

INFECCIÓN POR *PERKINSUS MARINUS*

1. **Ámbito de aplicación**

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

2. **Información sobre la enfermedad**

2.1. **Factores del agente**

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

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

2.1.2. **Supervivencia fuera del hospedador**

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

2.1.3. **Estabilidad del agente**

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

2.1.4. **Ciclo de vida**

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

2.2. **Factores del hospedador**

2.2.1. **Especies hospedadoras susceptibles**

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

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

Todas las fases tras el asentamiento son susceptibles.

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

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

2.2.4. **Órganos diana y tejidos infectados**

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

2.2.5. Infección persistente con portadores de por vida

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

2.2.6. Vectores

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

2.2.7. Animales acuáticos salvajes portadores o sospechosos de serlo

No se conoce ninguno.

2.3. Patrón de la enfermedad

2.3.1. Mecanismos de transmisión

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

2.3.2. Prevalencia

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

2.3.3. Distribución geográfica

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

2.3.4. Mortalidad y morbilidad

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

2.3.5. Factores ambientales

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

2.4. Control y prevención

2.4.1. Vacunación

Ninguna.

2.4.2. Tratamiento con sustancias químicas

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

2.4.3. Inmunoestimulación

Ninguna.

2.4.4. Selección genética a favor de la resistencia

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

2.4.5. Repoblación con especies resistentes

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

2.4.6. Agentes bloqueantes

Ninguno.

2.4.7. Desinfección de huevos y larvas

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

2.4.8. Prácticas generales de manejo

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

3. Obtención de muestras

3.1. Elección de ejemplares

Deben obtenerse muestras de individuos vivos o recién muertos.

3.2. Conservación de las muestras para su envío

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

3.3. Combinación de varias muestras

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

3.4. Órganos y tejidos de elección

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

3.5. Muestras/tejidos que no son adecuados

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

4. Métodos de diagnóstico

4.1. Métodos de diagnóstico de campo

4.1.1. Signos clínicos

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

4.1.2. Alteraciones del comportamiento

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

4.2. Métodos clínicos

4.2.1. Anatomopatología macroscópica

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

4.2.2. Bioquímica clínica

Ninguna.

4.2.3. Anatomopatología microscópica

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

4.2.4. Preparaciones húmedas

No se recomiendan como método clínico.

4.2.5. Frotis

No se recomienda como método clínico.

4.2.7. Microscopía electrónica/citopatología

No se dispone de datos.

4.3. Métodos de detección e identificación del agente

4.3.1. Métodos directos de detección

4.3.1.1. Métodos microscópicos

4.3.1.1.1. Preparaciones húmedas

No se recomienda.

4.3.1.1.2. Frotis

Los frotis son útiles tan solo en las infecciones avanzadas.

Muestras a obtener: hospedadores vivos.

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

Controles positivos/negativos: ninguno.

Niveles de validación:

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

Interpretación de los resultados:

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

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

4.3.1.1.3. Cortes fijados

Muestras a obtener: ostras vivas o recién muertas.

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

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

Niveles de validación:

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

Interpretación de los resultados:

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

Disponibilidad de pruebas comerciales: no hay pruebas comerciales disponibles.

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

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

Muestras a obtener: moluscos vivos o recién muertos.

Procedimiento técnico:

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

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

Niveles de validación:

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

Interpretación de los resultados:

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

Disponibilidad de pruebas comerciales: no hay kits comerciales disponibles.

4.3.1.2. Aislamiento e identificación del agente

4.3.1.2.1. Cultivo celular/medios artificiales

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

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

4.3.1.2.2. Métodos de detección del antígeno basados en anticuerpos

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

4.3.1.2.3. Técnicas moleculares

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

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

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

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

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

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

Niveles de validación:

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

Interpretación de los resultados:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Niveles de validación:

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

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

Interpretación de los resultados

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

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

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

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

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

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

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

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

Niveles de validación:

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

Interpretación de los resultados:

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

Disponibilidad de pruebas comerciales: no disponible comercialmente.

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

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

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

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

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

Niveles de validación:

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

Interpretación de los resultados

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

4.3.1.2.4. Purificación del agente

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

4.3.2. Métodos serológicos

Ninguno aplicable.

5. Idoneidad de las pruebas para cada uso previsto

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

Tabla 5.1. Métodos para la vigilancia y el diagnóstico dirigidos

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

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

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

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

7. Criterios de diagnóstico confirmativo

7.1. Definición de caso sospechoso

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

7.2. Definición de caso confirmado

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

8. Bibliografía

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

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

AUDEMARD C., CARNEGIE R.B. & BURRESON E.M. (2008). Shellfish tissues evaluated for *Perkinsus* spp. using the Ray's fluid thioglycollate medium culture assay can be used for downstream molecular assays. *Dis. Aquat. Org.*, **800**, 235–239.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

*
* *

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