

INFECCIÓN POR *BONAMIA OSTREAE*

1. **Ámbito de aplicación**

Bonamia ostreae es un parásito protozoario del filo Haplosporidia (Carnegie & Cochenec-Laureau, 2004; Lopez-Flores *et al.*, 2007) que infecta hemocitos de la ostra europea, *Ostrea edulis*, e induce trastornos de la fisiología y finalmente la muerte del animal (Grizel, 1985). A efectos de este capítulo, la infección por *Bonamia ostreae* se considera una infección por *B. ostreae*. Esta definición excluye infecciones por *B. exitiosa* (Hine *et al.*, 2001), *B. roughleyi* (Cochennec *et al.*, 2003) y *B. perspora* (Carnegie *et al.*, 2006). Los casos de *Bonamia* spp. que no estén identificados a nivel de especie deben remitirse al Laboratorio de Referencia de la OIE correspondiente.

2. **Información sobre la enfermedad**

2.1. **Factores del agente**

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

Bonamia ostreae (Pichot *et al.*, 1979), no se ha identificado ninguna cepa.

2.1.2. **Supervivencia fuera del hospedador**

Hasta un 58% de los parásitos purificados de ostras intensamente infectadas parece sobrevivir tras 1 semana en agua de lechos marinos a 15°C (Arzul *et al.*, 2009).

2.1.3. **Estabilidad del agente (métodos eficaces de inactivación)**

Se ha observado que un baño en ácido peracético (al 0,001% y al 0,005%) reduce la contaminación de las ostras por *B. ostreae* (Grizel, 1985).

2.1.4. **Ciclo de vida**

El ciclo de vida fuera del hospedador no se conoce, pero es posible que se produzca una transmisión del parásito directamente de hospedador a hospedador por cohabitación o por inoculación de parásitos purificados (Hervio *et al.*, 1995), lo cual sugiere que no se precisa hospedador intermediario.

2.2. **Factores del hospedador**

2.2.1. **Especies hospedadoras susceptibles**

Hospedador natural: Ostra europea, *Ostrea edulis*.

Especies de ostra infectadas cuando se trasladan a zonas endémicas de *B. ostreae*: *Ostrea puelchana*, *O. angasi*, *O. chilensis* (= *Tiostrea chilensis*, *T. lutaria*) (Carnegie & Cochenec-Laureau, 2004). No obstante, en estos hospedadores el parásito no se ha identificado hasta nivel de especie.

Pruebas experimentales han indicado una baja infectividad por *B. ostreae* en *Crassostrea ariakensis* (Audemard *et al.*, 2005).

Se ha establecido la hipótesis de que *Ostrea conchaphila* (= *O. lurida*) y *Crassostrea angulata* pueden resultar infectadas por *B. ostreae* (Carnegie & Cochenec-Laureau, 2004), pero no se ha logrado un diagnóstico.

En trabajos experimentales se ha observado que las siguientes especies no son susceptibles a *B. ostreae*: *C. gigas*, *Ruditapes decussatus*, *R. philippinarum*, *Mytilus edulis* y *M. galloprovincialis* (Culloty *et al.*, 1999).

2.2.2. Fases susceptibles de la vida del hospedador

O. edulis tanto de 0+ como de 1+ año de edad es susceptible al parásito y puede desarrollar una alta prevalencia e intensidad de infección, e incluso mortalidades a lo largo de un periodo de 6 meses (Lynch *et al.*, 2005). No obstante, los ejemplares de más de 2 años parecen ser más susceptibles a la enfermedad (Culloty & Mulcahy, 1996; Grizel, 1985; Engelsma *et al.*, 2010). Los ejemplares para siembra procedentes de poblaciones salvajes parecen estar significativamente más parasitados que las ostras procedentes de viveros (Conchas *et al.*, 2003).

Recientemente se ha observado que las larvas pueden resultar infectadas por *B. ostreae* (Arzul *et al.*, 2010).

2.2.3. Especies o subpoblaciones predilectas (probabilidad de detección)

Ostrea edulis es la única especie conocida susceptible en condiciones naturales, cuya intensidad de infección aumenta al mismo tiempo que la mortalidad con la edad y/o tamaño de las ostras (Culloty & Mulcahy, 1996; Grizel, 1985).

2.2.4. Órganos diana y tejidos infectados

Bonamia ostreae es un protozoo intrahemocítico (Comps *et al.*, 1980; Pichot *et al.*, 1979) pero puede observarse extracelularmente entre células epiteliales o intersticiales en las branquias y el estómago, así como en zonas de tejido conjuntivo necrótico. También se ha observado una localización intraepitelial en branquias (Montes *et al.*, 1994) y en tejido ovárico (Van Banning, 1990). Las infecciones avanzadas se convierten en sistémicas. En las larvas, el parásito se ha detectado en el epitelio que circunda la cavidad visceral (Arzul *et al.*, 2010).

2.2.5. Infección persistente con portadores de por vida

La infección a menudo es mortal, en función del hospedador y de las condiciones ambientales.

2.2.6. Vectores

Se ha estudiado el posible papel de los macroinvertebrados bentónicos y del zooplancton en el ciclo de vida de *B. ostreae*. La ofiura de espinas finas, *Ophiothrix fragilis*, se ha identificado como posible vector del parásito (Lynch *et al.*, 2006).

El resultado positivo en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) observado en *Crassostrea gigas* sugiere que esta especie podría actuar como portador o reservorio de *B. ostreae* (Lynch *et al.*, 2010).

2.2.7. Animales acuáticos salvajes portadores o sospechosos de serlo

También existen poblaciones salvajes de ostra europea, *Ostrea edulis*, infectadas por *B. ostreae*.

2.3. Patrón de la enfermedad

2.3.1. Mecanismos de transmisión

Es posible que se produzca una transmisión directa entre hospedadores. La forma infectiva y las vías de entrada y de salida siguen sin conocerse. El parásito se ha observado en larvas incubadas en la cavidad paleal de ostras adultas, lo cual sugiere una posible transmisión entre estos dos grupos de edad. Así pues, las larvas podrían contribuir a la diseminación del parásito durante su vida planctónica (Arzul *et al.*, 2010). En general, tiene lugar un lapso de tiempo de al menos 3 meses antes de poder detectar el parásito en lotes que estaban libres de la enfermedad y que han sido trasladados a zonas infectadas.

2.3.2. Prevalencia

La prevalencia es variable (de entre el 0% y el 80%), y más alta en individuos de más de 2 años. La enfermedad tiene lugar y puede transmitirse a lo largo de todo el año, pero existe una variación estacional en la infección por *B. ostreae*, de modo que la prevalencia de la infección aumenta a partir de otoño y alcanza un pico a finales de invierno/principios de primavera (Arzul *et al.*, 2006; Culloty & Mulcahy, 1996; Grizel, 1985; Engelsma *et al.*, 2010).

2.3.3. Distribución geográfica

Se ha observado infección por *B. ostreae* en Europa (Francia, Irlanda, Italia, Países Bajos, Portugal, España y el Reino Unido), Canadá (Columbia Británica) y Estado Unidos (los estados de California, Maine y Washington) (Carnegie & Cochenec-Laureau, 2004).

2.3.4. Mortalidad y morbilidad

La infección de ostra europea, tanto salvaje como cultivada, suele ser letal, y suelen morir en el momento de máxima intensidad de la infección.

2.3.5. Factores ambientales

La supervivencia de los parásitos purificados y mantenidos en agua de mar es inferior a los 25°C que a los 4°C o 15°C (Arzul *et al.*, 2009). Las salinidades altas (35, 40 y 45 ups) parecen favorecer la supervivencia del parásito (Arzul *et al.*, 2009). La prevalencia muestra un patrón anual que puede diferir en función de la zona, de modo que aumenta a partir de otoño y presenta un pico a finales de invierno/principios de primavera. En general se observan dos picos, que tienen lugar en invierno/primavera y en otoño (Arzul *et al.*, 2006; Culloty & Mulcahy, 1996). Las temperaturas más bajas y las salinidades más altas del verano inducen una mayor prevalencia en el siguiente invierno (Arzul *et al.*, 2006). *Ostrea edulis* parece ser más susceptible a *B. ostreae* tras los periodos de menor disponibilidad de alimento y menores salinidades (Engelsma *et al.*, 2010).

2.4. Control y prevención

2.4.1. Vacunación

Ninguna.

2.4.2. Tratamiento con sustancias químicas

Ninguno.

2.4.3. Inmunoestimulación

Ninguna.

2.4.4. Selección genética a favor de la resistencia

Se ha observado que la selección genética a favor de la resistencia es eficaz para reducir la susceptibilidad a *B. ostreae* y la mortalidad que causa (Naciri-Graven *et al.*, 1998).

2.4.5. Repoblación con especies resistentes

Las especies resistentes de *Ostrea edulis* desarrolladas mediante una cría selectiva podría constituir una alternativa en las zonas infectadas.

2.4.6. Agentes bloqueantes

Ninguno.

2.4.7. Desinfección de huevos y larvas

No se dispone de datos.

2.4.8. Prácticas generales de manejo

Las mortalidades causadas por la bonamiosis pueden reducirse utilizando cultivos en suspensión, menores densidades de población o bien cultivando *Ostrea edulis* con *Crassostrea gigas*, que no es susceptible de forma natural a la infección (Carnegie & Cochenec-Laureau, 2004). Los ejemplares de ostras para siembra procedentes de viveros son preferibles a los procedentes de poblaciones naturales, puesto que estos últimos parecen estar considerablemente más parasitados (Conchas *et al.*, 2003).

3. Obtención de muestras

3.1. Elección de ejemplares

Como muestra deben escogerse prioritariamente individuos moribundos o que acaben de morir (2 o más años de edad) con el fin de aumentar la probabilidad de hallar ostras infectadas. Para la histología, solo deben escogerse ostras vivas (pueden incluirse moribundas).

La obtención de muestras debe organizarse de modo que se lleve a cabo una vez al año, en el momento de máxima prevalencia. Cuando no se disponga de esta información en un ecosistema determinado, la obtención de muestras deberá llevarse a cabo preferiblemente a finales de invierno-principios de primavera o en otoño (Arzul *et al.*, 2006; Culloty & Mulcahy, 1996; Engelsma *et al.*, 2010).

3.2. Conservación de las muestras para su envío

Para la histología, el mejor conservante es el AFA del Davidson, pero la formalina tamponada al 10% u otros fijadores estándar para histología también son aceptables. Para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), las muestras deben conservarse en etanol al 95-100% y en alcohol no desnaturalizado.

3.3. Combinación de varias muestras

La combinación de muestras podría ser interesante, pero no se ha evaluado su posible impacto en el rendimiento de las pruebas de diagnóstico.

3.4. Órganos y tejidos de elección

Para el diagnóstico e *B. ostreae* mediante histología se utilizan cortes de 3-5 μm de grosor que incluyan las branquias, el manto, la gónada y la glándula digestiva. Para ciertas pruebas, como las improntas o la PCR, lo mejor es utilizar tejido de las branquias y/o del corazón.

3.5. Muestras/tejidos que no son adecuados

Cualquier tejido distinto de las branquias, el corazón y el manto es menos adecuado.

4. Métodos de diagnóstico

4.1. Métodos de diagnóstico de campo

4.1.1. Signos clínicos

Los signos clínicos son ostras muertas o moribundas, pero estos signos clínicos no son patognomónicos de la infección por *B. ostreae*, de modo que podrían indicar otras infecciones.

4.1.2. Alteraciones del comportamiento

Incapacidad de cerrar la concha cuando se les saca del agua.

4.2. Métodos clínicos

4.2.1. Anatomopatología macroscópica

La anatomopatología macroscópica incluye en ocasiones una coloración amarilla, así como extensas lesiones que incluyen úlceras perforadas en los tejidos conjuntivos de las branquias, el manto y la glándula digestiva (Comps *et al.*, 1980). Los signos macroscópicos no son patognomónicos de la infección por *B. ostreae* y la mayoría de ostras infectadas tiene un aspecto normal.

4.2.2. Bioquímica clínica

Ninguna.

4.2.3. Anatomopatología microscópica

Infiltraciones densas de hemocitos, algunas de las cuales contienen parásitos, en el tejido conjuntivo de la branquia y el manto, y en los senos vasculares que envuelven el estómago y el intestino, que pueden observarse en cortes fijados (Comps *et al.*, 1980).

4.2.4. Preparaciones húmedas

Ninguna.

4.2.5. Improntas

Pueden observarse microorganismos esféricos u ovoides (de 2-5 µm de ancho) dentro de los hemocitos en improntas de corazón o de branquias.

4.2.6. Microscopía electrónica/citopatología

En la infección avanzada, se puede observar el parásito dentro de los hemocitos.

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 es aplicable.

4.3.1.1.2. Improntas

Muestras a obtener: tejidos blandos de ostra europea, y ventrículo cardiaco o branquias de hospedadores vivos de 2 años de edad o más.

Procedimiento técnico: tras secar los tejidos sobre papel absorbente, se realizan varias improntas sobre un porta de vidrio. Los portas se secan al aire, se fijan en metanol o en etanol absoluto y se tiñen empleando un kit comercial de tinción de sangre, siguiendo las instrucciones del fabricante. Tras enjuagarlos en agua de grifo y secarlos, los portas se montan con un cubreobjetos empleando una resina sintética adecuada. Los portas se observan primero a 200 aumentos y a continuación en aceite de inmersión a 1.000 aumentos.

Controles positivos: son recomendables y pueden adquirirse en el Laboratorio de Referencia de la OIE.

Niveles de validación:

- *Especificidad y sensibilidad:* la especificidad es baja, pero la sensibilidad es mejor que el examen histológico (Da Silva & Villalba, 2004). No obstante, parece ser que la técnica de la impronta de corazón no es fiable para detectar infecciones latentes.
- *Método de referencia:* la sensibilidad de las improntas de tejido es mayor que la de la histología, que es el método de referencia, aunque no aquellas no son específicas de la especie de parásito.

Interpretación de los resultados:

- Un resultado positivo es la presencia de pequeños microorganismos esféricos u ovoides (de 2-5 µm de ancho) dentro de hemocitos. No obstante, el parásito también podría observarse extracelularmente. Estos microorganismos presentan un citoplasma basófilo y un núcleo eosinófilo (los colores pueden variar en función de la tinción utilizada) y, dado que se esparcen sobre el porta, en las improntas pueden parecer más anchos que en las preparaciones histológicas. Se han observado células multinucleadas. Esta técnica no es específica de la especie de parásito.
- En especies susceptibles que se encuentren en la zona geográfica en la que se sabe que hay infección por *B. ostreae*, un resultado positivo es muy indicativo de infección por *B. ostreae* o *B. exitiosa*.

- En otras especies de fuera de la zona geográfica en la que se sabe que hay infección por *B. ostreae*, un resultado positivo indica infección por una especie de *Bonamia* que tendrá que confirmarse en el Laboratorio de Referencia de la OIE.

Disponibilidad de pruebas comerciales: se comercializan kits de tinción rápida (por ejemplo, Hemacolor®).

4.3.1.1.3. Cortes fijados

4.3.1.1.3.1. Histología

Muestras a obtener: ostras vivas o que acaben de morir.

Procedimiento técnico: los cortes de tejido que incluyan branquias, glándula digestiva, manto y gónada deben fijarse durante 24 horas en fijador de Davidson o en otros fijadores estándar para histología, como formalina tamponada al 10%, y a continuación debe aplicarse un procedimiento normal para la inclusión en parafina y la tinción, por ejemplo, con hematoxilina y eosina. Las observaciones se llevan a cabo con aumentos cada vez mayores hasta llegar a los 1.000.

Controles positivos: son recomendables y pueden adquirirse en el Laboratorio de Referencia de la OIE.

Niveles de validación:

- *Especificidad y sensibilidad:* la especificidad es menor, pero la sensibilidad es buena para la detección en infecciones de intensidad moderada a alta, y baja en el caso de infecciones de baja intensidad.
- *Método de referencia:* la histología es el método de referencia y el que se recomienda para la vigilancia en zonas solo infectadas por *B. ostreae*. Sin embargo, en zonas donde cohabitan *B. exitiosa* y *B. ostreae*, un resultado positivo en la histología tendrá que confirmarse por caracterización molecular.

Interpretación de los resultados:

- Un resultado positivo es la presencia de parásitos en forma de células muy pequeñas, de 2-5 μm de ancho, dentro de los hemocitos o libres en el tejido conjuntivo o el epitelio de los senos de las branquias, del intestino y del manto, que a menudo se asocian a una intensa reacción inflamatoria. Para evitar posibles dudas, un resultado solo se considerará positivo si se observan parásitos dentro de hemocitos. Esta técnica no es específica de especie.
- En especies susceptibles de la zona geográfica en la que se sabe que hay infección por *B. ostreae*, un resultado positivo es muy indicativo de infección por *B. ostreae* o *B. exitiosa*
- En otras especies o fuera de la zona geográfica en la que se sabe que hay infección por *B. ostreae*, un resultado positivo indica infección por una especie de *Bonamia* que tendrá que confirmarse en el Laboratorio de Referencia de la OIE.

Disponibilidad de pruebas comerciales: no se dispone de ninguna.

4.3.1.1.3.2. Microscopía electrónica de transmisión

Muestras a obtener: ostras vivas o que acaben de morir.

Procedimiento técnico: debe fijarse un pequeño trozo de tejido (1-2 mm) en glutaraldehído al 3% (en agua de mar filtrada por un tamaño de poro de 0,22 μm [FSW]) durante 1 hora, lavarse tres veces en FSW, fijarse en ácido ósmico al 1% y lavarse dos veces más con FSW. Tras la deshidratación en baños sucesivos de etanol, y dos baños de óxido de propileno, las muestras deben impregnarse progresivamente e incluirse en Epon. Tras la polimerización a 60°C, deben realizarse cortes de los bloques de 0,5-1 μm de espesor para el control de calidad, y después de 80-100 nm para el examen al microscopio electrónico. Se depositan cortes ultrafinos en rejillas de malla de cobre y se les aplica una tinción de contraste utilizando acetato de uranilo y citrato de plomo

Controles positivos: ninguno.

Niveles de validación:

- *Especificidad y sensibilidad:* la especificidad es mejor que la de las improntas o la histología. La microscopía electrónica de transmisión (MET) puede ayudar a diferenciar *B. ostreae* de otras microcélulas estrechamente relacionadas, como *B. exitiosa*.

Interpretación de los resultados:

- Un resultado positivo es la presencia de parásitos dentro de los hemocitos. Se han observado varias fases, como los uninucleados, los diplocarióticos y los plasmodiales (Montes *et al.*, 1994; Pichot *et al.*, 1979). Las estructuras intracelulares son las mitocondrias, los haplosporosomas, el aparato de Golgi y microtúbulos intranucleares persistentes.
- Las formas densas de *B. ostreae* son más densas y ligeramente más pequeñas (diámetro medio de 64 parásitos = $2,4 \pm 0,5 \mu\text{m}$) que *B. exitiosa* (diámetro medio de 61 parásitos = $3 \pm 0,3 \mu\text{m}$) y tienen menos haplosporosomas, perfiles mitocondriales y cuerpos lipoides por corte de ultraestructura, así como unas mitocondrias tubulovesiculares más grandes que *B. exitiosa*. Además, las formas densas de *B. ostreae* carecen de complejos de aparato de Golgi/copa nuclear unidos a la membrana nuclear, y de fase vacuolada (Hine *et al.*, 2001).

Disponibilidad de pruebas comerciales: no se dispone de ninguna.

4.3.1.2. Aislamiento e identificación del agente4.3.1.2.1. *Cultivo celular/medios artificiales*

Ninguno disponible.

4.3.1.2.2. *Métodos de detección del antígeno basados en anticuerpos*

Se ha desarrollado una técnica de inmunofluorescencia basada en anticuerpos monoclonales y se ha observado que tiene una sensibilidad similar a la de las improntas de tejido. No obstante, esta técnica ha dado resultados poco claros cuando se ha aplicado de forma extensa a ostras de Maine, EE.UU. (Carnegie & Cochenec-Laureau, 2004). Aunque en su momento se desarrolló un inmunoanálisis directo en sándwich con anticuerpos monoclonales para la detección de *B. ostreae* en muestras de hemolinfa de *O. edulis* (Cochennec *et al.*, 1992) y se comercializó durante unos pocos años a mediados de los 90, ya no se comercializa. La especificidad y sensibilidad de esta última técnica en comparación con la histología son del 76,7% y del 106%, respectivamente (Cochennec *et al.*, 1992).

4.3.1.2.3. *Técnicas moleculares*4.3.1.2.3.1. *Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)*

Muestras a obtener: ostras vivas o que acaben de morir.

Procedimiento técnico: las muestras de tejido se introducen en etanol al 95-100% o se congelan hasta que se extrae el ADN. La extracción del ADN se lleva a cabo mediante digestión con proteinasa K durante toda la noche a 50-55°C, y extracción con fenol-cloroformo con precipitación mediante etanol (Carnegie *et al.*, 2000; Cochenec *et al.*, 2000) o la metodología de la columna de centrifugación empleando kits comerciales (como el de QIAGEN) (Carnegie *et al.*, 2000).

Se han desarrollado tres protocolos de PCR convencional para *Bonamia ostreae* con tres pares de cebadores distintos que acceden al ADNr de la subunidad pequeña (SSU):

El primer par de cebadores es 5'-CAT-TTA-ATT-GGT-CGG-GCC-GC-3' y 5'-CTG-ATC-GTC-TTC-GAT-CCC-CC-3', denominados Bo y Boas, respectivamente, y amplifica un producto de 300 pb (Cochennec *et al.*, 2000). Las mezclas para PCR contienen tampón (KCl 500 mM, Tris/HCl 100 mM [pH 9,0 a 25°C] y Triton[®] X-100 al 1%), MgCl₂ 2,5 mM, mezcla de las distintas dNTP, cada una a una concentración 0,2 mM, los cebadores directo e inverso a una concentración 1 μM , 0,02 unidades μl^{-1} de ADN polimerasa Taq, y 0,2 ng μl^{-1} del ADN molde en un volumen total de 50 μl . Las muestras se desnaturalizan en un termociclador durante 5 minutos a 94°C antes de ser sometidas a 30 ciclos (94°C durante 1 minuto, 55°C durante 1 minuto, 72°C durante 1 minuto) seguidos de una extensión final de 10 minutos a 72°C.

El segundo par de cebadores es 5'-CGG-GGG-CAT-AAT-TCA-GGA-AC-3' y 5'-CCA-TCT-GCT-GGA-GAC-ACA-G-3', denominados C_F y C_R, respectivamente, y amplifica un producto de 760 pb (Carnegie *et al.*, 2000). La mezcla para la PCR contiene tampón (Tris/HCl 200 mM [pH 8,4], KCl

500 mM), MgCl₂ 1,5 mM, una mezcla de cada una de las dNTP, cada una a una concentración 0,2 mM, los cebadores directo e inverso, a una concentración 0,05 μM, 0,05 unidades μl⁻¹ de ADN polimerasa Taq, y 1 ng μl⁻¹ de ADN molde en un volumen total de 50 μl. Las muestras se someten a 35 ciclos (94°C durante 1 minuto, 55°C durante 1 minuto, 72°C durante 1 minuto) seguidos de una extensión final de 10 minutos a 72°C.

El tercer par de cebadores es 3'-CAA-TGG-TGC-GTT-CAA-CGA-T-5' y 3'-GGG-TTC-GCG-GTT-GAA-TTT-TA-5', denominados BoosF03 y BoosR03, respectivamente, y amplifica un producto de 352 pb (Engelsma *et al.*, 2010). La mezcla para la PCR contiene tampón (1x), MgCl₂ 2 mM, una mezcla de cada una de las dNTP, cada una a una concentración 0,2 mM, los cebadores directo e inverso, a una concentración 0,4 μM, 2 unidades de ADN polimerasa Taq en agua destilada con Nonidet P-40 al 0,005% (v/v) y 2 μl del ADN molde en un volumen total de 50 μl. Las muestras se desnaturalizan en un termociclador durante 2 minutos a 94°C antes de ser sometidas a 40 ciclos (94°C durante 30 segundos, 58°C durante 30 segundos, 72°C durante 45 segundos) seguidos de una extensión final de 7 minutos a 72°C.

Existen dos PCR TaqMan que también pueden emplearse:

Una PCR TaqMan en la que se emplean cebadores y sonda que acceden al ITS1 (espaciador transcrito interno) detecta *Bonamia* spp. (Corbeil *et al.*, 2006). La sensibilidad ha sido buena y esta prueba no amplifica *Haplosporidium nelsoni*, *H. costale* ni *Mikrocytos mackini*. No obstante, no está del todo validada.

Para la detección de *B. ostreae* también se ha desarrollado otra PCR TaqMan en la que se emplean cebadores y sonda que acceden a una pequeña región (de 67 pb) del ADNr de la subunidad pequeña (SSU) (Marty *et al.*, 2006). Los cebadores y la sonda se diseñaron para ser específicos de *Bonamia* spp. y no amplifican otros miembros del filo Haplosporidia. La sensibilidad y la especificidad son buenas y mejores que las de la histopatología.

Por último, se ha desarrollado una PCR en tiempo real SYBR[®] Green para detectar y cuantificar *B. ostreae* (Robert *et al.*, 2009). Esta prueba tiene por diana una región de 201 pb del gen de la actina 1 del parásito. Se ha observado que esta prueba solo tiene por diana *B. ostreae* y no parásitos estrechamente relacionados, como *B. exitiosa*. El límite inferior de detección es de 50 copias del gen y la prueba parece ser al menos diez veces más sensible que la PCR convencional. Se ha observado una buena correlación entre la semi-cuantificación del parásito mediante impronta de corazón y esta PCR en tiempo real.

Controles positivo/negativo: son obligatorios. Los controles positivos son: 1) PCR con cebadores específicos del ADN genómico de un hospedador intensamente infectado o ADN de parásitos purificados; 2) amplificación inespecífica (de actina, SSU, etc.). Los controles negativos son: 3) reacción de ADN distinto de las secuencias diana; 4) PCR con cebadores específicos del ADN genómico de hospedadores no infectados. Los controles positivos pueden adquirirse previa petición en el Laboratorio de Referencia de la OIE.

Niveles de validación:

- **Especificidad y sensibilidad:** teniendo en cuenta la similitud entre las secuencias de ADN diana de los haplosporidios microcelulares (Cochennec *et al.*, 2000), la primera PCR convencional debe amplificarlas todas, y la segunda (Carnegie *et al.*, 2000) debe amplificar al menos *B. ostreae* y *B. exitiosa* (Carnegie & Cochennec-Laureau, 2004); la tercera parece amplificar solo *B. ostreae* (Engelsma *et al.*, 2010). La sensibilidad de estas pruebas es mayor que la de los métodos histocitológicos. Las dos PCR TaqMan detectan *Bonamia* spp. pero no otros miembros del filo Haplosporidia. LA PCR en tiempo real SYBR[®] Green solo detecta *B. ostreae*.
- **Método de referencia:** se calculó la sensibilidad y la especificidad de la primera PCR convencional (Cochennec *et al.*, 2000) respecto a los métodos histocitológicos (histología e improntas de branquias) y se observó que eran del 92% y del 87%, respectivamente. Se calculó sensibilidad y la especificidad de los métodos histocitológicos (histología e improntas de branquias) respecto a la primera PCR convencional (Cochennec *et al.*, 2000) y se observó que eran del 66% y del 97%, respectivamente (Balseiro *et al.*, 2006). También se ha evaluado la sensibilidad y la especificidad de la segunda PCR TaqMan e inicialmente se ha estimado que son del 88% y del 99%, respectivamente.

Interpretación de los resultados:

- Un resultado positivo es un amplicón del tamaño adecuado, cuando todos los controles negativos dan resultados negativos y todos los controles positivos dan resultados positivos.
- Ninguna prueba es específica de especie. La secuencia del ADNr del gen de la SSU de *B. ostreae* presenta polimorfismo respecto al de *B. exitiosa*, *B. roughleyi* o *B. perspora* según se observa en el análisis del polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) tras digerir con *Hae* II y *Bgl* I el producto de la PCR ejecutada con los cebadores Bo-Boas. Los perfiles obtenidos varían en función de la especie de parásito. *Bonamia ostreae*, *B. perspora* y *B. exitiosa* presentan el mismo perfil (dos productos de 115 y 189 pb) cuando se digieren con *Hae* II, mientras que el producto de *B. roughleyi* no se digiere. El perfil de *B. ostreae* consiste en dos bandas de 120 y 180 pb cuando se digiere con *Bgl* I, mientras que *B. exitiosa*, *B. perspora* y *B. roughleyi* no se digieren (Cochennec *et al.*, 2003; Hine *et al.*, 2001).
- En especies susceptibles de la zona geográfica en la que se sabe que hay infección por *B. ostreae*, un resultado esperado en la PCR-RFLP, junto con un resultado positivo en la histología o las improntas, permite confirmar la infección por *B. ostreae*;
- En otras especies o fuera de la zona geográfica en la que se sabe que hay infección por *B. ostreae*, un resultado esperado en la PCR-RFLP, junto con un resultado positivo en la histología o las improntas, es muy indicativo de infección por *B. ostreae*, pero para confirmar el diagnóstico es necesario secuenciar el producto de la PCR y, si es posible, realizar una observación mediante MET.

Disponibilidad de pruebas comerciales: no se dispone de ninguna.

4.3.1.2.3.2. Hibridación in-situ (ISH)

Muestras a obtener: ostras vivas o que acaben de morir.

Procedimiento técnico: se han desarrollado dos protocolos de ISH. En el primero (Cochennec *et al.*, 2000) se emplea una sonda de 300 pb marcada con digoxigenina, y en el segundo (Carnegie *et al.*, 2003) se emplean tres sondas de oligonucleótidos marcadas con fluoresceína. Todas estas sondas acceden al ADNr del gen de la SSU. Se introducen las muestras de tejido en fijador de Davidson durante 24 horas y a continuación se incluyen en parafina. Se realizan cortes de 5 µm de espesor, se depositan sobre portas recubiertos de silano y después se hornean durante toda la noche en un horno a 50-60°C. Tras desparafinarlos, los portas se tratan con proteinasa K (100 µg ml⁻¹) en tampón TE (Tris 50 mM, EDTA [ácido etilendiaminotetraacético] 10 mM) a 37°C durante 30 minutos en el primer protocolo o en tampón PBS (solución salina tamponada con fosfato) (NaCl 150 mM, Na₂HPO₄ 12,5 mM, KH₂PO₄ 3 mM, pH 7,2) durante 15 minutos a 37°C en el segundo protocolo.

- En el primer protocolo, los portas se deshidratan por inmersión en una serie de etanol y se secan al aire. A continuación, se recubren con tapón de hibridación (SSC 4x [citrato salino estándar; NaCl 60 mM, NaCl 600 mM, pH 7], formamida al 50%, solución de Denhardt 1x, 250 µg ml⁻¹ de ARNt de levadura, sulfato de dextrano al 10%) que contenga 20 ng de la sonda marcada con digoxigenina. Tras la desnaturalización durante 5 minutos a 95°C, se lleva a cabo la hibridación incubando los portas en una cámara húmeda durante toda la noche a 42°C. La sonda se produce por PCR empleando el par de cebadores Bo-Boas previamente descrito, con incorporación de digoxigenina. La PCR se lleva a cabo como se ha descrito en el apartado sobre PCR, excepto por el hecho de que se añade DIG dUTP 25 mM a la mezcla de reacción. Los pasos de detección se emprenden siguiendo las instrucciones del fabricante.
- En el segundo protocolo, tras el tratamiento con proteinasa K, los portas se lavan en varios baños incluyendo PBS más glicina al 0,2% durante 5 minutos, se acetilan empleando ácido acético anhidro al 5% en trietanolamina/HCl 0,1 M (pH 8), durante 10 minutos a temperatura ambiente, se lavan de nuevo en PBS durante 10 minutos y por último se equilibran en SET (NaCl 750 mM, EDTA 6,4 mM, Tris Base 100 mM) 5x durante 10 minutos a temperatura ambiente. Después, los portas se cubren con 200 µl de tampón de prehibridación (SET 5x, albúmina de suero bovino al 0,02%, dodecilsulfato de sodio [SDS] al 0,025%) durante 30 minutos a 45°C. El tampón de prehibridación se sustituye por 10 a 12 µl del tampón de prehibridación que contenga 2-10 ng µl⁻¹ de los oligonucleótidos y los portas se incuban durante toda la noche en una cámara húmeda a 45°C. Después, los portas se lavan tres veces en SET 0,2x durante 5 minutos a 42°C, se secan al aire y se montan antes de proceder al examen mediante microscopio de epifluorescencia a 600-1.000 aumentos. Las sondas consisten en un cóctel de sondas marcadas con oligo-fluoresceína específicas de *B. ostreae*: UME-BO-1

(5'-CGA-GGC-AGG-GTT-TGT-3'); UME-BO-2 (5'-GGG-TCA-AAC-TCG-TTG-AAC-3') y UME-BO-3 (5'-CGC-TCT-TAT-CCA-CCT-AAT-3').

Controles positivo/negativo: son obligatorios. Los controles positivos son: 1) ISH en hospedador infectado; 2) ISH inespecífica (ADNr de SSU) en muestras. Los controles negativos son: 3) reacciones de ISH sin sonda; 4) ISH en hospedadores no infectados. Los controles positivos pueden adquirirse previa petición en el Laboratorio de Referencia de la OIE

Niveles de validación:

- *Especificidad y sensibilidad:* tanto la especificidad como la sensibilidad son más altas que en el examen histológico. No obstante, la sonda Bo-Boas puede detectar *Haplosporidium nelsoni* en *Crassostrea virginica* y *B. exitiosa* en *O. chilensis*, pero no *Mikrocytos mackini* en *C. gigas* (Cochennec *et al.*, 2000). Se ha comprobado y demostrado la especificidad del cóctel de oligosonda UME-BO-1, 2 y 3 para *H. nelsoni* (Carnegie *et al.*, 2003), pero es probable que esta prueba de ISH detecte otras microcélulas, incluida *B. exitiosa* (Carnegie & Cochennec-Laureau, 2004).
- *Método de referencia:* La ISH todavía no se ha validado respecto a la histopatología.

Interpretación de los resultados:

- Un resultado positivo corresponde a parásitos marcados dentro de los hemocitos, siempre que todos los controles negativos den un resultado negativo, y que todos los controles positivos den un resultado positivo. En el primer protocolo descrito, aparecen en forma de manchas oscuras, mientras que en el segundo protocolo, corresponden a pequeños anillos verdes, que emiten fluorescencia verde alrededor de una región oscura excéntrica.
- En especies susceptibles de la zona geográfica en la que se sabe que hay infección por *B. ostreae*, un resultado positivo es muy indicativo de infección por *B. ostreae* o *B. exitiosa*.
- En otras especies o fuera de la zona geográfica en la que se sabe que hay infección por *B. ostreae*, un resultado positivo es indicativo de infección por una especie de *Bonamia* que tendrá que confirmarse en el Laboratorio de Referencia de la OIE.

Disponibilidad de pruebas comerciales: kit de detección del ácido nucleico con DIG (Boehringer Mannheim) para el primer protocolo.

4.3.1.2.3.3. Secuenciación

La secuenciación se recomienda como uno de los últimos pasos para la confirmación del diagnóstico. Las regiones diana son el ADNr de la SSU y el ITS1. Aunque las secuencias pueden consultarse en genotecas públicas, se recomienda remitir estos casos al Laboratorio de Referencia de la OIE correspondiente.

4.3.1.2.4. Purificación del agente

Bonamia ostreae puede purificarse a partir de ostras intensamente infectadas (Mialhe *et al.*, 1988). Se homogeneizan todos los órganos excepto el músculo aductor, y los parásitos se concentran mediante centrifugación diferencial en gradientes de sacarosa, y después se purifican mediante centrifugación isopícnica en un gradiente de Percoll.

4.3.2. Métodos serológicos

No son aplicables.

5. Idoneidad de las pruebas para cada uso previsto

A modo de ejemplo, los métodos actualmente disponibles para la vigilancia dirigida y el diagnóstico de la infección por *B. ostreae* se detallan en la Tabla 5.1. Las denominaciones utilizadas en la Tabla indican: a = el método es el recomendado por razones de disponibilidad, utilidad y especificidad y sensibilidad de diagnóstico; b = el método es estándar, con buena sensibilidad y especificidad de diagnóstico; c = el método tiene aplicación en algunas situaciones, pero el coste, la precisión u otros factores limitan seriamente su aplicación; y d = el método no se recomienda actualmente para este fin. Esta clasificación es de alguna forma subjetiva ya que la idoneidad implica cuestiones de fiabilidad, sensibilidad, especificidad y utilidad. Aunque no todas las pruebas incluidas en las categorías a o b se han sometido a estandarización y validación formales, su naturaleza sistemática y el hecho de que se hayan usado generalmente sin resultados dudosos las hace aceptables.

Tabla 5.1. Métodos de vigilancia dirigida y diagnóstico

Método	Vigilancia dirigida				Diagnóstico provisional	Diagnóstico confirmativo
	Larvas	PL	Juveniles	Adultos		
Signos macroscópicos	d	d	c	c	c	d
Improntas de tejidos	d	d	a	a	a	c
Histopatología	d	d	a	a	b	c
ME de transmisión	d	d	d	d	d	a
Sondas de ADN – <i>in situ</i>	d	d	d	d	d	b
PCR y PCR TaqMan	a	a	a	a	a	c
PCR-RFLP	d	d	d	d	d	b
PCR en tiempo real SYBR® Green	a	a	a	a	a	a c
Secuenciación	d	d	d	d	d	a

PL = postlarvas; ME = microscopía electrónica; PCR = reacción en cadena de la polimerasa; RFLP = análisis del polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción.

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

Los métodos prescritos para la vigilancia dirigida destinada a declarar la ausencia de infección, como se detalla en el *Código Acuático*, son los siguientes: improntas de tejido (corazón o branquias), histología o PCR en zonas infectadas solo por *B. ostreae*. No obstante, en zonas donde coexistan *B. exitiosa* y *B. ostreae*, un resultado positivo en la histología tendrá que confirmarse mediante caracterización molecular.

7. Criterios de diagnóstico confirmativo

7.1. Definición de caso sospechoso

Todo resultado positivo, obtenido mediante cualquier técnica de diagnóstico, debe considerarse sospechoso.

7.2. Definición de caso confirmado

En especies susceptibles de la zona geográfica en la que se sabe que hay infección por *B. ostreae*, un caso confirmado de *B. ostreae* es un cualquier resultado positivo en improntas de tejido, histología o hibridación *in situ* junto con un resultado positivo en la PCR-RFLP con secuenciación o en la PCR en tiempo real SYBR® Green.

En otras especies hospedadoras o fuera de la zona geográfica en la que se sabe que hay infección por *B. ostreae*, se recomienda confirmar el caso mediante MET. No obstante, esta técnica solo es adecuada para muestras con altas intensidades de infección.

8. Bibliografía

ARZUL I., GAGNAIRE B., BOND C., CHOLLET B., MORGAN B., FERRAND S., ROBERT M. & RENAULT T (2009). Effects of temperature and salinity on the survival of *Bonamia ostreae*, a parasite infecting flat oysters *Ostrea edulis*. *Dis. Aquat. Org.*, **85**, 67–75.

ARZUL I., LANGLADE A., CHOLLET B., ROBERT M., FERRAND S., OMNES E., LEROND S., COURALEAU Y., JOLY J.-P., FRANÇOIS C. & GARCIA C. (2010). Can the protozoan parasite *Bonamia ostreae* infect larvae of flat oysters *Ostrea edulis*?. *Vet. Parasitol.*, doi:10.1016/j.vetpar.2011.01.060.

ARZUL I., MIOSSEC L., BLANCHET E., GARCIA C., FRANÇOIS C. & JOLY J.-P. (2006). *Bonamia ostreae* and *Ostrea edulis*: a stable host-parasite system in France? Symposia proceedings, *ISVEE conference XI*, Cairns, Australia, 6–11 August 2006, 5 p.

AUDEMARD C., CARNEGIE R., STOKES N.A., BURRESON E. & BISHOP M. (2005). Salinity effects on the susceptibility to and persistence of *Bonamia ostreae* and *Bonamia* sp. in *Crassostrea ariakensis*. *J. Shellfish Res.*, **24**, 639.

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

CARNEGIE R., 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., BARBER B.J. & DISTEL D.L. (2003). Detection of the oyster parasite *Bonamia ostreae* by fluorescent *in situ* hybridization. *Dis. Aquat. Org.*, **55**, 247–252.

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

COCHENNEC N., HERVIO D., PANATIER B., BOULO V., MIALHE E., ROGIER H., GRIZEL H. & PAOLUCCI F. (1992). A direct monoclonal antibody sandwich immunoassay for detection of *Bonamia ostreae* (*Ascetospora*) in hemolymph samples of the flat oyster *Ostrea edulis* (*Mollusca: Bivalvia*). *Dis. Aquat. Org.*, **12**, 129–134.

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.

COCHENNEC N., REECE K.S., BERTHE F.C.J. & HINE P.M. (2003). Revisiting *Mikrocytos roughleyi* taxonomic affiliation points to the genus *Bonamia* (*Haplosporidia*). *Dis. Aquat. Org.*, **54**, 209–217.

COMPS M., TIGÉ G. & GRIZEL H. (1980). Etude ultrastructurale d'un protiste parasite de l'huître *Ostrea edulis* L. *L.C.R., Acad. Sc. Paris, Sér. D*, **290**, 383–385.

CONCHAS R.F., SANTAMARINA J., LAMA A., LONGA M.A. & MONTES J. (2003). Evolution of bonamiosis in Galicia (NW Spain). *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.*, **23**, 265–272.

CORBEIL S., ARZUL I., DIGGLES B., HEASMAN M., CHOLLET B., BERTHE F.C. & CRANE M.S. (2006). Development of a TaqMan PCR assay for the detection of *Bonamia* species. *Dis. Aquat. Org.*, **71**, 75–80.

CULLOTY S.C. & MULCAHY M.F. (1996). Season-, age-, and sex-related variation in the prevalence of bonamiosis in flat oysters (*Ostrea edulis* L.) on the south coast of Ireland. *Aquaculture*, **144**, 53–63.

CULLOTY S.C., NOVOA B., PERNAS M., LONGSHAW M., MULCAHY M.F., FEIST S.W. & FIGUERAS A. (1999). Susceptibility of a number of bivalve species to the protozoan parasite *Bonamia ostreae* and their ability to act as vectors for this parasite. *Dis. Aquat. Org.*, **37**, 73–80.

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

ENGELSMA M.Y., KERKHOFF S., ROOZENBURG I., HAENEN O.L.M., VAN GOOL A., SISTERMANS W., WIJNHOFEN S. & HUMMEL H. (2010). Epidemiology of *Bonamia ostreae* infecting European flat oyster *Ostrea edulis* from Lake Grevelingen, The Netherlands. *Marine Ecology Progress Series*, **409**, 131–142.

GRIZEL H. (1985). Etudes des récentes épizooties de l'huître plate *Ostrea edulis* L. et de leur impact sur l'ostréiculture bretonne. Thèse de doctorat, Université des Sciences et Techniques de Languedoc, Montpellier, France.

HERVIO D., BACHERE E., BOULO V., COCHENNEC N., VUILLEMIN V., LE COGUIC Y., CAILLETAUX G., MAZURIE J. & MIALHE E. (1995). Establishment of an experimental infection protocol for the flat oyster *Ostrea edulis* with the intrahaemocytic

protozoan parasite *Bonamia ostreae*: application in the selection of parasite-resistant oyster. *Aquaculture*, **132**, 183–194.

HINE P.M., COCHENNEC-LAUREAU N. & BERTHE F.C.J. (2001). *Bonamia exitiosus* n. sp. (*Haplosporidia*) infecting flat oysters *Ostrea chilensis* (Philippi) in New Zealand. *Dis. Aquat. Org.*, **47**, 63–72.

LOPEZ-FLORES I., SUAREZ-SANTIAGO V.N., LONGET D., SAULNIER D., CHOLLET B. & ARZUL I. (2007). Characterization of actin genes in *Bonamia ostreae* and their application to phylogeny of the *Haplosporidia*. *Parasitology*, **134**, 1941–1948.

LYNCH S.A., ARMITAGE D.V., COUGHLAN J., MULCAHY M.F. & CULLOTY S.C. (2006). Investigating the possible role of benthic macroinvertebrates and zooplakton in the life cycle of the haplosporidian *Bonamia ostreae*. *Exp. Parasitol.* **115** (4), 359–368.

LYNCH S.A., ARMITAGE D.V., WYLDE S., MULCAHY M.F. & CULLOTY S.C. (2005). The susceptibility of young prespawning oysters, *Ostrea edulis*, to *Bonamia ostreae*. *J. Shellfish Res.*, **24**, 1019–1025.

LYNCH S.A., ABOLLO E., RAMILLO A., CAO A., CULLOTY S.C. & VILLALBA A. (2010). Observations raise the question if the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, can act as either a carrier or a reservoir for *Bonamia ostreae* or *Bonamia exitiosa*. *Parasitol.*, **137**, 1515–1526.

MARTY G., BOWER S., CLARKE K., MEYER G., LOWE G., OSBORN A., CHOW E., HANNAH H., BYRNE S., SOJONKY K. & ROBINSON J. (2006). Histopathology and a real-time PCR assay for detection of *Bonamia ostreae* in *Ostrea edulis* cultured in western Canada. *Aquaculture*, **261**, 33–42.

MIALHE E., BOULO V., ELSTON R., HILL B., HINE M., MONTES J., VAN BANNING P. & GRIZEL H. (1988). Serological analysis *Bonamia* in *Ostrea edulis* and *Tiostrea lutaria* using polyclonal and monoclonal antibodies. *Aquat. Living Resour.*, **1**, 67–69.

MONTES J., ANADON R. & AZEVEDO C. (1994). A possible life cycle for *Bonamia ostreae* on the basis of electron microscopy studies. *J. Invertebr. Pathol.*, **63**, 1–6.

NACIRI-GRAVEN Y., MARTIN A.G., BAUD J.P., RENAULT T. & GERARD A. (1998). Selecting the flat oyster *Ostrea edulis* (L.) for survival when infected with the parasite *Bonamia ostreae*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **224**, 91–107.

PICHOT Y., COMPS M., TIGE G., GRIZEL H. & RABOUIN M.A. (1979). Recherches sur *Bonamia ostreae* gen. n., sp. n., parasite nouveau de l'huitre plate *Ostrea edulis* L. *Rev. Trav. Inst. Pêches Marit.*, **43**, 131–140.

ROBERT M., GARCIA C., CHOLLET B., LOPEZ-FLORES I., FERRAND S., FRANÇOIS C., JOLY J.-P. & ARZUL I. (2009). Molecular detection and quantification of the protozoan *Bonamia ostreae* in the flat oyster, *Ostrea edulis*. *Molecular Cellular Probes*, **23**, 264–271.

VAN BANNING P. (1990). The life cycle of the oyster pathogen *Bonamia ostreae* with a presumptive phase in the ovarian tissue of the European flat oyster, *Ostrea edulis*. *Aquaculture*, **84**, 189–192.

*

* *

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