

APARTADO 2.4.

ENFERMEDADES DE LOS MOLUSCOS

CAPÍTULO 2.4.0.

INFORMACIÓN GENERAL

La siguiente información y los siguientes procedimientos son adecuados para los agentes patógenos de la lista de la OIE, y proporcionarán una orientación a los patólogos que estudien brotes de enfermedades de los moluscos o que lleven a cabo procedimientos de vigilancia de las enfermedades. No obstante, si un trastorno persiste o se propaga más allá de los lugares en los que se ha detectado inicialmente debe consultarse el caso con patólogos con experiencia en marisco.

1. Evaluación del estado sanitario de la unidad epidemiológica

1.1. Muestras a utilizar en las pruebas

Las muestras a utilizar dependen de la especie, la fase de vida y el tamaño de los animales, así como del objetivo de la prueba (es decir, si se trata de diagnosticar una enfermedad manifiesta o de tomar muestras para una vigilancia dirigida destinada a declarar la ausencia de una enfermedad concreta). En los capítulos de este *Manual Acuático* sobre cada enfermedad se indican detalles concretos sobre los requisitos referentes a las muestras.

1.2. Especificaciones relativas al tamaño del molusco

1.2.1. Para detectar los parásitos de la lista

Juveniles de menos de 1 cm: se toma una muestra de animales enteros pero se elimina la concha o se procesa con un protocolo de descalcificación. Deben realizarse cortes que incluyan la mayor parte de los órganos. Esto pueden comportar tomar dos cortes de cada bloque histológico para disponer de órganos de distintas zonas (por ejemplo, los situados cerca de la superficie o más profundamente en el bloque).

Juveniles y adultos de 1-6 cm: se toma una muestra de todo el molusco y se realizan uno o varios cortes de 3-5 mm de espesor que incluyan el palpo labial, las branquias y la glándula digestiva.

Moluscos de más de 6 cm: se realizan varios cortes del cuerpo que contengan órganos/tejidos determinados, incluidos el manto, las branquias, la glándula digestiva, las gónadas y el riñón.

1.2.2. Para detectar el síndrome de marchitamiento de las orejas de mar

En el caso de orejas de mar ≥ 20 mm, se toman varios cortes de 3-5 mm de espesor que contengan el esófago posterior (post-esófago), la glándula digestiva y el músculo del pie.

1.2.3 Para detectar infecciones por el herpesvirus de las orejas de mar

Se toman muestras como se ha indicado en el apartado 1.2.2 anterior añadiendo un corte transversal de la cabeza para disponer del ganglio cerebroideo y tomando varios cortes del complejo del músculo del pie y aductor incluyendo un corte de 0,25-1,0 cm (la distancia depende de la longitud máxima de la oreja de mar) posterior a la cabeza para disponer del ganglio podal. Además, debe tomarse un corte longitudinal que abarque desde el ganglio podal anterior hasta la parte posterior de la musculatura del pie. Se indican más detalles sobre la toma de muestras en el apartado C de la introducción general a esta parte del *Manual Acuático*: Parte 2. Recomendaciones aplicables a enfermedades específicas.

1.3. Especificaciones relativas a las poblaciones de moluscos

Para disponer de una orientación general, consúltese la Guía de la OIE para la Vigilancia Sanitaria de los Animales Acuáticos (2009), y para conocer detalles sobre los requisitos respecto a las muestras para cada enfermedad concreta, consúltese los capítulos de este *Manual Acuático* sobre cada enfermedad.

- Normalmente, las poblaciones de moluscos que se cultivan hasta el peso comercial se crían en condiciones semi-intensivas (en bandejas, bolsas o sobre cuerdas o estacas, y utilizando métodos de cultivo en el fondo) e interaccionan mucho con los medios naturales;
- Algunas de las fases de vida de las poblaciones de moluscos cultivadas a menudo tienen lugar en estado salvaje (por ejemplo, las fases larvarias, que se recogen en el medio natural para después cultivarlas hasta el peso comercial), y a este tipo de poblaciones no siempre se puede llegar para observarlas y muestrearlas;
- Pueden existir múltiples métodos de cultivo para la misma especie dentro de la misma jurisdicción, los cuales pueden representar distintas poblaciones respecto a las características de riesgo;
- Las zonas geográficas extremadamente grandes pueden estar formadas por muchas pequeñas piscifactorías o unidades de producción contiguas con distintos propietarios y gestiones. Esto puede suponer un problema a la hora de diseñar programas de muestreo basados en la gestión de la población de moluscos;
- En algunos momentos de su ciclo de vida, los moluscos pueden ser sésiles (como por ejemplo, las ostras adultas) y muy móviles en otras fases (como por ejemplo, las larvas de ostras);
- Las poblaciones de moluscos, en concreto de moluscos salvajes, pueden ser difíciles de localizar debido a su hábitat (como por ejemplo, las almejas enterradas o las poblaciones submareales);
- Determinadas zonas geográficas a menudo contienen muchas especies y clases de edad de moluscos procedentes de distintos orígenes, lo cual dificulta la identificación de cada población de moluscos a la que pueden ir dirigidos los programas de vigilancia;
- Las poblaciones de moluscos salvajes son muy importantes para el estado de un país respecto a una enfermedad, pero en momentos concretos es posible que no se disponga de ellas para muestrearlas.

1.4. Especificaciones relativas al estado clínico

En el caso de infecciones clínicas, además de tomarse muestras de los órganos y tejidos diana, también deben tomarse otras del manto, palpos, etc. que presenten anomalías macroscópicas o lesiones. Para las pruebas de detección de agentes patógenos, deben tomarse muestras de diez moluscos enfermos o moribundos. También deben obtenerse muestras paralelas ($n > 10$) de animales aparentemente normales de la misma zona de producción.

2. Procesado general de las muestras

Todas las muestras deben enviarse vivas al laboratorio de diagnóstico autorizado. El laboratorio debe estar informado de la hora estimada de llegada de la muestra, de modo que pueda prepararse el material necesario para procesar los moluscos antes de que estos lleguen.

Las muestras de moluscos deben empaquetarse de modo que se mantengan vivos y de acuerdo con las normas actuales. Si el lugar muestreado está muy alejado del laboratorio, puede ocurrir que los animales lleguen moribundos u oliendo mal, y serán poco útiles para el análisis. Las muestras requeridas deben enviarse cuanto antes tras ser extraídas del agua, con el fin de reducir la retención de aire y la posible mortalidad durante el transporte, sobre todo en el caso de moluscos enfermos moribundos. A no ser que se especifique lo contrario, los animales moribundos deben enviarse sobre hielo (aunque no congelados) para reducir la descomposición de la muestra.

En el caso de muestras que no se puedan enviar vivas al laboratorio de diagnóstico, debido a un estado avanzado de la enfermedad, a largas distancias o a medios de transporte lentos, etc. deben fijarse en el lugar de obtención como se recomienda en los siguientes apartados de este capítulo o en los capítulos de este *Manual Acuático* sobre cada enfermedad. Aunque esto es adecuado para, por ejemplo, el posterior examen mediante histología o microscopía electrónica de transmisión, otras técnicas, como los frotis frescos, las improntas de tejidos, la bacteriológica sistemática, la micología o el cultivo de *Perkinsus* spp. en medio de tioglicolato líquido de Ray no

pueden llevarse a cabo. Antes de obtener las muestras deben aclararse las necesidades de diagnóstico y los requisitos de la muestra con el laboratorio de diagnóstico.

Las muestras deben ir acompañadas de información básica, como el motivo por el que se envía la muestra (vigilancia, mortalidad anómala, crecimiento anómalo, etc.), las observaciones macroscópicas y los parámetros ambientales asociados, la prevalencia aproximada y patrones de mortalidad, el origen y tipo de moluscos (especie, edad, si las muestras proceden de poblaciones locales de moluscos o de poblaciones transferidas procedentes de otro lugar, la fecha de la transferencia y el lugar de procedencia, etc.). Esta información debe indicar posibles cambios de manipulación o de las condiciones ambientales que pudieran influir en la mortalidad, tal vez junto con la presencia de agentes infecciosos.

2.1. Examen macroscópico

La observación macroscópica de los moluscos debe tener por objetivo, siempre que sea posible, el comportamiento del animal, la superficie de la concha, la parte interna de la concha y los tejidos blandos.

A menudo es difícil observar el comportamiento de los moluscos en aguas abiertas. No obstante, la observación de moluscos en determinadas instalaciones de cría, como las de reproductores en tanques y las de larvas en viveros, puede aportar indicaciones útiles de alteraciones del comportamiento relacionadas con la enfermedad. Si se detectan signos (por ejemplo, pre-depósito de larvas en el fondo, acumulación de alimento en los tanques, signos de debilitamiento, etc.), puede comprobarse si las muestras presentan signos macroscópicos, buscando mediante un microscopio de disección posibles anomalías y deformidades, organismos que huelan mal, y fijándolos para un posterior procesado como se recomienda abajo. En el caso de los adultos y los juveniles, los signos de debilitamiento pueden consistir en una posición entreabierta de la concha, acumulación de arena, barro y detritos en el manto y sobre las branquias, retracción del manto, que se alejará del borde de la concha, disminución de la actividad (vieiras que nadan menos, almejas que se entierran u orejas de mar que pastan), etc. El reflejo de erguido de las orejas de mar tras ser invertidas no tiene lugar en los animales debilitados, lo cual es un buen indicador de debilidad. Debe llevarse a cabo un seguimiento de la mortalidad en aguas abiertas para comprobar posibles patrones de pérdidas, y deben obtenerse muestras para posteriores análisis. También deben documentarse los factores ambientales, así como las mortalidades previa y posterior.

Incluso en condiciones de cultivo, las conchas de moluscos pueden no estar limpias, y es habitual encontrar organismos malolientes colonizando las superficies de las mismas. Organismos como percebes, lapas, esponjas, gusanos poliquetos, larvas de bivalvos, tunicados, briozoarios, etc. no suelen amenazar la salud de los moluscos. Los sistemas de cultivo, como los cultivos de agua en suspensión y poco profunda, pueden incluso aumentar la exposición a organismos malolientes, y las conchas pueden quedar cubiertas por otros animales y plantas. Esto puede afectar a la salud de forma directa, impidiendo que la concha se abra y cierre, o indirectamente por competición por el alimento. Los signos de debilitamiento asociados a un intenso mal olor son los que deben preocupar, y no el mal olor en sí. Las lesiones en la concha por microorganismos perforantes, como esponjas y gusanos poliquetos, suelen ser benignos, pero en ciertas condiciones pueden alcanzar proporciones que hagan que la concha se agriete o se quiebre o que el agujero llegue a los tejidos blandos. Este grado de lesión en la concha puede debilitar el molusco y hacerlo susceptible a infecciones por agentes patógenos. Deben registrarse las deformidades (forma, agujeros en la superficie), fragilidad, rotura o reparación observadas, pero pueden no ser indicativas de enfermedad preocupante. Los barrenadores epibiontes pueden causar deformidades y debilitar la concha(s). Un color y olor anómalos pueden indicar una posible infección de los tejidos blandos que tal vez tenga que examinarse en un laboratorio.

Los moluscos deben abrirse con cuidado para no dañar los tejidos blandos, sobre todo el manto, las branquias, el corazón y la glándula digestiva. La presencia de organismos malolientes sobre la cara interna de la concha es un indicio claro de debilidad. La superficie interna de la concha normalmente está lisa y limpia por la acción del manto y las branquias. Puede producirse una perforación de la superficie interna, pero esta se puede obturar con el depósito de conchiolina y nácar adicionales. Esto puede dar lugar a la formación de ampollas que se llenan de barro o agua. También se pueden formar ampollas sobre agentes irritantes superficiales, como cuerpos extraños. El grado de perforación de la concha puede determinarse sosteniendo la concha hacia arriba encarada a una fuente de luz intensa. Cuando las anomalías dentro de la matriz de la concha justifican una mayor investigación, pueden llevarse muestras acabadas de obtener al laboratorio, o bien intactas o bien fijadas para la posterior descalcificación, según sea necesario. El aspecto de los tejidos blandos a menudo es indicador del estado fisiológico del animal. Debe comprobarse si en los tejidos blandos hay abscesos, pústulas, cambio de color, perlas, edema, transparencia o acuosidad generales, deformidades de las branquias, etc., y, en el caso de que se observen en animales débiles o moribundos, estas anomalías deben hacer sospechar de un problema.

Deben buscarse y registrarse posibles anomalías y lesiones de los tejidos, así como toda posible deformidad de la concha, organismos que perforan la concha y habitantes llamativos del manto. Deben registrarse los niveles de lesión tisular y deben obtenerse muestras de animales afectados y no afectados para que sean examinados en el laboratorio cuanto antes.

2.2. Examen de poblaciones con mortalidades anómalas

Una mortalidad anómala de moluscos normalmente se detecta por una mortalidad medible súbita que tiene lugar en un corto periodo de tiempo entre dos observaciones o inspecciones de las poblaciones (por ejemplo, de unos 15 días en el caso de instalaciones ubicadas en una zona inter-mareal). En un vivero, una mortalidad anómala da lugar a la falta de producción de larvas procedentes de reproductores distintos. Dada la gran variedad de especies, ambientes y condiciones de cultivo, estas definiciones deben adaptarse cuando y como sea necesario.

Siempre que tenga lugar una mortalidad anómala en poblaciones de moluscos, debe llevarse a cabo una investigación urgente para determinar las causas de la enfermedad.

Las muestras deben obtenerse, conservarse o fijarse y guardarse según los procedimientos descritos en este *Manual Acuático*.

Cuando se disponga de moluscos no afectados o control, también deben fijarse para la comparación histológica con tejidos anómalos. Sea cual sea el fijador, es fundamental que la concha sea eliminada para que el fijador entre fácilmente. En los gasterópodos bivalva y operculados puede mantenerse la concha cerrada bajo el fijador hasta que empiece el autólisis.

2.3. Métodos de diagnóstico

Las técnicas para la detección de agentes patógenos de los moluscos se limitan a la detección directa del agente causal. Los métodos serológicos clásicos no pueden utilizarse a efectos del diagnóstico porque los moluscos no producen anticuerpos. Para la detección de los agentes patógenos de la lista de la OIE, además de la histología y la citología, pueden utilizarse inmunoanálisis con anticuerpos monoclonales o sondas de ácido nucleico. Desde este punto de vista, el desarrollo de técnicas de diagnóstico basadas en el ADN para la detección de agentes patógenos de los moluscos ha sido de lejos el avance más importante de los últimos años. Dado el desarrollo y potencial de aplicación de estas técnicas de diagnóstico y los problemas inherentes actualmente asociados a su uso, la validación es de vital importancia.

En los siguientes apartados se proponen tres niveles de procedimientos de examen. La histología se recomienda como método de detección sistemática estándar porque aporta una gran cantidad de información, lo cual es especialmente importante porque en el examen macroscópico no se suelen hallar signos patognomónicos ni información indicativa sólida. Además, la mortalidad puede estar causada por varios agentes patógenos o problemas fisiológicos, como un empeoramiento del estado tras el desove, y esto solo se puede determinar mediante histología. La vigilancia también se lleva a cabo de forma sistemática mediante histología. No obstante, para cada situación epidemiológica, y cuando esté justificado, la vigilancia dirigida puede basarse en otras técnicas.

Cuando se producen brotes de mortalidad anómala, también se recomienda la histología. Pueden utilizarse distintos métodos de diagnóstico provisional además de la histología, como improntas de tejidos, cultivo en medio de tioglicolato líquido de Ray (RFTM) o la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), como se recomienda en cada capítulo específico. Estos métodos pueden aportar ventajas de rapidez y/o coste ante una sospecha de infección por un agente patógeno dado.

Cuando se encuentra un agente patógeno durante un proceso de detección sistemática o durante brotes de mortalidad, para la identificación específica cada vez se utilizan más los métodos moleculares, además de la microscopía electrónica. Algunas de las enfermedades de los moluscos de la lista de la OIE están causadas por agentes patógenos que pertenecen a géneros que engloban especies estrechamente relacionadas. En los siguientes capítulos se recomiendan protocolos específicos diseñados para detectar ciertos agentes de la lista, que pueden utilizarse para confirmar los resultados del examen histológico y/o dar un diagnóstico específico de especie.

2.4. Técnicas histológicas

Dado que en los procedimientos de diagnóstico de las enfermedades de los moluscos la histología se utiliza de forma genérica, en este capítulo se aporta una orientación técnica detallada.

La histología es una técnica que se utiliza para estudiar la estructura de las células y los tejidos al microscopio óptico. La preparación del tejido consiste en distintos pasos, que son la fijación, la deshidratación, la impregnación y la inclusión de las muestras, así como la preparación de cortes y la tinción y montaje de los portas.

Los animales vivos moribundos o que acaben de morir (apenas unos minutos antes) proporcionan las condiciones óptimas en las que obtener tejidos. Las muestras congeladas deben evitarse por la lisis tisular que tiene lugar durante el ciclo de congelación-descongelación. En el caso de que tenga lugar un desfase entre la muerte del animal y la obtención de la muestra, se recomienda guardar los animales sobre hielo o en una nevera. Debe tomarse un corte estándar de la glándula digestiva, que incluya las branquias, el manto y los palpos en la medida de lo posible. Como alternativa, en el caso de muestras grandes, deben obtenerse varios cortes que incluyan todos los tejidos importantes.

2.4.1. Fijación de tejidos

La función del fijador es mantener la morfología de los tejidos tan similar a la morfología *in-vivo* como sea posible e impedir la necrosis que en condiciones naturales tendría lugar tras obtener la muestra. En el caso de muestras grandes, los fijadores recomendados para el estudio de moluscos marinos son la solución de Davidson y la solución de Carson. En el caso de muestras más pequeñas, pueden utilizarse fijadores a base de glutaraldehído, que son compatibles con el uso del microscopio electrónico. La proporción de volumen de fijador respecto a volumen de tejido debe ser de al menos 10:1 para garantizar una buena fijación. Pueden utilizarse conservantes que no contengan formaldehído, siguiendo las instrucciones del fabricante. Estos deben utilizarse con cuidado hasta que el usuario quede satisfecho con los resultados. Debe ser el investigador quien valore si el sustituto del formaldehído puede utilizarse de la misma forma que el formaldehído.

Solución de Davidson:

Agua marina	1200 ml
Alcohol al 95%	1200 ml
Formaldehído al 35–40% ¹	800 ml
Glicerol	400 ml
Ácido acético glacial	10% (se añade extemporáneamente)

Solución de Carson:

NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	23,8 g
NaOH	5,2 g
Agua destilada	900 ml
Formaldehído 1 al 40%	100 ml
Se ajusta el pH a 7,2–7,4	

**Solución madre 1G4F (puede guardarse a 4°C durante un máximo de 3 meses):*

Solución de formalina tamponada al 37–40% **	120 ml
Glutaraldehído al 50%	20 ml
Agua de grifo	360 ml

*** Solución de formalina tamponada:*

Formaldehído al 37–40%	1 litro
Fosfato de disodio (Na ₂ HPO ₄)	15 g
Hidróxido de sodio (NaOH)	0,06 g
Rojo fenol (indicador de pH)	0,03 g

Solución de trabajo (debe prepararse justo antes de ser utilizada):

Agua marina ambiental filtrada	500 ml
Solución madre 1G4Fn*	500 ml

No existe ningún fijador universal, de modo que la elección debe basarse en el último uso de material fijado así como en aspectos prácticos del uso de fijadores (como el precio, la disponibilidad de los componentes, etc.). La solución de Davidson es una excelente elección para conservar la estructura de los tejidos. Además, los cortes de tejido fijados con solución de Davidson pueden teñirse después mediante distintos métodos histoquímicos, así como por hibridación *in-situ* con sondas de ADN. Si va a utilizarse esta última prueba, debe evitarse una excesiva fijación (de más de 24-48 horas). La solución

1 Una solución acuosa saturada al 37-39% de gas formaldehído.

de Carson puede no ser tan buena como la solución de Davidson para el análisis histológico. No obstante, permite una buena conservación de la ultraestructura y puede utilizarse para conservar muestras para el posterior estudio por microscopía electrónica. 1G4F también aporta la flexibilidad de conservar tejidos tanto para la histología como para la microscopía electrónica, pero el espesor óptimo de los tejidos es de 2-3 mm. 1G4F produce preparaciones histológicas de gran calidad y buenas micrografías electrónicas. Dado que la microscopía electrónica puede ser una útil ayuda en el diagnóstico o confirmación de infecciones de los moluscos, puede plantearse la fijación de algunas muestras (sobre todo muestras más pequeñas) utilizando glutaraldehído, como se ha descrito en el apartado 2.5.1 de este capítulo, ya que proporcionará las micrografías electrónicas de máxima calidad.

Por otra parte, el material fijado en solución de Carson, en el que se hayan observado niveles suficientes de los agentes patógenos buscados o de anomalías, puede volver a fijarse en glutaraldehído. Se recomienda que parte del molusco se fije en solución de Davidson y parte en solución de Carson o en 1G4F para estudios posteriores. Esto debe llevarse a cabo para asegurar la fijación de todos los tejidos/órganos en ambos fijadores. Si no se dispone de ninguno, es suficiente con formalina al 10% tamponada con agua de mar filtrada. Dentro de cada país, la industria del cultivo de moluscos debe ponerse de acuerdo respecto a la forma más eficaz de garantizar una fijación suficiente.

2.4.2. Deshidratación, impregnación e inclusión de las muestras

La inclusión de las muestras en parafina requiere varios pasos, durante los cuales el agua que contienen los tejidos se vaya sustituyendo progresivamente, primero por alcohol, y a continuación por xileno o una solución de aclarado equivalente menos tóxica, y finalmente por parafina.

Una vez fijadas las muestras en solución de Davidson, Carson o 1G4F, se transfieren a alcoholes de graduaciones progresivas (70-95% [v/v]) antes de la deshidratación final en etanol absoluto. El alcohol que contienen los tejidos a continuación se elimina sumergiéndolo en xileno. Después, los tejidos se impregnan con parafina, que es soluble en xileno, a 60°C. Todos estos pasos se pueden llevar a cabo automáticamente utilizando una máquina de procesado de tejidos. En el caso de que el procesado se retrase, los tejidos conservados pueden guardarse en etanol al 70%.

Se producen bloques dejando los tejidos refrigerados en moldes llenos de parafina sobre una mesa de refrigeración; la refrigeración y humectación son fundamentales para la realización de cortes.

2.4.3. Preparación de los cortes

Una vez los bloques se han enfriado sobre una placa fría, que permite que la parafina se solidifique, se realizan cortes de unos 2-5 μm mediante un microtomo. Los cortes se extienden sobre portas de histología, se drenan y se secan durante un máximo de 1 hora a 40-42°C, o durante toda la noche a temperatura ambiente. El secado de las muestras permite eliminar el exceso de humedad y, por tanto, que los cortes se adhieran a los portas.

2.4.4. Tinción y montaje de los portas

Antes de pasar a la tinción, debe eliminarse la parafina de los cortes sumergiéndolos en xileno o una solución de aclarado equivalente menos tóxica durante 10-20 minutos. Esto se repite una vez y a continuación se elimina el disolvente por inmersión en dos baños sucesivos de etanol absoluto durante periodos de 10 minutos cada uno, y a continuación se rehidratan en una serie de baños de alcohol de graduaciones descendientes (por ejemplo, al 95%, 70%, 50%, 30%, 10 minutos en cada uno) con una inmersión final en un baño de agua de grifo durante 10 minutos. Pueden llevarse a cabo distintas técnicas de tinción topográficas o histoquímicas.

Cuando se utiliza la tinción de la hematoxilina-eosina (H/E) (hematoxilina o equivalente), las estructuras nucleares y basófilas se tiñen de un color azul a púrpura oscuro, el retículo endoplásmico se tiñe de azul, y el citoplasma adquiere un color gris. El colorante ácido eosina tiñe las otras estructuras de rosa. Esta técnica de tinción es sencilla y reproducible, y, aunque permite poca diferenciación de estructuras celulares, sí permite detectar cualquier anomalía en la estructura tisular y celular. Pueden aplicarse otras técnicas para demostrar estructuras o características concretas, según sea necesario (por ejemplo, tricolor en el caso del tejido conjuntivo y de los gránulos citoplásmicos).

2.5. Métodos de microscopía electrónica de transmisión

Dado que la microscopía electrónica de transmisión se utiliza con mucha frecuencia para la identificación confirmativa de agentes patógenos en procedimientos de diagnóstico de enfermedades de los moluscos, en este capítulo se aporta una orientación técnica detallada.

La fijación para el posterior examen mediante microscopía electrónica debe llevarse a cabo de inmediato tras la muerte del animal, antes de la fijación para la histología. Solo las muestras que se obtienen rápidamente de animales vivos tendrán alguna utilidad. La preparación de muestras para microscopía electrónica conlleva los siguientes pasos: fijación de tejidos, descalcificación de las muestras (cuando sea necesario), deshidratación, impregnación e inclusión de las muestras, preparación de los cortes y aplicación de tinción de contraste a los mismos.

2.5.1. Fijación de tejidos

En el caso de los tejidos que tienen que examinarse mediante microscopía electrónica, es importante que la fijación se realice correctamente, con el fin de causar los menores daños posibles a la ultraestructura. Las muestras se cortan de tal modo que sus dimensiones no superen los 1-2 mm. Este pequeño tamaño permite a las distintas soluciones penetrar rápidamente hacia el interior de la muestra.

La fijación de las muestras se lleva a cabo directamente en glutaraldehído al 3% durante 1-4 horas. Las muestras se lavan en tampón tres veces, a continuación se fijan en ácido ósmico al 1% (OsO_4 acuoso) y se lavan dos veces más en tampón. Distintas formulaciones de fijador de glutaraldehído y tapones funcionan igual de bien.

Para causar los menores daños posibles a la ultraestructura, las muestras se tratan con soluciones que tengan una osmolaridad cercana a la de los tejidos. Así, los tejidos de molusco se tratan con soluciones con una osmolaridad de aproximadamente 1000 mOsm. La osmolaridad de las soluciones se ajusta con sales de mar artificiales o NaCl. Dado que los tejidos de los moluscos son casi iso-osmóticos respecto al agua de mar, es posible preparar la solución de glutaraldehído con agua de mar filtrada por un tamaño de poro de 0,22 μm , y utilizar el agua de mar filtrada para posteriores lavados.

Cacodilato de sodio 0.4 M: 8,6 g en 100 ml de agua destilada

Cloruro de sodio al 10% en agua destilada

Tampón cacodilato, pH 7,4:

1000 mOsm

Cacodilato de sodio 50 ml de una solución madre 0,4 M
NaCl 20 ml de una solución madre al 10%
Agua destilada 30 ml

Se ajusta el pH a 7,4

Glutaraldehído al 3%:

1000 mOsm

Glutaraldehído al 25% 2,5 ml
Cacodilato de sodio 0,4 M 5 ml
NaCl al 10% 3,5 ml
Agua destilada 9 ml

Ácido ósmico al 1%:

1000 mOsm

Ácido ósmico al 4% 1 volumen
Cacodilato de sodio 0,4 M 1 volumen
NaCl 1 volumen de solución madre al 10%
Agua destilada 1 volumen

EDTA al 5%:

EDTA de disodio 5 g
Tampón cacodilato 100 ml

El EDTA se disuelve cuando el pH es superior a 8. Cuando la solución se vuelve transparente se ajusta el pH a 7,4 añadiendo HCl concentrado.

Si las muestras se han fijado previamente y guardado en solución de Carson, deben lavarse varias veces en un baño de tampón antes de la fijación con glutaraldehído al 3%. Los tejidos conservados en 1G4F pueden post-fijarse directamente en solución de ácido ósmico al 1%.

2.5.2. Deshidratación, impregnación e inclusión de las muestras

Las muestras se deshidratan en sucesivos baños de etanol: una vez en etanol al 70%, dos veces en etanol al 95% y tres veces en etanol absoluto. La deshidratación termina con dos baños de óxido de propileno, que permite la posterior impregnación con Epon u otra resina.

Las muestras se impregnan progresivamente. Tras un primer baño en una mezcla de óxido de polipropileno-Epon (50/50), las muestras se colocan en un baño de Epon. Cuando más dure la incubación, mejor se impregnarán los tejidos.

La inclusión se lleva a cabo colocando las muestras en moldes llenos de resina Epon. En cada bloque debe haber una etiqueta identificativa de la muestra, y a continuación los bloques deben ponerse a 60°C (la temperatura a la cual polimeriza la resina Epon) durante 48 horas.

2.5.3. Preparación de los cortes y aplicación de la tinción de contraste

Se cortan los bloques en trozos del tamaño adecuado con una hoja de afeitar y a continuación se realizan los cortes mediante un ultramicrotomo. Se realizan cortes semi-finos (0,5-1 µm) y se colocan sobre portas de vidrio. Estos se utilizarán para controlar la calidad de las muestras mediante microscopía óptica y para hallar las zonas de interés en el corte.

Los cortes semi-finos se tiñen a 90-100°C con una solución de azul de toluidina al 1%. Tras secarlos, los cortes se montan bajo cubreobjetos con una gota de resina sintética y se observan al microscopio óptico.

Se colocan cortes ultrafinos de 80-100 nm de espesor sobre rejillas de malla de cobre para el análisis mediante microscopía electrónica. Se utiliza acetato de uranilo y citrato de plomo para aplicar la tinción de contraste de los cortes ultrafinos.

2.6. Métodos moleculares

Las técnicas moleculares normalmente ofrecen una ventaja en cuanto a sensibilidad que a menudo es contrarrestada por problemas técnicos. La PCR es especialmente sensible a las condiciones en las que se ejecuta, y puede dar falsos positivos y falsos negativos. Siempre que se utilicen técnicas moleculares, deben llevarse a cabo con cautela y con especial atención a la inclusión de controles positivos y negativos adecuados, con el fin de superar la posible falta de robustez, así como para mantener una suficiente exactitud. Es importante reconocer que la PCR y las pruebas basadas en la secuencia solo detectan ácido nucleico patógeno y no indican la presencia de un parásito vivo ni de infección o enfermedad. No obstante, el uso de una prueba de PCR basada en el ARN puede indicar la presencia de un parásito vivo, pero aun así no confirmará la presencia de infección o enfermedad.

La PCR, la PCR-RFLP (análisis del polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción), la secuenciación, la hibridación *in situ* y la inmunohistoquímica cada vez se utilizan más en la identificación confirmativa de agentes patógenos. Para estas técnicas, deben prepararse las muestras de tal modo que se conserve el ADN del agente patógeno. De igual forma, las muestras destinadas al análisis con métodos basados en anticuerpos deben conservarse para que retengan los puntos antigénicos reactivos con los que vayan a reaccionar los anticuerpos utilizados.

2.6.1. Preparación de la muestra

Las muestras escogidas para las pruebas diagnósticas basadas en el ADN o en anticuerpos deben manipularse y empaquetarse con el máximo cuidado para minimizar la posibilidad de contaminación cruzada entre las muestras o la degradación antes de que se lleve a cabo la prueba. Para prevenir la contaminación, deben utilizarse recipientes nuevos (bolsas o frascos de plástico para muestras). Cada recipiente o paquete que contenga un conjunto de muestras debe incluir una etiqueta impermeable con los datos correspondientes. Debe evitarse el uso de los clásicos rotuladores permanentes (como los Sharpies), puesto que su tinta se disuelve en etanol, un disolvente que se utiliza en los métodos moleculares y puede dar lugar a una pérdida de la etiqueta. Solo puede utilizarse lápiz o bolígrafo para etiquetar viales o botes.

Algunos métodos adecuados para la conservación y transporte de muestras tomadas para las pruebas moleculares o basadas en anticuerpos son los siguientes:

- *Ejemplares vivos helados o refrigerados:* en el caso de ejemplares que puedan ser transportados rápidamente al laboratorio para ser analizados en un plazo de 24 horas, se empaquetan las muestras en bolsas para muestra envueltas de una cantidad suficiente de hielo húmedo alrededor de las muestras embolsadas, en una caja aislada, y se envían al laboratorio.

- *Ejemplares enteros congelados*: se escogen ejemplares vivos según el objetivo del estudio, se congelan rápidamente en el campo utilizando hielo seco triturado, o se congelan en un laboratorio de campo mediante un congelador mecánico a -20°C o a temperaturas inferiores. Se prepara e introduce la etiqueta en el recipiente con las muestras, se empaquetan las muestras con una cantidad suficiente de hielo seco en una caja aislada, y se envían al laboratorio.
- *Muestras conservadas en alcohol*: en zonas donde el almacenaje y envío de muestras congeladas es problemático, puede utilizarse etanol no desnaturalizado al 90-100% (es decir, etanol libre de metanol) para conservar, guardar y transportar ciertos tipos de muestras. Se empaquetan para ser enviadas según los métodos descritos arriba.
- *Tejidos fijados para la hibridación in situ y la inmunohistoquímica*: para este fin, serán suficientes los métodos clásicos de conservación de tejidos. La solución de Davidson suele ser una buena elección para el posterior uso de sondas moleculares. Para el ADN, en concreto, debe evitarse una fijación excesiva (de más de 24-48 horas).

2.6.2. Extracción de ADN

Para la extracción de ADN, se añade proteinasa K ($100\ \mu\text{gml}^{-1}$) a tejidos homogeneizados en unos 9 volúmenes de tampón de extracción (NaCl [100 mM], ácido etilendiaminotetraacético [EDTA, 25 mM], pH 8, dodecilsulfato de sodio [SDS, al 0,5%]). Tras una incubación durante toda la noche a 50°C , se extrae el ADN utilizando un protocolo estándar de fenol/cloroformo, y se precipita con etanol.

Teniendo en cuenta las presiones de tiempo y los riesgos para el personal de laboratorio, los kits comerciales puede constituir alternativas técnicas satisfactorias. Antes de ser utilizados sistemáticamente en laboratorios de diagnóstico, los kits comerciales deben validarse por comparación con un protocolo estándar de fenol/cloroformo.

Para la extracción de ARN, se utiliza 1 mm de reactivo Tri (Trizol) por cada 50 mg de tejido, $5-10 \times 10^6$ células o $10\ \text{cm}^2$ de placa de cultivo. Se homogeneizan las muestras y a continuación se dejan reposar a temperatura ambiente durante 5 minutos para permitir la disociación de complejos de nucleoproteínas. Se añaden 200 μl de cloroformo, se agitan enérgicamente y se dejan reposar durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugan a 12.000 **g** durante 15 minutos a 4°C . Se transfiere la fase acuosa a un tubo limpio y se precipita el ARN de la fase acuosa mediante mezclado suave con 0,5 ml de isopropanol por cada mililitro de reactivo Tri. Se guardan las muestras a temperatura ambiente durante 10 minutos y se centrifugan a 12.000 **g** durante 8 minutos a 4°C . Se retira el sobrenadante y se lava el sedimento de ARN con etanol al 75% y una posterior centrifugación a 7.500 **g** durante 5 minutos a 4°C . El ARN se puede solubilizar en agua u otra solución adecuada.

2.6.3. Preparación de portas para la hibridación *in-situ*

Para la hibridación *in situ*, se fijan moluscos en fijador de Davidson durante unas 24 horas y a continuación se incluyen en parafina, según los métodos descritos arriba para la histología. Se realizan cortes de 5 μm de espesor y se colocan sobre portas recubiertos de aminoalquilsilano, que a continuación se secan durante toda la noche a temperatura ambiente o en un horno a 40°C . Se desparafinan los cortes mediante inmersión en xileno durante 10 minutos. Este paso se repite una vez y a continuación el disolvente se elimina por inmersión en dos baños sucesivos de metanol absoluto durante 10 minutos cada uno. Después, se rehidratan los cortes por inmersión en una serie de etanol de graduación descendente. El protocolo puede requerir un paso de permeabilización de membrana que permita el acceso al ADN diana. Para este fin, se tratan los cortes con proteinasa K ($100\ \mu\text{gml}^{-1}$) en tampón TE (Tris [50 mM], EDTA [10 mM]), a 37°C durante 10-30 minutos.

BIBLIOGRAFÍA CLAVE PARA LECTURA ADICIONAL

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

ANDERSON T.J., MCCAUL T.F., BOULO V., ROBLEDO J.A.F. & LESTER R.J.G. (1994). Light and electron immunohistochemical assays on paramyxean parasites. *Aquatic Living Resources*, **7**, 47-52.

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

- AZEVEDO C., CORRAL L. & CACHOLA R. (1990). Fine structure of zoosporulation in *Perkinsus atlanticus* (Apicomplexa: Perkinsea). *Parasitology*, **100**, 351–358.
- BALSEIRO P., ARANGUREN R., GESTAL C., NOVOA B. & FIGUERAS A. (2006). *Candidatus Xenohaliothys californiensis* and *Haplosporidium montforti* associated with mortalities of abalone *Haliotis tuberculata* cultured in Europe. *Aquaculture*, **258**, 63–72.
- BERTHE F.C.J., BURRESON E. & HINE M. (1999). Use of molecular tools for mollusc disease diagnosis. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, **19**(6), 277–278.
- BERTHE F.C.J., LE ROUX F., ADLARD R.D. & FIGUERAS A.J. (2004). Marteiliiosis of molluscs: a review. *Aquatic Living Resources*, **17**(4), 433–448.
- BONDAD-REANTASO M.G., MCGLADDERY S.E., EAST I. & SUBASINGHE R.P. (2001). Asian Diagnostic Guide to Aquatic Animal Diseases. *FAO Fisheries Technical Paper*, No. 402, supplement 2. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), Rome, Italy, 240 pp.
- BOULO V., MIALHE E., ROGIER H., PAOLUCCI F. & GRIZEL H. (1989). Immunodiagnosis of *Bonamia ostreae* (Ascomycota) infection of *Ostrea edulis* L. and subcellular identification of epitopes by monoclonal antibodies. *J. Fish Dis.*, **12**, 257–262.
- BOWER S.M., MCGLADDERY S.E. & PRICE I.M. (1994). Synopsis of infectious diseases and parasites of commercially exploited shellfish. *Ann. Rev. Fish Dis.*, **4**, 1–199.
- BURRESON E.M. & FORD S.E. (2004). A review of recent information on the Haplosporidia, with special reference to *Haplosporidium nelsoni* (MSX disease). *Aquatic Living Resources*, **17**(4), 499–517.
- BUSHEK D., FORD S.E. & ALLEN SK (1994). Evaluation of methods using Ray's fluid thioglycollate medium for diagnosis of *Perkinsus marinus* infections in the eastern oyster, *Crassostrea virginica*. *Ann. Rev. Fish. Dis.*, **4**, 201–217.
- CARNEGIE R.B., BARBER B.J., CULLOTY S.C., FIGUERAS A.J. & DISTEL D.L. (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**, 199–206.
- CARNEGIE R.B. & COCHENNEC-LAUREAU N. (2004). Microcell parasites of oysters: recent insights and future trends. *Aquatic Living Resources*, **17**(4), 519–528.
- CHANG P.H., KUO S.T., LAI S.H., YANG H.S., TING Y.Y., HSU C.L. & CHEN H.C. (2005). Herpes-like virus infection causing mortality of cultured abalone *Haliotis diversicolor supertexta* in Taiwan. *Dis. Aquat. Org.*, **65**, 23–27.
- COCHENNEC N., LE ROUX F., BERTHE F. & GERARD A. (2000). Detection of *Bonamia ostreae* based on small subunit ribosomal probe. *J. Invertebr. Pathol.*, **76**, 26–32.
- CORBEIL S., COLLING A., WILLIAMS L.M., WONG F.Y.K., SAVIN K., WARNER S., MURDOCH B., COGAN N.O.I., SAWBRIDGE T.I., FEGAN M., MOHAMMAD I., SUNARTO A., HANDLINGER J., PYECROFT S., DOUGLAS M., CHANG P.H. & CRANE M.ST.J. (2010). Development and validation of a TaqMan® PCR assay for the Australian abalone herpes-like virus. *Dis. Aquat. Org.*, **92**, 1–10.
- CRANFIELD H.J., DUNN A., DOONAN I.J. & MICHAEL K.P. (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.
- DAVISON A.J., TRUS B.L., CHENG N., STEVEN A.C., WATSON M.S., CUNNINGHAM C., LE DEUFF R.M. & RENAULT T. (2005). A novel class of herpesvirus with bivalve hosts. *J. Gen. Virol.*, **86**, 41–53.
- DIGGLES B.K., COCHENNEC-LAUREAU N. & HINE P.M. (2003). Comparison of diagnostic techniques for *Bonamia exitiosa* from flat oysters *Ostrea chilensis* in New Zealand. *Aquaculture*, **220**, 145–156.
- DINAMANI P., HINE P.M. & JONES J.B. (1987). Occurrence and characteristics of the haemocyte parasite *Bonamia* sp. in the New Zealand dredge oyster *Tiostrea lutaria*. *Dis. Aquat. Org.*, **3**, 37–44.
- DOUGLAS M., CHANG P.H. & CRANE M.ST.J. (2010). Development and validation of a TaqMan® PCR assay for the Australian abalone herpes-like virus. *Dis. Aquat. Org.*, **92**, 1–10.

DUNGAN C.F. & ROBERSON B.S. (1993). Binding specificities of mono- and polyclonal antibodies to the protozoan oyster pathogen *Perkinsusmarinus*. *Dis. Aquat. Org.*, **15**, 9–22.

ELSTON R.A. (1999). Health Management, Development and Histology of Seed Oysters. World Aquaculture Society. Baton Rouge, Louisiana, USA, 110 pp.

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

FONG D., RODRIGUEZ R., KOO K., SUN J., SOGIN M.L., BUSHEK D., LITTLEWOOD D.T.J. & FORD S.E. (1993). Small subunit ribosomal RNA gene sequence of the oyster parasite *Perkinsusmarinus*. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.*, **2**, 346–350.

FORD S.E. (1992). Avoiding the transmission of disease in commercial culture of molluscs, with special reference to *Perkinsusmarinus* (Dermo) and *Haplosporidiumnelsoni* (MSX). *J. Shellfish Res.*, **11**, 539–546.

FRIEDMAN C.S., ANDREE K.B., BEAUCHAMP K.A., MOORE J.D., ROBBINS T.T., SHIELDS J.D. & HEDRICK R.P. (2000). "*CandidatusXenohaliothiscaliforniensis*" a newly described pathogen of abalone, *Haliotis* spp., along the west coast of North America. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **50**, 847–855.

FRIEDMAN C.S., BIGGS W., SHIELDS J.D. & HEDRICK R.P. (2002). Transmission of withering syndrome in black abalone, *Haliotis cracherodii* Leach. *J. Shellfish Res.*, **21** (2), 817–824.

GALTSOFF P.S. (1964). The American oyster, *Crassostrea virginica* Gmelin. *Fishery Bull.*, **64**, 480 pp.

GRIZEL H., COMPS M., BONAMI J-R, COUSSERANS F., DUTHOIT J.L. & LE PENNEC M.A. (1974). Recherche sur l'agent de la maladie de la glande digestive de *Ostrea edulis* Linné. Science et Pêche. Bull Inst. Pêches marit., **240**, 7–30.

GRIZEL H., MIALHE E., CHAGOT D., BOULO V. & BACHERE E. (1988). Bonamiasis: a model study of diseases in marine molluscs. In: Disease Processes in Marine Bivalve Molluscs, Fisher W.S., ed. American Fisheries Society Special Publication **18**, 1–4.

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

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

HINE P.M. & THORNE T. (2000). A survey of some parasites and diseases of several species of bivalve mollusc in northern Western Australia. *Dis. Aquat. Org.*, **40**, 67–78.

HOOPER C., HARDY-SMITH P. & HANDLINGER J. (2007). Ganglioneuritis causing high mortalities in farmed Australian abalone (*Haliotis laevis* and *Haliotis rubra*). *Aus. Vet. J.*, **85**, 188–193.

HOWARD D.W., LEWIS E.J., KELLER J. & SMITH C.S. (2004). Histological techniques for marine bivalve molluscs and crustaceans. NOAA Technical Memorandum NOS NCCOS 5, 218 pp.

KLEEMAN S.N., LE ROUX F., BERTHE F. & ADLARD R.D. (2002). Specificity of PCR and *in situ* hybridization assays designed for detection of *Marteilia sydneyi* and *M. refringens*. *Parasitology*, **125**, 131–141.

KOTOB S., MCLAUGHLIN S.M., VAN BERKUM P. & FAISAL M. (1999). Discrimination between two *Perkinsus* spp. isolated from the softshell clam, *Mya arenaria*, by sequence analysis of two internal transcribed spacer regions and the 5.8S ribosomal RNA gene. *Parasitology*, **119**, 363–368.

LE DEUFF R.-M. & RENAULT T. (1999). Purification and partial genome characterization of a herpes-like virus infecting the Japanese oyster, *Crassostrea gigas*. *J. Gen. Virol.*, **80**, 1317–1322.

LE ROUX F., AUDEMARD C., BARNAUD A. & BERTHE F. (1999). DNA probes as potential tools for the detection of *Marteilia refringens*. *Mar. Biotechnol.*, **1**, 588–597.

LE ROUX F., LORENZO G., PEYRET P., AUDEMARD C., FIGUERAS A., VIVARES C., GOUY M. & BERTHE F. (2001). Molecular evidence for the existence of two species of *Marteilia* in Europe. *J. Eukaryot. Microbiol.*, **48**, 449–454.

LESTER R.J.G. & DAVIS G.H.G. (1981). A new *Perkinsus* species (Apicomplexa, Perkinsea) from the abalone *Haliotis ruber*. *J. Invertebr. Pathol.*, **37**, 181–187.

LONGSHAW M., FEIST S.W., MATTHEWS R.A. & FIGUERAS A. (2001). Ultrastructural characterization of *Marteilia* species (Paramyxia) from *Ostrea edulis*, *Mytilus edulis* and *Mytilus galloprovincialis* in Europe. *Dis. Aquat. Org.*, **44**, 137–142.

MCDOWELL E. & TRUMP B.F. (1976). Histologic fixatives suitable for diagnostic light and electron microscopy. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, **100**, 405–414.

MIALHE E., BACHERE E., BOULO V., CADORET J.P., ROUSSEAU C., CEDENO V., SARAIVA E., CARRERA L., CALDERON J. & COLWELL R.R. (1995). Future of biotechnology-based control of disease in marine invertebrates. *Molec. Mar. Biol. Biotechnol.*, **4**, 275–283.

MURRELL A., KLEEMAN S.N., BARKER S.C. & LESTER R.J.G. (2002). Synonymy of *Perkinsus olseni* Lester & Davis, 1981 and *P. atlanticus* Azevedo, 1989 and an update on the phylogenetic position of the genus *Perkinsus*. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, **22**, 258–265.

OSSIANDER F.J. & WEDEMEYER G. (1973). Computer program for sample size required to determine disease incidence in fish populations. *J. Fish. Res. Board Can.*, **30**, 1383–1384.

PÉPIN J. F., RIOU A. & RENAULT T. (2008). Rapid and sensitive detection of ostreid herpesvirus 1 in oyster samples by real-time PCR. *J. Virol. Methods*, **149**, 269–276.

RAY S.M. (1966). A review of the culture method for detecting *Dermocystidium marinum* with suggested modifications. *Proc. Natl Shellfish Assoc.*, **54**, 55–69.

REECE K., SIDDALL M.E., BURRESON E.M. & GRAVES J.E. (1997). Phylogenetic analysis of *Perkinsus* based on actin gene sequences. *J. Parasitol.*, **83**, 417–423.

RENAULT T., LE DEUFF R.-M., COCHENNEC N. & MAFFART P. (1994). Herpesviruses associated with mortalities among Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, in France – comparative study. *Revue de Médecine Vétérinaire*, **145**, 735–742.

RENAULT T., LE DEUFF R.-M., LIPART C. & DELSERT C. (2000). Development of a PCR procedure for the detection of a herpes-like virus infecting oysters in France. *J. Virol. Methods*, **88**, 41–50.

RODRIGUEZ F. & NAVAS J.L. (1995). A comparison of gill and haemolymph assays for the thioglycollate diagnosis of *Perkinsus atlanticus* (Apicomplexa, Perkinsea) in clams, *Ruditapes decussatus* (L.) and *Ruditapes philippinarum* (Adamson & Reeve). *Aquaculture*, **132**, 145–152.

SAVINK W., COCKS B.G., WONG F., SAWBRIDGE T., COGAN N., SAVAGE D. & WARNER S. (2010). A neurotropic herpesvirus infecting the gastropod, abalone, shares ancestry with oyster herpesvirus and a herpesvirus associated with the amphioxus genome. *Virology*, **7**, 308. <http://www.virology.com/content/7/1/308>.

SEGARRA A., PEPIN J.F., ARZUL I., MORGA B., FAURY N. & RENAULT T. (2010). Detection and description of a particular *Ostreid herpesvirus 1* genotype associated with massive mortality outbreaks of Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, in France in 2008. *Virus Res.*, **153**, 92–99.

STOKES N.A. & BURRESON E.M. (1995). A sensitive and specific DNA probe for the oyster pathogen *Haplosporidium nelsoni*. *J. Eukaryot. Microbiol.*, **42**, 350–357.

TAN J., LANCASTER M., HYATT A., VAN DRIEL R., WONG F. & WARNER S. (2008). Purification of a herpes-like virus from abalone (*Haliotis* spp.) with ganglioneuritis and detection by transmission electron microscopy. *J. Virol. Methods*, **149**, 338–341.

THOESON J.C. (1994). Suggested Procedures for the Detection and Identification of Certain Finfish and Shellfish Pathogens, Fifth Edition. *Bluebook*, American Fisheries Society, Bethesda, USA.

VILLALBA A., REECE K.S., ORDÁS M.C., CASAS S.M. & FIGUERAS A. J. (2004). Perkinsosis in molluscs. *Aquatic Living Resources*, **17**(4), 411–432.

WALKER P. & SUBASINGHE R.P. (2000). DNA-based Molecular Diagnostic Techniques. Research needs for standardization and validation of the detection of aquatic animal pathogens and diseases. *FAO Fisheries Technical Paper*, n°395, 93 pp.

YARNALL H.A., REECE K.S., STOKES N.A. & BURRESON E.M. (2000). A quantitative competitive polymerase chain reaction assay for the oyster pathogen *Perkinsus marinus*. *J. Parasitol.*, **86**, 827–837.

*

* *