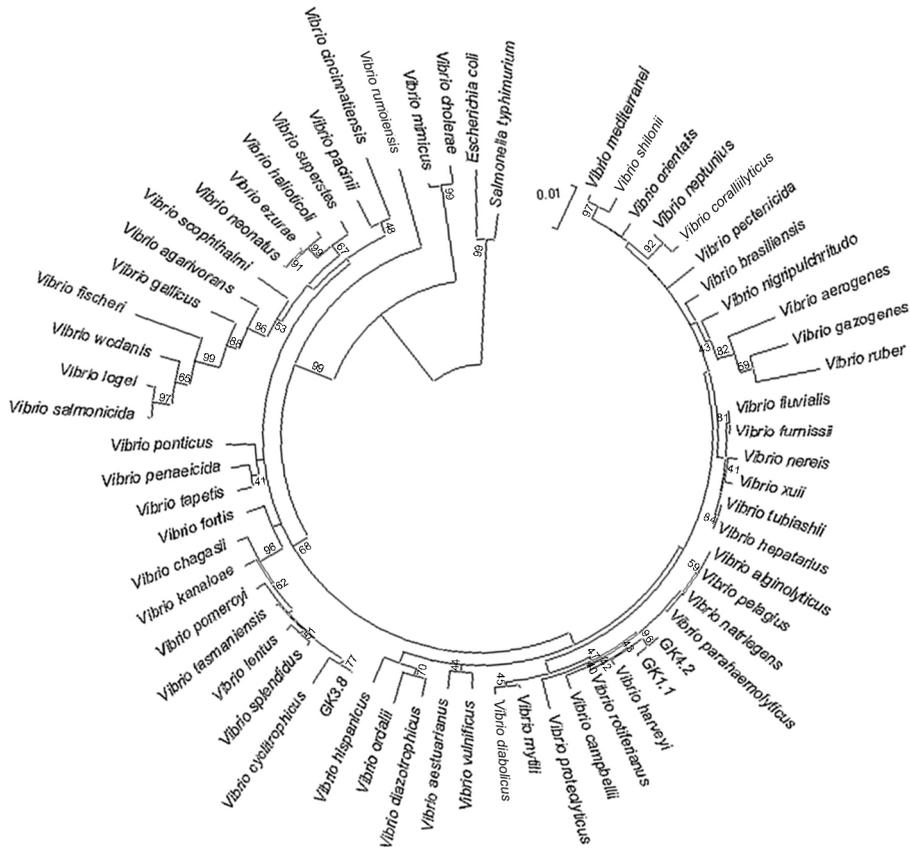
El análisis detallado de la secuencia del fragmento *PSL-PSR* perteneciente a la cepas GK3.8 la presenta agrupada con las especies *Vibrio cyclitrophicus* Hedlund et Staley, 2001, *Vibrio mediterranei*, *Vibrio pomeroyi* Thompson et al., 2003, *Vibrio pectenecida*, *Vibrio crassostreae*

Faury *et al.*, 2004, *Vibrio scophthalmi* Cerdà-Cuéllar *et al.*, 1997, *Vibrio lentus*, *Vibrio tasmaniensis* Thompson *et al.*, 2003 y *Vibrio chagasii* Thompson *et al.*, 2003 con un valor de *bootstrap* del 41%. La longitud de este subárbol es 0.0018.

Figura 3.18: Filograma obtenido mediante el algoritmo de *Neighbour Joining* empleando la distancia de dos parámetros para transiciones y transversiones de Kimura a partir del fragmento *PSL-PSR* del gen *16S* del ARNr mostrando las relaciones evolutivas más próximas a las cepas GK3.8. El análisis está realizado sobre 261 nucleótidos alineados de las secuencias más representativas del grupo, con las bacterias *Vibrio campbellii* y *Vibrio harveyi* como grupo externo. La barra indica la distancia génica. Se representan en las ramificaciones los valores de *bootstrap* iguales o superiores al 40%. *Bootstrap*: 10000 repeticiones. Longitud del árbol (SBL)=0.1493.



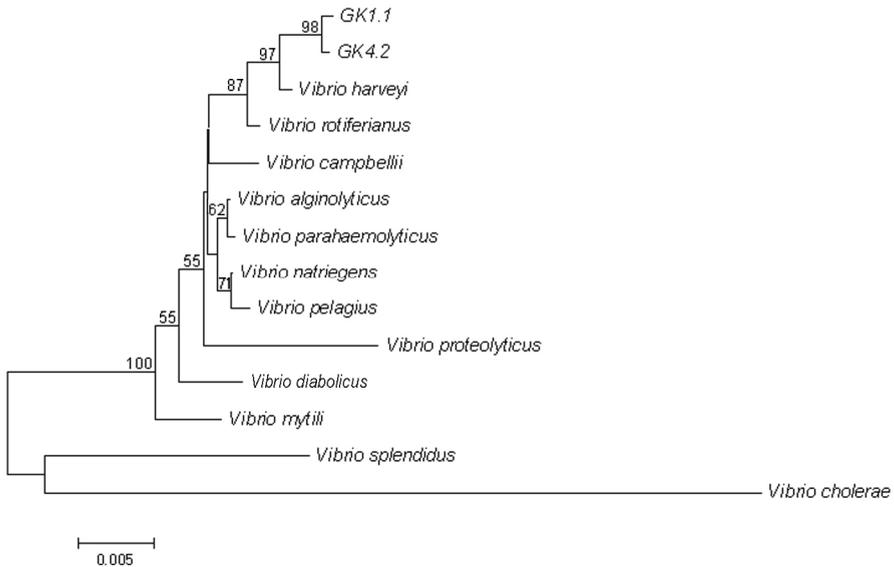
Figura 3.19: Filograma obtenido mediante el algoritmo de *Neighbour Joining* empleando la distancia de dos parámetros para transiciones y transversiones de Kimura a partir del fragmento 27F-1492R del gen 16S del ARNr mostrando las relaciones evolutivas dentro del género *Vibrio*. El análisis está realizado sobre 1196 nucleótidos alineados de las secuencias más representativas del grupo, con las bacterias *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium* como grupo externo. La barra indica la distancia génica. Se representan en las ramificaciones los valores de *bootstrap* iguales o superiores al 40%. *Bootstrap*: 10000 repeticiones. Longitud del árbol (SBL)=0.4158.



La figura 3.19 presenta las relaciones filogenéticas de las cepas GK1.1, GK3.8 y GK4.2 según determina el fragmento 27F-1492R del gen de la subunidad ribosómica pequeña (16S). El análisis más detallado de las secuencias del fragmento 27F-1492R perteneciente a las cepas GK1.1 y GK4.2 las presenta agrupadas entre ellas con un *bootstrap* del 98% y agrupadas con *Vibrio harveyi* con un *bootstrap* del

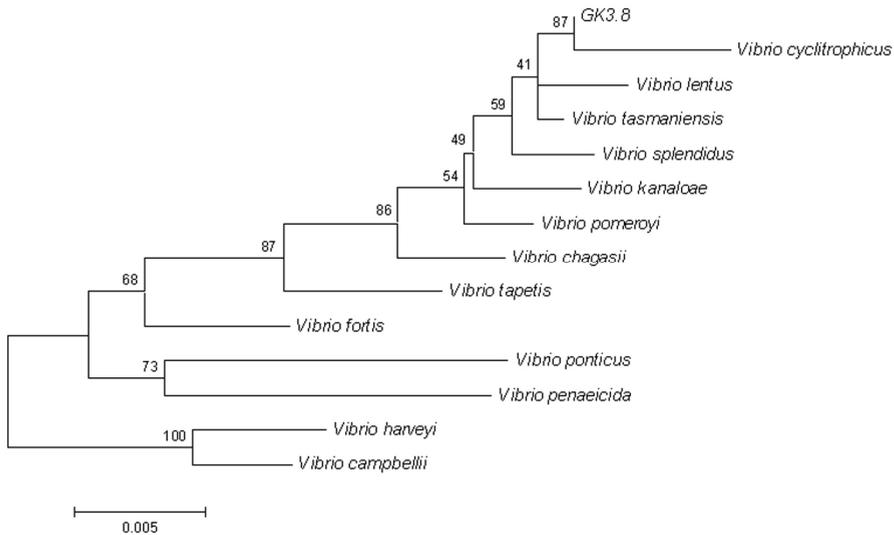
97% (Fig. 3.20). La longitud del subárbol que contiene las cepas aisladas y la especie *Vibrio harveyi* es de 0.0021.

Figura 3.20: Filograma obtenido mediante el algoritmo de *Neighbour Joining* empleando la distancia de dos parámetros para transiciones y transversiones de Kimura a partir del fragmento 27F-1492R del gen 16S del ARNr mostrando las relaciones evolutivas más próximas a las cepas GK1.1 y GK4.2. El análisis está realizado sobre 1326 nucleótidos alineados de las secuencias más representativas del grupo, con las bacterias *Vibrio splendidus* y *Vibrio cholerae* como grupo externo. La barra indica la distancia génica. Se representan en las ramificaciones los valores de *bootstrap* iguales o superiores al 40%. *Bootstrap*: 10000 repeticiones. Longitud del árbol (SBL)=0.1203.



El análisis detallado de la secuencia del fragmento 27F-1492R perteneciente a la cepa GK3.8 la presenta agrupada con la especie *Vibrio cyclitrophicus* con un valor de *bootstrap* de 87% y con *Vibrio tasmaniensis* y *Vibrio lentus* con un valor de *bootstrap* de 41% (Fig. 3.21). La longitud de este último subárbol es 0.0010.

Figura 3.21: Filograma obtenido mediante el algoritmo de *Neighbour Joining* empleando la distancia de dos parámetros para transiciones y transversiones de Kimura a partir del fragmento 27F-1492R del gen 16S del ARNr mostrando las relaciones evolutivas más próximas a las cepas GK3.8. El análisis está realizado sobre 1350 nucleótidos alineados de las secuencias más representativas del grupo, con las bacterias *Vibrio campbellii* y *Vibrio harveyi* como grupo externo. La barra indica la distancia génica. Se representan en las ramificaciones los valores de *bootstrap* iguales o superiores al 40%. *Bootstrap*: 10000 repeticiones. Longitud del árbol (SBL)=0. 1019.



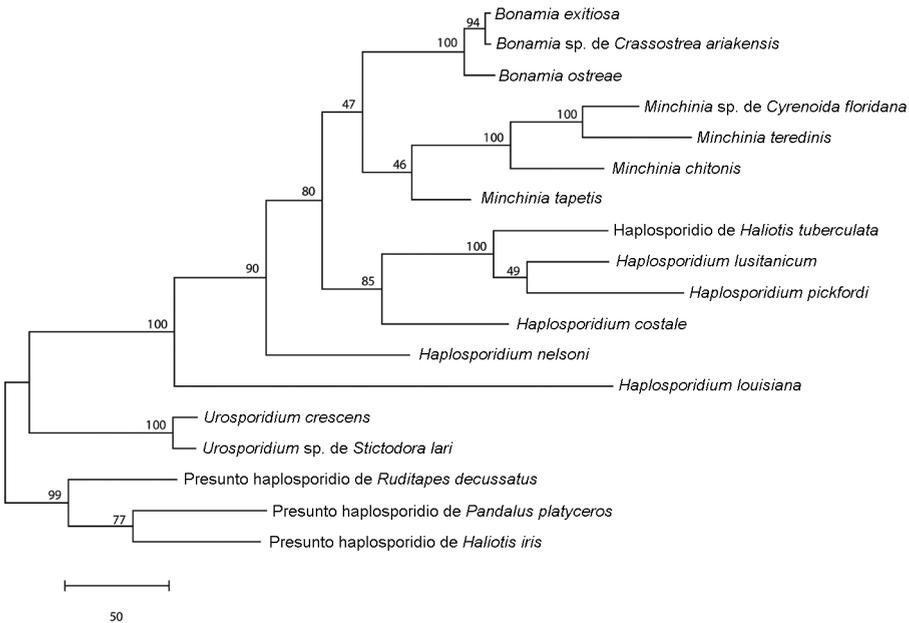
Haplosporidio

Una vez obtenida la secuencia completa del gen 18S del haplosporidio, esta secuencia, de 1872 pb, ha sido depositada en la base de datos *GenBank* bajo el código de acceso DQ219484. Tras la secuenciación al menos dos veces de los clones obtenidos con los diferentes productos de PCR procedentes de hospedadores diferentes, es posible encontrar algunos *loci* polimórficos en el gen 18S. En las posiciones 532 y 533 se puede observar una secuencia TC en 7 clones procedentes de 3 individuos diferentes, y un CG en 4 clones de 2 individuos. Además, en la posición 1621, se puede observar una C en 4 clones procedentes de 2 individuos y una G en 5 clones de otros dos hospedadores diferentes.

La matriz de distancias empleando la distancia de dos parámetros de Kimura (Tabla 3.4) muestra que la menor distancia entre dos especies reconocidas del phylum Haplosporidia es un 1.9% entre *Bonamia exitiosa* y *Bonamia ostreae*. La distancia entre el presente parásito y las especies más próximas es 8.1% con *Haplosporidium lusitanicum* y 11.2% con *Haplosporidium pickfordi*.

El análisis por máxima parsimonia incluye diversas secuencias representativas de miembros del phylum Haplosporidia (Fig. 3.22). Este análisis sitúa al haplosporidio observado en *Haliotis tuberculata* en la misma rama que *Haplosporidium pickfordi* y *Haplosporidium lusitanicum*, con un gran apoyo del valor de *bootstrap* (100%). La secuencia del único haplosporidio previamente descrito en un miembro de la familia Haliotiidae (*Haliotis iris*) es claramente diferente. Este análisis apoya la monofilia de los géneros *Bonamia* y *Urosporidium* Caullery et Mesnil, 1905 (100% de *bootstrap* en ambos casos). El género *Haplosporidium*, sin embargo, es parafilético. No se consigue producto de PCR al amplificar con los cebadores específicos del presunto haplosporidio parásito de *Haliotis iris*.

Figura 3.22: Filograma más parsimonioso obtenido a partir de las secuencias del gen 18S del ARNr mostrando las relaciones evolutivas del phylum Haplosporidia. El análisis está realizado sobre 1274 nucleótidos alineados de las secuencias más representativas del grupo, con los haplosporidios previamente documentados como basales como grupo externo. La barra indica la equivalencia entre la distancia y el número de cambios. Se representan en las ramificaciones los valores de *bootstrap* iguales o superiores al 40%. *Bootstrap*: 100 repeticiones. Estadísticas del árbol: Longitud (L): 1441; Índice de Consistencia (CI): 0.609; Índice de Retención (RI): 0.608.



La PCR anidada realizada a partir de los cebadores diseñados con la secuencia del haplosporidio origina un producto de 632 pb de tamaño, presente en las orejas de mar cultivadas en la Ría de Arousa que experimentaban mortalidades. Este producto de PCR también se detecta en las orejas de mar importadas de Irlanda y Francia. La presencia de este haplosporidio, sin embargo no es detectada en las poblaciones naturales de la Ría de Arousa (Fig. 3.15 B). La secuenciación de estos productos confirma que pertenecen al parásito del phylum Haplosporidia.

Epizootiología de la infección

Los niveles de mortalidad acumulada de los tres lotes de orejas de mar en cultivo fueron controlados durante un año y se encuentran resumidos en la tabla 3.5. Los lotes I y II empiezan a sufrir mortalidades después de 9 meses de su introducción y un año después, la mortalidad acumulada es un 62% y un 25.9%, respectivamente. Tras el periodo de verano, el lote I alcanza una mortalidad acumulada del 100%, mientras que en esos momentos la mortalidad acumulada del lote II es del 58%. En el caso del lote III, importado en Mayo del 2004, la mortalidad acumulada al principio del verano es del 3%, creciendo hasta el 26.4% al final del mismo.

Tabla 3.5: Mortalidades acumuladas alcanzadas en los diferentes lotes de oreja de mar europea, *Haliotis tuberculata*, mantenidos en bidones plásticos suspendidos de bateas en la Ría de Arousa.

Lote	Julio 2004	Octubre 2004	Diciembre 2004	Febrero 2005	Mayo 2005
I	62.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%
II	25.9%	58.0%	86.3%	89.3%	93.3%
III	3.0%	26.4%	36.8%	37.4%	45.9%

La riqueta patógena *Candidatus Xenohaliothis californiensis* se observa en unas prevalencias similares durante todas las épocas de muestreo (Tabla 3.6 A), presentando unas intensidades de infección de bajas a moderadas. Por otra parte, la prevalencia del haplosporidio aumenta con el incremento de la temperatura de las aguas en primavera (Tabla 3.6 B), pasando de una prevalencia del 25% en el lote II en diciembre de 2004 al 83.3% en mayo del 2005. Además, la mayoría de las infecciones del lote II presentaban plasmodios en estadios iniciales de desarrollo en diciembre de 2004. Las intensidades de las infecciones por el haplosporidio eran de intensidad alta a muy alta en la mayoría de los animales.

Tabla 3.6: Prevalencias observadas por análisis histológico de los dos principales patógenos detectados en el cultivo de *Haliotis tuberculata* durante el periodo observado. **A.** Prevalencia de *Candidatus Xenohaliotis californiensis*. **B.** Prevalencia del parásito del phylum Haplosporidia. NA: No analizado.

Lote	Llegada	Julio 2004	Diciembre 2004	Mayo 2005
A				
I	0%	52%	Todas muertas	Todas muertas
II	0%	16.10%	16.60%	16.60%
III	0%	14.50%	38.70%	25%
Población natural	NA	0%	NA	NA
B				
I	0%	50%	Todas muertas	Todas muertas
II	0%	22.50%	25%	83.30%
III	0%	0%	3.20%	33.30%
Población natural	NA	0%	NA	NA

Descripción de *Haplosporidium montforti* n. sp.

Autores: Azevedo, Balseiro, Casal, Gestal, Aranguren, Stokes, Carnegie, Novoa, Burreson *et* Figueras.

Diagnóstico: Esporas con esporontes observadas en el tejido conectivo y músculo del pie de la oreja de mar europea, *Haliotis tuberculata*. La espora es ovoide, midiendo 3.3 (3.1-3.5) μm de longitud y 2.1 (1.9-2.2) μm de ancho, con un opérculo de 2.7 (2.1-3.7) μm de diámetro. Posee cuatro filamentos derivados de la pared de la espora, dos filamentos en sentidos opuestos anclados al polo apical de la espora y otros dos también en sentidos opuestos anclados al polo basal. Estos filamentos están libres en el caso de esporas maduras y enrollados alrededor de la espora en esporas inmaduras. Las esporas no pierden los filamentos durante el transcurso de la evolución.

Secuencia del gen 18S tipo: Secuencia de 1872 pb depositada en la base de datos *Gen Bank* con el código de acceso DQ219484.

Especímenes tipo: Se encuentran tanto preparaciones histológicas (hapantotipo) como semifinos (paratipo), con multitud de esporas y diferentes estadios de desarrollo en la *Internacional Protozoan Type Slide Collection, National Museum of Natural History, Washington D.C., 20560, E.E.U.U.*; bajo el código de acceso 2039532.

Localidad tipo: Ría de Arousa (42° 30' N 8° 50' O), Costa de Galicia (NO de España), NE del Océano Atlántico.

Hospedador tipo: *Haliotis tuberculata* Linnaeus, 1758.

Lugar de infección: Tejido conectivo de branquias, glándula digestiva y musculatura del pie.

Etimología: El nombre de la especie está dedicado al Dr. Antonio Figueras Montfort, investigador pionero en la investigación marina en España, especialmente en el campo de la biología, la ecología y la acuicultura de los moluscos.

Discusión

Tradicionalmente, el diagnóstico de las enfermedades de moluscos se ha realizado mediante técnicas de microscopía óptica y/o electrónica o técnicas inmunológicas (Lauckner, 1983; Figueras y Figueras, 1987; Mialhe *et al.*, 1988; Cunningham, 2002; Bower y McGladdery, 2003; Howard *et al.*, 2004; O.I.E., 2006). Estas enfermedades pueden ser causadas por virus, bacterias, protozoos, hongos o metazoos, aunque las patologías más importantes a las que tienen que hacer frente los moluscos suelen ser las producidas por protozoos.

Los virus, debido a su tamaño, no pueden ser detectados directamente por histología, únicamente pueden serlo de forma indirecta por medio de las lesiones producidas en las células infectadas, que por otra parte suelen ser inespecíficas y comunes a diferentes alteraciones. Los virus sí pueden ser detectados por microscopía electrónica, pero es una técnica lenta, compleja y cara, que se emplea principalmente como complemento para la identificación y no como técnica de diagnóstico.

La morfología al microscopio óptico de las diferentes bacterias y hongos que también pudieran originar enfermedades en moluscos no suele ser una buena herramienta diagnóstica, debido a que dicha morfología puede ser similar incluso en especies alejadas filogenéticamente, y su caracterización siempre depende del correcto aislamiento del patógeno. El parasitismo por metazoos no suele causar importantes mortalidades aunque las malformaciones originadas en el molusco pueden reducir su valor comercial (Lauckner, 1983; Elston, 1990; Robledo *et al.*, 1994c).

Como ya se ha comentado, las principales enfermedades de moluscos están provocadas por parásitos protozoos, una de cuyas principales características es la complejidad de su ciclo de vida, a menudo con diferentes fases en distintos hospedadores y que no en pocas ocasiones es desconocido en su totalidad. Esto afecta a la posible identificación de un patógeno, ya que no todas las formas del parásito pueden ser reconocidas al microscopio. Además, el enorme rango de organismos candidatos a ser hospedadores intermediarios o reservorios obliga al conocimiento de la histología normal de un gran número de organismos.

Las técnicas inmunológicas están basadas en el reconocimiento de determinados antígenos del patógeno por parte de anticuerpos específicos. En caso de organismos de ciclo complejo, estos antígenos en ocasiones pueden ser expresados en una fase concreta del ciclo de vida, fallando en la detección del patógeno en otra fase (Burreson, 1988; Goggin *et al.*, 1991). Una posible solución a este fenómeno es el empleo de sondas basadas en el reconocimiento de regiones de ADN, ya que el ADN permanece estable a lo largo de todo el ciclo de vida del parásito (Anónimo, 1993a; Stokes *et al.*, 1995; Burreson *et al.*, 1997; Hine, 2000; McGladdery, 2000).

El empleo de técnicas de diagnóstico moleculares, en conjunción con otras técnicas más tradicionales como el aislamiento bacteriano o la microscopía, permite identificar las posibles causas de los diferentes episodios de mortalidad a los que tuvo que hacer frente un cultivo experimental de la especie oreja de mar europea, *Haliotis tuberculata*, ligadas a diferentes microorganismos tanto bacterianos como protozoarios.

El análisis morfológico y bioquímico de las cepas bacterianas aisladas de *Haliotis tuberculata* remite a *Vibrio campbellii* (cepas GK1.1 y GK4.2) o a las especies *Vibrio campbellii* y *Vibrio harveyi* de manera no totalmente clara (cepas GK3.5, GK3.7 y GK3.8). Mediante el empleo de la secuenciación parcial del gen 16S de la subunidad ribosómica pequeña, se han caracterizado las cepas bacterianas aisladas. La región PSL-PSR (Campbell *et al.*, 1995) no se revela como un buen instrumento discriminador debido principalmente al pequeño fragmento amplificado y a la baja variabilidad del gen 16S entre especies tan próximas como las pertenecientes al género *Vibrio*.

Las secuencias de las cepas GK1.1, GK3.5, GK3.7 y GK4.2 agrupan con un gran número de secuencias diferentes, entre las que se encuentran *Vibrio harveyi* y *Vibrio campbellii*, pero con un valor de *bootstrap* demasiado bajo. Además las distancias entre todas las ramas de este subárbol también son demasiado pequeñas, dando una idea de la poca variación entre las diferentes regiones secuenciadas. La cepa GK3.8 también se presenta agrupada con un gran número de especies, entre las que figuran los patógenos de moluscos *Vibrio lentus*, *Vibrio pectenecida* y *Vibrio crassostreae*, pero con un valor de *bootstrap* del 41%. El valor de longitud de este grupo también concuerda con los bajos niveles de variabilidad en el fragmento PSL-PSR de los *Vibrio* spp. evaluados. La filogenia realizada con el fragmento PSL-PSR de los diversos conjuntos de secuencias, también falla al recuperar algunos grupos taxonómicos ya caracterizados en la literatura empleando diversas combinaciones de genes (Thompson *et al.*, 2004; Thompson *et al.*, 2005), agrupando las especies de manera incorrecta, en ocasiones con alto *bootstrap*. De esta forma, podemos comprobar como las especies *Vibrio scophthalmi* y *Vibrio pectenecida* se emplazan en las diferentes filogenias con el grupo de *Vibrio lentus*, que a su vez no presenta incluida la especie *Vibrio splendidus* (Macián *et al.*, 2001b; Thompson *et al.*, 2004; Thompson *et al.*, 2005) o se establece un grupo formado por *Vibrio ponticus* Macián *et al.*, 2004, *Vibrio nigripulchritudo*, *Vibrio penaeicida* Ishimaru *et al.*, 1995, *Vibrio fortis* Thompson *et al.*, 2003, *Vibrio agarivorans* Macián *et al.*, 2001, *Vibrio fluvialis*, *Vibrio furnissii* Brenner *et al.*, 1984 y *Vibrio halioticoli* Sawabe *et al.*, 1998 no registrado previamente en la literatura (Sawabe *et al.*, 1998; Macián *et al.*, 2001a; Thompson *et al.*, 2003b; Thompson *et al.*, 2004; Thompson *et al.*, 2005). Estas agrupaciones se pueden

considerar como artefactos y estarían motivadas por la baja variabilidad y el pequeño tamaño de la región *PSL-PSR*.

El empleo del fragmento 27F-1492R (Lane, 1991) nos permite discriminar entre las diferentes especies de una manera más clara. Las cepas GK1.1 y GK4.2 se agrupan con un alto respaldo de *bootstrap* (98%) lo cual nos sugiere que ambas cepas pertenecen a la misma especie. Esto estaría de acuerdo con los resultados de las infecciones experimentales, donde ambas cepas alcanzan un 100% de mortalidad en los dos experimentos, y con los resultados bioquímicos, idénticos para ambas especies y que muestran ambas cepas como pertenecientes a *Vibrio campbellii*. El análisis filogenético del fragmento 27F-1492R agrupa ambas cepas con *Vibrio campbellii* con un respaldo de *bootstrap* inferior al 40%, pero en cambio las agrupa con *Vibrio harveyi* con un respaldo de *bootstrap* del 97%. La cepa GK3.8, que en la segunda infección experimental no consigue matar a ninguna oreja de mar al cabo de 10 días, se agrupa con la especie *Vibrio cyclitrophicus* con un respaldo de *bootstrap* del 87%.

La especie *Vibrio harveyi* -*Vibrio carchariae* y *Vibrio trachuri* son consideradas sinónimas de *Vibrio harveyi*, con preferencia para esta última (Pedersen *et al.*, 1998; Gauger y Gómez-Chiarri, 2002)- se encuentra habitualmente en el medio marino, ya sea en sedimentos o en la columna de agua (O'Brien y Sizemore, 1979) o como patógeno de diversos animales acuáticos (Austin y Austin, 1987; Austin y Zhang, 2006) incluyendo el branquiópodo *Artemia* (Prayitno y Latchford, 1995), larvas y juveniles de los camarones *Litopenaeus* spp. y *Penaeus* spp. (Karunasagar *et al.*, 1994; Prayitno y Latchford, 1995; Álvarez *et al.*, 1998; Vandenberghe *et al.*, 1998; Aguirre-Guzmán *et al.*,

2001), del anfípodo *Talorchestia* sp. (Johnson y Shunk, 1936), larvas de la langosta *Jasus verreauxi* (Milne-Edwards, 1851) (Diggles *et al.*, 2000), de diversos peces tanto osteictios -como el corvinón ocelado *Sciaenops ocellatus* (Linnaeus, 1766) (Liu *et al.*, 2003), el dentón *Dentex dentex* Linnaeus, 1758 (Company *et al.*, 1999), el mero *Epinephelus* spp. (Saeed, 1995; Yii *et al.*, 1997), el lenguado *Solea senegalensis* Kaup, 1858 (Zorrilla *et al.*, 2003), el pez luna *Mola mola* Linnaeus, 1758 (Hispano *et al.*, 1997), la paguara *Chaetodipterus faber* (Broussonet, 1782) (Álvarez *et al.*, 1998), el caballito de mar *Hippocampus* spp. (Alcaide *et al.*, 2001), las doradas *Sparus aurata* Linnaeus, 1758 y *Acanthopagrus cuvieri* (Day, 1875) (Balebona *et al.*, 1995; Saeed, 1995; Pedersen *et al.*, 1998), la lubina *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758) (Pedersen *et al.*, 1998), la perca gigante *Lates calcarifer* (Bloch, 1790) (Tendencia, 2002), los salmónidos *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792) y *Salmo salar* Linnaeus, 1758 (Zhang y Austin, 2000)- como condriictios -*Carcharinus plumbeus* Nardo, 1827 y *Negraprion brevirostris* (Poey, 1868) (Colwell y Grimes, 1984; Grimes *et al.*, 1984)-, y moluscos como las ostras perlíferas *Pinctada maxima* (Pass *et al.*, 1987; Lester, 1990), los pulpos *Octopus bimaculoides* (Elston y Lockwood, 1983) o las orejas de mar *Haliotis tuberculata* (Nicolas *et al.*, 2002) y *Haliotis diversicolor supertexta* (Nishimori *et al.*, 1998). En ambos casos, *Vibrio harveyi* produce altas mortalidades del gasterópodo (hasta un 85%). La mortalidad se produce durante los meses de verano y se agudiza con una temperatura del agua por encima de los 20°C. Las bacterias producen unas lesiones características en el pie en forma de pústulas blancas, con una presencia más acusada en *Haliotis diversicolor* que en *Haliotis tuberculata*. En el caso de *Haliotis tuberculata* cultivada en Galicia, no se observan tales lesiones. En estas lesiones las fibras musculares se

desorganizan y se producen vacuolas. La cepa aislada de *Haliotis tuberculata* en Francia solo se diferencia de las cepas GK1.1 y GK4.2 aisladas en Galicia en la desaminación del triptófano en los aislados gallegos y en la movilidad del aislado francés. *Vibrio harveyi* también se encuentra asociado a mortalidades de *Haliotis rubra* y *Haliotis laevigata* en Australia (Handlering *et al.*, 2002). *Vibrio cyclitrophicus* es una especie degradadora de hidrocarburos aromáticos policíclicos (Hedlund y Staley, 2001) y está emparentada con las especies *Vibrio lentus* y *Vibrio tasmaniensis*. *Vibrio lentus* se encuentra asociada a la ostra plana, *Ostrea edulis*, y es patógena en pulpo, *Octopus vulgaris* (Macián *et al.*, 2001b; Farto *et al.*, 2003), mientras que *Vibrio tasmaniensis* está asociada a salmónidos, en los cuales no produce mortalidades (Thompson *et al.*, 2003a; Austin *et al.*, 2005).

En el presente trabajo, se describe por vez primera la presencia de la riquetsia *Candidatus Xenohaliotis californiensis* en oreja de mar europea, *Haliotis tuberculata*, y se extiende el rango de distribución de este patógeno a aguas europeas. Esta riquetsia se ha ligado con la enfermedad de la oreja de mar conocida como síndrome del marchitamiento (también escrito en ocasiones en inglés, *withering syndrome*). Esta enfermedad afecta a varias especies de oreja de mar: abulón negro (*Haliotis cracherodii*), abulón rojo (*Haliotis rufescens*), abulón verde (*Haliotis fulgens* Philippi, 1845) y abulón rosa (*Haliotis corrugata* Gray, 1828) (Haaker *et al.*, 1992; Van Blaricom *et al.*, 1993; Gardner *et al.*, 1995; Altstatt *et al.*, 1996; Friedman *et al.*, 2000b; Moore *et al.*, 2000b; Moore *et al.*, 2001; Álvarez-Tinajero *et al.*, 2002; Moore *et al.*, 2002b). También se ha podido observar en la costa suroeste africana riquetsias en la glándula digestiva de la especie *Haliotis midae*, posiblemente *Candidatus Xenohaliotis californiensis* (Mouton,

2000) y se ha comprobado la susceptibilidad de la especie de abulón blanco, *Haliotis sorenseni* Bartsch, 1940 (Moore *et al.*, 2003). La distribución de la enfermedad abarca las costas de los estados de California, en Estados Unidos, y de Baja California, en México (Haaker *et al.*, 1992; Steinbeck *et al.*, 1992; Davis, 1993; Cáceres-Martínez y Tinoco-Orta, 2001; Álvarez-Tinajero *et al.*, 2002; Friedman y Finley, 2003), además de la costa suroeste africana. Sin embargo, ya se sospechaba que su distribución podría ser mayor debido a las exportaciones incontroladas de animales infectados a otros países (Anónimo, 2004; O.I.E., 2006). La notificación de la presencia de esta riquetsia en oreja de mar en Europa no hace más que sugerir su distribución cosmopolita.

El término *Candidatus* que debe figurar al nombrar la bacteria alude a su descripción parcial y a su estatus taxonómico provisional, ya que este término está reservado para todos aquellos patógenos no cultivables y por tanto no convenientemente caracterizados desde el punto de vista bioquímico y serológico (Murray y Stackebrandt, 1995). El nombre correcto de una bacteria según el Código Internacional de Nomenclatura Bacteriana (Lapage *et al.*, 1992) es aquel que ha sido publicado en la revista *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, o en una de sus listas de validación en el caso de que la especie haya sido descrita en otra publicación. Debido a que la forma publicada en esta revista es la de *Candidatus Xenohaliotis californiensis* (Anónimo, 2000a; Friedman *et al.*, 2000b) en la presente tesis doctoral se adopta esta nomenclatura.

El síndrome del marchitamiento se caracteriza por un cambio en la coloración del epipodio y el pie, metaplasia y atrofia de la

glándula digestiva, reducción del tamaño de la gónada, y la disminución de la adhesión a los sustratos. El síntoma más importante, y que da su nombre a la enfermedad, es la reducción del volumen del cuerpo del animal, caracterizado por la retracción del músculo del pie (Haaker *et al.*, 1992; Lafferty y Kuris, 1993; Altstatt *et al.*, 1996; Bower, 2000; Moore *et al.*, 2001). La reabsorción del músculo del pie viene determinada por la incapacidad del animal de absorber los nutrientes necesarios al tener las células del epitelio digestivo infectadas por la riquetsia.

Los efectos combinados de la sobrepesca y el síndrome de marchitamiento han causado un descenso tan acusado de la población de abulón negro, *Haliotis cracherodii*, que la pesquería de este animal se cerró en 1993 para evitar la total desaparición del recurso (California Department of Fish and Game, 1997). Como consecuencia, la población natural de este molusco está empezando a repuntar, lo que además podría estar ayudado por la adquisición de un cierto grado de resistencia a la enfermedad en los individuos supervivientes.

Otras enfermedades de origen bacteriano de especies del género *Haliotis* Linnaeus, 1758, aunque ninguna de la importancia de *Candidatus Xenohaliotis californiensis*, tienen como causa especies del género *Vibrio*. *Vibrio campbelli* ha sido señalado como la causa de la septicemia sufrida por la especie de oreja de mar *Haliotis discus hannai* en China (Ma *et al.*, 1996). Cabe destacar que la caracterización de la bacteria causante de dicha septicemia fue mediante el *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, lo que podría indicar que la cepa involucrada era en realidad *Vibrio harveyi*, ya que la discriminación

por métodos bioquímicos entre estas dos especies es difícil (Gómez-Gil *et al.*, 2004).

Vibrio alginolyticus se asoció a mortalidades de larvas y juveniles de *Haliotis rufescens* (Anguiano-Beltrán *et al.*, 1998), asociándose en esta especie a lesiones del tejido nervioso (Elston y Lockwood, 1983). Probablemente, el *Vibrio* sp. asociado a las altas mortalidades de juveniles (cercasas al 90%) en el primer mes tras el asentamiento larvario sea debido a *Vibrio alginolyticus* (Ebert y Houk, 1984). En *Haliotis rufescens*, *Vibrio alginolyticus* produce una decoloración de los tentáculos, epipodio y pie, una pérdida de la turgencia de los tentáculos, abscesos en el pie y en casos avanzados, una sintomatología parecida al síndrome del marchitamiento, con retracción del pie (Elston y Lockwood, 1983). Estos últimos síntomas también se observan en *Haliotis diversicolor supertexta*, donde se comprobó que los productos extracelulares son letales para las orejas de mar (Liu *et al.*, 2001). Esta especie también se ha ligado a mortalidades de *Haliotis midae* (Dixon *et al.*, 1991). *Vibrio parahaemolyticus* afecta a *Haliotis diversicolor supertexta* (Lee *et al.*, 2003; Cheng *et al.*, 2004) y su mayor importancia es que esta bacteria también es patógena para el ser humano. Los productos extracelulares también son patógenos y su efecto es más negativo a temperaturas elevadas (Huang *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2001a) y a salinidades extremas (Cheng *et al.*, 2004). Se la ha vinculado al síndrome de marchitamiento en *Haliotis diversicolor supertexta* (Liu *et al.*, 2000; Huang *et al.*, 2001), aunque parece probable que la reabsorción del pie sea una sintomatología convergente. Se ha asociado la presencia de *Vibrio fluvialis* (biovar II) a la enfermedad de las pústulas en la especie *Haliotis discus hannai* en China (Li *et al.*,

1998; Guo *et al.*, 1999; Bower y McGladdery, 2003). Esta enfermedad se caracteriza por la presencia de unas pústulas blancas en el pie de los animales enfermos y se transmite a través de las lesiones que presentan las orejas de mar en el pie, pero no por baño ni alimentación. Las bacterias penetran por las lesiones, creando focos de infección que provocan desorganización de las fibras musculares y del tejido conectivo (Li *et al.*, 1997), daños similares a los observados en el caso de *Vibrio harveyi* en *Haliotis tuberculata*. Sin embargo, la infección sí se transmite por baño en el caso de *Vibrio harveyi* y no se observan pústulas. También se ha documentado la infección ligada a estrés de *Haliotis midae* por *Clostridium lituseberense* (Dixon *et al.*, 1991). Esta infección, presente junto a *Vibrio alginolyticus*, se pudo tratar con ozono y sulfadimidina. Otra bacteria causante de enfermedad en *Haliotis rubra* y *Haliotis laevigata* se ha descrito como similar a *Flavobacterium* (Handlinger *et al.*, 2002). No todos los organismos del género *Vibrio* asociados a *Haliotis* spp. son patógenos y algunos podrían ser candidatos para su empleo como prebióticos, como *Vibrio superstes* Hayashi *et al.*, 2003 en *Haliotis laevigata* y *Haliotis rubra* (Hayashi *et al.*, 2003), *Vibrio neonatus* Sawabe *et al.*, 2004 y *Vibrio halioticoli* en *Haliotis discus* (Sawabe *et al.*, 1998; Sawabe *et al.*, 2004a), *Vibrio ezuræ* en *Haliotis discus* y *Haliotis diversicolor* (Sawabe *et al.*, 2004a) o *Vibrio gallicus* Sawabe *et al.*, 2004 en *Haliotis tuberculata* (Sawabe *et al.*, 2004b). Estas bacterias son alginolíticas, y establecen una simbiosis con las orejas de mar al facilitar la digestión de las algas.

Además de los patógenos considerados, se ha encontrado una nueva especie de haplosporidio ligada a las mortalidades. Los parásitos protozoos pertenecientes al phylum Haplosporidia se

pueden encontrar parasitando a numerosos invertebrados marinos a lo largo del mundo siendo la causa de importantes pérdidas económicas en la acuicultura, principalmente de moluscos bivalvos (Perkins, 1990; Hallett *et al.*, 2001; Hine y Thorne, 2002; Bower y McGladdery, 2003; Burreson y Ford, 2004; Cranfield *et al.*, 2005).

El phylum Haplosporidia está compuesto por los géneros *Haplosporidium*, *Minchinia*, *Urosporidium* y *Bonamia*. Los diferentes géneros se definen utilizando las diferencias morfológicas de las esporas y la presencia y origen de la ornamentación en las paredes de las esporas. El género *Urosporidium* no tiene un opérculo con charnela derivado de la pared de la espora cubriendo el orificio anterior (Caullery y Mesnil, 1905). Los géneros *Haplosporidium* y *Minchinia* sí tienen un opérculo con charnela en ambos casos, pero se diferencian en el origen y tipos de ornamentación de la espora. Aunque la literatura sea un poco confusa al respecto, Sprague distingue entre *Minchinia* y *Haplosporidium* en base a la morfología del opérculo (Sprague, 1963). Un criterio alternativo empleado es que la ornamentación de *Minchinia* es visible con un microscopio óptico y la de *Haplosporidium* en cambio no lo es (Perkins, 1988; 2000). Pero la mayoría de los autores aceptaban hasta hace poco que el género *Haplosporidium* presenta ornamentaciones derivadas de la pared de la espora y que permanecen estables al madurar la espora. En cambio las ornamentaciones en el género *Minchinia* están originadas en el exoesporoplasma, desapareciendo tras la maduración de la espora (Ormières, 1980; Azevedo, 1984; McGovern y Burreson, 1990; Azevedo *et al.*, 1999; Azevedo, 2001; Burreson, 2001; Hine y Thorne, 2002; Azevedo *et al.*, 2003). Las ornamentaciones presentes en las esporas podrían favorecer la flotabilidad de las mismas y ayudar en

la dispersión entre hospedadores (Barber y Ford, 1992). Recientemente ha sido corroborada la adscripción del género *Bonamia* al phylum Haplosporidia con el descubrimiento de la esporulación en la especie *Bonamia perspora* (Carnegie *et al.*, 2006), en la cual la ornamentación de las esporas se origina en la pared. De esta forma, los géneros que presentan las ornamentaciones derivadas de la pared son parafiléticos, dejando la clasificación del phylum pendiente de revisión (Burrenson y Reece, 2006).

Esta posición ya había sido previamente sugerida tanto por los análisis de las secuencias del gen *18S* (Carnegie *et al.*, 2000; Cochenec *et al.*, 2000; Cochenec-Laureau *et al.*, 2003a) como por la presencia de haplosporosomas en las células de *Bonamia ostreae* y *Bonamia exitiosa* (Pichot *et al.*, 1980; Hine *et al.*, 2001). Otros presuntos haplosporidios parásitos de invertebrados han sido también caracterizados por biología molecular al no haber sido observada la esporulación en ningún caso (Reece *et al.*, 2000; Reece y Stokes, 2003; Novoa *et al.*, 2004; Reece *et al.*, 2004).

La morfología de la espora del haplosporidio descrito en la presente tesis doctoral muestra diferencias importantes con los haplosporidios previamente descritos. Las esporas maduras de *Haplosporidium montforti* tienen cuatro filamentos derivados de la pared de la espora, lo que indica que la especie pertenece al género *Haplosporidium* (Ormières, 1980; McGovern y Burrenson, 1990; Azevedo *et al.*, 1999; Azevedo, 2001; Burrenson, 2001; Azevedo *et al.*, 2003). Aunque la morfología interna del endoesporoplasma muestra una organización similar a otras especies del género *Haplosporidium*, los estudios comparativos muestran que ninguna otra *Haplosporidium*

spp. presenta cuatro filamentos anclados a la pared en dos pares, uno en el extremo basal y otro en el extremo apical. Además, la secuencia completa del gen *18S* nos permite corroborar estas hipótesis, ya que las distancias génicas, según el modelo de dos parámetros de Kimura, entre el nuevo haplosporidio y las dos especies más próximas, *Haplosporidium lusitanicum* (Azevedo, 1984) y *Haplosporidium pickfordi* (Barrow, 1961) son de 8.1 y 11.2%, mientras que la distancias mínimas entre dos especies aceptadas como diferentes en este análisis concreto es de 1.9% entre *Bonamia ostreae* y *Bonamia exitiosa*. Tanto los datos epizootiológicos como la distribución del parásito y el hospedador apoyan la conclusión de que este parásito es de hecho una nueva especie y se describe como *Haplosporidium montforti* Azevedo, Balseiro, Casal, Gestal, Aranguren, Stokes, Carnegie, Novoa, Burreson *et* Figueras.

El análisis filogenético de las especies del phylum Haplosporidia descubre que las especies más próximas a *Haplosporidium montforti* son de hecho patógenos de moluscos gasterópodos. *Haplosporidium lusitanicum* parasita a la lapa *Patella pellucida* y *Haplosporidium pickfordi* a los gasterópodos pulmonados *Physa parkeri*, *Lymnaea emarginata* y *Planorbella (Helisoma) campanulata*. Esta rama del árbol está apoyada por un valor de *bootstrap* del 100%. La morfología de la espora es congruente con estos resultados. Los filamentos del extremo basal de *Haplosporidium montforti* son muy similares a los de *Haplosporidium lusitanicum* y el opérculo de esta espora es también muy grande en relación al tamaño de la espora. La espora de *Haplosporidium pickfordi* también tiene filamentos originados en el extremo basal de la espora. El presunto haplosporidio de *Haliotis iris* de Nueva Zelanda se encuentra alejado

filogenéticamente. Además de la secuencia, se han probado los cebadores específicos para esta especie y no se consiguió amplificar ningún fragmento, lo que apoya este hecho. Este presunto haplosporidio está más relacionado con otras especies cuyas esporas permanecen desconocidas (Reece y Stokes, 2003; Reece *et al.*, 2004).

La monofilia del género *Haplosporidium*, con los análisis que tenemos a nuestra disposición, está apoyada por los resultados si excluimos *Haplosporidium louisiana* y *Haplosporidium nelsoni* de los mismos, como ha sido sugerido previamente (Flores *et al.*, 1996; Reece *et al.*, 2004). La ultraestructura y secuencia del gen *18S* de *Haplosporidium scolopli*, la especie tipo del género *Haplosporidium*, no se conoce hasta la fecha. La caracterización completa de esta y otras especies poco estudiadas podría ayudar a resolver la presente parafilia del género *Haplosporidium* (Burreson y Ford, 2004). La monofilia de los géneros *Minchinia*, *Urosporidium* y *Bonamia*, sin embargo, sí se ve apoyada en el presente análisis.

Hasta la fecha el único haplosporidio encontrado en un gasterópodo del género *Haliotis* se encontró en Nueva Zelanda parasitando la oreja de mar nativa *Haliotis iris* y causando importantes mortalidades en cultivo (Diggles *et al.*, 2002; Hine *et al.*, 2002b; Reece y Stokes, 2003). Las orejas de mar infectadas muestran debilidad en la adhesión al sustrato, lesiones pálidas en el pie e incapacidad para girarse dorsoventralmente al ser colocadas sobre sus conchas (Diggles *et al.*, 2002; Hine *et al.*, 2002b). En nuestro caso, los síntomas externos son coloración oscura del pie, disminución en la capacidad de adhesión al sustrato y descenso de la irritabilidad del animal. En este caso se puede comprobar que los síntomas externos

son concurrentes entre diferentes enfermedades y pueden estar asociados a varios patógenos distintos. Incluso el marchitamiento del pie es causado por diferentes trastornos en otras especies del género *Haliotis* (Elston, 1990; Nakatsugawa *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 2000; Huang *et al.*, 2001; Chang *et al.*, 2005). Por tanto la sintomatología externa no puede ser empleada como mecanismo de diagnosis en la oreja de mar europea.

La mayor prevalencia e intensidad de la infección en el caso de *Haplosporidium montforti* respecto a *Candidatus Xenohaliotis californiensis* y la patología observada en la haplosporidiosis, infiltraciones hemocitarias y sustitución casi total de los tejidos por los plasmodios con pérdida de la arquitectura anatómica normal, sugiere que *Haplosporidium montforti* es la causa principal de las mortalidades en *Haliotis tuberculata* cultivada experimentalmente en Galicia. No se puede obviar el posible papel patogénico de la riqueta *Candidatus Xenohaliotis californiensis*, pero es posible que el largo periodo de incubación de este organismo, que ha sido documentado en alrededor de ocho meses tanto en *Haliotis rufescens* como en *Haliotis cracherodii* (Friedman *et al.*, 1997; Friedman *et al.*, 2002), y que probablemente es mayor en *Haliotis tuberculata*, sea la causa del bajo desarrollo y patogenicidad de esta riqueta en *Haliotis tuberculata*. Otra hipótesis alternativa es que la riqueta no sea muy patogénica al ser detectada fuera de su región original, como ya ha sido propuesto (Anónimo, 2004).

La débil adhesión al sustrato como consecuencia de la desorganización de las fibras musculares del pie podría favorecer el debilitamiento generalizado del animal, puesto que los animales

tienen más dificultades para alimentarse correctamente y en el caso de las poblaciones naturales, las orejas de mar infectadas podrían ser objeto de los depredadores de una manera más simple al poder separarse más fácilmente.

El síndrome del marchitamiento puede ocurrir durante todo el año, pero las pérdidas más importantes acontecen en el verano y el otoño. La elevada temperatura del agua, superando los 18°C, no es la causa directa de la enfermedad, pero acelera su desarrollo y la mortalidad de las orejas de mar infectadas (Lafferty y Kuris, 1993; Friedman *et al.*, 1997; Moore *et al.*, 2000a; Raimondi *et al.*, 2002). En el lugar de cultivo, la Ría de Arousa, no hay grandes fluctuaciones en la temperatura de la capa de agua superficial, que en pocas ocasiones supera los 17°C (Anónimo, 1993b; Pazos *et al.*, 1997). Estas temperaturas del agua pueden ser la causa de que no hubiera un gran desarrollo en la infección por *Candidatus Xenohalictis californiensis*. Sin embargo, la prevalencia de *Haplosporidium montforti* se incrementa en los meses más cálidos.

Aunque ambos parásitos fueron detectados por PCR en los juveniles importados de Francia e Irlanda, no se han registrado mortalidades de este molusco en el semillero, probablemente debido a las menores temperaturas de las aguas en estos países. En el caso de las orejas de mar adultas obtenidas de bancos naturales en verano, no se observaron patógenos por histología, aunque sí se detectó por PCR el *Candidatus Xenohalictis californiensis*, lo que podría indicar una infección latente. Aunque el parásito *Haplosporidium montforti* no haya sido detectado, el pequeño número de muestras analizadas nos

impide concluir que el parásito no está presente en la población natural.

El análisis histológico está reconocido por la O.I.E. como el método oficial de diagnóstico para la detección de *Candidatus Xenohaliotis californiensis* (O.I.E., 2006). Sin embargo, en nuestro caso, la histología no fue capaz de detectar este patógeno en juveniles procedentes de Irlanda y Francia ni con adultos de Galicia, tal y como fue descrito previamente en otros organismos (O'Neill *et al.*, 1998).

Este hecho ilustra la necesidad de emplear los métodos de diagnóstico más sensibles de los que se disponga en el caso de detección de patógenos de la lista de la O.I.E., y la obligación de desarrollar métodos de diagnóstico cada vez más sensibles para la detección de las enfermedades de los animales acuáticos. Pero no se debe abandonar un método útil como es la histología, ya que permite evaluar el estado de salud de un molusco, así como la presencia de patógenos que aunque no sean de declaración obligatoria pueden causar problemas a la industria acuícola.

CONCLUSIONES FINALES

Conclusiones finales

1. La citología es poco sensible y es útil para el seguimiento de algunas enfermedades de moluscos, debido a la ventaja de su bajo coste, pero no debe ser empleada en diagnósticos oficiales.
2. El diagnóstico por RFTM de *Perkinsus olseni* es poco repetitivo y sobreestima la infección. Es adecuado para seguimiento de lotes de moluscos en los que está diagnosticada la enfermedad para seguir su evolución, debido a la ventaja de su bajo coste.
3. La histología es la técnica que presenta una mayor especificidad para el diagnóstico de *Bonamia ostreae* y *Perkinsus olseni*. Es más útil en análisis confirmatorios. La detección por histología de *Marteilia refringens* es una técnica sensible, favorecida por la morfología y desarrollo del parásito.
4. La técnica por PCR es más sensible y presenta un menor número de falsos negativos en la detección de *Bonamia ostreae* y *Perkinsus olseni* que los métodos oficiales de diagnóstico empleados por UE y OIE. La diagnosis de *Marteilia refringens* por PCR con los cebadores 2S y 3AS es menos sensible que las técnicas oficiales de diagnóstico. Además, la técnica por PCR permite detectar infecciones en sus primeros estadios y es aplicable a variables relacionadas con la actividad acuícola, donde la histología y la citología no son aplicables.
5. La técnica de PCR es más rápida y barata que la histología, no requiriendo de personal altamente cualificado y siendo su capacidad de respuesta razonablemente rápida en la evaluación de transacciones comerciales. En general, la técnica

- por PCR es apropiada para el control de lotes grandes de moluscos permitiendo la detección de un mayor número de moluscos infectados.
6. Toda introducción de moluscos en una región debe estar acompañada de un periodo de cuarentena al final del cual se debe repetir el análisis debido a que ninguna técnica tiene un valor predictivo negativo del 100%.
 7. La enorme variedad de tipos génicos del género *Bonamia* sugiere una alta tasa de evolución en este género o una temprana divergencia. La agrupación de especies de *Bonamia* parásitas de *Ostrea chilensis* y *Crassostrea ariakensis*, oriundas del Océano Pacífico sugiere la existencia de un grupo “Pacífico” del parásito, más relacionado entre sí.
 8. El *Perkinsus* sp. parásito de la almeja *Pitar rostrata* en Uruguay es *Perkinsus olseni*. La técnica de RFLP con *Bsg I* permite diferenciar la cepa que infecta *Pitar rostrata* de otros *Perkinsus olseni* de diversos lugares del mundo. La baja divergencia en la región ITS entre las diferentes especies del género *Perkinsus* sugiere una reciente especiación.
 9. Los análisis filogenéticos muestran que las *Marteilia* spp. que infectan a *Ostrea edulis* y *Mytilus* spp. en Europa son en realidad la misma especie, *Marteilia refringens*. El comercio de *Mytilus* spp. en acuicultura debe ser regulado de la misma manera que el de *Ostrea edulis* respecto a la existencia de zonas libres y no libres de *Marteilia refringens*.
 10. Algunos de los problemas patológicos asociados a juveniles de oreja de mar *Haliotis tuberculata* cultivada experimentalmente en Galicia son debidos a una bacteria

perteneciente al grupo *Vibrio harveyi*- *Vibrio campbelli*. Esta bacteria es capaz de reproducir las mortalidades registradas en infecciones realizadas por baño.

11. El rango de distribución geográfica y el espectro de especies susceptibles a *Candidatus Xenohaliotis californiensis* incluye el Atlántico Nororiental (Irlanda, Francia y Galicia) y la especie *Haliotis tuberculata*.
12. Las orejas de mar que mostraban un episodio de mortalidad en los meses de mayo y junio del 2004 presentaban diversos estadios de desarrollo y una reacción asociada a un haplosporidio descrito bajo el nombre de *Haplosporidium montforti* n. sp.

**PUBLICACIONES DERIVADAS DE LA
PRESENTE TESIS DOCTORAL**

Publicaciones derivadas de la presente tesis doctoral

Trabajos publicados en revistas del SCI (*Science Citation Index, Índice de Citas Científicas*)

NOVOA B, BALSEIRO P & FIGUERAS A (2004) Molecular detection of a haplosporidian parasite in carpet shell clam *Ruditapes decussatus* from Spain. *Dis. Aquat. Org.* 61 89-93.

CREMONTE F, BALSEIRO P & FIGUERAS A (2005) Occurrence of *Perkinsus olseni* (Protozoa: Apicomplexa) and other parasites in the venerid commercial clam *Pitar rostrata* from Uruguay, southwestern Atlantic coast. *Dis. Aquat. Org.* 64 (1): 85-90.

AZEVEDO C, BALSEIRO P, CASAL G, GESTAL C, ARANGUREN R, STOKES NA, CARNEGIE RB, NOVOA B, BURRESON EM & FIGUERAS A (2006) Ultrastructural and molecular characterization of *Haplosporidium montforti* n. sp., parasite of the European abalone *Haliotis tuberculata*. *J. Invertebr. Pathol.* 92 (1): 23-32.

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

BALSEIRO P, CONCHAS RF, MONTES J, GOMEZ-LEÓN J, NOVOA B & FIGUERAS A (2006b) Comparison of diagnosis techniques for the protozoan parasite *Bonamia ostreae* in flat oyster *Ostrea edulis*. *Aquaculture* 261 (4): 1135-1143.

BALSEIRO P, MONTES A, CESCHIA G, GESTAL C, NOVOA B & FIGUERAS A (2007) Molecular epizootiology of the European *Marteilia* spp., infecting mussels (*Mytilus galloprovincialis* and *M. edulis*) and oysters (*Ostrea edulis*): an update. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.* 27 (4): 147-154.

Capítulos de libros

NOVOA B, FERNÁNDEZ ROBLEDO JA, PERNAS M, BALSEIRO P, FIGUERAS A (2007) Diagnóstico de enfermedades de mejillón: *Marteilia refringens*. En: Figueras A (Ed.) *Biología y cultivo del mejillón (Mytilus galloprovincialis) en Galicia*. Biblioteca de Ciencias. Consejo Superior de Investigaciones Científicas (Madrid), págs. 167-193.

BIBLIOGRAFÍA

Bibliografía

ABOLLO E, CASAS SM, CESCIA G & VILLALBA A (2006) Differential diagnosis of *Perkinsus* species by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism assay. *Mol. Cell. Probes* 20 (6): 323-329.

ADLARD RD & ERNST I (1995) Extended range of the oyster pathogen *Marteilia sydneyi*. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.* 15 (4): 119-121.

AFGHANI B & STUTMAN HR (1996) Polymerase chain reaction for diagnosis of *M. tuberculosis*: comparison of simple boiling and a conventional method for DNA extraction. *Biochem. Mol. Med.* 57 (1): 14-18.

AGUIRRE-GUZMÁN G, VÁZQUEZ-JUÁREZ R & ASCENCIO F (2001) Differences in the susceptibility of American white shrimp larval substages (*Litopenaeus vannamei*) to four *Vibrio* species. *J. Invertebr. Pathol.* 78 (4): 215-219.

ALCAIDE E, GIL-SANZ C, SANJUÁN E, ESTEVE D, AMARO C & SILVEIRA L (2001) *Vibrio harveyi* causes disease in seahorse, *Hippocampus* sp. *J. Fish Dis.* 24 (5): 311-313.

ALDERMAN DJ (1996) Geographical spread of bacterial and fungal diseases of crustaceans. *Rev. Sci. Tech.* 15 (2): 603-632.

ALMEIDA M, BERTHE FCJ, THEBAULT A & DINIS MT (1999) Whole clam culture as a quantitative diagnostic procedure of *Perkinsus atlanticus* (Apicomplexa, Perkinsea) in clams *Ruditapes decussatus*. *Aquaculture* 177 (1-4): 325-332.

ALTSCHUL SF, GISH W, MILLER W, MYERS EW & LIPMAN DJ (1990) Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215 (3): 403-410.

ALTSTATT JM, AMBROSE RF, ENGLE JM, HAAKER PL, LAFFERTY KD & RAIMONDI PT (1996) Recent declines of black abalone *Haliotis cracherodii* on the mainland coast of central California. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 142 (1-3): 185-192.

ÁLVAREZ-TINAJERO MC, CÁCERES-MARTÍNEZ J & AVILÉS JGG (2002) Histopathological evaluation of the yellow abalone *Haliotis corrugata* and the blue abalone *Haliotis fulgens* from Baja California, Mexico. *J. Shellfish Res.* 21 (2): 825-830.

ÁLVAREZ JD, AUSTIN B, ÁLVAREZ AM & REYES H (1998) *Vibrio harveyi*: a pathogen of penaeid shrimps and fish in Venezuela. *J. Fish Dis.* 21 (4): 313-316.

ANDERSON TJ & LESTER RJ (1992) Sporulation of *Marteilioides branchialis* n. sp. (Paramyxia) in the Sydney rock oyster, *Saccostrea commercialis*: an electron microscope study. *J. Protozool.* 39 (4): 502-508.

ANDERSON TJ & ADLARD RD (1994) Nucleotide sequence of a rDNA internal transcribed spacer supports synonymy of *Saccostrea commercialis* and *S. glomerata*. *J. Molluscan Stud.* 60 (2): 196-197.

ANDERSON TJ, WESCHE S & LESTER RJG (1994) Are outbreaks of *Marteilia sydneyi* in Sydney rock oysters, *Saccostrea commercialis*, triggered by a drop in environmental pH? *Aust. J. Mar. Freshw. Res.* 45 (7): 1285-1287.

ANDERSON TJ, HINE PM & LESTER RJG (1995) A *Steinhausia*-like infection in the ovocytes of Sydney rock oysters *Saccostrea commercialis*. *Dis. Aquat. Org.* 22 (2): 143-146.

ANDREE KB, FRIEDMAN CS, MOORE JD & HEDRICK RP (2000) A polymerase chain reaction assay for the detection of genomic DNA of a Rickettsiales-like prokaryote associated with withering syndrome in California abalone. *J. Shellfish Res.* 19 (1): 213-218.

ANDREWS JD & HEWATT WG (1957) Oyster Mortality Studies in Virginia. II. The Fungus Disease caused by *Dermocystidium marinum* in oysters of Chesapeake Bay. *Ecol. Monogr.* 27 (1): 1-25.

ANDREWS JD & FRIEDMAN M (1974) Epizootiology of *Minchinia nelsoni* in susceptible wild oysters in Virginia, 1959 to 1971. *J. Invertebr. Pathol.* 24 (2): 127-140.

ANGUIANO-BELTRÁN C, SEARCY-BERNAL R & LIZÁRRAGA-PARTIDA ML (1998) Pathogenic effects of *Vibrio alginolyticus* on

larvae and postlarvae of the red abalone *Haliotis rufescens*. *Dis. Aquat. Org.* 33 (2): 119-122.

ANÓNIMO (1993a) On the trail of MSX. *Va. Mar. Res. Bull.* 26 (2-3): 15-17.

ANÓNIMO (1993b) Informe Anual Ría de Arousa. Centro de Control da Calidade do Medio Mariño, Xunta de Galicia. Condicións Oceanográficas e Fitoplancton., Vilaxoán (España).

ANÓNIMO (1994) Catalogue analytique. 3^a Ed. Marcy-l'Étoile (Francia), 443 págs.

ANÓNIMO (1996) *Crassostrea gigas* under scrutiny: Previous VIMS tests with the Pacific oyster. *Va. Mar. Res. Bull.* 28 (2-3): 14-15.

ANÓNIMO (2000a) Notification that new names and new combinations have appeared in volume 50, part 2, of the IJSEM. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50 (3): 951-953.

ANÓNIMO (2000b) Observatorio medioambiental de la Ría de Vigo. Informe 1998-99. Fundacion Provigo. Vigo (España), 51 págs.

ANÓNIMO (2001) Observatorio medioambiental de la Ría de Vigo. Informe 2000. Fundacion Provigo. Vigo (España), 40 págs.

ANÓNIMO (2003) Observatorio medioambiental de la Ría de Vigo. Informe 2002. Fundacion Provigo. Vigo (España), 39 págs.

ANÓNIMO (2004) Infection with *Candidatus Xenohaliotis californiensis* in Iceland. *Dis. Inf.* 17 (25): 160.

ANÓNIMO (2005) Non-native oyster research. Spring 2005 Quarterly Review Report. National Oceanic & Atmospheric Administration (N.O.A.A.). Annapolis (E.E.U.U.), 9 págs.

ANÓNIMO (2006) Directiva 2006/88/CE del consejo de 24 de octubre de 2006 relativa a los requisitos zoonosanitarios de los animales y de los productos de la acuicultura, y a la prevención y el control de determinadas enfermedades de los animales acuáticos. *Off. J. Eur. Communities L*: 1-43

ANÓNIMO (2007) Immediate notification report. Ref: 6368. O.I.E. Accesible en: http://www.oie.int/wahid-prod/reports/en_imm_0000006368_20071019_170403.pdf.

ARZUL I, NICOLAS J, DAVISON AJ & RENAULT T (2001a) French Scallops: A New Host for Ostreid Herpesvirus-1. *Virology* 290 (2): 342-349.

ARZUL I, RENAULT T, LIPART C & DAVISON AJ (2001b) Evidence for interspecies transmission of oyster herpesvirus in marine bivalves. *J. Gen. Virol.* 82 (4): 865-870.

ARZUL I, CHOLLET B, GARCIA C, ROBERT M, JOLY JP, MIOSSEC L & BERTHE FCJ (2005a) *Ostrea concaphila*. A natural host of *Bonamia ostreae*? *J. Shellfish Res.* 24 (2): 638-639.

ARZUL I, JOLY JP, ROBERT M, CHOLLET B, GARCIA C, MIOSSEC L, COCHENNEC N, CARRASCO N, CAMPALANS J, CAMPALANS M & BERTHE FCJ (2005b) Microcells in flat oysters, *Ostrea chilensis* from Chiloe Island, Chile: A new *Bonamia* species? *J. Shellfish Res.* 24 (2): 639.

AUDEMARD C, REECE KS & BURRESON EM (2004) Real-time PCR for detection and quantification of the protistan parasite *Perkinsus marinus* in environmental waters. *Appl. Environ. Microbiol.* 70 (11): 6611-6618.

AUDEMARD C, BARNAUD A, COLLINS CM, LE ROUX F, SAURIAU P, COUSTAU C, BLACHIER P & BERTHE FCJ (2001) Claire ponds as an experimental model for *Marteilia refringens* life-cycle studies: new perspectives. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 257 (1): 87-108.

AUDEMARD C, LE RF, BARNAUD A, COLLINS C, SAUTOUR B, SAURIA PG, DE MX, COUSTAU C, COMBES C & BERTHE FCJ (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 & PODER M (1985) Recherches sur *Marteilia maurini*, parasite de *Mytilus edulis* sur les côtes de Bretagne nord. *Rev. Trav. Inst. Pêch. Marit.* 47 (1-2): 105-109.

AUFFRET M & PODER M (1987) Pathology of the main bivalve mollusc species from the oyster rearing areas in Brittany (France). *Aquaculture* 67 (1-2): 255-257.

AUSTIN B & AUSTIN DA (1987) Bacterial fish pathogens: Disease in farmed and wild fish. 1^a Ed. Ellis Horwood., Chichester (Reino Unido), 457 págs.

AUSTIN B & ZHANG XH (2006) *Vibrio harveyi*: a significant pathogen of marine vertebrates and invertebrates. *Lett. Appl. Microbiol.* 43 (2): 119-124.

AUSTIN B, AUSTIN D, SUTHERLAND R, THOMPSON F & SWINGS J (2005) Pathogenicity of vibrios to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) and *Artemia nauplii*. *Environ. Microbiol.* 7 (9): 1488-1495.

AVANT P (2005) *Haliotis tuberculata*. Green ormer. Marine Life Information Network: Biology and sensitivity key information sub-programme. Marine Biological Association of the United Kingdom. Plymouth (Reino Unido). Accesible en: <http://www.marlin.ac.uk/species/Haliotistuberculata.htm>.

AZEVEDO C (1984) Ultrastructure of the spore of *Haplosporidium lusitanicum* sp. n. (Haplosporida, Haplosporidiidae), parasite of a marine mollusc. *J. Parasitol.* 70 (3): 358-371.

AZEVEDO C (1989a) Ultrastructural observations of *Cryptosporidium* sp. parasite of *Ruditapes decussatus* (Mollusca, Bivalvia). *J. Invertebr. Pathol.* 54 (1): 23.

AZEVEDO C (1989b) Fine structure of *Perkinsus atlanticus* n. sp. (Apicomplexa, Perkinsea) parasite of the clam *Ruditapes decussatus* from Portugal. *J. Parasitol.* 75 (4): 627-635.

AZEVEDO C (1993) Occurrence of an unusual branchial mycoplasma-like infection in cockle *Cerastoderma edule* (Mollusca, Bivalvia). *Dis. Aquat. Org.* 16 (1): 55-59.

AZEVEDO C (2001) Ultrastructural description of the spore maturation stages of the clam parasite *Minchinia tapetis* (Vilela, 1951) (Haplosporida: Haplosporidiidae). *Syst. Parasitol.* 49 (3): 189-194.

AZEVEDO C & VILLALBA A (1991) Extracellular giant rickettsiae associated with bacteria in the gill of *Crassostrea gigas* (Mollusca, Bivalvia). *J. Invertebr. Pathol.* 58 (1): 75-81.

AZEVEDO C & PADOVAN I (2004) *Nematopsis gigas* n. sp. (Apicomplexa), a parasite of *Nerita ascencionis* (Gastropoda, Neritidae) from Brazil. *J. Eukaryot. Microbiol.* 51 (2): 214-219.

AZEVEDO C, MONTES J & CORRAL L (1999) A revised description of *Haplosporidium armoricanum*, parasite of *Ostrea edulis* L. from Galicia, northwestern Spain, with special reference to the spore-wall filaments. *Parasitol. Res.* 85 (12): 977-983.

AZEVEDO C, CONCHAS RF & MONTES J (2003) Description of *Haplosporidium edule* n. sp. (Phylum Haplosporidia), a parasite of *Cerastoderma edule* (Mollusca, Bivalvia) with complex spore ornamentation. *Eur. J. Protistol.* 39 (2): 161-167.

BACHÈRE E & GRIZEL H (1985) Réceptivité de trois populations naturelles d'huîtres plates *Ostrea edulis* L. au protozoaire *Bonamia ostreae* (Pichot et al., 1980). *Rev. Trav. Inst. Pêch. Marit.* 47 (3-4): 237-240.

BACHÈRE E, DURAND JL & TIGÉ G (1982) *Bonamia ostreae* (Pichot et coll., 1979) parasite de l'huître plate: Comparaison de deux méthodes de diagnostic. Conseil International pour l'Exploration de la Mer. C.M.1982/ F:28. Copenhague (Dinamarca).

BACHÈRE E, CHAGOT D, TIGÉ G & GRIZEL H (1987) Study of a haplosporidian (Asctospora), parasitizing the Australian flat oyster *Ostrea angasi*. *Aquaculture* 67 (1-2): 266-268.

BALDWIN BG, SANDERSON MJ, PORTER JM, WOJCIECHOWSKI MF, CAMPBELL CS & DONOGHUE MJ (1995) The ITS region of nuclear ribosomal DNA: a valuable source of evidence on angiosperm phylogeny. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 82 (2): 247-277.

BALEBONA MC, MORINIGO MA, FARIS A, KROVACEK K, MANSSON I, BORDAS MA & BORREGO JJ (1995) Influence of salinity and pH on the adhesion of pathogenic *Vibrio* strains to *Sparus aurata* skin mucus. *Aquaculture* 132 (1-2): 113-120.

- BALON EK (1995) Origin and domestication of the wild carp, *Cyprinus carpio*: From Roman gourmets to the swimming flowers. *Aquaculture* 129 (1-4): 3-48.
- BALOUET G & PODER M (1983) *Bonamia*: A threat to oyster stocks. En: 14th Annual Shellfish Conference, 17-18 de Mayo de 1983, Londres (Reino Unido).
- BALL SJ (1981) Spore structure of *Minchinia chitonis*. *Mar. Fish. Rev.* 43 (10): 5-8.
- BALL SJ & NEVILLE JE (1979) *Minchinia chitonis* (Lankester, 1885) Labbe, 1896, a haplosporidian parasite of the chiton, *Lepidochitona cinereus*. *J. Molluscan Stud.* 45 (3): 340-344.
- BARBER RD & FORD SE (1992) Occurrence and significance of ingested haplosporidian spores in the eastern oyster, *Crassostrea virginica* (Gmelin, 1791). *J. Shellfish Res.* 11 (2): 371-375.
- BARROW JHJ (1961) Observations of a haplosporidian, *Haplosporidium pickfordi* sp. nov. in freshwater snails. *Trans. Am. Microsc. Soc.* 80 (3): 319-329.
- BARTHE D, RONDELAUD D, FAUCHER Y & VAGO C (1984) Infection virale chez le mollusque pulmone *Lymnaea truncatula* Mueller. *C. R. Hebd. Séances Acad. Sci.* 298 (17): 513-514.
- BARTLEY DM & SUBASINGHE RP (1996) Historical aspects of international movement of living aquatic species. *Rev. Sci. Tech.* 15 (2): 387-400.
- BAUD JP, GÉRARD A & NACIRI-GRAVEN Y (1997) Comparative growth and mortality of *Bonamia ostreae*-resistant and wild flat oysters, *Ostrea edulis*, in an intensive system. 1. First year of experiment. *Mar. Biol.* 130 (1): 71-79.
- BAXTER JM, HODGSON AN & STURROCK MG (1989) Variation in infestation rates of *Lepidochitona cinereus* (Polyplacophora) by *Minchinia chitonis* (Sporozoa) in twelve populations in Scotland and Northern Ireland. *Mar. Biol.* 102 (1): 107-117.

BEARHAM D, SPIERS Z, RAIDAL S, JONES JB & NICHOLLS PK (2007) Molecular characterisation of a haplosporidian parasite infecting rock oysters *Saccostrea cucullata* in north Western Australia. *J. Invertebr. Pathol.* 95 (1): 33-40.

BECKER CD & PAULEY GB (1968) An ovarian parasite (Protista Incertae Sedis) from the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *J. Invertebr. Pathol.* 12 (3): 425.

BENSON DA, KARSCH-MIZRACHI I, LIPMAN DJ, OSTELL J & WHEELER DL (2006) GenBank. *Nucleic Acids Res.* 34 (Database issue): D16-20.

BERTHE FCJ & BOUDRY P (1999) Pister les huîtres et leurs pathogènes. *Biofutur* 195 (1): 38-42.

BERTHE FCJ & HINE PM (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. *Dis. Aquat. Org.* 57 (1-2): 181.

BERTHE FCJ, LE ROUX F, PEYRETAILLADE E, PEYRET P, RODRÍGUEZ D, GOUY M & VIVARES CP (2000) Phylogenetic analysis of the small subunit ribosomal RNA of *Marteilia refringens* validates the existence of phylum Paramyxia (Desportes and Perkins, 1990). *J. Eukaryot. Microbiol.* 47 (3): 288-293.

BISHOP MJ, CARNEGIE RB, STOKES NA, PETERSON CH & BURRESON EM (2006) Complications of a non-native oyster introduction: facilitation of a local parasite. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 325 (1): 145-152.

BLACKBOURN J, BOWER SM & MEYER GR (1998) *Perkinsus qugwadi* sp.nov. (incertae sedis), a pathogenic protozoan parasite of Japanese scallops, *Patinopecten yessoensis*, cultured in British Columbia, Canada. *Can. J. Zool.* 76 (5): 942-953.

BLANCHET H, RAYMOND N, DE MONTAUDOUIN X, CAPDEPUY M & BACHELET G (2003) Effects of digenean trematodes and heterotrophic bacteria on mortality and burying capability of the common cockle *Cerastoderma edule* (L.). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 293 (1): 89-105.

BOETTCHER KJ, GEAGHAN KK, MALOY AP & BARBER BJ (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 (4): 1531-1537.

BONAMI JR, VIVARES CP & BREHÉLIN M (1985) Etude d'une nouvelle haplosporidie parasite de l'huitre plate *Ostrea edulis* L.: morphologie et cytologie de différents stades. *Protistologica* 21 (2): 161-173.

BORREGO JJ, CASTRO D, LUQUE A, PAILLARD C, MAES P, GARCIA MT & VENTOSA A (1996) *Vibrio tapetis* sp. nov., the causative agent of the brown ring disease affecting cultured clams. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46 (2): 480-484.

BOTES L, SYM SD & PITCHER GC (2003) *Karenia cristata* sp. nov. and *Karenia bicuneiformis* sp. nov. (Gymnodiniales, Dinophyceae): Two new *Karenia* species from the South African coast. *Phycologia* 42 (6): 563-571.

BOUGRIER S, TIGE G, BACHERE E & GRIZEL H (1986) *Ostrea angasi* acclimatization to French coasts. *Aquaculture* 58 (1-2): 151-154.

BOWER SM (1987a) The life cycle and ultrastructure of a new species of thraustochytrid (Protozoa: Labyrinthomorpha) pathogenic to small abalone. *Aquaculture* 67 (1-2): 269-270.

BOWER SM (1987b) *Labyrinthuloides haliotidis* n. sp. (Protozoa: Labyrinthomorpha), a pathogenic parasite of small juvenile abalone in a British Columbia mariculture facility. *Can. J. Zool.* 65 (8): 1996-2007.

BOWER SM (2000) Infectious diseases of abalone (*Haliotis* spp.) and risks associated with transplantation. En: Campbell A (Ed.), Workshop on rebuilding abalone stocks in British Columbia. Canadian Special Publication of Fisheries and Aquatic Sciences, págs. 111-122.

BOWER SM (2003) Update on emerging abalone diseases and techniques for health assessment. *J. Shellfish Res.* 22 (3): 805-810.

BOWER SM & FIGUERAS AJ (1989) Infectious diseases of mussels, especially pertaining to mussel transplantation. *World Aquac.* 20 (1): 89-93.

BOWER SM & MCGLADDERY SE (2003) Synopsis of infectious diseases and parasites of commercially exploited shellfish. Accessible en: http://www-sci.pac.dfo-mpo.gc.ca/shelldis/title_e.htm.

BOWER SM, BLACKBOURN J, MEYER GR & WELCH DW (1999) Effect of *Perkinsus qugwadi* on various species and strains of scallops. *Dis. Aquat. Org.* 36 (2): 143-151.

BOWER SM, CARNEGIE RB, GOH B, JONES SR, LOWE GJ & MAK MW (2004) Preferential PCR amplification of parasitic protistan small subunit rDNA from metazoan tissues. *J. Eukaryot. Microbiol.* 51 (3): 325-332.

BOYLES SA, POWELL EN, TAYLOR R & GAUTHIER J (1991) Gulf of Mexico oysters: Histopathology, parasites, and heavy metals. *J. Shellfish Res.* 10 (1): 276-277.

BREHÉLIN M, BONAMI JR, COUSSERANS F & VIVARÈS CP (1982) Existence de formes plasmodiales vraies chez *Bonamia ostreae* parasite de l'huitre plate *Ostrea edulis*. *C. R. Séances Acad. Sci., Sér. III, Sci. Vie* 295 (1): 45-48.

BRICELJ VM, FORD SE, BORRERO FJ, PERKINS FO, RIVARA G, HILLMAN RE, ELSTON RA & JENG C (1992) Unexplained mortalities of hatchery-reared, juvenile oysters, *Crassostrea virginica* (Gmelin). *J. Shellfish Res.* 11 (2): 331-347.

BROUSSEAU DJ (1996) Epizootiology of the parasite, *Perkinsus marinus* (Dermo) in intertidal oyster populations from Long Island Sound. *J. Shellfish Res.* 15 (3): 583-587.

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 (1): 83-87.

BROWN GD, KOTOB S & FAISAL M (1999) Diversity among *Perkinsus marinus* isolates from the Chesapeake Bay. *J. Shellfish Res.* 18 (1): 317.

BRUGEROLLE G (2002) *Cryptophagus subtilis*: a new parasite of cryptophytes affiliated with the Perkinsozoa lineage. *Eur. J. Protistol.* 37 (4): 379-390.

BUCK JD (1982) Nonstaining (KOH) method for determination of gram reactions of marine bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 44 (4): 992-993.

BUCKE D (1988) Pathology of bonamiasis. *Parasitol. Today* 4 (6): 174-176.

BUCKE D, HEPPER B, KEY D & BANNISTER RCA (1984) A report on *Bonamia ostreae* in *Ostrea edulis* in the UK. International Council for the Exploration of the Sea (ICES). C.M.1984 / K:9. Copenhagen (Dinamarca).

BURGE CA, GRIFFIN FJ & FRIEDMAN CS (2006) Mortality and herpesvirus infections of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* in Tomales Bay, California, USA. *Dis. Aquat. Org.* 72 (1): 31-43.

BURGE CA, JUDAH LR, CONQUEST LL, GRIFFIN FJ, CHENEY DP, SUHRBIER A, VADOPALAS B, OLEV PG, RENAULT T & FRIEDMAN CS (2007) Summer seed mortality of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* Thunberg grown in Tomales Bay, California, USA: The influence of oyster stock, planting time, pathogens, and environmental stressors. *J. Shellfish Res.* 26 (1): 163-172.

BUROKER NE, CHANLEY P, CRANFIELD HJ & DINAMANI P (1983) Systematic status of two oyster populations of the genus *Tiostrea* from New Zealand and Chile. *Mar. Biol.* 77 (2): 191-200.

BURRESON EM (1988) Use of immunoassays in haplosporidian life cycle studies. En: Fisher WS (Ed.), Disease process in marine bivalve molluscs. Vol. 18, American Fisheries Society Special Publication, Bethesda, MD (E.E.U.U.), págs. 298-303.

BURRESON EM (1994) Further evidence of regular sporulation by *Haplosporidium nelsoni* in small oysters, *Crassostrea virginica*. *Journal of Parasitology* 80 (6): 1036-1038.

BURRESON EM (1996) 101 Uses for the small subunit ribosomal RNA gene: Applications to *Haplosporidium nelsoni*. *J. Shellfish Res.* 15 (2): 475.

BURRESON EM (2001) Spore ornamentation of *Haplosporidium pickfordi* Barrow, 1961 (Haplosporidia), a parasite of freshwater snails in Michigan, USA. *J. Eukaryot. Microbiol.* 48 (6): 622-626.

BURRESON EM & RAGONE CALVO LM (1996) Epizootiology of *Perkinsus marinus* disease of oysters in Chesapeake Bay, with emphasis on data since 1985. *J. Shellfish Res.* 15 (1): 17-34.

BURRESON EM & FORD SE (2004) A review of recent information on the Haplosporidia, with special reference to *Haplosporidium nelsoni* (MSX disease). *Aquat. Living Resour.* 17 (4): 499-517.

BURRESON EM & REECE KS (2006) Spore ornamentation of *Haplosporidium nelsoni* and *Haplosporidium costale* (Haplosporidia), and incongruence of molecular phylogeny and spore ornamentation in the haplosporidia. *J. Parasitol.* 92 (6): 1295-1301.

BURRESON EM, STOKES NA & FRIEDMAN CS (2000) Increased virulence in an introduced pathogen: *Haplosporidium nelsoni* (MSX) in the eastern oyster *Crassostrea virginica*. *J. Aquat. Anim. Health* 12 (1): 1-8.

BURRESON EM, SIMA ÁLVAREZ R, VIDAL MARTÍNEZ V & AGUIRRE MACEDO L (1994) *Perkinsus marinus* (Apicomplexa) as a potential source of oyster (*Crassostrea virginica*) mortality in coastal lagoons of Tabasco, Mexico. *Dis. Aquat. Org.* 20 (1): 77-82.

BURRESON EM, STOKES NA, CARNEGIE RB & BISHOP MJ (2004) *Bonamia* sp. (Haplosporidia) found in nonnative oysters *Crassostrea ariakensis* in Bogue Sound, North Carolina. *J. Aquat. Anim. Health* 16 (1): 1-9.

BURRESON EM, STOKES NA, FLORES BS, FORD SE & ALCOX KA (1997) Life cycle studies of *Haplosporidium nelsoni* (MSX) using PCR technology. *J. Shellfish Res.* 16 (1): 259-260.

BUSHEK D & ALLEN SK, JR. (1996a) Host-parasite interactions among broadly distributed populations of the eastern oyster

Crassostrea virginica and the protozoan *Perkinsus marinus*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 139 (1-3): 127-141.

BUSHEK D & ALLEN SK, JR. (1996b) Races of *Perkinsus marinus*. *J. Shellfish Res.* 15 (1): 103-107.

BUSHEK D, FORD SE & ALLEN SK, JR. (1994) Evaluation of methods using Ray's fluid thioglycollate medium for diagnosis of *Perkinsus marinus* infection in the eastern oyster, *Crassostrea virginica*. *Annu. Rev. Fish Dis.* 4 201-217.

BUSHEK D, DUNGAN CF & LEWITUS AJ (2002) Serological affinities of the oyster pathogen *Perkinsus marinus* (Apicomplexa) with some dinoflagellates (Dinophyceae). *J. Eukaryot. Microbiol.* 49 (1): 11-16.

CÁCERES-MARTÍNEZ J & TINOCO-ORTA GD (2001) Symbionts of cultured red abalone *Haliotis rufescens* from Baja California, Mexico. *J. Shellfish Res.* 20 (2): 875-881.

CALIFORNIA DEPARTMENT OF FISH AND GAME (1997) Review of some California fisheries for 1996. *Rep. Calif. Coop. Ocean. Fish. Invest.* 38 (1): 7-21.

CALVO GW, LUCKENBACH MW, ALLEN SK, JR. & BURRESON EM (1999) Comparative field study of *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) and *Crassostrea virginica* (Gmelin, 1791) in relation to salinity in Virginia. *J. Shellfish Res.* 18 (2): 465-473.

CALVO GW, LUCKENBACH MW, ALLEN SK, JR. & BURRESON EM (2001) A comparative field study of *Crassostrea ariakensis* (Fujita 1913) and *Crassostrea virginica* (Gmelin 1791) in relation to salinity in Virginia. *J. Shellfish Res.* 20 (1): 221-229.

CAMPALANS M, ROJAS P & GONZÁLEZ M (2000) Haemocytic parasitosis in the farmed oyster *Tiostrea chilensis*. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.* 20 (1): 31-33.

CAMPBELL PW, 3RD, PHILLIPS JA, 3RD, HEIDECKER GJ, KRISHNAMANI MR, ZAHORCHAK R & STULL TL (1995) Detection of *Pseudomonas (Burkholderia) cepacia* using PCR. *Pediatr. Pulmonol.* 20 (1): 44-49.

CANESTRI-TROTTI G, BACCARANI EM, PAESANTI F & TUROLLA E (2000) Monitoring of infections by protozoa of the genera *Nematopsis*, *Perkinsus* and *Porospora* in the smooth venus clam *Callista chione* from the North-Western Adriatic Sea (Italy). *Dis. Aquat. Org.* 42 (2): 157-161.

CANESTRI-TROTTI G, BACCARANI EM, GIANNETTO S, GIUFFRIDA A & PAESANTI F (1998) Prevalence of *Mytilicola intestinalis* (Copepoda: Mytilicolidae) and *Urastoma cyprinae* (Turbellaria: Hypotrichinidae) in marketable mussels *Mytilus galloprovincialis* in Italy. *Dis. Aquat. Org.* 32 (2): 145-149.

CARBALLAL MJ, IGLESIAS D, SANTAMARINA J, FERRO-SOTO B & VILLALBA A (2001) Parasites and pathologic conditions of the cockle *Cerastoderma edule* populations of the coast of Galicia (NW Spain). *J. Invertebr. Pathol.* 78 (2): 87-97.

CARNEGIE RB & COCHENNEC-LAUREAU N (2004) Microcell parasites of oysters: Recent insights and future trends. *Aquat. Living Resour.* 17 (4): 519-528.

CARNEGIE RB, STOKES NA, AUDEMARD C & BURRESON EM (2005) Bonamiasis in the crested oyster *Ostrea equestris* in North Carolina, USA. *J. Shellfish Res.* 24 (2): 644.

CARNEGIE RB, BARBER BJ, CULLOTY SC, FIGUERAS AJ & DISTEL DL (2000) Development of a PCR assay for detection of the oyster pathogen *Bonamia ostreae* and support for its inclusion in the Haplosporidia. *Dis. Aquat. Org.* 42 (3): 199-206.

CARNEGIE RB, MEYER GR, BLACKBOURN J, COCHENNEC-LAUREAU N, BERTHE FCJ & BOWER SM (2003) Molecular detection of the oyster parasite *Mikrocytos mackini*, and a preliminary phylogenetic analysis. *Dis. Aquat. Org.* 54 (3): 219-227.

CARNEGIE RB, BURRESON EM, MIKE HINE P, STOKES NA, AUDEMARD C, BISHOP MJ & PETERSON CH (2006) *Bonamia perspora* n. sp. (Haplosporidia), a parasite of the oyster *Ostreola equestris*, is the first *Bonamia* species known to produce spores. *J. Eukaryot. Microbiol.* 53 (4): 232-245.

CASAS SM, VILLALBA A & REECE KS (2002) 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. *Dis. Aquat. Org.* 50 (1): 51-65.

CASAS SM, GRAU A, REECE KS, APAKUPAKUL K, AZEVEDO C & VILLALBA A (2004) *Perkinsus mediterraneus* n. sp., a protistan parasite of the European flat oyster *Ostrea edulis* from the Balearic Islands, Mediterranean Sea. *Dis. Aquat. Org.* 58 (2-3): 231-244.

CASTELL J (2000) Farming the waters: bringing aquatic plant and animal species to agriculture. *Can. J. Anim. Sci.* 80 (2): 235-243.

CASTRO D, PUJALTE M, LOPEZ-CORTES L, GARAY E & BORREGO J (2002) Vibrios isolated from the cultured manila clam (*Ruditapes philippinarum*): numerical taxonomy and antibacterial activities. *J. Appl. Microbiol.* 93 (3): 438-447.

CAULLERY M & MESNIL F (1899a) Sur les Aplosporidies, ordre nouveau de la classe des Sporozoaires. *C. R. Hebd. Séances Acad. Sci.* 129 (1): 616-619.

CAULLERY M & MESNIL F (1899b) Sur le genre *Aplosporidium* (nov) et l'ordre nouveau des Aplosporidies. *C. R. Séances Soc. Biol. Fil.* 51 (1): 789-791.

CAULLERY M & MESNIL F (1905) Sur quelques nouvelles haplosporidies d'annélide. *C. R. Séances Soc. Biol. Fil.* 58 (1): 580-583.

CAVALIER-SMITH T & CHAO EE (2003a) Phylogeny and classification of phylum Cercozoa (Protozoa). *Protist* 154 (3-4): 341-358.

CAVALIER-SMITH T & CHAO EE (2003b) Phylogeny of choanozoa, apusozoa, and other protozoa and early eukaryote megaevolution. *J. Mol. Evol.* 56 (5): 540-563.

CESCHIA G, ZANCHETTA S, SELLO M, MONTESI F, ANTONETTI P & FIGUERAS A (2001) Presenza di parassiti in cannolicchi (*Ensis minor* e *Ensis siliqua*) pescati nell'area costiera del Mar Tirreno

meridionale e del Mar Adriatico. *Boll. Soc. Ital. Patol. Ittica* 13 (30): 20-27.

CIGARRÍA J & ELSTON RA (1997) Independent introduction of *Bonamia ostreae*, a parasite of *Ostrea edulis*, to Spain. *Dis. Aquat. Org.* 29 (2): 157-158.

CLAVIER J (1992) The ormer (*Haliotis tuberculata*) fishery of France and the Channel Islands. En: Shepherd SA, Tegner MJ, Próo Gd (Eds.), Abalone of the world. Biology, Fisheries and Culture. Proceedings of the 1st international symposium on abalone. Fishing News Books, La Paz (México), págs. 454-456.

COCHENNEC-LAUREAU N, REECE KS, BERTHE FCJ & HINE PM (2003a) *Mikrocytos roughleyi* taxonomic affiliation leads to the genus *Bonamia* (Haplosporidia). *Dis. Aquat. Org.* 54 (3): 209-217.

COCHENNEC-LAUREAU N, AUFFRET M, RENAULT T & LANGLADE A (2003b) Changes in circulating and tissue-infiltrating hemocyte parameters of European flat oysters, *Ostrea edulis*, naturally infected with *Bonamia ostreae*. *J. Invertebr. Pathol.* 83 (1): 23-30.

COCHENNEC N, LE ROUX F, BERTHE FCJ & GERARD A (2000) Detection of *Bonamia ostreae* based on small subunit ribosomal probe. *J. Invertebr. Pathol.* 76 (1): 26-32.

COCHENNEC N, RENAULT T, BOUDRY P, CHOLLET B & GERARD A (1998) *Bonamia*-like parasite found in the Suminoe oyster *Crassostrea rivularis* reared in France. *Dis. Aquat. Org.* 34 (3): 193-197.

COLE JR, CHAI B, FARRIS RJ, WANG Q, KULAM SA, MCGARRELL DM, GARRITY GM & TIEDJE JM (2005) The Ribosomal Database Project (RDP-II): sequences and tools for high-throughput rRNA analysis. *Nucleic Acids Res.* 33 (Database issue): D294-296.

COLWELL RR & GRIMES DJ (1984) *Vibrio* diseases of marine fish populations. *Helgol. Meeresunters.* 37 (1-4): 265-287.

COMPANY R, SITJÀ-BOBADILLA A, PUJALTE MJ, GARAY E, ÁLVAREZ-PELLITERO P & PÉREZ-SÁNCHEZ J (1999) Bacterial and

parasitic pathogens in cultured common dentex, *Dentex dentex* L. J. *Fish Dis.* 22 (4): 299-309.

COMPS M (1970) La maladie des branchies chez les huîtres du genre *Crassostrea*. Caractéristiques et évolution des altérations, processus de cicatrisation. *Rev. Trav. Inst. Pêch. Marit.* 34 (1): 24-43.

COMPS M (1972) Observation sur la résistance d'huîtres du genre *Crassostrea* au cours de la mortalité massive de 1970-1971 dans le bassin de Marennes- Oléron. Conseil International pour l'Exploration de la Mer. C.M.:1972/K:22. Copenhague (Dinamarca).

COMPS M (1976) *Marteilia lengehi* n.sp., parasite de l'huître *Crassostrea cucullata* Born. *Rev. Trav. Inst. Pêch. Marit.* 40 (2): 347-349.

COMPS M (1978) Evolution des recherches et etudes recentes en pathologie des huîtres. *Oceanol. Acta* 1 (2): 255-262.

COMPS M (1985) Etude morphologique de *Marteilia christenseni* sp. n. parasite du lavignon *Scrobicularia piperata* P. (mollusque pelecypode). *Rev. Trav. Inst. Pêch. Marit.* 47 (1-2): 99-104.

COMPS M & DUTHOIT JL (1976) Infection virale associée a la 'maladie des branchies' de l'huître portugaise *Crassostrea angulata* Lmk. *C. R. Hebd. Séances Acad. Sci. Sér. D* 283 (14): 1595-1596.

COMPS M & BONAMI JR (1977) Infection virale associée à des mortalites chez l'huître *Crassostrea gigas* Thunberg. *C. R. Hebd. Séances Acad. Sci. Sér. D* 285 (11): 1139-1140.

COMPS M & DUTHOIT JL (1979) Infections virales chez les huîtres *Crassostrea angulata* Lmk et *Crassostrea gigas* Th. *Haliotis* 8 (1): 297-299.

COMPS M & JOLY JP (1980) Contamination expérimentale de *Mytilus galloprovincialis* Lmk par *Marteilia refringens*. *Sci. Pêche* 301 (1): 19-21.

COMPS M & CHAGOT D (1987) Une parasitose nouvelle chez la palourde *Ruditapes decussatus* L. *C. R. Séances Acad. Sci., Sér. III, Sci. Vie* 304 (1): 41-44.

COMPS M & PICHOT Y (1991) Fine spore structure of a haplosporidan parasitizing *Crassostrea gigas*: Taxonomic implications. *Dis. Aquat. Org.* 11 (1): 73-77.

COMPS M & COCHENNEC N (1993) A herpes-like virus from the European oyster *Ostrea edulis* L. *J. Invertebr. Pathol.* 62 (2):

COMPS M, BONAMI JR & VAGO C (1977) Mise en évidence d'une infection rickettsienne chez les huîtres. *C. R. Hebd. Séances Acad. Sci. Sér. D* 285 427-429.

COMPS M, PICHOT Y & PAPAGIANNI P (1982) Recherche sur *Marteilia maurini* n. sp. parasite de la moule *Mytilus galloprovincialis* Lmk. *Rev. Trav. Inst. Pêch. Marit.* 45 (3): 211-214.

COMPS M, PARK MS & DESPORTES I (1987) Fine structure of *Marteilioides chungmuensis* n.g., n.sp., parasite of the oocytes of the oyster *Crassostrea gigas*. *Aquaculture* 67 (1-2): 264-265.

COMPS M, HERBAUT C & FOUGEROUSE A (1999) Virus-like particles in pearl oyster *Pinctada margaritifera*. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.* 19 (2): 85-88.

COMPS M, GRIZEL H, TIGÉ G & DUTHOIT JL (1975) Parasites nouveaux de la glande digestive des mollusques marins *Mytilus edulis* L. et *Cardium edule* L. *C. R. Hebd. Séances Acad. Sci.* 281 (2-3): 179-181.

COMPS M, TIGÉ G, DUTHOIT JL & GRIZEL H (1979) Microorganisms de type rickettsienne chez les huîtres *Crassostrea gigas* Th. et *Ostrea edulis* L. *Haliotis* 8 317-321.

COMTET T, GARCIA C, LE COQUIC Y & JOLY JP (2004) First record of the microsporidian parasite *Steinhausia mytilovum* in *Mytilus* sp. (Bivalvia: Mytilidae) from France. *Dis. Aquat. Org.* 58 (2-3): 261-264.

CORBEIL S, ARZUL I, ROBERT M, BERTHE FCJ, BESNARD-COCHENNEC N & CRANE MS (2006a) Molecular characterisation of an Australian isolate of *Bonamia exitiosa*. *Dis. Aquat. Org.* 71 (1): 81-85.

CORBEIL S, ARZUL I, DIGGLES B, HEASMAN M, CHOLLET B, BERTHE FCJ & CRANE MS (2006b) Development of a TaqMan PCR

assay for the detection of *Bonamia* species. *Dis. Aquat. Org.* 71 (1): 75-80.

COSS CA, ROBLEDO JAF, RUIZ GM & VASTA GR (2001) 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. *J. Eukaryot. Microbiol.* 48 (1): 52-61.

CRANFIELD HJ, DUNN A, DOONAN IJ & MICHAEL KP (2005) *Bonamia exitiosa* epizootic in *Ostrea chilensis* from Foveaux Strait, southern New Zealand between 1986 and 1992. *ICES J. Mar. Sci.* 62 (1): 3-13.

CULLOTY SC & MULCAHY MF (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 (1-3): 53-63.

CULLOTY SC & MULCAHY MF (2001) Living with bonamiasis: Irish research since 1987. *Hydrobiologia* 465 (1-3): 181-186.

CULLOTY SC, CRONIN MA & MULCAHY MF (2003) Possible limitations of diagnostic methods recommended for the detection of the protistan, *Bonamia ostreae* in the European flat oyster, *Ostrea edulis*. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.* 23 (2): 67-71.

CULLOTY SC, CRONIN MA & MULCAHY MF (2004) Potential resistance of a number of populations of the oyster *Ostrea edulis* to the parasite *Bonamia ostreae*. *Aquaculture* 237 (1-4): 41-58.

CULLOTY SC, NOVOA B, PERNAS M, LONGSHAW M, MULCAHY MF, FEIST SW & FIGUERAS A (1999) Susceptibility of a number of bivalve species to the protozoan parasite *Bonamia ostreae* and their ability to act as vectors for this parasite. *Dis. Aquat. Org.* 37 (1): 73-80.

CUNNINGHAM CO (2002) Molecular diagnosis of fish and shellfish diseases: present status and potential use in disease control. *Aquaculture* 206 (1-2): 19-55.

CHAGOT D, COMPS M, BOULO V, RUANO F & GRIZEL H (1987a) Histological study of a cellular reaction in *Ruditapes decussatus* infected by a protozoan. *Aquaculture* 67 (1-2): 260-261.

CHAGOT D, BACHERE E, RUANO F, COMPS M & GRIZEL H (1987b) Ultrastructural study of sporulated instars of a haplosporidian parasitizing the clam *Ruditapes decussatus*. *Aquaculture* 67 (1-2): 262-263.

CHAGOT D, BOULO V, HERVIO D, MIALHE E, BACHÈRE E, MOURTON C & GRIZEL H (1992) Interactions between *Bonamia ostreae* (Protozoa: Ascetospora) and hemocytes of *Ostrea edulis* and *Crassostrea gigas* (Mollusca: Bivalvia): Entry mechanisms. *J. Invertebr. Pathol.* 59 (3): 241-249.

CHAI JY, HAN ET, PARK YK, GUK SM & LEE SH (2001) *Acanthoparyphium tyosenense*: The discovery of human infection and identification of its source. *J. Parasitol.* 87 (4): 794-800.

CHANG PH, KUO ST, LAI SH, YANG HS, TING YY, HSU CL & CHEN HC (2005) Herpes-like virus infection causing mortality of cultured abalone *Haliotis diversicolor supertexta* in Taiwan. *Dis. Aquat. Org.* 65 (1): 23-27.

CHENG W, JUANG F & CHEN J (2004) The immune response of Taiwan abalone *Haliotis diversicolor supertexta* and its susceptibility to *Vibrio parahaemolyticus* at different salinity levels. *Fish Shellfish Immunol.* 16 (3): 295-306.

CHOI DL, LEE NS, CHOI HJ, PARK MA, MCGLADDERY SE & PARK MS (2004) Viral gametocytic hypertrophy caused by a papova-like infection in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* in Korea. *Dis. Aquat. Org.* 59 (3): 205-209.

CHOI K-S & PARK KI (1997) Report on the occurrence of *Perkinsus* sp. in the Manila clams, *Ruditapes philippinarum* in Korea. *J. Aquac.* 10 (3): 227-237.

CHU FE (1996) Laboratory investigations of susceptibility, infectivity, and transmission of *Perkinsus marinus* in oysters. *J. Shellfish Res.* 15 (1): 57-66.

DA ROS L & MASSIGNAN F (1985) Indagine parassitologica su *Mytilus galloprovincialis* Lmk allevato in Laguna di Venezia (Bacino di Chioggia). *Oebalia* 11 (3): 809-811.

DA ROS L & CANZONIER WJ (1985) *Perkinsus*, a protistan threat to bivalve culture in the Mediterranean basin. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.* 5 (2): 23-27.

DA SILVA PM & VILLALBA A (2004) Comparison of light microscopic techniques for the diagnosis of the infection of the European flat oyster *Ostrea edulis* by the protozoan *Bonamia ostreae*. *J. Invertebr. Pathol.* 85 (2): 97-104.

DA SILVA PM, FUENTES J & VILLALBA A (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). *Mar. Biol.* 147 (4): 965-977.

DAVIS GE (1993) Mysterious demise of Southern California black abalone, *Haliotis cracherodii* Leach, 1814. *J. Shellfish Res.* 12 (2): 183-184.

DAVIS HC, LOOSANOFF VL, WESTON WH & MARTIN C (1954) A fungus disease in clam and oyster larvae. *Science* 120 (3105): 36-38.

DAVISON AJ, TRUS BL, CHENG N, STEVEN AC, WATSON MS, CUNNINGHAM C, LE DEUFF RM & RENAULT T (2005) A novel class of herpesvirus with bivalve hosts. *J. Gen. Virol.* 86 (1): 41-53.

DE LA HERRÁN R, GARRIDO-RAMOS MA, NAVAS JL, REJÓN CR & REJÓN MR (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 (4): 345-353.

DESORTES I & NASHED NN (1983) Ultrastructure of sporulation in *Minchinia dentali* (Arvy), an haplosporean parasite of *Dentalium entale* (Scaphopoda, Mollusca); taxonomic implications. *Protistologica* 19 (3): 435-460.

DESSER SS, BOWER SM & HONG H (1998) *Pseudoklossia semiluna* n. sp. (Apicomplexa: Aggregatidae): a coccidian parasite of the kidney of blue mussels [mussels], species of *Mytilus*, from British Columbia, Canada. *Parasite* 5 (1): 17-22.

DIGGLES BK, COCHENNEC-LAUREAU N & HINE PM (2003) Comparison of diagnostic techniques for *Bonamia exitiosus* from flat oysters *Ostrea chilensis* in New Zealand. *Aquaculture* 220 (1-4): 145-156.

DIGGLES BK, MOSS GA, CARSON J & ANDERSON CD (2000) Luminous vibriosis in rock lobster *Jasus verreauxi* (Decapoda: Palinuridae) phyllosoma larvae associated with infection by *Vibrio harveyi*. *Dis. Aquat. Org.* 43 (2): 127-137.

DIGGLES BK, NICHOL J, HINE PM, WAKEFIELD S, COCHENNEC-LAUREAU N, ROBERTS RD & FRIEDMAN CS (2002) Pathology of cultured paua *Haliotis iris* infected with a novel haplosporidian parasite, with some observations on the course of disease. *Dis. Aquat. Org.* 50 219-231.

DINAMANI P, HINE PM & JONES JB (1987) Occurrence and characteristics of the haemocyte parasite *Bonamia* sp. in the New Zealand dredge oyster *Tiostrea lutaria*. *Dis. Aquat. Org.* 3 (1): 37-44.

DISALVO LH, BLECKA J & ZEBAL R (1978) *Vibrio anguillarum* and larval mortality in a California coastal shellfish hatchery. *Appl. Environ. Microbiol.* 35 (1): 219-221.

DIXON MG, HECHT T & BRANDT CR (1991) Identification and treatment of a *Clostridium* and *Vibrio* infection in South African abalone, *Haliotis midae* L. *J. Fish Dis.* 14 (6): 693-695.

DUNGAN CF & ELSTON RA (1988) Histopathological and ultrastructural characteristics of bacterial destruction of the hinge ligaments of cultured juvenile Pacific oysters, *Crassostrea gigas*. *Aquaculture* 72 (1-2): 1-14.

DUNGAN CF, ELSTON RA & SCHIEWE MH (1989) Evidence for colonization and destruction of hinge ligaments in cultured juvenile Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) by cytophaga-like bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 55 (5): 1128-1135.

DUNGAN CF, REECE KS & DUNGAN CF (2006) *In vitro* propagation of two *Perkinsus* spp. parasites from Japanese Manila clams *Venerupis philippinarum* and description of *Perkinsus honshuensis* n. sp. *J. Eukaryot. Microbiol.* 53 (5): 316-326.

DUNGAN CF, HAMILTON RM, HUDSON KL, MCCOLLOUGH CB & REECE KS (2002) Two epizootic diseases in Chesapeake Bay commercial clams, *Mya arenaria* and *Tagelus plebeius*. *Dis. Aquat. Org.* 50 (1): 67-78.

DUNGAN CF, HAMILTON RM, REECE KS, MOSS JA & DIGGLES BK (2007) *Perkinsus olseni* in vitro isolates from the New Zealand clam *Austrovenus stutchburyi*. *J. Eukaryot. Microbiol.* 54 (3): 263-270.

DUNN G & EVERITT S (1982) An introduction to mathematical taxonomy. 1^a Ed. Cambridge University Press, Cambridge (Reino Unido), 152 págs.

EBERT EE & HOUK JL (1984) Elements and innovations in the cultivation of red abalone *Haliotis rufescens*. *Aquaculture* 39 (1-4): 375-392.

ELSTON RA (1986) An intranuclear pathogen [nuclear inclusion X (NIX)] associated with massive mortalities of the Pacific razor clam, *Siliqua patula*. *J. Invertebr. Pathol.* 47 (1): 93-104.

ELSTON RA (1989) Bacteriological methods for diseased shellfish. En: Austin B, Austin DA (Eds.), *Methods for the microbiological examination of fish and shellfish*. Ellis Horwood, Chichester (Reino Unido), págs. 187-215.

ELSTON RA (1990) *Mollusc Diseases: Guide for the Shellfish Farmer*. 1^a Ed. University of Washington Press, Seattle (E.E.U.U.), 73 págs.

ELSTON RA (1997) Bivalve mollusc viruses. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 13 (4): 393-403.

ELSTON RA & LEIBOVITZ L (1980) Pathogenesis of experimental vibriosis in larval American oysters, *Crassostrea virginica*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 37 (6): 964-978.

ELSTON RA & LOCKWOOD GS (1983) Pathogenesis of vibriosis in cultured juvenile red abalone, *Haliotis rufescens* Swainson. *J. Fish Dis.* 6 (2): 111-128.

ELSTON RA, FARLEY CA & KENT ML (1986) Occurrence and significance of bonamiasis in European flat oysters *Ostrea edulis* in North America. *Dis. Aquat. Org.* 2 (1): 49-54.

ELSTON RA, CHENEY D, FRELIER P & LYNN D (1999) Invasive orchitophryid ciliate infections in juvenile Pacific and Kumamoto oysters, *Crassostrea gigas* and *Crassostrea sikamea*. *Aquaculture* 174 (1-2): 1-14.

ELLIN R & BUSHEK D (2006) Adaptation of Ray's fluid thioglycollate medium assay to detect and quantify planktonic stages of Perkinsus spp. parasites. *J. Shellfish Res.* 25 (3): 1037-1042.

F.A.O. (2003) FISHSTAT plus: Universal software for fishery statistical time series. Versión 2.3.2000. F.A.O. Fisheries Department, Fishery Information, Data and Statistics Unit, Roma (Italia)

FARLEY CA (1978) Viruses and viruslike lesions in marine mollusks. *Mar. Fish. Rev.* 40 (10): 18-20.

FARLEY CA (1988a) A computerized coding system for organs, tissues, lesions, and parasites of bivalve mollusks and its application in pollution monitoring with *Mytilus edulis*. *Mar. Environ. Res.* 24 (1-4): 243-249.

FARLEY CA (1988b) Mass mortalities and infectious lethal diseases in bivalve mollusks and associations with geographic transfers of populations. *J. Shellfish Res.* 7 (3): 554.

FARLEY CA, WOLF PH & ELSTON RA (1988) A long-term study of "microcell" disease in oysters with a description of a new genus, *Mikrocytos* (g. n.), and two new species, *Mikrocytos mackini* (sp. n.) and *Mikrocytos roughleyi* (sp. n.). *Fish Bull.* 86 (3): 581-594.

FARLEY CA, BANFIELD WG, KASNIC G & FOSTER WS (1972) Oyster herpes-type virus. *Science* 178 (4062): 759-760.

FARTO R, ARMADA SP, MONTES M, GUISANDE JA, PÉREZ MJ & NIETO TP (2003) *Vibrio lentus* associated with diseased wild octopus (*Octopus vulgaris*). *J. Invertebr. Pathol.* 83 (2): 149-156.

FEGAN DF (2000) Evaluation of diagnostic tests: The epidemiological approach. En: Walker P, Subasinghe R (Eds.), DNA-based molecular diagnostic techniques. Research needs for standardization and validation of the detection of aquatic animal pathogens and diseases. Vol. 395, F.A.O., Roma (Italia), págs. 30-37.

FENG SY & STAUBER LA (1968) Experimental hexamitiasis in the oyster *Crassostrea virginica*. *J. Invertebr. Pathol.* 10 (1): 94-110.

FIGUERAS A & VILLALBA A (1988) Patología de Moluscos. En: Labarta U, Espinosa de los Monteros J (Eds.), Patología en acuicultura. Comisión Asesora de Investigación Científica y Técnica, Madrid (España), págs. 327-389.

FIGUERAS A & ROBLEDO JAF (1993) Does the *Marteilia* present in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) infect flat oysters (*Ostrea edulis*)? *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.* 13 (3): 97-99.

FIGUERAS A, ROBLEDO JAF & NOVOA B (1992) Occurrence of haplosporidian and *Perkinsus*-like infections in carpet-shell clams, *Ruditapes decussatus* (Linnaeus 1758), of the Ria de Vigo (Galicia, NW Spain). *J. Shellfish Res.* 11 (2): 377-382.

FIGUERAS A, LORENZO G, ORDÁS MC, GOUY M & NOVOA B (2000) Sequence of the small subunit ribosomal RNA gene of *Perkinsus atlanticus*-like isolated from carpet shell clam in Galicia, Spain. *Mar. Biotechnol.* 2 (5): 419-428.

FIGUERAS AJ & FIGUERAS A (1987) La patología de moluscos y la acuicultura. *Cuad. Marisq. Publ. Téc.* 10 (1): 11-29.

FIGUERAS AJ & MONTES J (1988) Aber disease of edible oysters caused by *Marteilia refringens*. En: Fisher WS (Ed.), Disease process in marine bivalve molluscs. 18, American Fisheries Society Special Publication, Bethesda, MD (E.E.U.U.), págs. 38-46.

FIGUERAS AJ, JARDON CF & CALDAS JR (1991) Diseases and parasites of mussels (*Mytilus edulis*, Linnaeus, 1758) from two sites on the east coast of the United States. *J. Shellfish Res.* 10 (1): 89-94.

FIGUS V, CULURGIONI J & CANESTRI-TROTTI G (2002) Monitoraggio parassitologico di *Paphia aurea* e *P. aurea* var. *bicolor*

(Mollusca, Bivalvia) nella Laguna di S.ta Gilla (Cagliari-Italia). *Boll. Soc. Ital. Patol. Ittica* 14 (35): 55-62.

FISHER WS & OLIVER LM (1996) A whole-oyster procedure for diagnosis of *Perkinsus marinus* disease using Ray's fluid thioglycollate culture medium. *J. Shellfish Res.* 15 (1): 109-117.

FLORES BS, SIDDALL ME & BURRESON EM (1996) Phylogeny of the Haplosporidia (Eukaryota: Alveolata) based on small subunit ribosomal RNA gene sequence. *J. Parasitol.* 82 (4): 616-623.

FORD SE (1996) Range extension by the oyster parasite *Perkinsus marinus* into the northeastern United States: Response to climate change? *J. Shellfish Res.* 15 (1): 45-56.

FORD SE & HASKIN HH (1982) History and epizootiology of *Haplosporidium nelsoni* (MSX), an oyster pathogen in Delaware Bay, 1957 - 1980. *J. Invertebr. Pathol.* 40 (1): 118-141.

FORD SE & BORRERO FJ (2001) Epizootiology and pathology of juvenile oyster disease in the Eastern oyster, *Crassostrea virginica*. *J. Invertebr. Pathol.* 78 (3): 141-154.

FORD SE & CHINTALA MM (2006) Northward expansion of a marine parasite: Testing the role of temperature adaptation. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 339 (2): 226-235.

FORD SE & SMOLOWITZ R (2007) Infection dynamics of an oyster parasite in its newly expanded range. *Mar. Biol.* 151 (1): 119-133.

FRIEDMAN CS & FINLEY CA (2003) Anthropogenic introduction of the etiological agent of withering syndrome into northern California abalone populations via conservation efforts. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 60 (11): 1424-1431.

FRIEDMAN CS, CLONEY DF, MANZER D & HEDRICK RP (1991a) Haplosporidiosis of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *J. Invertebr. Pathol.* 58 (3): 367-372.

FRIEDMAN CS, BEATTIE JH, ELSTON RA & HEDRICK RP (1991b) 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): 1-15.

FRIEDMAN CS, BIGGS W, SHIELDS JD & HEDRICK RP (2002) Transmission of withering syndrome in black abalone, *Haliotis cracherodii* Leach. *J. Shellfish Res.* 21 (2): 817-824.

FRIEDMAN CS, THOMSON M, CHUN C, HAAKER PL & HEDRICK RP (1997) Withering syndrome of the black abalone, *Haliotis cracherodii* (Leach): Water temperature, food availability, and parasites as possible causes. *J. Shellfish Res.* 16 (2): 403-411.

FRIEDMAN CS, BROWN HM, EWING TW, GRIFFIN FJ & CHERR GN (2005a) Pilot study of the Olympia oyster *Ostrea conchaphila* in the San Francisco Bay estuary: description and distribution of diseases. *Dis. Aquat. Org.* 65 (1): 1-8.

FRIEDMAN CS, GARDNER GR, HEDRICK RP, STEPHENSON M, CAWTHORN RJ & UPTON SJ (1995) *Pseudoklossia haliotis* sp. n. (Apicomplexa) from the kidney of California abalone, *Haliotis* spp. (Mollusca). *J. Invertebr. Pathol.* 66 (1): 33-38.

FRIEDMAN CS, BEAMAN BL, CHUN J, GOODFELLOW M, GEE A & HEDRICK RP (1998) *Nocardia crassostreae* sp. nov., the causal agent of nocardiosis in Pacific oysters. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48 (1): 237-246.

FRIEDMAN CS, ANDREE KB, ROBBINS TT, SHIELDS JD, MOORE JD, BEAUCHAMP K & HEDRICK RP (2000a) "*Candidatus Xenohaliotis californiensis*," a newly described bacterial pathogen and etiological agent of withering syndrome found in abalone, *Haliotis* spp., along the west coast of North America. *J. Shellfish Res.* 19 (1): 513.

FRIEDMAN CS, ANDREE KB, BEAUCHAMP KA, MOORE JD, ROBBINS TT, SHIELDS JD & HEDRICK RP (2000b) '*Candidatus Xenohaliotis californiensis*', a newly described pathogen of abalone, *Haliotis* spp., along the west coast of North America. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50 (2): 847-855.

FRIEDMAN CS, ESTES RM, STOKES NA, BURGE CA, HARGOVE JS, BARBER BJ, ELSTON RA, BURRESON EM & REECE KS (2005b) Herpes virus in juvenile Pacific oysters *Crassostrea gigas* from Tomales

Bay, California, coincides with summer mortality episodes. *Dis. Aquat. Org.* 63 (1): 33-41.

GARDNER GR, HARSHBARGER JC, LAKE JL, SAWYER TK, PRICE KL, STEPHENSON MD, HAAKER PL & TOGSTAD HA (1995) Association of prokaryotes with symptomatic appearance of withering syndrome in black abalone *Haliotis cracherodii*. *J. Invertebr. Pathol.* 66 (2): 111-120.

GARLAND CD, NASH GV, SUMNER CE & MCMEEKIN TA (1983) Bacterial pathogens of oyster larvae (*Crassostrea gigas*) in a Tasmanian hatchery (*Alteromonas*, *Vibrio*). *Aust. J. Mar. Freshw. Res.* 34 (3): 483.

GAUGER EJ & GÓMEZ-CHIARRI M (2002) 16S ribosomal DNA sequencing confirms the synonymy of *Vibrio harveyi* and *V. carchariae*. *Dis. Aquat. Org.* 52 (1): 39-46.

GAUTHIER JD & FISHER WS (1990) Hemolymph assay for diagnosis of *Perkinsus marinus* in oysters *Crassostrea virginica* (Gmelin, 1791). *J. Shellfish Res.* 9 (2): 367-371.

GAUTHIER JD, SONIAT TM & ROGERS JS (1990) A parasitological survey of oysters along salinity gradients in coastal Louisiana. *J. World Aquacult. Soc.* 21 (2): 105-115.

GAUTHIER JD, MILLER CR & WILBUR AE (2006) TaqMan registered MGB real-time PCR approach to quantification of *Perkinsus marinus* and *Perkinsus* spp. in oysters. *J. Shellfish Res.* 25 (2): 619-624.

GEIGER DL (1998) Recent genera and species of the family Haliotidae Rafinesque, 1815 (Gastropoda: Vetigastropoda). *The Nautilus* 111 (3): 85-116.

GEIGER DL (2000) Distribution and biogeography of the Recent Haliotidae (Gastropoda: Vetigastropoda) world-wide. *Boll. Malacol.* 35 (5-12): 57-120.

GESTAL C, DE LA CADENA MP & PASCUAL S (2002a) Malabsorption syndrome observed in the common octopus *Octopus vulgaris* infected with *Aggregata octopiana* (Protista: Apicomplexa). *Dis. Aquat. Org.* 51 (1): 61-65.

GESTAL C, ABOLLO E & PASCUAL S (2002b) Observations on associated histopathology with *Aggregata octopiana* infection (Protista: Apicomplexa) in *Octopus vulgaris*. *Dis. Aquat. Org.* 50 (1): 45-49.

GESTAL C, GUERRA A, ABOLLO E & PASCUAL S (2000) *Aggregata sagittata* n. sp. (Apicomplexa: Aggregatidae), a coccidian parasite from the European flying squid *Todarodes sagittatus* (Mollusca: Cephalopoda). *Syst. Parasitol.* 47 (3): 203-206.

GESTAL C, NOVOA B, POSADA D, FIGUERAS A & AZEVEDO C (2006) *Perkinsoide chabelardi* n. gen., a protozoan parasite with an intermediate evolutionary position: possible cause of the decrease of sardine fisheries? *Environ. Microbiol.* 8 (6): 1105-1114.

GOGGIN CL (1994) Variation in the two internal transcribed spacers and 5.8S ribosomal RNA from five isolates of the marine parasite *Perkinsus* (Protista, Apicomplexa). *Mol. Biochem. Parasitol.* 65 (1): 179-182.

GOGGIN CL (1996) Effect of *Perkinsus olseni* (Protozoa, Apicomplexa) on the weight of *Tridacna crocea* (Mollusca, Bivalvia) from Lizard Island, Great Barrier Reef. *Aquaculture* 141 (1-2): 25-30.

GOGGIN CL & LESTER RJG (1987) Occurrence of *Perkinsus* species (Protozoa, Apicomplexa) in bivalves from the Great Barrier Reef. *Dis. Aquat. Org.* 3 (2): 113-117.

GOGGIN CL & BARKER SC (1993) Phylogenetic position of the genus *Perkinsus* (Protista, Apicomplexa) based on small subunit ribosomal RNA. *Mol. Biochem. Parasitol.* 60 (1): 65-70.

GOGGIN CL & LESTER RJG (1995) *Perkinsus*, a protistan parasite of abalone in Australia: A review. *Mar. Freshwater Res.* 46 (3): 639-646.

GOGGIN CL, SEWELL KB & LESTER RJG (1989) Cross-infection experiments with Australian *Perkinsus* species. *Dis. Aquat. Org.* 7 (1): 55-59.

GOGGIN CL, MCGLADDERY SE, WHYTE SK & CAWTHORN RJ (1996) An assessment of lesions in bay scallops *Argopecten irradians* attributed to *Perkinsus karlssoni* (Protozoa, Apicomplexa). *Dis. Aquat. Org.* 24 (1): 77-80.

GOGGIN CL, BOULO V, MIALHE E, COUSIN K & HERVIO D (1991) Diagnosis of *Perkinsus atlanticus* with monoclonal antibodies and DNA probes. En: DePauw N, Joyce J (Eds.), Aquaculture Europe '91. Aquaculture and the environment, 10-12 de junio de 1991, Dublin (Irlanda).

GÓMEZ-GIL B, SOTO-RODRIGUEZ S, GARCÍA-GASCA A, ROQUE A, VÁZQUEZ-JUÁREZ R, THOMPSON FL & SWINGS J (2004) Molecular identification of *Vibrio harveyi*-related isolates associated with diseased aquatic organisms. *Microbiology* 150 (6): 1769-1777.

GÓMEZ-LEÓN J, VILLAMIL L, LEMOS ML, NOVOA B & FIGUERAS A (2005) Isolation of *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio splendidus* from aquacultured carpet shell clam (*Ruditapes decussatus*) larvae associated with mass mortalities. *Appl. Environ. Microbiol.* 71 (1): 98-104.

GONZÁLEZ HERRERO V, PEÑAS RODRÍGUEZ J & DÍAZ MARTÍNEZ A (1987) Dermocystidiosis en almeja fina portuguesa de importación. *Cuad. Marisq. Publ. Téc.* 12 (2): 695-700.

GREGORY CR, LATIMER KS, PENNICK KE, BENSON K & MOORE T (2006) Novel iridovirus in a nautilus (*Nautilus* spp.). *J. Vet. Diagn. Invest.* 18 (2): 208-211.

GRIMES DJ, COLWELL RR, STEMMLER J, HADA H, MANEVAL D, HETRICK FM, MAY EB, JONES RT & STOSKOPF M (1984) *Vibrio* species as agents of elasmobranch disease. *Helgol. Meeresunters.* 37 (1): 309-315.

GRIZEL H (1979) *Marteilia refringens* and oyster disease - recent observations. *Mar. Fish. Rev.* 41 (1-2): 38-39.

GRIZEL H, COMPS M, BONAMI JR, COUSSERANS F, DUTHOIT JL & PENNEC M (1974) Recherche sur l'agent de la maladie de la glande digestive de *Ostrea edulis* Linne. *Sci. Pêche* 240 (1): 7-30.

GRIZEL H, COMPS M, RAGEUNES D, LEBORGNE Y, TIGÉ G & MARTIN AG (1983) Bilan des essais d'acclimatation d'*Ostrea chilensis* sur les cotes de Bretagne. *Rev. Trav. Inst. Pêch. Marit.* 46 (3): 209-225.

GUO X, FORD SE & ZHANG F (1999) Molluscan aquaculture in China. *J. Shellfish Res.* 18 (1): 19-31.

GUTIÉRREZ M (1977) Nota sobre marteiliasis en el mejillón, *Mytilus edulis* (L.), de la costa Noroeste de España. *Inv. Pesq.* 41 (3): 637-642.

HAAKER PL, PARKER DO, TOGSTAD H, RICHARDS DV, DAVIS GE & FRIEDMAN CS (1992) Mass mortality and withering syndrome in black abalone, *Haliotis cracherodii*, in California. En: Shepherd SA, Tegner MJ, Próo Gd (Eds.), *Abalone of the world. Biology, Fisheries and Culture. Proceedings of the 1st international symposium on abalone.* Fishing News Books, La Paz (México), págs. 214-224.

HADA HS, WEST PA, LEE JV, STEMMLER J & COLWELL RR (1984) *Vibrio tubiashii* sp. nov., a pathogen of bivalve mollusks. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 34 (1): 1-4.

HALL TA (1999) BioEdit, a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids Symp. Ser.* 41 (1): 95-98.

HALLETT SL, ERSEUS C, O'DONOGHUE PJ & LESTER RJG (2001) Parasite fauna of Australian marine oligochaetes. *Mem. Qld. Mus.* 46 (2): 555-576.

HAMAGUCHI M, SUZUKI N, USUKI H & ISHIOKA H (1998) *Perkinsus* protozoan infection in short-necked clam *Tapes (=Ruditapes) philippinarum* in Japan. *Fish Pathol.* 33 (5): 473-480.

HANDLINGER J, CARSON J, DONACHIE L, GABOR L & TAYLOR D (2002) Bacterial infection in Tasmanian farmed abalone: causes, pathology, farm factors and control options. En: Walker P, Lester R, Bondad-Reantaso MG (Eds.), *5th Symposium on Diseases in Asian Aquaculture.* Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Gold Coast (Australia), págs. 138.

HARVELL CD, KIM K, BURKHOLDER JM, COLWELL RR, EPSTEIN PR, GRIMES DJ, HOFMANN EE, LIPP EK, OSTERHAUS AD, OVERSTREET RM, PORTER JW, SMITH GW & VASTA GR (1999) Emerging marine diseases--climate links and anthropogenic factors. *Science* 285 (5433): 1505-1510.

HASKIN HH, STAUBER LA & MACKIN JA (1966) *Minchinia nelsoni* n. sp. (Haplosporida, Haplosporidiidae): Causative agent of the Delaware Bay oyster epizootic. *Science* 153 (3742): 1414-1416.

HAY B & SCOTTI P (1986) Evidence for intracellular absorption of virus by the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *N. Z. J. Mar. Freshw. Res.* 20 (4): 655-659.

HAYASHI K, MORIWAKI J, SAWABE T, THOMPSON FL, SWINGS J, GUDKOV N, CHRISTEN R & EZURA Y (2003) *Vibrio superstes* sp. nov., isolated from the gut of Australian abalones *Haliotis laevis* and *Haliotis rubra*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53 (6): 1813-1817.

HEDLUND BP & STALEY JT (2001) *Vibrio cyclotrophicus* sp. nov., a polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-degrading marine bacterium. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51 (1): 61-66.

HERFORD A (2004) Aquatic Animal Diseases Significant to Australia: Identification field guide. Australian Government Department of Agriculture, Fisheries and Forestry. Canberra (Australia). Accessible en: <http://www.disease-watch.com/documents/CD/index/body.htm>.

HERR RA, AJELLO L, TAYLOR JW, ARSECULERATNE SN & MENDOZA L (1999) Phylogenetic analysis of *Rhinosporidium seeberi*'s 18S small-subunit ribosomal DNA groups this pathogen among members of the protocistan Mesomycetozoa clade. *J. Clin. Microbiol.* 37 (9): 2750-2754.

HILL BJ, WAY K & ALDERMAN DJ (1982) Further investigations into the pathogenicity of IPN-like viruses for oysters. En: III International Colloquium on Invertebrate Pathology. XVth Annu Meeting of the Society for Invertebrate Pathology, Brighton (Reino Unido).

HILLIS DM & DIXON MT (1991) Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. *Q. Rev. Biol.* 66 (4): 411-453.

HILLMAN RE (1991) *Steinhausia mytilovum* (Minisporia: Chitridiopsidae) in *Mytilus* sp. in California: a new geographic record. *J. Invertebr. Pathol.* 57 (1): 144-145.

HILLMAN RE, FORD SE & HASKIN HH (1990) *Minchinia teredinis* n. sp. (Balanosporida, Haplosporidiidae), a parasite of teredinid shipworms. *J. Protozool.* 37 (5): 364-368.

HINE PM (2000) The need for molecular tools in the study of mollusc pathogens. En: Walker P, Subasinghe R (Eds.), DNA-based molecular diagnostic techniques. Research needs for standardization and validation of the detection of aquatic animal pathogens and diseases. 395, F.A.O., Roma (Italia), págs. 60-63.

HINE PM (2002) Severe apicomplexan infection in the oyster *Ostrea chilensis*: a possible predisposing factor in bonamiosis. *Dis. Aquat. Org.* 51 (1): 49-60.

HINE PM & JONES JB (1994) *Bonamia* and other aquatic parasites of importance to New Zealand. *N. Z. J. Zool.* 21 (1): 49-56.

HINE PM & THORNE T (1997) Replication of herpes-like viruses in haemocytes of adult flat oysters *Ostrea angasi*: An ultrastructural study. *Dis. Aquat. Org.* 29 (3): 189-196.

HINE PM & WESNEY B (1997) Virus-like particles associated with cytopathology in the digestive gland epithelium of scallops *Pecten novaezelandiae* and toheroa *Paphies ventricosum*. *Dis. Aquat. Org.* 29 (3): 197-204.

HINE PM & THORNE T (1998) *Haplosporidium* sp. (Haplosporidia) in Hatchery-Reared Pearl Oysters, *Pinctada maxima* (Jameson, 1901), in north Western Australia. *J. Invertebr. Pathol.* 71 (1): 48-52.

HINE PM & THORNE T (2000) A survey of some parasites and diseases of several species of bivalve mollusc in northern Western Australia. *Dis. Aquat. Org.* 40 (1): 67-78.

HINE PM & THORNE T (2002) *Haplosporidium* sp. (Alveolata: Haplosporidia) associated with mortalities among rock oysters *Saccostrea cucullata* in north Western Australia. *Dis. Aquat. Org.* 51 (2): 123-133.

HINE PM, WESNEY B & HAY BE (1992) Herpesviruses associated with mortalities among hatchery-reared larval Pacific oysters *Crassostrea gigas*. *Dis. Aquat. Org.* 12 (2): 135-142.

HINE PM, WESNEY B & BESANT P (1998) Replication of a herpes-like virus in larvae of the flat oyster *Tiostrea chilensis* at ambient temperatures. *Dis. Aquat. Org.* 32 (3): 161-171.

HINE PM, COCHENNEC-LAUREAU N & BERTHE FCJ (2001) *Bonamia exitiosus* n. sp. (Haplosporidia) infecting flat oysters *Ostrea chilensis* in New Zealand. *Dis. Aquat. Org.* 47 (1): 63-72.

HINE PM, DIGGLES BK, PARSONS MJD, PRINGLE A & BULL B (2002a) The effects of stressors on the dynamics of *Bonamia exitiosus* Hine, Cochennec-Laureau & Berthe, infections in flat oysters *Ostrea chilensis* (Philippi). *J. Fish Dis.* 25 (9): 545-554.

HINE PM, WAKEFIELD S, DIGGLES BK, WEBB VL & MAAS EW (2002b) Ultrastructure of a haplosporidian containing Rickettsiae, associated with mortalities among cultured paua *Haliotis iris*. *Dis. Aquat. Org.* 49 (3): 207-219.

HISPANO C, NEBRA Y & BLANCH AR (1997) Isolation in *Vibrio harveyi* from an ocular lesion in the short sunfish (*Mola mola*). *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.* 17 (3-4): 104-107.

HOFFMAN RC (1995) Environmental change and the culture of common carp in medieval Europe. *Guelph Ichthyol. Rev.* 3 (1): 57-85.

HOWARD DW, LEWIS EJ, KELLER J & SMITH CS (2004) Histological techniques for marine bivalve mollusks and crustaceans. NOAA Technical Memorandum, NOS NCCOS 5. 2^a Ed. 218 págs.

HUANG CY, LIU PC & LEE KK (2001) Withering syndrome of the small abalone, *Haliotis diversicolor supertexta*, is caused by *Vibrio parahaemolyticus* and associated with thermal induction. *Z. Naturforsch. [C]* 56 (9-10): 898-901.

HUCHETTE S, PAILLARD C, CLAVIER J & DAY R (2006) Shell disease: abnormal conchiolin deposit in the abalone *Haliotis tuberculata*. *Dis. Aquat. Org.* 68 (3): 267-271.

ITOH N, MOMOYAMA K & OGAWA K (2005) First report of three protozoan parasites (a haplosporidian, *Marteilia* sp. and *Marteilioides*

sp.) from the Manila clam, *Venerupis* (= *Ruditapes*) *philippinarum* in Japan. *J. Invertebr. Pathol.* 88 (3): 201-206.

ITOH N, KOMIYAMA H, UEKI N & OGAWA K (2004) Early developmental stages of a protozoan parasite, *Marteilioides chungmuensis* (Paramyxea), the causative agent of the ovary enlargement disease in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Int. J. Parasitol.* 34 (10): 1129-1135.

JACOBSON RH (1996) Principles of Validation of Diagnostic Assays for Infectious Diseases. En: Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines. Office International des Epizooties, Paris (Francia), págs. 8-15.

JEFFRIES VE (1982) Three *Vibrio* strains pathogenic to larvae of *Crassostrea gigas* and *Ostrea edulis*. *Aquaculture* 29 (3-4): 201-226.

JEFFRIES VE (1984) Vibriosis of larval oysters. En: Vivares CP, Bonami JR, Jaspers E (Eds.), Pathologie en aquaculture marine. PAMAQ I, 11-14 de Septiembre de 1984, Montpellier (Francia).

JOHNSON FH & SHUNK IV (1936) An interesting new species of luminous bacteria. *J. Bacteriol.* 31 (6): 585-593.

JONES JB (1981) A new microsporidium from the oyster *Ostrea lutaria* in New Zealand. *J. Invertebr. Pathol.* 38 (1): 67-70.

JONES JB, SCOTTI PD, DEARING SC & WESNEY B (1996) Virus-like particles associated with marine mussel mortalities in New Zealand. *Dis. Aquat. Org.* 25 (1-2): 143-149.

KAEHLER S (1999) Incidence and distribution of phototrophic shell-degrading endoliths of the brown mussel *Perna perna*. *Mar. Biol.* 135 (3): 505-514.

KAEHLER S & MCQUAID CD (1999) Lethal and sub-lethal effects of phototrophic endoliths attacking the shell of the intertidal mussel *Perna perna*. *Mar. Biol.* 135 (3): 497-503.

KARAGIANNIS D & ANGELIDIS P (2007) Infection of cultured mussels *Mytilus galloprovincialis* by the protozoan *Marteilia* sp. in the

Thermaikos Gulf (N Greece). *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.* 27 (4): 131-141.

KARUNASAGAR I, PAI R, MALATHI GR & KARUNASAGAR I (1994) Mass mortality of *Penaeus monodon* larvae due to antibiotic-resistant *Vibrio harveyi* infection. *Aquaculture* 128 (3-4): 203-209.

KATKANSKY SC, DAHLSTROM WA & WARNER RW (1969) Observations on survival and growth of the European flat oyster, *Ostrea edulis*, in California. *Calif. Fish Game* 55 (1): 69-74.

KISMOHANDAKA G, ROBERTS W, HEDRICK RP & FRIEDMAN CS (1995) Physiological alterations of the black abalone, *Haliotis cracherodii* Leach, with withering syndrome. *J. Shellfish Res.* 14 (1): 269-270.

KITAMURA SI, KO JY, LEE WL, KIM SR, SONG JY, KIM DK, JUNG SJ & OH MJ (2007) Seasonal prevalence of lymphocystis disease virus and aquabirnavirus in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus* and blue mussel, *Mytilus galloprovincialis*. *Aquaculture* 266 (1-4): 26-31.

KLEEMAN SN, ADLARD RD & LESTER RJ (2002) Detection of the initial infective stages of the protozoan parasite *Marteilia sydneyi* in *Saccostrea glomerata* and their development through to sporogenesis. *Int. J. Parasitol.* 32 (6): 767-784.

KLEEMAN SN, ADLARD RD, ZHU X & GASSER RB (2004) Mutation scanning analysis of *Marteilia sydneyi* populations from different geographical locations in eastern Australia. *Mol. Cell. Probes* 18 (2): 133-138.

KNOTTNERUS JA, VAN WEEL C & MURIS JW (2002) Evaluation of diagnostic procedures. *Brit. Med. J.* 324 (7335): 477-480.

KO YT, CHAN MM, FORD SE & FONG D (1999) A PCR-ELISA method for direct detection of the oyster pathogen *Haplosporidium nelsoni*. *Mar. Biotechnol.* 1 (2): 147-154.

KOTOB SI, MCLAUGHLIN SM, VAN BERKUM P & FAISAL M (1999a) 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 (4): 363-368.

KOTOB SI, MCLAUGHLIN SM, VAN BERKUM P & FAISAL M (1999b) Characterization of two *Perkinsus* spp. from the softshell clam, *Mya arenaria* using the small subunit ribosomal RNA gene. *J. Eukaryot. Microbiol.* 46 (4): 439-444.

KOVACS N (1956) Identification of *Pseudomonas pyocyanea* by the oxidase reaction. *Nature* 178 (4535): 703.

KRIEG NR & HOLT JG (1984) Bergey's manual of systematic bacteriology. Vol. 1. 1^a Ed. Williams & Wilkins, Baltimore (E.E.U.U.), 964 págs.

KROECK MA & MONTES J (2005) Occurrence of the haemocyte parasite *Bonamia* sp. in flat oysters *Ostrea puelchana* farmed in San Antonio Bay (Argentina). *Dis. Aquat. Org.* 63 (2-3): 231-235.

KUMAR S, TAMURA K & NEI M (2004) MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Brief. Bioinform.* 5 (2): 150-163.

LAFFERTY KD & KURIS AM (1993) Mass mortality of abalone *Haliotis cracherodii* on the California Channel Islands: test of epidemiological hypotheses. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 96 (3): 239-248.

LAMA A & MONTES J (1993) Influence of Depth of Culture in the infection of the European flat oyster (*Ostrea edulis* L.) by *Bonamia ostreae*. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.* 13 (1): 17-20.

LAMBERT C, NICOLAS JL, CILIA V & CORRE S (1998) *Vibrio pectenecida* sp. nov., a pathogen of scallop (*Pecten maximus*) larvae. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48 (2): 481-487.

LAN J, WALBOOMERS JM, ROOSENDAAL R, VAN DOORNUM GJ, MACLAREN DM, MEIJER CJ & VAN DEN BRULE AJ (1993) Direct detection and genotyping of *Chlamydia trachomatis* in cervical scrapes by using polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis. *J. Clin. Microbiol.* 31 (5): 1060-1065.

LANE DJ (1991) 16S/23S rRNA sequencing. En: Stackebrandt E, Goodfellow M (Eds.), *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*. Wiley, Chichester (Reino Unido), págs. 115-148.

LAPAGE SP, SNEATH PHA, LESSEL EF, SKERMAN VBD, SEELIGER HPR & CLARK WA (1992) *International Code of Nomenclature of Bacteria and Statutes of the International Committee on Systematic Bacteriology and Statutes of the Bacteriology and Applied Microbiology Section of The International Union of Microbiological Societies: Bacteriological Code*. ASM Press. Accesible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?rid=icnb>.

LAUCKNER G (1983) Introduction. Bivalvia to Scaphoda. En: Kinne O (Ed.), *Diseases of Marine Animals*. Vol. 2, Biologische Anstalt Helgoland, Hamburgo (Alemania), págs. 467-1038.

LAUER TE & SPACIE A (2000) The effects of sponge (*Porifera*) biofouling on zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) fitness: reduction of glycogen, tissue loss, and mortality. *J. Freshwat. Ecol.* 15 (1): 83-92.

LE ROUX F, LORENZO G, PEYRET P, AUDEMARD C, FIGUERAS A, VIVARES C, GOUY M & BERTHE FCJ (2001) Molecular evidence for the existence of two species of *Marteilia* in Europe. *J. Eukaryot. Microbiol.* 48 (4): 449-454.

LEE KK, LIU PC & HUANG CY (2003) *Vibrio parahaemolyticus* infectious for both humans and edible mollusk abalone. *Microbes Infect.* 5 (6): 481-485.

LEE KK, LIU PC, CHEN YC & HUANG CY (2001a) The implication of ambient temperature with the outbreak of vibriosis in cultured small abalone *Haliotis diversicolor supertexta* Lischke. *J. Therm. Biol.* 26 (6): 585-587.

LEE MK, CHO BY, LEE SJ, KANG JY, JEONG HD, HUH SH & HUH MD (2001b) Histopathological lesions of Manila clam, *Tapes philippinarum*, from Hadong and Namhae coastal areas of Korea. *Aquaculture* 201 (3-4): 199-209.

LEETHOCHAVALIT S, UPATHAM ES, CHOI KS, SAWANGWONG P, CHALERMWAT K & KRUA TRACHUE M (2003) Ribosomal RNA characterization of non-transcribed spacer and two internal

transcribed spacers with 5.8s ribosomal RNA of *Perkinsus* sp. found in undulated surf clams (*Paphia undulata*) from Thailand. *J. Shellfish Res.* 22 (2): 431-434.

LEIBOVITZ L (1989) Chlamydiosis: a newly reported serious disease of larval and postmetamorphic bay scallops, *Argopecten irradians* (Lamarck). *J. Fish Dis.* 12 (2): 125-136.

LESTER RJG (1986) Abalone die-back caused by protozoan infection? *Aust. Fish.* 45 (6): 26-27.

LESTER RJG (1990) Diseases of cultured molluscs in Australia. En: Barret J (Ed.), IFREMER Centre de Brest. Actes de Colloques. IFREMER, Brest (Francia), págs. 207-216.

LESTER RJG & DAVIS GHG (1981) A new *Perkinsus* species (Apicomplexa, Perkinsea) from the abalone *Haliotis ruber*. *J. Invertebr. Pathol.* 37 (2): 181-187.

LESTER RJG, GOGGIN CL & SEWELL KB (1990) *Perkinsus* in Australia. En: Perkins FO, Cheng TC (Eds.), Pathology in Marine Science. Academic Press, San Diego, (E.E.U.U.), págs. 189-199.

LEVINE ND (1978) *Perkinsus* gen.n. and other new taxa in the protozoan phylum Apicomplexa. *J. Parasitol.* 64 (3): 549.

LEWIS EJ, FARLEY CA, SMALL EB & BAYA AM (1996) A synopsis of juvenile oyster disease (JOD) experimental studies in *Crassostrea virginica*. *Aquat. Living Resour.* 9 (2): 169-178.

LI MF, DRINNAN RE, DREBOT M, JR. & NEWKIRK G (1983) Studies of shell disease of the European flat oyster *Ostrea edulis* Linne in Nova Scotia. *J. Shellfish Res.* 3 (2): 135-140.

LI T, DING M, ZHANG J, XIANG J & LIU R (1998) Studies on the pustule disease of abalone (*Haliotis discus hannai* Ino) on the Dalian coast. *J. Shellfish Res.* 17 (3): 707-711.

LI T, ZHANG J, DING M, WANG S, SHI P, XIANG J & LIU R (1997) Histology and ultrastructure of pustule disease in abalone *Haliotis discus hannai* (Mollusca:Gastropoda) (Resumen). *Acta. Zool. Sin.* 43 (3): 238-242.

LIU PC, CHEN YC & LEE KK (2001) Pathogenicity of *Vibrio alginolyticus* isolated from diseased small abalone *Haliotis diversicolor supertexta*. *Microbios* 104 (408): 71-77.

LIU PC, CHUANG WH & LEE KK (2003) Infectious gastroenteritis caused by *Vibrio harveyi* (*V. carchariae*) in cultured red drum, *Sciaenops ocellatus*. *J. Appl. Ichthyol.* 19 (1): 59-61.

LIU PC, CHEN YC, HUANG CY & LEE KK (2000) Virulence of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from cultured small abalone, *Haliotis diversicolor supertexta*, with withering syndrome. *Lett. Appl. Microbiol.* 31 (6): 433-437.

LO CF, HONG YW, HUANG SY & WANG CH (1988) The characteristics of the virus isolated from the gill of clam, *Meretrix lusoria*. *Fish Pathol.* 23 (3): 147-154.

LODEIROS C, BOLINCHES J, DOPAZO CP & TORANZO AE (1987) Bacillary necrosis in hatcheries of *Ostrea edulis* in Spain. *Aquaculture* 65 (1): 15-29.

LONGSHAW M, FEIST SW, MATTHEWS RA & FIGUERAS A (2001) Ultrastructural characterisation of *Marteilia* species (Paramyxea) from *Ostrea edulis*, *Mytilus edulis* and *Mytilus galloprovincialis* in Europe. *Dis. Aquat. Org.* 44 (2): 137-142.

LÓPEZ-FLORES I, DE LA HERRÁN R, GARRIDO-RAMOS MA, NAVAS JI, RUIZ-REJÓN C & RUIZ-REJÓN M (2004) The molecular diagnosis of *Marteilia refringens* and differentiation between *Marteilia* strains infecting oysters and mussels based on the rDNA IGS sequence. *Parasitology* 129 (4): 411-419.

LÓPEZ C & DARRIBA S (2006) Presence of *Marteilia* sp. (Paramyxea) in the razor clam *Solen marginatus* (Pennant, 1777) in Galicia (NW Spain). *J. Invertebr. Pathol.* 92 (2): 97-99.

LUNA-GONZÁLEZ A, MAEDA MARTÍNEZ AN, SAINZ JC & ASCENCIO VALLE F (2002) Comparative susceptibility of veliger larvae of four bivalve mollusks to a *Vibrio alginolyticus* strain. *Dis. Aquat. Org.* 49 (3): 221-226.

LUPIANI B, SUBRAMANIAN K & SAMAL SK (1995) Aquareoviruses. *Annu. Rev. Fish Dis.* 5 (1): 175-208.

LYNCH SA, ARMITAGE DV, WYLDE S, MULCAHY MF & CULLOTY SC (2006) Inventory of benthic macroinvertebrates and zooplankton in several European *Bonamia ostreae*-endemic areas and their possible role in the life cycle of this parasite. *Mar. Biol.* 149 (6): 1477-1487.

MA J, WANG Q, MA F & LIU M (1996) A pathogen of septicopyaemia in the abalone *Haliotis discus hannai* Ino. (Resumen). *J. Fish. China* 20 (4): 332-336.

MAAS PAY, KLEINSCHUSTER SJ, DYKSTRA MJ, SMOLOWITZ R & PARENT J (1999) Molecular characterization of QPX (quahog parasite unknown), a pathogen of *Mercenaria mercenaria*. *J. Shellfish Res.* 18 (2): 561-567.

MACIÁN MC, LUDWIG W, SCHLEIFER KH, PUJALTE MJ & GARAY E (2001a) *Vibrio agarivorans* sp. nov., a novel agarolytic marine bacterium. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51 (6): 2031-2036.

MACIÁN MC, LUDWIG W, AZNAR R, GRIMONT PAD, SCHLEIFER KH, GARAY E & PUJALTE MJ (2001b) *Vibrio lentus* sp. nov., isolated from Mediterranean oysters. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51 (4): 1449.

MACKIN JG & RAY SM (1966) The Taxonomic Relationships of *Dermocystidium marinum* Mackin, Owen, and Collier. *J. Invertebr. Pathol.* 8 (4): 544-545.

MACKIN JG, OWEN HM & COLLIER A (1950) Preliminary note on the occurrence of a New Protistan Parasite, *Dermocystidium marinum* n. sp. in *Crassostrea virginica*. *Science* 111 328-329.

MADICO G, AKOPYANTS NS & BERG DE (1995) Arbitrarily primed PCR DNA fingerprinting of *Escherichia coli* O157:H7 strains by using templates from boiled cultures. *J. Clin. Microbiol.* 33 (6): 1534-1536.

MARTEIL L (1976) La conchyliculture française. 2^{ème} partie. Biologie de l'huître et de la moule. *Rev. Trav. Inst. Pêch. Marit.* 40 (2): 149-346.

MARTY GD, BOWER SM, CLARKE KR, MEYER G, LOWE G, OSBORN AL, CHOW EP, HANNAH H, BYRNE S, SOJONKY K & ROBINSON JH (2006) Histopathology and a real-time PCR assay for detection of *Bonamia ostreae* in *Ostrea edulis* cultured in western Canada. *Aquaculture* 261 (1): 33-42.

MATSUYAMA Y, UCHIDA T, HONJO T & SHUMWAY SE (2001) Impacts of the harmful dinoflagellate, *Heterocapsa circularisquama*, on shellfish aquaculture in Japan. *J. Shellfish Res.* 20 (3): 1269-1272.

MCGLADDERY SE (2000) Technological constraints to disease prevention and control in aquatic animals, with special reference to pathogen detection. En: Walker P Subasinghe R, DNA-based molecular diagnostic techniques. Research needs for standardization and validation of the detection of aquatic animal pathogens and diseases. Vol. 395, F.A.O., Roma (Italia), págs. 17-24.

MCGLADDERY SE & STEPHENSON MF (1993) A viral infection of the gonads of eastern oyster (*Crassostrea virginica*) from Atlantic Canada. *Bull. Aquac. Assoc. Can.* 93 (4): 84-86.

MCGLADDERY SE, CAWTHORN RJ & BRADFORD BC (1991) *Perkinsus karlssoni* n. sp. (Apicomplexa) in bay scallops *Argopecten irradians*. *Dis. Aquat. Org.* 10 (2): 127-137.

MCGOVERN ER & BURRESON EM (1990) Ultrastructure of *Minchinia* sp. spores from shipworms (*Teredo* spp.) in the western North Atlantic, with a discussion of taxonomy of the Haplosporidiidae. *J. Protozool.* 37 (3): 212-218.

MCLAUGHLIN SM & FAISAL M (1999) A comparison of diagnostic assays for detection of *Perkinsus* spp. in the softshell clam *Mya arenaria*. *Aquaculture* 172 (1-2): 197-204.

MCHENERY JG & BIRKBECK TH (1986) Inhibition of filtration in *Mytilus edulis* L. by marine vibrios. *J. Fish Dis.* 9 (3): 257-261.

MEDLIN L, ELWOOD HJ, STICKEL S & SOGIN ML (1988) The characterization of enzymatically amplified eukaryotic 16S-like rRNA-coding regions. *Gene* 71 (2): 491-499.

- MEYER GR, BOWER SM & CARNEGIE RB (2005) Sensitivity of a digoxigenin-labelled DNA probe in detecting *Mikrocytos mackini*, causative agent of Denman Island disease (mikrocytosis), in oysters. *J. Invertebr. Pathol.* 88 (2): 89-94.
- MEYERS TR (1979) A reo-like virus isolated from juvenile American oysters (*Crassostrea virginica*). *J. Gen. Virol.* 43 (1): 203-212.
- MEYERS TR & HIRAI K (1980) Morphology of a reo-like virus isolated from juvenile American oysters (*Crassostrea virginica*). *J. Gen. Virol.* 46 (1): 249-253.
- MIALHE E, BOULO V, GRIZEL H, ROGIER H & PAOLUCCI F (1988) Monoclonal antibodies: a tool for molluscan pathology. En: Fisher WS (Ed.), Disease process in marine bivalve molluscs. Vol. 18, American Fisheries Society Special Publication, Bethesda (E.E.U.U.), págs. 304-310.
- MIYAZAKI T, GOTO K, KOBAYASHI T, KAGEYAMA T & MIYATA M (1999) Mass mortalities associated with a virus disease in Japanese pearl oysters *Pinctada fucata martensii*. *Dis. Aquat. Org.* 37 (1): 1-12.
- MONTES J, ANADÓN R & AZEVEDO C (1994) A possible life cycle for *Bonamia ostreae* on the basis of electron microscopy studies. *J. Invertebr. Pathol.* 63 (1): 1-6.
- MONTES J, FERRO-SOTO B, CONCHAS RF & GUERRA A (2003) Determining culture strategies in populations of the European flat oyster, *Ostrea edulis*, affected by bonamiosis. *Aquaculture* 220 (1-4): 175-182.
- MONTES JF, DURFORT M & GARCÍA-VALERO J (2001) Parasitism by the protozoan *Perkinsus atlanticus* favours the development of opportunistic infections. *Dis. Aquat. Org.* 46 (1): 57-66.
- MOORE BR, KLEEMAN SN & LESTER RJG (2002a) The development of a positive non-infectious control for the detection of *Perkinsus* using the Ray test. *J. Shellfish Res.* 21 (2): 871-873.
- MOORE J, ROBBINS T, FRIEDMAN C, HOOKER N, MCCORMICK T & NEUMAN M (2003) Preliminary pathological investigation of the white abalone, *Haliotis sorenseni*. *J. Shellfish Res.* 22 (1): 345-346.

MOORE JD, ROBBINS TT & FRIEDMAN CS (2000a) Withering Syndrome in Farmed Red Abalone *Haliotis rufescens*: Thermal Induction and Association with a Gastrointestinal Rickettsiales-like Prokaryote. *J. Aquat. Anim. Health* 12 (1): 26-34.

MOORE JD, ROBBINS TT & FRIEDMAN CS (2000b) The role of a Rickettsia-like prokaryote in withering syndrome in California red abalone, *Haliotis rufescens*. *J. Shellfish Res.* 19 (1): 525-526.

MOORE JD, ROBBINS TT, HEDRICK RP & FRIEDMAN CS (2001) Transmission of the Rickettsiales-like prokaryote "*Candidatus Xenohaliotis californiensis*" and its role in withering syndrome of California abalone, *Haliotis* spp. *J. Shellfish Res.* 20 (2): 867-874.

MOORE JD, FINLEY CA, FRIEDMAN CS & ROBBINS TT (2002b) Withering syndrome and restoration of southern California abalone populations. *Rep. Calif. Coop. Ocean. Fish. Invest.* 43 112-119.

MOSS JA & REECE KS (2005) Pathogens of the non-native oyster, *Crassostrea ariakensis*, in its native range: Current findings and work in progress. *J. Shellfish Res.* 24 (2): 668.

MOURTON C, BOULO V, CHAGOT D, HERVIO D, BACHERE E, MIALHE E & GRIZEL H (1992) Interactions between *Bonamia ostreae* (Protozoa: Ascetospora) and hemocytes of *Ostrea edulis* and *Crassostrea gigas* (Mollusca: Bivalvia): In vitro system establishment. *J. Invertebr. Pathol.* 59 (3): 235-240.

MOUTON A (2000) Health management and disease surveillance in abalone, *Haliotis midae*, in South Africa. *J. Shellfish Res.* 19 (1): 526.

MOYER MA, BLAKE NJ & ARNOLD WS (1993) An ascetosporan disease causing mass mortality in the Atlantic calico scallop, *Argopecten gibbus* (Linnaeus, 1758). *J. Shellfish Res.* 12 (2): 305-310.

MURRAY RG & STACKEBRANDT E (1995) Taxonomic note: implementation of the provisional status *Candidatus* for incompletely described procaryotes. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45 (1): 186-187.

MURRELL A, KLEEMAN SN, BARKER SC & LESTER RJG (2002) Synonymy of *Perkinsus olseni* Lester Davis, 1981 and *Perkinsus*

atlanticus Azevedo, 1989 and an update on the phylogenetic position of the genus *Perkinsus*. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.* 22 (4): 258-265.

MUSTERS W, BOON K, VAN DER SANDE CA, VAN HEERIKHUIZEN H & PLANTA RJ (1990) Functional analysis of transcribed spacers of yeast ribosomal DNA. *EMBO J.* 9 (12): 3989-3996.

NACIRI-GRAVEN Y, HAURE J, GÉRARD A & BAUD JP (1999) Comparative growth of *Bonamia ostreae* resistant and wild flat oyster *Ostrea edulis* in an intensive system II. Second year of the experiment. *Aquaculture* 171 (3-4): 195-208.

NAKATSUGAWA T, NAGAI T, HIYA K, NISHIZAWA T & MUROGA K (1999) A virus isolated from juvenile Japanese black abalone *Nordotis discus discus* affected with amyotrophy. *Dis. Aquat. Org.* 36 (2): 159-161.

NAVAS JI, CASTILLO MC, VERA P & RUIZ-RICO M (1992) Principal parasites observed in clams, *Ruditapes decussatus* (L.), *Ruditapes philippinarum* (Adam et Reeve), *Venerupis pullastra* (Montagu) and *Venerupis aureus* (Gmelin), from the Huelva coast (S.W. Spain). *Aquaculture* 107 (2-3): 193-199.

NICOLAS JL, COMPS M & COCHENNEC N (1992) Herpes-like virus infecting Pacific-oyster larvae, *Crassostrea gigas*. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.* 12 (1): 11-13.

NICOLAS JL, BASUYAUX O, MAZURIÉ J & THÉBAULT A (2002) *Vibrio carchariae*, a pathogen of the abalone *Haliotis tuberculata*. *Dis. Aquat. Org.* 50 (1): 35-43.

NICOLAS JL, CORRE S, GAUTHIER G, ROBERT R & D. A (1996) Bacterial problems associated with scallop *Pecten maximus* larval culture. *Dis. Aquat. Org.* 27 67-76.

NISHIMORI E, HASEGAWA O, NUMATA T & WAKABAYASHI H (1998) *Vibrio carchariae* causes mass mortalities in Japanese abalone, *Sulculus diversicolor supratexta*. *Fish Pathol.* 33 (5): 495-502.

NORÉN F, MOESTRUP Ø & REHNSTAM-HOLM AS (1999) *Parvilucifera infectans* Noren et Moestrup gen. et sp. nov. (Perkinsozoa

phylum nov.): A parasitic flagellate capable of killing toxic microalgae. *Eur. J. Protistol.* 35 (3): 233-254.

NORTON JH, PERKINS FP & LEDUA E (1993a) *Marteilia*-like infection in a giant clam, *Tridacna maxima*, in Fiji. *J. Invertebr. Pathol.* 61 (3): 328-330.

NORTON JH, SHEPHERD MA & PRIOR HC (1993b) Papovavirus-like infection of the golden-lipped pearl oyster, *Pinctada maxima*, from the Torres Strait, Australia. *J. Invertebr. Pathol.* 62 (2): 198-200.

NORTON JH, SHEPHERD MA, PERKINS FP & PRIOR HC (1993c) *Perkinsus*-like infection in farmed golden-lipped pearl oyster *Pinctada maxima* from the Torres Strait, Australia. *J. Invertebr. Pathol.* 62 (1): 105-106.

NOVOA B & FIGUERAS A (2000) Virus-like particles associated with mortalities of the carpet-shell clam *Ruditapes decussatus*. *Dis. Aquat. Org.* 39 (2): 147-149.

NOVOA B, ORDÁS MC & FIGUERAS A (2002) Hypnospores detected by RFTM in clam (*Ruditapes decussatus*) tissues belong to two different protozoan organisms, *Perkinsus atlanticus* and a *Perkinsus*-like organism. *Aquaculture* 209 (1-4): 11-18.

NOVOA B, BALSEIRO P & FIGUERAS A (2004) Molecular detection of a haplosporidian parasite in carpet shell clam *Ruditapes decussatus* from Spain. *Dis. Aquat. Org.* 61 89-93.

NOVOA B, POSADA D & FIGUERAS A (2005) Polymorphisms in the sequences of *Marteilia* internal transcribed spacer region of the ribosomal RNA genes (ITS-1) in Spain: genetic types are not related with bivalve hosts. *J. Fish Dis.* 28 (6): 331-338.

NUNAN LM, LIGHTNER DV, PANTOJA CR, STOKES NA & REECE KS (2006) Characterization of a rediscovered haplosporidian parasite from cultured *Penaeus vannamei*. *Dis. Aquat. Org.* 74 (1): 67-75.

O'BRIEN CH & SIZEMORE RK (1979) Distribution of the luminous bacterium *Beneckeia harveyi* in a semitropical estuarine environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 38 (5): 928-933.

O'DONOGHUE PJ, PHILLIPS PH & SHEPHERD SA (1991) *Perkinsus* (Protozoa: Apicomplexa) infections in abalone from South Australian waters. *Trans. R. Soc. S. Aust.* 115 (1-2): 77-82.

O'NEILL G, CULLOTY SC & MULCAHY MF (1998) The effectiveness of two routine diagnostic techniques for the detection of the protozoan parasite *Bonamia ostreae* (Pichot et al. 1980). *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.* 18 (4): 117-120.

O.I.E. (2006) Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals. Office International des Epizooties. Accesible en: http://www.oie.int/eng/normes/fmanual/A_summry.htm.

O.I.E. (2007) Código sanitario para los animales acuáticos. Office International des Epizooties. Accesible en: http://www.oie.int/esp/normes/fcode/es_sommaire.htm.

ODA T, SATO Y, KIM D, MURAMATSU T, MATSUYAMA Y & HONJO T (2001) Hemolytic activity of *Heterocapsa circularisquama* (Dinophyceae) and its possible involvement in shellfish toxicity. *J. Phycol.* 37 (4): 509-516.

OLIVARES CA (2005) Evidence of a parasite protist in *Eurhomalea lenticularis* (Sowerby, 1835) (Mollusca: Bivalvia): A case of intraoocytarian parasitism. *J. Nat. Hist.* 39 (23): 2073-2082.

OLIVER LM, FISHER WS, WINSTEAD JT, HEMMER BL & LONG ER (2001) Relationships between tissue contaminants and defense-related characteristics of oysters (*Crassostrea virginica*) from five Florida bays. *Aquat. Toxicol.* 55 (3-4): 203-222.

OLSON RE & PIERCE J (1988) Occurrence of the nuclear inclusion parasite in Oregon razor clams (*Siliqua patula*). *J. Invertebr. Pathol.* 52 (1): 198-199.

OPRANDY JJ, CHANG PW, PRONOVOST AD, COOPER KR, BROWN RS & YATES VJ (1981) Isolation of a viral agent causing hematopoietic neoplasia in the soft-shell clam, *Mya arenaria*. *J. Invertebr. Pathol.* 38 (1): 45-51.

ORDÁS MC, GÓMEZ-LEÓN J & FIGUERAS A (2001) Histopathology of the infection by *Perkinsus atlanticus* in three clam species (*Ruditapes*

decussatus, *R. philippinarum* and *R. pullastra*) from Galicia (NW Spain). *J. Shellfish Res.* 20 (3): 1019-1024.

ORMIÈRES R (1980) *Haplosporidium parisi* n. sp., de *Serpula vermicularis* L. Étude ultrastructurale de la spore. *Protistologica.* 16 (3): 467-474.

OTSU R & SASAKI K (1997) Virus-like particles detected from juvenile abalones (*Nordotis discus discus*) reared with an epizootic fatal wasting disease. *J. Invertebr. Pathol.* 70 (2): 167-168.

PAGE RDM & HOLMES EC (1998) *Molecular Evolution: A Phylogenetic Approach.* 1^a Ed. Blackwell Science, Londres (Reino Unido), 346 págs.

PAILLARD C (2004) A short-review of brown ring disease, a vibriosis affecting clams, *Ruditapes philippinarum* and *Ruditapes decussatus*. *Aquat. Living Resour.* 17 (4): 467-475.

PAILLARD C & MAES P (1989) Origine pathogène de l' "anneau brun" chez *Tapes philippinarum* (Mollusque, bivalve). *C. R. Séances Acad. Sci., Sér. III, Sci. Vie* 309 235-241.

PAILLARD C, LE ROUX F & BORREG JJ (2004) Bacterial disease in marine bivalves, a review of recent studies: Trends and evolution. *Aquat. Living Resour.* 17 (4): 477-498.

PASS DA, DYBDAHL R & MANNION MM (1987) Investigations into the causes of mortality of the pearl oyster, *Pinctada maxima* (Jamson), in Western Australia. *Aquaculture* 65 (2): 149-169.

PAZOS AJ, ROMAN G, ACOSTA CP, ABAD M & SANCHEZ JL (1997) Seasonal changes in condition and biochemical composition of the scallop *Pecten maximus* L. from suspended culture in the Ria de Arousa (Galicia, N.W. Spain) in relation to environmental conditions. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 211 (2): 169-193.

PECHER WT, ROBLEDO JAF & VASTA GR (2004) Identification of a second rRNA gene unit in the *Perkinsus andrewsi* genome. *J. Eukaryot. Microbiol.* 51 (2): 234-245.

PEDERSEN K, VERDONCK L, AUSTIN B, AUSTIN DA, BLANCH AR, GRIMONT PAD, JOFRE J, KOBLAVI S, LARSEN JL, TIANINEN T, VIGNEULLE M & SWINGS J (1998) Taxonomic evidence that *Vibrio carchariae* Grimes et al. 1985 is a junior synonym of *Vibrio harveyi* (Johnson and Shunk 1936) Baumann et al. 1981. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48 (3): 749.

PENNA MS, KHAN M & FRENCH RA (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). *Mol. Cell. Probes* 15 (6): 385-390.

PERKINS FO (1975) Fine structure of *Minchinia* sp. (Haplosporida) sporulation in the mud crab *Panopeus herbstii*. *Mar. Fish. Rev.* 37 (1): 46-60.

PERKINS FO (1976) Ultrastructure of sporulation in the European flat oyster pathogen, *Marteilia refringens* - taxonomic implications. *J. Protozool.* 23 (1): 64-74.

PERKINS FO (1988) Structure of protistan parasites found in bivalve molluscs. En: Fisher WS (Ed.), Disease processes in marine bivalve molluscs. Vol. 18, American Fisheries Society Special Publication, Bethesda, MD (E.E.U.U.), págs. 93-111.

PERKINS FO (1990) Phylum Haplosporidia. En: Margulis L, Corliss JO, Melkonian M, Chapman DJ (Eds.), Handbook of Protoctista. Jones & Bartlett, Boston (E.E.U.U.), págs. 19-29.

PERKINS FO (1991) 'Sporozoa': Apicomplexa, Microsporidia, Haplosporidia, Paramyxia, Myxosporidia and Actinosporidia. En: Harrison FW, Corliss JO (Eds.), Microscopic Anatomy of Invertebrates. Vol. 1, Wiley-Liss Inc., Nueva York (E.E.U.U.), págs. 261-331.

PERKINS FO (1996) The structure of *Perkinsus marinus* (Mackin, Owen and Collier, 1950) Levine, 1978 with comments on taxonomy and phylogeny of *Perkinsus* spp. *J. Shellfish Res.* 15 (1): 67-87.

PERKINS FO (2000) Phylum Haplosporidia Caullery & Mesnil, 1899. En: Lee JJ, Leedale GF, Bradbury P (Eds.), An Illustrated Guide to the

Protozoa. 2, Society of Protozoologists, Lawrence (E.E.U.U.), págs. 1328-1341.

PETKEVICIUTE R, STUNZENAS V & STANEVICIUTE G (2004) Cytogenetic and sequence comparison of adult *Phyllodistomum* (Digenea: Gorgoderidae) from the three-spined stickleback with larvae from two bivalves. *Parasitology* 129 (6): 771-778.

PFEIFFER DU (2002) Veterinary Epidemiology- An introduction. 1ª Ed. University of London, Londres (Reino Unido), 60 págs.

PICHOT Y, COMPS M, TIGÉ G, GRIZEL H & RABOUIN MA (1980) Recherches sur *Bonamia ostreae* gen. n., sp. n., parasite nouveau d l'huître plate *Ostrea edulis* L. *Rev. Trav. Inst. Pêch. Marit.* 43 (1): 131-140.

PILLAY TVR (1997) Acuicultura: principios y prácticas. 1ª Ed. Editorial Limusa, México D.F. (México), 699 págs.

PODER M, CAHOUR A & BALOUET G (1982) Haemocytic parasitosis in european oyster *Ostrea edulis* L.: pathology and contamination. En: Burges HD, Payne CC (Eds.), Proceedings of the International Colloquium on Invertebrate Pathology. XVth Annu. Meet., Soc. Invertebr. Pathol. University of Sussex, Brighton (Reino Unido), págs. 254-257.

POLANCO E, MONTES J, OUTON MJ & M.I. M (1984) Situation pathologique du stock d'huîtres plates en Galice (Espagne) en relation avec *Bonamia ostreae*. *Haliotis* 14 (1): 91-95.

POWELL EN, WHITE ME, WILSON EA & RAY SM (1988) The spatial distribution of *Perkinsus marinus* in relation to its oyster host and an ectoparasitic snail *Boonea impressa*. *J. Shellfish Res.* 7 (1): 204.

POYNTON SL, REIMSCHUSSEL R & STOSKOPF MK (1992) *Aggregata dobelli* n. sp. and *Aggregata millerorum* n. sp. (Apicomplexa: Aggregatidae) from two species of octopus (Mollusca: Octopodidae) from the eastern North Pacific Ocean. *J. Protozool.* 39 (1): 248-256.

PRAYITNO SB & LATCHFORD JW (1995) Experimental infections of crustaceans with luminous bacteria related to *Photobacterium* and

Vibrio. Effect of salinity and pH on infectiosity. *Aquaculture* 132 (1-2): 105-112.

PRINCE JS (2003) A presumptive Alphavirus in the gastropod mollusc, *Aplysia californica*. *Bull. Mar. Sci.* 73 (3): 673-677.

RAGAN MA, MACCALLUM GS, MURPHY CA, CANNONE JJ, GUTELL RR & MCGLADDERY SE (2000) Protistan parasite QPX of hard-shell clam *Mercenaria mercenaria* is a member of Labyrinthulomycota. *Dis. Aquat. Org.* 42 (3): 185-190.

RAGAN MA, GOGGIN CL, CAWTHORN RJ, CERENIUS L, JAMIESON AV, PLOURDE SM, RAND TG, SODERHALL K & GUTELL RR (1996) A novel clade of protistan parasites near the animal-fungal divergence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93 (21): 11907-11912.

RAGHUKUMAR C & LANDE V (1988) Shell disease of rock oyster *Crassostrea cucullata*. *Dis. Aquat. Org.* 4 (1): 77-81.

RAIMONDI PT, WILSON CM, AMBROSE RF, ENGLE JM & MINCHINTON TE (2002) Continued declines of black abalone along the coast of California: Are mass mortalities related to El Niño events? *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 242 (1): 143-152.

RASMUSSEN LPD (1986a) Virus-associated granulocytomas in the marine mussel, *Mytilus edulis*, from three sites in Denmark. *J. Invertebr. Pathol.* 48 (1): 117-123.

RASMUSSEN LPD (1986b) Occurrence, prevalence and seasonality of neoplasia in the marine mussel *Mytilus edulis* from three sites in Denmark. *Mar. Biol.* 92 (1): 59-64.

RAY SM (1952) A culture technique for the diagnosis of infections with *Dermocystidium marinum* Mackin, Owen, and Collier in oysters. *Science* 116 (3014): 360-361.

RAY SM (1954) Biological studies of *Dermocystidium marinum*. 1^a Ed. The Rice Institut Pamphlet. Special- Issue, Houston (E.E.U.U.), 114 págs.

RAY SM (1996) Historical perspective on *Perkinsus marinus* disease of oysters in the Gulf of Mexico. *J. Shellfish Res.* 15 (1): 9-11.

RAYYAN A, PHOTIS G & CHINTIROGLOU CC (2004) Metazoan parasite species in cultured mussel *Mytilus galloprovincialis* in the Thermaikos Gulf (North Aegean Sea, Greece). *Dis. Aquat. Org.* 58 (1): 55-62.

REECE KS & STOKES NA (2003) Molecular analysis of a haplosporidian parasite from cultured New Zealand abalone *Haliotis iris*. *Dis. Aquat. Org.* 53 (1): 61-66.

REECE KS, GRAVES JE & BUSHEK D (1996) Development of molecular markers for population genetic analysis of *Perkinsus marinus*. *J. Shellfish Res.* 15 (2): 477-478.

REECE KS, BUSHEK D & GRAVES JE (1997a) Molecular markers for population genetic analysis of *Perkinsus marinus*. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 6 (3): 197-206.

REECE KS, SIDDALL ME, BURRESON EM & GRAVES JE (1997b) Phylogenetic analysis of *Perkinsus* based on actin gene sequences. *J. Parasitol.* 83 (3): 417-423.

REECE KS, BURRESON EM, BOWER SM & DUNGAN CF (2000) Molecular analyses of a parasite in prawns (*Pandalus platyceros*) from British Columbia, Canada. *J. Shellfish Res.* 19 (1): 647.

REECE KS, BUSHEK D, HUDSON KL & GRAVES JE (2001) Geographic distribution of *Perkinsus marinus* genetic strains along the Atlantic and Gulf coasts of the USA. *Mar. Biol.* 139 (6): 1047-1055.

REECE KS, SIDDALL ME, STOKES NA & BURRESON EM (2004) Molecular phylogeny of the Haplosporidia based on two independent gene sequences. *J. Parasitol.* 90 (5): 1111-1122.

RENAULT T (1996) Appearance and spread of diseases among bivalve molluscs in the northern hemisphere in relation to international trade. *Rev. Sci. Tech.* 15 (2): 551-561.

RENAULT T & COCHENNEC N (1995) *Chlamydia*-like organisms in ctenidia and mantle cells of the Japanese oyster *Crassostrea gigas* from the French Atlantic coast. *Dis. Aquat. Org.* 23 (2): 153-159.

RENAULT T & NOVOA B (2004) Viruses infecting bivalve molluscs. *Aquat. Living Resour.* 17 (4): 397-409.

RENAULT T, LIPART C & ARZUL I (2001) A herpes-like virus infects a non-ostreid bivalve species: virus replication in *Ruditapes philippinarum* larvae. *Dis. Aquat. Org.* 45 (1): 1-7.

RENAULT T, LE DEUFF RM, COCHENNEC N, CHOLLET B & MAFFART P (1995) Herpes-like viruses associated with high mortality levels in larvae and spat of Pacific oysters, *Crassostrea gigas*: A comparative study, the thermal effects on virus detection in hatchery-reared larvae, reproduction of the disease in axenic larvae. *Vet. Res.* 26 (5-6): 539-543.

RENAULT T, STOKES NA, CHOLLET B, COCHENNEC N, BERTHE FCJ, GERARD A & BURRESON EM (2000) Haplosporidiosis in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* from the French Atlantic coast. *Dis. Aquat. Org.* 42 (3): 207-214.

RIQUELME JL, HAYASHIDA G, TORANZO AE, VILCHES J & CHÁVEZ P (1995) Pathogenicity studies on a *Vibrio anguillarum*-related (VAR) strain causing an epizootic in *Argopecten purpuratus* larvae cultured in Chile. *Dis. Aquat. Org.* 22 (2): 135-141.

ROBLEDO JAF & FIGUERAS A (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, Spain. *J. Parasitol.* 81 (3): 354-363.

ROBLEDO JAF, SANTARÉM MM & FIGUERAS A (1994a) Parasite loads of rafted blue mussels (*Mytilus galloprovincialis*) in Spain with special reference to the copepod, *Mytilicola intestinalis*. *Aquaculture* 127 (4): 287-302.

ROBLEDO JAF, CÁCERES-MARTÍNEZ J & FIGUERAS A (1994b) *Marteilia refringens* in mussel (*Mytilus galloprovincialis* Lmk.) beds in Spain. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.* 14 (2): 61-63.

ROBLEDO JAF, CACERES MARTINEZ J & FIGUERAS A (1994c) *Mytilicola intestinalis* and *Proctoeces maculatus* in mussel (*Mytilus galloprovincialis* Lmk.) beds in Spain. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.* 14 (3): 89-91.

ROBLEDO JAF, MIALHE E & FIGUERAS A (1995) Purification of several phases of the parasite *Marteilia* (Protozoa: Ascetospora) from mussels (*Mytilus galloprovincialis*). En: Stolen JS, Fletcher TC, Smith SA, Zelikoff JT, Kaatari SL, Anderson RS, Söderhäll K, Weeks-Perkins BA (Eds.), *Techniques in Fish Immunology*. Vol. 4, S.O.S. Publications, Fair Haven (E.E.U.U.), págs. 117-121.

ROBLEDO JAF, COSS CA & VASTA GR (2000) Characterization of the ribosomal RNA locus of *Perkinsus atlanticus* and development of a polymerase chain reaction-based diagnostic assay. *J. Parasitol.* 86 (5): 972-978.

ROBLEDO JAF, CÁCERES-MARTÍNEZ J, SANTARÉM MM & FIGUERAS A (1993) Últimos avances en patología mejillón cultivado en Galicia. En: Cervino A, Landin A, de Coó A, Guerra A, Torre M (Eds.), *Actas del IV Congreso Nacional de Acuicultura*. Centro de Investigaciones Mariñas, Vilanova de Arousa (España), págs. 545-549.

ROBLEDO JAF, CÁCERES-MARTÍNEZ J, SLUYS R & FIGUERAS A (1994d) The parasitic turbellarian *Urastoma cyprinae* (Platyhelminthes: Urastomidae) from blue mussel *Mytilus galloprovincialis* in Spain: occurrence and pathology. *Dis. Aquat. Org.* 18 (3): 203-210.

ROBLEDO JAF, WRIGHT AC, MARSH AG & VASTA GR (1999) Nucleotide sequence variability in the nontranscribed spacer of the rRNA locus in the oyster parasite *Perkinsus marinus*. *J. Parasitol.* 85 (4): 650-656.

ROGAN E, CULLOTY SC, CORSS TF & MULCAHY MF (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 (4): 311-315.

ROUGHLEY TC (1926) An investigation of the cause of an oyster mortality on the Georges River, New South Wales. *Proc. Linn. Soc. N.S.W.* 51 (1): 446-491.

RUCK KR & COOK PA (1998) Sabellid infestations in the shells of South African molluscs: implications for abalone mariculture. *J. Shellfish Res.* 17 (2): 693-699.

RUSSELL S, FRASCA S, JR., SUNILA I & FRENCH RA (2004) Application of a multiplex PCR for the detection of protozoan pathogens of the eastern oyster *Crassostrea virginica* in field samples. *Dis. Aquat. Org.* 59 (1): 85-91.

SAEED MO (1995) Association of *Vibrio harveyi* with mortalities in cultured marine fish in Kuwait. *Aquaculture* 136 (1-2): 21-29.

SAGRISTÀ E, DURFORT M & AZEVEDO C (1995) *Perkinsus* sp. (Phylum Apicomplexa) in Mediterranean clam *Ruditapes semidecussatus*: Ultrastructural observations of the cellular response of the host. *Aquaculture* 132 (1-2): 153-160.

SALDARRIAGA JF, MCEWAN ML, FAST NM, TAYLOR FJ & KEELING PJ (2003) Multiple protein phylogenies show that *Oxyrrhis marina* and *Perkinsus marinus* are early branches of the dinoflagellate lineage. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53 (1): 355-365.

SARDELLA NH, RE ME & TIMI JT (2000) Two new *Aggregata* species (Apicomplexa: Aggregatidae) infecting *Octopus tehuelchus* and *Enteroctopus megalocyathus* (Mollusca: Octopodidae) in Patagonia, Argentina. *J. Parasitol.* 86 (5): 1107-1113.

SAWABE T, SUGIMURA I, OHTSUKA M, NAKANO K, TAJIMA K, EZURA Y & CHRISTEN R (1998) *Vibrio halioticoli* sp. nov., a non-motile alginolytic marine bacterium isolated from the gut of the abalone *Haliotis discus hannai*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48 (2): 573-580.

SAWABE T, HAYASHI K, MORIWAKI J, FUKUI Y, THOMPSON FL, SWINGS J & CHRISTEN R (2004a) *Vibrio neonatus* sp. nov. and *Vibrio ezurae* sp. nov. isolated from the gut of Japanese abalones. *Syst. Appl. Microbiol.* 27 (5): 527-534.

SAWABE T, HAYASHI K, MORIWAKI J, THOMPSON FL, SWINGS J, POTIN P, CHRISTEN R & EZURA Y (2004b) *Vibrio gallicus* sp. nov., isolated from the gut of the French abalone *Haliotis tuberculata*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54 (3): 843-886.

SCHLICHT FG & MACKIN JG (1968) *Hexamita nelsoni* sp.n. (Polymastigina: Hexamitidae) parasitic in oysters. *J. Invertebr. Pathol.* 11 (1): 35-39.

SHAW BL & BATTLE HI (1957) The gross and microscopic anatomy of the digestive tract of the oyster *Crassostrea virginica* (Gmelin). *Can. J. Zool.* 35 (2): 325-347.

SHERRILL J, SPELMAN LH, REIDEL CL & MONTALI RJ (2000) Common cuttlefish (*Sepia officinalis*) mortality at the national zoological park: implications for clinical management. *J. Zoo Wildl. Med.* 31 (4): 523-531.

SIDDALL ME, REECE KS, GRAVES JE & BURRESON EM (1997) 'Total evidence' refutes the inclusion of *Perkinsus* species in the phylum Apicomplexa. *Parasitology* 115 (2): 165-176.

SINDERMANN CJ (1990) Principal diseases of marine fish and shellfish. Diseases of marine shellfish. 2^a Ed. Academic Press, San Diego (E.E.U.U.), 516 págs.

SONIAT TM (1996) Epizootiology of *Perkinsus marinus* disease of eastern oysters in the Gulf of Mexico. *J. Shellfish Res.* 15 (1): 35-43.

SOTO M, PASCUAL S, RODRIGUEZ H, GESTAL C, ABOLLO E, ARIAS C & ESTEVEZ J (1996) *Nematopsis* spp. Schneider, 1892 (Apicomplexa: Gregarinida) in bivalve molluscs off Ria de Vigo (Galicia, NW Spain). *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.* 16 (5): 157-160.

SPRAGUE V (1963) Revision of genus *Haplosporidium* and restoration of genus *Minchinia* (Haplosporidia, Haplosporidiidae). *J. Protozool.* 10 (3): 263-266.

STEEL S & MULCAHY MF (2001) Impact of the copepod *Mytilicola orientalis* on the Pacific oyster *Crassostrea gigas* in Ireland. *Dis. Aquat. Org.* 47 (2): 145-149.

STEINBECK JR, GROFF JM, FRIEDMAN CS, MCDOWELL T & HEDRICK RP (1992) Investigations into a mortality among populations of the California black abalone, *Haliotis cracherodii*, on the central coast of California, USA. En: Shepherd SA, Tegner MJ, Próo Gd (Eds.), Abalone of the world. Biology, Fisheries and Culture.

Proceedings of the 1st international symposium on abalone. Fishing News Books, La Paz (México), págs. 203-213.

STELTER K, EL-SAYED NM & SEEBER F (2007) The Expression of a Plant-type Ferredoxin Redox System provides Molecular Evidence for a Plastid in the Early Dinoflagellate *Perkinsus marinus*. *Protist* 158 (1): 119-130.

STEVENSON M (2005) An introduction to veterinary epidemiology. 1^a Ed. Massey University, Palmerston North (Nueva Zelanda), 90 págs.

STOKES NA & BURRESON EM (2001) Differential diagnosis of mixed *Haplosporidium costale* and *Haplosporidium nelsoni* infections in the eastern oyster, *Crassostrea virginica*, using DNA probes. *J. Shellfish Res.* 20 (1): 207-213.

STOKES NA, SIDDALL ME & BURRESON EM (1995) Small subunit ribosomal RNA gene sequence of *Minchinia teredinis* (Haplosporidia: Haplosporidiidae) and a specific DNA probe and PCR primers for its detection. *J. Invertebr. Pathol.* 65 (3): 300-308.

STOKES NA, WALKER JG & BURRESON EM (1996) Comparison of *Haplosporidium nelsoni* diagnostic techniques: Polymerase chain reaction outperforms histology. *J. Shellfish Res.* 15 (2): 498.

STOKES NA, CARNEGIE R, CROCKETT R, BURRESON E & BISHOP M (2005) Molecular insights into *Bonamia* spp. infections in native and non-native oysters in North Carolina. *J. Shellfish Res.* 24 (2): 678.

SUGUMAR G, NAKAI T, HIRATA Y, MATSUBARA D & MUROGA K (1998) *Vibrio splendidus* biovar II as the causative agent of bacillary necrosis of Japanese oyster *Crassostrea gigas* larvae. *Dis. Aquat. Org.* 33 (2): 111-118.

SUNILA I, KAROLUS J, LANG EP, MROCKA ME & VOLK J (2000) Transmission of the haplosporidian parasite MSX *Haplosporidium nelsoni* to the eastern oyster *Crassostrea virginica* in an upweller system. *Dis. Aquat. Org.* 42 (2): 153-155.

SUNILA I, STOKES NA, SMOLOWITZ R, KARNEY RC & BURRESON EM (2002) *Haplosporidium costale* (seaside organism), a parasite of the eastern oyster, is present in Long Island Sound. *J. Shellfish Res.* 21 (1): 113-118.

TAYLOR RL (1966) *Haplosporidium tumefaciens* sp. n., the etiologic agent of a disease of the California sea mussel, *Mytilus californianus* Conrad. *J. Invertebr. Pathol.* 8 (1): 109-121.

TELES-GRILO ML, TATO-COSTA J, DUARTE SM, MAIA A, CASAL G & AZEVEDO C (2007) Is there a plastid in *Perkinsus atlanticus* (Phylum Perkinsozoa)? *Eur. J. Protistol.* 43 (2): 163-167.

TELES-GRILO ML, DUARTE SM, TATO-COSTA J, GASPAR-MAIA A, OLIVEIRA C, ROCHA AA, MARQUES A, CORDEIRO-DA-SILVA A & AZEVEDO C (2007) Molecular karyotype analysis of *Perkinsus atlanticus* (Phylum Perkinsozoa) by pulsed field gel electrophoresis. *Eur. J. Protistol.* 43 (4): 315-318.

TENDENCIA EA (2002) *Vibrio harveyi* isolated from cage-cultured seabass *Lates calcarifer* Bloch in the Philippines. *Aquacult. Res.* 33 (6): 455-458.

THÉBAULT A, BERGMAN S, POUILLOT R, LE ROUX F & BERTHE FCJ (2005) Validation of *in situ* hybridisation and histology assays for the detection of the oyster parasite *Marteilia refringens*. *Dis. Aquat. Org.* 65 (1): 9-16.

THOMPSON FL, THOMPSON CC & SWINGS J (2003a) *Vibrio tasmaniensis* sp. nov., isolated from Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Syst. Appl. Microbiol.* 26 (1): 65-69.

THOMPSON FL, IIDA T & SWINGS J (2004) Biodiversity of vibrios. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 68 (3): 403-431.

THOMPSON FL, THOMPSON CC, HOSTE B, VANDEMEULEBROECKE K, GULLIAN M & SWINGS J (2003b) *Vibrio fortis* sp. nov. and *Vibrio hepatarius* sp. nov., isolated from aquatic animals and the marine environment. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53 (5): 1495-1501.

THOMPSON FL, GEVERS D, THOMPSON CC, DAWYNDT P, NASER S, HOSTE B, MUNN CB & SWINGS J (2005) Phylogeny and molecular identification of vibrios on the basis of multilocus sequence analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 71 (9): 5107-5115.

THOMPSON JD, HIGGINS DG & GIBSON TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22 (22): 4673-4680.

TIGÉ G & RABOUIN MA (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, Comité de la Mariculture C.M.:1976/ K:21. Copenhague (Dinamarca).

TIGÉ G, GRIZEL H, RABOUIN MA, COCHENNEC N, AUDC G & LANGLADE A (1982) Maladie hémogtaire de l'huître plate causée par *Bonamia ostreae*: évolution de la situation épizootologique en Bretagne au cours de l'année 1981. *Sci. Pêche* 328 (1): 3-13.

TUBIASH HS, CHANLEY PE & LEIFSON E (1965) Bacillary necrosis, a disease of larval and juvenile bivalve mollusks. I. Etiology and epizootiology. *J. Bacteriol.* 90 (4): 1036-1044.

TUBIASH HS, COLWELL RR & SAKAZAKI R (1970) Marine vibrios associated with bacillary necrosis, a disease of larval and juvenile bivalve mollusks. *J. Bacteriol.* 103 (1): 271-272.

UNDERWOOD BO, SMALE CJ, BROWN F & HILL BJ (1977) Relationship of a virus from *Tellina tenuis* to infectious pancreatic necrosis virus. *J. Gen. Virol.* 36 (1): 93-109.

VAN BANNING P (1977) *Minchinia armoricana* sp. nov. (Haplosporida), a parasite of the European flat oyster, *Ostrea edulis*. *J. Invertebr. Pathol.* 30 (2): 199-206.

VAN BANNING P (1979) Protistan parasites observed in the European flat oyster (*Ostrea edulis*) and the cockle (*Cerastoderma edule*) from some coastal areas of the Netherlands. *Haliotis* 8 (1): 33-37.

VAN BANNING P (1987) Further results of the *Bonamia ostreae* challenge tests in Dutch oyster culture. *Aquaculture* 67 (1-2): 191-194.

VAN BANNING P (1990) The life cycle of the oyster pathogen *Bonamia ostreae* with a presumptive phase in the ovarian tissue of the European flat oyster, *Ostrea edulis*. *Aquaculture* 84 (2): 189-192.

VAN BANNING P (1991) Observations on bonamiasis 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 (3): 205-211.

VAN BLARICOM GR, RUEDIGER JL, FRIEDMAN CS, WOODARD DD & HEDRICK RP (1993) Discovery of withering syndrome among black abalone *Haliotis cracherodii* Leach, 1814, populations at San Nicolas Island, California. *J. Shellfish Res.* 12 (2): 185-188.

VAN DOVER CL, WARD ME, SCOTT JL, UNDERDOWN J, ANDERSON B, GUSTAFSON C, WHALEN M & CARNEGIE RB (2007) A fungal epizootic in mussels at a deep-sea hydrothermal vent. *Mar. Ecol.* 28 (1): 54-62.

VAN NUES RW, RIENTJES JM, VAN DER SANDE CA, ZERP SF, SLUITER C, VENEMA J, PLANTA RJ & RAUE HA (1994) Separate structural elements within internal transcribed spacer 1 of *Saccharomyces cerevisiae* precursor ribosomal RNA direct the formation of 17S and 26S rRNA. *Nucleic Acids Res.* 22 (6): 912-919.

VANDENBERGHE J, LI Y, VERDONCK L, LI J, SORGELOOS P, XU HS & SWINGS J (1998) *Vibrios* associated with *Penaeus chinensis* (Crustacea: Decapoda) larvae in Chinese shrimp hatcheries. *Aquaculture* 169 (1-2): 121.

VÁSQUEZ-YEOMANS R, CÁCERES-MARTINEZ J & HUERTA AF (2004) Herpes-like virus associated with eroded gills of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* in Mexico. *J. Shellfish Res.* 23 (2): 417-419.

VILLALBA A, LOPEZ MC & CARBALLAL MJ (1993a) Parasites and pathologic conditions of three clam species, *Ruditapes decussatus*, *Venerupis pullastra*, and *Venerupis rhomboides*, in the Galician Rias. En: Cervino A, Landín A, de Coo A, Guerra A, Torre M (Eds.), *Actas del IV Congreso Nacional de Acuicultura*. Centro de Investigaciones Marinas, Vilanova de Arousa (España), págs. 551-556.

VILLALBA A, MOURELLE SG, CARBALLAL MJ & LOPEZ MC (1993b) Effects of infection by the protistan parasite *Marteilia refringens* on the reproduction of cultured mussels *Mytilus galloprovincialis* in Galicia (NW Spain). *Dis. Aquat. Org.* 17 (3): 205-213.

VILLALBA A, MOURELLE SG, CARBALLAL MJ & LOPEZ C (1997) Symbionts and diseases of farmed mussels *Mytilus galloprovincialis* throughout the culture process in the Rias of Galicia (NW Spain). *Dis. Aquat. Org.* 31 (2): 127-139.

VILLALBA A, CASAS MC, LÓPEZ C & CARBALLAL MJ (2005) Study of perkinsiosis in the carpet shell clam *Tapes decussatus* in Galicia (NW Spain). II. Temporal pattern of disease dynamics and association with clam mortality. *Dis. Aquat. Org.* 65 (3): 257-267.

VILLALBA A, MOURELLE SG, LOPEZ MC, CARBALLAL MJ & AZEVEDO C (1993c) Marteliiasis affecting cultured mussels *Mytilus galloprovincialis* of Galicia (NW Spain). I. Etiology, phases of the infection, and temporal and spatial variability in prevalence. *Dis. Aquat. Org.* 16 (1): 61-72.

VILLALBA A, REECE KS, ORDÁS MC, CASAS MC & FIGUERAS A (2004) Perkinsiosis in molluscs: A review. *Aquat. Living Resour.* 17 (4): 411-432.

VIRVILIS C & ANGELIDIS P (2006) Presence of the parasite *Marteilia* sp. in the flat oyster (*Ostrea edulis* L) in Greece. *Aquaculture* 259 (1-4): 1-5.

VIRVILIS C, ANGELIDIS P & PHOTIS G (2003) Presence of the parasite *Marteilia* sp. in the shellfish of the Thermaikos gulf in northern Greece. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.* 23 (4): 157-162.

VOLETY AK & CHU F-LE (1994) Comparison of infectivity and pathogenicity of meront (trophozoite) and prezoosporangiae stages of the oyster pathogen *Perkinsus marinus* in eastern oysters, *Crassostrea virginica* (Gmelin, 1791). *J. Shellfish Res.* 13 (2): 521-527.

WAECHTER M, LE ROUX F, NICOLAS JL, MARISSAL E & BERTHE FCJ (2002) Caractérisation de bactéries pathogènes de naissain d'huître creuse *Crassostrea gigas*. *C. R. Biol.* 325 (3): 231-238.

WANG H, GUO X, ZHANG G & ZHANG F (2004) Classification of jinjiang oysters *Crassostrea rivularis* (Gould, 1861) from China, based on morphology and phylogenetic analysis. *Aquaculture* 242 (1-4): 137-155.

WEBB SC & KORRUBEL JL (1994) Shell weakening in marine mytilids attributable to blue-green alga *Mastigocoleus* sp. (Nostochopsidaceae). *J. Shellfish Res.* 13 (1): 11-17.

WEINSTEIN JE (1997) Fluoranthene-induced histological alterations in oysters, *Crassostrea virginica*: Seasonal field and laboratory studies. *Mar. Environ. Res.* 43 (3): 201-218.

WHITE D & BURRESON E (2006) Determining Presence/Absence of *Sirolopidium Zoophthorum* spores and/or Hyphae in Specific Areas of the Chesapeake Bay and Nearby Ports. *EOS Trans. Am. Geophys. Union* 87 (36): suplemento.

WHITE ME, POWELL EN, RAY SM & WILSON EA (1987) Host-to-host transmission of *Perkinsus marinus* in oyster (*Crassostrea virginica*) populations by the ectoparasitic snail *Boonea impressa* (Pyramidellidae). *J. Shellfish Res.* 6 (1): 1-5.

WHYTE SK, CAWTHORN RJ & MCGLADDERY SE (1994) QPX (Quahaug Parasite X), a pathogen of northern quahaug *Mercenaria mercenaria* from the Gulf of St. Lawrence, Canada. *Dis. Aquat. Org.* 19 (2): 129-136.

WILSON EA, POWELL EN, CRAIG MA, WADE TL & BROOKS JM (1990) The distribution of *Perkinsus marinus* in Gulf Coast oysters: Its relationship with temperature, reproduction, and pollutant body burden. *Int. Rev. gesamten Hydrobiol.* 75 (4): 533-550.

WINSTEAD JT & COURTNEY LA (2003) Ovacystis-like condition in the eastern oyster *Crassostrea virginica* from the northeastern Gulf of Mexico. *Dis. Aquat. Org.* 53 (1): 89-90.

WOLF PH (1977) An unidentified protistan parasite in the ova of the blacklip oyster, *Crassostrea echinata*, from northern Australia. *J. Invertebr. Pathol.* 29 (2): 244-246.

WOLF PH (1979) Life cycle and ecology of *Marteilia sydneyi* in the Australian oyster, *Crassostrea commercialis*. *Mar. Fish. Rev.* 41 (1-2): 70-72.

YII K-C, YANG T-I & LEE K-K (1997) Isolation and characterization of *Vibrio carchariae*, a causative agent of gastroenteritis in the groupers, *Epinephelus coioides*. *Curr. Microbiol.* 35 (2): 109-115.

YOSHIMIZU M (1996) Disease problems of salmonid fish in Japan caused by international trade. *Rev. Sci. Tech.* 15 (2): 533-549.

ZABALETA AI & BARBER BJ (1996) Prevalence, intensity, and detection of *Bonamia ostreae* in *Ostrea edulis* L. in the Damariscotta River area, Maine. *J. Shellfish Res.* 15 (2): 395-400.

ZHANG XH & AUSTIN B (2000) Pathogenicity of *Vibrio harveyi* to salmonids. *J. Fish Dis.* 23 (2): 93-102.

ZORRILLA I, ARIJO S, CHABRILLON M, DÍAZ P, MARTÍNEZ-MANZANARES E, BALEBONA MC & MORIÑIGO MA (2003) *Vibrio* species isolated from diseased farmed sole, *Solea senegalensis* (Kaup), and evaluation of the potential virulence role of their extracellular products. *J. Fish Dis.* 26 (2): 103-108.

ZRNCIC S, LE ROUX F, ORAIC D, SOSTARIC B & BERTHE FCJ (2001) First record of *Marteilia* sp. in mussels *Mytilus galloprovincialis* in Croatia. *Dis. Aquat. Org.* 44 (2): 143-148.

APÉNDICE

Apéndice

A. Procesado citológico

Se elimina el agua sobrante del tejido y sobre un portaobjetos limpio se hace una serie de impresiones. Fijamos con etanol al 96% durante un minuto. Posteriormente, se hacen dos lavados en la solución Hemacolor-2 y tres lavados en la solución Hemacolor-3 del kit Hemacolor® de Merck. Se dan una serie de pases en agua hasta eliminar el colorante sobrante, se deja secar al aire y se montan las muestras con la resina DEPEX (BDH Chemicals) previamente a su observación al microscopio óptico.

B. Incubación en medio tioglicolato (Ray's Fluid Thioglycollate Medium, RFTM)

Se incuba en oscuridad durante 72h un fragmento del tejido a evaluar (normalmente branquia) en un tubo con yodo de lugol al que previamente se le ha adicionado 500 µl de micostatina.

Transcurrido este tiempo, se coloca el tejido sobre un portaobjetos y se añaden unas gotas de yodo de lugol. Se empapa bien el tejido con la ayuda de unas pinzas y se observa al microscopio óptico para detectar la presencia de hipnosporas esféricas de color azulado a negro.

Medio tioglicolato:

- Cloruro sódico 10g
- Medio de tioglicolato (Cultimed) 15 g
- Agua destilada 500 ml
- Llevar a ebullición y añadir 0.025g de cloranfenicol
- Repartir en tubos de 10 ml.
- Autoclavar y guardar en oscuridad

Micostatina:

- Nistatina (SIGMA)..... 1000000 U
- Agua destilada 250 ml

Yodo de lugol:

- Yoduro de potasio 0.9 g
- Yodo 0.6 g
- Agua destilada 45 ml

C. Procesado histológico de tejidos de moluscos

Fijación

Los tejidos de molusco para microscopía óptica se fijan en solución de Davidson y ácido acético (9:1) (Shaw y Battle, 1957) durante 24 horas, con una relación mínima de cinco volúmenes de fijador por un volumen de muestra. Los tejidos, en caso de no ser procesados inmediatamente, se mantienen en solución conservante de Davidson:

Solución conservante de Davidson:

Glicerina.....	100 ml
Formol.....	200 ml
99% alcohol.....	300 ml
Agua de mar filtrada.....	300 ml

Se debe agitar bien antes de usar

Para preparar la solución fijadora, añadir 100 ml de ácido acético

Deshidratación e inclusión en parafina

Se corta un fragmento de unos 5 mm de ancho que contenga la mayor parte de órganos posibles del animal y se sitúa en un cassette histológico convenientemente codificado para el posterior reconocimiento de la muestra.

Con la ayuda de un procesador automático de tejidos (Histokinette Reichert- Jung) se realiza la deshidratación del tejido en una serie creciente de alcoholes:

Alcohol 70%	1 hora
Alcohol 96%	2 horas
Alcohol 96%	2 horas
Alcohol 100%	2 horas
Alcohol 100%	2 horas
Etanol-Benceno	3 horas
Benceno.....	2 horas
Benceno.....	2 horas
Benceno-Parafina.....	3 horas
Parafina.....	2 horas
Parafina.....	2 horas

Corte

Sobre el propio cassette histológico, se orienta correctamente la muestra y se embebe en parafina líquida, que facilitará el corte.

Antes de realizar los cortes es importante desbastar y eliminar la parafina que pueda interferir al realizar el corte.

Colocar los bloques de parafina en solución ablandadora durante 24 horas.

Con la ayuda de un microtomo Reichert- Jung 2040 se cortan secciones de 5 μm . Las soluciones se depositan en un baño a 40°C, de donde se recogen en un portaobjetos con una gota de ovoalbúmina al 1% para facilitar la adhesión. Hasta su tinción, los cortes se mantienen a 40°C.

Solución ablandadora:

Glicerina.....	100ml
Agua destilada.....	500ml
Etanol 96%	1400ml

Tinción

Previamente, se desparafina la muestra mediante tres lavados en xileno a 35°C

Posteriormente, las muestras se rehidratan:

Alcohol 100°	5 minutos
Alcohol 100°	5 minutos
Alcohol 96°	5 minutos
Alcohol 10°	5 minutos
Agua destilada	5 minutos

Para teñir empleamos la tinción Hematoxilina de Harris-Eosina:

Hematoxilina de Harris	8 minutos
Agua destilada	2 minutos
Alcohol ácido	1 lavado
Agua corriente	5 minutos
Agua destilada	3 minutos
Alcohol 95%	3 minutos
Eosina amarillenta	3 minutos
Alcohol 95%	6 lavados

Alcohol ácido:

Alcohol 70%	99 ml
Ácido clorhídrico	1 ml

Hematoxilina de Harris:

Solución de Hematoxilina de Harris.....	200ml
Ácido acético glacial.....	14ml

Eosina amarillenta:

Eosina	0.2 g
Alcohol 100%	25 ml
Agua destilada	75 ml

Antes de usar se añade una gota de ácido clorhídrico.

Montaje

Se montan las muestras con una gota de Permount, colocando el portaobjetos cuidadosamente para evitar la formación de burbujas.

D. Cuantificación de ADN

La concentración de ADN se midió en un espectrofotómetro *RNA/DNA calculator GeneQuant* (Pharmacia Biotech). Para calcular la

concentración se empleó una modificación de la Ley de Beer-Lambert:

$$A_{260} = \epsilon \cdot c \cdot l \cdot d$$

donde A_{260} es la absorción de la muestra con una longitud de onda de 260nm, ϵ es el coeficiente de absorción atómica (en el caso de ADN bicatenario y linear $0.020 \mu\text{g ml}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), c la concentración medida en $\mu\text{g ml}^{-1}$, l la longitud de la celdilla y d la dilución de la muestra.

E. Clonación de secuencias

Los productos de PCR se ligan en el vector p-GEM T (Promega) o pCR 2.1 (Invitrogen Life Technologies). El vector recircularizado se emplea para transformar las bacterias competentes *Escherichia coli* Top 10 F'.

Se seleccionan los clones que presentan inserto por su crecimiento característico como colonias de color blanco en medio LB sólido enriquecido con ampicilina, IPTG y X-Gal. Mediante PCR con los cebadores *M13F* (5'-GTAAAACGACGGCCAG-3') y *M13R* (5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'), que se unen a unas secuencias diana presentes en el vector y que flanquean el punto de inserción de la secuencia clonada, se hace una selección de los clones que presentan el inserto del tamaño adecuado. La PCR se realiza con las siguientes condiciones en un volumen de 25 μl : 2.5 μl de tampón 10x (10 mM de Tris, 50 mM de KCl; pH 8.3), 2.75 mM de MgCl_2 , 0.4 mM de cada uno de los dNTPs, 0.4 μM de cada cebador y 0.025 U de *Taq* polimerasa. Se añade como ADN molde 1 μl de la solución resultante de hervir a

100°C durante 10 min una parte de la colonia en 100 µl de agua destilada estéril, ya que mediante este sistema es posible la extracción de ADN de organismos procariotas (Lan *et al.*, 1993; Madico *et al.*, 1995; Afghani y Stutman, 1996). Las reacciones consisten en una desnaturalización inicial a 94°C durante 5 min, 40 ciclos de una desnaturalización a 94°C durante 30 s, una fusión a 55°C durante 1 min y una extensión a 72°C durante 2 min. Finalmente, se permite una extensión final a 72°C durante 10 min. Los productos de PCR son visualizados y fotografiados tras ser separados en un gel de agarosa al 1% en tampón TAE (p/v) teñido con bromuro de etidio y mientras son iluminados con luz ultravioleta a 488 nm.

Los clones del tamaño esperado se seleccionan y se secuencian en un secuenciador *ABI Prism 377 DNA sequencer* (Applied Biosystems).

F. Protocolo de Hibridación *in situ*

Para el marcaje de la sonda contra *Bonamia ostreae*, *BoBoAs*, la PCR se realiza en un volumen de 50 µl con 5 µl de tampón 10x (10 mM de Tris, 50 mM de KCl; pH 8.3), 4 mM de MgCl₂, 0.2 mM de dATP, dCTP y dGTP, 0.19 mM de dTTP y 0.01 mM de digoxigenin-11-dUTP, 0.8 µM de los cebadores *Bo* y *BoAs*, 0.05U de la enzima *Taq* polimerasa y 2 µl del ADN molde. Como ADN molde se empleó el fragmento *BoBoAs* clonado en el vector p-GEM T. La reacción se realizó con el mismo patrón de temperaturas que en el caso de la PCR de detección.

La sonda contra *Perkinsus olseni* fue sintetizada en un volumen de 50 µl con 5µl de tampón 10x (10 mM de Tris, 50 mM KCl; pH 8.3),

4 mM de MgCl₂, 0.2 mM de dATP, dCTP y dGTP, 0.19 mM de dTTP y 0.01 mM de digoxigenin-11-dUTP, 0.4 μM de los cebadores *Pk-ITS1 S* y *Pk-ITS2 As* y 0.05 U de la enzima *Taq* polimerasa y 2 μl del producto de PCR con los cebadores *Perk ITS S* y *Perk ITS As* (Kotob *et al.*, 1999a). La reacción se llevó a cabo con el mismo patrón de temperaturas que en el caso de la PCR de detección.

Las PCR para la obtención de sonda se acompañaron de las correspondientes PCR de detección con el mismo ADN molde para corroborar el marcaje del producto de amplificación. Los productos resultantes de las dos amplificaciones (con y sin digoxigenina) se corrieron paralelamente en el mismo gel de agarosa al 1% (p/v) en tampón TAE teñido con bromuro de etidio y se visualizaron con luz ultravioleta a 488 nm. El producto de PCR marcado migra un poco menos que el de la PCR sin marcar debido a la presencia de la digoxigenina.

Se cortaron secciones embebidas en parafina de 7 μm de grosor con tejidos de ostra plana, *Ostrea edulis*, y de almeja fina, *Ruditapes decussatus* en corte transversal, y se depositaron en portaobjetos tratados con silano, *Silane-prep slides* (Sigma). Se incubaron un mínimo de 24h a 37°C para permitir la fijación del tejido al portaobjetos.

Los cortes histológicos se desparafinaron por medio de dos inmersiones de 5 minutos en xileno, seguidas de dos inmersiones de 5 minutos en etanol absoluto y posteriormente se secaron al aire. Seguidamente, se trataron con 75 μg ml⁻¹ de proteinasa K (Roche) a 37°C durante 30 minutos y a continuación se depositaron en el

tampón de inactivación de la proteínasa K (0.1M Tris; 0.1 M NaCl) durante tres minutos a temperatura ambiente. Posteriormente las muestras se deshidrataron en dos pasos de un minuto en etanol 95° primero y en etanol absoluto después y se dejaron secar al aire. Las secciones se prehibridaron durante 30 min a 42°C con 500 µl de tampón de hibridación (50% de formamida; SSC 4x; 20% dextran-sulfato; 2.5 mg ARN_t de levadura; 1x solución de Denhardt).

Para la fase de hibridación propiamente dicha, cada corte histológico se cubrió con un Gene Frame® (AB Gene), en donde se depositó la sonda. Posteriormente, las muestras se sometieron a desnaturalización a 95°C durante cinco minutos, se enfriaron en hielo durante tres minutos y se incubaron toda la noche a 42°C para que se produjera la hibridación. Por último las secciones se lavaron dos veces durante cinco minutos en SSC 2x a temperatura ambiente y una vez a 42°C en SSC 0.4x durante diez minutos. La detección de la sonda marcada se realizó mediante el kit *DIG Nucleic Acid Detection Kit* (Roche) siguiendo las instrucciones del fabricante.

G. Secuencias y códigos de acceso

Las secuencias empleadas en la caracterización molecular de los aislados bacterianos de *Haliotis tuberculata* y sus respectivos códigos de acceso del *GenBank* son las siguientes: *Vibrio cincinnatiensis* Brayton *et al.*, 1986 (X74698), *Vibrio nereis* (Harwood *et al.*, 1980) Baumann *et al.*, 1981 (X74716), *Vibrio cholerae* (Z21856), *Vibrio ordalii* Schiewe *et al.*, 1982 (X70641), *Vibrio fischeri* (Beijerinck, 1889) Lehmann *et Neumann*, 1896 (X70640), *Vibrio fluvialis* (X74703), *Vibrio vulnificus* (Reichelt *et al.*, 1979) Farmer, 1980 (X74726), *Vibrio tubiashii* (X74725),

Vibrio lentus (AJ278881), *Vibrio furnissii* (X74704), *Vibrio orientalis* Yang et al., 1983 (X74719), *Vibrio natriegens* (Payne et al., 1961) Baumann et al., 1981 (X74714), *Vibrio salmonicida* Egidius et al., 1986 (X70643), *Vibrio splendidus* (X74724), *Vibrio harveyi* (X74706), *Vibrio wodanis* Lunder et al., 2000 (AJ132227), *Vibrio mediterranei* Pujalte et Garay, 1986 (X74710), *Vibrio diazotrophicus* Guerinot et al., 1982 (X74701), *Vibrio navarrensis* Urdaci et al., 1991 (X74715), *Vibrio tapetis* (Y08430), *Vibrio aestuarianus* Tison et Seidler, 1983 (X74689), *Vibrio pectenocida* (Y13830), *Vibrio nigripulchritudo* (Baumann et al., 1971) Baumann et al., 1981 (X74717), *Vibrio chagasii* (AJ316199), *Vibrio parahaemolyticus* (X74720), *Vibrio campbellii* (X56575), *Vibrio alginolyticus* (X74690), *Vibrio proteolyticus* (X56579), *Vibrio fortis* (AJ514916), *Vibrio crassostreae* (AJ582808), *Vibrio gallicus* (AY257972), *Vibrio aerogenes* Shieh et al., 2000 (AF124055), *Vibrio ruber* Shieh et al., 2003 (AF462458), *Vibrio superstes* (AY155585), *Vibrio hispanicus* Gómez-Gil et al., 2004 (AY254039), *Vibrio haliotocoli* (AB000390), *Vibrio pelagius* (Baumann et al., 1971) Baumann et al., 1981 (X74722), *Vibrio shilonii* Kushmaro et al., 2001 (AF007115), *Vibrio mimicus* Davis et al., 1981 (X74713), *Vibrio agarivorans* (AJ310647), *Vibrio gazogenes* (Harwood et al., 1980) Baumann et al., 1981 (X74705), *Vibrio neptunius* Thompson et al., 2003 (AJ316171), *Vibrio brasiliensis* (AJ316172), *Vibrio xuii* Thompson et al., 2003 (AJ316181), *Vibrio kanaloae* Thompson et al., 2003 (AJ316193), *Vibrio tasmaniensis* (AJ316192), *Vibrio coralliilyticus* Ben-Haim et al., 2003 (AJ440005), *Vibrio diabolicus* Raguénès et al., 1997 (X99762), *Vibrio pomeroyi* (AJ491290), *Vibrio hepatarius* Thompson et al., 2003 (AJ345063), *Vibrio rumoiensis* (AB013297), *Vibrio scopthalmi* (U46579), *Vibrio cyclitrophicus* (U57919), *Vibrio pacinii* Gómez-Gil et al., 2003 (AJ316194), *Vibrio ponticus* (AJ630103), *Vibrio neonatus* (AY426979),

Vibrio ezurae (AY426980), *Vibrio mytili* Pujalte *et al.*, 1993 (X99761), *Vibrio penaeicida* (AJ437191), *Vibrio rotiferianus* (AJ316187), *Vibrio logei* (Harwood *et al.*, 1980) Baumann *et al.*, 1981 (X74708), *Escherichia coli* (X80725), *Salmonella typhimurium* (X80681).

Las especies empleadas en la caracterización molecular del parásito de *Haliotis tuberculata* perteneciente al phylum Haplosporidia y sus respectivos códigos de acceso son las siguientes: *Haplosporidium nelsoni* (U19538), *Haplosporidium pickfordi* (AY452724), *Haplosporidium lusitanicum* (AY449713), *Haplosporidium louisiana* (U47851), *Haplosporidium costale* (AF387122), *Minchinia terebinis* (U20319), *Minchinia tapetis* (AY449710), *Minchinia chitonis* (AY449711), *Minchinia* sp. de *Cyrenoida floridana* (Dall, 1896) (AY449712), *Urosporidium crescens* DeTurk, 1940 (U47852), *Urosporidium* sp. de *Stictodora lari* Yamaguti, 1939 (AY449714), *Bonamia ostreae* (AF262995), *Bonamia exitiosa* (AF337563), *Bonamia* sp. de *Crassostrea ariakiensis* (AY542903), el presunto haplosporidio de *Haliotis iris* (AF492442), el presunto haplosporidio de *Ruditapes decussatus* (AY435093) y el presunto haplosporidio de *Pandalus platyceros* (AY449715).

Las secuencias incluidas en la formación de las diferentes secuencias consenso empleadas en los estudios de caracterización molecular de patógenos y su número de acceso en el *GenBank* son las siguientes:

- **Parásitos del género *Perkinsus*:**

Perkinsus olseni: *Perkinsus olseni*: AY820757, DQ194974, DQ194975, DQ194976, DQ194977, DQ194978, DQ194979, U07701; *Perkinsus atlanticus*: AF140295, AF369969, AF369970,

AF369974, AF369975, AF369977, AF369978, AF369979,
 AF441207, AF441208, AF441209, AF441210, AF441211,
 AF441213, AF441214, AF441215, AF441216, AF441217,
 AF441218, AF472517, AF472518, AF472519, AF472520,
 AF472521, AF472522, AF472523, AF473840, AF509333, U07697;
Perkinsus sp. de *Paphia undulata*: AF522321; *Perkinsus* sp. de
Anadara trapezia: U07698; *Perkinsus* sp. de *Chama pacifica*:
 U07699.

Perkinsus marinus: *Perkinsus marinus*: AF126022,
 AF149876, AF150985, AF150986, AF150987, AF150988,
 AF150989, AF150990, AF497479, AY295177, AY295178,
 AY295179, AY295180, AY295181, AY295182, AY295183,
 AY295185, AY295184, AY295186, AY295187, AY295188,
 AY295189, AY295190, AY295191, AY295192, AY295193,
 AY295194, AY295195, AY295196, AY295197, AY295198,
 AY295199, U07700; *Perkinsus* sp.: AF091542.

Perkinsus chesapeaki: *Perkinsus chesapeaki*: AY876302,
 AY876303, AY876306, AY876308, AY876309, AY876310,
 AY876311, AY876312, AY876313, AY876314; *Perkinsus andrewsi*:
 AY305326; *Perkinsus* sp.: AF091541, AF252288, AF440464,
 AF440465, AF440467, AF440468, AF440469 AF440471,
 AY876315, AY876317, AY876318.

Perkinsus mediterraneus: *Perkinsus mediterraneus*:
 AY487834, AY487835, AY487836, AY487837, AY487838,
 AY487839, AY487840, AY487841, AY487842, AY487843.

Perkinsus qugwadi: *Perkinsus qugwadi*: AF151528.

- **Parásitos del género *Marteilia*:**

Marteilia refringens de *Ostrea edulis*: AJ629334, AJ629335, AJ629336, AJ629337.

Marteilia refringens de *Mytilus galloprovincialis*: AJ629338, AJ629339, AJ629340, AJ629341, AJ629342, AJ629343, AJ629344, AJ629345, AJ629346, AJ629347, AJ629348, AJ629349, AJ629350, AJ629351.

Marteilia sp. de *Ostrea edulis*: AY324557, AY324558, AY324562, AY324564, AY324567, AY324568, AY324575, AY324576, AY324577, AY324578, AY324579, AY324580, AY324581, AY324583, AY324585, AY324586, AY324587, AY324588.

Marteilia sp. de *Mytilus galloprovincialis*: AY324551, AY324552, AY324553, AY324554, AY324555, AY324556, AY324559, AY324560, AY324561, AY324563, AY324565, AY324566, AY324569, AY324570, AY324571, AY324572, AY324573, AY324574, AY324582, AY324584.