

## CAPÍTULO 2.4.8.

# INFECCIÓN POR *MIKROCYTOS MACKINI*

---

## 1. **Ámbito de aplicación**

A efectos de este capítulo, la infección por *Mikrocytos mackini* se considera que es una infección por *Mikrocytos mackini*, el agente causal de la enfermedad de la Isla de Denman en las ostras.

## 2. **Información sobre la enfermedad**

### 2.1. **Factores del agente**

Protozoos de filiación taxonómica desconocida. Los análisis filogenéticos sugirieron que *M. mackini* puede ser un eucariota basal, pero casi con seguridad no está directamente relacionado con otros taxones de protistas conocidos (Carnegie *et al.*, 2003).

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

No se conocen cepas (Carnegie *et al.*, 2003; Farley *et al.*, 1988) y hay una ausencia total de variación genética dentro de *Mikrocytos mackini* en toda la gama de ITS1-5.8S-ITS2 en el ADNr de más de 70 muestras recogidas en todo su ámbito de distribución (Abbott *et al.*, 2011).

#### 2.1.2. **Supervivencia fuera del hospedador**

Desconocida. Sin embargo, se produce una transmisión directa entre las ostras a través de la columna de agua (Bower, 1988; Hervio *et al.*, 1996; Quayle, 1982).

#### 2.1.3. **Estabilidad del agente**

Desconocida. Sin embargo, se produce una transmisión directa entre las ostras a través de la columna de agua (Bower, 1988; Hervio *et al.*, 1996; Quayle, 1982).

#### 2.1.4. **Ciclo de vida**

El ciclo de vida es directo de hospedador a hospedador.

### 2.2. **Factores del hospedador**

Infeccioso para todas las especies de ostras expuestas artificialmente en el laboratorio o de forma natural.

#### 2.2.1. **Especies hospedadoras susceptibles**

El ostión japonés (*Crassostrea gigas*), el ostión virgínico (*Crassostrea virginica*), la ostra europea (*Ostrea edulis*) y la ostra plegata (*Ostrea lurida*) son susceptibles a la infección (Bower *et al.*, 1997). Al menos dos especies de almejas, la almeja panopea (*Panope abrupta*) y la almeja de Manila (*Venerupis [=Tapes, =Ruditapes] philippinarum*), son resistentes a la infección (Bower *et al.*, 2005; y Meyer *et al.*, 2008, respectivamente).

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

Todas las fases de la vida de las ostras después del asentamiento son susceptibles a la infección (Bower *et al.*, 2005). La susceptibilidad de las larvas no se conoce.

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

Todas las especies susceptibles mantenidas a una temperatura inferior a 10°C durante al menos 3 meses son vulnerables a la enfermedad (Bower *et al.*, 1997; Hervio *et al.*, 1996). *Crassostrea virginica*, *Ostrea edulis* y *Ostrea lurida* parecen ser más susceptibles a la infección y la enfermedad que *Crassostrea gigas* (Bower *et al.*, 1997).

### 2.2.4. Órganos diana y tejidos infectados

*Mikrocytos mackini* suele encontrarse en el citoplasma de las células del tejido conjuntivo vesicular de todos los órganos, y en las fibras del músculo aductor, pero se ha observado también en hemocitos y en el epitelio de la glándula digestiva (Hine *et al.*, 2001; Meyer *et al.*, 2005).

### 2.2.5. Infección persistente con portadores de por vida

La infección puede ser mortal dependiendo de las condiciones ambientales y del hospedador (Bower, 1988; 2001; Bower & Meyer, 1999). Se producen infecciones subclínicas pero no se conoce la persistencia de la infección durante varios años ni la existencia de portadores durante toda la vida (Bower *et al.*, 1994a).

### 2.2.6. Vectores

No son necesarios vectores para la transmisión de la infección.

### 2.2.7. Animales acuáticos salvajes portadores o sospechosos de serlo

No aplicable.

## 2.3. Patrón de la enfermedad

### 2.3.1. Mecanismos de transmisión

La transmisión es directa de hospedador a hospedador (Hervio *et al.*, 1996). Las células viables de *M. mackini* liberadas al morir el hospedador son adquiridas probablemente por el siguiente hospedador a través de mecanismos de alimentación. Las células de *Mikrocytos mackini* que se encuentran en los hemocitos pueden salir también de su hospedador vivo por diapedesis, a través del tracto intestinal y las branquias.

### 2.3.2. Prevalencia

Durante los años sesenta del siglo XX, se atribuyeron a *M. mackini* cifras de mortalidad de hasta un 40% en la primavera (Abril y Mayo), en niveles intermareales bajas, en los individuos de *C. gigas* de edad avanzada (3+ años) cultivados sobre un sustrato de playa. Más recientemente, en individuos de *C. gigas* (2 años de edad) procedentes de una instalación de cultivo suspendido, se observó una mortalidad del 10% con las infecciones intensas por *M. mackini* durante la primavera. Hasta un 35% de las ostras de esta población infectada presentaban lesiones sintomáticas (pústulas verdes amarillentas) y una vez recolectada, la población afectada fue rechazada por el elaborador comercial. Esto fue un hecho poco habitual, puesto que esta enfermedad no suele tener repercusiones en las ostras de cultivos intensivos que son recolectadas en un plazo no superior a 3 años. Los experimentos de exposición en el laboratorio indicaron que la enfermedad es exacerbada por las temperaturas frías, lo cual sugiere que las repercusiones de *M. mackini* pueden ser más graves si es introducido inadvertidamente en lugares más fríos. Además, en el laboratorio, las ostras juveniles (ejemplares para siembra) son susceptibles a la infección, que causa una alta mortalidad (Bower *et al.*, 2005). No se conocen las repercusiones de *M. mackini* en los juveniles durante el cultivo comercial, pero se prevé que sea desdeñable si la siembra se realiza después de finalizado el periodo de transmisión natural que tiene lugar en la primavera (Quayle, 1982).

### 2.3.3. Distribución geográfica

En la costa Oeste de Canadá, *M. mackini* parece tener una distribución ubicua en todo el Estrecho de Georgia y estar limitado a otras localidades específicas en la zona de la isla de Vancouver. Este parásito se ha detectado también en ostras de áreas adyacentes del Estado de Washington (Estados Unidos), sin que se haya detectado una mortalidad asociada (Abbott *et al.*, 2001).

### 2.3.4. Mortalidad y morbilidad

La infección puede ser mortal si las temperaturas ambientales son favorables, como se indica más adelante. Sin embargo, alrededor de la mitad de las ostras expuestas parecen ser resistentes a la infección o la enfermedad resultante.

### 2.3.5. Factores ambientales

Las temperaturas frías de menos de 10°C durante 3–4 meses parecen ser un requisito necesario para que se desarrolle la enfermedad (Bower & Meyer, 1999; Hervio *et al.*, 1996). Las ostras expuestas experimentalmente y mantenidas a una temperatura de 15°C durante 3 meses no desarrollaron la

enfermedad hasta que fueron trasladadas y mantenidas a 10°C durante otros 4 meses. El hecho de que la enfermedad aparezca anualmente tan solo durante la primavera (Marzo a Junio) podría explicarse por el requisito de una temperatura fría para el desarrollo de la enfermedad.

## 2.4. Control y prevención

El sector de la acuicultura puede utilizar técnicas de gestión para evitar las consecuencias de la infección por *M. mackini* (Bower, 1988).

### 2.4.1. Vacunación

No aplicable.

### 2.4.2. Tratamiento con sustancias químicas

No aplicable.

### 2.4.3. Inmunoestimulación

No aplicable.

### 2.4.4. Selección genética a favor de la resistencia

No aplicable.

### 2.4.5. Repoblación con especies resistentes

No aplicable.

### 2.4.6. Agentes bloqueantes

No aplicable.

### 2.4.7. Desinfección de huevos y larvas

No aplicable.

### 2.4.8. Prácticas generales de manejo

Recolectar las ostras de un tamaño adecuado para el mercado en un plazo no superior a 3 años desde la siembra y antes del mes de Febrero del tercer año de engorde. Las ostras juveniles (ejemplares para siembra) no deben desplegarse a niveles de marea baja ni en zonas adyacentes a cultivos en suspensión infectados antes del mes de Junio (Bower, 1988; Quayle, 1982).

## 3. Obtención de muestras

### 3.1. Elección de ejemplares

Deben obtenerse muestras de ostras vivas o recién muertas.

En primavera, se seleccionan ostras de edad avanzada (3+ años) de niveles intermareales bajos. La obtención de muestras se centra en lugares en los que ha habido una mortalidad reciente. Se extraen las ostras de la concha y se seleccionan los ejemplares que tienen lesiones pequeñas (ulceraciones, abscesos, pústulas generalmente de color verde pero que pueden ser de color amarillo-marrón o incoloras, y de un diámetro de hasta 5 mm) en el tejido conjuntivo vesicular del cuerpo, el manto y los palpos labiales, y/o en el músculo aductor (véanse las imágenes de las lesiones en [http://www.pac.dfo-mpo.gc.ca/sci/shelldis/pages/mikmacoy\\_e.htm](http://www.pac.dfo-mpo.gc.ca/sci/shelldis/pages/mikmacoy_e.htm)).

### 3.2. Conservación de las muestras para su envío

Para la histología, el mejor conservante es la solución de Davidson, pero también son aceptables el formol tamponado al 10% u otros fijadores estándar de histología. Para los análisis de reacción en cadena de polimerasa (PCR), las muestras deben conservarse y almacenarse en etanol no desnaturalizado al 95% hasta la extracción del ADN, utilizando un kit comercial (por ejemplo DNeasy Kit; QIAGEN).

### 3.3. Combinación de varias muestras

La combinación de lesiones procedentes de la misma ostra es aceptable para la PCR y la histología.

### 3.4. Órganos y tejidos de elección

Es importante que cualquier lesión observada en los palpos labiales, el manto, la pared corporal o el músculo aductor se conserve tanto para la histología como para la PCR. Se recomienda la extirpación y bisección de lesiones representativas, fijando la mitad para histología y la otra para PCR.

Para la histología, en ausencia de lesiones (o además de ellas), se utiliza un corte transversal (aproximadamente 3 mm de grosor) realizado a través de la parte anterior de la masa visceral y que incluya los palpos labiales, el manto, la glándula digestiva y el estómago. El tejido conjuntivo vesicular (TCV) es el mejor para visualizar *M. mackini* en el examen histopatológico.

Para la PCR, en ausencia de lesiones (o además de ellas), se obtiene un corte transversal (de aproximadamente 3 mm de grosor) a través de la parte media de la masa visceral. De este corte, se extirpan uno o varios fragmentos de tejido (aproximadamente 25 mg de peso total) de una zona próxima a la base de las branquias que incluya: TCV, gónada, glándula digestiva y branquia.

### 3.5. Muestras/tejidos que no son adecuados

La presencia de *Mikrocytos mackini* asociada al tracto digestivo no es evidente en el examen histológico ordinario de cortes teñidos con hematoxilina y eosina. Generalmente es necesaria una hibridación *in situ* para ver el parásito en estos tejidos. Además, es casi imposible detectar *M. mackini* mediante histopatología en tejidos de ostras con una infección natural que no se asocia a lesiones de infiltración hemocítica.

## 4. Métodos de diagnóstico

### 4.1. Métodos de diagnóstico de campo

#### 4.1.1. Signos clínicos

Lesiones focales pequeñas (ulceraciones, abscesos, pústulas, generalmente de color verde pero que pueden ser también de color amarillo-marrón o incoloras) de hasta 5 mm de diámetro, observadas en los tejidos blandos y a menudo con cicatrices marrones en la concha, adyacentes a abscesos en la superficie del manto. Aparte de las lesiones, las ostras infectadas suelen estar en buen estado hasta el momento de la muerte. Estos signos clínicos no son específicos de la infección por *M. mackini*.

#### 4.1.2. Alteraciones del comportamiento

Hay ostras moribundas o débiles (que cierran herméticamente con lentitud las valvas) en las poblaciones afectadas durante la primavera o cuando se las tiene en tanques mantenidos a una temperatura <10°C. Estas alteraciones del comportamiento no son específicas de la infección por *M. mackini*.

### 4.2. Métodos clínicos

#### 4.2.1. Anatomopatología macroscópica

Se producen lesiones focales pequeñas de infiltración hemocítica intensa (ulceraciones, abscesos, pústulas generalmente de color verde pero que pueden ser también de color amarillo-marrón o incoloras) de hasta 5 mm de diámetro en la pared corporal, el músculo aductor o en las superficies de los palpos labiales o el manto (Bower, 2005). Estos signos macroscópicos no son específicos de la infección por *M. mackini*.

#### 4.2.2. Bioquímica clínica

No aplicable.

#### 4.2.3. Anatomopatología microscópica

Acumulación (infiltración) de numerosos hemocitos en la proximidad de una infección focal.

#### 4.2.4. Preparaciones húmedas

No aplicable.

#### 4.2.5. Frotis

Las improntas tisulares de lesiones teñidas con un colorante de tipo Giemsa y examinadas mediante microscopía óptica a 1000x aumentos (inmersión en aceite) pueden mostrar la presencia de *M. mackini* liberado por las células del hospedador.

#### 4.2.6. Cortes fijados

Los focos de infiltración hemocítica en el manto, los palpos labiales y el músculo aductor pueden indicar la localización de *M. mackini* en el citoplasma de las células adyacentes de tejido conjuntivo vesicular y de miofibrocitos. Puede producirse una necrosis del tejido en el centro de la lesión (Bower *et al.*, 1994b). En las infecciones de gran intensidad inducidas en el laboratorio, puede no haber infiltración hemocítica.

#### 4.2.7. Microscopía electrónica/citopatología

La íntima relación de *M. mackini* con los orgánulos de la célula del hospedador sugiere que este parásito es capaz de obtener energía directamente a partir de las mitocondrias de la célula del hospedador (Hine *et al.*, 2001).

### 4.3. Métodos de detección e identificación del agente

#### 4.3.1. Métodos directos de detección

El pequeño tamaño de *M. mackini* (2 a 3 µm de diámetro) hace imposible observarlo sin la ayuda de una ampliación a gran aumento (aproximadamente 1000x).

##### 4.3.1.1. Métodos microscópicos

Al microscopio óptico, *M. mackini* tiene un aspecto morfológicamente similar al de *Bonamia* sp. excepto por su presencia en el citoplasma de las células del tejido conjuntivo vesicular y los miocitos, en los que no se encuentra *Bonamia* sp. En la microscopía electrónica, puede utilizarse la ultraestructura morfológica para diferenciar *M. mackini* de otros protozoos conocidos. Sin embargo, son necesarias infecciones muy intensas para poder utilizar este instrumento.

##### 4.3.1.1.1. Preparaciones húmedas

No aplicable.

##### 4.3.1.1.2. Frotis

*Muestras a obtener:* hospedadores vivos con lesiones.

*Procedimiento técnico:* se extirpa una lesión y se corta por la mitad con un bisturí. Se aplica el lado del tejido de la lesión sobre un papel absorbente para eliminar el exceso de líquido. Se tocan con el tejido varias áreas de un portaobjetos de vidrio limpio y se seca al aire. Las observaciones se realizan a ×1000 aumentos (inmersión en aceite) tras una tinción con colorantes de tipo Wright–Giemsa o con un kit de tinción comercial para células sanguíneas (por ejemplo, Hemacolor®, EMD Chemicals Inc.) siguiendo las instrucciones del fabricante.

*Controles positivos:* se dispone de improntas de tejido procedentes de ostras infectadas que proporciona el Laboratorio de Referencia de la OIE. Sin embargo, es importante señalar que *M. mackini* en improntas de tejido es prácticamente imposible de diferenciar de *Bonamia* sp en este material.

*Niveles de validación:* Este análisis no ha sido validado formalmente.

*Especificidad y sensibilidad:* la especificidad es muy baja porque *M. mackini* se parece a otras microcélulas en las improntas de tejido; la sensibilidad puede ser mejor que la de la histología ordinaria, pero solamente cuando hay lesiones (Carnegie *et al.*, 2003).

*Interpretación de los resultados:* presencia de microcélulas pequeñas (pueden estar distorsionadas hasta un diámetro de alrededor de 4 µm) que suelen observarse fuera de las células del hospedador. El parásito, generalmente de 2-3 µm de diámetro tiene un citoplasma de color azul claro (basófilo) y

un núcleo pequeño rojo (eosinófilo) (los colores pueden ser diferentes según la tinción utilizada). La técnica no es específica para la especie.

#### 4.3.1.1.3. Cortes fijados

*Muestras a obtener:* ostras vivas o recién muertas.

*Procedimiento técnico:* los cortes de tejido que incluyan lesiones deben fijarse durante aproximadamente 24 horas en solución de Davidson o en formol tamponado al 10%, seguido de un procesamiento normal para histología en parafina y tinción con hematoxilina y eosina. Las observaciones se hacen con aumentos crecientes hasta llegar a  $\times 1000$ .

*Controles positivos:* se dispone de cortes histológicos (teñidos y con cubreobjetos o cortes en parafina sin teñir en un portaobjetos de vidrio) que proporciona el Laboratorio de Referencia de la OIE. Se recomienda la referencia frecuente a las preparaciones de control positivas mientras se realiza la búsqueda de *M. mackini* dado el carácter críptico y el pequeño tamaño de este parásito.

*Niveles de validación:* este análisis no ha sido validado de manera formal.

*Especificidad y sensibilidad:* la especificidad de especie es muy baja para las microcélulas observadas en los hemocitos, pero es alta cuando estas microcélulas se encuentran dentro del citoplasma de células de tejido conjuntivo vesicular; la sensibilidad es buena para las infecciones de intensidad moderada o alta, sobre todo cuando se examina el tejido conjuntivo procedente de la proximidad inmediata a las lesiones, pero es baja para los tejidos situados a distancia de las lesiones y para las infecciones de intensidad baja.

*Método de referencia:* en la actualidad, la histopatología de las lesiones en las ostras se considera el análisis de elección para detectar y diagnosticar las infecciones por *M. mackini*.

Interpretación de los resultados:

- Un resultado positivo es la presencia de microcélulas esféricas de alrededor de 2–3  $\mu\text{m}$  de diámetro en el interior del citoplasma de células de tejido conjuntivo vesicular y/o miocitos, generalmente en células del hospedador inmediatamente adyacentes a una infiltración hemocítica intensa focal.
- En las especies hospedadoras susceptibles, dentro del ámbito de distribución conocido de *M. mackini*, un resultado positivo es un signo de infección por *M. mackini*. Fuera del ámbito de distribución conocido, un resultado positivo debe confirmarse mediante secuenciación del ADN del gen de ARN ribosómico de subunidad pequeña (ADNr de SSU) y la comparación de la secuencia con el fragmento de 1457 pb de *M. mackini* publicado en GenBank. (Número de acceso AF477623, URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&val=30515676>). Si la secuencia de ADNr de SSU sugiere la presencia de *M. mackini*, se recomienda secuenciar el ADNr de ITS1-5.8S-ITS2 con el empleo de los métodos de Abbott *et al.* (2001) para determinar de manera fiable si es genéticamente idéntico a *M. mackini* dentro del margen actualmente descrito (GenBank # HM563060.1; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/HM563060.1>).

#### 4.3.1.2. Aislamiento e identificación del agente

No se ha realizado un aislamiento puro de *M. mackini*. Sin embargo, se están desarrollando otros procedimientos de identificación además de la microscopía óptica.

##### 4.3.1.2.1. Cultivo celular/medios artificiales

No aplicable.

##### 4.3.1.2.2. Métodos de detección del antígeno basados en anticuerpos (IFAT, ELISA, etc.)

No aplicable. Se han producido anticuerpos monoclonales, pero no se ha desarrollado con ellos un análisis diagnóstico inmunológico.

#### 4.3.1.2.3. Técnicas moleculares (PCR, ISH, secuenciación, etc.)

##### 4.3.1.2.3.1 Análisis de PCR de la región de ADNr de SSU

Se han desarrollado pares de cebadores dirigidos a la región SSU para *M. mackini*. Estos cebadores son 5'-AGA-TGG-TTA-ATG-AGC-CTC-C-3' y 5'-GCG-AGG-TGC-CAC-AAG-GC-3' y amplifican un producto de 546 pb (Carnegie *et al.*, 2003). Las muestras deben diluirse en ddH<sub>2</sub>O estéril o en tampón Tris/EDTA (TE) estéril (pH 7,0–7,2) hasta una concentración de entre 10 y 40 ng/μl antes de realizar el análisis. La mezcla de reacción de PCR contiene los siguientes ingredientes a concentraciones finales: Tris/HCl 20 mM (pH 8,4); KCl 50 mM; MgCl<sub>2</sub> 1,25 mM; una concentración 200 μM de cada uno de los siguientes: dATP, dCTP, dGTP y dTTP; una concentración 0,05 μM de cada cebador; y 0,05 unidades/μl y 1,5 μl de ADN plantilla en un volumen total de 15 μl. Los parámetros de los ciclos empiezan con una desnaturalización inicial a 95°C durante 10 minutos, seguido de 40 ciclos a 95°C durante 1 minuto, 60,5°C durante 1 minuto y 72°C durante 1 minuto, y terminan con una extensión final a 72°C durante 10 minutos. Los productos pueden analizarse mediante electroforesis en geles de agarosa al 1,5% con un contenido de 2,0 μl de 5000X SybrGreen o 0,1 μg/ml de bromuro de etidio y pueden visualizarse mediante exposición a luz UV.

Controles positivos/negativos: son obligatorios. Los controles positivos son el ADN genómico procedente de hospedadores con una infección intensa que proporciona el Laboratorio de Referencia de la OIE. Los controles negativos son el ADN genómico procedente de hospedadores no infectados o de reacciones sin ADN plantilla.

Niveles de validación: este análisis no ha sido validado formalmente.

Especificidad y sensibilidad: el análisis de la región de ADNr de SSU detectó de tres a cuatro veces más infecciones por *M. mackini* en 1056 ostras salvajes procedentes de la isla Denman de la Columbia Británica, en comparación con la histopatología estándar (Carnegie *et al.*, 2003). Sin embargo, posteriormente se ha demostrado que este método es problemático, ya que no diferencia entre *M. mackini* y una especie de *Mikrocytos* genéticamente diferente, que se ha detectado en múltiples localizaciones geográficas dispersas (Abbott *et al.*, 2001).

Interpretación de los resultados: un resultado positivo es un amplicón de PCR del tamaño apropiado, al tiempo que todos los controles negativos producen resultados negativos y todos los controles positivos tienen resultados positivos.

##### 4.3.1.2.3.2 Análisis por qPCR TaqMan en ADNr de ITS2-28S

Recientemente se ha desarrollado un análisis diagnóstico de qPCR en tiempo real, con el empleo de cebadores y sonda en ADNr de ITS2-28S en *M. mackini*, que no muestra una reacción cruzada con *Mikrocytos* sp. La validación en el laboratorio de este análisis ha mostrado que es muy específico y sensible para la detección de *M. mackini*. En la actualidad se está realizando una validación diagnóstica formal del análisis de qPCR.

##### 4.3.1.2.3.3 Hibridación in-situ (ISH)

Muestras a obtener: seguir el procedimiento para los cortes fijados (4.3.1.1.3) descrito más arriba, excepto porque los cortes de tejido deben colocarse en portaobjetos con carga eléctrica positiva o portaobjetos recubiertos con aminoalquilsilano.

Procedimiento técnico: se desparafinan los cortes de tejido, se rehidratan y luego se hibridan con sondas oligonucleótidas marcadas. Las sondas marcadas con 5' Oregon Green muestran una intensa hibridación respecto a *M. mackini* (Carnegie *et al.*, 2003). Sin embargo, la orientación del tejido del hospedador resulta difícil cuando se emplea esta sonda fluorescente. La hibridación con la sonda MACKINI-1 (5'-AGC-CCA-CAG-CCT-TCA-C-3') con un extremo 3' marcado con digoxigenina y una tinción de contraste con Bismark Brown Y al 0,5% en etanol al 30% (Meyer *et al.*, 2005) pone de manifiesto la localización del parásito en el interior de los tejidos del hospedador.

Controles positivos/negativos: son obligatorios. Los controles positivos son cortes de tejido procedentes de una ostra infectada por *M. mackini*. Los controles negativos son análisis sin sonda o análisis realizados con ostras no infectadas.

Niveles de validación: esta técnica no ha sido validada formalmente.

Especificidad y sensibilidad: la sonda MACKINI-1 mostró una hibridación intensa respecto a *M. mackini*, pero no evidenció hibridación respecto a los tejidos de ostras o respecto a los demás parásitos de estos hospedadores y una bacteria que se estudiaron: *Bonamia ostreae* en *O. edulis*; *Perkinsus qugwadi* en *Patinopectin yessoensis*; *Trichodina* sp. en *C. gigas*; un protista de tipo amebiano en *Protothaca staminea*; *Hematodinium* sp en *Chionoecetes tanneri*; SPP (un protista parásito de filiación taxonómica incierta) en *Pandalus platyceros*; y *Nocardia crassostreae* en *C. gigas* (Meyer *et al.*, 2005). Esa sonda con un marcaje con digoxigenina fue considerablemente más sensible en la detección de infecciones, en comparación con los cortes histológicos estándar teñidos con hematoxilina y eosina. La infección pudo detectarse a menos aumentos (x100 en comparación con x1000) y en tejido con tinción basófila, como la glándula digestiva, el epitelio digestivo y el tejido gonadal (Meyer *et al.*, 2005).

Interpretación de los resultados: Un resultado positivo es la presencia de un marcaje de color azul-negro de las células del parásito (tamaño y localización en el tejido apropiados) 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

No se ha obtenido un aislamiento de *M. mackini* sin contaminación de núcleos de la célula hospedadora. Sin embargo, se ha descrito una técnica de filtración que concentra este parásito (Joly *et al.*, 2001).

#### 4.3.2. Métodos serológicos

Se desarrollaron anticuerpos monoclonales e hibridomas criopreservados hace unos 15 años. La especificidad de los anticuerpos monoclonales no ha sido validada plenamente y no se han desarrollado como prueba diagnóstica.

### 5. Idoneidad de las pruebas para cada uso previsto

Los métodos actualmente disponibles para la vigilancia dirigida y el diagnóstico de *Mikrocytos mackini* 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
	Juveniles	Adultos		
Signos macroscópicos	d	c	c	d
Frotis (improntas de tejido)*	c	c	c	d
Histopatología	c	a	b	b
ME de transmisión	d	d	d	b
Sondas de ADN – <i>in situ</i>	c	c	c	a
PCR	b	b	b	b
Secuenciación	d	d	d	a <sup>1</sup>

ME = microscopía electrónica; PCR = reacción en cadena de polimerasa. \*La técnica no es específica para la especie, pero puede utilizarse en áreas y hospedadores susceptibles y durante la primavera del año en el que se ha evidenciado la enfermedad causada por *M. mackini*. <sup>1</sup>Solamente se utiliza en combinación con un resultado positivo en la PCR.



## 6. Prueba(s) recomendada(s) para la vigilancia dirigida destinada a declarar la ausencia de infección por *M. mackini*

Deben usarse la histopatología y los análisis de PCR para una vigilancia dirigida destinada a declarar la ausencia de infección por *M. mackini*. Deben obtenerse ostras de edad 2+ años procedentes de niveles intermareales bajos o de cultivos en suspensión durante la primavera del año y debe buscarse la posible presencia de cualquier lesión.

### 7.1. Definición de caso sospechoso

En las especies que se sabe que son susceptibles dentro del ámbito de distribución geográfica de *M. mackini* durante la primavera del año, un caso sospechoso de infección por *M. mackini* se caracteriza por presentar signos macroscópicos de la enfermedad, en combinación con un resultado positivo en las improntas del tejido en las lesiones.

En otras especies hospedadoras o fuera del ámbito de distribución conocido de *M. mackini*, un caso sospechoso es un resultado positivo en la histología o la PCR.

### 7.2. Definición de caso confirmado

En las especies que se sabe que son susceptibles dentro del ámbito de distribución geográfica de *M. mackini* durante la primavera del año, un caso confirmado es un resultado positivo en uno de los siguientes métodos: histología, PCR o ISH.

En otras especies hospedadoras o fuera del ámbito de distribución conocido de *M. mackini*, un caso confirmado es un resultado positivo en la histología o la PCR combinado con un resultado positivo de la hibridación *in-situ*, la microscopía electrónica o una homología con las secuencias de ADN<sub>r</sub> publicadas (Abbott *et al.*, 2011; Carnegie *et al.*, 2003). Se recomienda la secuenciación de las regiones SSU y/o ITS1-5.8S-ITS2 como paso final para un diagnóstico confirmativo de *M. mackini*.

## 8. Bibliografía

- ABBOTT C.L., GILMORE S.R., LOWE G., MEYER G. & BOWER S. (2011). Sequence homogeneity of internal transcribed spacer rDNA in *Mikrocytos mackini* and detection of *Mikrocytos* sp. in a new location. *Dis. Aquat. Org.*, **93**, 243–250.
- BOWER S.M. (1988). Circumvention of mortalities caused by Denman Island oyster disease during mariculture of Pacific oysters. *Am. Fish. Soc. (Special Publication)*, **18**, 246–248.
- BOWER S.M. (2001). Hazards and risk management of *Mikrocytos mackini* in oysters. In: Proceedings of the OIE International Conference on Risk Analysis in Aquatic Animal Health, Rodgers C.J., ed. World Organisation for Animal Health (OIE), Paris, France, 164–166.
- BOWER S.M. (2005). Synopsis of Infectious Diseases and Parasites of Commercially Exploited Shellfish: *Mikrocytos mackini* (Denman Island Disease) of Oysters. URL: [http://www.pac.dfo-mpo.gc.ca/sci/shelldis/pages/mikmacoy\\_e.htm](http://www.pac.dfo-mpo.gc.ca/sci/shelldis/pages/mikmacoy_e.htm).
- BOWER S.M., BATE K. & MEYER G.R. (2005). Susceptibility of juvenile *Crassostrea gigas* and resistance of *Panope abrupta* to *Mikrocytos mackini*. *J. Invertebr. Pathol.*, **88**, 95–99.
- BOWER S.M., CARNEGIE R.B., GOH B., JONES S.R.M., LOWE G.J. & MAK M.W.S. (2004). Preferential PCR amplification of parasitic protistan small subunit rDNA from metazoan tissues. *J. Eukaryotic Microbiol.*, **51**, 325–332.
- BOWER S.M., HERVIO D. & MCGLADDERY S.E. (1994a). Potential for the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, to serve as a reservoir host and carrier of oyster pathogens. *ICES Council Meeting Papers*, Copenhagen, Denmark, ICES-CM-1994/F:30.
- BOWER S.M., HERVIO D. & MEYER G.R. (1997). Infectivity of *Mikrocytos mackini*, the causative agent of Denman Island disease in Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, to various species of oysters. *Dis. Aquat. Org.*, **29**, 111–116.
- BOWER S.M., MCGLADDERY S.E. & PRICE I.M. (1994b). Synopsis of infectious diseases and parasites of commercially exploited shellfish. *Ann. Rev. Fish Dis.*, **4**, 1–199.  
For update see URL: [http://www.pac.dfo-mpo.gc.ca/sci/shelldis/title\\_e.htm](http://www.pac.dfo-mpo.gc.ca/sci/shelldis/title_e.htm).

BOWER S.M. & MEYER G.R. (1999). Effects of cold water on limiting or exacerbating some oyster diseases. *J. Shellfish Res.*, **18**, 296 (Abstract).

BOWER S.M. & MEYER G.R. (2002). Morphology and ultrastructure of a protistan pathogen in the haemolymph of shrimp (*Pandalus* spp.) in the northeastern Pacific Ocean. *Can. J. Zool.*, **80**, 1055–1068.

CARNEGIE R.B., MEYER G.R., BLACKBOURN J., COCHENNEC-LAUREAU N., BERTHE F.C.J. & BOWER S.M. (2003). Molecular detection of the oyster parasite *Mikrocytos mackini* and a preliminary phylogenetic analysis. *Dis. Aquat. Org.*, **54**, 219–227.

COMMITTEE ON THE STATUS OF ENDANGERED WILDLIFE IN CANADA (2004). Canadian Wildlife Service, Ottawa, Canada. [http://www.sararegistry.gc.ca/species/showDocument\\_e.cfm?id=591](http://www.sararegistry.gc.ca/species/showDocument_e.cfm?id=591)

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

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

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

JOLY J.-P., BOWER S.M. & MEYER G.R. (2001). A simple technique to concentrate the protozoan *Mikrocytos mackini*, causative agent of Denman Island disease in oysters. *J. Parasitol.*, **87**, 432–434.

MEYER G.R., BOWER S.M. & CARNEGIE R.B. (2005). Sensitivity of a digoxigenin-labelled DNA probe in detecting *Mikrocytos mackini*, causative agent of Denman Island disease (mikrocytosis) in oysters. *J. Invertebr. Pathol.*, **88**, 89–94.

MEYER G.R., BOWER S.M., LOWE G. & DAVIES S. (2008). Resistance of the Manila clam (*Venerupis philippinarum*) to infection with *Mikrocytos mackini*. *J. Invertebr. Pathol.*, **98**, 54–57.

QUAYLE D.B. (1982). Denman Island oyster disease 1960–1980. *British Columbia Shellfish Mariculture Newsletter*, **2**, 1–5, (Victoria, Canada).

\*  
\* \*