

INFECCIÓN POR *PERKINSUS OLSENI*

1. Ámbito de aplicación

A efectos de este capítulo, la infección por *Perkinsus olseni* se considera que es una infección por *P. olseni*. *Perkinsus atlanticus* se considera un sinónimo inicial.

2. Información sobre la enfermedad

2.1. Factores del agente

2.1.1. El agente patógeno, cepas del agente

El agente etiológico es *Perkinsus olseni*.

2.1.2. Supervivencia fuera del hospedador

El tiempo de supervivencia máximo fuera del hospedador no se conoce, pero es como mínimo de varios meses para los prezoosporangios, o hipnosporos (Casas *et al.*, 2002b).

2.1.3. Estabilidad del agente

Perkinsus olseni es relativamente estable gracias a su pared celular gruesa. Las células aisladas de *P. olseni* fueron destruidas por el agua dulce en un plazo de 10 minutos a temperatura ambiente y por 0,006 mg ml⁻¹ = 6 ppm (partes por millón) de cloro en un plazo de 30 minutos (Goggin *et al.*, 1990). Las células de *Perkinsus olseni* en los tejidos del hospedador fueron mucho más resistentes a estos tratamientos. Se ha observado que la luz UV (>28.000 µWs cm⁻²) inactiva los trofozoitos de *P. marinus* (Bushek & Howell, 2000) y que 60.000 µWs cm⁻² de luz UV causan la muerte de los hipnosporos de *P. olseni* (Lester & Hayward, 2005).

2.1.4. Ciclo de vida

El ciclo de vida es directo de hospedador a hospedador y todas las fases de la vida son infecciosas (Villalba *et al.*, 2004).

2.2. Factores del hospedador

2.2.1. Especies hospedadoras susceptibles

Perkinsus olseni tiene una gama de hospedadores extraordinariamente amplia. Entre los hospedadores conocidos se encuentran las almejas *Anadara trapezia*, *Austrovenus stutchburyi*, *Ruditapes decussatus*, *R. philippinarum*, *Tridacna maxima*, *T. crocea*, *Protothaca jedoensis* y *Pitar rostrata* (Goggin & Lester, 1995; Villalba *et al.*, 2004; Cremonte *et al.*, 2005; Park *et al.*, 2006; Sheppard & Phillips, 2008); las ostras *Crassostrea gigas*, *C. ariakensis* y *C. sikamea* (Villalba *et al.*, 2004); las ostras perlíferas *Pinctada margaritifera*, *P. martensii* y *P. fucata* (Goggin & Lester, 1995; Sanil *et al.*, 2010); los abulones *Haliotis rubra*, *H. laevigata*, *H. scalaris* y *H. cyclobates* (Goggin & Lester, 1995). Otras especies de bivalvos y gasterópodos podrían ser también susceptibles a este parásito, sobre todo dentro del ámbito geográfico conocido. Los miembros de las familias Arcidae, Malleidae, Isognomonidae, Chamidae y Veneridae son especialmente susceptibles, y la obtención de muestras selectiva pueden revelar la presencia de *P. olseni* cuando solamente se producen infecciones leves en otras familias en el mismo hábitat.

2.2.2. Fases susceptibles de la vida del hospedador

Todas las fases tras el asentamiento son susceptibles.

2.2.3. Especies o subpoblaciones predilectas (probabilidad de detección)

Existe una amplia gama de hospedadores, y la susceptibilidad varía (véase el apartado 2.2.1 más arriba); la intensidad de la infección aumenta con la edad del hospedador.

2.2.4. Órganos diana y tejidos infectados

El tejido conjuntivo de todos los órganos y los hemocitos.

2.2.5. Infección persistente con portadores de por vida

La infección por *P. olseni* puede ser mortal en función de las condiciones ambientales y del hospedador. Puede producirse una infección persistente en individuos portadores durante toda la vida.

2.2.6. Vectores

No se requiere ninguno ya que el ciclo de vida es directo de hospedador a hospedador.

2.2.7. Animales acuáticos salvajes portadores o sospechosos de serlo

No se conoce ninguno. Lester & Hayward (2005) examinaron 32 especies de moluscos no abulones en la Isla Taylor del Sur de Australia utilizando el método de cultivo en tioglicolato líquido de Ray (RFTM) y no encontraron infecciones. La prevalencia de *P. olseni* en el abulón (*H. rubra*) en esa zona osciló entre el 26% y el 56% en tres muestras diferentes.

2.3. Patrón de la enfermedad

2.3.1. Mecanismos de transmisión

La transmisión es directa de hospedador a hospedador (Villalba *et al.*, 2004) y todas las fases del ciclo de vida son infecciosas.

2.3.2. Prevalencia

La prevalencia es muy variable en función del hospedador y de las condiciones ambientales, pero a menudo es del 100%, según lo determinado por la histología o la reacción en cadena de polimerasa (PCR). Se prevé que la prevalencia sea superior en los individuos con más de 1 año de exposición al patógeno.

2.3.3. Distribución geográfica

Tiene una amplia distribución en el Océano Pacífico tropical, Australia, North Island de Nueva Zelanda, Vietnam, Corea (República de), Japón, China (República Popular de), Portugal, España, Francia, Italia y Uruguay (Goggin & Lester, 1995; Villalba *et al.*, 2004; Cremonte *et al.*, 2005). Recientemente se ha observado en la India (Sanil *et al.*, 2010). La especie de *Perkinsus* descrita en Tailandia en la almeja *Paphia undulata* es casi con seguridad *P. olseni* según lo indicado por las secuencias de ADN de las regiones del espaciador transcrito interno (ITS) del parásito. No se conoce la presencia de *Perkinsus olseni* en Norteamérica.

2.3.4. Mortalidad y morbilidad

Las infecciones en las almejas hospedadoras pueden ser mortales, según cuáles sean las condiciones ambientales y la muerte puede producirse 1 o 2 años después de la infección. Las infecciones en abulones en Australia parecen no causar mortalidad, a pesar de que la prevalencia puede ser alta (Lester & Hayward, 2005).

2.3.5. Factores ambientales

El ciclo anual de *P. olseni* está controlado por la temperatura. En *R. decussatus* en España, la intensidad de la infección por *P. olseni* alcanzó un máximo en primavera, al aumentar la temperatura hasta alrededor de 15°C, continuó siendo elevada durante el verano y comienzos de otoño, en que las temperaturas fueron de 19–21°C, y luego disminuyó durante el invierno y comienzo de la primavera, coincidiendo con las temperaturas de 9–10°C (Villalba *et al.*, 2005). La máxima mortalidad del hospedador se produjo al inicio del otoño, durante un periodo de temperatura máxima anual. La tolerancia de *P. olseni* a la salinidad no se conoce bien. La salinidad se mantuvo por encima de 15 unidades prácticas de salinidad (psu) durante el estudio realizado en España. Los estudios de laboratorio en los que se ha utilizado *P. olseni* procedente de piscifactoría (La Peyre *et al.*, 2006) sugieren que *P. olseni* tiene un crecimiento óptimo a 25 psu pero no tolera una salinidad inferior a 15 psu.

2.4. Control y prevención

2.4.1. Vacunación

Ninguna.

2.4.2. Tratamiento con sustancias químicas

La ciclohexamida, la pirimetamina, la desferoxamina (DFO) y el 2, 2-bipiridilo inhiben *P. olseni in vitro*, y la DFO inhibe *P. olseni in vivo*. (Elandalloussi *et al.*, 2005). Los compuestos desinfectantes de N-halamina son eficaces frente a las células de *P. marinus* de cultivo en agua de mar (Delaney *et al.*, 2003), y se ha observado que la bacitracina reduce, pero no elimina *P. marinus* en las ostras hospedadores infectadas (Faisal *et al.*, 1999). Estos compuestos pueden ser eficaces también frente a *P. olseni*, pero no se ha realizado ningún estudio comparativo.

2.4.3. Inmunoestimulación

Ninguna.

2.4.4. Selección genética a favor de la resistencia

Ninguna para *P. olseni*, si bien una selección genética ha mostrado cierta efectividad para *P. marinus*.

2.4.5. Repoblación con especies resistentes

Ninguna.

2.4.6. Agentes bloqueantes

Ninguno.

2.4.7. Desinfección de huevos y larvas

No se tiene conocimiento de que *Perkinsus olseni* infecte los huevos o las larvas de sus hospedadores, pero puede haber células del parásito intracelulares. Los compuestos desinfectantes de N-halamina han sido efectivos frente a *P. marinus* sin causar ningún efecto aparente sobre las larvas de ostras (Delaney *et al.*, 2003) y estos compuestos pueden ser útiles también frente a *P. olseni*.

2.4.8. Prácticas generales de manejo

Una baja densidad de población puede reducir la transmisión del patógeno

3. Obtención de muestras

3.1. Elección de ejemplares

Deben obtenerse muestras de individuos vivos o recién muertos.

3.2. Conservación de las muestras para su envío

Para el diagnóstico con el empleo del RFTM, las muestras deben ser recientes. Para la histología, el mejor conservante es el AFA de Davidson, pero también son aceptables el formol tamponado al 10% u otros fijadores estándar para histología. Para los análisis de PCR, las muestras deben conservarse en etanol al 95%-100% y no en alcohol desnaturalizado.

3.3. Combinación de varias muestras

La combinación de larvas muy pequeñas (5-10 según el tamaño) es aceptable para los análisis de PCR.

3.4. Órganos y tejidos de elección

Para el RFTM con bivalvos, se suelen utilizar fragmentos de branquia, manto y recto. En los abulones, se cultivan cortes de tejido que incluyen branquia, manto y pie. Para la histología, se emplea un corte de 5 mm de grosor realizado a través de la masa visceral, que incluye glándula digestiva, branquia y manto. Para la PCR, lo mejor es utilizar tejido de manto o branquia

3.5. Muestras/tejidos que no son adecuados

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

4. Métodos de diagnóstico

4.1. Métodos de diagnóstico de campo

4.1.1. Signos clínicos

Los signos clínicos son moluscos muertos o moribundos, pero estos signos clínicos no son específicos para la infección por *P. olseni*.

4.1.2. Alteraciones del comportamiento

Algunos bivalvos individuales con infecciones en una fase avanzada pueden mostrar un cierre lento de las valvas, pero estas alteraciones no son específicas para *P. olseni*.

4.2. Métodos clínicos

4.2.1. Anatomopatología macroscópica

Los signos macroscópicos son una glándula digestiva pálida, un tejido acuoso y delgado, y la presencia de nódulos en el manto y las branquias de algunos hospedadores, aunque estos signos no son específicos para la infección por *P. olseni*.

4.2.2. Bioquímica clínica

No se dispone de datos.

4.2.3. Anatomopatología microscópica

Los cortes fijados muestran lesiones multifocales grandes en el tejido conjuntivo que contiene células de *P. olseni*. Se produce una infiltración hemocítica (hemocitosis) en la mayoría de las infecciones. En las almejas hospedadoras, las células de *P. olseni* están con frecuencia encapsuladas por una capa gruesa de material eosinófilo procedente de la desgranulación de los hemocitos (Villalba *et al.*, 2004).

4.2.4. Preparaciones húmedas

No se recomienda como método clínico.

4.2.5. Frotis

No se recomienda como método clínico.

4.2.6. Microscopía electrónica/citopatología

Los datos ultraestructurales ponen de manifiesto que la lisis de los hemocitos y la coalescencia de los gránulos metacromáticos dan lugar al nódulo que encapsula los trofozoitos (Sagrista *et al.*, 1995).

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 recomendado.

4.3.1.1.2. Frotis

Los frotis son útiles únicamente en las infecciones avanzadas.

Muestras a obtener: hospedadores vivos.

Procedimiento técnico: obtener sangre del hospedador con una aguja y jeringa introducidas en el músculo aductor de ostras y almejas, o en el seno cefálico de los abulones. Colocar una gota de

hemolinfa sobre un portaobjetos de vidrio y realizar un frotis. Las observaciones se realizan a $\times 100$ – 400 aumentos tras una tinción de Giemsa.

Controles positivos/negativos: ninguno.

Niveles de validación:

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

Interpretación de los resultados:

- La presencia de células esféricas, mononucleares, de 5–15 μm de diámetro, con una vacuola grande y núcleo excéntrico indica la presencia de *Perkinsus* sp., pero la técnica no es específica para la especie.

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

4.3.1.1.3. Cortes fijados

Muestras a obtener: moluscos vivos o recién muertos.

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

Controles positivos: se recomienda su empleo y pueden obtenerse del Laboratorio de Referencia de la OIE según el hospedador de que se trate.

Niveles de validación:

- *Especificidad y sensibilidad:* la especificidad de especie es muy baja y la sensibilidad es buena para las infecciones de moderadas a intensas, pero es baja para las infecciones de baja intensidad.
- *Método de referencia:* el cultivo en tioglicolato líquido (análisis de carga corporal total [Fisher & Oliver, 1996]) es el método de referencia, aunque no es específico para la especie. La histología no ha sido validada formalmente frente al cultivo en tioglicolato líquido, aunque un estudio reciente ha observado que la histología es menos sensible (Balseiro *et al.* 2010).

Interpretación de los resultados:

- Un resultado positivo es la presencia de células esféricas mononucleadas, de un diámetro que va de aproximadamente 5 a 15 μm , con una gran vacuola y un núcleo desplazado excéntricamente que muestra un nucléolo prominente. Los esquizontes (formas en proceso de división) multinucleados acompañan con frecuencia a los trofozoitos mononucleares. Las células pueden ser fagocitadas por los hemocitos del hospedador. Las células de *Perkinsus olseni* muestran una leve tinción basófila.
- En las especies hospedadoras susceptibles, en una zona en la que solamente conoce la presencia de *P. olseni*, un resultado positivo es un dato que hace presumir la presencia de una infección por *P. olseni*, pero debe ser confirmado mediante hibridación *in-situ* (ISH) o secuenciación de ADN, debido a la posible presencia de otras especies de *Perkinsus*.

Disponibilidad de pruebas comerciales: no hay pruebas comerciales disponibles.

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

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

Muestras a obtener: moluscos vivos o recién muertos.

Procedimiento técnico:

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

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

Niveles de validación:

- *Especificidad y sensibilidad:* la especificidad es baja ya que la técnica no diferencia entre las distintas especies de *Perkinsus*. La sensibilidad es alta, sobre todo para el análisis de carga corporal total (Bushek *et al.*, 1994).
- *Método de referencia:* el cultivo en tioglicolato líquido (análisis de tejido) es el método de vigilancia recomendado. El análisis de tejido no ha sido validado frente al análisis de carga corporal total para *P. olseni*, pero para *P. marinus* el análisis de tejido ha resultado menos sensible (Bushek *et al.*, 1994). En un reciente estudio en el que se comparó el análisis de tejido de RFTM con la histología y con un análisis de PCR recientemente diseñado, se observó que el análisis de RFTM era el más sensible de los tres (Balseiro *et al.*, 2010).

Interpretación de los resultados:

- Los parásitos cultivados aumentan de tamaño pasando de 5–15 a 50–70 µm durante la incubación. Las células de *Perkinsus* spp. son esféricas y las paredes se tiñen generalmente de azul o negro-azulado con la solución yodada Lugol (Ray, 1966).
- En las especies hospedadores susceptibles, dentro de la gama conocida de *P. olseni*, un resultado positivo es un dato que hace presumir la presencia de una infección por *P. olseni*, pero debe ser confirmado mediante una PCR específica para la especie, hibridación *in-situ* (ISH) y/o secuenciación de ADN de la región del ITS (espaciador transcrito interno), debido a la posible presencia de otras especies de *Perkinsus*. Si no se conservan muestras paralelas para el diagnóstico molecular, puede extraerse el ADN del parásito y amplificarse mediante PCR directamente a partir de preparados de tioglicolato positivos (Audemard *et al.*, 2008).

Disponibilidad de pruebas comerciales: no hay kits comerciales disponibles.

4.3.1.2. Aislamiento e identificación del agente

4.3.1.2.1. Cultivo celular/medios artificiales

Las células de *Perkinsus* spp. se cultivan con facilidad en diversos medios (Casas *et al.*, 2002a; Dungan & Hamilton, 1995; La Peyre *et al.*, 1993). Se suele inocular en el medio de cultivo de tejido de corazón, hemolinfa o branquias. Se han realizado comparaciones de los medios comercializados para el cultivo de *P. marinus*, pero no de *P. olseni* (Dungan & Hamilton, 1995). La cepa de *P. marinus* utilizada proliferó con mayor rapidez en el medio 1:1 DME/Ham's F-12.

4.3.1.2.2. Métodos de detección del antígeno basados en anticuerpos

Se han desarrollado anticuerpos policlonales para un componente de la pared celular de *P. olseni* (Montes *et al.*, 2002), pero se unen también a *P. marinus*. No se ha desarrollado ningún análisis diagnóstico con el uso de estos anticuerpos.

4.3.1.2.3. Técnicas moleculares

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

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

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

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

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

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

Niveles de validación:

- **Especificidad y sensibilidad:** los cebadores de PCR para el género *Perkinsus* se han evaluado respecto a su inclusividad frente a todas las especies conocidas de *Perkinsus*, y se ha estudiado

su especificidad frente a diversos haplosporidios y dinoflagelados parasitarios y no parasitarios (Reece & Dungan, 2005). No se ha comparado su sensibilidad con la del RFTM.

Interpretación de los resultados

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Se lavan las preparaciones dos veces en Tampón 1 durante 5 minutos cada una, y luego dos veces en Tampón 2 (Tris 100 mM, pH 9,5, NaCl 100 mM, MgCl_2 50 mM) durante 5 minutos cada una. A continuación se colocan en solución de revelado de color (337,5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de nitroazul de tetrazolio, 175 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de sal de 5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato p-toluidina, 240 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de levamisol en Tampón 2) durante 2 horas en oscuridad. La reacción de color se interrumpe mediante un lavado en tampón TE (Tris 10 mM, pH 8,0, EDTA [ácido etileno diamino tetraacético] 1 mM).

A continuación se lavan las preparaciones en agua destilada estéril (dH_2O). Se aplica a los cortes una tinción de contraste con Bismarck Brown Y, se lavan en dH_2O , y se aplican cubreobjetos con el empleo de un medio de montaje acuoso.

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

Niveles de validación:

- **Especificidad y sensibilidad:** la sonda de ADN del género *Perkinsus* se ha evaluado para determinar su especificidad frente a diversas especies de *Perkinsus*, haplosporidios y dinoflagelados parasitarios (Elston *et al.*, 2004). La sensibilidad es superior a la de la histología en parafina, pero no se ha comparado la sonda con el RFTM.

Interpretación de los resultados

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

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

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

Se han desarrollado cebadores de PCR dirigidos a la región NTS y a la región ITS del complejo génico de ARNr para *P. olseni*. Aunque los cebadores dirigidos a la región NTS han mostrado una buena especificidad para la especie, es poco lo que se sabe de la variación existente dentro de la especie para la región NTS y existe un riesgo de resultados falsamente negativos. La variación de la secuencia en la región ITS se ha caracterizado más ampliamente (véase la base de datos GenBank) y se ha estudiado de manera más detallada la especificidad de los cebadores dirigidos a la región ITS. Por estas razones, se recomiendan los cebadores dirigidos a la región ITS. Se presenta aquí la versión más reciente del análisis de ITS específico para *P. olseni* recomendado. Se recomienda que se realice primero una vigilancia con el empleo del análisis de ITS para el género *Perkinsus*, y luego el análisis específico. Se ha desarrollado un análisis de PCR-polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) que puede ser útil para diagnósticos específicos de *P. olseni* (Abollo *et al.*, 2006), aunque no se ha evaluado su especificidad frente a todas las especies conocidas de *Perkinsus*.

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

Procedimientos técnicos: se extrae el ADN mediante digestión con proteinasa K durante una noche a 56°C y la metodología de columna spin con el empleo de kits comerciales. Se han desarrollado cebadores dirigidos a la región ITS del complejo génico de ARNr de *P. olseni* (Moss *et al.*, 2006): cebador directo PolsITS-140F (5'-GAC-CGC-CTT-AAC-GGG-CCG-TGT-T-3') y cebador inverso PolsITS-600R (5'-GGR-CTT-GCG-AGC-ATC-CAA-AG-3'). El tamaño del producto amplificado es de aproximadamente 450 pb. Las mezclas para la reacción de PCR contienen tampón de PCR a una concentración de Tris/HCl 20 mM (pH 8,4), KCl 50 mM, MgCl₂ 1,5 mM, una concentración 0,2 mM de cada dNTP, cada cebador a una concentración 0,1 µM, 0,025 U µl⁻¹ de *Taq* polimerasa, 0,05 mg ml⁻¹ de BSA y 0,5 µl de ADN genómico (~10–50 ng) en un volumen total de 25 µl. Las amplificaciones se realizan con una desnaturalización inicial de 95°C durante 4 minutos seguida de 40 ciclos de: 94°C durante 1 minuto, 62°C durante 1 minuto, 65°C durante 3 minutos, con un paso final de elongación de 65°C durante 10 minutos.

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

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

Niveles de validación:

- **Especificidad y sensibilidad:** se ha evaluado la especificidad de cebadores de la región ITS frente a *P. marinus*, *P. chesapeakei*, *P. mediterraneus* y *P. honshuensis* (Moss, 2007; Moss *et al.*, 2006). La sensibilidad es alta y permite detectar una célula de *P. olseni* en 30 mg de tejido de ostra, pero los errores de submuestreo en las infecciones leves localizadas pueden dar lugar a resultados falsamente negativos
- **Método de referencia:** el análisis de PCR de la ITS para *P. olseni* ha sido validado de manera limitada frente al RFTM (análisis de tejido) y se ha observado que es más sensible (Moss, 2007).

Interpretación de los resultados:

- Un resultado positivo es un producto de amplificación de PCR del tamaño apropiado (455 pb), al tiempo que todos los controles negativos producen un resultado negativo y todos los controles positivos tienen un resultado positivo.

Disponibilidad de pruebas comerciales: no disponible comercialmente.

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

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

Procedimientos técnicos: se ha desarrollado una sonda de ADN dirigida a la LSU del gen de ARNr de *P. olseni* (Moss *et al.*, 2006) (PolsLSU-464DIG 5'-CTC-ACA-AGT-GCC-AAA-CAA-CTG-3'). La sonda debe tener una marca de digoxigenina en su extremo. Los procedimientos de ISH son los mismos que los que se han presentado antes para la sonda del género *Perkinsus*.

Controles positivos/negativos: son obligatorios. Los controles positivos son cortes de tejido procedentes de cualquier hospedador susceptible infectado por *P. olseni*. Los controles negativos son análisis sin ninguna sonda o bien análisis con ostras no infectadas.

Niveles de validación:

- *Especificidad y sensibilidad:* se ha evaluado la sonda de ADN de *P. olseni* respecto a la especificidad frente a diversas especies de *Perkinsus* (Moss, 2007; Moss *et al.*, 2006), incluidas *P. marinus*, *P. chesapeakei*, *P. mediterraneus* y *P. honshuensis*. La sensibilidad es superior a la de la histología en parafina pero la sonda no se ha comparado con el RFTM.

Interpretación de los resultados

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

4.3.1.2.4. Purificación del agente

Perkinsus olseni puede purificarse mediante el desarrollo de cultivos clonales.

4.3.2. Métodos serológicos

Ninguno aplicable.

5. Idoneidad de las pruebas para cada uso previsto

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

Tabla 5.1. Métodos para la vigilancia y el diagnóstico dirigidos

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

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

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

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

7. Criterios de diagnóstico confirmativo

7.1. Definición de caso sospechoso

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

7.2. Definición de caso confirmado

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

8. Bibliografía

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

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

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

BALSEIRO P., MONTES J., FERNÁNDEZ CONCHAS R., NOVOA B. & FIGUERAS A. (2010). Comparison of diagnostic techniques to detect the clam pathogen *Perkinsus olseni*. *Dis. Aquat. Org.*, **90**, 143–151.

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

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

CASAS S.M., LA PEYRE J.F., REECE K.S., AZEVEDO C. & VILLALBA A. (2002a). Continuous *in vitro* culture of the carpet shell clam *Tapes decussatus* protozoan parasite *Perkinsus atlanticus*. *Dis. Aquat. Org.*, **52**, 217–231.

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

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

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

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

ELANDALLOUSSI, L.M., LEITE R.B., RODRIGUES P.M., AFONSO R., NUNES P.A. & CANCELA M.L. (2005). Effect of antiprotozoal drugs on the proliferation of the bivalve parasite *Perkinsus olseni*. *Aquaculture*, **243**, 9–17.

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

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

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

GAUTHIER J.D., MILLER C.R. & WILBUR A.E. (2006). TaqMan® MGB real-time PCR approach to quantification of *Perkinsus marinus* and *Perkinsus* spp. in oysters. *J. Shellfish Res.*, **25**, 619–624.

GOGGIN C.L. & LESTER R.J.G. (1995). *Perkinsus*, a protistan parasite of abalone in Australia: a review. *Aust. J. Mar. Freshwater Res.*, **46**, 639–646.

GOGGIN C.L., SEWELL K.B. AND LESTER R.J.G. (1990). Tolerances of *Perkinsus* spp. (Protozoa, Apicomplexa) to temperature, chlorine and salinity. *J. Shellfish Res.*, **9**, 145–148.

LA PEYRE M., CASAS S. LA PEYRE J. (2006). Salinity effects on viability, metabolic activity and proliferation of three *Perkinsus* species. *Dis. Aquat. Org.*, **71**, 59–74.

LA PEYRE J.F., FAISAL M. & BURRESON E.M. (1993). *In vitro* propagation of the protozoan *Perkinsus marinus*, a pathogen of the eastern oyster, *Crassostrea virginica*. *J. Eukaryot. Microbiol.*, **40**, 304–310.

LESTER R.J.G., & HAYWARD C.J. (2005). Control of *Perkinsus* disease in abalone. Fisheries Research and Development Corporation Project 2000/151 Final Report. University of Queensland, Brisbane. 50 p.

MONTES J.F., DURFORT M., LLADO, A. & GARCIA VALERO J. (2002). Characterization and immunolocalization of a main proteinaceous component of the cell wall of the protozoan parasite *Perkinsus atlanticus*. *Parasitology*, **124**, 477–484.

MOSS J.A. (2007). Characterization of exotic pathogens associated with the suminoe oyster, *Crassostrea ariakensis*. Ph.D. Dissertation. Virginia Institute of Marine Science, College of William and Mary, Gloucester Point, Virginia, USA. 230p.

MOSS J.A., BURRESON E.M. & REECE K.S. (2006). Advanced *Perkinus marinus* infections in *Crassostrea ariakensis* maintained under laboratory conditions. *J. Shellfish Res.*, **25**, 65–72.

PARK K.I., NGO T.T., CHOI S.D., CHO M. & CHOI K.S. (2006). Occurrence of *Perkinsus olseni* in the Venus clam *Protothaca jodoensis* in Korean waters. *J. Invertebr. Parasitol.*, **93**, 81–87.

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

REECE K. & DUNGAN C. (2005). Chapter 5.2. *Perkinsus* sp. infections of marine molluscs. In: Fish Health Section Blue Book, suggested procedures for the detection and identification of certain finfish and shellfish pathogens. Published in CD format by American Fisheries Society, Bethesda, Maryland, USA.

SAGRISTA E., DURFORT M. & AZEVEDO C. (1995). *Perkinsus* sp. (Phylum Apicomplexa) in Mediterranean clam *Ruditapes semidecussatus*: ultrastructural observations of the cellular response of the host. *Aquaculture* **132**, 153–160.

SANIL N.K., VIJAYAN K.K., KRIPA V. & MOHAMED K.S. (2010). Occurrence of the protozoan parasite, *Perkinsus olseni* in the wild and farmed pearl oyster, *Pinctada fucata* (Gould) from the Southeast coast of India. *Aquaculture*, **299**, 8–14.

SHEPPARD B.J. & PHILLIPS A.C. (2008). *Perkinsus olseni* detected in Vietnamese aquacultured reef clams *Tridacna crocea* imported to the USA, following a mortality event. *Dis. Aquat. Org.*, **79**, 229–235.

VILLALBA A., CASAS S.M., LÓPEZ C., & CARBALLAL M.J. (2005). Study of perkinsosis in the carpet shell clam *Tapes decussatus* in Galicia (NW Spain). II. Temporal pattern of disease dynamics and association with clam mortality. *Dis. Aquat. Org.*, **65**, 257–267.

VILLALBA A., REECE K.S., ORDAS M.C., CASA S.M. & FIGUERAS A. (2004). Perkinsosis in molluscs: a review. *Aquat. Living Resour.*, **17**, 411–432.

*
* *

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