

INFECCIÓN POR *MARTEILIA REFRINGENS*

1. Ámbito de aplicación

Marteilia refringens es un protozoo parasitario perteneciente al filo Cercozoa y al orden Paramyxida (Cavalier-Smith & Chao, 1998; 2003; Feist *et al.*, 2009) que infecta el sistema digestivo de varias especies de bivalvos e induce trastornos fisiológicos y finalmente la muerte del animal (Alderman, 1979; Grizel *et al.*, 1974). A los efectos de este capítulo, la infección por *Marteilia refringens* engloba la infección por *M. refringens* según la definición de Lopez-Flores *et al.* (2004), incluidos los tipos M y O según lo definido por Le Roux *et al.* (2001). Esta definición excluye las infecciones por *M. sydneyi* (Perkins & Wolf, 1976), *M. lenghei* (Comps, 1976) y *M. christensenii* (Comps, 1983). Los casos de *Marteilia* spp. que no se identifican a nivel de especie (Berthe *et al.*, 2004; Moyer *et al.*, 1993; Norton *et al.*, 1993) deben ser remitidos al Laboratorio de referencia apropiado de la OIE.

2. Información sobre la enfermedad

2.1. Factores del agente

2.1.1. Agentes etiológicos, cepas del agente

Dos tipos de *Marteilia refringens* (Grizel *et al.*, 1974), los tipos O y M, fueron definidos por Le Roux *et al.* (2001).

2.1.2. Supervivencia fuera del hospedador

Según cuáles sean las condiciones ambientales, *M. refringens* puede sobrevivir entre varios días y 2-3 semanas fuera del hospedador (Grizel, 1985).

2.1.3. Estabilidad del agente

No hay datos disponibles.

2.1.4. Ciclo de vida

Se supone que el ciclo de vida de *M. refringens* es indirecto y puede incluir *Paracartia grani* (Audemard *et al.*, 2001; 2002), al menos en sistemas de estanque. En otras especies, incluidas otras *Acartia* spp., la ciclozoica *Oithona* sp. y una especie indeterminada de harpaticoidea, el parásito se ha detectado mediante reacción en cadena de polimerasa (PCR) en el estuario natural del Delta del Ebro (España), pero no se ha establecido su papel en el ciclo de vida (Carrasco *et al.*, 2007).

2.2. Factores del hospedador

2.2.1. Especies hospedadoras susceptibles

Especies de ostras: *Ostrea edulis* (Grizel *et al.*, 1974); y especies de mejillones: *Mytilus* sp., incluidos *M. edulis* (Le Roux *et al.*, 2001) y *M. galloprovincialis* (López-Flores *et al.*, 2004; Novoa *et al.*, 2005; Robledo *et al.*, 1995a; Villalba *et al.*, 1993b).

Se demostró la presencia de infección por *M. refringens* en la ostra *Ostrea stentina*, las especies de almejas *Solen marginatus* (López-Flores *et al.*, 2008a) y *Chamelea gallina* (López-Flores *et al.*, 2008b) y el mejillón *Xenostrobus securis* (Pascual *et al.*, 2010).

Se observó que otras especies de *Ostrea*, como *O. chilensis*, *O. puelchana*, *O. angasi* y *O. denselamellosa* presentaban infecciones por *Marteilia* sp. cuando se desplegaban en un área infectada (Berthe *et al.*, 2004; Martin, 1993). Sin embargo, en estos casos la identificación del parásito no se realizó a nivel molecular.

Además, se observaron diferentes fases de parásitos de aspecto similar a *M. refringens*, incluidas las fases maduras, mediante el examen histológico en berberechos (*Cerastoderma edule*), especies de almejas (*Ruditapes decussatus*, *R. philippinarum*, *Tapes rhomboides*, *T. pullastra*, *Ensis minor*, *E. siliqua*) y ostras (*Crassostrea virginica*) entre otras especies de bivalvos (Berthe *et al.*, 2004; López-Flores *et al.*, 2008b). En todos estos casos, la identificación del parásito es incierta.

Por último, se ha observado que el copépodo *Paracartia grani* es susceptible a la infección por *M. refringens* y esta especie podría participar en la transmisión de los parásitos entre bivalvos (véase 2.3.1)

2.2.2. Fases susceptibles de la vida del hospedador

Se sabe que las fases juveniles y las fases de vida posteriores son susceptibles (Grizel, 1985).

2.2.3. Especies o subpoblaciones predilectas (probabilidad de detección)

Marteilia refringens suele causar una infección clínica en *O. edulis* (Grizel *et al.*, 1974) y *Ostrea* spp. (Berthe *et al.*, 2004; Grizel, 1985). En las ostras y los mejillones, la prevalencia y la intensidad de la infección son generalmente superiores en los individuos de edad igual o superior a 2 años (Audemard *et al.*, 2001; Villalba *et al.*, 1993b).

2.2.4. Órganos diana y tejidos infectados

Marteilia refringens infecta el tracto digestivo. Los plasmodios jóvenes se observan principalmente en el epitelio de los palpos labiales y del estómago (Grizel *et al.*, 1974). La esporulación se produce en los túbulos y conductos de la glándula digestiva. Se liberan propágulos a la luz del tracto digestivo que se desprenden y pasan al medio a través de las heces. (Audemard *et al.*, 2002; Berthe *et al.*, 2004).

2.2.5. Infección persistente con portadores de por vida

La infección por *M. refringens* es una enfermedad mortal en las ostras (Alderman, 1979; Audemard *et al.*, 2002; Grizel *et al.*, 1974). La muerte se produce durante el segundo año tras la infección inicial (Alderman, 1979; Grizel, 1985), de manera que la infección puede persistir durante más de 1 año y puede darse durante toda la vida. Los mejillones no suelen verse afectados de manera adversa por *M. refringens* (Berthe *et al.*, 2004), pero no se sabe si se produce la esporulación de *M. refringens* ni si los mejillones pueden ser portadores de *M. refringens* (Berthe *et al.*, 2004; Le Roux *et al.*, 2001).

2.2.6. Vectores

Se han detectado mediante PCR varias especies de zooplancton, incluidas especies de copépodos (*Acartia discaudata*, *A. clausi*, *A. italica*, *Othoia* sp., *Euterpina acutifrons*) y fases larvarias zoeales de decápodos braquiuros, así como especies que no forman parte del plancton, como *Lineus gisserensis* (Nematoda) y *Cereus pendunculatus* (Cnidaria), que podrían actuar como vectores del parásito (Audemard *et al.*, 2002; Carrasco *et al.*, 2007).

2.2.7. Animales acuáticos salvajes portadores o sospechosos de serlo

Las poblaciones salvajes de ostras, *O. edulis*, y mejillones, *Mytilus edulis* y *M. galloprovincialis*, son infectadas por *M. refringens* y podrían no mostrar signos clínicos ni mortalidad.

Se ha descrito la presencia de *Marteilia refringens* en individuos salvajes de *Solen marginatus* (López-Flores *et al.*, 2008a), *Chamelea gallina* (López-Flores *et al.*, 2008b), *Xenostrobus securis* (Pascual *et al.*, 2010) y *Ostrea stentina*, sin una repercusión clínica clara del parásito en estas especies hospedadoras.

Otras especies de bivalvos se han incluido también en la relación de posibles especies susceptibles a la infección por *M. refringens* y podrían actuar, pues, como portadores.

2.3. Patrón de la enfermedad

2.3.1. Mecanismos de transmisión

La transmisión de *M. refringens* se produce, probablemente, a través de un hospedador intermedio (Audemard *et al.*, 2002; Carrasco *et al.*, 2008b). El parásito pudo ser transmitido experimentalmente de *O. edulis* y *M. galloprovincialis* al copépodo *Paracartia grani* (Audemard *et al.*, 2002; Carrasco *et al.*, 2008b). La transmisión de *P. grani* a *O. edulis* o *M. galloprovincialis* no se ha evidenciado experimentalmente (Audemard *et al.*, 2002; Carrasco *et al.*, 2008b). En las ostras, las fases iniciales de la enfermedad tienen lugar en los epitelios del estómago, los palpos e incluso las branquias. Se cree que la infección inicial se produce a través de las corrientes de alimentación. En los mejillones, las fases iniciales se han observado en el epitelio de las branquias, el manto, el estómago y los túbulos digestivos primarios (Carrasco *et al.*, 2008a).

2.3.2. Prevalencia

La prevalencia es muy variable, de hasta un 98% en *O. edulis*. Se prevé una prevalencia superior en función del uso de determinadas prácticas de cultivo y en áreas que han tenido una exposición a la infección durante más de 1 año (Berthe *et al.*, 2004; Grizel, 1985).

2.3.3. Distribución geográfica

Se ha descrito en Albania, Croacia, España, Francia, Grecia, Italia, Marruecos, Portugal, Suecia, Túnez y el Reino Unido.

2.3.4. Mortalidad y morbilidad

La infección es mortal en las ostras: generalmente se describe una tasa de mortalidad del 50%-90% durante el verano y el otoño, y ello se asocia a la esporulación del parásito (Grizel, 1985; Grizel *et al.*, 1974). De igual modo, la morbilidad es mayor durante los períodos más cálidos. Los mejillones se ven menos afectados por la infección, pero se describieron mortalidades de hasta un 40% en las áreas afectadas (Berthe *et al.*, 2004; Villalba *et al.*, 1993b) y los mejillones que no habían tenido ningún contacto previo con la infección presentaron una mortalidad del 100% tras haberlos cultivado durante 6 meses en un área infectada (Thébault *et al.*, 1999).

2.3.5. Factores ambientales

El umbral de temperatura para la esporulación y transmisión del parásito es de 17°C. Dicha temperatura es frecuente en los estuarios o bahías, en donde la prevalencia suele ser más alta en las partes superiores de la columna de agua (Audemard *et al.*, 2001; Berthe *et al.*, 2004; Carrasco *et al.*, 2007; Grizel, 1985). La infección por *M. refringens* rara vez se observa en aguas marinas abiertas (Grizel, 1985). La salinidad elevada y la renovación del agua podría tener efectos negativos sobre el desarrollo y la transmisión de *M. refringens*, aunque estos parámetros parecen ser menos importantes que la temperatura (Audemard *et al.*, 2001).

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

Ninguna.

2.4.5. Repoblación con especies resistentes

En Europa se han realizado intentos con diferentes especies del género *Ostrea* pero todas ellas han mostrado susceptibilidad (Grizel, 1985). Las poblaciones de *Ostrea edulis* y *Mytilus edulis* que no han tenido ningún contacto previo presentan una susceptibilidad elevada a la infección. Aunque se observaron algunas fases primarias de *M. refringens* en *Crassostrea gigas* (Berthe *et al.*, 2004), esta especie parece ser resistente a la infección por el parásito.

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

Se ha puesto de manifiesto la eficacia del cultivo a baja densidad o de manera asociada a especies de moluscos resistentes, como *Crassostrea gigas* (Grizel, 1985).

3. Obtención de muestras

3.1. Elección de ejemplares

Deben obtenerse muestras de forma prioritaria de individuos moribundos o recién muertos (edad igual o superior a 2 años), con objeto de aumentar la probabilidad de encontrar ostras infectadas. Para la histología, solamente deben obtenerse muestras de ostras o mejillones vivos (incluidos los moribundos).

La obtención de muestras de ostras y mejillones debe organizarse una vez al año, cuando se sabe que la prevalencia es máxima. Cuando no se dispone de este tipo de datos en un ecosistema concreto, la obtención de muestras debe llevarse a cabo preferiblemente cuando la temperatura alcanza el máximo anual (Audemard *et al.*, 2001; Carrasco *et al.*, 2007).

3.2. Conservación de las muestras para su envío

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

3.3. Combinación de varias muestras

La combinación de muestras podría ser de interés, pero no se ha evaluado su repercusión en el rendimiento de los métodos diagnósticos.

3.4. Órganos y tejidos de elección

Se utiliza un corte de 3-5 mm de grosor de tejidos que incluyan branquias y masa digestiva, para el diagnóstico de *M. refringens* mediante histología. Se prefiere el empleo de un fragmento de la glándula digestiva para algunas pruebas, incluidas las improntas y la PCR.

3.5. Muestras/tejidos que no son adecuados

No son adecuados tejidos distintos de las branquias y la masa digestiva.

4. Métodos de diagnóstico

4.1. Métodos de diagnóstico de campo

4.1.1. Signos clínicos

Los signos clínicos consisten en la presencia de moluscos muertos o moribundos, ya que los animales debilitados son especialmente susceptibles a los efectos de cualquier estrés adicional (Grizel, 1985; Grizel *et al.*, 1974). Esos signos clínicos no son específicos de la infección por *M. refringens* y podrían ser indicativos de otras infecciones.

4.1.2. Alteraciones del comportamiento

Ostras que no pueden cerrar la concha cuando se les saca del agua.

4.2. Métodos clínicos

4.2.1. Anatomopatología macroscópica

Se ha descrito la presencia de una glándula digestiva pálida, carne acuosa y fina, retracción del manto y reducción de la rapidez de crecimiento en ostras infectadas (Berthe *et al.*, 2004; Grizel, 1985; Grizel *et al.*, 1974), aunque estos signos macroscópicos no son específicos de la infección por *M. refringens*. Se ha descrito una reducción de la rapidez de crecimiento y una inhibición del desarrollo gonadal en los mejillones infectados (Villalba *et al.*, 1993a).

4.2.2. Bioquímica clínica

No se dispone de ninguna.

4.2.3. Anatomopatología microscópica

La glándula digestiva, en la que se encuentran *M. refringens* y otras especies de *Marteilia*, es un lugar en el que se produce la digestión intracelular del alimento y uno de los principales lugares de almacenamiento de reservas metabólicas (Berthe *et al.*, 2004). En las infecciones intensas, *M. refringens* reduce significativamente la absorción de la materia orgánica (Robledo *et al.*, 1995b). Las infecciones graves pueden causar también una pérdida del buen estado del animal como consecuencia de una reducción de la adquisición de energía. Además, el parásito puede interferir directamente en la alimentación y la absorción del hospedador con su simple presencia física. Se ha observado que el desarrollo de las células de almacenamiento adipogranuloso del manto de *Mytilus galloprovincialis* es inhibido en presencia de *M. refringens* (Villalba *et al.*, 1993b). Aparentemente, *M. refringens* interfiere también en el almacenamiento del glucógeno en *O. edulis* (Robert *et al.*, 1991).

Marteilia sydneyi es ligeramente diferente de *M. refringens*. Al microscopio óptico y al microscopio electrónico de transmisión, los criterios de reconocimiento se basan en la presencia o ausencia de inclusiones estriadas en los primordios de esporontes y las membranas concéntricas que rodean las esporas maduras, el número de primordios de esporangios en el plasmodio y el número de esporas en el esporangio.

4.2.4. Preparaciones húmedas

En la infección avanzada, pueden observarse esporangios maduros con gránulos refringentes en las preparaciones húmedas realizadas a partir de muestras de ostras/mejillones moribundos o de ostras/mejillones recién muertos o de heces de ostras/mejillones vivos.

4.2.5. Frotis

En la infección avanzada, pueden observarse parásitos de un tamaño que oscila entre 30 y 40 µm en las improntas de glándula digestiva de ostras/mejillones moribundos o de ostras/mejillones recién muertos.

4.2.6. Microscopía electrónica/citopatología

En la infección avanzada pueden observarse diferentes fases del parásito en los epitelios del tracto digestivo.

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

En la infección avanzada, se utilizan preparaciones húmedas.

Muestras a obtener: ostras/mejillones moribundos u ostras/mejillones recién muertos o heces de ostras/mejillones vivos.

Procedimiento técnico: chafar un fragmento de glándula digestiva o de heces sobre un portaobjetos de vidrio. A continuación se realizan las observaciones a $\times 400$ aumentos, que pueden mostrar la presencia de gránulos refringentes en los esporangios maduros.

Controles positivos/negativos: ninguno.

Niveles de validación:

- *Especificidad y sensibilidad:* desconocidas pero presumiblemente bajas;
- *Método de referencia:* no validado frente a la histología.

Interpretación de los resultados:

- Un resultado positivo es la presencia de cuerpos esféricos grandes (20–30 µm) que contienen estructuras de paredes gruesas;
- En las especies susceptibles, dentro del ámbito de distribución geográfica de la infección por *M. refringens*, un resultado positivo es indicativo de la infección por *M. refringens*;

- En otras especies, o fuera del ámbito geográfico conocido de la infección por *M. refringens*, un resultado positivo es indicativo de la infección por *Marteilia* spp., que deberá ser confirmada por el Laboratorio de Referencia de la OIE.

Disponibilidad de pruebas comerciales: no hay kits comercializados.

4.3.1.1.2. Improntas

En la infección avanzada, se preparan improntas de glándula digestiva.

Muestras a obtener: ostras/mejillones moribundos u ostras/mejillones recién muertos.

Procedimiento técnico: tras el secado de los tejidos sobre papel absorbente, se realizan varias improntas sobre un portaobjetos de vidrio. Las preparaciones se secan al aire, se fijan en metanol o en etanol absoluto, y se tiñen con el empleo de un kit de tinción sanguínea comercializado, siguiendo las instrucciones del fabricante. Tras un lavado con agua corriente y secado, se montan las preparaciones con un cubreobjetos, utilizando una resina sintética apropiada. El examen de las preparaciones se realiza primero a $\times 200$ aumentos, y luego con microscopía de inmersión en aceite a $\times 1000$ aumentos.

Controles positivos/negativos: se recomienda su empleo y pueden obtenerse solicitándolos al Laboratorio de Referencia de la OIE.

Niveles de validación:

- *Especificidad y sensibilidad:* desconocidas. Dado que la infección puede ser focal y también porque la infección afecta a tejidos diferentes en las fases inicial y avanzada, es posible que en las improntas no se detecten los niveles de infección iniciales y bajos;
- *Método de referencia:* no validado frente a la histología.

Interpretación de los resultados:

- Un resultado positivo es la observación de células de un tamaño de hasta 30–40 μm . El citoplasma adquiere una tinción basófila, mientras que la tinción del núcleo es eosinófila. Se observan halos de color pálido alrededor de gránulos grandes, intensamente teñidos (refringentes) y, en las células más grandes, disposiciones de células dentro de células (Berthe *et al.*, 2000; Berthe *et al.*, 2004; Grizel *et al.*, 1974);
- En las especies susceptibles, dentro del ámbito de distribución geográfica conocido de la infección por *M. refringens*, un resultado positivo es claramente indicativo de la infección por *M. refringens*;
- En otras especies, o fuera del ámbito de distribución geográfica conocido de la infección por *M. refringens*, un resultado positivo es indicativo de la infección por una especie de *Marteilia* que deberá ser confirmada por el Laboratorio de Referencia de la OIE.

Disponibilidad de pruebas comerciales: los kits de tinción rápida comercializados incluyen Difquick®/Hemacolor®.

4.3.1.1.3. Cortes fijados

4.3.1.1.3.1 Histología

Muestras a obtener: ostras/mejillones vivos.

Procedimiento técnico: se utilizan cortes de tejido que incluyan branquias, glándula digestiva, manto y tejido gonadal, que deben fijarse durante 24 horas en fijador de Davidson, seguido de un procesado normal para histología en parafina y tinción, por ejemplo con hematoxilina y eosina. Las observaciones se realizan a aumentos crecientes de hasta $\times 1000$ aumentos.

Controles positivos/negativos: se recomienda su empleo y pueden obtenerse solicitándolos al Laboratorio de Referencia de la OIE.

Niveles de validación:

- *Especificidad y sensibilidad:* los valores de sensibilidad y especificidad estimados para la histología son de un 70% y 99%, respectivamente (Thébault *et al.*, 2005);

- *Método de referencia:* la histología es el método de referencia, y la hibridación *in situ* ha sido covalidada con la histología.

Interpretación de los resultados:

- Un resultado positivo es la observación de células de un tamaño que va de 4 a hasta 40 µm. Los plasmodios jóvenes (mononucleados) se encuentran principalmente en el epitelio de los palpos labiales o el estómago. La esporulación comporta la división de células dentro de células y tiene lugar en los túbulos y conductos de la glándula digestiva. Aparecen gránulos refringentes en el curso de la esporulación, pero no se observan en las fases iniciales. En las fases avanzadas de la infección, se observan esporangios libres en la luz del tracto digestivo. El citoplasma adquiere una tinción basófila, mientras que la tinción del núcleo es eosinófila. Los gránulos pueden adquirir una coloración entre naranja oscuro y rojo oscuro;

Marteilia refringens difiere ligeramente de *M. sydneyi*. Los criterios de reconocimiento se basan en una falta de inclusiones estriadas en los primordios de esporantes de *M. sydneyi*, la formación de entre ocho y dieciséis primordios de esporangios en cada plasmodio, en vez de ocho en *M. refringens*, la presencia de dos esporas en cada esporangio, en vez de cuatro en *M. refringens*, y la presencia de una capa densa de membranas concéntricas alrededor de las esporas maduras de *M. sydneyi*.

- En las especies susceptibles, dentro del ámbito de distribución geográfica conocido de la infección por *M. refringens*, un resultado positivo es un dato concluyente que indica una infección por *M. refringens*;
- En otras especies o fuera del ámbito de distribución geográfica conocido de la infección por *M. refringens*, un resultado positivo, sobre todo si se observan gránulos refringentes, es indicativo de la infección por una especie de *Marteilia* que deberá ser confirmada por el Laboratorio de Referencia de la OIE.

Disponibilidad de pruebas comerciales: no hay kits comercializados.

4.3.1.1.3.2 Microscopía electrónica de transmisión

Procedimiento técnico: se utiliza un fragmento de tejido de pequeño tamaño (1–2 mm) que debe fijarse en glutaraldehído al 3% (en agua de mar filtrada [AMF] a 0,22 µm) durante 1 hora, lavarse tres veces en AMF, fijarse en ácido ósmico al 1% y lavarse de nuevo dos veces en AMF. Tras la deshidratación en baños sucesivos de etanol y dos baños de óxido de propileno, las muestras deben impregnarse de modo progresivo e incluirse en Epon. Tras la polimerización a 60°C, los bloques deben cortarse primero a 0,5–1 µm para un control de calidad y luego a 80–100 nm para el examen al microscopio electrónico. Se colocan cortes ultrafinos sobre rejillas de malla de cobre y se aplica una tinción de contraste con el empleo de acetato de uranilo y citrato de plomo.

Controles positivos: ninguno.

Niveles de validación:

- *Especificidad y sensibilidad:* la microscopía electrónica de transmisión (MET), como la histología, permite diferenciar *Marteilia refringens* de *M. sydneyi*. Los criterios de reconocimiento son los mismos que se han presentado en el apartado 4.3.1.1.3.1 Histología.

Interpretación de los resultados:

- Un resultado positivo es la presencia de parásitos en el interior de los epitelios de la glándula digestiva o el estómago. Pueden observarse diferentes fases del parásito (Longshaw *et al.*, 2001). La célula primaria presenta en su interior una única célula secundaria. Las células secundarias proceden de una serie de divisiones e incluyen ocho preesporangios. Las células terciarias contienen estos ocho preesporangios que se han dividido y contienen primordios de cuatro esporas. Los primordios de esporas se dividen internamente para producir esporas maduras. Estas están formadas por tres esporoplasmas, uno dentro de otro, y el más externo de ellos contiene haplosporosomas.

Disponibilidad de pruebas comerciales: no hay pruebas comercializadas.

4.3.1.2. Aislamiento e identificación del agente

4.3.1.2.1. Cultivo celular/medios artificiales

No los hay disponibles.

4.3.1.2.2. Métodos de detección de antígenos basados en anticuerpos

En la actualidad no se dispone de ellos o no se utilizan para fines diagnósticos, pero se han desarrollado y publicado anticuerpos monoclonales (Berthe *et al.*, 2004). Estos anticuerpos no muestran una reacción cruzada frente a *M. sydneyi*.

4.3.1.2.3. Técnicas moleculares

4.3.1.2.3.1. Reacción en cadena de polimerasa (PCR)

Se han desarrollado y publicado protocolos de PCR (Berthe *et al.*, 2000; Le Roux *et al.*, 1999; 2001; López-Flores *et al.*, 2004).

Se recomiendan los cebadores de PCR dirigidos a la región ITS1 (espaciador transcrito interno) (Le Roux *et al.*, 2001) ya que son capaces de amplificar únicamente la especie *M. refringens*. Sin embargo, se dispone también de algunos cebadores dirigidos a la subunidad pequeña (SSU) del complejo génico de ARNr y ello permite la amplificación de *M. refringens* y *M. sydneyi* (Grizel *et al.*, 1974; Le Roux *et al.*, 1999). Además, se ha desarrollado un análisis de PCR anidado con el empleo de cebadores dirigidos al espaciador intergénico de ADNr (López-Flores *et al.*, 2004). Se ha evaluado tan solo con *M. refringens*. Se ha demostrado que este análisis es más sensible que el análisis de PCR del TS1, pero será necesario evaluarlo con mayor detalle en cuanto a su especificidad.

Muestras a obtener: ostras/mejillones vivos u ostras/mejillones recién muertos.

Procedimiento técnico: se colocan las muestras en etanol al 95%-100% o se congelan hasta la extracción del ADN. La extracción del ADN se realiza mediante digestión con proteinasa K durante una noche a 50–55°C y extracción en fenol-cloroformo con precipitación con etanol o metodología de columna spin, utilizando kits comercializados (por ejemplo, Qiagen). La PCR se lleva a cabo en un volumen de 50 µl. Las mezclas de 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 dNTP 0,2 mM, cebadores directo e inverso a concentración 1 µM, 0,02 unidades µl⁻¹ de Taq ADN polimerasa, y 10–100 ng de ADN extraído. Tras la desnaturalización del ADN a 94°C durante 5 minutos, se realizan 30 ciclos de la siguiente forma: desnaturalización a 94°C durante 1 minuto, hibridación a 55°C durante 1 minuto y elongación a 72°C durante 1 minuto por kilo-par de bases. Se realiza un paso final de elongación de 10 minutos a 72°C. Para la detección de *M. refringens*, se realiza una PCR con cebadores dirigidos a la región ITS1 (5'-CCG-CAC-ACG-TTC-TTC-ACT-CC-3' y 5'-CTC-GCG-AGT-TTC-GAC-AGA-CG-3') (Le Roux *et al.*, 2001).

Controles positivos/negativos: son obligatorios. Los controles positivos son los siguientes: 1) PCR con cebadores específicos para ADN genómico procedente de un hospedador con una infección intensa o ADN procedente de parásitos purificados; 2) amplificación inespecífica (actina, SSU, etc.). Los controles negativos son los siguientes: 3) ausencia de reacciones con ADN diana; 4) PCR con cebadores específicos para ADN genómico procedente de hospedadores no infectados. Pueden solicitarse controles positivos al Laboratorio de Referencia de la OIE.

Niveles de validación:

- **Especificidad y sensibilidad:** valores desconocidos. No se ha producido reacción cruzada alguna con las muestras examinadas, y la especificidad se considera muy alta (Kleeman *et al.*, 2002; Le Roux *et al.*, 1999). Se espera que la técnica de PCR detecte la presencia de *M. refringens*. Dado que la infección puede ser focal y también porque la infección afecta a tejidos diferentes en las fases inicial y avanzada, la sensibilidad de la detección mediante PCR puede ser inferior al rendimiento teórico esperado de esta técnica;
- **Método de referencia:** no validado frente a la histología.

Interpretación de los resultados:

- Un resultado positivo es una amplificación de PCR positiva de la magnitud esperada, al tiempo que todos los controles negativos producen resultados negativos y todos los controles positivos tienen resultados positivos;
- En las especies susceptibles, dentro del ámbito de distribución geográfica conocido de la infección por *M. refringens*, un resultado de PCR positivo, asociado a un resultado positivo mediante histología o improntas, tiene valor confirmativo de la infección por *M. refringens*;
- En otras especies, o fuera del ámbito de distribución geográfica conocido de la infección por *M. refringens*, un resultado de PCR positivo, asociado a un resultado positivo mediante

histología o improntas, es claramente indicativo de la infección por *M. refringens*, pero es necesaria la secuenciación del producto de PCR antes de establecer un diagnóstico confirmativo.

Disponibilidad de pruebas comerciales: no hay kits comercializados.

4.3.1.2.3.2. Hibridación *in-situ* (ISH)

Se han desarrollado y publicado protocolos de ISH (Berthe *et al.*, 2000; Le Roux *et al.*, 1999).

Se recomienda una sonda dirigida a la SSU del complejo génico de ARNr, ya que ha sido validada frente a la histología (Le Roux *et al.*, 1999; Thébault *et al.*, 2004). Sin embargo, se ha observado que esta sonda muestra una reacción cruzada con *Marteilia sydneyi* y *Marteilioïdes chungmuensis* (Kleeman *et al.*, 2002). Además, se desarrolló un ensayo de ISH con el empleo de una sonda dirigida al espaciador intergénico de ADNr (López-Flores *et al.*, 2008a; 2008b). Este método ha resultado más específico que el análisis de ISH de la SSU, pero deberá ser validado de forma más completa.

Muestras a obtener: ostras/mejillones vivos u ostras/mejillones moribundos.

Procedimiento técnico: para la ISH, se fijan los moluscos en fijador de Davidson durante aproximadamente 24 horas, y luego se incluyen en parafina. Se realizan cortes de 5 µm y se colocan sobre portaobjetos con recubrimiento de aminoalquilsilano, que se mantienen durante una noche en el horno a 40°C. Se desceran los cortes mediante inmersión en xileno o su equivalente durante 10 minutos. Este paso se repite una vez y luego se elimina el disolvente mediante inmersión en dos baños sucesivos en etanol absoluto durante 10 minutos cada uno. Luego se rehidratan los cortes mediante inmersión en una serie de etanol. Los cortes se tratan con proteinasa K (100 µg ml⁻¹) en tampón TE (Tris [50 mM], EDTA [10 mM]), a 37°C durante 30 minutos. Se deshidratan las preparaciones mediante inmersión en una serie de etanol y luego se secan al aire. A continuación se incuban los cortes con 100 µl de tampón de hibridación (4 × SSC [citrato salino estándar], formamida al 50%, 1 × solución de Denhardt, 250 µg ml⁻¹ de ARNt de levadura, dextrano sulfato al 10%) con un contenido de 10 ng (1 µl de la reacción de PCR preparada como se ha descrito más arriba utilizando los cebadores CCG-GTG-CCA-GGT-ATA-TCT-CG y TTC-GGG-TGG-TCT-TGA-AAG-GC) de la sonda marcada con digoxigenina (Le Roux *et al.*, 1999). Los cortes se cubren con cubreobjetos de plástico *in-situ* y se colocan en un bloque de calentamiento a 95°C durante 5 minutos. A continuación se enfrían las preparaciones en hielo durante 1 minuto antes de una hibridación durante una noche a 42°C en cámara húmeda. Los cortes se lavan dos veces durante 5 minutos en 2 × SSC a temperatura ambiente, y una vez durante 10 minutos en 0,4 × SSC a 42°C. Los pasos de detección se realizan según lo indicado en las instrucciones del fabricante. Luego se lavan las preparaciones en agua destilada estéril (dH₂O). Se aplica una tinción de contraste a los cortes con Bismarck Brown Yellow, se lavan en dH₂O, y se aplican cubreobjetos utilizando un medio de montaje acuoso.

Controles positivos/negativos: obligatorios. Los controles positivos son los siguientes: 1) ISH en el hospedador infectado; 2) ISH inespecífica (ADNr de SSU) en muestras. Los controles negativos son los siguientes: 3) reacciones de ISH sin ninguna sonda; 4) ISH en hospedadores no infectados. Se dispone de controles positivos que pueden solicitarse al Laboratorio de Referencia de la OIE.

Niveles de validación:

- *Especificidad y sensibilidad:* 90% y 99%, respectivamente, en el caso de la ISH (Thébault *et al.*, 2005). Se prevé que este protocolo de ISH detecte *M. refringens*; sin embargo, se ha observado que esta sonda muestra una reacción cruzada con *M. sydneyi* y *Marteilioïdes chungmuensis* (Kleeman *et al.*, 2002).
- *Método de referencia:* covalidado con la histología.

Interpretación de los resultados:

- Un resultado positivo se pone de manifiesto por un marcado de color púrpura-negro de las células de *M. refringens* dentro de los tejidos diana conocidos, al tiempo que todos los controles negativos producen resultados negativos y todos los controles positivos tienen resultados positivos;
- En las especies susceptibles, dentro del ámbito de distribución geográfica conocido de la infección por *M. refringens*, un resultado de ISH positivo tiene valor confirmativo de la infección por *M. refringens*;
- En otras especies, o fuera del ámbito de distribución geográfica conocido de la infección por *M. refringens*, un resultado de ISH positivo requiere una caracterización molecular más

completa, para determinar la especie del parásito. Sin embargo, un caso de este tipo debe ser trasladado al Laboratorio de Referencia apropiado de la OIE.

Disponibilidad de la prueba: la sonda puede obtenerse solicitándola al Laboratorio de Referencia apropiado de la OIE.

4.3.1.2.3.3. Secuenciación

Se recomienda la secuenciación como uno de los pasos finales para el diagnóstico confirmativo. Las regiones diana son el ADN_r de la SSU, el ITS1 y el IGS (espaciador intergénico). Aunque se dispone de secuencias en los bancos genéticos públicos, se recomienda remitir estos casos al Laboratorio de Referencia apropiado de la OIE.

4.3.1.2.4. Purificación del agente

La purificación del agente no se emplea actualmente para fines diagnósticos, pero se han desarrollado y publicado protocolos de purificación (Miahle *et al.*, 1985; Robledo *et al.*, 1995a).

4.3.2. Métodos serológicos

No hay ninguno aplicable.

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

Tabla 5.1. Métodos para la vigilancia y el diagnóstico dirigidos

Método	Vigilancia dirigida				Diagnóstico provisional	Diagnóstico confirmativo
	Larvas	PL	Juveniles	Adultos		
Signos macroscópicos	d	d	c	c	c	d
Preparaciones húmedas	d	d	c	c	c	d
Improntas	d	d	b	b	a	c
Histopatología	d	d	a	a	b	c
Sondas de DNA – <i>in situ</i>	d	d	d	d	d	b
PCR	a	a	a	a	a	a
Secuenciación	d	d	d	d	d	a
Microscopía electrónica de transmisión	d	d	d	d	d	b

PL = fase post-larvaria; PCR = reacción en cadena de polimerasa.

6. Prueba(s) recomendada(s) para la vigilancia dirigida destinada a declarar la ausencia de *Marteilia refringens*

Los métodos prescritos para la vigilancia dirigida destinada a declarar la ausencia de la infección, según se detalla en el *Código Acuático* son: improntas de tejido (glándula digestiva), histología o PCR.

7. Criterios de diagnóstico confirmativo

7.1. Definición de caso sospechoso

Todo resultado positivo obtenido con cualquiera de las técnicas diagnósticas debe considerarse sospechoso.

7.2. Definición de caso confirmado

En las especies susceptibles conocidas, y dentro del ámbito de distribución geográfica conocido, un caso confirmado de *M. refringens* es un resultado positivo en las improntas de tejido o en la histología, combinado con la ISH o la PCR.

En otras especies hospedadoras, o fuera del ámbito de distribución conocido de *M. refringens*, se recomienda la confirmación mediante secuenciación y la descripción mediante microscopía electrónica de transmisión.

8. Bibliografía

ALDERMAN D.J. (1979). Epizootiology of *Marteilia refringens* in Europe. *Mar. Fishery Rev.*, **41**, 67–69.

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

AUDEMARD C., LE ROUX F., BARNAUD A., COLLINS C., SAUTOUR B., SAURIAU P.-G., DE MONTAUDOUIN X., COUSTAU C., COMBES C. & BERTHE F.C.J. (2002). Needle in a haystack: involvement of the copepod *Paracartia grani* in the life cycle of the oyster pathogen *Marteilia refringens*. *Parasitology*, **124** (3), 315–323.

BERTHE F.C.J., LE ROUX F., PEYRETAILLADE E., PEYRET P., RODRIGUEZ D., GOUY M. & VIVARÈS C.P. (2000). The existence of the phylum Paramyxea Desportes and Perkins, 1990 is validated by the phylogenetic analysis of the *Marteilia refringens* small subunit ribosomal RNA. *J. Euk. Microbiol.*, **47** (3), 288–293.

BERTHE F.C.J., ROUX F., ADLARD R.D. & FIGUERAS A. (2004). Marteiliosis in molluscs: A review. *Aquat. Living Resour.*, **17**, 433–448.

CARRASCO N., ARZUL I., BERTHE F.C.J. & FURONES M.D. (2008a). *In situ* hybridization detection of initial infective stages of *Marteilia refringens* (Paramyxea) in its host *Mytilus galloprovincialis*. *J. Fish Dis.* **31**, 153–157.

CARRASCO N., ARZUL I., CHOLLET B., ROBERT M., JOLY J.-P., FURONES M.D. & BERTHE F. (2008b). Comparative experimental infection of the copepod *Paracartia grani* with *Marteilia refringens* and *M. maurini*. *J. Fish Dis.* **31**, 497–504.

CARRASCO N., LOPEZ-FLORES I., ALCARAZ M., FURONES M.D., BERTHE F.C.J. & ARZUL I. (2007b) Dynamics of the parasite *Marteilia refringens* (Paramyxea) in *Mytilus galloprovincialis* and zooplankton populations in Alfacs Bay (Catalonia, Spain). *Parasitology*, **134**, 1541–1550.

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

COMPS M. (1983). Etude morphologique de *Marteilia christenseni* sp. n. parasite du lavignon *Scrobicularia piperata* P. (mollusque pélécyopode). *Rev. Trav. Inst. Pêches Marit.*, **47**, 99–104.

FEIST S.W., HINE P.M., BATEMAN K.S., GRANT D.S. & LONGSHAW M. (2009). *Paramarteilia canceri* sp. n. (Cercozoa) in the European edible crab (*Cancer pagarus*) with a proposal for the revision of the order Paramyxida Chatton, 1911. *Folia Parasitologica*, **56** (2), 73–85.

GRIZEL H. (1985). Etude des récentes épizooties de l'huître plate (*Ostrea edulis* Linné) et leur impact sur l'ostréiculture bretonne. Thèse Doctorat es Sciences, Université des Sciences et Techniques du Languedoc, Montpellier, France, 145 p.

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* Linne. *Sci. Pêche. Bull. Inst. Pêches marit.*, **240**, 7–29.

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

LE ROUX F., LORENZO G., PEYRET P., AUDEMARD C., FIGUERAS A., VIVARES C., GOUY M. & BERTHE F.C.J. (2001). Molecular evidence for the existence of two species of *Marteilia* in Europe. *J. Euk. Microbiol.*, **48** (4), 449–454.

LE ROUX F., AUDEMARD C., BARNAUD A. & BERTHE F.C.J. (1999). DNA probes as potential tools for the detection of *Marteilia refringens*. *Mar. Biotechnol.*, **1**(6), 588–597.

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

LOPEZ-FLORES I., DE LA HERRAN R., GARRIDO-RAMOS, M.A., NAVAS J.I., RUIZ-REJON C., RUIZ-REJON M. (2004). The molecular diagnosis of *Marteilia refringens* and differentiation between *Marteilia* strains infecting oysters and mussels based on the rDNA IGS sequence. *Parasitology*, **129**, 411–419

LÓPEZ-FLORES I., GARRIDO-RAMOS M.A., DE LA HERRAN R., RUIZ-REJÓN C., RUIZ-REJÓN M. & NAVAS J.I. (2008a). Identification of *Marteilia refringens* infecting the razor clam *Solen marginatus* by PCR and *in situ* hybridization. *Mol. Cell Probes*, **22**, 151–155.

LÓPEZ-FLORES I., ROBLES F., VALENCIA J.M., GRAU A., VILLALBA A., DE LA HERRÁN R., GARRIDO-RAMOS M.A., RUIZ-REJÓN C., RUIZ-REJÓN M. & NAVAS J.I. (2008b). Detection of *Marteilia refringens* using nested PCR and *in situ* hybridisation in *Chamelea gallina* from the Balearic Islands (Spain). *Dis. Aquat. Org.*, **82**, 79–87.

MARTIN A.G. (1993). Relance de l'huitre plate – Rapport d'avancement des travaux année 1991. Rapport Ifremer. RIDRV-93.026 RA/Trinité, pp 40.

MIAHLE E., BACHERE E., LE BEC C. & GRIZEL H. (1985). Isolement et purification de *Marteilia* (Protozoa: Ascetospora) parasites de bivalves marins. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences de Paris* 301, Serie III, no 4, 137–142.

MOYER M.A., BLAKE N.J. & ARNOLD W.S. (1993). An ascetosporan disease causing mass mortality in the Atlantic calico scallop, *Argopecten gibbus* (Linnaeus, 1758). *J. Shellfish Res.*, **12** (2), 305–310.

NORTON J.H., PERKINS F.P. & LEDUA E. (1993). *Marteilia*-like infection in a giant clam, *Tridacna maxima*, in Fiji. *J. Invertebr. Pathol.*, **61**, 328–330.

NOVOA B., POSADA D. & FIGUERAS A. (2005). Polymorphisms in the sequences of *Marteilia* internal transcribed spacer region of the ribosomal RNA genes (ITS-1) in Spain: genetic types are not related with bivalve hosts. *J. Fish Dis.*, **28** (6), 331-338.

Pascual S., Villalba A., Abollo E., Garci M., Gonzales A.F., Nombela M., Posada D. & Guerra A. (2010). The mussel *Xenostrobus securis*: a well established alien invader in the Ria de Vigo (Spain, NE Atlantic). *Biological Invasions*, **12**, 2091–2103.

PERKINS F.O. & WOLF P.H. (1976). Fine structure of *Marteilia sydneyi* sp. n. – *Haplosporidian* pathogen of Australian oysters. *J. Parasitol.*, **62**, 528–538.

ROBERT R., BOREL M., PICHOT Y. & TRUT G. (1991). Growth and mortality of the european oyster *Ostrea edulis* in the Bay of Arcachon (France). *Aquatic Living Resource*, **4**, 265–274.

ROBLEDO J.A.F., MIAHLE E. & FIGUERAS A. (1995a). Purification of several phases of the parasite *Marteilia* (Protozoa: Ascetospora) from mussels (*Mytilus galloprovincialis*). In: Techniques in Fish Immunology – 4. Immunology and pathology of aquatic invertebrates, Stolen J.C., Fletcher T.C., Smith S.A., Zelikoff J.T., Kaattari S.L., Anderson R.S., Soderhall K. & Weeks-Perkins B.A., eds. SOS Publications, Fair Haven, NJ, USA, 117–121.

ROBLEDO J.A.F., SANTAREM M.M., GONZALEZ P. & FIGUERAS A. (1995b). Seasonal variations in the biochemical composition of the serum of *Mytilus galloprovincialis* Lmk. and its relationship to the reproductive cycle and parasitic loads. *Aquaculture*, **133**, 311–322.

THEBAULT A., BAUD J.P., LE SAUX J.C., LE ROUX F., CHOLLET B., LE COGUIC M.J., FLEURY P.G., BERTHE F. & GERARD A. (1999). Compte rendu sur les mortalité de juillet 1999 des moules (*Mytilus edulis*) en poches dans l'Aber Benoît. Rapport IFREMER. 12 p.

THÉBAULT A., BERGMANN S., POUILLOT S., LE ROUX F. & BERTHE F.C.J. (2005). Validation of in situ hybridization and histology assays for the detection of the oyster parasite *Marteilia refringens*. *Dis. Aquat. Org.*, **65** (1), 9–16.

VILLALBA A., MOURELLE S.G., CARBALLAL M.J. & LOPEZ M.C. (1993a). Effects of infection by the protistan parasite *Marteilia refringens* on the reproduction of cultured mussels *Mytilus galloprovincialis* in Galicia (NW Spain). *Dis. Aquat. Org.*, **17**, 205–213.

VILLALBA A., MOURELLE S.G., LOPEZ M.C., CARBALLAL M.J. & AZEVEDO C. (1993b). Marteiliasis affecting cultured mussels *Mytilus galloprovincialis* of Galicia (NW. Spain). I. Etiology, phases of the infection, and temporal and spatial variability in prevalence. *Dis. Aquat. Org.*, **16**, 61–72.

*
* *

NB: Existe un Laboratorio de Referencia de la OIE para la infección por *Marteilia refringens* (véase la Tabla al final de este *Manual Acuático* o consúltese la página web de la OIE para acceder a la relación más actualizada: www.oie.int).