



# Diagnóstico molecular y epidemiología de enfermedades relevantes de moluscos bivalvos

Tesis Doctoral

Andrea Ramilo Álvarez

Santiago de Compostela, 2015

---



# Diagnóstico molecular y epidemiología de enfermedades relevantes de moluscos bivalvos

Memoria presentada por:

**Andrea Ramilo Álvarez**

para optar al título de Doctora en Biología

Codirectores:

Elvira Abollo Rodríguez

Antonio Villalba García

Santiago de Compostela, 2015

---



Dña. Elvira Abollo Rodríguez, Doctora en Biología e Investigadora del Centro Tecnológico del Mar (Fundación CETMAR) y D. Antonio Villalba García, Doctor en Biología e Investigador del Centro de Investigaciones Marinas de la Consellería de Medio Rural e do Mar (Xunta de Galicia), como Directores de la tesis titulada “Diagnóstico molecular y epidemiología de enfermedades relevantes de moluscos bivalvos”

Por la presente DECLARAMOS:

Que la tesis presentada por Dña. Andrea Ramilo Álvarez para optar al grado de Doctora en Biología por la Universidad de Santiago de Compostela, es idónea para ser presentada, de acuerdo con el artículo 41 del Reglamento de Estudios de Doctorado, por la modalidad de compendio de ARTÍCULOS, en los que la doctoranda tuvo participación en el peso de la investigación y su contribución fue decisiva para llevar a cabo este trabajo. Hallándose concluida, autorizan su presentación a fin de que pueda ser juzgada por el tribunal correspondiente.

Los coautores, tanto doctores como no doctores, de dichos artículos conocen la inclusión de estos artículos en esta tesis doctoral y ninguno de los artículos reunidos en esta tesis será presentado por ninguno de ellos en otra tesis doctoral, lo que firmamos bajo nuestra responsabilidad.

Y para que así conste, firman la presente en Vilanova de Arousa, 22 de septiembre de 2015

Fdo.: Dra. Elvira Abollo Rodríguez

Fdo.: Dr. Antonio Villalba García





D. Carlos Pereira Dopazo, Doctor en Biología y Profesor Titular del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Universidad de Santiago de Compostela,


INFORMA:

Que la presente Memoria titulada “Diagnóstico molecular y epidemiología de enfermedades relevantes de moluscos bivalvos”, presentada por Dña. Andrea Ramilo Álvarez para optar al grado de Doctora en Biología por la Universidad de Santiago de Compostela, ha sido realizada bajo su tutela y que, hallándose concluida, autoriza su presentación a fin de que pueda ser juzgada por el tribunal correspondiente.

Y para que así conste, firma la presente en Santiago de Compostela, a 22 de septiembre de 2015

Fdo.: Carlos Pereira Dopazo





*La presente tesis doctoral se ha desarrollado en el Centro de Investigaciones Marinas (CIMA), perteneciente a la Xunta de Galicia y se ha financiado a través de la Consellería do Medio Rural e do Mar mediante los proyectos PGIDIT-CIMA08/01, PGIDIT-CIMA09/01 y PGIDIT-CIMA12/03 y por el Ministerio de Ciencia e Innovación con los proyectos AGL2006-11809, AGL2009-11607 y AGL2011-30449-C02-01.*



## Agradecimientos

*En primer lugar quiero expresar mis más sinceros agradecimientos a la Dra. Elvira Abollo Rodríguez y al Dr. Antonio Villaba García, codirectores de esta tesis doctoral, por darme la oportunidad de realizar este trabajo de investigación. Gracias por vuestra total dedicación, por vuestro rigor científico, por todos los conocimientos que me habéis enseñado y por vuestra paciencia y buen humor. Siempre tendréis mi gratitud, cariño y admiración.*

*Al Dr. José Pintado Valverde del Instituto de Investigaciones Marinas (IIM-CSIC) por su generosidad y amabilidad en mi estancia en el laboratorio de Biología y fisiología larvaria de peces. A Patricia Ruíz, por su simpatía y por toda la ayuda recibida.*

*A la Dra. María Jesús Carballal, coautora de varios artículos de investigación de esta tesis, por colaborar siempre con una sonrisa.*

*Al Dr. José Fuentes y a su equipo: Juan Carlos, Vicki, Ramón y Rocío, por su inmenso trabajo en el criadero de moluscos y su inestimable ayuda en nuestras salidas a las bateas.*

*Al Dr. David Iglesias y a la Dra. Susana Darriba y a sus respectivos equipos, por estar siempre dispuestos a colaborar y por su ayuda mediante la aportación de material biológico para poder desarrollar este trabajo.*

*Al Dr. José Ignacio Navas, por sus sugerencias y colaboración en la parte estadística de uno de los artículos de esta tesis.*

*Agradecer a mis compañeras de laboratorio, Mar y Bea, todo el trabajo realizado para hacerme más llevadera la experimental de la tesis, por ser unas trabajadoras incansables y por su simpatía. Gracias especialmente a Laura, mi compañera de laboratorio durante 4 años, por ser capaz de aguantarme y por todos los momentos vividos.*

*Gracias a toda la gente del departamento de Patología por estar siempre dispuestos a echar una mano y por alegrarme estos años. Sois tantos los que habéis coincidido conmigo que espero no olvidarme de nadie. Gracias en especial a Raquel y a Ángel mis compis de viaje, por tantas confidencias y tantas horas de risas en el trabajo y en la carretera. Gracias a Bea Galván, Fátima, Sonia, Rocío, Ana "Ribeira", Paula, Lola y Lourdes por los buenos momentos. Lucía, gracias por tu locura y por ser una gran compañera. Y cómo no, gracias infinitas a Maribel (mi Mari Pili) y a Elena, por estar siempre dispuestas a facilitarnos la vida a todos los que pasamos por el laboratorio de Patología. Es imposible no cogeros cariño desde el primer día. Gracias por vuestra ayuda y por ser tan buenas personas.*

*Gracias a mis compañeras de despacho Nuria, Seila y Asun.*

*Gracias a mi compañero Sergio por tantos y tantos buenos momentos. Gracias por tu ayuda, tu buen humor, tus confidencias, tu comprensión...No podía haber tenido mejor suerte. Me llevo un gran amigo.*

*A mi amiga Natalia, por estar siempre a mi lado, en los buenos y malos momentos, por sus consejos y su cariño, y por aguantarme tantos y tantos años hablando de bichitos raros. Gracias a mis amigos: Javi Tamame, por su apoyo y esos cafés tan intelectuales; a Tita por compartir conmigo mis inicios en el mundo de la investigación y por su amistad; a super Anita de Salamanca, por estar cada día más cerca; a Merchy por su ayuda con el inglés; a mi prima Graci, por su amistad y por compartir tantas historias de laboratorio y, sobre todo, por su ayuda con la bibliografía. Gracias a todos vosotros y a los amigos que no nombro aquí, por vuestro cariño y por estar siempre que os necesito.*

*Gracias a las personas más importantes de mi vida, mi familia, los mejores. A mis hermanos Ana y Nando, a mi tío Javi, a mi madrina y, sobre todo, a mis padres porque con su esfuerzo han permitido que me dedique a lo que más me gusta. Gracias por vuestro apoyo y amor.*

*Gracias Javi, por tu apoyo incondicional, por tu amor, por tu paciencia y por estar en mi vida, en la que se acaba una etapa, pero empieza otra diferente a tu lado. Seguro que estupenda.*

*Dedico esta tesis a mi madrina, que estaría orgullosa de mí como yo lo estoy de ella. Te echo de menos.*



---

## Resumen

---

Los protozoos parásitos de los géneros *Bonamia*, *Perkinsus*, *Marteilia* y *Mikrocytos* son responsables de elevadas mortalidades en poblaciones de moluscos bivalvos a lo largo de todo el mundo, causando cuantiosas pérdidas económicas. Algunas de las especies de estos géneros están incluidas en la legislación europea como parásitos que requieren especial vigilancia y control y recogidas en la lista de enfermedades de declaración obligatoria de la Organización Mundial de la Sanidad Animal (OIE). El objetivo general de esta tesis doctoral fue desarrollar nuevas herramientas moleculares que permitan un control sanitario más eficaz de estas enfermedades. Para ello, se han desarrollado y validado ensayos de PCR convencional y PCR en tiempo real para el diagnóstico de *Bonamia ostreae* y *Bonamia exitiosa* con una elevada especificidad y sensibilidad, que podrían sustituir a los métodos actuales recomendados por la OIE. Además, se han desarrollado otros métodos de diagnóstico como la PCR *multiplex* para la detección simultánea de ambas especies (ensayo patentado), los primeros ensayos de hibridación *in situ* específicos para *B. exitiosa* y *Perkinsus mediterraneus* y un ensayo PCR-DGGE capaz de discriminar especies de *Perkinsus*. Estas herramientas moleculares han servido para realizar un estudio epidemiológico de la bonamiosis y perkinsosis en Galicia y de la perkinsosis en la costa mediterránea, aumentando la distribución geográfica y hospedadora de las especies *Perkinsus olseni*, *Perkinsus mediterraneus* y *Perkinsus chesapeakei*. Asimismo, se han identificado y caracterizado molecularmente dos parásitos emergentes en aguas gallegas: *Mikrocytos* sp. relacionado con un episodio de mortalidad elevada de almeja japonesa *Ruditapes philippinarum*, y *Marteilia cochillia*, una especie descrita recientemente parasitando el berberecho *Cerastoderma edule* y que ha causado el colapso de la pesquería de este molusco en la Ría de Arousa, principal zona productora de este bivalvo en Galicia.

**Palabras clave:** *Bonamia*, *Perkinsus*, *Marteilia*, *Mikrocytos*, PCR

---

## Resumo

---

Os protozoos parasitos dos xéneros *Bonamia*, *Perkinsus*, *Marteilia* e *Mikrocytos* son responsables de elevadas mortalidades en poboacións de moluscos bivalvos ao longo de todo o mundo, causando cuantiosas perdas económicas. Algunhas especies destes xéneros están incluídas na lexislación europea como parasitos que requiren especial vixilancia e control, e recollidas na lista de enfermidades de declaración obligatoria da Organización Mundial de Sanidade Animal (OIE). O obxectivo xeral desta tese de doutoramento foi desenvolver novas ferramentas moleculares que permitan un control sanitario máis eficaz destas enfermidades. Para isto, desenvolvéronse e validáronse ensaios de PCR convencional e PCR en tempo real para o diagnóstico de *Bonamia ostreae* e *Bonamia exitiosa*, cunha elevada especificidade e sensibilidade, que poderían substituír aos métodos actuais recomendados pola OIE. Ademais, desenvolvéronse outros métodos de diagnóstico como a PCR *multiplex* para a detección simultánea de ámbalas dúas especies (ensaio patentado), os primeiros ensaios de hibridación *in situ* específicos para *B. exitiosa* e *Perkinsus mediterraneus* e un ensaio PCR-DGGE capaz de discriminar especies de *Perkinsus*. Estas ferramentas moleculares serviron para realizar un estudo epidemiolóxico da bonamiose e perkinsose en Galicia e da perkinsose na costa mediterránea, aumentando a distribución xeográfica e hospedadora das especies *Perkinsus olseni*, *Perkinsus mediterraneus* e *Perkinsus chesapeakei*. Ademais, identificáronse e caracterizáronse molecularmente dous parasitos emerxentes en augas galegas: *Mikrocytos* sp., relacionado cun episodio de mortalidade elevada de ameixa xaponesa *Ruditapes philippinarum*, e *Marteilia cochillia*, unha especie descrita recentemente parasitando o berberecho *Cerastoderma edule* e que provocou o colapso da pesqueira deste molusco na Ría de Arousa, principal zona produtora deste bivalvo en Galicia.

**Palabras clave:** *Bonamia*, *Perkinsus*, *Marteilia*, *Mikrocytos*, PCR

---

## Abstract

---

The protozoan parasites belonging to the genus *Bonamia*, *Perkinsus*, *Marteilia* and *Mikrocytos* are responsible for high mortality in populations of bivalve molluscs worldwide, causing severe economic losses. Some species of these genera are included in the European animal health regulation among those to be kept under special surveillance and control and also included on the list of notifiable diseases of the World Organisation for Animal Health (OIE). The common objective of this thesis was to develop new molecular tools allowing a more exhaustive sanitary control of these diseases. For this, conventional PCR and real time PCR assays for the diagnosis of *Bonamia ostreae* and *Bonamia exitiosa* have been developed and validated. These assays show a high specificity and sensitivity and could replace the current methods recommended by the OIE. In addition, other diagnosis methods have been developed such as the PCR multiplex for the simultaneous detection of both species (patented), the first specific *in situ* hybridization assays for *B. exitiosa* and *Perkinsus mediterraneus* and a PCR-DGGE assay for the discrimination of species of *Perkinsus*. These molecular tools have been used to perform an epidemiological study of bonamiosis and perkinsosis in Galicia and of perkinsosis in the Mediterranean coast, increasing the geographic and host ranges of the species *Perkinsus olseni*, *Perkinsus mediterraneus* and *Perkinsus chesapeaki*. Additionally, two emerging parasites in Galician waters have been identified and characterized by molecular methods: *Mikrocytos* sp. related with an event of high mortalities of the Manila clam *Ruditapes philippinarum*, and *Marteilia cochillia*, a recently described species parasitizing the cockle *Cerastoderma edule*, which is responsible for the collapse of cockle fishery in the Ría de Arousa, the highest area of production of this bivalve in Galicia.

**Key words:** *Bonamia*, *Perkinsus*, *Marteilia*, *Mikrocytos*, PCR



# ÍNDICE

<b>INTRODUCCIÓN GENERAL.....</b>	<b>1</b>
1. Principales moluscos bivalvos producidos en Galicia: importancia socioeconómica.....	1
2. Principales problemas patológicos que afectan a los cultivos de moluscos bivalvos.....	6
<hr/>	
2.1. Bonamiosis	6
<hr/>	
2.1.1. Taxonomía .....	6
2.1.2. Epidemiología .....	8
2.1.2.1. Distribución geográfica y especies hospedadoras .....	8
2.1.2.2. Influencia de algunas características del hospedador en la parasitación.....	9
2.1.2.3. Influencia de factores ambientales en la parasitación.....	10
2.1.3. Ciclo de vida y transmisión.....	10
2.1.4. Interacción hospedador-parásito .....	12
2.1.5. Estrategias de lucha .....	13
<hr/>	
2.2. Perkinsosis	14
<hr/>	
2.2.1. Taxonomía .....	14
2.2.2. Epidemiología .....	15
2.2.2.1. Distribución geográfica y especies hospedadoras .....	15
2.2.2.2. Influencia de algunas características del hospedador en la parasitación.....	16
2.2.2.3. Influencia de factores ambientales en la parasitación.....	16
2.2.3. Ciclo de vida y transmisión.....	17
2.2.4. Interacción hospedador-parásito .....	19
2.2.5. Estrategias de lucha .....	22
<hr/>	
2.3. Marteliosis	23
<hr/>	
2.3.1. Taxonomía .....	23
2.3.2. Epidemiología .....	25
2.3.2.1. Distribución geográfica y especies hospedadoras .....	25
2.3.2.2. Influencia de algunas características del hospedador en la parasitación.....	26
2.3.2.3. Influencia de factores ambientales en la parasitación.....	26
2.3.3. Ciclo de vida y transmisión.....	27
2.3.4. Interacción hospedador-parásito .....	29
2.3.5. Estrategias de lucha .....	30

2.4. Mikrocytos	31
2.4.1. Taxonomía	31
2.4.2. Epidemiología	33
2.4.2.1. Distribución geográfica y especies hospedadoras	33
2.4.2.2. Influencia de algunas características del hospedador y de factores ambientales en la parasitación	33
2.4.3. Ciclo de vida y transmisión	34
2.4.4. Interacción hospedador-parásito	35
3. Principales técnicas diagnósticas de parásitos de moluscos	36
3.1. Técnicas moleculares	38
3.1.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	39
3.1.2. PCR-RFLPs (Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción)	40
3.1.3. PCR Multiplex	40
3.1.4. PCR en tiempo real	41
3.1.5. PCR-DGGE (Electroforesis en Gel con Gradiente Desnaturalizante)	42
3.1.6. Hibridación <i>in situ</i> (ISH)	43
3.1.7. Secuenciación masiva	44
3.2. Métodos moleculares para el diagnóstico de <i>Bonamia</i> , <i>Perkinsus</i> , <i>Marteilia</i> y <i>Mikrocytos</i>	45
3.2.1. Género <i>Bonamia</i>	45
3.2.2. Género <i>Perkinsus</i>	46
3.2.3. Género <i>Marteilia</i>	48
3.2.4. Género <i>Mikrocytos</i>	50
<b>JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS</b>	<b>55</b>
<b>SECCIÓN I: BONAMIOSIS</b>	
➤ Species-specific diagnostic assays for <i>Bonamia ostreae</i> and <i>B. exitiosa</i> in European flat oyster <i>Ostrea edulis</i> : conventional, real-time and PCR multiplex	59
➤ Species-specific oligonucleotide probe for detection of <i>Bonamia exitiosa</i> (Haplosporidia) using <i>in situ</i> hybridization assay	73
➤ Oyster parasites <i>Bonamia ostreae</i> and <i>B. exitiosa</i> co-occur in Galicia (NW Spain): spatial distribution and infections dynamics	85

## SECCIÓN II: PERKINSOSIS

- Update of information on perkinsosis in NW Mediterranean coast: Identification of the *Perkinsus* spp. (Protista) in new locations and host.....99
- *Perkinsus olseni* and *Perkinsus chesapeaki* detected in a survey of perkinsosis of various clam species in Galicia (NW Spain) using PCR-DGGE as a screening tool.....105

## SECCIÓN III: ENFERMEDADES EMERGENTES

- Cockle *Cerastoderma edule* fishery collapse in the Ría de Arousa (Galicia, NW Spain) associated with the protistan parasite *Marteilia cochillia*.....135
- Infection of Manila clams *Ruditapes philippinarum* from Galicia (NW Spain) with a *Mikrocytos*-like parasite.....161

**DISCUSIÓN GENERAL.....173**

**CONCLUSIONES.....181**

**BIBLIOGRAFÍA.....185**

**ABREVIATURAS.....231**

**ANEXO I:** Certificado-Título de patente de invención. Procedimiento para detectar e identificar *B. ostreae* y *B. exitiosa* en un único ensayo de reacción en cadena de la polimerasa.....235

**ANEXO II:** Listado de publicaciones incluidas y relacionadas con la tesis doctoral.....261





## **INTRODUCCIÓN GENERAL**



## INTRODUCCIÓN GENERAL

### 1. Principales moluscos bivalvos producidos en Galicia: importancia socioeconómica

Los moluscos constituyen una parte importante de la acuicultura mundial (23%), aumentando su volumen progresivamente, pasando de 6,3 millones de toneladas desembarcadas en 1991 a los 15,2 millones de toneladas en el año 2012. Asimismo, las capturas mundiales de moluscos provenientes de la pesquería alcanzaron en ese año los 6,9 millones de toneladas (FAO, 2015). En el conjunto de la Unión Europea, España es el primer productor, siendo Galicia la región más productiva del país con cerca del 96% de la producción total nacional (<http://www.magrama.gob.es>).

La costa gallega cuenta con un total de 278 arenasles y 70 millones de metros cuadrados de zona intermareal, que junto a las características geográficas y biotípicas de las rías, lo convierten en una región óptima para el crecimiento de moluscos bivalvos (Mahou, 2008). Estas condiciones han favorecido el desarrollo de una potente actividad en torno al marisqueo, definido legalmente como una modalidad específica de pesca, que ocupa a unas 8.500 personas, por lo que se considera una actividad socioeconómica de primer orden (<http://www.pescadegalicia.com>). Su faceta más sencilla y artesanal tiene como objeto la captura de moluscos en la costa arenosa y se hace a pie sin utilizar embarcación, lo que se denomina *marisqueo a pie*, proporcionando trabajo a casi 4.000 personas, en su mayoría mujeres. El *marisqueo a flote* tiene lugar en la zona sublitoral y se realiza empleando una embarcación pequeña y artes específicas, como varas, rastros o raños. Está actividad la desarrollan casi exclusivamente hombres. La mayoría de las especies extraídas son moluscos bivalvos, aunque también se incluyen dentro de esta actividad moluscos gasterópodos, equinodermos y crustáceos. En el año 2014, el valor económico de los bivalvos descargados en las lonjas gallegas superó los 53 millones de euros, correspondientes a las cerca de 6.000 t de producción subastada (<http://www.pescadegalicia.com>). El número de especies marisqueras con interés comercial en Galicia es elevado (21 especies diferentes), sin embargo, las que destacan por su producción e importancia económica son la almeja japonesa *Ruditapes philippinarum*, el berberecho *Cerastoderma edule*, la almeja fina *Ruditapes decussatus* y la almeja babosa *Venerupis corrugata* (Figuras 1 y 2) (<http://www.pescadegalicia.com>).

La almeja japonesa es una especie foránea procedente de las costas asiáticas e introducida en la costa pacífica de Norteamérica de forma accidental, con semilla de la ostra japonesa *Crassostrea gigas*. *R. philippinarum* también fue importada a Europa para paliar los efectos de la sobreexplotación de las especies de almeja autóctonas, principalmente de la almeja fina. Su buena adaptación al medio y su rápido crecimiento (Pérez Camacho y Cuña, 1985) la han convertido en el molusco más cultivado del mundo, alcanzando 3,8 millones de toneladas en el año 2012 con un valor comercial de 3.300 millones de euros (FAO, 2015).

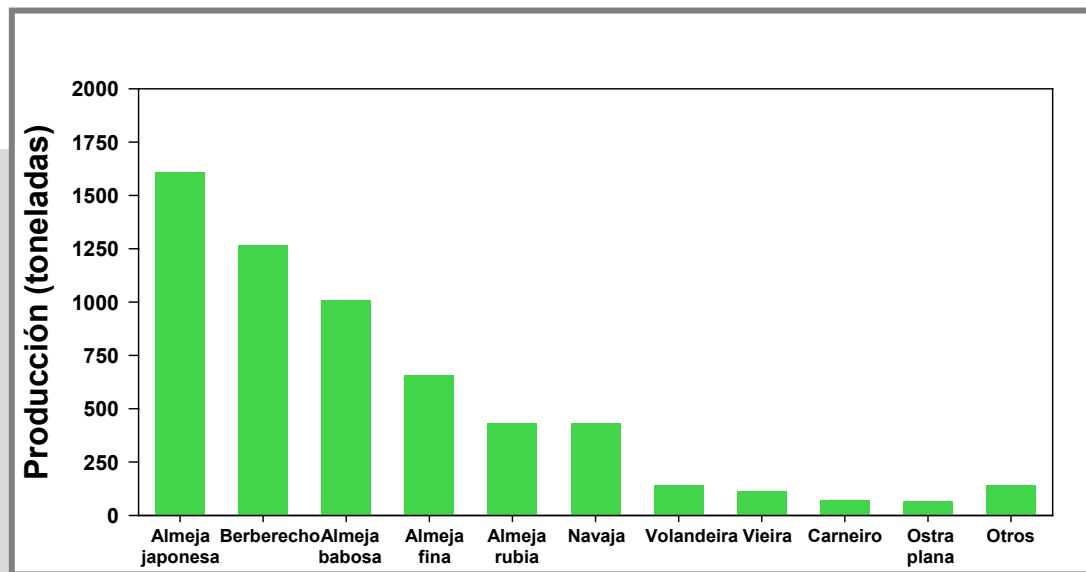


Figura 1. Producción de moluscos bivalvos en Galicia correspondiente a pesquería en el año 2014.

En Galicia, más de la mitad de almeja japonesa se obtiene del marisqueo y el resto proviene de su cultivo, mediante la introducción de almejas de otros países europeos, principalmente de Italia y en menor medida de Francia, así como de semilla producida en criaderos, posteriormente engordada en parques de cultivo. Entre el marisqueo y el cultivo, en el año 2014 se recogieron más de 2.955 t de almeja japonesa con un valor comercial de aproximadamente 19 millones de euros (<http://www.pescadegalicia.com>). La distribución geográfica de la almeja fina *R. decussatus* abarca el Mediterráneo, desde el estrecho de Gibraltar al canal de Suez, el mar Rojo y la costa oriental atlántica, desde Noruega hasta Senegal (Navas, 2008). La almeja babosa también se distribuye en países mediterráneos y desde Noruega hasta Marruecos, incluyendo el mar Báltico (Cerviño, 2011). La producción mundial de ambas especies dista mucho de la producción de almeja japonesa pues, según las estadísticas de la FAO, sólo se producen 4.000 t de almeja fina y 275 t de almeja babosa (FAO, 2015); parece claro que la información recogida en las bases de datos de la FAO no es exacta pues las ventas de almeja babosa en las lonjas gallegas superan ampliamente la producción mundial de esta especie según la FAO. En cualquier caso, el elevado valor de las almejas fina y babosa en el mercado sigue haciendo rentable su captura. Así, en el año 2014 en Galicia se capturaron por marisqueo (la fuente principal de estas especies) 657 t de almeja fina y 1.009 t de almeja babosa, cuyo valor en el mercado fue de 20,58 €/Kg y 13,30 €/Kg, respectivamente, frente a los 6,43 €/kg de almeja japonesa. Por tanto, las almejas fina y babosa aportan al sector mariscador más ingresos que *R. philippinarum* (Figura 2). Sin embargo en el ámbito de la acuicultura, la producción e ingresos correspondientes a la almeja japonesa superan a los de las almejas fina y babosa (Figuras 3 y 4) (<http://www.pescadegalicia.com>).

El berberecho *C. edule* se distribuye a lo largo de la costa atlántica europea y africana desde el Mar de Barents, al Norte de Noruega, hasta Marruecos. Los principales productores de esta especie, que alcanza las 7.000 t pescadas y las 1.800 t en acuicultura, son Reino Unido y Países Bajos (FAO, 2015). En Galicia, el berberecho tradicionalmente ha sido la especie más importante para el marisqueo en términos de biomasa. En el año 2011 se capturaron 3.314 t de berberechos con un valor en el mercado de 16 millones de euros. Sin embargo, a partir del año 2012 la cantidad de berberecho descendió drásticamente a la mitad, debido a la enfermedad de la marteliosis que provocó la muerte de más del 90% de ejemplares en la Ría de Arousa, una de las zonas más productivas de Galicia para esta especie. Según los datos aportados por la Xunta de Galicia para el año 2014, sólo se capturaron 1.200 t de berberecho con un valor comercial de 7,8 millones de euros. Existe también un reclutamiento natural de semilla de berberecho para trasladarla a zonas con menor densidad (reparqueo). Sin embargo, la producción de estos moluscos mediante cultivo de semilla supone un porcentaje mínimo con respecto a las capturas por marisqueo (<http://www.pescadegalicia.com>).

A pesar de que la producción de moluscos de bancos naturales tiene gran importancia, la gran demanda de bivalvos está provocando que algunas poblaciones naturales ya se encuentren al límite de su sostenibilidad o que éste ya se haya sobrepasado. Por ese motivo, la acuicultura se presenta como una opción imprescindible para atender la actual demanda de estos productos. En Galicia el cultivo del mejillón *Mytilus galloprovincialis* es claramente mayoritario, seguido de la almeja japonesa, la ostra plana *Ostrea edulis*, el berberecho, y la ostra rizada *C. gigas* (Figura 3).

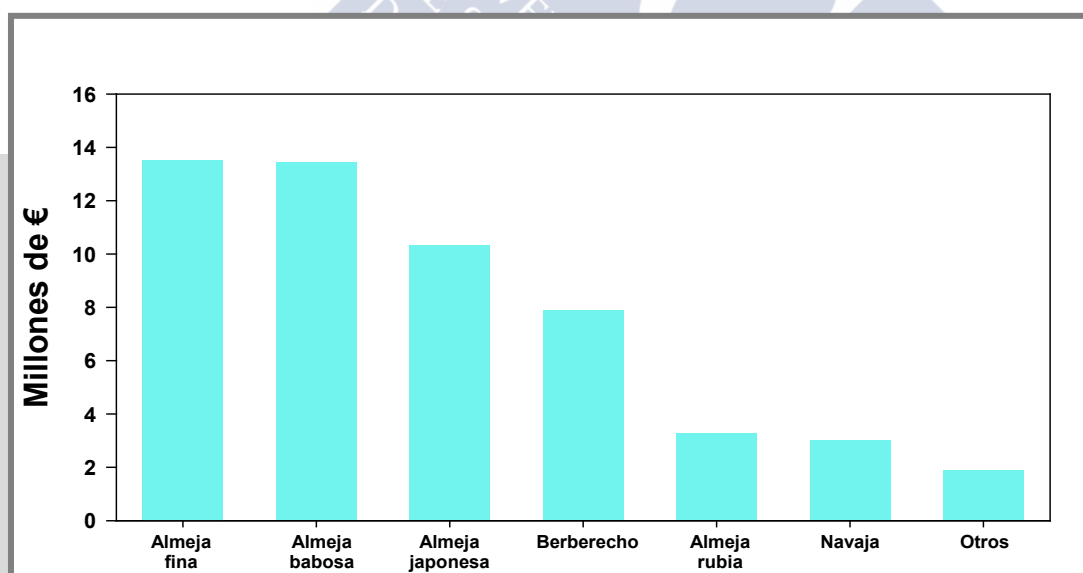


Figura 2. Valor económico de moluscos bivalvos de Galicia correspondientes a pesquería en el año 2014.

La acuicultura gallega del mejillón convierte a España en el principal país productor de la Unión Europea y el segundo a nivel mundial, después de China, con

cantidades que alcanzaron las 235.459 t en el año 2014 en nuestro país (<http://www.pescadegalicia.com>). *M. galloprovincialis* se distribuye por la costa atlántica desde Irlanda y Reino Unido hasta Marruecos, a lo largo de la costa norte mediterránea, por el Mar Negro, Sudáfrica y China. El sector mitilícola gallego facturó en primera venta en el año 2014 alrededor de 98 millones de euros. Sin embargo, a pesar de que el 99% de la producción acuícola gallega de bivalvos se basa en el mejillón, su bajo precio en el mercado, cercano a los 0,42 €/kg, hace que esta especie solo aporte el 84% del valor total de los moluscos cultivados. Otras especies con una producción muy inferior a la de *M. galloprovincialis*, pero con un precio en el mercado muy superior, son las almejas japonesa, fina y babosa y la ostra plana. El valor en euros de estas especies, durante el año 2014, se representa en la figura 4 (<http://www.pescadegalicia.com>).

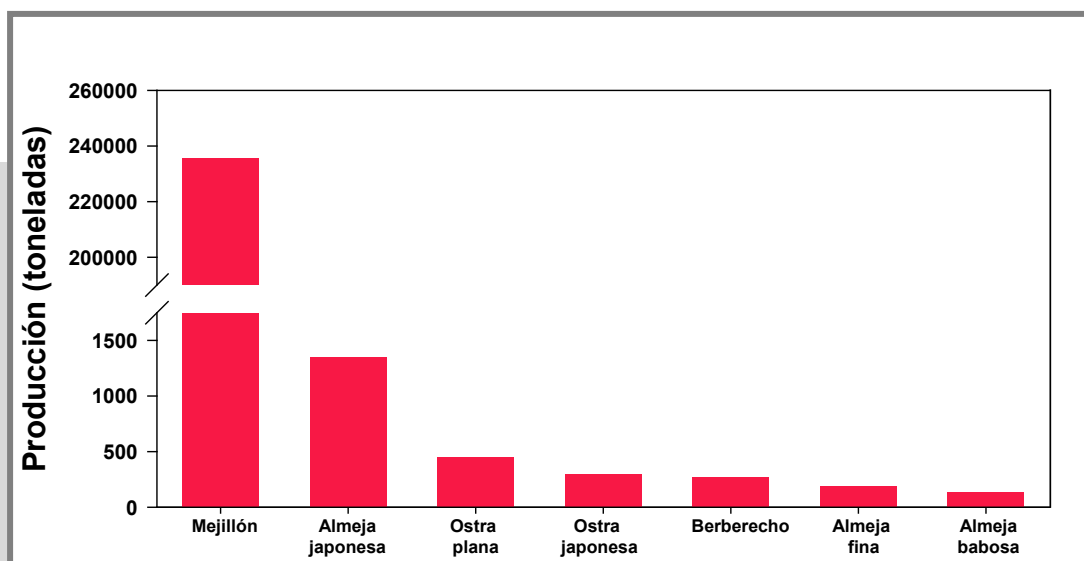


Figura 3. Producción de las principales especies de bivalvos de Galicia obtenidas mediante acuicultura en el año 2014.

*Ostrea edulis*, es una especie autóctona de Europa y Norte de África, distribuyéndose desde el Mar Negro hasta las costas de Noruega y alcanzando en su límite meridional Marruecos. En la actualidad la ostra plana cultivada en Europa representa menos del 1% de los cultivos ostrícolas mundiales pero su valor comercial es significativo, por lo que este cultivo sigue siendo importante en las áreas limitadas donde se desarrolla (FAO, 2015). España es uno de los principales productores de ostra plana del mundo y su cultivo se ubica principalmente en las rías gallegas. Esta especie de ostra fue el principal molusco recolectado en Galicia hasta la mitad del siglo pasado. Sin embargo, la sobreexplotación provocó la desaparición de prácticamente todos los bancos naturales de las Rías de Arousa, Vigo y Muros entre los años 50 y 60. Debido a esta sobreexplotación, comenzó la introducción de semilla importada de países europeos, principalmente de Francia (Andreu, 1968), para su engorde en las diferentes áreas de cultivo. Sin embargo, esta importación incontrolada de semilla de ostra provocó la entrada de dos parásitos protistas, *Marteilia refringens* y *Bonamia ostreae*, los cuales causaron elevadas

mortalidades en los años 70 y 80, respectivamente, frenando drásticamente el cultivo de ostra. Actualmente, el cultivo de ostra en Galicia se mantiene mediante la importación de ostras casi adultas de otros países y su inmersión en aguas gallegas durante unos meses, hasta alcanzar la talla comercial, dentro de cajas suspendidas en las bateas o pegadas con cemento a cuerdas que cuelgan de las bateas. Los datos aportados por la Xunta de Galicia indican una producción de 447 t de ostras cultivadas en 2014, frente a las 64 t recogidas en los bancos naturales (Figuras 1 y 3) (<http://www.pescadegalicia.com>). La disponibilidad de semilla de los bancos naturales es muy escasa y todavía no se han conseguido desarrollar protocolos fiables que permitan producir semilla en criaderos de forma exitosa.

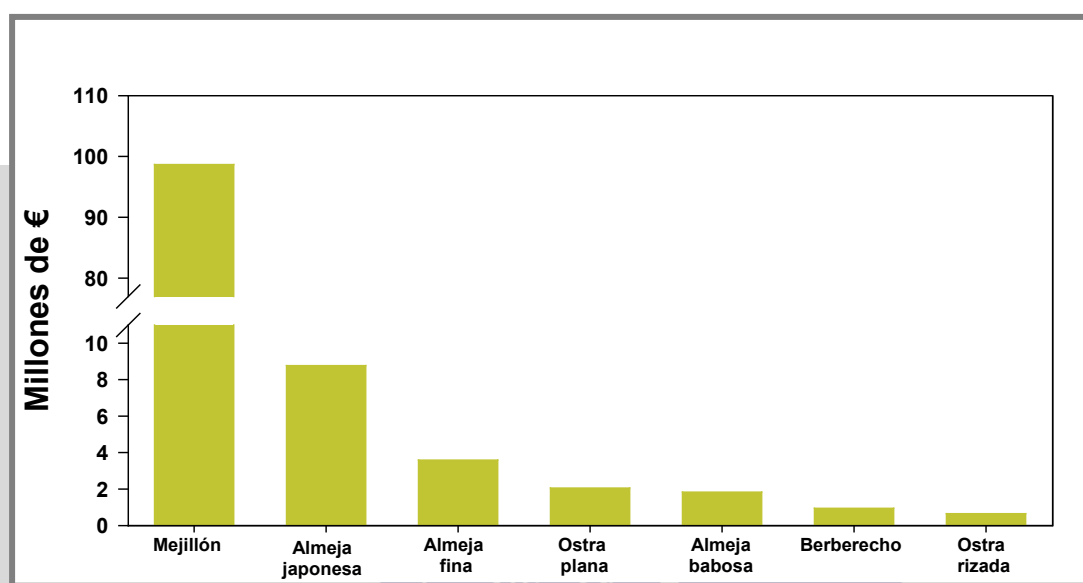


Figura 4. Valor económico de las principales especies de bivalvos de Galicia obtenidas mediante acuicultura en el año 2014.

La dramática reducción de la ostra plana debido a la marteiliosis y bonamiosis, intentó paliarse con la introducción experimental de la ostra japonesa *C. gigas*, especie que constituye más de un 90% de la producción ostrícola mundial. La ostra japonesa es el segundo molusco bivalvo más cultivado en el mundo tras la almeja japonesa, con 608.688 t producidas en 2012 y con un valor en el mercado que asciende a 1.200 millones de euros. Los principales países productores son China, Japón, Corea, Francia, Estados Unidos y Taiwan (FAO, 2015). En Galicia, gran parte de la producción de ostra japonesa se obtiene engordando en bateas semilla importada de otros países, como Francia. Su cultivo en 2014 supuso más de la mitad de la producción de ostra plana (301 t), pero su valor económico en el mercado es muy inferior (2,15 €/kg de ostra japonesa frente a los 4,60 €/kg de ostra plana) (Figuras 3 y 4) (<http://www.pescadegalicia.com>).

## 2. Principales problemas patológicos que afectan a los cultivos de moluscos bivalvos

El progresivo aumento de la producción acuícola en los últimos años, debido a la demanda de productos por la industria alimentaria, ha provocado la sobreexplotación de los bancos naturales de moluscos y ha limitado la fuente de stocks. Tanto la sobreexplotación como el aumento de demanda han provocado la expansión de la acuicultura de moluscos, con una progresiva intensificación, lo que se ha asociado a un creciente tráfico de individuos entre regiones y países para inmersión en zonas nuevas o incluso a la introducción de especies exóticas. Este conjunto de factores ha favorecido la aparición, desarrollo y dispersión de enfermedades, como fue el caso de la bonamiosis y marteiliosis que afectaron a la ostra plana en Europa en los años 70-80 (Alderman, 1979; Pichot *et al.*, 1980; van Banning, 1982; Friedman y Perkins, 1994), o más recientemente, la infección emergente causada por el virus herpes de ostreidos tipo 1 (OsHV-1) en la ostra rizada *C. gigas* (García *et al.*, 2011; Aranguren *et al.*, 2012; Lynch *et al.*, 2012; Peeler *et al.*, 2012; Abollo y Villalba, 2013). La dispersión de estas enfermedades supone una importante amenaza tanto para la acuicultura como para el sector marisquero, por lo que tiene serias repercusiones sociales y económicas. Los problemas patológicos asociados al cultivo de moluscos son numerosos y de etiología diversa. Esta tesis tiene como objeto de estudio cuatro enfermedades que han causado importantes mortalidades de moluscos en Galicia y en otras regiones del mundo: la bonamiosis, causada por parásitos del género *Bonamia*; la perkinsosis, cuyos agentes etiológicos pertenecen al género *Perkinsus*; la marteiliosis, causada por *Marteilia* spp. y la microcitosis, cuyos agentes infecciosos se incluyen en el género *Mikrocytos*. Algunas especies de estos géneros están incluidas en el Código Acuático de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) como enfermedades de declaración obligatoria, en concreto *Bonamia ostreae*, *Bonamia exitiosa*, *Perkinsus olseni*, *Perkinsus marinus* y *Marteilia refringens* (OIE, 2014). Además, la Directiva 2006/88/EC incluye las infecciones por *B. ostreae* y *M. refringens* en la lista de enfermedades no exóticas que requieren control y las debidas a *B. exitiosa*, *P. marinus* y *Mikrocytos mackini* en la de enfermedades exóticas. La condición de enfermedad exótica que se le confería a la infección por *B. exitiosa* en la Directiva del 2006 todavía no se ha cambiado oficialmente, a pesar del registro de la enfermedad en aguas de Galicia (Abollo *et al.*, 2008) y de citas posteriores en Italia (Narcisi *et al.*, 2010), Francia (Arzul *et al.*, 2011), Cataluña (Carrasco *et al.*, 2012a) y Reino Unido (Longshaw *et al.*, 2013).

---

### 2.1. Bonamiosis

---

#### 2.1.1. Taxonomía

El género *Bonamia* está incluido en el supergrupo SAR, Rhizaria, Cercozoa, Ascetosporea y Haplosporida, según la última clasificación de los eucariotas propuesta por Adl *et al.* (2012). En esta clasificación se incluyen dentro de los haplosporidos otros cuatro géneros parásitos o hiperparásitos de moluscos: *Urosporidium*, *Haplosporidium*, *Minchinia*

y *Mikrocytos*. Sin embargo, estudios posteriores sitúan el género *Mikrocytos* fuera de este grupo, como se describe más adelante. Antes de la inclusión del género *Bonamia*, el grupo de los haplosporídeos se caracterizaba porque sus especies presentaban dos estadios en su ciclo de vida: un estadio plasmodial, presente en los moluscos, y un estadio de espora que se supone que corresponde a una fase de latencia libre, aunque el ciclo completo de vida se desconoce. La ornamentación de estas esporas, cuyo tamaño varía entre 4 y 12  $\mu\text{m}$  de longitud, es usada con fines taxonómicos (Burrison, 2005) para asignar géneros e identificar especies. Por el contrario, los plasmodios son similares en todas las especies del grupo. Además, todas ellas cuentan con unos orgánulos comunes denominados haplosporosomas (Pichot *et al.*, 1980) (Figura 5).

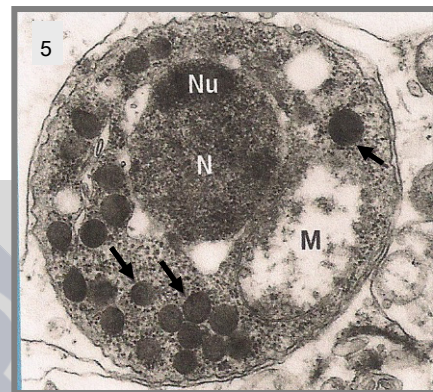


Figura 5. Micrografía de un corte ultrafino que muestra una microcélula uninucleada de *Bonamia ostreae*. M: mitocondria; N: núcleo; Nu: nucleolo; flechas: haplosporosomas.

Actualmente el género *Bonamia* incluye 4 especies: *B. ostreae*, *B. exitiosa*, *B. roughleyi* y *B. perspora*, aunque estudios filogenéticos recientes apuntan la posibilidad de que existan otras tres nuevas especies (Hill *et al.*, 2014) y la validez de *B. roughleyi* se ha puesto en duda, como se comentará más adelante. La primera especie descrita fue *B. ostreae* (Pichot *et al.*, 1980) y en ella se observaron los haplosporosomas característicos (no exclusivos) de los haplosporídeos, aunque en esta primera descripción sólo se registraron formas uninucleadas así como las binucleadas correspondientes a la división de las unicleadas, sin encontrar una fase plasmodial del parásito ni tampoco esporas. Posteriormente, se describieron estructuras plasmodiales, lo que reforzaba la inclusión de *B. ostreae* dentro del grupo Haplosporida (Brehélin *et al.*, 1982; Perkins, 1987, 1988). En dos especies descritas posteriormente, *B. exitiosa* (Hine *et al.*, 2001a) y *B. roughleyi* (Cochennec-Laureau *et al.*, 2003a), también se observaron haplosporosomas y formas plasmodiales, lo que unido al análisis de secuencias génicas (Carnegie *et al.*, 2003a, Cochennec-Laureau *et al.*, 2003a, Reece *et al.*, 2004, Lopez-Flores *et al.*, 2007a), apoyó la inclusión de estas dos especies en el género *Bonamia*, dentro de los Haplosporida. *B. roughleyi* fue descrita originalmente como *Mikrocytos roughleyi*, el agente causante de la enfermedad denominada “mortalidad de invierno” de la ostra *Saccostrea glomerata* de Australia (Farley *et al.*, 1988). Posteriormente, Cochennec-Laureau *et al.* (2003a) consideraron que este parásito pertenecía al género *Bonamia* en base a estudios moleculares y ultraestructurales. Sin embargo, recientemente se ha puesto en duda la identidad del parásito descrito como *B. roughleyi*, argumentando que tanto los estudios filogenéticos, morfológicos como ultraestructurales indican que se trataría de la especie *B.*

*exitiosa* (Hill *et al.*, 2010; Carnegie *et al.*, 2014; Hill *et al.*, 2014). Así, Carnegie *et al.* (2014) le asignan a *B. roughleyi* el estatus *nomen dubium*. Aunque esta última asignación parecía esclarecer la identidad de este parásito descrito en *S. glomerata*, se ha demostrado que *B. roughleyi* no es el causante de la mortalidad de invierno, debido a su baja prevalencia en ostras enfermas y, por tanto, no se trata del mismo parásito descrito por Farley *et al.* (1988) (Carnegie *et al.*, 2014). Por tanto, el parásito descrito inicialmente como *M. roughleyi* no se correspondería con ninguna especie del género *Bonamia*, sino con un parásito similar a *Haplosporidium costale*; según esto, no sería correcto el nombre *B. roughleyi* y el parásito del género *Bonamia* presente en *S. glomerata* debería denominarse *B. exitiosa*.

A pesar de la ausencia de esporas características del grupo en *B. ostreae*, *B. exitiosa* y *B. roughleyi*, la inclusión de este género en el grupo Haplosporida se confirmó mediante estudios de filogenia molecular (Reece *et al.*, 2004, Hartikainen *et al.*, 2014a). La descripción de la especie *B. perspora*, con esporas ornamentadas y portadoras de un opérculo característico de los haplosporidos, apoyó esta asignación. La ausencia de esporas en algunas especies de *Bonamia* podría deberse a que los parásitos de este género tienen un ciclo de vida complejo que aún no se conoce, en el cual podrían existir esporas como forma de resistencia, o podría tratarse de especies que en su desarrollo evolutivo las hayan perdido (Reece *et al.*, 2004; Burreson y Reece, 2006).

Los siguientes apartados de este capítulo, se centran en la revisión de diferentes aspectos de la epidemiología, diagnosis y efectos patológicos que causan *B. ostreae* y *B. exitiosa*, que son las especies que afectan actualmente al desarrollo socio-económico del sector ostrícola en Galicia.

## 2.1.2. Epidemiología

### 2.1.2.1. Distribución geográfica y especies hospedadoras

*B. ostreae* y *B. exitiosa* están ampliamente distribuidas a lo largo de todo el mundo, causando mortalidades masivas en poblaciones de ostras tanto en el hemisferio norte como sur. Los primeros registros de *B. ostreae* se produjeron en Norteamérica infectando la ostra plana *O. edulis* en la costa pacífica de EE. UU. (Katkansky *et al.*, 1969; Elston *et al.*, 1986; Friedman *et al.*, 1989), y en la costa atlántica (Friedman y Perkins, 1994; Zabaleta y Barber, 1996). Asimismo, *B. ostreae* se detectó en diferentes países europeos como España (Polanco *et al.*, 1984), Reino Unido (Hudson y Hill, 1991; Laing *et al.*, 2014), Holanda (van Banning, 1991), Irlanda (Culloty y Mulcahy, 2001), Italia (Narcisi *et al.*, 2010), Canadá (Marty *et al.*, 2006) y Marruecos (Belhsen *et al.*, 2008). Recientemente, se ha detectado *B. ostreae* en un nuevo hospedador, la ostra *Ostrea chilensis*, en Nueva Zelanda ([http://www.oie.int/wahis\\_2/public/wahid.php/Reviewreport/Review?page\\_refer=MapFullEventReport&reportid=17208](http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Reviewreport/Review?page_refer=MapFullEventReport&reportid=17208)). Existen indicios de que *B. ostreae* se introdujo de forma accidental en Europa mediante movimientos de ostras infectadas por el parásito desde California a Francia y España (Elston *et al.*, 1986, Cigarría y Elston, 1997), extendiéndose posteriormente a otros países europeos. Las importaciones masivas de ostras de Francia a finales de los años 70 y durante los 80 del siglo pasado contribuyeron a expandir *B.*

*ostreae* por toda la costa gallega, con un efecto devastador sobre el cultivo de la ostra plana en Galicia (Polanco *et al.*, 1984; Figueras, 1991; Montes y Lama, 1992).

Durante un tiempo se pensó que la distribución geográfica de *B. exitiosa* se limitaba al hemisferio sur, causando importantes mortalidades en la ostra *Ostrea chilensis* de Nueva Zelanda (Hine *et al.*, 2001a; Berthe y Hine, 2003) y *Ostrea angasi* de Australia (Corbeil *et al.*, 2006a). Se describieron numerosos registros de microcélulas *Bonamia* sp. tipo *exitiosa* parasitando *O. chilensis* de Chile (Kern, 1993; Campalans *et al.*, 2000) y *Ostrea puelchana* de Argentina (Kroeck y Montes, 2005; Oehrens-Kissner *et al.*, 2014). Sin embargo, el rango geográfico y hospedador de *B. exitiosa* mostró ser todavía más amplio, detectándose *B. exitiosa* y *Bonamia* sp. tipo *exitiosa* en los continentes del hemisferio norte: en la costa atlántica de EE. UU. infectando *Crassostrea ariakensis* y *Crassostrea virginica* (Burreson *et al.*, 2004, Dungan *et al.*, 2012), en la costa de California (EE. UU.) parasitando *O. edulis* (Hill *et al.*, 2010), así como en varios países europeos, detectándose por primera vez en España infectando *O. edulis* en Galicia (Abollo *et al.*, 2008) y posteriormente en Cataluña (Carrasco *et al.*, 2012a), Italia (Narcisi *et al.*, 2010), Francia (Arzul *et al.*, 2011) y Reino Unido (Longshaw *et al.*, 2013). *B. exitiosa* también se detectó parasitando *Ostrea stentina* en Túnez (Hill *et al.*, 2010). El Laboratorio de Referencia de la OIE para la bonamiosis ha identificado todos los registros de *Bonamia* sp. tipo *exitiosa* como *B. exitiosa* (López-Flores *et al.*, 2007a). Estudios filogenéticos posteriores también apoyan esta inclusión (Abollo *et al.*, 2008; Hill *et al.*, 2010, 2014; Carnegie *et al.*, 2014), aunque existen evidencias de que las especies de *Bonamia* que parasitan *O. chilensis* de Chile y *O. edulis* de California puedan ser dos nuevas especies del género *Bonamia* (Hill *et al.*, 2010, 2014). Se ha demostrado que la especie *B. roughleyi*, descrita originalmente como *Mikrocytos roughleyi*, el agente causante de la enfermedad denominada “mortalidad de invierno” de la ostra *S. glomerata* de Australia (Farley *et al.* 1988) y considerada en la actualidad como *B. exitiosa* (Abollo *et al.*, 2008; Hill *et al.*, 2010; Carnegie *et al.*, 2014; Spiers *et al.*, 2014), fue equívocamente identificada como el agente causante de la “enfermedad de invierno” ya que su prevalencia en ostras con esta enfermedad es escasa (Carnegie *et al.*, 2014; Engelsma *et al.*, 2014; Spiers *et al.*, 2014).

#### 2.1.2.2. Influencia de algunas características del hospedador en la parasitación

Varios estudios indican que las ostras adultas son más susceptibles a la enfermedad que las ostras jóvenes, por lo que la prevalencia e intensidad de la bonamiosis y la mortalidad de las ostras aumentan cuando éstas están próximas a alcanzar el tamaño comercial (Abollo y Villalba, 2011). Mc Ardle *et al.* (1991) y Culloy y Mulcay (1996) señalan que las primeras mortalidades de ostra se producen generalmente a los dos años de edad. Sin embargo, *B. ostreae* se detectó por histología a partir del primer año de edad (da Silva *et al.*, 2005), mientras que empleando técnicas moleculares, que son más sensibles, la infección se ha detectado en semilla de pequeño tamaño (Lynch *et al.*, 2005; Engelsma *et al.*, 2010) e incluso en larvas (Arzul *et al.*, 2011). Varios estudios han evidenciado la asociación entre bonamiosis y gametogénesis en la ostra, siendo las infecciones más intensas en hembras con gónadas maduras o en proceso de desove (Hine, 1991a; da Silva *et al.*, 2009).

### 2.1.2.3. Influencia de factores ambientales en la parasitación

La infección por *B. ostreae* y *B. exitiosa* se produce a lo largo de todo el año, aunque se han descrito patrones estacionales de prevalencia para cada una de ellas en áreas concretas. En el caso de *B. ostreae*, los valores de prevalencia mayores se dan en primavera y otoño (Grizel, 1985; Montes, 1990; Van Banning, 1991, Culloty y Mulcahy, 1996; da Silva *et al.*, 2005; Engelsma *et al.*, 2010). En cuanto a *B. exitiosa*, se encontraron picos de prevalencia entre enero y abril en *O. chilensis* (Hine, 1991b); una evidente estacionalidad con prevalencias más altas entre mayo y julio en *C. ariakensis* de EE. UU. (Carnegie *et al.*, 2008) y valores de prevalencia más altos entre marzo y mayo para *O. puelchana* de Argentina (Kroeck *et al.*, 2008). Todavía no se ha estudiado la dinámica temporal de *B. exitiosa* en *O. edulis* ni en *O. stentina*, por lo que no está claro si hay estacionalidad. Algunos estudios indican que las temperaturas altas favorecen el desarrollo de la enfermedad mientras que las bajas ralentizan su transmisión (Audemard *et al.*, 2008; Carnegie *et al.*, 2008). La salinidad también influye en la dinámica de *Bonamia*, encontrándose valores más altos de prevalencia cuando la salinidad es mayor de 30 g/l (Bishop *et al.*, 2006; Audemard *et al.*, 2008; Carnegie *et al.*, 2008; Arzul *et al.*, 2009).

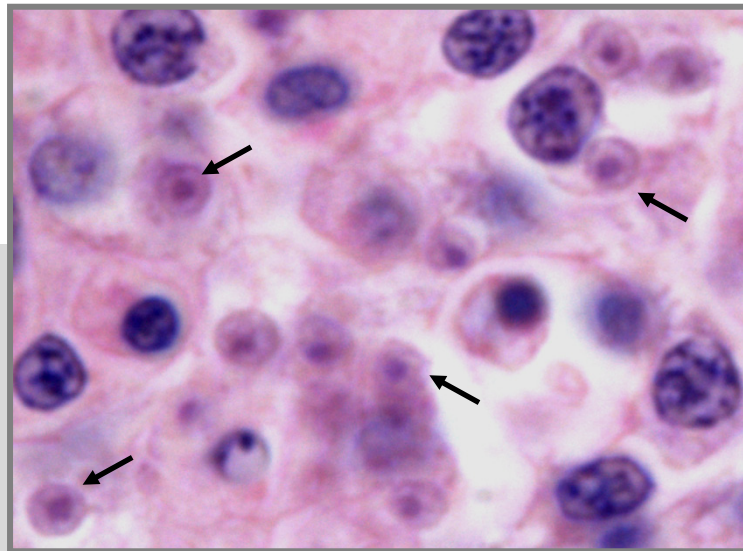
### 2.1.3. Ciclo de vida y transmisión

Los estadios del ciclo de vida de *B. ostreae* y *B. exitiosa* que se observan habitualmente en las ostras son células uni o binucleadas denominadas microcélulas y, menos frecuentemente, estadios plasmodiales. Las microcélulas uninucleadas tienen un diámetro de 1 a 2,5  $\mu\text{m}$  y presentan un núcleo periférico en el caso de *B. ostreae* (Figura 6) mientras que en *B. exitiosa* el diámetro es de 2 a 5  $\mu\text{m}$  con un núcleo central o subcentral (Abollo *et al.*, 2008) (Figura 7).



Figura 6. Corte histológico de *Ostrea edulis* con numerosas células de *Bonamia ostreae* (flechas) en las que se observa la posición periférica de su núcleo.

Figura 7. Corte histológico de *Ostrea edulis* con numerosas células de *Bonamia exitiosa* (flechas) en las que se observa la posición central de su núcleo.



El papel que juega cada estadio en el ciclo de vida de *Bonamia* no está todavía claro. Las formas uninucleadas de *B. ostreae* y *B. exitiosa* se observan al microscopio electrónico como formas densas a los electrones, con un núcleo pequeño y condensado, o bien como formas claras. Algunos estudios sugieren que las formas densas constituyen el estadio infeccioso, mientras que las claras aparecerían en infecciones leves (Pichot *et al.*, 1980; Hine, 1991a). Sin embargo, esta hipótesis no se ha confirmado. Las formas binucleadas representan microcélulas en división celular, mientras que la función de los plasmodios multinucleados también es desconocida, aunque algunos autores sugieren que esta fase corresponde a la explosión proliferativa del parásito que conduce a la muerte del hospedador (Brehélin *et al.*, 1982). Se ha constatado la transmisión experimental de *B. ostreae* por cohabitación de ostras no infectadas con ostras infectadas y por inoculación del parásito a ostras no infectadas (Elston *et al.*, 1987; Mialhe *et al.*, 1988; Hervio *et al.*, 1995; Culloty *et al.*, 1999), lo que evidencia la posibilidad de transmisión directa del parásito de ostras enfermas a ostras sanas en el medio natural. Se cree que *B. exitiosa* se transmite del mismo modo en bancos de ostra (Hine, 1996; Cranfield *et al.*, 2005; Corbeil *et al.*, 2006a), habiéndose comprobado su transmisión de ostras *C. ariakensis* infectadas a ostras no infectadas, mediante experimentos de cohabitación (Audemard *et al.*, 2014) en el medio natural. El parásito se introduce en la ostra a través del agua filtrada (Bucke, 1988; Montes *et al.*, 1994), pasando al epitelio branquial donde es fagocitado por los hemocitos (Montes *et al.*, 1994). Dentro de estas células, el parásito se multiplica por fisión binaria y llega a provocar la ruptura del hemocito, de forma que los parásitos liberados pueden ser fagocitados por nuevos hemocitos. Los parásitos, bien libres bien en el interior de los hemocitos, abandonan el hospedador a través de las heces o por diapédesis de los hemocitos infectados (Abollo y Villalba, 2011). Asimismo, Arzul *et al.* (2011) detectaron *B. ostreae* y *B. exitiosa* en larvas, lo que sugiere una hipotética “transmisión vertical” *sui generis* durante el período de incubación larvaria. Las larvas infectadas, durante su fase planctónica, podrían contribuir también a la dispersión del parásito.

A pesar de que todo apunta a la transmisión directa de *B. ostreae* y *B. exitiosa*, de ostra a ostra, no se puede descartar que haya fases no conocidas en su ciclo de vida, pues se han identificado otros hospedadores posibles (Lynch *et al.*, 2007; Hartikainen *et al.*, 2014a) y, además, el hallazgo de una especie del género *Bonamia* que produce esporas (*B. perspora*), permite hipotetizar la existencia de fase esporal en el ciclo de las otras especies del género aunque no se hayan encontrado. Se han realizado numerosos estudios de transmisión con el objetivo de determinar si otros moluscos, como *Mytilus edulis*, *M. galloprovincialis*, *R. decussatus*, *R. philippinarum* o *C. edule*, juegan algún papel en el ciclo del parásito (Van Banning, 1987; Figueras y Robledo, 1994; Renault *et al.*, 1995; Culloty *et al.*, 1999). Sin embargo, estos moluscos no se infectaron experimentalmente. En el caso de la ostra japonesa *C. gigas*, se han encontrado indicios de que puede actuar como reservorio tanto de *B. exitiosa* como de *B. ostreae* (Lynch *et al.*, 2010).

#### **2.1.4. Interacción hospedador-parásito**

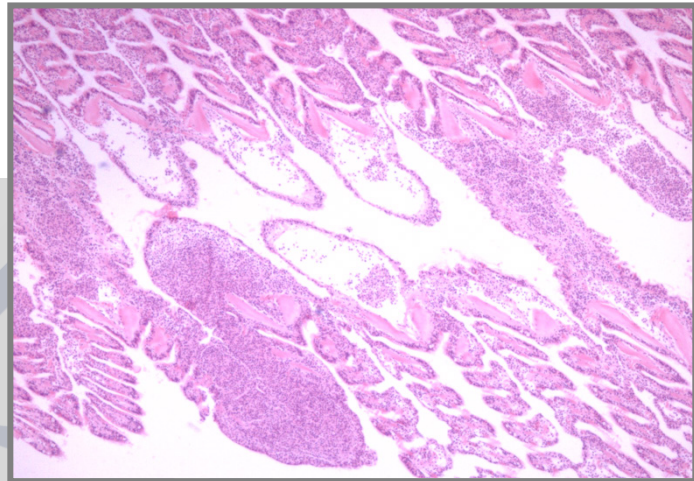
La aparición de *B. ostreae* en Europa a finales de los años 70 provocó mortalidades muy altas en las poblaciones y cultivos de ostra plana en diferentes países europeos (Pichot *et al.*, 1980; Polanco *et al.*, 1984; Hudson y Hill, 1991; van Banning, 1991; Culloty y Mulcahy, 2001). Por este motivo, la producción de *O. edulis* en el continente descendió drásticamente de 29.595 t en el año 1961 a 5.921 t en el año 2000 (FAO, 2004). *B. exitiosa* también causó mortalidades masivas en poblaciones de *O. chilensis* en Nueva Zelanda. En 1985 se confirmó un brote epidémico con mortalidades elevadas de ostra que duraron hasta 1995, provocando incluso el cierre de la pesquería (Doonan *et al.*, 1994; Cranfield *et al.*, 2005). Un segundo brote epidémico se produjo entre los años 2000-2006 con mortalidades que alcanzaron el 72% de la población (Anonymous, 2006).

En Galicia, se ha descrito que *B. ostreae* afecta al crecimiento e índice de condición de las ostras (Montes y Meléndez, 1987; Montes *et al.*, 1991). Los signos macroscópicos de la infección producida por *Bonamia* son hendiduras en el borde de las láminas branquiales, perforaciones branquiales y, en algunas ocasiones, decoloración amarilla y lesiones en el tejido conjuntivo de branquias, manto y glándula digestiva (Dinamani *et al.*, 1987; Tigé *et al.*, 1980; Grizel *et al.*, 1988; Mc Ardle *et al.*, 1991). Estas lesiones son producidas por una reacción inflamatoria muy intensa, con infiltración hemocitaria del tejido conjuntivo e incluso epitelios de los órganos afectados, que llega a causar la pérdida de la arquitectura normal de estos órganos y la oclusión del sistema circulatorio (Figura 8).

Se ha observado que *B. ostreae* aparece más frecuentemente y se multiplica más eficientemente dentro de los hialinocitos que de los granulocitos (tipos hemocitarios), ya que aquéllos carecen de lisosomas (Cochennec-Laureau *et al.*, 2003b; da Silva *et al.*, 2008). Varios estudios han mostrado que el parásito es capaz de modular la respuesta inmune del hospedador para aumentar el número de hemocitos más susceptibles y disminuir la producción de radicales tóxicos de oxígeno (ROS), que poseen actividad antimicrobiana (Morga *et al.*, 2009; Comesaña *et al.*, 2012), modificar los niveles de determinadas actividades enzimáticas de la hemolinfa (Xue y Renault, 2000; da Silva *et al.*, 2008; Morga *et al.*, 2009) y de otras proteínas (Cao *et al.*, 2009; De la Ballina *et al.*, 2013).

Recientemente, estudios genómicos han descrito una expresión diferencial de genes implicados en diferentes procesos biológicos entre ostras infectadas y sanas (Martín-Gómez *et al.*, 2012, 2014a; Morga *et al.*, 2011a, b, 2012). Martín-Gómez *et al.* (2014b) describieron 19 microARNs (ARN con capacidad de regular la expresión de otros genes), específicos de ostras infectadas con *Bonamia*; también el empleo de microarrays ha mostrado genes implicados en la respuesta inmune frente a *Bonamia* (Pardo *et al.*, 2013).

Figura 8. Corte histológico de *Ostrea edulis* en el que se observa la reacción inflamatoria producida frente *Bonamia ostreae* en las branquias de la ostra.



### 2.1.5. Estrategias de lucha

Según el Manual Diagnóstico para Animales Acuáticos publicado por la OIE (2012a, b), los mecanismos de prevención y control de la bonamiosis se basan en la selección genética de estirpes de ostra resistentes a la enfermedad y en prácticas generales de manejo del cultivo. Las medidas terapéuticas como la vacunación, inmuno-estimulación o tratamientos químicos no se aplican en acuicultura de moluscos bivalvos que se desarrollan en el medio natural. Cuando la enfermedad se ha establecido en una zona determinada, se deben implementar medidas encaminadas a disminuir la incidencia y la gravedad de la enfermedad, como modificaciones en la gestión de las pesquerías o en los procedimientos de cultivo. Sabiendo que la mortalidad máxima de las ostras en zonas con *Bonamia* se alcanza en el último verano de engorde, poco antes de que alcancen el tamaño comercial, Montes *et al.* (2003) propusieron modificaciones en el procedimiento del cultivo, tratando de acelerar el ritmo de crecimiento de las ostras. La producción de estirpes resistentes a la bonamiosis es otra de las medidas llevadas a cabo para mitigar los daños producidos por la enfermedad. En Irlanda, un programa desarrollado por una empresa desde los años 80 del siglo pasado ha conseguido aumentar la supervivencia de las ostras en presencia de la enfermedad de forma significativa y satisfactoria (Culloty *et al.*, 2001, 2004; Lynch *et al.*, 2014), mientras que en Francia (Martin *et al.*, 1993; Baud *et al.*, 1997; Naciri-Graven *et al.*, 1998, 1999; Lallias *et al.*, 2008) y en España, concretamente en Galicia (da Silva *et al.*, 2005; Villalba *et al.*, 2007), se han desarrollado programas experimentales con resultados prometedores.

---

## 2.2. Perkinsosis

---

### 2.2.1. Taxonomía

La posición taxonómica del género *Perkinsus* es controvertida desde su descubrimiento. La primera especie descrita, *P. marinus*, se consideró inicialmente un hongo que se denominó *Dermocystidium marinum* (Mackin *et al.*, 1950). Posteriormente, estudios morfológicos y estructurales incluyeron a *P. marinus* en diferentes filos como Ascomycetes, Entomoftorales, Saprolegniales, Haplosporidia y finalmente Laberintúlidos (Mackin, 1951; Sprague, 1954; Mackin y Boswell, 1956; Mackin, 1962; Mackin y Ray, 1966). Tras estas clasificaciones, Levine (1978) creó el género *Perkinsus* y lo incluyó en el filo Apicomplexa, basándose en la ultraestructura de la zoospora de este parásito (Perkins, 1976a). Sin embargo, ya en los años 90 los análisis moleculares basados en la región del ADN que codifica la subunidad pequeña ribosómica y en el gen de la actina sugirieron que el género *Perkinsus* estaba más próximo a los dinoflagelados que a los Apicomplexa (Fong *et al.*, 1993; Goggin y Barker, 1993; Siddal *et al.*, 1997). Cavalier-Smith y Chao (2004) incluyen el género *Perkinsus* en el filo Myzozoa, como un linaje muy próximo evolutivamente a los dinoflagelados, y lo clasifican dentro del orden Perkinsida, clase Perkinsea. La reciente caracterización de genes codificantes de diversas proteínas y el estudio de genes implicados en el ciclo celular, apoyan la hipótesis de que este género constituye un clado próximo al linaje de los dinoflagelados (Saldarriaga *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2011; Bachvaroff *et al.*, 2011, 2014). Adl *et al.* (2012), en una nueva revisión de los Protistas, proponen la posición taxonómica siguiente: Eukarya: Alveolata: Protoalveolata: Perkinsidae.

A pesar de que se han descrito 10 especies de *Perkinsus*, actualmente solo 7 se consideran válidas: *P. marinus* (Mackin *et al.*, 1950), *P. olseni* (= *P. atlanticus*) (Lester y Davis, 1981), *P. qugwadi* (Blackbourn *et al.*, 1998), *P. chesapeakei* (= *P. andrewsi*) (McLaughlin *et al.*, 2000), *P. mediterraneus* (Casas *et al.*, 2004), *P. honshuensis* (Dungan y Reece, 2006) y *P. beihaiensis* (Moss *et al.*, 2008). La especie *P. karlssoni* descrita como parásito del pectínido *Argopecten irradians* de Canadá (McGladdery *et al.*, 1991), no se considera actualmente válida pues se demostró que varios de los estadios descritos correspondían a parásitos diferentes (Goggin *et al.*, 1996).

La caracterización de las especies de *Perkinsus* se llevó a cabo, en un principio, basándose en la morfología del zoosporangio y de la hipnoespora, el rango hospedador y la distribución geográfica. Sin embargo, debido al gran número de hospedadores y a la amplia distribución geográfica que tienen algunas especies de *Perkinsus*, estos criterios no se consideran suficientes hoy en día para distinguir especies. Actualmente el criterio más importante usado para discriminar entre especies de este género es el análisis de secuencias de ADN de varios loci, principalmente el estudio de diferentes regiones del complejo génico del ADN que codifica el ARN ribosómico (subunidad grande LSU, espaciadores transcritos internos ITS1 e ITS2, espaciador no transcrito NTS) y genes de actina (tipo I y tipo II) (Villalba *et al.*, 2004; Moss *et al.*, 2008). Los siguientes apartados de

este capítulo se centran en las especies *P. olseni*, *P. mediterraneus* y *P. chesapeaki*, que son las especies objeto del estudio recogido en esta memoria.

## 2.2.2. Epidemiología

### 2.2.2.1. Distribución geográfica y especies hospedadoras

El rango geográfico de las especies de *Perkinsus* así como sus especies hospedadoras es muy amplio. *P. olseni* es la especie más cosmopolita del género, registrándose en diferentes países de Oceanía, América, Europa, Asia y África. *P. olseni* se encontró en orejas de mar *Haliotis ruber* y *Haliotis laevigata*, *Haliotis scalaris* y *Haliotis cyclobates* de Australia (Lester y Davis, 1981; O'Donoghue *et al.*, 1991; Goggin y Lester, 1995); en almejas *R. decussatus* y *R. philippinarum* de países europeos como Francia, Portugal, España, Italia (Azevedo, 1989; Figueras *et al.*, 1992; Sagristà *et al.*, 1996; De la Herrán *et al.*, 2000; Robledo *et al.*, 2000; Abollo *et al.*, 2006; Elandaloussi *et al.*, 2009; Balseiro *et al.*, 2010; Arzul *et al.*, 2012; Pretto *et al.*, 2014), en almejas finas de Túnez (El Bour *et al.*, 2012) y en almejas japonesas de la costa pacífica de Japón, Corea del Sur y China (Choi y Park, 1997; Hamaguchi *et al.*, 1998; Maeno *et al.*, 1999; Park *et al.*, 1999; Park y Choi, 2001; Choi *et al.*, 2002; Park *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 2011). También se ha registrado la presencia de *P. olseni* en otras especies de almejas menos comerciales como *Paphia undulata* de Tailandia (Leethochavalit *et al.*, 2004), *Pitar rostrata* de Uruguay (Cremonte *et al.*, 2005), *Protothaca jedoensis* de Corea (Park *et al.*, 2006a), *Tridacna crocea* de Vietnam (Sheppard *et al.*, 2008), *Austrovenus stutchburyi* de Nueva Zelanda (Dungan *et al.*, 2007) o *Anadara trapezia* de Australia (Dang *et al.*, 2015), así como en las ostras perlíferas *Pinctada maxima* de Australia (Norton *et al.*, 1993) y *Pinctada fucata* de la India (Sanil *et al.*, 2010) y de las ostras comestibles *Crassostrea ariakensis* de Japón y China, *Crassostrea hongkongensis* de China (Moss *et al.*, 2007) y *Crassostrea gasar* y *Crassostrea rhizophorae* de Brasil (da Silva *et al.*, 2014). Desde finales de los 80 se ha detectado *P. olseni* en Galicia, infectando las almejas *R. decussatus*, *R. philippinarum*, *V. corrugata* y *Polititapes rhomboides* (Figueras *et al.*, 1992, Casas *et al.*, 2002; Robledo *et al.*, 2000; Villalba *et al.*, 2005; Balseiro *et al.*, 2010).

La especie *P. chesapeaki* es endémica del noreste de América y se ha descrito en las almejas *Mya arenaria* (McLaughlin *et al.*, 2000; Dungan *et al.*, 2002; Burreson *et al.*, 2005; Reece *et al.*, 2008), *Macoma balthica* (Coss *et al.*, 2001a; Burreson *et al.*, 2005; Reece *et al.*, 2008), *Mercenaria mercenaria* (Coss *et al.*, 2001a; Pecher *et al.*, 2008), *Macoma mitchelli* (Coss *et al.*, 2001a), *Tagelus plebeius* (Dungan *et al.*, 2002; Bushek *et al.*, 2008; Reece *et al.*, 2008), *Mulinia lateralis*, *Rangia cuneata* y *Cyrtopleura costata* (Reece *et al.*, 2008). A pesar de que *P. chesapeaki* principalmente infecta almejas, también se ha detectado parasitando las ostras *C. virginica* de Maine, Massachusetts y las bahías de Chesapeake y Delaware en EE. UU. (Pecher *et al.*, 2008; Reece *et al.*, 2008; Marquis *et al.*, 2015). Sin embargo, el rango geográfico de esta especie es mayor del que se creía hasta hace poco, ya que recientemente se ha detectado la presencia de *P. chesapeaki* en Europa, concretamente en Francia (Arzul *et al.*, 2012), infectando las almejas *R. decussatus* y *R. philippinarum*, y en España, infectando el berberecho *C. edule* (Carrasco *et al.*, 2014), así como en Australia, infectando la almeja *Anadara trapezia* (Dang *et al.*, 2015).

*P. mediterraneus* presenta una distribución geográfica y rango hospedador mucho más limitado que las especies anteriores. Sólo se ha detectado en el mar Mediterráneo, infectando la ostra plana *O. edulis* (Casas *et al.*, 2004) y la almeja *Chamelea gallina* (Moss *et al.*, 2008) y recientemente se ha encontrado en el arca *Arca noae* y la zamburiña *Mimachlamys varia* (= *Chlamys varia*) (Valencia *et al.*, 2014). El esfuerzo investigador en torno a la perkinsosis hace que el número de especies de *Perkinsus*, su rango geográfico y la lista de especies hospedadoras crezcan, lo que evidencia la necesidad de disponer de técnicas de detección sensibles que permitan un diagnóstico específico a nivel de especie.

#### 2.2.2.2. Influencia de algunas características del hospedador en la parasitación

La edad del molusco juega un papel importante a la hora de adquirir la enfermedad de la perkinsosis. Las ostras y almejas adultas presentan niveles mayores de prevalencia de *Perkinsus* debido a una tasa mayor de filtración y una exposición al parásito más prolongada. Así, se ha detectado una prevalencia mayor de *P. olseni* en almejas *R. decussatus* de más de tres años en un banco natural de Galicia, mientras que no se detectó el parásito en las menores de un año (Villalba *et al.*, 2005). Otros factores que favorecen la progresión de *Perkinsus* son un mal estado nutricional del hospedador o la debilidad del mismo tras la puesta (Hofmann *et al.*, 1995; Powell *et al.*, 1996).

#### 2.2.2.3. Influencia de factores ambientales en la parasitación

La dinámica de infección de la perkinsosis está influenciada fundamentalmente por factores ambientales. Los estudios epidemiológicos llevados a cabo hasta el momento se basaron principalmente en *P. marinus* y, en menor medida, en *P. olseni*. En el caso de *P. olseni* se observó un patrón estacional relacionado con la temperatura. Villalba *et al.* (2005) observaron que la infección por *P. olseni* en un banco de almeja fina de Galicia mostraba un pico de intensidad cuando la temperatura alcanzaba los 15°C. La intensidad alta se mantiene desde la primavera hasta final de verano, cuando se alcanzan temperaturas de 19-21°C y se producen las tasas de mortalidad mayores de las almejas. Con el descenso de temperatura, desciende la intensidad de infección, comenzando un nuevo ciclo en la primavera siguiente. Por tanto, años con invierno e inicio de primavera poco fríos son más proclives a tener una intensidad y prevalencia elevadas de la perkinsosis y a sufrir mortalidades importantes de ostras o almejas (Liang *et al.*, 2008). Estos autores también constataron que la salinidad tiene una gran influencia en la dinámica de infección de la almeja japonesa *R. philippinarum* por *P. olseni*. Otros experimentos *in vitro* han confirmado que la temperatura y la salinidad influyen en la actividad celular y viabilidad de *P. marinus* y *P. olseni* (Chu y Greene, 1989; Burreson *et al.*, 1994; Auzoux-Bordenave *et al.*, 1995; O'Farrell *et al.*, 2000; Ahn y Kim, 2001; Casas *et al.*, 2002; La Peyre *et al.*, 2006, 2008). Estos experimentos demostraron que la tasa de proliferación de *P. marinus* y *P. olseni* fue mayor a 28°C que a 15°C, pero a esta última temperatura la tasa de *P. olseni* fue mayor a la de *P. marinus*, lo que concuerda con los resultados obtenidos en el campo.

Otros factores ambientales que influyen en la dinámica de infección de *Perkinsus* son factores estresantes como los contaminantes del agua, métodos agresivos de extracción de los moluscos o zonas muy afectadas por la actividad humana (Chu y Hale, 1994; Anderson *et al.*, 1996; Leite *et al.*, 2004). La contaminación, la hipoxia y la infección por *P. olseni* han sido las responsables de altas mortalidades de almeja fina *R. decussatus* en el Algarve (Portugal) (Azevedo, 1989; Bebianno, 1995; Sobral y Widdows, 1997).

### 2.2.3. Ciclo de vida y transmisión

El ciclo de vida de *Perkinsus* no se conoce en su totalidad, pero se sabe que es directo y no necesita hospedadores intermediarios para completarse (Ray, 1954; Goggin y Lester, 1995; Chu, 1996; Blackbourn *et al.*, 1998). Se han descrito tres estadios: trofozoíto, hipnoespora y zoospora. El trofozoíto corresponde a la fase de multiplicación vegetativa que tiene lugar en los tejidos del hospedador (Figura 9).

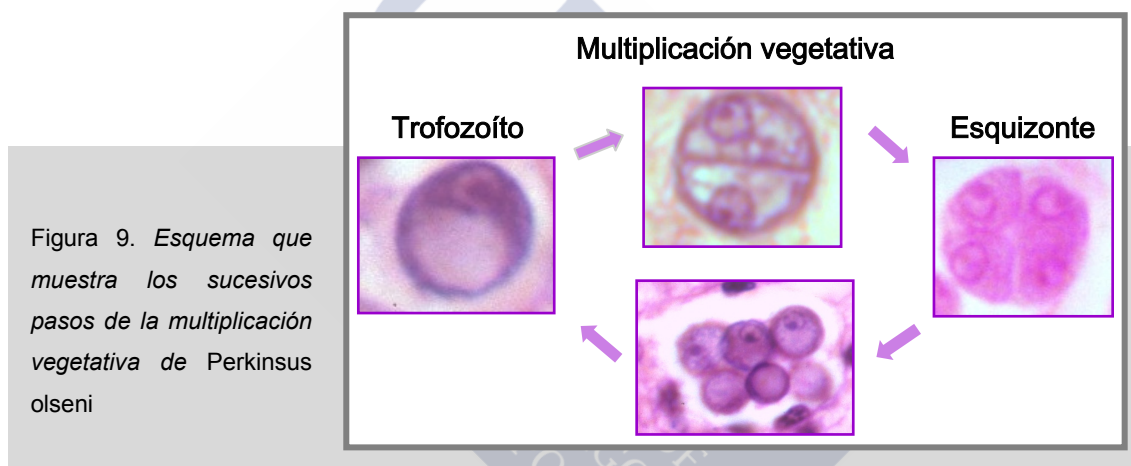


Figura 9. Esquema que muestra los sucesivos pasos de la multiplicación vegetativa de *Perkinsus olseni*

Estas células tienen forma esférica u ovoide, con una gran vacuola que ocupa buena parte de su volumen y un núcleo en posición periférica con un nucleolo patente. El tamaño del trofozoíto varía, según la especie, en un rango de 5-15  $\mu\text{m}$ . Los trofozoítos se multiplican por divisiones binarias sucesivas y las células hijas (de 2 a 64 permanecen durante un tiempo juntas dentro de la pared de la célula madre, formando una estructura con forma de roseta (esquizonte), hasta que la pared se rompe y se liberan las células hijas denominadas trofozoítos inmaduros.

Estos trofozoítos inmaduros aumentan de tamaño y desarrollan la gran vacuola, convirtiéndose en trofozoítos maduros (Goggin y Lester, 1995; Perkins, 1996; Blackbourn *et al.*, 1998) que pueden liberarse del molusco vivo a través de las heces o por diapédesis (Scanlon *et al.*, 1997; Bushek *et al.*, 2002; Allam *et al.*, 2013; Park *et al.*, 2013) y también debido a la muerte del hospedador (Ragone-Calvo *et al.*, 2003a).

Las especies del género *Perkinsus*, excepto *P. qugwadi*, presentan la particularidad de que sus trofozoítos aumentan su tamaño, incluso más de tres veces, y se rodean de una

pared polisacárida gruesa cuando se incuban en caldo de tioglicolato, en oscuridad y condiciones anaeróbicas, transformándose así en un nuevo estadio denominado hipnoespora. Se ha observado que cuando las hipnoesporas se incuban en agua de mar comienza el proceso de zoosporulación (Figura 10); las hipnoesporas pueden mantenerse vivas en condiciones adversas durante periodos prolongados y entran en zoosporulación cuando las condiciones son favorables, por lo que se cree que las hipnoesporas son la fase de resistencia del ciclo de vida de *Perkinsus* (Casas *et al.*, 2002).

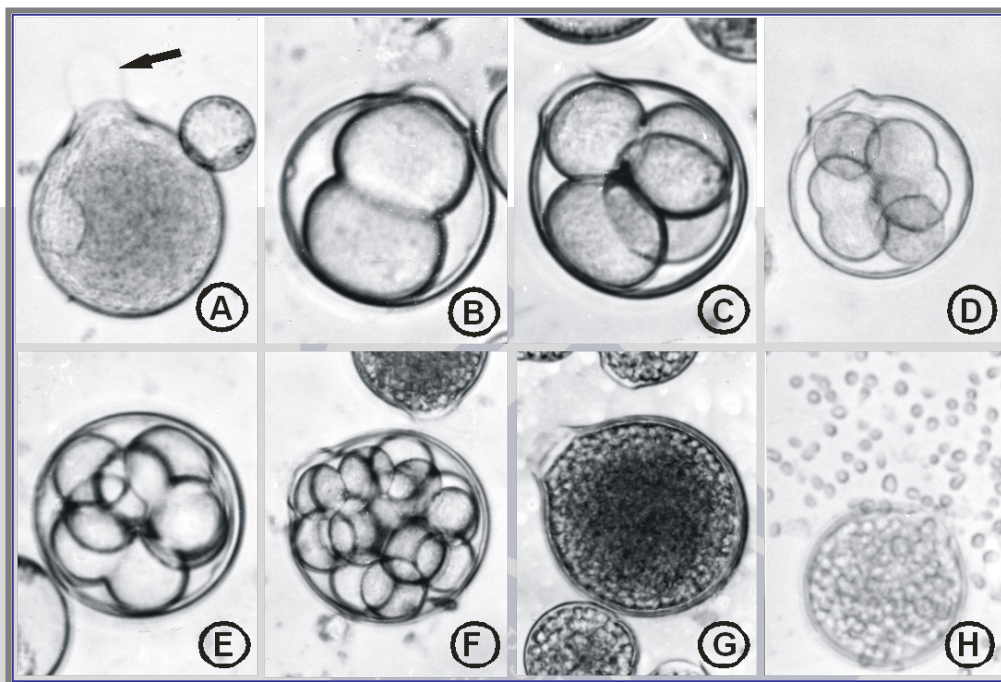


Figura 10. Progresión de la zoosporulación. A: zoosporangio unicelular con tubo de descarga (flecha); B: zoosporangio de 2 células; C: zoosporangio de 4 células; D: zoosporangio dividiéndose para pasar de 4 a 8 células; E: zoosporangio de ocho células; F: zoosporangio de 16 células; G: cientos de zoosporas móviles dentro del zoosporangio; H: zoosporas móviles liberadas a través del tubo de descarga. Imágenes obtenidas de Villalba *et al.*, 2011.

El proceso de zoosporulación supone sucesivas divisiones binarias manteniéndose la gruesa pared intacta, de forma que se forman centenares de zoosporas en el interior del zoosporangio. Las zoosporas (Figura 11) son liberadas del zoosporangio a través de uno o dos tubos de descarga que aparecen en la hipnoespora antes de que comiencen las divisiones celulares (Perkins y Menzel, 1966, 1967; Azevedo, 1989; Auzoux-Bordenave *et al.*, 1995; McLaughlin *et al.*, 2000; Casas *et al.*, 2002, 2004). Casas y La Peyre (2013) mostraron evidencias de que la diferenciación de trofozoítos a hipnoesporas se produce en condiciones asociadas a tejidos en descomposición, pudiendo desarrollarse este estadio en los hospedadores muertos como una forma de resistencia. Se desconoce cuál es el estadio que más frecuentemente inicia la infección en un hospedador

sano en el medio natural, aunque se ha demostrado experimentalmente que tanto trofozoítos, hipnoesporas, zoosporangios y zoosporas son capaces de transmitir la infección (Goggin *et al.*, 1989; Rodríguez *et al.*, 1994; Volety y Chu, 1994; Chu, 1996; Bushek *et al.*, 1997, 2002a; Chintala *et al.*, 2002; Ford *et al.*, 2002).

La ruta de entrada de las diferentes células de *Perkinsus* en el hospedador ocurre a través de las branquias, del manto y del tubo digestivo, dispersándose a otros tejidos por medio de la hemolinfa (Azevedo *et al.*, 1989; Navas *et al.*, 1992; Rodríguez y Navas, 1995; Villalba *et al.*, 2004). Allam *et al.* (2013) proponen que las células de *Perkinsus* entran en la cavidad paleal del hospedador, son capturadas por las branquias y transferidas a los palpos branquiales, donde una pequeña parte es ingerida, mientras que el resto de células son transferidas al área de descarga de las pseudoheces. Estudios genéticos también indican que las especies del género *Perkinsus* podrían tener reproducción sexual, pues se han observado individuos diploides heterocigotos en cultivos clonales del parásito y en ostras infectadas (Robledo *et al.*, 1999; Reece *et al.*, 2001; Thompson, 2010; Thompson *et al.*, 2011, 2014; Pardo *et al.*, 2011; Vilas *et al.*, 2011).

Figura 11. Micrografía electrónica de transmisión de una zoospora de *Perkinsus olseni* obtenida con un microscopio electrónico de transmisión. Fotografía de Villalba *et al.*, 2011.



#### 2.2.4. Interacción hospedador-parásito

Se han llevado a cabo numerosos estudios acerca de la interacción entre *Perkinsus* y sus hospedadores, fundamentalmente de la interacción de las especies *P. olseni* (objeto de estudio de esta tesis) y *P. marinus*. *P. olseni* es responsable de grandes mortalidades de almejas y de pérdidas económicas importantes. Este parásito ha causado mortalidades en poblaciones de almeja fina de Galicia, alcanzando mortalidades anuales acumuladas del 41% (Villalba *et al.*, 2005), y del Algarve, registrando mortalidades entre un 50-80% (Ruano y Cachola, 1986). El cultivo de la almeja japonesa también ha sufrido mortalidades por *P. olseni* que alcanzaron el 90-100% en cultivos de Cataluña y de la Laguna de Venecia (Santmartí *et al.*, 1995; Pretto *et al.*, 2014). En Asia este parásito es el responsable de una dramática reducción de la almeja japonesa en Corea, cayendo su producción a la quinta parte desde 1990 hasta 1997 (Park y Choi, 2001), y de importantes mortalidades en Japón (Choi *et al.*, 2002) y China (Liang *et al.*, 2001).

Los efectos de la perkinsosis en la fisiología del hospedador incluyen un desequilibrio energético, observándose que en infecciones intensas el parásito consume más energía de la que el molusco necesita para responder a su propia demanda, creándose un balance energético negativo en el hospedador (Choi *et al.*, 1989; Casas *et al.*, 2002), lo que afecta negativamente al crecimiento (Dang *et al.*, 2013). Asimismo, se ha observado que el potencial reproductivo de las almejas *R. decussatus* se reduce en infecciones intensas, ya que la gametogénesis se ve afectada (Casas *et al.*, 2002; Park *et al.*, 2006b; Casas y Villalba, 2012). El sistema inmunitario del hospedador también se ve comprometido con esta enfermedad, favoreciendo el desarrollo de infecciones oportunistas como bacterias y virus (Montes *et al.*, 2001; Soudant *et al.*, 2013), o un efecto más intenso de las algas tóxicas (Hégaret *et al.*, 2009).

La infección provoca una respuesta inmunitaria del hospedador que conlleva una concentración hemocitaria en las zonas afectadas. Esta reacción hemocitaria es diferente en ostras y en otros moluscos. En el caso de las ostras, los parásitos son fagocitados y casi nunca son destruidos si no que se dividen dentro de los hemocitos, pudiendo romper estas células y seguir activos (Figura 12). Este proceso se ha observado en el caso de ostras *C. virginica* parasitada con *P. marinus* (Mackin, 1951), en las ostras *C. hongkongensis* y *C. ariakensis* infectadas con *P. beihaiensis* (Moss *et al.*, 2008) y en *O. edulis* parasitada con *P. mediterraneus* (Casas *et al.*, 2004). Sin embargo, se ha observado que en las almejas *R. decussatus*, *R. philippinarum* y *M. arenaria* (Chagot *et al.*, 1987; Navas *et al.*, 1992; Montes *et al.*, 1995, 1996; Sagristá *et al.*, 1995; Ordás *et al.*, 2001; Park y Choi, 2001; Dungan *et al.*, 2006), en orejas de mar *Haliotis* spp. (Goggin y Lester, 1995) y en vieiras *P. yessoensis* (Bower *et al.*, 1998) la reacción predominante es la encapsulación del parásito por los hemocitos circulantes, principalmente granulocitos (Figura 13).

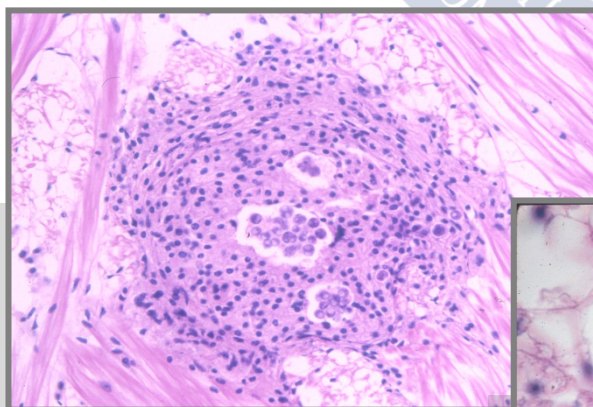


Figura 12. Corte histológico de *Crassostrea virginica* en el que se observa la respuesta inmunitaria producida frente a *Perkinsus marinus*.

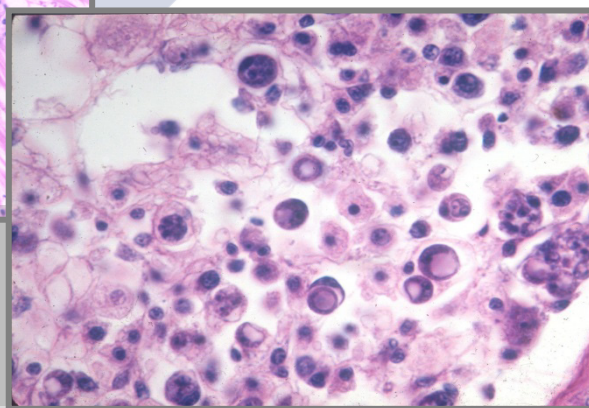


Figura 13. Corte histológico de *Ruditapes decussatus* en el que se observa la respuesta inmunitaria producida frente a *Perkinsus olseni*.

Los granulocitos circulantes migran a las zonas parasitadas y se diferencian en granulocitos secretores, produciendo un polipéptido glicosilado de 225 kDa que es secretado de un modo organizado para constituir una cápsula alrededor de los trofozoítos de *Perkinsus* (Montes *et al.*, 1995; Soudant *et al.*, 2013). Tras la encapsulación, las enzimas lisosomales de los granulocitos y la producción de ROS intervendrían en la destrucción de los trofozoítos. Sin embargo, un elevado porcentaje de trofozoítos sobreviven, posiblemente debido a la naturaleza proteica de la pared celular del parásito (Montes *et al.*, 1996). El sistema inmune del hospedador no logra evitar la proliferación del parásito y la progresión de la infección. Cada foco de encapsulación puede llegar a contener varias decenas de células de *Perkinsus* y su gran tamaño provoca la destrucción y la pérdida de tejidos y de la estructura normal de los órganos. Estos daños llegan a ser visibles como pústulas o abscesos (Bower *et al.*, 1992; Pretto *et al.*, 2014). Además de la respuesta celular, *P. olseni* desencadena una respuesta humoral en el hospedador que incluye, entre otros, la producción de lectinas, que son proteínas que juegan un papel importante en el reconocimiento del parásito por el hospedador. Se ha demostrado que la infección por *P. olseni* induce la síntesis de varios tipos de lectinas específicas en *R. philippinarum* (Bulgakov *et al.*, 2004; Kang *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2006, 2008 a,b). En esta línea se ha demostrado que la infección por *P. olseni* modula la expresión de los genes que codifican lectinas en *R. decussatus* (Leite *et al.*, 2013). Por otra parte se han encontrado diferentes azúcares en la pared celular de *P. olseni* a los que se podrían ligar estas lectinas producidas por las almejas infectadas (Vasta *et al.*, 1982, 1984). En los últimos años, son cada vez más los estudios genómicos y proteómicos dedicados a establecer la base genética de la respuesta inmunitaria de los moluscos frente a *Perkinsus*. Empleando diferentes técnicas se han identificado genes o marcadores genéticos implicados en la respuesta inmune de las almejas *R. philippinarum* (Kang *et al.*, 2006) y *R. decussatus* (Prado-Álvarez *et al.*, 2009; Leite *et al.*, 2013) frente a *P. olseni*. Leite *et al.* (2008) han caracterizado en el genoma de *P. olseni* genes de prolil hidrolasas, cuya expresión aumenta en presencia de la hemolinfa del hospedador, sugiriendo que estas enzimas están implicadas en el proceso de infección.

Aunque *P. marinus* no es objeto de este estudio, dado que buena parte de la información sobre la interacción hospedador-parásito en el ámbito de la perkinsosis deriva del modelo experimental *C. virginica* – *P. marinus*, es interesante incluir al menos aspectos generales de la interacción entre estas dos especies. La reacción hemocitaria provocada por *P. marinus* en las ostras *C. virginica* es diferente a la de otros moluscos. En el caso de las ostras, no tiene lugar la encapsulación de los parásitos, si no que éstos son fagocitados y casi nunca destruidos, dividiéndose dentro de los hemocitos y pudiendo romper estas células y seguir activos (Mackin, 1951). Este proceso también se ha observado en las ostras *C. honkongensis* y *C. ariakensis* infectadas con *P. beihaiensis* (Moss *et al.*, 2008) y en *O. edulis* parasitada con *P. mediterraneus* (Casas *et al.*, 2004). Se han observado otras respuestas celulares de las ostras frente a la perkinsosis, como un aumento de hemocitos en la hemolinfa en *C. virginica* infectada por *P. marinus* y *C. gasar* parasitada por *Perkinsus* sp. (Anderson *et al.*, 1992; Chu y La Peyre, 1993; La Peyre *et al.*, 1995a, b; Queiroga *et al.*, 2013); la disminución del porcentaje de hemocitos capaces de fagocitar partículas en las ostras *C. virginica* y *C. gigas* infectadas por *P. marinus* (La Peyre *et al.*, 1995a; Goedken *et al.*, 2005) y en *C. gasar* parasitada por *Perkinsus* sp. y la inhibición de la apoptosis por parte de *P. marinus*, lo que favorece la proliferación del parásito en *C.*

*virginica* (Sunila y LaBanca, 2003). La respuesta humoral de *C. virginica* frente a *P. marinus* incluye un tipo de lectina, que se moviliza hacia la pared celular de los hemocitos para hacer frente a la infección (Tasumi y Vasta, 2007); la inhibición de ROS, favoreciendo que el parásito sobreviva dentro de los hemocitos (La Peyre *et al.*, 1995a; Volety y Chu, 1995; Anderson, 1999 a, b; Schott *et al.*, 2003); la producción de óxido nítrico por los hemocitos, implicado en la degradación de patógenos (Villamil *et al.*, 2007); y una actividad inhibitoria de las proteasas que libera el parásito como factor de virulencia (Faisal *et al.*, 1998; Oliver *et al.*, 1999; La Peyre *et al.*, 2010; He *et al.*, 2012), como por ejemplo la perkinsina, que es la proteasa liberada por *P. marinus* de forma mayoritaria (Xue *et al.*, 2006). Al igual que en el caso de la interacción almeja-*P. olseni* también se han identificado marcadores genéticos implicados en la respuesta inmune de las ostras *C. virginica* y *C. gigas* infectadas con *P. marinus* (Tanguy *et al.*, 2004; Sokolova *et al.*, 2006; Yu y Guo, 2006; Wang *et al.*, 2010a; Nikapitiya *et al.*, 2014).

### 2.2.5. Estrategias de lucha

Las altas mortalidades de moluscos provocadas por las especies del género *Perkinsus*, especialmente *P. marinus* en poblaciones de *C. virginica*, ha hecho necesario implementar medidas para mitigar el efecto de la enfermedad. Toda la información disponible en este ámbito corresponde al binomio *C. virginica* – *P. marinus*. Se han abordado estrategias basadas en el conocimiento epidemiológico para diseñar nuevas estrategias de cultivo: cultivando en zonas de baja salinidad, con semilla libre del parásito y trasladando posteriormente la semilla a zonas de mayor salinidad, donde el crecimiento de la ostra es más rápido, o cosechando las ostras antes de que empiece el periodo de mortalidad, aunque no hayan alcanzado un tamaño grande (revisado por Villalba y Figueras, 2011). También se han desarrollado programas de selección de estirpes de ostra *C. virginica*, muy susceptible a la infección por *P. marinus* y *Haplosporidium nelsoni*, con un éxito notable a medio y largo plazo (Ford y Haskin, 1988; Gaffney y Bushek, 1996; Ragone Calvo *et al.*, 2003b; Abbe *et al.*, 2010; Frank-Lawale *et al.*, 2014). Estos programas se basaron en la selección de individuos con buena tasa de crecimiento y que durante años estuvieron sometidos a infecciones por estos parásitos (Abbe *et al.*, 2010; Villalba y Figueras, 2011). Sin embargo, la identificación de marcadores genéticos implicados en la respuesta inmune de las ostras frente *P. marinus*, permitirá conocer la susceptibilidad/resistencia de los stocks seleccionados para estos programas de forma más eficiente (Tanguy *et al.*, 2004; Yu y Guo, 2006; Sokolova *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2010a; Yu *et al.*, 2011; He *et al.*, 2012; Nikapitiya *et al.*, 2014). Asimismo, se han producido ostras triploides, las cuales no demostraron resistencia a *P. marinus*, aunque las ostras alcanzaron el tamaño comercial antes de que se produjesen mortalidades importantes (Barber y Mann, 1991; Meyers *et al.*, 1991). Otra estrategia es la inserción de genes ajenos a la ostra que confieran resistencia; aunque las restricciones legales para comercializar animales modificados genéticamente han frenado la investigación en esta línea, la tecnología de transferencia de genes y su expresión en ostras adultas está desarrollada (Cadoret *et al.*, 1997 a, b, 2000; Buchanan *et al.*, 2001a, b), por lo que parece viable la inserción en el genoma de la ostra de genes que codifican péptidos antimicrobianos (Morvan *et al.*, 1997; Pierce *et al.*, 1997; Faisal *et al.*, 1999) u otros genes implicados en la

respuesta inmune frente al parásito, como vía para conseguir estirpes resistentes de ostra. Aunque para las restantes especies del género *Perkinsus* no hay noticias de estrategia de lucha específicas, es destacable el hecho de que las especies de este género se consideren adecuadas para desarrollar quimioterapias frente a ellas ya que: 1) comparten características con algas, hongos y plantas y, por tanto, rutas metabólicas que no están presentes en su hospedador y que pueden actuar como dianas frente a diversas drogas; 2) comparten rutas metabólicas con parásitos ampliamente estudiados como *Plasmodium* y *Toxoplasma*, frente a los cuales se han desarrollado múltiples drogas; 3) se puede cultivar *in vitro*, lo que facilita el desarrollo de las pruebas de toxicidad. Así, se han probado quimioterapias para reducir o eliminar las células de *P. marinus* y *P. olseni*, tanto *in vitro* como *in vivo*. Diversos herbicidas (Elandalloussi *et al.*, 2008; Leite *et al.*, 2011), drogas antimicrobianas (Calvo y Burreson, 1994; Krantz, 1994; Dungan y Hamilton, 1995; Lund *et al.*, 2005; Stelter *et al.*, 2007) o drogas anti-malaria y antiprotozoos (Elandalloussi *et al.*, 2005; Panko *et al.*, 2008) se han mostrado efectivos a la hora de reducir al parásito, habiéndose demostrado la inocuidad para el hospedador en algunos casos. La eficacia de la quimioterapia como vía para controlar la enfermedad choca con el inconveniente, de difícil solución, de que la mayor parte de los moluscos crecen o se cultivan en un medio abierto, lo que hace que el uso de estas sustancias pueda suponer un riesgo medioambiental y, además, que no sea rentable.

---

## 2.3. Marteiliosis

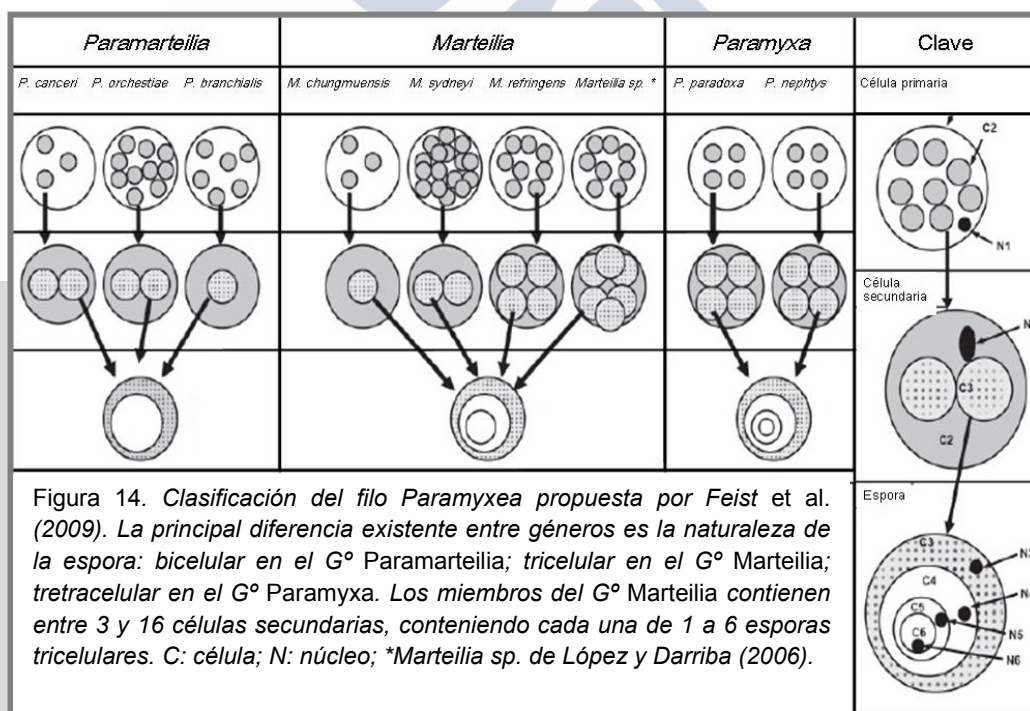
---

### 2.3.1. Taxonomía

La posición taxonómica del género *Marteilia* ha sido controvertida durante varias décadas. La primera especie del género se detectó a finales de la década de los 60 del siglo pasado (Comps, 1970; Bonami *et al.*, 1971; Herrbach, 1971;) y se describió como *M. refringens* (Grizel *et al.*, 1974). Las primeras clasificaciones incluían a esta especie en diferentes grupos de hongos, como Chytridiales (Herrbach, 1971), Labyrinthomyxa (Grizel y Tigé, 1973) o Microsporidia (Grizel *et al.*, 1974). También se le relacionó con los Haplosporida (Comps, 1970; Perkins, 1975, 1976b, 1979), y con los mixosporidios (Desportes y Ginsburger-Vogel, 1977; Desportes y Lom, 1981). En 1982, Sprague creó el filo Ascetospora e incluyó a *Marteilia* dentro de la clase Stellatospora (Familia Marteiliidae, orden Occlusosporidia). El género *Marteilia* también se incluyó en la clase Paramyxea, dentro del filo Ascetospora, orden Marteilidea (Desportes y Lom, 1981; Desportes, 1984; Desportes y Nashed, 1983). En 1990, Desportes y Perkins propusieron elevar la clase Paramyxea a filo, incluyendo en él al género *Marteilia* y a otros tres géneros de parásitos próximos morfológicamente a él: *Paramarteilia*, *Paramyxa* y *Marteilioides*. Esta descripción del filo Paramyxea y la inclusión de *Marteilia* las validaron Berthe *et al.* (2000) mediante estudios moleculares. Posteriormente, Cavalier-Smith y Chao (2003), en base a estudios moleculares, degradaron el filo Paramyxea a nivel de Orden. La posición taxonómica actual considera que el género *Marteilia* está incluido en el grupo Paramyxida perteneciente a los Ascetosporea, Cercozoa, Rhizaria y supergrupo SAR (Adl *et al.*, 2005,

2012). Sin embargo, Feist *et al.* (2009) sugieren que el grupo Paramyxida debe revisarse ya que la clasificación de los parásitos adscritos a él está basada principalmente en estudios ultraestructurales, utilizando criterios morfológicos diferentes en cada caso. Estos autores proponen una reestructuración de este grupo en la que, entre otras modificaciones, suprimen el género *Marteilioides* y transfieren una de sus especies, *M. chungmuensis* al género *Marteilia* en base a las características de la espora y a estudios moleculares previos, en los que *M. chungmuensis* y *Marteilioides* sp. se incluyen dentro del género *Marteilia* (Kleeman *et al.*, 2002a; Itoh *et al.*, 2003) (Figura 14).

Sin tener en cuenta la inclusión de *M. chungmuensis* dentro del género *Marteilia*, las especies integrantes de este género son: *M. refringens* (= *M. maurini*) (Grizel *et al.*, 1974), *M. sydneyi* (Perkins y Wolf, 1976), *M. lengehi* (Comps, 1976), *M. christenseni* (Comps, 1983) y las especies recientemente descritas *M. cochillia* (Carrasco *et al.*, 2013) y *M. granula* (Itoh *et al.*, 2014). Estas especies muestran diferencias en el número de esporangios en las células primarias, en la estructura de la pared celular de estos esporangios y en el tipo de gránulos de inclusión que presentan, así como en el número de esporas por esporangio y su pared (Longshaw *et al.*, 2001; Kleeman *et al.*, 2002a; Feist *et al.*, 2009; Carrasco *et al.* 2013; Itoh *et al.*, 2014).



En el caso de *M. refringens*, *M. sydneyi*, *M. cochillia* y *M. granula* se han llevado a cabo estudios moleculares que confirman que se trata de especies distintas (Le Roux *et al.*, 1999; Berthe *et al.*, 2000; Kleeman y Adlard, 2000; Carrasco *et al.*, 2012b, 2013; Elgharsalli *et al.*, 2013; Itoh *et al.*, 2014). Además de estas especies, se han descrito infecciones de *Marteilia* sp. en diferentes hospedadores a lo largo de todo el mundo. En las secciones siguientes se hará referencia principalmente a las especies de *Marteilia* que afectan

actualmente a las poblaciones de molucos bivalvos de Galicia, que son objeto de este estudio.

## 2.3.2. Epidemiología

### 2.3.2.1. Distribución geográfica y especies hospedadoras

Los parásitos del género *Marteilia*, en especial *M. refringens*, *M. sydneyi* y la recientemente descrita *M. cochillia*, son responsables de causar mortalidades elevadas en moluscos de gran interés comercial. El rango geográfico de *M. refringens* engloba costas europeas desde Suecia hasta Grecia y algunos registros puntuales en Marruecos y Túnez (OIE, 2012c). Esta especie es la causante de la enfermedad de los Abers que causó importantes mortalidades de *O. edulis* en Francia y en otros países europeos (Grizel *et al.*, 1974; Massó, 1978; Alderman, 1979; van Banning, 1979). En Galicia, se encontró parasitando la ostra plana de la Ría de Arousa y de Vigo (Massó, 1978) y en la ría de Muros-Noia (Alderman, 1979), aunque en los últimos 30 años sólo se ha detectado infectando la ostra plana de forma puntual. Los mejillones *M. edule* y *M. galloprovinciales* también son susceptibles de ser parasitados por esta especie, habiéndose detectado infecciones en Francia, España, Italia y Grecia (Tigé y Rabouin, 1976; Comps *et al.*, 1982; Auffret y Poder, 1985; Claver-Derqui, 1990; Villalba *et al.*, 1993a; Robledo y Figueras, 1995; Le Roux *et al.*, 2001; López-Flores *et al.*, 2004; Novoa *et al.*, 2005; Virvilis y Angelidis, 2006; Karagiannis *et al.*, 2013; Carrasco *et al.*, 2007; Balseiro *et al.*, 2007; Garcia *et al.*, 2009; Carella *et al.*, 2010; Boyer *et al.*, 2013). Galicia es una zona endémica para la infección causada por *M. refringens* en el mejillón (Villalba *et al.*, 1993b; Camacho *et al.*, 1997; Villalba *et al.*, 1997). También se ha detectado infectando el mejillón *Xenostrobus securis*, una especie invasora que se ha establecido en la Ría de Vigo (Pascual *et al.*, 2010).

Recientemente, se ha descrito una especie nueva, *M. cochillia*, infectando el berberecho *C. edule* de Cataluña, provocando mortalidades importantes en el Delta del Ebro (Carrasco *et al.*, 2011). Estudios llevados a cabo en un lago de Córcega, con el objetivo de encontrar hospedadores intermediarios para *M. refringens*, detectaron un parásito similar a *M. cochillia* en muestras de zooplancton, lo que sugiere que el rango geográfico de esta especie podría aumentar y podría estar presente en otros hospedadores, ya que en esa región italiana no existe *C. edule*, pero sí otras especies de berberechos como *Acanthocardia paucicostata*, *Anadara inaequalis* y *Parvicardium exiguum* (Arzul *et al.*, 2014).

La última especie descrita de este género ha sido *M. granula* parasitando *R. philippinarum* de Japón aunque, por el momento, no se ha asociado con mortalidades de almeja japonesa (Itoh *et al.*, 2014).

Existen registros de *Marteilia* sp. que aún no se han asignado a ninguna especie (Berthe *et al.*, 2004; Aranguren *et al.*, 2011), lo que pone de manifiesto la necesidad de realizar estudios moleculares y ultraestructurales más exhaustivos para verificar si se trata de especies de *Marteilia* ya descritas parasitando nuevos hospedadores o si, por el contrario, estamos ante nuevas especies todavía sin identificar. En Galicia se ha descrito *Marteilia* sp. en las almejas *R. decussatus*, *R. philippinarum* y *P. rhomboides* de Galicia

(Villalba *et al.*, 1993c; Figueras *et al.*, 1996) y en el longueirón vello *Solen marginatus* (López y Darriba, 2006; Ruiz *et al.*, 2015) .

### 2.3.2.2. Influencia de algunas características del hospedador en la parasitación

Tanto en ostras como en mejillones, la prevalencia y la intensidad de infección por *M. refringens* son generalmente superiores en los individuos de edad igual o superior a 2 años, al igual que la infección de *M. sydneyi* en ostras *S. glomerata* (Wolf, 1979; Villalba *et al.*, 1993a; Audemard *et al.*, 2001).

### 2.3.2.3. Influencia de factores ambientales en la parasitación

La dinámica de infección de *M. refringens* en ostra está relacionada con la temperatura y, por tanto, presenta una marcada estacionalidad. En Europa se han descrito infecciones de ostra con este parásito desde mayo a diciembre, alcanzando picos de prevalencia e intensidad en los meses de verano (Balouet, 1977; Grizel, 1985; Audemard *et al.*, 2001). *M. refringens* esporula y se transmite entre los meses de verano y otoño, alcanzando tasas de mortalidad del 50-90% (Grizel *et al.*, 1974; Grizel, 1985; OIE 2012c). En invierno, los esporangios primarios no se desarrollan y las infecciones son ligeras, hasta la llegada de la primavera y el aumento de la temperatura del agua, a partir de las cuales, las infecciones progresan hasta alcanzar los picos de prevalencia e intensidad del verano (Alderman, 1979; Balouet *et al.*, 1979; Grizel, 1985; Berthe *et al.*, 1998; Audemard *et al.*, 2004a). Diversos estudios han intentado establecer la dinámica de infección de *M. refringens* en mejillones, pero los resultados no han sido concluyentes. Villalba *et al.* (1993a) y Robledo y Figueras (1995) no encontraron un patrón estacional claro de la enfermedad, observando formas maduras del parásito en el sistema digestivo de los mejillones gallegos a lo largo de todo el año, con picos de prevalencia en períodos diferentes. En la Bahía de Alfacs (Tarragona) también se observaron esporangios maduros en mejillones a lo largo de todo el año, sin embargo, se detectaron mayores prevalencias en los meses de julio a septiembre, cuando las temperaturas superaban los 17 °C (Carrasco *et al.*, 2007). Estudios realizados en Córcega confirman la esporulación del parásito a lo largo de todo el año, pero la intensidad de la esporulación y, por tanto, de la infección y la prevalencia aumentan entre junio y agosto (Arzul *et al.*, 2014). En septiembre, las intensidades y el número de individuos afectados disminuyen considerablemente, lo que sugiere la liberación del parásito al medio y/o una defensa efectiva del hospedador, que logra superar la infección. Por otra parte, en el sureste de Francia solo se detectaron esporangios maduros del parásito en los meses de primavera y otoño (Boyer *et al.*, 2013), lo que podría indicar que el parásito tenga dos ciclos por año y que la enfermedad pueda transmitirse en estos dos períodos. Algunos autores sugieren que los cambios de temperatura repentinos podrían activar al parásito y favorecer su esporulación (Carrasco *et al.*, 2008), lo que explicaría la presencia de formas maduras durante todo el año y, principalmente, en los meses de verano.

Para la especie recientemente descrita *M. cochillia* no se dispone todavía de información epidemiológica.

### 2.3.3. Ciclo de vida y transmisión

El ciclo de vida completo de las especies del género *Martelia* aún no se conoce, aunque existen evidencias de que se trata de un ciclo de vida indirecto que necesita hospedadores intermediarios para cerrarse. La infección de *M. refringens* comienza en el tracto digestivo de las ostras, observándose células esféricas uninucleadas y de tipo plasmodial en el epitelio ciliado del estómago y de los túbulos digestivos (Grizel *et al.*, 1974). Estas células uni y plurinucleadas descritas por Herrbach (1971) y Comps (1970) se consideran los estadios primarios del desarrollo de *M. refringens*. Posteriormente, se produce una división endógena de los núcleos y del citoplasma que les rodea y se forman las células secundarias, 8 para *M. refringens* y 4 para *M. cochillia* (Carrasco *et al.*, 2013). Estas células secundarias darán lugar, cada una de ellas, a las células terciarias que compondrán el esporangio (3-4 para *M. refringens*, 6 para *M. cochillia*) (Grizel *et al.*, 1974; Audemard *et al.*, 2001; Aranguren *et al.*, 2011; Carrasco *et al.*, 2013). Cuando la pared de las células primarias alcanza la madurez, se rompe y se desprenden los esporangios (Herrbach, 1971; Grizel, 1985), que son liberados al lumen del tracto digestivo y, a través de las heces de la ostra, pasan al medio externo (Perkins, 1976b; Audemard *et al.*, 2002; Berthe *et al.*, 2004). El mismo proceso de esporulación se observó en *M. refringens* infectando mejillones, pero en este caso se produce una colonización masiva de todos los túbulos digestivos de forma simultánea (Villalba *et al.*, 1993a; Robledo y Figueras, 1995). Carrasco *et al.* (2013) también observaron todas las etapas de esporulación de *M. cochillia* en el epitelio de los divertículos digestivos del berberecho *C. edule*, encontrando algunas células parasitando la glándula digestiva y esporangios libres en el intestino y en las heces.

Existen numerosos estudios que tratan de esclarecer la ruta que siguen las esporas una vez liberadas al medio. Grizel (1985) sugirió que las esporas de *M. refringens* podrían requerir un tiempo de maduración en el agua del mar o en el sedimento antes de ser infectivas. Se han realizado numerosos estudios en los que se ha intentado, sin éxito, transmitir *M. refringens* entre individuos de ostra plana, mediante cohabitación e inyección de suspensiones de esporas del parásito (Balouet, 1979; Grizel, 1985; Berthe *et al.*, 1998). Estos resultados han llevado a proponer la hipótesis de que el ciclo de vida pueda ser heteroxeno. En la búsqueda de hospedadores intermediarios, en un primer momento se barajó la posibilidad de que peces filtradores cumplieran esta función, sin embargo los experimentos de infección con *M. sydneyi* no dieron resultado (Roubal *et al.*, 1989; Wesche *et al.*, 1999). Otras especies estudiadas como posibles hospedadores de *Martelia* spp., también dieron resultados negativos, como los poliquetos *Polydora* spp., *Pomatoceros triqueter* y *Spirorbis* spp., el molusco *Crepidula fornicata* y diferentes especies de crustáceos como los decápodos *Crangon crangon*, los anfípodos *Marinogammarus marinus*, los cangrejos *Carcinus maenas*, la langosta *Galathea squamifera* o la nécora *Liocarcinus puber* (Balouet *et al.*, 1979; Van Banning, 1979). La diversidad de especies presentes en bancos naturales de ostras hace complicada la búsqueda de hospedadores intermediarios. Audemard *et al.* (2001) realizaron un estudio de diversidad de especies en “estanques” naturales de las marismas de la bahía francesa Marennes-Oléron, denominados localmente “claires”, en los que el número de especies reconocidas es menor de 100 (Reymond, 1991) y en donde se encontraba *M. refringens* infectando la ostra plana con altos valores de prevalencia. Cuando se estudió la presencia/ausencia de *M. refringens*

en cada una de las especies reconocidas en esta zona, se detectó, mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) e hibridación *in situ* (ISH), que el ovario del copépodo *Paracartia grani* estaba infectado por este parásito (Audemard *et al.*, 2002). La implicación de *P. grani* en el ciclo de vida de *M. refringens* es congruente también con la ecología del copépodo, la epidemiología de la enfermedad y la distribución geográfica de ambos, ya que *P. grani* coexiste en las mismas zonas que *Marteilia* y se observa principalmente en primavera y verano, periodo que coincide con el periodo de transmisión de esporas de *Marteilia* (Audemard *et al.*, 2002; Boyer *et al.*, 2013; Arzul *et al.*, 2014). Experimentos de cohabitación demuestran que los copépodos adquieren la infección cuando están presentes ostras infectadas con *M. refringens*. Sin embargo, no se ha conseguido demostrar que los copépodos infectados transmiten el parásito a ostras sanas (Audemard *et al.*, 2002; Carrasco *et al.*, 2008). Boyer *et al.* (2013) detectaron *M. refringens* en todos los estadios de vida de *P. grani*, incluidos sus huevos, e infectando no sólo el ovario, sino también su tracto digestivo. Estos autores sugieren que el copépodo ingiere el parásito y dentro de él se multiplica y migra al ovario. Una vez allí, los huevos podrían contribuir a la dispersión de *M. refringens*, ya que *P. grani* produce gran cantidad de huevos en septiembre, periodo en el que las esporas de *M. refringens* se liberan al agua; o podrían actuar de reservorio del parásito en el sedimento durante la fase de diapausa que sufren en invierno (Audemard *et al.*, 2002; Boyer *et al.*, 2013), lo que apoyaría las hipótesis de Grizel (1985) y Wesche *et al.* (1999) de que las esporas tienen un periodo de vida corto en la columna de agua y necesitan un período de maduración antes de transmitirse a nuevos moluscos.

Otra especie del género *Paracartia*, *P. latisetosa*, también podría actuar como hospedador intermediario, ya que también se han detectado infecciones por *M. refringens* en su ovario (Arzul *et al.*, 2014). Los parásitos podrían ser liberados a través de los conductos gonadales o liberados con los huevos durante el desove. Asimismo, se han obtenido resultados positivos por PCR, usando cebadores específicos de *Marteilia* en otras especies del género *Paracartia* y en otros copépodos como *Oithona* sp., *Euterpina acutifrons* y *Evadne* sp., aunque la infección no se ha confirmado mediante histología o ISH (Carrasco *et al.*, 2007; Arzul *et al.*, 2014).

¿Cómo se transmiten las esporas de *M. refringens* de las distintas etapas de desarrollo de los copépodos a los moluscos? 1) La ausencia de transmisión del parásito de copépodos infectados a moluscos, podría indicar la presencia de un tercer hospedador en el ciclo de vida de *Marteilia* (Audemard *et al.*, 2002); 2) los copépodos infectados (o sus gametos) podrían ser ingeridos por el molusco (Audemard *et al.*, 2002; Carrasco *et al.*, 2008; Arzul *et al.*, 2014). Los mejillones suelen filtrar partículas más pequeñas que los copépodos (entre 4-35  $\mu\text{m}$ ) pero algunos autores han demostrado que *M. edulis* puede filtrar ciliados de hasta 90  $\mu\text{m}$  de tamaño (Trottet *et al.*, 2008) y que huevos y larvas de copépodos son retenidos por *M. galloprovincialis* (Arzul *et al.*, 2014). Se requieren más estudios para cerrar el ciclo de vida de las especies de *Marteilia*.

En coherencia con la hipótesis de un hospedador intermedio para las especies del género *Marteilia*, recientemente se ha publicado la presencia de *M. sydneyi* en poliquetos *Nephtys australiensis* (Adlard y Nolan, 2015).

### 2.3.4. Interacción hospedador-parásito

*M. refringens* es el agente causal de la enfermedad de los Abers que provoca elevadas mortalidades en la ostra plana, *O. edulis*, en Europa (Grizel *et al.*, 1974; Massó, 1978; Alderman, 1979; van Banning, 1979). Los mejillones *M. edulis* y *M. galloprovincialis* son también susceptibles a la enfermedad, aunque existen discrepancias a la hora de valorar el efecto letal de este parásito. Algunos autores describieron a *M. refringens* como el agente causal de cierta mortalidad de mejillón (Villalba *et al.*, 1993a; Fuentes *et al.*, 1994), mientras que en otros casos estas infecciones no se asociaron a episodios de mortalidad (Comps *et al.*, 1982; Longshaw *et al.*, 2001).

Las ostras parasitadas por *M. refringens* experimentan una disminución o ausencia de crecimiento y muestran decoloración de tono amarillo claro en la masa visceral (Comps, 1970; Berthe *et al.*, 2004; Aranguren *et al.*, 2011). El parásito provoca una disminución en la absorción de materia orgánica en *M. galloprovincialis*, provocando incluso inanición, lo que conlleva una pérdida de condición importante e incluso la muerte del mejillón (Pérez-Camacho *et al.*, 1997). La infección por *M. refringens* comienza en las células epiteliales del sistema digestivo y, a medida que el parásito progresa, va limitando la actividad metabólica del hospedador y sus funciones digestivas, e incluso obtura los túbulos digestivos (Comps, 1970; Grizel *et al.*, 1974). Así, *M. refringens* interfiere en el almacenamiento del glucógeno en la ostra (Robert *et al.*, 1991). Las esporas maduras de *M. refringens* se liberan al mar a través del lumen de los túbulos digestivos y del intestino, tras la destrucción del epitelio de la gándula digestiva y de los túbulos digestivos secundarios (Alderman, 1979; Robledo y Figueras, 1995). En estadios terminales de la enfermedad, las ostras son incapaces de cerrar las valvas (Aranguren *et al.*, 2011). Las infecciones de *M. refringens* en mejillones *M. edulis* y *M. galloprovincialis* provocan síntomas similares a los de la enfermedad en la ostra. La infección por *M. refringens* también tiene efectos negativos en la gametogénesis y en el desarrollo gonadal de ostras y mejillones, inhibiendo incluso, en el caso de infecciones severas, el ciclo gametogénico del año siguiente (Robert *et al.*, 1991; Villalba *et al.*, 1993b).

La nueva especie descrita, *M. cochillia*, parasita también los túbulos digestivos del berberecho *C. edule*, provocando mortalidades elevadas (Carrasco *et al.*, 2011) (Figura 15).

Los mecanismos de defensa del hospedador frente a las especies del género *Marteilia* todavía no se conocen en profundidad. En general, la defensa del hospedador consiste en un aumento significativo de hemocitos circulantes en la hemolinfa (Carballal *et al.*, 1998) y una infiltración hemocitaria en las zonas parasitadas por *Marteilia* (Alderman, 1979; Figueras *et al.*, 1991; Villalba *et al.*, 1993a; Robledo y Figueras, 1995; Dang *et al.*, 2011).

La especie más estudiada en relación a la interacción con su hospedador es *M. sydneyi*. Se ha demostrado que los hemocitos de *S. glomerata*, principalmente los granulocitos, están implicados en el control de la infección por *M. sydneyi* (Newton *et al.*, 2004; Aladaileh *et al.*, 2007; Butt y Raftos, 2008; Kuchel *et al.*, 2010). *In vivo*, estas células son capaces de fagocitar células de *M. sydneyi* y, tras la fusión de los pseudópodos forman fagosomas, dentro de los cuales se incluye el parásito. Tras la formación de estos fagosomas, los lisosomas presentes en los hemocitos se fusionan a su membrana,

liberando los productos que contiene para llevar a cabo la digestión del parásito (Kuchel *et al.*, 2010). Los hemocitos son capaces de fagocitar esporangios maduros de gran tamaño (6-30  $\mu\text{m}$ ), mediante la formación de estos fagosomas y posterior melanización de los mismos (Butt y Raftos, 2008).

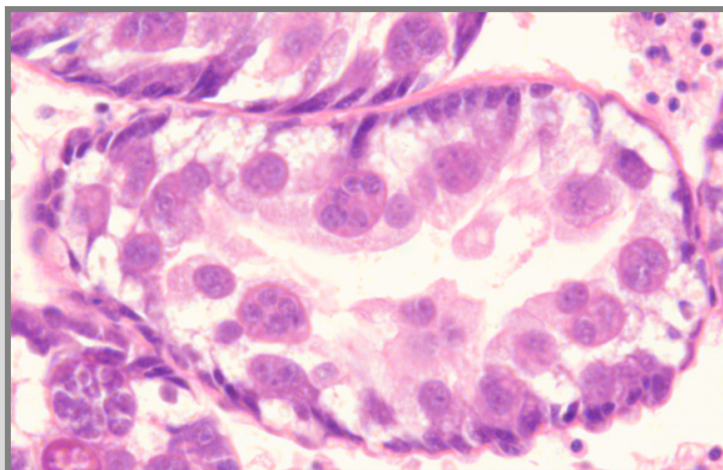


Figura 15. Corte histológico que muestra Marteilia cochillia parasitando los túbulos digestivos del berberecho Cerastoderma edule.

Numerosos estudios han demostrado la existencia de altos niveles de fenoloxidasa y fosfatasa ácida en el interior de los lisosomas de los hemocitos de ostras infectadas por *M. sydneyi* (Peters y Raftos, 2003; Newton *et al.*, 2004; Bezemer *et al.*, 2006; Butt y Raftos, 2008). La fenoloxidasa está implicada en la ruta de producción de melanina, necesaria para degradar al parásito dentro de las cápsulas hemocitarias. Se ha observado que ostras seleccionadas como resistentes a la enfermedad poseen una mayor actividad fenoloxidasa que ostras no seleccionadas y presentan hemocitos de mayor tamaño (Newton *et al.*, 2004; Butt y Raftos, 2008), lo que confirmaría su papel en la defensa frente al parásito. Peters y Raftos (2003) apuntan a que una de las dianas de *M. sydneyi* para sobrevivir dentro del hospedador, sería la inhibición de la cascada pro-fenoloxidasa, mediante la síntesis de proteínas serínicas que interfieren en la activación de esta cascada. De hecho, se ha observado la supresión de la actividad fenoloxidasa en ostras justo antes de la esporulación del parásito (Peters y Raftos, 2003; Butt *et al.*, 2006; Butt y Raftos, 2007). Por el momento el conocimiento sobre proteínas o genes implicados en la respuesta inmune de los moluscos frente a *Marteilia* spp. es limitado, aunque se han llevado a cabo algunos estudios preliminares que muestran una expresión diferencial de genes que codifican para enzimas antioxidantes en ostras infectadas por *M. sydneyi* y sanas (Green *et al.*, 2009), así como un aumento de proteínas de este tipo en ostras infectadas por el parásito (Simonian *et al.*, 2009).

### 2.3.5. Estrategias de lucha

La prevención de la marteiliosis es fundamental en acuicultura, ya que *M. refringens* y *M. cochillia* han causado grandes mortalidades y pérdidas económicas (Herrbach, 1971; Grizel *et al.*, 1974; Alderman, 1979; Grizel, 1985; Goulletquer y Héral,

1997; Carrasco *et al.*, 2011). Se han probado productos químicos como el azul de metileno, el verde malaquita y el furanace para intentar eliminar a *M. refringens* en ostras planas infectadas (Grizel, 1979). Con estos tratamientos no se consiguió erradicar el parásito y, en algunos casos, se mostraron tóxicos para las ostras.

La propagación epidémica puede evitarse estableciendo programas efectivos de control de movimientos de moluscos de áreas afectadas a áreas libres de la enfermedad. Una vez que el parásito se establece en una zona, las estrategias de lucha deben ir encaminadas a una mejor gestión de su cultivo, en base al conocimiento existente sobre su biología, y a buscar moluscos resistentes a la enfermedad. En áreas endémicas, debería evitarse el inicio del cultivo de semillas y juveniles de ostra plana entre junio y agosto, ya que es el periodo de transmisión de *M. refringens* (Perkins, 1993). El desarrollo de la marteiliosis podría minimizarse cultivando las ostras en aguas frías, con temperaturas menores a los 17° C, y con salinidades altas (Grizel, 1985; Bower *et al.*, 1994; Berthe *et al.*, 1998; Audemard *et al.*, 2001, 2002). Sin embargo, son necesarios más estudios que permitan evaluar la influencia de los factores bióticos y abióticos en el desarrollo de la enfermedad, así como conocer el ciclo de vida completo del parásito para buscar vías con que minimizar el impacto de esta enfermedad. Es de destacar la estrategia de lucha seguida en Australia frente a *M. sydneyi*. Tras más de 20 años desarrollando un programa de selección de ostras resistentes a la enfermedad han reducido la mortalidad de las poblaciones de *S. glomerata*, pasando de un 97% en ostras no seleccionadas a un 28% en ostras seleccionadas, y han reducido las pérdidas económicas que descendieron de un 52% a un 23% (Dove *et al.*, 2013a,b).

---

## 2.4. Mikrocytosis

---

### 2.4.1. Taxonomía

El género *Mikrocytos* lo propusieron Farley *et al.* (1988) para incluir a dos protozoos: *M. mackini*, causante de la enfermedad denominada “Denman Island Disease”, que afectaba a las ostras japonesas *C. gigas* en el entorno de la isla Denman (Columbia Británica, Canadá), y *M. roughleyi*, agente etiológico de la enfermedad “Winter mortality” responsable de elevadas mortalidades en las ostras *S. glomerata* en Australia. Estos autores incluyeron a ambos parásitos en el mismo género basándose en observaciones microscópicas, en las cuales se evidenciaba que ambos parásitos eran células pequeñas, menores de 5 µm, de tipo esférico y núcleo excéntrico que les daba una apariencia de huevo frito; en la especificidad celular, ya que ambos eran parásitos de hemocitos; y en su mismo modo de transmisión, directamente de ostra a ostra (Carnegie y Cochenec-Laureau, 2004).

A las especies del género *Mikrocytos*, junto a las del género *Bonamia*, se les denomina microcélulas por su tamaño pequeño y por ser parásitos de hemocitos de ostra. Ambos géneros se diferenciaron en función de los signos macroscópicos de las enfermedades que causaban y de sus especies hospedadoras (Farley *et al.*, 1988). La

ultraestructura de *M. mackini* también confirmó que se trataba de un parásito diferente a *Bonamia* spp., principalmente porque no se observaban mitocondrias u orgánulos equivalentes, ni haplosporosomas, excluyéndolos así de los Haplosporida (Farley *et al.*, 1988; Hine *et al.*, 2001b) (Figura 16).

Sin embargo, estudios morfológicos de *M. roughleyi* demostraron que este parásito mostraba más similitudes con el género *Bonamia* que con *Mikrocytos*, por poseer haplosporosomas y mitocondria (Hine *et al.*, 2001b; Cochennec-Laureau *et al.*, 2003a), lo que se confirmó mediante estudios moleculares (Cochennec-Laureau *et al.*, 2003a) y permitió un cambio en su asignación, pasando a llamarse *B. roughleyi*. Desde entonces, *M. mackini* ha sido la única especie integrante de este género y su posición filogenética dentro de los eucariotas ha sido una incógnita, ya que la secuencias de su ADN ribosómico obtenidas eran altamente divergentes con las de cualquier otro filo de Protistas (Carnegie *et al.*, 2003b).

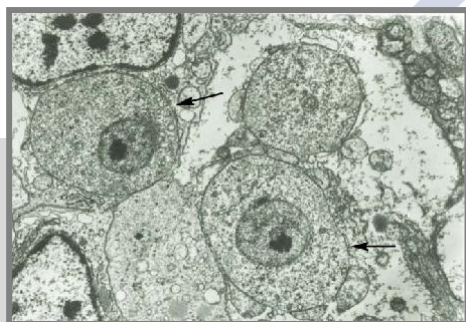


Figura 16. Micrografía de *Mikrocystos mackini* (flechas) infectando *Crassostrea gigas*. En el interior de las células se observa el núcleo con un nucleolo prominente. Fotografía de Bower (2015).

Adl *et al.* (2012) incluyeron al género *Mikrocystos* en el grupo Haplosporida. Sin embargo, el desarrollo de las nuevas tecnologías de secuenciación masiva han permitido secuenciar el transcriptoma de *M. mackini* y realizar estudios filogenéticos más robustos, usando un mayor número de genes (Burki *et al.*, 2013); estos estudios concluyeron que *M. mackini* ha de incluirse dentro del grupo Rhizaria y, aunque no aclararon su posición dentro del mismo, sugirieron que este género podría ser un taxón hermano de los Haplosporida (donde se incluye el género *Bonamia*). Por otra parte, Burki *et al.* (2013) demostraron que *M. mackini* no es un organismo amitochondrial, si no que posee "orgánulos mitocondriales reducidos" (MROs), lo que lo convierte en el primer organismo con MROs descrito dentro del grupo Rhizaria. Poco tiempo después, Hartikainen *et al.* (2014b) confirmaron que este género está incluido dentro de Rhizaria como taxón hermano a los Haplosporida. Además, el descubrimiento de nuevos organismos relacionados molecularmente con *Mikrocystos*, en nuevos hospedadores y rangos geográficos, permitió agruparlos en una nueva familia Mikrocystiidae, orden Mikrocystida e incluirlos en la clase Ascetospora (Hartikainen *et al.*, 2014b). Entre estos organismos mikrocystidos se describió la nueva especie, *M. mimicus*, que se detectó como parásito de la ostra japonesa *C. gigas*; también recientemente se ha descrito la especie nueva *M. boweri*, que infecta la ostra *Ostrea lurida* (Abbott *et al.*, 2014).

Existen otros parásitos de moluscos descritos como *Mikrocystos* sp. o tipo *Mikrocystos* cuya posición taxonómica no se ha establecido debido a la escasez de

secuencias disponibles de este género y a los pocos estudios ultraestructurales existentes (Gagné *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2010b; Garcia *et al.*, 2012). Las recientes descripciones de *M. mimicus* y *M. boweri*, que aportan un mayor conocimiento ultraestructural y molecular de este género, junto con los avances recientes en el análisis filogenético de *Mikrocytos*, favorecerán la descripción de nuevas especies y la asignación, si corresponde, de los *Mikrocytos* sp. a alguna de las especies ya descritas.

## 2.4.2. Epidemiología

### 2.4.2.1. Distribución geográfica y especies hospedadoras

Durante más de una década, *M. mackini* ha sido la única especie conocida representante de este género, con registro en un único hospedador, la ostra japonesa *C. gigas*, y en una sola localización geográfica, la Columbia Británica (Canadá) (Quayle, 1982; Bower, 1988; Farley *et al.*, 1988; Bower *et al.*, 1994; Abbott *et al.*, 2011). En los últimos años, el rango geográfico y hospedador de este género se ha ampliado notablemente. *M. mackini* también se ha detectado en Washington (EE. UU.) infectando *C. gigas* (Bower, 2010; Abbott *et al.*, 2011) y en California (EE. UU.) parasitando una nueva especie hospedadora *Crassostrea sikamea* (Elston *et al.*, 2012). Recientemente, la especie *M. boweri* también se ha descrito parasitando la ostra japonesa en la costa oeste de EE. UU. y la ostra *O. lurida* en la Columbia Británica (Canadá) (Abbott *et al.*, 2011; Abbott *et al.*, 2014), mientras que *M. mimicus* se describió infectando *C. gigas* en el Reino Unido (Hartikainen *et al.*, 2014b). También existen registros de *Mikrocytos* sp. infectando la ostra *O. lurida* de California (EE. UU.) (Friedman *et al.*, 2005), *O. edulis* en Nueva Escocia (Canadá) (Gagné *et al.*, 2008), *C. gigas* en China (Wang *et al.*, 2010b) y la almeja *Donax trunculus* en Francia (Garcia *et al.*, 2012). Abbott y Meyer (2014) apuntan que los parásitos tipo *Mikrocytos* que parasitan *C. gigas* de China y *O. edulis* de Canadá podrían tratarse de la especie *M. boweri*, ya que sus secuencias de ADN ribosómico son idénticas. Además, se han detectado diferentes secuencias de ADN de microcítidos en muestras ambientales de Reino Unido, entre las que se incluyen secuencias idénticas a las de *M. mackini* y *M. boweri* (Hartikainen *et al.*, 2014b).

### 2.4.2.2. Influencia de algunas características del hospedador y de factores ambientales en la parasitación

Se han realizado infecciones experimentales con *M. mackini* cuyos resultados indicaron que las especies *C. virginica*, *O. edulis* y *O. lurida* son susceptibles a la infección y que individuos jóvenes de ostra japonesa menores de 2 años también desarrollan la enfermedad (Bower *et al.*, 1997; Bower *et al.*, 2005). Este parásito presenta un patrón estacional de infección, detectándose por histología entre los meses de enero y junio y provocando mortalidades entre marzo y mayo (Bower, 1988; Farley *et al.*, 1988; Quayle, 1988). Esta estacionalidad está ligada a la dependencia de *Mikrocytos* por las bajas temperaturas del agua. Mediante experimentos de laboratorio se observó que ostras expuestas a *M. mackini* a temperaturas menores de 10 °C durante tres meses, desarrollaron la enfermedad, mientras que temperaturas de 15 °C inhibían su desarrollo,

aunque no eliminaban el parásito. Posteriormente, cuando estas ostras se sometieron de nuevo a temperaturas bajas, se recuperaba la infección (Hervio *et al.*, 1996; Bower *et al.*, 1997). Estos experimentos confirman lo observado en el campo, ya que las diferentes especies de *Mikrocytos* se han encontrado en latitudes altas, entre los 41°N de California (*M. mackini* parasitando *C. sikamea*) y los 53°N de Reino Unido (*M. mimicus* infectando *C. gigas*), en las cuales las temperaturas en invierno son cercanas o menores a 10°C (Bower, 1988; Quayle, 1988; Gagné *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2010b; Garcia *et al.*, 2012; Elston *et al.*, 2012; Abbott y Meyer, 2014; Hartikainen *et al.*, 2014b).

### 2.4.3. Ciclo de vida y transmisión

No se conoce el ciclo de vida completo de las especies del género *Mikrocytos*. Estudios de campo y laboratorio muestran que *M. mackini* puede transferirse de ostra a ostra directamente (Quayle, 1961; Bower *et al.*, 1997). Las células viables de *M. mackini* liberadas al morir el hospedador, son adquiridas probablemente por un individuo nuevo a través de los mecanismos de alimentación. Las células de *M. mackini* que se encuentran en los hemocitos pueden salir al exterior por diapédesis, a través del tracto intestinal y las branquias (OIE, 2012d). Se han identificado tres tipos de células en *M. mackini* y *M. mimicus*, en base a sus características ultraestructurales: (1) células quiescentes (QC) localizadas en el tejido conjuntivo vesicular, en hemocitos, extracelularmente y en los miocitos del músculo aductor y del corazón; (2) células vesiculares (VC) observadas sólo en los miocitos o extracelularmente cerca de ellos; (3) células endosomales (EC), que se encuentran en hemocitos, extracelularmente o en el tejido conjuntivo vesicular, pero nunca en miocitos (Hine *et al.*, 2001b; Hartikainen *et al.*, 2014b). Hine *et al.* (2001b) sugieren un posible ciclo de vida directo dentro de los tejidos del hospedador, en el cual las QC del tejido conjuntivo vesicular viajan a través de los hemocitos al músculo aductor o al corazón. En los miocitos de estos órganos, los QC adquieren ATP de las mitocondrias de las células del hospedador y se transforman en VC, que endocitan ATP y proteínas del miocito. Estas VC salen del miocito transformadas en EC y migran de nuevo, dentro de los hemocitos, al tejido conjuntivo vesicular. Estas EC obtienen energía y proteínas de las mitocondrias hemocitarias y desarrollan un retículo endoplasmático, un complejo de Golgi túbulo-vesicular, hacen la glucólisis y se dividen mediante cariocinesis para dar lugar a células hijas que se convierten en QC, empezando de nuevo el ciclo. Por el momento, no se han encontrado formas esporuladas o de resistencia que permitan al parásito sobrevivir en el medio externo y que indiquen la posibilidad de que el ciclo de vida de las especies del género *Mikrocytos* sea indirecto. Sin embargo, la reciente detección de diferentes secuencias de microcítidos, entre los que se encuentran *M. mackini* y *M. boweri*, en muestras ambientales que incluían copépodos y otros invertebrados, podría indicar que estos organismos actúan como vectores o transportadores de estos parásitos o, tal vez, podrían jugar un papel importante en el ciclo de vida de *Mikrocytos* como hospedadores intermediarios (Hartikainen *et al.*, 2014b).

#### 2.4.4. Interacción hospedador-parásito

Los signos macroscópicos provocados por *M. mackini* y *M. mimicus* en *C. gigas* incluyen lesiones focales pequeñas como ulceraciones, abscesos o pústulas, generalmente de color verde, de hasta 5 mm de diámetro, observadas principalmente en el manto, músculo aductor y palpos labiales (Figura 17). Adyacentes a los abscesos de la superficie del manto pueden existir cicatrices marrones en la concha. A pesar de estas lesiones, las ostras infectadas suelen estar en buen estado hasta el momento de su muerte, aunque cuando su estado es moribundo o muy débil cierran con lentitud y herméticamente las valvas (OIE, 2012d; Abbott y Meyer, 2014; Hartikainen *et al.*, 2014b). Sin embargo, no se han descrito signos macroscópicos de la enfermedad provocados por *M. mackini* en *C. sikamea*, por *M. boweri* en *C. gigas* u *O. lurida*, o en las almejas parasitadas por *Mikrocytos* sp.

A nivel histológico, *M. mackini*, *M. boweri* y *M. mimicus* suelen encontrarse en el citoplasma de las células del tejido conjuntivo vesicular, en las fibras del músculo aductor principalmente, aunque también se han observado en el epitelio de la glándula digestiva, gónada, intestino, corazón y branquias.

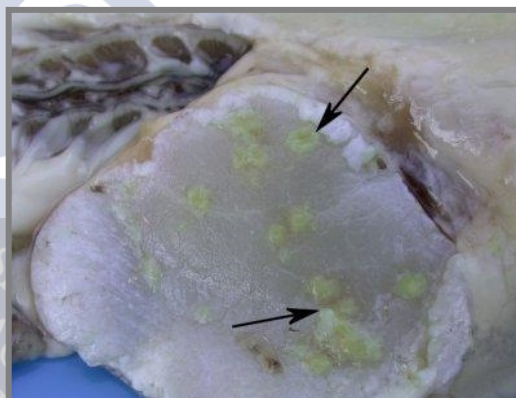


Figura 17. Músculo aductor de *Crassostrea gigas* mostrando las lesiones características (flechas) provocadas por *Mikrocytos mackini* en una infección avanzada. Fotografía de Bower (2015).

En estos órganos, provocan infiltraciones hemocitarias focales intensas asociadas con áreas de necrosis en los tejidos conjuntivos vesiculares. También se han encontrado evidencias de que los hemocitos pueden fagocitar estas microcélulas (Hine *et al.*, 2001b; Meyer *et al.*, 2005; Abbott *et al.*, 2014; Hartikainen *et al.*, 2014b). La información proporcionada sobre la detección de *Mikrocytos* sp. en *C. gigas* de China y en *O. edulis* de Nueva Escocia no incluye la descripción de infiltraciones hemocitarias focales en el tejido conjuntivo vesicular, posiblemente porque en el momento de la detección, la infección era subclínica (Gagné *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2010b). En la actualidad no existen estudios a nivel celular o molecular que aclaren las estrategias que siguen los parásitos de este género para desarrollar la infección dentro de sus hospedadores, ni de cómo se defienden éstos para vencerla. La ausencia de verdaderas mitocondrias en *Mikrocytos* y la proximidad del parásito a las mitocondrias de las células del hospedador, sugiere que éste podría transferir moléculas de ATP y otros materiales de las mitocondrias de las células hospedadoras a su citoplasma (Hine *et al.*, 2001b; Burki *et al.*, 2013).

### 3. Principales técnicas diagnósticas de parásitos de moluscos

El rápido crecimiento que ha experimentado el cultivo de moluscos en todo el mundo ha hecho cada vez más necesario el desarrollo de métodos de diagnóstico válidos, con el fin de (1) realizar una determinación temprana de la presencia de los patógenos en los cultivos, evitando así el contagio a animales sanos y la dispersión del agente infeccioso por otras áreas de cultivo, minimizando de esta forma los episodios de mortandades masivas; y (2) reducir o evitar los riesgos asociados a la transferencia incontrolada y al traslado de animales enfermos a zonas legalmente reconocidas como libres de la enfermedad. La OIE establece, en su Manual Diagnóstico, las técnicas de diagnóstico, prevención y control de las enfermedades de moluscos recogidas en el Código Acuático como enfermedades de declaración obligatoria. Este organismo cuenta con laboratorios de Referencia encargados de recibir y verificar las alertas sanitarias de estos patógenos. Por otra parte, el Laboratorio de Referencia de la Unión Europea (EURL) para enfermedades de moluscos, es el órgano encargado de estandarizar las técnicas de diagnóstico para los parásitos listados en la Directiva europea 2006/88/EC, estableciendo los denominados Procedimientos Operativos Estándar (SOP, *standard operating procedures*) en los cuales se recogen los métodos, protocolos y procedimientos estándar para cada parásito. El EURL es el encargado de promover pruebas en anillo para determinar qué técnicas de diagnóstico son más fiables.

El Manual Diagnóstico de la OIE recoge, en algunas enfermedades de parásitos de moluscos, la histología como método de referencia aunque recomienda otras técnicas, como las moleculares, para confirmar la identidad del agente patógeno. Sin embargo, estas técnicas, incluidas la histología, no siempre están validadas y, en algunos casos, ni siquiera se ha evaluado su especificidad y sensibilidad, habiéndose incorporado en muchos casos sin valorar su precisión, fiabilidad e idoneidad. El diseño de una nueva técnica diagnóstica debería incluir la evaluación de estos parámetros: 1) especificidad analítica y sensibilidad analítica, definidos como la especificidad que muestra la técnica en el laboratorio frente a otros organismos y el límite de detección de la técnica para su diana, respectivamente; 2) especificidad y sensibilidad relativa, proporción de animales sin la enfermedad con resultado del test negativo y proporción de moluscos con la enfermedad con test positivo comparados con otras técnicas, respectivamente; 3) exactitud relativa, nivel de similitud de los resultados comparándolos con otras técnicas y 4) repetibilidad, la probabilidad de obtener el mismo resultado al testar dos muestras idénticas en el mismo laboratorio. Además, a la hora de validar un método es importante realizar pruebas interlaboratorio que evalúen la reproducibilidad o probabilidad de obtener resultados similares para dos muestras idénticas en laboratorios diferentes.

La OIE recomienda para las especies de los géneros *Bonamia*, *Perkinsus*, *Marteilia* y *Mikrocytos* un método diagnóstico u otro en función de si se va a usar en programas de vigilancia, de detección específica o en un diagnóstico confirmativo, siguiendo criterios de disponibilidad, utilidad, sensibilidad y especificidad, coste, precisión o fiabilidad (Tabla 1). Por tanto, son muchos los factores que entran en juego a la hora de elegir la técnica de diagnóstico más adecuada para una determinada enfermedad y, en la mayoría de los casos, la combinación de varias de ellas suele ser lo más adecuado.

Tabla 1. Métodos estándar y recomendados recogidos por el Manual Diagnóstico (OIE, 2015) para los parásitos de moluscos de declaración obligatoria (se incluye además *M. mackini*). A: adultos; J: juveniles; L: larvas; P: postlarvas.

	Vigilancia		Diagnóstico provisional		Diagnóstico confirmativo	
	Métodos recomendados	Métodos estándar	Métodos recomendados	Métodos estándar	Métodos recomendados	Métodos estándar
<b><i>B. ostreae</i></b>	PCR (L,P,J, A) qPCR (L,P,J, A) Histopatología (J, A) Improntas (J, A)	-	Improntas PCR qPCR	Histopatología	MET Secuenciación	ISH PCR-RFLP
<b><i>B. exitiosa</i></b>	PCR (L,P,J, A) qPCR (L,P,J, A) Histopatología (J, A) Improntas (J, A)	-	Improntas PCR qPCR	Histopatología	Secuenciación	ISH PCR-RFLP MET
<b><i>P. olseni</i></b>	RFTM (L,P,J,A)	RFTM (L,P,J,A) PCR (L,P,J,A)	PCR	Histopatología RFTM	Secuenciación PCR	
<b><i>P. marinus</i></b>	PCR (P) RFTM (J,A)	Histopatología (P,J,A) PCR ISH (J, A)	PCR	Histopatología RFTM ISH	ISH	PCR Secuenciación
<b><i>M. refringens</i></b>	PCR (L,P,J,A) Histopatología (J, A)	Improntas (J,A)	Improntas PCR	Histopatología	PCR Secuenciación	ISH TEM
<b><i>M. sydneyi</i></b>	PCR (L,P,J,A) Improntas (J,A) Histopatología (J,A)	-	Improntas PCR	Histopatología	ISH PCR Secuenciación	
<b><i>M. mackini</i></b>	Histopatología (A)	PCR (J,A)	-	PCR Histopatología	ISH Secuenciación	Histopatología MET PCR

Las técnicas diagnósticas más usadas en patología de moluscos son: 1) técnicas de microscopía óptica, como los frotis e improntas de diferentes órganos y la histología estándar; 2) técnicas de microscopía electrónica; 3) métodos moleculares, siendo los más usados la PCR, las pruebas de polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) y PCR cuantitativas, que permiten detectar más de un taxón en una única prueba, y la ISH. Se han descrito métodos inmunológicos para algunos de los principales parásitos de moluscos, pero actualmente no están en vigor. En los apartados siguientes se aborda el estado del arte relativo a las técnicas moleculares para las especies parásitas objeto de este estudio.

### 3.1. Técnicas moleculares

El desarrollo de los métodos moleculares ha mejorado significativamente el diagnóstico de enfermedades de moluscos, debido a su especificidad y sensibilidad elevadas, una reproducibilidad mayor de los resultados y una rapidez mayor en el diagnóstico. Aun cuando los métodos histocitológicos son recomendados por la OIE como métodos de referencia para realizar controles de la bonamiosis, perkinsosis, marteiliosis y mikrocytosis, actualmente es necesario confirmar la identidad de los parásitos observados empleando técnicas moleculares.

El diseño de métodos moleculares de diagnóstico para la detección de parásitos de moluscos bivalvos requiere la búsqueda de marcadores moleculares que representen una región del genoma específica de cada una de las especies (o taxones) parásitas a diagnosticar (López-Flores *et al.*, 2007b). Las diferentes regiones del complejo génico que codifica los ARNs ribosómicos son los marcadores más ampliamente usados en diagnóstico de enfermedades de moluscos; este complejo incluye 4 genes que codifican para las subunidades ribosómicas 5S, 5.8S, 18S y 28S. Tres de ellos, 18S, 5.8S y 28S constituyen la unidad ribosómica (Figura 18) y están separados entre sí por secuencias espaciadoras denominadas espaciadores transcritos internos (ITS1 e ITS2).

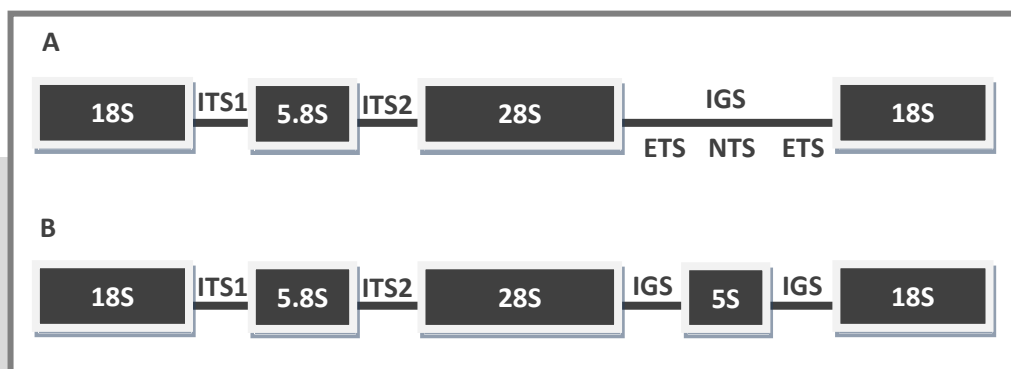


Figura 18. Organización cromosómica de los genes del ADN ribosómico. A) Eucariotas; B) Género Perkinsus.

Estas subunidades ribosómicas se repiten cientos de veces en el genoma y están separadas entre sí por regiones denominadas espaciadores intergénicos (IGS), compuestas a su vez por espaciadores externos transcritos (EST) y espaciadores no transcritos (NTS). Esta organización génica es característica de la mayoría de los organismos eucariotas, en los cuales el gen 5S se sitúa en otra región del genoma. Sin embargo, en bacterias y, de forma excepcional, en algunos eucariotas inferiores como en ciertos hongos, algas y protozoos, entre los que se encuentran el género *Perkinsus*, el gen que codifica para la subunidad 5S se encuentra incluido entre los genes 28S y 18S. Por su elevado número de copias, estos genes ribosómicos son muy útiles como marcadores moleculares en la detección de parásitos. Además, estos cuatro genes nucleares presentan la particularidad de que se encuentran entre las secuencias que evolucionan más lentamente a lo largo de la escala evolutiva, mientras que las regiones intergénicas, que no poseen función codificadora, muestran una elevada divergencia incluso entre especies relacionadas entre sí (Hillis y Dixon, 1991; López-Flores *et al.* 2007a). Por tanto, los genes que codifican para las subunidades ribosómicas pequeña (18S o SSU) y grande (28S o LSU) son adecuados para el diseño de cebadores específicos de un determinado género, mientras que los espaciadores intergénicos (ITS1 y 2 o IGS) son los elegidos para diseñar cebadores usados en el diagnóstico a nivel de especie. Otros genes menos usados en diagnóstico pero útiles para realizar estudios filogenéticos, debido a que presentan una tasa evolutiva diferente a los genes ribosómicos, son los genes que codifican proteínas como por ejemplo la actina. Esta proteína presenta la ventaja de que está presente en todas las células eucariotas y de que es una de las más conservadas a lo largo de la evolución.

La identificación molecular de los parásitos de moluscos debe hacerse diseñando cebadores que se unan específicamente a estos marcadores moleculares presentes en el parásito, ya que su ADN se encontrará de forma minoritaria en el ADN extraído del molusco infectado. Existen bases de datos de nucleótidos, como GenBank, o de genes, como UniGene, pertenecientes al Centro Nacional para la Información Biotecnológica-NCBI o entidades colaboradoras, como el Instituto Europeo de Bioinformática (EBI) y el banco de datos de ADN de Japón (DDBJ), que poseen secuencias de multitud de organismos distintos, entre las que se pueden encontrar las secuencias de ADN ribosómico de los parásitos de moluscos para el diseño de cebadores específicos (Álvarez y Gómez, 2007). El diseño de estos cebadores que se unirán de forma complementaria a secuencias específicas de ADN es la base de los métodos moleculares que se describen a continuación.

### **3.1.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

La PCR es el método molecular más utilizado de forma rutinaria en los laboratorios de diagnóstico de enfermedades infecciosas en acuicultura. Las técnicas basadas en la PCR permiten un diagnóstico rápido y específico de un parásito, y son útiles en estudios de epidemiología molecular en los que se evalúen, entre otros factores, la distribución espacio-temporal de la infección en un área determinada, las intensidades o prevalencias de infección o la relación existente entre la infección y la edad de su hospedador. También son empleadas en la búsqueda de hospedadores intermediarios de parásitos, o de organismos que puedan actuar como reservorios. Asimismo, la secuenciación de los

productos de PCR permite realizar la identificación taxonómica inequívoca del parásito mediante análisis filogenético. Existen diferentes variantes de la PCR, como la PCR multiplex convencional, la PCR-RFLPs o la PCR combinada con electroforesis en gel con gradiente desnaturante (DGGE), que permiten identificar varias especies en una misma prueba. Otra variante es la PCR en tiempo real que permite la cuantificación de los patógenos en estudio.

### **3.1.2. PCR-RFLPs (Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción)**

Los polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLPs) suponen pequeñas variantes nucleotídicas presentes en secuencias de ADN homólogas, que permiten obtener fragmentos de ADN de diferentes longitudes, al digerir toda la secuencia con endonucleasas de restricción específicas. De esta forma, un locus polimórfico puede ser identificado por la presencia o ausencia de un sitio de reconocimiento específico para una endonucleasa de restricción. Las pruebas de RFLP, usadas frecuentemente como marcadores moleculares en estudios de mapeo genómico y de análisis de variación genética, son también empleadas en el diagnóstico de enfermedades de moluscos. Los RFLP permiten diferenciar varias especies patógenas en una única prueba, mediante el empleo de una o varias enzimas de restricción cuya diana esté en una región polimórfica de los organismos que queremos identificar. Tras una PCR y posterior digestión con las enzimas, obtendremos diferentes perfiles de restricción para cada especie. Las ventajas de esta técnica son su rapidez, simplicidad y la reproducibilidad de los patrones de restricción. Sin embargo, no permite una identificación de especies adecuada en caso de infecciones leves, ya que el producto de PCR obtenido en estos casos suele ser insuficiente para realizar las pruebas de RFLPs. Por otra parte, en infecciones mixtas, en las que algunas especies están representadas de forma minoritaria frente al resto, se pueden obtener falsos negativos, debido a que el producto de PCR amplificado para ellas será más tenue y, en algunos casos, no permitirá la visualización de su perfil de restricción en el gel de agarosa.

### **3.1.3. PCR Multiplex**

Otro tipo de prueba basada en la tecnología de la PCR es la multiplex: una PCR en la que intervienen varias parejas de cebadores que amplifican varios productos en una única prueba. Esta técnica se usa frecuentemente para la identificación de patógenos, como por ejemplo para diferenciar especies de bacterias presentes en una muestra, distintos tipos de virus herpes o ADN virales (Edwards y Gibbs, 1994). Aunque todavía no es muy usada en el diagnóstico de enfermedades de moluscos, presenta grandes ventajas a la hora de detectar varios patógenos simultáneamente, como su rapidez y coste, ya que permite ahorrar en el coste de los reactivos. Todo esto, sumado a la gran sensibilidad y especificidad que posee por tratarse de una técnica molecular, convierten este tipo de pruebas en candidatos interesantes para realizar un cribado rutinario de los patógenos de moluscos más comunes.

### 3.1.4. PCR en tiempo real

La PCR en tiempo real es una variante de la PCR convencional que nos permite monitorizar, en tiempo real, lo que está ocurriendo dentro de cada tubo de ensayo en cada ciclo de amplificación. Esta monitorización de los amplificados es posible mediante la utilización de fluoróforos en la reacción de PCR, los cuales emiten señales de fluorescencia durante el proceso de amplificación que son recogidas por un sistema de detección de fluorescencia que lleva incorporado el termociclador. Existen diferentes tipos de fluoróforos, que se clasifican principalmente en agentes intercalantes del ADN y sondas de hibridación específica. El agente intercalante más usado es el fluorocromo SYBR Green, el cual aumenta notablemente la emisión de fluorescencia cuando se une al ADN de doble hélice amplificado. Este sistema de detección presenta la ventaja de que la optimización de las condiciones de la reacción de PCR es más sencilla y barata que cuando se emplean sondas de hibridación específicas, ya que solo se necesita diseñar cebadores y optimizar sus condiciones como en una PCR convencional. Por el contrario, su especificidad es menor, ya que posibles amplificados inespecíficos o dímeros de cebadores, también emiten fluorescencia que se suma a la emitida por el producto de PCR de interés. Además, el SYBR Green no permite realizar una prueba multiplex en la que estén presentes varias parejas de cebadores. En estas pruebas de PCR en tiempo real la especificidad de los productos amplificados se determina mediante la temperatura de fusión de los fragmentos amplificados ( $T_m$ ), que representa la temperatura a la que el 50% del ADN amplificado está desnaturalizado. Esta  $T_m$  dependerá de la longitud del fragmento de ADN y de la composición de sus bases nitrogenadas, por lo que cada producto de PCR tendrá su propia  $T_m$  específica.

Las sondas de hibridación específicas son sondas marcadas con dos tipos de fluorocromos, un donador y un aceptor, que emiten fluorescencia basándose en la transferencia de energía fluorescente mediante resonancia (FRET) entre ambas moléculas. Así, la sonda de ADN posee en sus extremos dos moléculas fluorescentes: en el extremo 5' la molécula donadora que emite fluorescencia al ser excitada y en el extremo 3' un aceptor que absorbe la fluorescencia liberada por el primero. Esta transferencia es dependiente de la distancia, por lo que ambas moléculas deben estar próximas y el espectro de emisión de la primera debe solaparse con el de absorción de la segunda. Mientras la sonda está intacta, la fluorescencia emitida por el donador es absorbida por el aceptor. Sin embargo, la sonda complementaria al ADN diana, se une a éste en la fase de anillamiento de la PCR y, en la fase de extensión, la Taq polimerasa con su actividad 5' exonucleasa hidroliza el extremo 5' de la sonda, separando la molécula donadora. Debido a la mayor distancia existente entre donador y aceptor, la fluorescencia no se transmite entre ambas moléculas y es captada por el lector de fluorescencia. Existen una amplia variedad de sondas de hibridación específica pero las más utilizadas son las sondas TaqMan, molecular beacons y sondas FRET. Las pruebas de PCR en tiempo real que utilizan estas sondas requieren también el diseño de cebadores para amplificar un fragmento de ADN pero, al contrario de lo que sucedía con el agente intercalante SYBR Green, la especificidad en este caso no se obtiene mediante la  $T_m$ , sino que es proporcionada por las sondas específicas. El aumento de ADN durante la PCR se corresponde con un aumento de hibridación de la sonda específica y, por tanto, de fluorescencia emitida. Esto proporciona una alta especificidad

que permite incluso detectar polimorfismos o mutaciones puntuales. Además, el empleo de varias sondas con diferentes fluoróforos y dianas hace posible una prueba multiplex. Sin embargo, el uso de sondas encarece notablemente la prueba de PCR y su optimización es mucho más compleja que en el caso del SYBR Green.

La principal ventaja que presenta la PCR en tiempo real frente a la PCR convencional es la posibilidad de cuantificar moléculas de ADN, lo que permite estimar intensidades de infección. Las señales fluorescentes de cada ciclo de PCR se convierten en un valor numérico para cada muestra analizada, lo que hace viable cuantificar el ADN molde inicial de una muestra. La cuantificación puede ser absoluta, si es posible realizar una curva estándar en la que se asocien concentraciones conocidas del ADN a analizar con unos determinados valores de fluorescencia, o relativa, cuando se comparan los valores de fluorescencia obtenidos frente a un ADN de referencia. Otras ventajas de la PCR en tiempo real frente a la PCR convencional son su rapidez, ya que no se necesita un análisis posterior de los productos amplificados en geles de agarosa; el menor riesgo de contaminación, ya que toda la prueba se realiza en un sistema cerrado, y la posibilidad de detectar polimorfismos o mutaciones. Estas ventajas, junto a una mayor sensibilidad que las PCR convencionales, como veremos posteriormente, la convierten en una potente herramienta para el diagnóstico de enfermedades de moluscos así como para estudios epidemiológicos en los que se valore el progreso de la infección a lo largo del tiempo o crecimiento del molusco, el seguimiento de la evolución de las infecciones en diferentes órganos, o para contribuir al estudio del ciclo de vida de los parásitos.

### **3.1.5. PCR-DGGE (Electroforesis en Gel con Gradiente Desnaturalizante)**

La electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante (DGGE, “*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*”) es un tipo de electroforesis que permite la separación de fragmentos de ADN del mismo tamaño pero con diferente secuencia de nucleótidos. Esta electroforesis se lleva a cabo en geles de poliacrilamida a los que se les incorpora un gradiente lineal creciente de agentes químicos desnaturalizantes del ADN (urea y formamida). Durante la electroforesis, los fragmentos de ADN de doble cadena migran por el gel hasta encontrar una determinada concentración desnaturalizante, que hace que se separen las cadenas parcialmente, disminuyendo o deteniendo su migración. La concentración desnaturalizante que separa cada molécula de ADN dependerá de su contenido en dobles o triples puentes de hidrógeno, dependiendo de si son pares de bases adenina-timina o citosina-guanina (Myers *et al.*, 1987). Esto provocará que un producto de PCR que contenga moléculas de ADN del mismo tamaño, pero distinta composición nucleotídica, no migre en una sola posición como en los geles de agarosa, sino que cada molécula diferente tendrá diferentes posiciones en los geles DGGE. Además, para evitar que las moléculas de ADN se desnaturalicen completamente y no queden retenidas en el gel, la amplificación por PCR de los fragmentos a analizar por DGGE requiere la adición de una cola rica en nucleótidos GC denominada clamp. El clamp es una secuencia de 30-50 pares de bases de guanina-citosina, que se añade al extremo 5' de uno de los cebadores y es amplificada en cada PCR con el fragmento de ADN diana (Myers *et al.*, 1987). Los triples puentes de hidrógeno de esta cola, no permiten que la molécula se desnaturalice en su

extremo 5', pero sí lo hará el resto dependiendo de la composición y concentración desnaturalizante, quedando la molécula retenida en el gel.

Este método tiene un alto poder de discriminación, detectando hasta variaciones de un nucleótido en una secuencia de ADN (Fisher y Lerman, 1983; Lerman y Beldjord, 1999).

### 3.1.6. Hibridación *in situ* (ISH)

Las técnicas moleculares basadas en PCR permiten detectar ADN del parásito pero no dan información acerca de la viabilidad del mismo, ni de su localización histológica exacta. Así, resultados positivos por PCR no indican una infección real, ya que el parásito puede no ser viable o puede que su localización no sea en los tejidos del hospedador sino en la superficie externa o en un lumen comunicado con el exterior, sin causar infección (Burreson, 2008). Es importante, por lo tanto, visualizar el parásito en los tejidos del hospedador. La ISH es la técnica más adecuada para esto, ya que ofrece las ventajas de la histología y la especificidad de las técnicas moleculares. Se basa en el uso de una secuencia de ADN complementaria al ADN del parásito a detectar, que se unirá a él de forma específica, y que va marcada con compuestos que permiten una clara visualización del mismo (Figura 19). Estos compuestos suelen ser fluoróforos o una molécula de origen vegetal de la que se disponen anticuerpos específicos denominada digoxigenina.

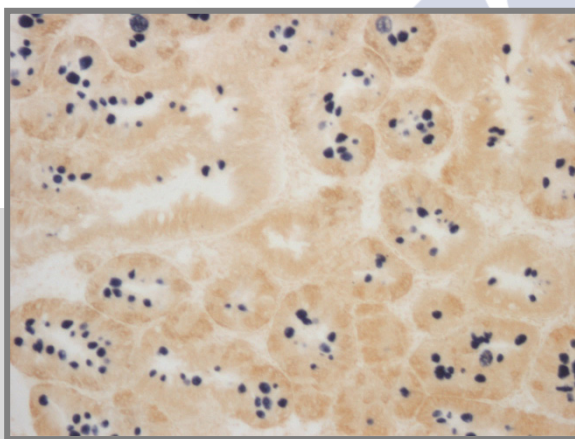


Figura 19. Hibridación *in situ* de *Marteilia refringens* (puntos azules) parasitando los túbulos digestivos de *Ostrea edulis*.

La ISH consume más tiempo que las técnicas de PCR por lo que no es muy útil para el diagnóstico rutinario de un gran número de muestras. Sin embargo, el diagnóstico por técnicas de PCR de especies nuevas de parásitos o de las ya existentes en hospedadores nuevos debería confirmarse mediante ISH, para descartar la posibilidad de que se trate de falsos positivos o de parásitos inviables. Además, la ISH puede dar información sobre: 1) la interacción entre el hospedador y el parásito como por ejemplo qué órganos o tejidos están infectados y el grado y avance de la infección; 2) la presencia/ausencia de varias especies de parásitos causando infecciones mixtas en un mismo hospedador y 3) el ciclo de vida, ya que se puede observar la presencia de diferentes estadios de un parásito y visualizarlo en hospedadores intermediarios.

### 3.1.7. Secuenciación masiva

Los avances tecnológicos de los últimos años han conducido al desarrollo de la secuenciación de nueva generación (*next generation sequencing*, NGS), también conocida como secuenciación masiva paralela, del inglés *massive parallel sequencing* (MPS). Este proceso de secuenciación en paralelo produce miles o millones de secuencias a la vez, abaratando enormemente la secuenciación de ADN. Las tecnologías de secuenciación masiva incluyen varias etapas que pueden agruparse en la preparación del “template” o plantilla, secuenciación, sistema de imagen y análisis de datos. La combinación única de protocolos específicos distingue una tecnología de otra y determina la clase de datos producidos en cada plataforma (Harismendy *et al.*, 2009; Metzker, 2010). Un punto común entre todas las tecnologías de NGS es que la plantilla se une o inmoviliza en una superficie sólida o soporte, lo que permite que las moléculas estén separadas espacialmente y se puedan llevar a cabo miles e incluso millones de reacciones de secuenciación simultáneamente. Los métodos existentes para la preparación de la plantilla se clasifican en aquellos en los que es necesario una amplificación previa del ADN (Clonally amplified templates) y los que no necesitan de una PCR previa (Single-molecules templates). Incluidos en el primer grupo se encuentran los dos métodos más comunes de preparación de la plantilla: 1) PCR en emulsión, en la cual se crea una librería de fragmentos a los que se les unen en los extremos una serie de adaptadores universales, lo que permite amplificar todo el ADN con una misma pareja de cebadores. Posteriormente, el ADN de doble cadena se separa en ADN de cadena sencilla y se captura sobre la superficie de unas bolas de agua, de forma que en cada bola haya una sola molécula de ADN. Estas bolas se depositan en pocillos individuales de una placa de muy pequeño volumen en los cuales se realiza la secuenciación, o previamente se pueden inmovilizar en una superficie, como por ejemplo un gel de poliacrilamida; 2) Amplificación en fase sólida, que se basa en la fijación de los cebadores en un soporte de vidrio, lo que permite obtener grupos de fragmentos amplificados separados espacialmente y con extremos libres a los cuales se les pueden unir cebadores universales para realizar la secuenciación. Los métodos que no necesitan amplificación previa del ADN se basan en la inmovilización del ADN molde, DNA polimerasa y/o cebadores sobre un soporte sólido.

Las estrategias principales de secuenciación incluyen pirosecuenciación (Ronaghi *et al.*, 1998), la terminación reversible cíclica (Metzker, 2005), la secuenciación por medio de la enzima ADN liasa (Tomkinsosn *et al.*, 2006) y la secuenciación en tiempo real (Eid *et al.*, 2009). La NGS produce una cantidad de datos tan elevada que requiere un análisis computacional para realizar los ligamientos de las lecturas obtenidas en base a una secuencia de referencia o un ensamblaje *de novo* (Trapnell y Salzberg, 2009).

El uso de esta tecnología en bivalvos sirvió para realizar diversos estudios como los encaminados a identificar genes implicados en la respuesta inmune (Moreira *et al.*, 2012; Philipp *et al.*, 2012; Rosa *et al.*, 2012; Leite *et al.*, 2013; McDowell *et al.*, 2014, Menike *et al.*, 2014, Moreira *et al.*, 2014, Pauletto *et al.*, 2014, Zhang *et al.*, 2014; Gómez-Chiarri *et al.*, 2015; He *et al.*, 2015; Meng *et al.*, 2014) o para investigar procesos biológicos como la deposición de la concha o la biomineralización de almejas (Clark *et al.*, 2010; Joubert *et al.*, 2010). La tecnología NGS se ha empleado para realizar un estudio transcriptómico de *M. mackini*, que permitió obtener gran cantidad de genes, entre los que

se encuentran genes con gran relevancia taxonómica (Burki *et al.*, 2013). Por el momento la NGS es poco usada en el diagnóstico o identificación de especies patógenas de moluscos bivalvos, aunque ya se ha publicado un estudio en el cual se usó esta tecnología para la detección de la nueva especie y nuevo género *Paramikrocytos canceri*, parásito mikrocítico del cangrejo *Cancer pagurus*, y de la especie *Haplosporidium littoralis* que infecta el hepatopáncreas de *Carcinus maenas* (Hartikainen *et al.*, 2014b).

---

## 3.2. Métodos moleculares para el diagnóstico de *Bonamia*, *Perkinsus*, *Marteilia* y *Mikrocytos*

---

### 3.2.1. Género *Bonamia*

Se han descrito diversos protocolos de PCR para el diagnóstico de *Bonamia* spp., tres de los cuales están recogidos en el Manual de Test diagnósticos para Animales Acuáticos de la OIE (OIE, 2012 a, b). Estos protocolos de PCR emplean cebadores diseñados en la región SSU de los parásitos de este género: 1) Bo/Boas (Cochennec *et al.*, 2000) que amplifican un producto de PCR de 300 pb, pero que no son específicos de *B. ostreae* si no que pueden amplificar otros Haplosporida; 2) CF/CR (Carnegie *et al.*, 2000), que dan lugar a un producto de 760 pb y que detectan, al menos, *B. ostreae* y *B. exitiosa*, y 3) BoosF03/BoosR03, que amplifican 352 pb y su especificidad se limita a *B. ostreae* (Engelsma *et al.*, 2010). Para la identificación específica, en la prueba descrita por Cochennec *et al.* (2000), el producto de PCR obtenido por amplificación con los cebadores Bo/Boas se digiere con la enzima *BglI*. Esta restrictasa produce dos perfiles de restricción diferentes: una banda de 300 pb para *B. exitiosa* y dos bandas de 120 pb y 180 pb para *B. ostreae* (Hine *et al.*, 2001a, Cochennec-Laureau *et al.*, 2003a). Otros protocolos de PCR para *Bonamia* spp. basados en la región SSU, son los descritos por Marty *et al.* (2006) empleando una pareja de cebadores denominada BO-1/BO-4, que amplifican 237 pb, y por Abollo *et al.* (2008) quienes diseñaron los cebadores BOG-F/BOG-R, que dan lugar a un amplificado de aproximadamente 665 pb. Este último protocolo permite la identificación específica de *B. exitiosa* y *B. ostreae* si el producto de PCR es digerido con la enzima de restricción *Sall*, que produce dos perfiles de restricción diferentes para ambas: dos bandas de 319 y 350 pb para *B. exitiosa* y una única banda de 665 pb para *B. ostreae* (Abollo *et al.*, 2008). Carnegie *et al.* (2006) también diseñaron un protocolo de PCR para detectar *B. perspora*, aunque su especificidad no se evaluó frente a otras especies de *Bonamia*.

Actualmente existen tres protocolos de PCR en tiempo real recomendadas por la OIE para el diagnóstico de la bonamiosis. Los procedimientos descritos por Corbeil *et al.* (2006b) y Marty *et al.* (2006) emplean sondas TaqMan y amplifican todas las especies del género. La prueba descrita por Robert *et al.* (2009) emplea SYBR Green como fluoroforo y permite la detección y cuantificación específica de *B. ostreae*. Engelsma y Voorbergen-Laarman (2009) basándose en el diseño de Corbeil *et al.* (2006b), describieron un nuevo protocolo de PCR en tiempo real empleando SYBR Green. Mediante esta nueva PCR, Carrasco *et al.* (2012a) identificaron, en una única prueba, *B. ostreae* y *B. exitiosa* en base a

los diferentes valores de Tm que presenta cada una de las especies (*B. ostreae* 78.5 °C y *B. exitiosa* 79.8 °C). Sin embargo, la proximidad de ambos valores hace que este método sólo sea válido para realizar un diagnóstico presuntivo a nivel de especie y que la identificación deba corroborarse mediante otras pruebas más específicas (Carrasco *et al.*, 2012a).

Se han desarrollado varios protocolos de ISH para la detección de *Bonamia* spp. en cortes histológicos. Por un lado, los cebadores Bo/Boas descritos anteriormente se usaron para sintetizar una sonda polinucleotídica que lleva incorporada digoxigenina (Cochennek *et al.*, 2000). Tanto la especificidad como la sensibilidad de esta sonda son más elevadas que las del diagnóstico por histología convencional. Sin embargo, esta sonda muestra reacción cruzada con otras especies de *Bonamia* y otros Haplosporida. Carnegie *et al.* (2003a) diseñaron otro protocolo de ISH basado en la región ITS1 de *B. ostreae*, usando un conjunto de tres oligosondas marcadas con fluoresceína (UME-BO-1, 2, 3), con el objetivo de aumentar la sensibilidad, que mostró ser mayor que la sensibilidad del método histológico. Sin embargo, estas sondas presentan reacción cruzada con *B. exitiosa*. Otros autores también usaron un conjunto de tres oligosondas (CaBon166, CaBon461, CaBon1704) marcadas con digoxigenina para el clado *B. exitiosa*-*B. roughleyi*, pero no evaluaron la especificidad ni la sensibilidad de las mismas (Hill *et al.*, 2010). Carnegie *et al.* (2006) diseñaron un conjunto de 4 oligosondas con marcaje fluorescente (*B. perspora*-ISH-1, 2, 3, 4) para identificar *B. perspora* en los tejidos de ostra *O. stentina* y conocer las preferencias celulares y tisulares del parásito. Este protocolo de ISH se probó frente a tejidos de ostra *C. ariakensis* parasitada por *B. exitiosa* y sus resultados fueron negativos. Sin embargo, su especificidad frente a *B. ostreae* y otros haplosporidos es desconocida.

### 3.2.2. Género Perkinsus

La OIE recoge en su Manual de Test Diagnósticos para Animales Acuáticos las técnicas moleculares recomendadas para las dos especies de *Perkinsus* listadas por esta organización, *P. marinus* y *P. olseni*, entre los que se encuentran varios protocolos de PCR. Este organismo recomienda, para la vigilancia del género *Perkinsus* y de la especie *P. marinus*, realizar un primer análisis de PCR con los cebadores genéricos PerKITS-750/PerKITS-85 (Casas *et al.*, 2002), y una segunda prueba con los cebadores PmarITS-70F/PmarITS600R para identificar *P. marinus* (Audemard *et al.*, 2004b). En el caso de *P. olseni*, la OIE recomienda el uso de dos protocolos de PCR cuya diana es la región NTS de esta especie, localizada entre el gen ribosómico 5S y el gen SSU. La primera pareja de cebadores, PA690F/PA690R amplifican un fragmento de 690 pb de dicha región (Robledo *et al.*, 2000) y su especificidad se evaluó frente a *P. marinus* y *P. chesapeakei*, pero no frente a otras especies. La sensibilidad analítica de esta técnica muestra que su límite de detección es bajo, aunque no se ha evaluado frente al método de cultivo en caldo tioglicolato (RFTM). La segunda pareja de cebadores, PK1/PK2, amplifica un fragmento de 554 pb de la región NTS de *P. olseni*, pero su especificidad y sensibilidad no se han estudiado (De la Herrán *et al.*, 2000). Existen otros protocolos de PCR convencional específicos para el género *Perkinsus* (Robledo *et al.*, 2002; Gauthier *et al.*, 2006) y para *P. marinus* y *P. olseni* que no están recogidos por la OIE en su manual (Fong *et al.*, 1993; Marsh *et al.* 1995; Hamaguchi *et al.*, 1998; Robledo *et al.*, 1998; Park *et al.*, 2002; Pecher *et al.*

*al.*, 2008). También se ha desarrollado un protocolo de PCR para el diagnóstico específico de *P. chesapeaki*, usando como diana la región NTS del parásito. La especificidad de sus cebadores, NTS6/NTS7, se evaluó frente a *P. marinus* y *P. olsenii* y su sensibilidad analítica se mostró alta, detectando cantidades de hasta 100 fg de ADN del parásito (Coss *et al.*, 2001b). Moss *et al.* (2008) desarrollaron un protocolo específico para *P. beihaiensis* que amplifica un fragmento de su región ITS1-5.8S-ITS2. Los cebadores diseñados, PerkITS-85/PerkITS-430R, se testaron frente a las restantes especies de *Perkinsus*, frente a algunos dinoflagelados y haplosporidios, mientras que su sensibilidad analítica no se evaluó. Asimismo, se diseñaron unos cebadores específicos para *P. qugwadi*, denominados PqguF7TC/PQ3R, que amplifican un fragmento de 281 pb de la región ITS1-5.8S-ITS2 de este parásito (Itoh *et al.*, 2013). Este test no amplifica ADN de ninguna otra especie de *Perkinsus*, excepto una banda tenue de *P. chesapeaki* de tamaño mayor (300 pb). Esta prueba muestra unos límites de detección bajos y su sensibilidad es superior a la del diagnóstico por histología. En la actualidad no existen protocolos de PCR para la detección específica de *P. mediterraneus*, ni para *P. honshuensis*, lo que facilitaría un diagnóstico más rápido y sensible de estas especies.

Se han desarrollado protocolos PCR-RFLPs útiles para la identificación de varias especies de *Perkinsus*, entre ellos el descrito por Abollo *et al.* (2006) y recomendado por la OIE. En esta prueba el producto de 703 pb amplificado con los cebadores PerkITS-750/PerkITS-85 (Casas *et al.*, 2002), es digerido con la enzima *RsaI* produciendo un patrón de bandas específico para *P. marinus*, *P. chesapeaki* y *P. olsenii*/*P. mediterraneus*. A su vez, *P. olsenii* y *P. mediterraneus* pueden diferenciarse mediante restricción con la endonucleasa *HinfI*. Se ha publicado otro protocolo de RFLP diseñado para diferenciar *P. olsenii* de *P. honshuensis* presentes en la almeja japonesa, usando la enzima de restricción *DdeI* (Takahashi *et al.*, 2009). Sin embargo, la diana de *DdeI* se sitúa en una zona polimórfica dentro de la región ITS de *P. olsenii*, y algunas variantes de esta especie no dan el perfil esperado (Ramilo *et al.*, datos no publicados).

Penna *et al.* (2001) diseñaron un procedimiento de PCR multiplex para la detección de *P. marinus*, *Haplosporidium nelsonii* y *Haplosporidium costale*, responsables de las elevadas mortalidades de la ostra *C. virginica*. Posteriormente, Russell *et al.* (2004) diseñaron una PCR multiplex mejorada para detectar estas especies parásitas que permite, a su vez, detectar el ADN del hospedador *C. virginica*, que sirve de control interno de PCR para evitar falsos negativos.

También se han descrito varios protocolos de PCR en tiempo real para la cuantificación de parásitos del género *Perkinsus*. El primero de ellos emplea el fluoróforo SYBR Green y los cebadores PerkITS-750/PerkITS-85, descritos por Casas *et al.* (2002), mostrando una sensibilidad mayor que la PCR convencional descrita por estos autores (Audemard *et al.*, 2004b). La segunda PCR en tiempo real se trata de una prueba TaqMan en el que se diseñan nuevos cebadores específicos para el género *Perkinsus*, PERK-F/PERK-R, y una sonda marcada fluorescentemente que hibrida con el fragmento amplificado (Gauthier *et al.*, 2006). Su sensibilidad y especificidad es mayor que la del RFTM, muy usado para el diagnóstico de perkinsosis (Ray, 1966). Además, se ha desarrollado un protocolo de PCR en tiempo real dúplex, capaz de detectar y cuantificar simultáneamente y de forma específica *Haplosporidium* spp. y *Perkinsus* spp. Dos parejas

de cebadores específicos para cada género, junto con sondas de hibridación para cada fragmento amplificado, permiten la detección de estos dos géneros en una única prueba (Xie *et al.*, 2013). La especificidad de esta técnica se evaluó frente a patógenos como *M. refringens*, *Toxoplasma gondii*, *B. ostreae*, *Escherichia coli*, *Cyprinidinium* spp., *M. mackini* o *Vibrio parahaemolyticus* y su sensibilidad analítica fue alta (200 copias de ADN<sub>r</sub>). Para *P. marinus* se han diseñado varios protocolos de PCR en tiempo real, como los de Audemard *et al.* (2004b), Gauthier *et al.* (2006), Ulrich *et al.* (2007) y De Faveri *et al.* (2009). También se ha desarrollado un protocolo para cuantificar *P. olseni* y otro para *P. honshuensis* (Umeda *et al.* 2012). No se han descrito protocolos de PCR en tiempo real que permitan cuantificar *P. chesapeaki*, *P. mediterraneus*, *P. beihaiensis* y *P. qugwadi*.

Para el género *Perkinsus*, la OIE recomienda un protocolo de ISH desarrollado por Elston *et al.* (2004). La oligosonda (Perksp700DIG) de ADN, complementaria a la SSU de *Perkinsus* spp., lleva un marcaje de digoxigenina en su extremo 5'. La especificidad de este protocolo se evaluó frente a varias especies de *Perkinsus* y a parásitos haplosporidios y dinoflagelados. Este método es más sensible que la histología, pero no se ha comparado con el RFTM. Se ha descrito otra oligosonda que muestra especificidad a nivel de género, PK-5.8S-DIG, diseñada en la región 5.8S de *Perkinsus* spp. La especificidad de esta sonda se evaluó frente a otros patógenos de moluscos como *Minchinia tapetis*, Rickettsias, microsporidios, *Nematopsis* sp., hemogregarinas y coccidios (Navas, 2008). A nivel de especie se han desarrollado protocolos de ISH específicos para *P. marinus*, *P. chesapeaki*, *P. olseni* y *P. beihaiensis*. El primero de ellos, diseñado para detectar *P. marinus*, es uno de los métodos recomendados por la OIE para la confirmación de este parásito (Moss *et al.*, 2006). Para la detección de *P. olseni* también se ha desarrollado un protocolo de ISH específico para la especie, mediante la sonda PK-IGS-DIG que hibrida en la región IGS. La especificidad de esta sonda se demostró frente a *P. chesapeaki*, *P. mediterraneus* y *P. marinus* (de la Herrán, 1998; de la Herrán *et al.*, 2000; Navas, 2008). Otras dos oligosondas con marcaje de digoxigenina y diseñadas en base a la región LSU de *P. beihaiensis* y *P. chesapeaki* son PerkBehLSU (Moss *et al.*, 2008) y PchesLSU-485 (Reece *et al.*, 2008), respectivamente. Su especificidad se ha demostrado frente a otras especies de *Perkinsus*. Basándose en esta región, Reece *et al.* (2008) también diseñaron un grupo de dos sondas marcadas fluorescentemente específicas para *P. chesapeaki* (PchesLSU-485 y P. chesLSU-690) y otro grupo de tres sondas específicas para *P. marinus* (PmarLSU-181, PmarLSU-420 y PmarLSU-560). El uso de más de una sonda aumenta la sensibilidad de la técnica y el marcaje con distintos fluoróforos permite detectar varias especies en una misma prueba. No se han desarrollado protocolos de ISH específicos para *P. mediterraneus*, *P. honshuensis* y *P. qugwadi*.

### 3.2.3. Género *Marteilia*

El primer protocolo de PCR descrito para el diagnóstico de la marteiliosis fue el desarrollado por Anderson *et al.* (1995). Posteriormente, en base a esta secuencia, se diseñaron los denominados LEG1/PRO2, que amplifican un fragmento de 195 pb dentro de la región ITS1 de *M. sydneyi* (Kleeman y Adlard, 2000). Estos cebadores específicos son los recomendados por la OIE para el diagnóstico de esta especie mediante PCR, aunque el

protocolo no se ha validado frente a la histopatología. Su especificidad se ha demostrado frente a *M. refringens* y *Marteilioides chungmuensis* (Kleeman *et al.*, 2002b) y su sensibilidad es alta (Kleeman y Adlard, 2000).

En 1999, se publicó el primer protocolo de PCR para la detección específica de *M. refringens* (Le Roux *et al.*, 1999). Estos autores diseñaron un grupo de cebadores específicos a nivel de especie y los combinaron entre ellos y con cebadores universales. Entre estas combinaciones las parejas de cebadores SAS2/SS2 y SAS1/SS2, detectaron específicamente *M. refringens*. La especificidad de estos cebadores también se evaluó frente a *M. sydneyi* y *M. chungmuensis* (Kleeman *et al.*, 2002b). Sin embargo, el ADNr de la nueva especie *M. cochillia* también se amplifica con los cebadores SAS1/SS2, lo que demuestra que no son específicos a nivel de especie (Carrasco *et al.*, 2012b). Berthe *et al.* (2000) utilizaron otros dos cebadores descritos por Le Roux *et al.* (1999), CAS2/SS1, para amplificar la región completa SSU del ADNr de *M. refringens*. La OIE, recomienda el método descrito por Le Roux *et al.* (2001), considerándolo un protocolo específico para esta especie, ya que la región ITS1 es más fiable para una detección a nivel de especie. Sin embargo, este protocolo (empleando los cebadores Pr3/PR4/Pr5) también amplifica la recientemente descrita *M. cochillia* (Carrasco *et al.*, 2012b). Además de los protocolos descritos, se han publicado un par de protocolos de PCR anidada para el diagnóstico de *M. refringens*, los descritos por Pernas *et al.* (2001) y López-Flores *et al.* (2004). Este último se diseñó para amplificar un fragmento de la región IGS de *M. refringens* mediante los cebadores MT1/MT2 para la primera ronda de PCR y MT2B/MT1B para la segunda ronda PCR. Este protocolo es más sensible que las PCR convencionales descritas pero, al igual que en los casos anteriores, estos cebadores también amplifican la IGS de *M. cochillia* (Carrasco *et al.*, 2012b), lo que pone de manifiesto que las pruebas de PCR descritas para el diagnóstico de *Marteilia refringens* no son específicas a nivel de especie.

Actualmente existen dos protocolos de PCR-RFLPs descritos para discriminar especies de *Marteilia*. El procedimiento descrito por Le Roux *et al.* (2001) permite diferenciar entre *M. refringens* y *M. maurini*, pero actualmente está en desuso ya que se consideran la misma especie. También se ha descrito un procedimiento de PCR-RFLPs para diferenciar entre *M. refringens* y *M. cochillia*. Tras la amplificación con los cebadores MT2B/MT1B (López-Flores *et al.*, 2004), se realiza la prueba de restricción con la enzima *Bgl*III. Esta enzima produce un perfil de dos bandas para *M. cochillia* (192 y 166 pb) y una única banda para *M. refringens* (358 pb) (Carrasco *et al.*, 2012b).

Existen varios protocolos de ISH descritos para *M. refringens* y *M. sydneyi* que emplean sondas polinucleotídicas sintetizadas empleando los cebadores ya descritos en el apartado anterior, a los cuales se les incorpora un marcaje con digoxigenina. Una de estas sondas es la denominada Smart 2, elaborada con los cebadores SAS1/SS2 (Le Roux *et al.*, 1999). Este protocolo no detecta sólo *M. refringens*, sino que probablemente detecte todas las especies de este género y otros (Kleeman *et al.*, 2002b; Carrasco *et al.*, 2011). Este protocolo de ISH es el recomendado por la OIE para *M. sydneyi* y *M. refringens*, sin embargo sólo se ha validado frente a la técnica histológica para la segunda especie (OIE, 2012c), mostrando una especificidad del 90% y una sensibilidad del 99% frente a esta técnica (Thébault *et al.*, 2005). La OIE también recoge el protocolo de ISH descrito por López-Flores *et al.* (2008a,b), cuya especificidad aún está sin evaluar (OIE, 2012c). Otros

protocolos de ISH diseñados para *M. refringens* menos utilizados son los desarrollados por Berthe *et al.* (2000) y por Pernas *et al.* (2001). Para la especie *M. sydneyi*, la OIE recomienda, además de la sonda genérica Smart 2 ya descrita, la sonda diseñada con los cebadores PRO2-LEG1 que se unen a su región ITS1 (Kleeman y Adlard, 2000). Esta sonda no muestra reacción cruzada con *M. refringens* ni *M. chungmuensis*, por lo que probablemente sea específica de *M. sydneyi* (Kleeman *et al.*, 2002b).

### 3.2.4. Género *Mikrocytos*

La falta de secuencias de *M. mackini*, única especie del género conocida durante años, y la reciente descripción de nuevas especies ha limitado el desarrollo de métodos de diagnóstico molecular para este género. La primera secuencia de ADN que se obtuvo de *M. mackini* se generó a partir de su gen 18S (Carnegie *et al.*, 2003b). A partir de esta región de 1.457 pb, se diseñó la única prueba de PCR utilizada durante años para el diagnóstico de este parásito. Los cebadores MIKROCYTOS-F/MIKROCYTOS-R de este protocolo amplifican un fragmento de 544 pb y su sensibilidad frente a la histología es mucho mayor. Recientemente, se ha observado que estos cebadores también amplifican el ADN de las nuevas especies de *Mikrocytos* descritas (Gagné *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2008; Abbott *et al.*, 2011, 2014), lo que indica que este protocolo no es específico para la especie *M. mackini*, aunque tampoco amplifica todas las especies del género como es el caso de *M. mimicus*. Gagné *et al.* (2008) diseñaron una pareja de cebadores que amplifican ADN de *M. mackini* y el parásito *Mikrocytos* sp. descrito infectando *O. edulis* de Nueva Escocia (Canadá), y otras dos parejas de cebadores que detectan de forma específica cada uno de ellos. Sin embargo, amplifican regiones pequeñas de ADNr y no están testadas frente a otras especies de *Mikrocytos*. Abbott *et al.* (2011) aportaron nuevos cebadores que permiten la caracterización molecular del tándem 18S-ITS1-5.8S-ITS2-28S de *M. mackini* y *M. boweri*. Estos cebadores también amplifican *Mikrocytos* sp. de *D. trunculus* de Francia (Abbott y Meyer, 2014). Se recomienda el uso de las parejas Mm18SF1/Mm18S1403R, Mm18S\_120F/Mm18S1403R o Mm18SF1/Mm18S\_1450R para la amplificación de un fragmento superior a 1000 pb del gen 18S ADNr de las especies del género *Mikrocytos* y la pareja Mm18S\_1435F/pro28SR para la amplificación de su región ITS1-5.8S-ITS2-28S (Abbott *et al.*, 2014). Se ha diseñado un protocolo de PCR anidada específico para microcítidos que, junto con una posterior secuenciación, puede ser útil para detectar todas las especies del género *Mikrocytos* (Hartikainen *et al.*, 2014b). Este protocolo ha permitido la detección de *M. mimicus*.

La reciente caracterización de la región ITS-ADNr de *M. mackini* ha permitido desarrollar un protocolo de PCR en tiempo real, empleando sondas TaqMan, complementarias a la región 5.8S-ITS2 de esta especie (Polinski *et al.*, 2015). La especificidad de esta prueba se testó frente a *M. boweri*, *P. canceri* y otros patógenos de moluscos y su sensibilidad analítica es alta, demostrándose que detecta muchos más casos positivos que la PCR convencional (Carnegie *et al.*, 2003b) y que la histopatología.

El primer protocolo de ISH específico para *M. mackini* consistió en un conjunto de cuatro oligosondas de ISH marcadas con fluorescencia, que hibridaban de forma satisfactoria en la SSU del ADNr de este parásito. Este protocolo de FISH se modificó

posteriormente para realizarlo usando solamente una sonda de ISH, de las cuatro descritas por Carnegie *et al.* (2003b), con un marcaje de digoxigenina (Meyer *et al.*, 2005). La especificidad de esta sonda se evaluó frente a otros parásitos de moluscos y su sensibilidad fue mejor que la mostrada por la histología. Sin embargo, la especificidad de estas oligosondas debería de testarse frente a las nuevas especies de *Mikrocytos* descritas. Se ha diseñado también un protocolo de ISH para *Mikrocytos* sp. detectado en *O. edulis* de Canadá (Gagné *et al.*, 2008). En base a la región SSU del ADNr de este parásito, se diseñó una sonda polinucleotídica, mediante PCR e incorporación de digoxigenina a los productos amplificados. Esta sonda también hibrida con *M. mackini* y debería testarse también frente a otras especies de *Mikrocytos*.







## **JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS**



## JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Las enfermedades de moluscos bivalvos son responsables de grandes pérdidas económicas en España y en el mundo. Para luchar contra ellas es muy importante contar con procedimientos de diagnóstico sensibles, específicos y reproducibles del agente causal, que impidan la dispersión de los parásitos que las causan a zonas libres, mediante la transferencia incontrolada de moluscos. Incluso se podría decir que no puede haber lucha eficaz sin procedimientos diagnósticos con las características reseñadas. Sin embargo, muchos de los métodos diagnósticos disponibles antes de este estudio carecían de la especificidad y sensibilidad necesarias para identificar de forma inequívoca especies parásitas de moluscos consideradas entre las más virulentas.

Los objetivos generales de esta tesis doctoral fueron diseñar nuevas herramientas moleculares para realizar un diagnóstico más específico y sensible de las especies causantes de la bonamiosis y perkinsosis, dos enfermedades endémicas en la costa gallega y con amplia distribución mundial. Las nuevas técnicas diseñadas se emplearon en estudios epidemiológicos en Galicia y en el litoral mediterráneo. Además, se utilizaron técnicas moleculares para identificar y caracterizar los parásitos causantes de dos enfermedades emergentes asociadas a mortalidad muy alta en Galicia, una de almeja japonesa y otra de berberecho. La relevancia de este estudio trasciende el ámbito geográfico gallego pues se trata bien de enfermedades de amplia distribución mundial bien de enfermedades con rango geográfico conocido más restringido pero con alto potencial letal para especies de moluscos con amplia distribución mundial.

Estos objetivos generales se desglosaron de la siguiente forma:

### *Sección I: Bonamiosis*

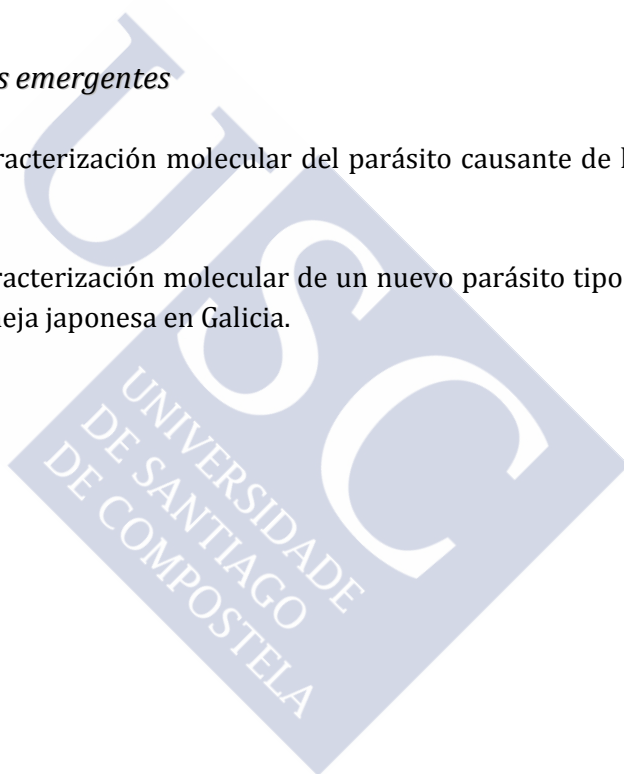
1. Diseño de nuevas herramientas moleculares para el diagnóstico específico de *B. ostreae* y *B. exitiosa*: PCR convencional, en tiempo real y multiplex.
2. Diseño de un protocolo de hibridación *in situ* para la identificación específica de *B. exitiosa*.
3. Aplicación de las herramientas moleculares diseñadas en el estudio epidemiológico de las especies de *Bonamia* presentes en Galicia: distribución espacial y dinámica temporal de las enfermedades.

### Sección II: Perkinsosis

4. Diseño de un nuevo método de PCR-DGGE para la detección y diferenciación de especies de *Perkinsus*.
5. Diseño de un protocolo de hibridación *in situ* para la detección específica de *P. mediterraneus*.
6. Aplicación de la nueva PCR-DGGE en el estudio epidemiológico de las especies de *Perkinsus* que infectan las poblaciones de almeja a lo largo de la costa gallega.
7. Identificación molecular de las especies de *Perkinsus* en el litoral mediterráneo noroccidental.

### Sección III: Enfermedades emergentes

8. Identificación y caracterización molecular del parásito causante de la marteiliosis del berberecho.
9. Identificación y caracterización molecular de un nuevo parásito tipo “microcélula” que infecta a la almeja japonesa en Galicia.



## SECCIÓN I: BONAMIOSIS



***Esta sección se ha publicado en las revistas:***

*Diseases of Aquatic Organisms 104: 149-161. 2013*  
Autores: A. Ramilo, J.I. Navas, A. Villalba, E. Abollo

*Diseases of Aquatic Organisms 110: 81-91. 2014*  
Autores: A. Ramilo, A. Villalba, E. Abollo

*Diseases of Aquatic Organisms 110: 123-133. 2014*  
Autores: A. Ramilo, M. González, M.J. Carballal S.  
Darriba, E. Abollo, A. Villalba



Vol. 104: 149–161, 2013 doi: 10.3354/dao02597	DISEASES OF AQUATIC ORGANISMS Dis Aquat Org	Published May 27
--	--	------------------

## Species-specific diagnostic assays for *Bonamia ostreae* and *B. exitiosa* in European flat oyster *Ostrea edulis*: conventional, real-time and multiplex PCR

Andrea Ramilo<sup>1</sup>, J. Ignacio Navas<sup>2</sup>, Antonio Villalba<sup>1,\*</sup>, Elvira Abollo<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Centro de Investigaciones Mariñas, Consellería do Medio Rural e do Mar, Xunta de Galicia, 36620 Vilanova de Arousa, Spain

<sup>2</sup>Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera (IFAPA), Centro 'Agua del Pino', Junta de Andalucía, 21450 Cartaya, Spain

<sup>3</sup>Centro Tecnológico del Mar – Fundación CETMAR, 36208 Vigo, Spain





## Species-specific oligonucleotide probe for detection of *Bonamia exitiosa* (Haplosporidia) using *in situ* hybridisation assay

Andrea Ramilo<sup>1</sup>, Antonio Villalba<sup>1,\*</sup>, Elvira Abollo<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Centro de Investigacións Mariñas, Consellería do Medio Rural e do Mar, Xunta de Galicia, 36620 Vilanova de Arousa, Spain

<sup>2</sup>Centro Tecnológico del Mar – Fundación CETMAR, 36208 Vigo, Spain





## Oyster parasites *Bonamia ostreae* and *B. exitiosa* co-occur in Galicia (NW Spain): spatial distribution and infection dynamics

Andrea Ramilo<sup>1</sup>, Mar González<sup>1</sup>, María J. Carballal<sup>1</sup>, Susana Darriba<sup>2</sup>,  
Elvira Abollo<sup>3</sup>, Antonio Villalba<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Centro de Investigacións Mariñas (CIMA), Consellería do Medio Rural e do Mar, Xunta de Galicia,  
36620 Vilanova de Arousa, Spain

<sup>2</sup>Instituto Tecnolóxico para o Control do Medio Mariño de Galicia (INTECMAR), Consellería do Medio Rural e do Mar,  
Xunta de Galicia, 36611 Vilagarcía de Arousa, Spain

<sup>3</sup>Centro Tecnolóxico del Mar — Fundación CETMAR, 36208 Vigo, Spain





## SECCIÓN II: PERKINSOSIS



***Esta sección se ha publicado en la revista:***

*Journal of Invertebrate Pathology* 125, 37-41. 2015

*Autores: A. Ramilo, N. Carrasco, K. S. Reece,  
J. M. Valencia, A. Grau, P. Aceituno, M. Rojas, I.  
Gairín, M. D. Furones, E. Abollo, A. Villalba*

***y enviado a:***

*Journal of Invertebrate Pathology*. 2015

*Autores: A. Ramilo, J. Pintado,  
A. Villalba, E. Abollo*

*(En revisión)*





Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Invertebrate Pathology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/jip](http://www.elsevier.com/locate/jip)



Short Communication

## Update of information on perkinsosis in NW Mediterranean coast: Identification of *Perkinsus* spp. (Protista) in new locations and hosts



Andrea Ramilo<sup>a</sup>, Noelia Carrasco<sup>b</sup>, Kimberly S. Reece<sup>c</sup>, José M. Valencia<sup>d</sup>, Amalia Grau<sup>d</sup>, Patricia Aceituno<sup>b</sup>, Mauricio Rojas<sup>b</sup>, Ignasi Gairin<sup>b</sup>, M. Dolores Furones<sup>b</sup>, Elvira Abollo<sup>e</sup>, Antonio Villalba<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Centro de Investigacións Mariñas (CIMA), Consellería do Medio Rural e do Mar, Xunta de Galicia, Apto 13, 36620 Vilanova de Arousa, Spain

<sup>b</sup> IRTA-Sant Carles de la Ràpita and Catalonia's Aquaculture R&D and Innovation Reference Network (XRAq), Ctra. Poblenou Km 5, 43540 Sant Carles de la Ràpita, Spain

<sup>c</sup> Virginia Institute of Marine Science, The College of William and Mary, Gloucester Point, VA 23062, USA

<sup>d</sup> Laboratori d'Investigacions Marines i Aquicultura (LIMIA), D.G. Medi Rural i Mari, Govern Balear, Port d'Andratx, 07158 Mallorca, Spain

<sup>e</sup> Centro Tecnológico del Mar-Fundación CETMAR, Eduardo Cabello s/n, 36208 Vigo, Spain





***Perkinsus olseni* and *P. chesapeaki* detected in a survey of perkinsosis of various clam species in Galicia (NW Spain) using PCR-DGGE as a screening tool**

Andrea Ramilo<sup>1</sup>, José Pintado<sup>2</sup>, Antonio Villalba<sup>1\*</sup>, Elvira Abollo<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Centro de Investigacións Mariñas, Consellería do Medio Rural e do Mar, Xunta de Galicia, Apto. 13, 36620 Vilanova de Arousa. Spain

<sup>2</sup> Instituto de Investigaciones Marinas (IIM-CSIC), Eduardo Cabello no.6, 36208 Vigo, Spain.

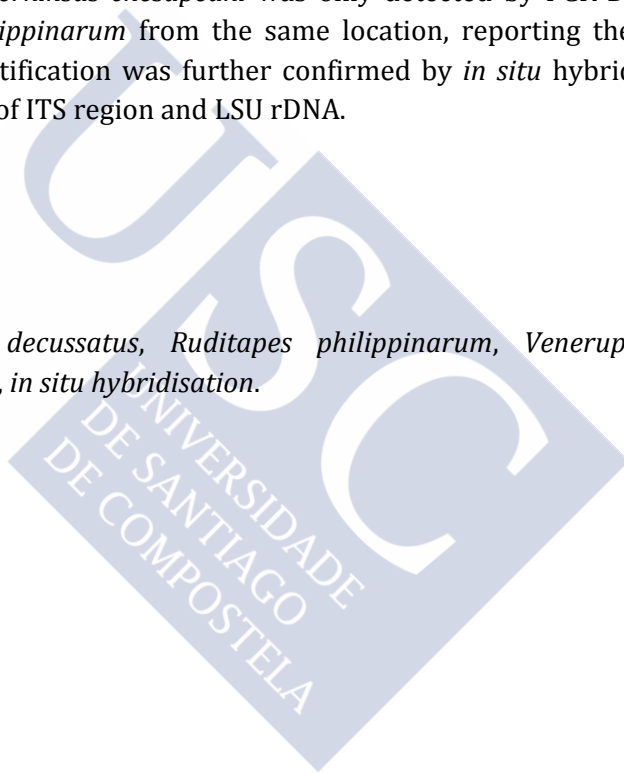
<sup>3</sup> Centro Tecnológico del Mar-Fundación CETMAR. Eduardo Cabello s/n. 36208 Vigo. Spain.

\*Corresponding author. Tel: +34 886206331. Fax: +34 886206372. E-mail: [antonio.villalba.garcia@xunta.es](mailto:antonio.villalba.garcia@xunta.es)

## Abstract

A survey on perkinsosis was performed involving 15 locations scattered along the Galician coast (NW Spain) and four clam species with high market value (*Ruditapes decussatus*, *Ruditapes philippinarum*, *Venerupis corrugata* and *Polititapes rhomboides*). The prevalence of *Perkinsus* parasites was estimated by PCR using genus-specific primers. The highest percentage of PCR-positive cases for perkinsosis corresponded to clams *R. decussatus* and *V. corrugata*, while lower values were detected in *R. philippinarum* and no case was found in *P. rhomboides*. The discrimination of *Perkinsus* species was performed by PCR-RFLP and by a new PCR-DGGE method developed in this study. *Perkinsus olseni* was identified in every clam species, except in *P. rhomboides*, using both PCR-DGGE and PCR-RFLP. Additionally, *Perkinsus chesapeaki* was only detected by PCR-DGGE infecting two Manila clams *R. philippinarum* from the same location, reporting the first case in Galicia. *P. chesapeaki* identification was further confirmed by *in situ* hybridisation assay and phylogenetic analysis of ITS region and LSU rDNA.

**Key words:** *Ruditapes decussatus*, *Ruditapes philippinarum*, *Venerupis corrugata*, *Polititapes rhomboids*, PCR, *in situ* hybridisation.



## 1. Introduction

Perkinsosis is a disease affecting numerous mollusc species worldwide, causing important mortalities and economic losses. The use of molecular tools has contributed to discriminate *Perkinsus* species and to record them in new hosts and locations. Nowadays, seven *Perkinsus* species are considered valid: *P. marinus* (Mackin et al., 1950), *P. olseni* (Lester and Davis, 1981), *P. qugwadi* (Blackbourn et al., 1998), *P. chesapeaki* (McLaughlin et al., 2000), *P. mediterraneus* (Casas et al., 2004), *P. honshuensis* (Dungan and Reece, 2006) and *P. beihaiensis* (Moss et al., 2008). Two of them, *P. marinus* and *P. olseni*, have a severe impact on bivalve mollusc populations and are included in the list of reportable diseases of aquatic animals by the World Organisation for Animal Health. Three species of the genus have been reported from Europe: *P. olseni* a cosmopolitan species infecting various mollusc species along the coasts of Europe (Azevedo, 1989; Abollo et al., 2006; Elandaloussi et al., 2009; Arzul et al., 2012; Ramilo et al., 2015); *P. mediterraneus*, originally described infecting oysters *Ostrea edulis* (Casas et al., 2004) from Balearic Islands (Spain) and then found in other hosts and Mediterranean locations of Spain and Italy (Valencia et al., 2014; Ramilo et al., 2015); and *P. chesapeaki*, a species that had been reported from various hosts in the Atlantic coast of USA (McLaughlin et al., 2000; Coss et al., 2001; Dungan et al., 2002; Pecher et al., 2008; Reece et al., 2008; Marquis et al., 2015) and recently found in clams *Ruditapes decussatus* and *Ruditapes philippinarum* from France (Arzul et al., 2012), cockles *Cerastoderma edule* from Spain (Carrasco et al., 2014) and mud ark cockles *Anadara trapezia* from Australia (Dang et al., 2015). Perkinsosis is an endemic disease in Galicia (NW Spain) affecting various clam species of clams and *P. olseni* is the only species of the genus reported thus far (Robledo et al., 2000; Casas et al., 2002; Balseiro et al., 2010).

*Perkinsus* infections can be diagnosed by incubating host tissues in Ray's fluid thioglicolate medium (RFTM) (Ray, 1966); the RFTM assay is more sensitive than standard histology, but it does not allow discrimination between *Perkinsus* spp. Additionally, PCR assays have been developed to be genus-specific (Casas et al., 2002; Robledo et al., 2002; Gauthier et al., 2006) and species-specific, such as those developed for *P. marinus* (Robledo et al., 1998; Audemard et al., 2004; De Faveri, et al., 2009), *P. olseni* (De la Herrán et al., 2000; Robledo et al., 2000; Park et al., 2002), *P. chesapeaki* (Coss et al., 2001) and *P. beihaiensis* (Moss et al., 2008). Moreover, restriction fragment length polymorphism (RFLP) assays have been also designed for differential diagnosis of *Perkinsus* species (Kotob et al., 1999; Abollo et al., 2006) and *in situ* hybridisation (ISH) assays for the detection of *Perkinsus* species on histological sections (Moss et al., 2006, 2008; Navas, 2008; Ramilo et al., 2015). In this study, another molecular procedure, based on denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE), has been applied for the first time to simultaneously detect various *Perkinsus* species. DGGE is a molecular technique used to separate DNA fragments of the same length but with different sequences. This method has a high power of discrimination, detecting until single base variations in DNA (Fisher and Lerman, 1983; Lerman and Beldjord, 1999). DGGE analysis have been widely used in microbial ecology studies in different environments (Muyzer and Samala, 1998) including aquaculture systems (Pintado et al., 2010; Prol-García et al., 2010, 2014); its application is

not widespread in parasitological studies, it has been used to identify Quahog Parasite Unknown (QPX) infecting clams *Mercenaria mercenaria* (Gast et al., 2006, 2008), for the discrimination of three species and one genotype of the protistan genus *Cryptosporidium* (Sato and Nakai, 2007) as well for the discrimination of *Eimeria* species (Martynova-Vankley et al., 2008) and to display sequence variation of nematode parasite species (Gasser et al., 1996, 1998).

The above-referred recent reports of *Perkinsus* spp. in new areas and new hosts encouraged us to perform a survey of perkinsosis along Galician coast, involving four clam species with high market value, using sensitive and specific diagnostic tools. A new PCR-DGGE assay was developed to discriminate *Perkinsus* species, which was compared with the well-known PCR-RFLP assay described by Abollo et al. (2006). DGGE-PCR results revealed for the first time the presence of *P. chesapeaki* in Galicia (NW Spain), infecting the Manila clam *R. philippinarum*.

## 2. Material and methods

### 2.1. Mollusc samples

Samples involving four clam species were collected between April and June 2010 from 15 beds scattered along Galician coast: grooved carpet-shell clams *R. decussatus* were obtained from O Barqueiro, Foz, Ortigueira, Viveiro, A Toxa and Lourizán; Manila clams *R. philippinarum* were collected from Carril, Pontedeume, Camariñas and Arcade; pullet carpet-shell clams *Venerupis corrugata* were obtained from A Coruña, Illa de Arousa, Ferrol, Vilanova de Arousa and Cangas; and banded clams *Polititapes rhomboides* were collected from A Illa de Arousa (Fig. 1). Samples consisting of 30 clams from each site were collected and, once in the laboratory, the clams were placed in tanks with filtered seawater and aeration, overnight, to favour sediment expelling before being processed for histological and molecular procedures.

### 2.2. Histology

A section (ca. 5 mm thick) of the meat of each specimen containing gills, visceral mass, mantle lobes and foot was fixed in Davidson's solution, dehydrated in an ethanol series and embedded in paraffin. Paraffin blocks were stored in case histological examination or ISH assay were needed.

### 2.3. Genomic DNA extraction

Small pieces of gills from the clams were preserved in 96 % ethanol for molecular analysis. Moreover, samples from *in vitro* non-clonal cultures of *P. olseni*, *P. mediterraneus*, *P. chesapeaki* and *P. marinus* were also employed for the development and validation of the DGGE technique. DNA purifications were performed employing the commercial kit

Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega), according to the manufacturer's protocol. DNA quality and quantity was checked with a spectrophotometer Nanodrop® ND-1000 (Nanodrop technologies, Inc).

## 2.4. Molecular procedures

PCR assays using the generic primers PerkITS750/PerkITS85 (Casas et al., 2002) (Table 1) were carried out first to detect *Perkinsus* spp. in all sampled clams. Subsequently, all positive cases were analysed to identify *Perkinsus* species by the well-known RFLP analysis, as described by Abollo et al. (2006), and by a new PCR-DGGE assay described next. Eight random PCR products were also sequenced to confirm the identity of the restriction profile obtained.

### 2.4.1. PCR-DGGE assay

*Primer design.* To develop the DGGE method for *Perkinsus* spp. diagnosis, new genus-specific primers, named PerkLSU-F and PerkLSU-R (Table 1), were designed based on the LSU rDNA sequence of *Perkinsus* genus. This region shows lower intraspecific variability than ITS region, which is used for diagnosis of *Perkinsus* spp.. For this, the *Perkinsus* spp. DNA sequences shown in Table 2 were aligned using the programme Clustal W (Kumar et al., 2004) and, subsequently, the primers were designed using the programme Primer 3 (Rozen and Skaletsky, 2000).

*PCR assay.* In order to obtain a pattern to be used as a reference for each *Perkinsus* species, PCRs were performed with *in vitro* cultured cells of *P. olseni*, *P. chesapeaki*, *P. marinus* and *P. mediterraneus*. Subsequently, DNA from every *Perkinsus* PCR-positive clam was selected to perform PCR-DGGE assay. Those DNA samples were amplified using the primers PerkLSU-F/PerkLSU-R. The forward primer was used with a GC clamp attached to the 5' end (5'-CGCCCCCGCGCGCGGGCGGGCGGGGCGGGGCACGGGGG-3'). The PCR mix solution was prepared as described above. All PCRs were carried out under the following reaction parameters: 94 °C for 2 min, 40 cycles at a denaturation temperature of 94 °C for 30 s, an annealing temperature of 55 °C for 45 s and an extension temperature of 72 °C for 1 min, followed by a final extension of 72 °C for 7 min. Positive control for *Perkinsus* sp. and a negative control (no DNA) were also used and 10 µl of each amplified DNA were analysed by electrophoresis on 2% agarose gels.

*DGGE.* PCR products were analysed by DGGE using a Bio Rad DCode for electrophoresis. One hundred nanograms of each PCR amplified product were loaded on 8% (w/v) polyacrylamide gels in TAE 1X with two concentrations of gradients: 20 to 80% and 30 to 60% gradient urea-formamide (100% corresponded to 7M urea and 40% [v/v] formamide), increasing in the direction of electrophoresis. Additionally, 6% polyacrylamide gels with a denaturing gradient of 20-80% and 30-70% were also tested in order to establish the best concentration of polyacrylamide and denaturing gradient for *Perkinsus* species. Gels were run a 60 °C for 10 min to 20 V and 17 h at 100V, stained with

ethidium bromide for 15 min and rinsed for 20 min in distilled water. PCR products derived from *in vitro* cultured cells of *P. olseni*, *P. chesapeaki*, *P. marinus* and *P. mediterraneus* were included in all gels as reference of each species. DGGE gels were scanned in a GelDoc XR documentation system (BioRad). To confirm the specific identity, different patterns of bands were cut out with a sterile scalpel. All bands were washed with 200 µl of sterile water and DNA was eluted in 50 µl of the same solution at 4 °C for 5 days. After this, 5 µl of each band were re-amplified using the primer PerkLSU-R/PerkLSU-F without the GC clamp, using the same conditions described above, and then processed for sequencing.

#### 2.4.2. Characterisation of ITS region of *P. chesapeaki*-like parasite

The positive samples for *P. chesapeaki*-like parasite obtained by PCR-DGGE, were negative for this parasite by PCR-RFLPs because the product of PCR assay obtained was insufficient. To know the sequence of the ITS region of this presumptive *P. chesapeaki* parasite, these PCR products were cloned and sequenced but the results were also negative for *P. chesapeaki*-like parasite (data not shown). Then, we decided to design new primers (PerkITS2-F/PerkITS2-R) on the 5.8S-ITS2 region of *Perkinsus* species (Table 2), which amplified a smaller fragment of 375 bp included in the sequence amplified for the genus specific primers PerkITS750/85, used in the PCR-RFLPs assay. PCR assays with new primers were performed following the same conditions described in the PCR-DGGE assay. PCR products were ligated and cloned according to Ramilo et al. (2015) and ten clones were processed for sequencing.

#### 2.4.3. Sequencing and phylogenetic analyses.

PCR products were purified for sequencing using ExoSap-It (Usb) for 15 min at 37°C, followed by inactivation for 15 min at 80 °C. Sequencing was performed in a specialised service (Secugen, Madrid). Chromatograms were analysed using ChromasPro v.1.41 Technelysium Pty Ltd. All generated sequences were searched for identity using BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) through web servers of the National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Multiple alignments based on ITS region and LSU rDNA of the *P. chesapeaki*-like parasite and of *P. olseni* were performed using all the sequences obtained in this study and others available from GenBank (Table 3). Alignments were performed using Clustal W (Thompson et al., 1994) included in MEGA6 (Tamura et al., 2013). Maximum-likelihood analysis implemented in MEGA6 software was used to generate phylogenetic trees. Kimura 2-parameter model was found the most appropriate evolutionary model for both analyses. The bootstrap values were calculated from 2,000 replicates.

#### 2.4.4. *In situ* hybridisation (ISH) assay

An ISH assay was carried out with sections of the clams previously diagnosed positive for *P. chesapeaki*, using the species-specific PchesLSU-485 digoxigenin-labelled probe (Reece et al., 2008), to confirm the presence of this parasite in clam *R. philippinarum* tissues. Serial tissue sections (5 µm thick) were produced so that one section was used for ISH assay and another section was stained with Harris' haematoxylin and eosin (H&E) (Howard et al., 2004) in order to identify and localise the parasite. ISH assay was performed as described by Ramilo et al. (2014).

### 3. Results

#### 3.1. Distribution of perkinsosis in locations and clam species

Results provided by PCR using PerKITS750/PerKITS85 genus-specific primers gave positive amplification in 144 of the 480 analysed clams. PCR-positive cases for perkinsosis were detected in 9 of the 15 sampled locations (Table 4). The highest percentage of positive cases corresponded to samples of clams *R. decussatus* and *V. corrugata*, with ranges from 0% to 73.3% and 0% to 93.3%, respectively (Table 4). Clam *R. philippinarum* samples showed lower percentages (range 0% - 46%), while no PCR-positive case was detected in clams *P. rhomboides* (Table 4).

#### 3.2. Screening of *Perkinsus* spp. by PCR-RFLP

RFLPs allowed identifying 91 clams infected by *P. olseni* according to restriction profiles obtained with *Rsa*I (413, 193 and 74 bp) and *Hinf*I (363, 160, 150 bp) endonucleases. Amplified DNA from 53 clams was insufficient to allow subsequent RFLP analysis.

#### 3.3. Screening of *Perkinsus* spp. by PCR-DGGE

DNA of all the previous *Perkinsus* PCR-positive clams (n= 144) and DNA extracted from *in vitro* *Perkinsus* spp. cultures yielded amplicons of 269 bp by PCR using PerKLSU-F/PerKLSU-R with CG clamp. Nevertheless, PCR assays produced amplicons with insufficient amount of DNA to allow subsequent DGGE analysis in 34 out of 144 cases (Table 4). Amplified products corresponding to 110 clams were loaded on gels made with different concentration of polyacrylamide and gradient urea-formamide. Gels made with 6% polyacrylamide and the denaturing gradients of 20-80% and 30-70% did not allow establishing a clear pattern of bands specific for each species of *Perkinsus* included as positive control, because numerous and coincident bands among species were obtained. Gels with 8% polyacrylamide and a denaturing gradient of 20-80% yielded the same results. However, when DGGE assay was performed in 8% polyacrylamide gels with a denaturing gradient of 30-60%, a differential, clear band pattern was obtained for cultured cells of *P. marinus*, *P. chesapeaki*, *P. mediterraneus* and *P. olseni* (Fig. 2); in all the

cases, an intense band, which migrated to different position for each species, was identified; moreover other weaker bands completed the differential pattern of each species. Regarding clam DNA samples, all showed an intense band matching that obtained for *P. olseni* cultured cells (Fig. 2, lanes 5 to 18). However, two Manila clams *R. philippinarum* from Arcade additionally showed another less intense band matching that of *P. chesapeakei* cultured cells (Fig. 2, lanes 19 and 20)..

### 3.4. Sequence and phylogenetic analyses

The ITS sequences obtained of the eight random PCR products obtained by generic PCR assay with the primers PerkITS750/85 confirmed the results observed by RFLP assay and shared 99-100% nucleotide identity with other *P. olseni* sequences deposited in GenBank, with a query coverage of 100% in all of cases.

All the bands (weak and intense) of DGGE gels corresponding to cultured cells of *Perkinsus* species showed identity values of 99-100% with the expected *Perkinsus* species. LSU sequences obtained from clam DNA samples whose bands matched that of *P. olseni* in PCR-DGGE assay, shared 99-100% nucleotide identity with LSU sequences of *P. olseni* deposited in GenBank (100% query coverage). LSU sequences corresponding to the band pattern of *P. chesapeakei* showed 100% nucleotide identity with *P. chesapeakei* from France and 98-100% identity with other *P. chesapeakei* from USA (100% query coverage).

Three of the ten clones that were sequenced to know the ITS region of the presumptive *P. chesapeakei* parasite showed 99% identity to 5.8S-ITS2 sequences of *P. chesapeakei* from Catalonia (E. Spain) (100% query coverage), 99-100% identity with *P. chesapeakei* from France (93-95% query coverage) although they displayed 94%-96 % identity with other *P. chesapeakei* sequences from USA and Australia deposited in GenBank (98%-100% query coverage). The remaining seven clones shared 99-100% with *P. olseni* sequences, confirming the mixed infection *P. olseni*-*P. chesapeakei* in the two Manila clams from Arcade also detected by PCR-DGGE assay.

An ITS tree constructed with a total of 242 sites and 67 sequences showed that *P. olseni* sequences from Galicia grouped in a clade with other *P. olseni* sequences with bootstrap values of 93%. Furthermore, the *P. chesapeakei* sequence from Galicia was included in *P. chesapeakei* clade, with bootstrap values of 99% (Fig. 3). Within this *P. chesapeakei* clade, two main subclades could be distinguished, one of these subclades corresponded to sequences from North American and Australia and the other one included sequences from Europe (Spain and France), forming one clade with bootstrap values 94%, while another clade with sequences from North America had bootstrap values of 85% (Fig. 3).

A LSU tree was constructed using 159 sites and 28 sequences. Phylogenetic analysis on the LSU showed that *P. olseni* from Galicia was included in the same clade with other *P. olseni* sequences with bootstrap values 95%. The *P. chesapeakei* sequence from Galicia grouped in the same clade with other *P. chesapeakei* sequences with bootstrap values of 92% (Fig. 4). The LSU analysis was uninformative, and all sequences belonging to *P. mediterraneus* and *P. honshuensis* formed an unresolved single clade. The sequences of

*P. chesapeaki* from Galicia clustered together with other *P. chesapeaki* sequences, but all the ingroup sequences formed a single clade.

All the *Perkinsus* sequences reported in this work have been deposited in the GenBank under the accession numbers: KP764676-KP764683 (ITS *P. olsenii*), KP764684-KP764686 (ITS *P. chesapeaki*), KP764687-KP764689 (LSU *P. olsenii*), and KP764690-KP764691 (LSU *P. chesapeaki*).

### 3.5. Visualisation of *Perkinsus chesapeaki*

The PchesLSU-485DIG probe specific for *P. chesapeaki* was found to hybridise on *R. philippinarum* sections (Fig. 5A), showing a strong reaction. The hybridisation signal corresponded to *Perkinsus*-like parasites in the adjacent section stained with H&E; *P. chesapeaki* appeared encapsulated by haemocytes in the connective tissue of the digestive gland of the host (Fig. 5B).

## 4. Discussion

Results of the survey confirmed that perkinsosis is widely distributed along the Galician coast and suggested higher prevalence in *R. decussatus* and *V. corrugata* than in *R. philippinarum*, while no case was detected in *P. rhomboides*. Balseiro et al. (2010) found higher prevalence in *R. decussatus* and *R. philippinarum* from Galicia than in *V. corrugata* (referred as *Venerupis pullastra*), while only one PCR-positive case was detected in *P. rhomboides* without histological confirmation. Thus, *P. rhomboides* seems to be less susceptible to perkinsosis than the other studied clam species, although perkinsosis had been detected in clams *P. rhomboides* from Galicia by RFTM (AV, unpublished results) and from Andalusia (S. Spain) (Navas, 2008).

A PCR-DGGE method to discriminate *Perkinsus* species was designed and successfully applied in this survey. Gast et al. (2006, 2008) applied DGGE to detect the protistan QPX in the hard clam *M. mercenaria* and they obtained a similar pattern band, with an intense band and weaker bands for one species. The occurrence of multiple bands in the *Perkinsus* spp. patterns could represent intraspecific variability due to the existence of multiple slightly different copies of the RNA cluster (Dungan et al., 2002; Pecher et al., 2004), multiple infections of different strains from *Perkinsus* and could be also due to a clonal structure of *Perkinsus* spp. population with rare but possible genetic recombination between loci of the clones (Tibayrenc et al., 1990; Tibayrenc and Ayala, 2002) or could indicate the existence of sexual reproduction in *Perkinsus*, with heterozygotic individuals (Reece et al., 1997, 2001; Robledo et al., 1999; Thompson et al., 2011; Vilas et al., 2011). These slight variations in the sequences of DNA could be giving rise to homoduplex molecules, consisting of complementary strands synthesised in the PCR cycle, and to heteroduplex molecules created by the union of strands with little differences in their sequences. Thus, heteroduplex (weaker bands) would show a slower migration in DGGE gel than homoduplex (intense bands), since the mismatch sites of the former are easier denatured than the unions established between the nucleotides of homoduplex (intense

bands) (Kanagawa, 2003). Despite of this variability, DGGE allowed to establish a clear pattern specific for each species of *Perkinsus* involved in this study. Moreover, DGGE could easily be extended to the other *Perkinsus* species not included in this study, as diagnostic tool.

Comparison between the well-known PCR-RFLP method and the new PCR-DGGE showed that species identification was possible in more cases with the latter assay. Furthermore, *P. chesapeaki* was detected with PCR-DGGE co-infecting with *P. olseni* two clams *R. philippinarum*, whereas the PCR-RFLP method only detected *P. olseni* in those two clams. Co-infections with two *Perkinsus* species in the same host have already been described: *P. marinus*-*P. chesapeaki* in various hosts species (Pecher et al., 2008; Reece et al., 2008), *P. marinus*-*Perkinsus* sp. in *M. mercenaria* (Pecher et al., 2008), *P. chesapeaki*-*P. olseni* in *R. decussatus* (Arzul et al., 2012) and *P. olseni*-*P. mediterraneus* in *Venus verrucosa* (Ramilo et al., 2015).

Occurrence of more than one *Perkinsus* species in an area, even in the same species host, is not exceptional; in addition to the above mentioned cases, *P. marinus*, *P. olseni* and *P. beihaiensis* have been found in *Crassostrea gasar* from Paraiba (Brazil) (Queiroga et al., 2015); *P. olseni* and *P. honsuensis* have been reported from Japan (Dungan and Reece, 2006); *P. beihaiensis* and *P. olseni* from China (Moss et al. 2008), and from India (Sanil et al. 2010, 2012); *P. chesapeaki*, *P. olseni* and *P. mediterraneus* from Catalonia (Spain) (Ramilo et al. 2015); and *P. olseni* and *P. chesapeaki* from Australia (Lester and Davis, 1981; Dang et al., 2015). Results showed that PCR-DGGE method is a useful tool to discriminate among *Perkinsus* species. Species-specific conventional PCR or real time PCR assays are good tools for routine diagnoses when evaluating the prevalence or the intensity of a particular *Perkinsus* species expected in a specific area or host. However, when various *Perkinsus* spp. are expected (or may occur) in an area or in a host species, using these methods would be slow and expensive, because a species-specific PCR assay would be needed for each *Perkinsus* species. Genus-specific PCR assay followed by cloning and sequencing involves laborious workflow and is more expensive than PCR-DGGE assay for an elevated number of individuals, particularly if there are mixed infections in the same individual. The specific DGGE pattern of bands for each *Perkinsus* species makes that cloning and sequencing are not needed. Moreover, RFLPs assays need a high quantity of DNA since weak PCR amplification does not allow obtaining the restriction patterns, which is more evident in the case of mixed infections, because one of them can be less represented in the host and being unnoticed (Ramilo et al., 2015). Furthermore, the high power of discrimination of DGGE assays, based in small differences between DNA sequences, could allow the detection of any unknown *Perkinsus* species. These results agreed with those published by Martynova-VanKley et al. (2008) and Satoh and Nakai (2007) who found that PCR-DGGE is a better method than PCR-RFLP for the discrimination of *Eimeria* and *Cryptosporidium* species, respectively. Although numerous molecular techniques such as species-specific PCR assays, multiplex PCR or RAPD-PCR have been developed for both parasite genera, none of them has been able to detect all the species of *Eimeria* or *Cryptosporidium* in a single assay, while it was possible with DGGE method.

Recently, the high-throughput sequencing (HTS) is replacing the PCR-DGGE method in microbial ecology studies and will be soon considered a standard approach in environmental microbial research (Douterelo et al. 2014; Elizaquível et al., 2015; Ju and Zhang, 2015; Pochon et al., 2015). HTS has been mainly used to the study of functional genomic in bivalve mollusc (Leite et al., 2013; Gómez-Chiarri et al., 2015; He et al., 2015; Meng et al., 2015). Burki et al. (2013) also employed the HTS to perform a phylogenomic study of *Mikrocytos mackini* infecting *Crassostrea gigas*. Hartikainen et al. (2014) using HTS identified a new genus and new species, *Paramikrocytos canceri*, parasitising the crab *Cancer pagurus*. However, in epidemiological surveys, in which the number of samples is high and unknown parasite species may occur, a pre-screening method would be practical to determine which populations would be suitable for further analysis by HTS. DGGE is relatively cheaper than HTS and the data comparing parasite populations are visualised immediately by electrophoresis.

Species-specific ISH assay confirmed the infection with *P. chesapeaki* in the two Manila clams, as recommended by Burreson (2008). *P. chesapeaki* has been found in three host species (*R. decussatus*, *R. philippinarum* and *C. edule*) in Europe (France and Spain). Our phylogenetic results would support a common origin of the parasites *P. chesapeaki* found in Europe thus far. Arzul et al. (2012) hypothesised that imports of the hard clam *M. mercenaria* from the Atlantic coast of USA into France could have been the vehicle for the introduction of *P. chesapeaki* into France. The recent report of *P. chesapeaki* infecting *A. trapezia* from Australia raises the hypothesis of that *Anadara* invaders could had been a vehicle for the introduction of the parasite into Europe, because the allochthonous species *Anadara kagoshimensis*, native in Pacific coasts including Australia, has been reported as an invader species in Europe, including France and Spain (Catalonia and Galicia) (Bañón et al., 2015). However, the phylogenetic analysis placed ITS sequences of *P. chesapeaki* from Australia in a different clade from the European ones. The very low number of positive cases for *P. chesapeaki* in this study suggests an accidental or punctual introduction of this parasite or a bad adaptation of this species to the new host and marine environment.

## Acknowledgements

We are grateful for technical assistance to: Patricia Ruiz from IIM-CSIC and Mar González, Maribel Meléndez and Elena Penas from CIMA. Dr. Susana Darriba provided mollusc samples and Sergio Fernández provided *in vitro* cultured cells of *Perkinsus* species. This study was funded by the *Ministerio de Economía y Competitividad* of the Government of Spain, through the project AGL2011-30449-C02-01.

## References

- 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.
- Arzul, I., Chollet, B., Michel, J., Robert, M., García, C., Yoly, J.P., François, C., Miossec, L., 2012. One *Perkinsus* species may hide another: characterization of *Perkinsus* species present in clam production areas of France. *Parasitology* 139, 1757-1771.
- Audemard, C., Reece, K.S., Burrenson, E.M., 2004. Real-Time PCR for detection and quantification of the protistan parasite *Perkinsus marinus* in environmental waters. *Appl. Environ. Microbiol* 70, 6611-6618.
- Azevedo, C., 1989. Fine structure of *Perkinsus atlanticus* n. sp. (Apicomplexa, Perkinsea) parasite of the clam *Ruditapes decussatus* from Portugal. *J. Parasitol.* 75, 627-635.
- Balseiro, P., Montes, J., Fernández, R., Novoa, B., Figueras, A., 2010. Comparison of diagnostic techniques to detect the clam pathogen *Perkinsus olseni*. *Dis. Aquat. Org.* 90, 143-151.
- Bañón, R., Fernández, J., Trigo, J.E., Pérez-Dieste, J., Barros-García, D., De Carlos, A., 2015. Range expansion, biometric features and molecular identification of the exotic ark shell *Anadara kagoshimensis* from Galician waters, NW Spain. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.* 95, 545-550.
- Blackbourn, J., Bower, S.M., Meyer, G.R., 1998. *Perkinsus qugwadi* sp. nov. (incertae sedis), a pathogenic protozoan parasite of Japanese scallops, *Patinopecten yessoensis*, cultured in British Columbia, Canada. *Can. J. Zool.* 76, 942-953.
- Burki, F., Corradi, N., Sierra, R., Pawlowski, J., Meyer, G.R., Abbott, C.L., Keeling, P.J., 2013. Phylogenomics of the Intracellular Parasite *Mikrocytos mackini* Reveals Evidence for a Mitosome in Rhizaria. *Curr. Biol.* 23:1-7.
- Burrenson, E.M., 2008. Misuse of PCR assay for diagnosis of mollusc protistan infections. *Dis. Aquat. Org.* 80, 81-83.
- Carrasco, N., Rojas, M., Aceituno, P., Andree, K.B., Lacuesta, B., Furones, M.D., 2014. *Perkinsus chesapeaki* observed in a new host, the European common edible cockle *Cerastoderma edule*, in the Spanish Mediterranean coast. *J. Invertebr. Pathol.* 117, 56-60.
- Casas, S. M., Villalba, A., Reece, K.S., 2002. Study of perkinsosis in the carpet shell clam *Tapes decussatus* in Galicia (NW Spain). I. Identification of the aetiological agent and *in vitro* modulation of zoosporulation by temperature and salinity. *Dis. Aquat. Org.* 50, 51-65.

- Casas, S.M., Grau, A., Reece, K.S., Apakupakul, K., Azevedo, C., Villalba, A., 2004. *Perkinsus mediterraneus* n. sp., a protistan parasite of the European flat oyster *Ostrea edulis* from the Balearic Islands, Mediterranean Sea. Dis. Aquat. Org. 58, 231-244.
- Coss, C.A., Robledo, J.A.F., Ruiz, G.M., Vasta, G.R., 2001. Description of *Perkinsus andrewsi* n. sp. isolated from the Baltic clam (*Macoma balthica*) by characterization of the ribosomal RNA locus, and development of a species-specific PCR- based diagnostic assay. J. Eukaryot. Microbiol. 48, 52-61.
- Dang, C., Dungan, C.F., Scott, G.P., Reece, K.S., 2015. *Perkinsus* sp. infections and *in vitro* isolates from *Anadara trapezia* mud arks of Queensland, Australia. Dis. Aquat. Org. 113, 51-58.
- De Faveri, J., Smolowitz, R., Robert, S., 2009. Development and validation of a real-time quantitative PCR assay for the detection and quantification of *Perkinsus marinus* in the Eastern oyster, *Crassostrea virginica*. J. Shellfish Res. 28, 459-464.
- De la Herrán, R., Garrido-Ramos, M.A., Navas, J.I., Ruiz Rejón, C., Ruiz Rejón, M., 2000. Molecular characterization of the ribosomal RNA gene region of *Perkinsus atlanticus*: its use in phylogenetic analysis and as a target for a molecular diagnosis. Parasitology 120, 345-353.
- Douterelo, I., Boxall, J.B., Deines, P., Sekar, R., Fish, K.E., Biggs, C.A., 2014. Methodological approaches for studying the microbial ecology of drinking water distribution systems. Water Res. 65, 134-156.
- Dungan, C.F., Reece, K.S., 2006. *In vitro* propagation of two *Perkinsus* spp. parasites from Japanese Manila clams *Venerupis philippinarum* and description of *Perkinsus honshuensis* n. sp. J. Eukaryot. Microbiol. 53, 316-326.
- Dungan, C.F., Hamilton, R.M., Hudson, K.L., McCollough, C.B., Reece, K.S., 2002. Two epizootic diseases in Chesapeake Bay commercial clams, *Mya arenaria* and *Tagelus plebius*. Dis. Aquat. Org. 50, 67-78.
- Elandaloussi, L. M., Carrasco, N., Roque, A., Andree, K., Furones, M.D., 2009. First record of *Perkinsus olseni*, a protozoan parasite infecting the commercial clam *Ruditapes decussatus* in Spanish Mediterranean waters. J. Invertebr. Pathol. 100, 50-53.
- Elizaquível, P., Pérez-Cataluña, A., Yépez, A., Aristimuño, C., Jiménez, E., Cocconcelli, P.S., Vignolo, G., Aznar R., 2015. Pyrosequencing vs. culture-dependent approaches to analyze lactic acid bacteria associated to *chicha*, a traditional maize-based fermented beverage from Northwestern Argentina. Int. J. Food Microbiol. 198, 9-18.
- Fisher, S.G., Lerman, L.S., 1983. DNA fragments differing by single base-pair substitutions are separated in denaturing gradient gels-correspondence with melting theory. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 1579-1583.

- Gasser, R., Nansen, P., Guldborg, P., 1996. Fingerprinting sequence variation in ribosomal DNA of parasites by DGGE. *Mol. Cell. Probes* 102, 99-105.
- Gasser, R.B., Zhu, X., Chilton, N.B., Newton, L.A., Nedergaard, T., Guldborg, P., 1998. Analysis of sequence homogenisation in rDNA arrays of *Haemonchus contortus* by denaturing gradient gel electrophoresis. *Electrophoresis* 19, 2391-2395.
- Gast, R.J., Cushman, E., Moran, D.M., Uhlinger, K.R., Leavitt, D., Smolowitz, R., 2006. DGGE-based detection method for Quahog Parasite Unknown (QPX). *Dis. Aquat. Org.* 70,115-22.
- Gast, R.J., Moran, D.M., Audemard, C., Lyons, M.M., DeFavari, J., Reece, K.S., Leavitt, D., Smolowitz, R., 2008. Environmental distribution and persistence of Quahog Parasite Unknown (QPX). *Dis. Aquat. Org.* 81, 219-229.
- 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.
- Gómez-Chiarri, M., Warren, W.C., Guo, X., Proestou, D., 2015. Developing tools for the study of molluscan immunity: The sequencing of the genome of the eastern oyster, *Crassostrea virginica*. *Fish Shellfish Immunol.* 46, 2-4.
- Hartikainen, H., Stentiford, G.D., Bateman, K.S., Berney, C., Feist, S.W., Longshaw, M., Okamura, B., Stone, D., Ward, G., Wood, C., Bass, D., 2014. Mikrocytids are a broadly distributed and divergent radiation of parasites in aquatic invertebrates. *Curr. Biol.* 24, 807-12.
- He, Y., Jouaux, A., Ford, S.E., Lelong, C., Sourdain, P., Mathieu, M., Guo, X., 2015. Transcriptome analysis reveals strong and complex antiviral response in a mollusc. *Fish Shellfish Immunol.* 46, 131-144.
- Howard, D.W., Lewis, E.J., Keller, B.J., Smith, C.S., 2004. Histological techniques for marine bivalve molluscs and crustaceans. NOAA Tech Memo NOS NCCOS 5. US Center for Coastal Environmental Health and Biomolecular Research, Cooperative Oxford Laboratory, Oxford, MD.
- Ju, F., Zhang, T., 2015. 16S rRNA gene high-throughput sequencing data mining of microbial diversity and interactions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99, 4119-4129.
- Kanagawa, T., 2003. Bias and Artifacts in Multitemplate Polymerase Chain Reactions (PCR). *J. Biosci. Bioeng.* 96, 317-323.
- Kotob, S.I., McLaughlin, S.M., Van Berkum, P., Faisal, M., 1999. Discrimination between two *Perkinsus* spp. isolated from the softshell clam, *Mya arenaria*, by sequence analysis of two internal transcribed spacer regions and the 5.8S ribosomal RNA gene. *Parasitology* 119, 363-368.

- Kumar, S., Tamura, K., Nei, M., 2004. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Brief Bioinf* 5, 150-63.
- Leite, R.B., Milan, M., Coppe, A., Bortoluzzi, S., dos Anjos, A., Reinhardt, R., Saavedra, C., Patarnello, T., Cancela, M.L., Bargelloni, L., 2013. mRNA-Seq and microarray development for the Grooved Carpet shell clam, *Ruditapes decussatus*: a functional approach to unravel host-parasite interaction. *BMC Genomics* 14:741.
- Lerman, L.S., Beldjord, C., 1999. Comprehensive mutation detection with denaturing gradient gel electrophoresis, in: Cotton, R.G.H., Edkins, E., Forrest, S. (Eds.), *Mutation Detection*. Oxford University Press, New York, pp. 35-61.
- Lester, R.J.G., Davis, G.H.G., 1981. A new *Perkinsus* species (Apicomplexa, Perkinsea) from the abalone *Haliotis ruber*. *J. Invertebr. Pathol.* 37, 181-187.
- Mackin, J.G., Owen, H.M., Collier, A., 1950. Preliminary note on the occurrence of a new protistan parasite, *Dermocystidium marinum* n. sp. in *Crassostrea virginica* (Gmelin). *Science* 111, 328-329.
- Marquis, N.D., Record, N.R., Fernández Robledo, J.A., 2015. Survey for protozoan parasites in Eastern oysters (*Crassostrea virginica*) from the Gulf of Maine using PCR-based assays. *Parasitol. Int.* 64, 299-302.
- Martynova-Vankley, A., Syvyk, A., Teplova, I., Hume, M., Nalian, A., 2008. Rapid detection of avian *Eimeria* species using denaturing gradient gel electrophoresis. *Poult. Sci.* 87, 1707-13.
- McLaughlin, S.M., Tall, B.D., Shaheen, A., Elsayed, E.E., Faisal, M., 2000. Zoosporulation of a new *Perkinsus* species isolated from the gills of the softshell clam *Mya arenaria*. *Parasite* 7, 115-122.
- Meng, X., Tian, X., Nie, G., Wang, J., Liu, M., Jiang, K., Wang, B., Guo, Q., Huang, J., Wang, L., 2015. The transcriptomic response to copper exposure in the digestive gland of Japanese scallops (*Mizuhopecten yessoensis*). *Fish Shellfish Immunol.* 46, 161-167.
- Moss, J. A., Burrenson, E.M., Reece, K., 2006. Advanced *Perkinsus marinus* infections in *Crassostrea ariakensis* maintained under laboratory conditions. *J. Shellfish Res.* 25, 65-72.
- Moss, J.A., Xiao, J., Dungan, C.F., Reece, K.S., 2008. Description of *Perkinsus beihaiensis* n. sp., a new *Perkinsus* sp. parasite in oysters of Southern China. *J. Eukaryot. Microbiol.* 55, 117-130.
- Muyzer, G., Smalla, K., 1998. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Anton. Leeuw. Int. J. G.* 73, 127-141.
- Navas, J.I., 2008. Principales patologías de la almeja fina, *Ruditapes decussatus* (Linnaeus, 1758), del litoral onubense con especial referencia a la parasitosis por *Perkinsus*

- olseni Lester y Davis, 1981: diagnóstico, transmisión y efectos sobre la almeja. PhD. Thesis Dissertation. Universidad de Sevilla.
- Park, K.I, Park, Y.M., Lee, J., Choi, K.S., 2002. Development of a PCR assay for detection of the protozoan parasite *Perkinsus*. Korean J. Environ. Biol. 20, 109-117.
- Pecher, W.T., Robledo, J.A., Vasta, G.R., 2004. Identification of a Second rRNA Gene Unit in the *Perkinsus andrewsi* Genome. J. Eukaryot. Microbiol. 51, 234-245.
- Pecher, W.T., Mohammad, R.A., Schott, E.J., Fernandez-Robledo, J.A., Roth, L., Berg, S.T., Vasta, G.R., 2008. Assessment of the northern distribution range of selected *Perkinsus* species in Eastern oysters (*Crassostrea virginica*) and hard clams (*Mercenaria mercenaria*) with the use of PCR-based detection assays. J. Parasitol. 94, 410-422.
- Pintado, J., Pérez-Lorenzo, M., Luna-González, A., Sotelo, C.G., Prol, M.J., Planas, M., 2010. Monitoring of the bioencapsulation of a probiotic *Phaeobacter* strain in the rotifer *Brachionus plicatilis* using denaturing gradient gel electrophoresis. Aquaculture 302, 182-194.
- Pochon, X., Zaiko, A., Hopkins, G. A., Banks, J.C., Wood, S.A., 2015. Early detection of eukaryotic communities from marine biofilm using high-throughput sequencing: an assessment of different sampling devices. Biofouling 31, 241-251.
- Prol-García, M.J., Planas, M., Pintado, J., 2010. Different colonization and residence time of *Listonella anguillarum* and *Vibrio splendidus* in the rotifer *Brachionus plicatilis* determined by real-time PCR and DGGE. Aquaculture 302, 26-35.
- Prol-García, M.J., Gomez, M., Sanchez, L., Pintado, J., 2014. *Phaeobacter* grown in biofilters: a new strategy for the control of *Vibrionaceae* in aquaculture. Aquac. Res. 45, 1012-1025.
- Queiroga, F.R., Vianna, R.T., Vieira, C.B., Farias, N.D., da Silva, P.M., 2015. Parasites infecting the cultured oyster *Crassostrea gasar* (Adanson, 1757) in Northeast Brazil. Parasitology 142, 756-766.
- Ramilo, A., Villalba, A., Abollo, E., 2014. Species-specific oligonucleotide probe for detection of *Bonamia exitiosa* (Haplosporidia) using *in situ* hybridization assay. Dis. Aquat. Org. 110, 81-91.
- Ramilo, A., Carrasco, N., Reece, K.S., Valencia, J.M., Grau, A., Aceituno, P., Rojas, M., Gairin, I., Furones, M.D., Abollo, E., Villalba, A., 2015. Update of information on perkinsosis in NW Mediterranean coast: Identification of *Perkinsus* spp. (Protista) in new locations and hosts. J. Invertebr. Pathol. 125, 37-41.

- 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., Bushek, D., Graves, J., 1997. Molecular markers for population genetic analysis of *Perkinsus marinus*. Mol. Mar. Biol. Biotechnol. 6, 197–206.
- Reece, K.S., Bushek, D.B., Hudson, K.H., Graves, J.G., 2001. Geographic distribution of *Perkinsus marinus* genetic strains along the Atlantic and Gulf coasts of the USA. Mar. Biol. 139, 1047–1055.
- Reece, K.S., Dungan, C.F., Burreson, E.M., 2008. Molecular epizootiology of *Perkinsus marinus* and *P. chesapeaki* infections among wild oysters and clams in Chesapeake Bay, USA. Dis. Aquat. Org. 82, 237–248.
- Robledo, J.A.F., Gauthier, J.D., Coss, C.A., Wright, A.C., Vasta, G.R., 1998. Species-specificity and sensitivity of a PCR-based assay for *Perkinsus marinus* in the eastern oyster, *Crassostrea virginica*: a comparison with the fluid thioglycollate assay. J. Parasitol. 84, 1237–1244.
- Robledo, J.A.F., Wright, A.C., Marsh, A.G., Vasta, G.R., 1999. Nucleotide sequence variability in the non-transcribed spacer of the rRNA locus in the oyster parasite *Perkinsus marinus*. J. Parasitol. 85, 650–656.
- Robledo, J.A.F., Coss, C.A., Vasta, G.R., 2000. Characterization of the ribosomal RNA locus of *Perkinsus atlanticus* and development of a polymerase chain reaction-based diagnostic assay. J. Parasitol. 86, 972–978.
- Robledo, J.A.F., Nunes, P.A., Cancela, M.L., Vasta, G.R., 2002. Development of an *in vitro* clonal culture and characterization of the rRNA gene cluster of *Perkinsus atlanticus*, a protistan parasite of the clam *Tapes decussatus*. J. Eukaryot. Microbiol. 49, 414–422.
- Rozen, S., Skaletsky, H.J., 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers in Krawetz, S., Misener, S. (Eds.) Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology. Humana Press, Totowa, pp. 365–386.
- 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 Southern coast of India. Aquaculture 299, 8–14.
- Sanil, N.K., Suja, G., Lijo, J., Vijayan, K.K., 2012. First report of *Perkinsus beihaiensis* in *Crassostrea madrasensis* from the Indian subcontinent. Dis. Aquat. Org. 98, 209–220.
- Satoh, M., Nakai, Y., 2007. Discrimination of *Cryptosporidium* species by denaturing gradient gel electrophoresis. Parasitol Res. 101, 463–466.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., Kumar, S., 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. Mol. Biol. Evol. 30, 2725–2729.

- Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J., 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22, 4673–4680.
- Thompson, P.C., Rosenthal, B.M., Hare, M.P., 2011. An evolutionary legacy of sex and clonal reproduction in the protistan oyster parasite *Perkinsus marinus*. *Infect. Genet. Evol.* 11, 598–609.
- Tibayrenc, M., Ayala, F.J., 2002. The clonal theory of parasitic protozoa: 12 years on. *Trends Parasitol.* 18, 405-10.
- Tibayrenc, M., Kjellberg, F., Ayala, F.J., 1990. A clonal theory of parasitic protozoa: the population structures of *Entamoeba*, *Giardia*, *Leishmania*, *Naegleria*, *Plasmodium*, *Trichomonas*, and *Trypanosoma* and their medical and taxonomical consequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 2414-8.
- Valencia, J.M., Bassitta, M., Picornell, A., Ramon, C., Castro, A.J., 2014. New data on *Perkinsus mediterraneus* in the Balearic Archipelago: locations and affected species. *Dis. Aquat. Org.* 112, 69-82.
- Vilas, R., Cao, A., Pardo, B.G., Fernández, S., Villalba, A., Martínez, P., 2011. Very low microsatellite polymorphism and large heterozygote deficits suggest founder effects and cryptic structure in the parasite *Perkinsus olseni*. *Infect. Genet. Evol.* 11, 904-911.





Table 2. GenBank accession numbers of the rRNA LSU and ITS gene sequences of *Perkinsus* spp. used to design the primer pairs *PerkLSU-F/PerkLSU-R* and *PerkITS2-F/PerkITS2-R*, respectively.

	LSU sequences	ITS sequences
<i>P. chesapeakei</i>	AY876336, AY876337, AY876346, AY876349	AY876313, AF102171, AY305326
<i>P. marinus</i>	AY876321, AY876326, AY876328, AY876329	AF126022, AF149876, AY295177, U07700
<i>P. mediterraneus</i>	EF204095, EF204099, EF204100, EF204106	AY487835, AY487838, AY487843
<i>P. beithaiensis</i>	EF526437, EF526450, EF526452	KF730251, JX502840, JX502841
<i>P. honshuensis</i>	DQ516681, DQ516684	DQ516696, DQ516697, DQ516698
<i>P. olseni</i>	AY876333, AY876335, AF509333	AF369977, AF441216, AF472523, AY435092, U07697
<i>P. qugwadi</i>		AF151528

Table 3. GenBank accession numbers of the sequences of rRNA ITS and LSU genes that were used to construct the phylogenetic trees.

	ITS sequences	LSU sequences
<i>P. chesapeakei</i>	AY305326, AY876302, AY876303, AY876304, AY876305, AY876306, AY876307, EU919470, EU919484, AF091541, AF102171, AF252288, AF440464, AF440466, AF440468, JQ669646, JQ669647, JQ669648, JQ669649, KF314812, KM983409, KM983411, KM983413, KM983414, KM983416- KM983419, KP764684- KP764686	AY876344, AY876345, AY876346, AY876347, AY876348, AY876349, JQ669651, JQ669652, KP764690, KP764691
<i>P. olseni</i>	AF140295, AF369967, AF369969, AF441211, AF441213, AF473840, U07697, KJ608210, KJ701596, KJ701597, KP764676- KP764683	AY876330, AY876331, AY876332, KP764687- KP764689
<i>P. mediterraneus</i>	EU068096, EU068098, DQ370482, AY487839, AY295189, AY295194, AF150987	EF204096, EF204098, EF204100
<i>P. marinus</i>	AY295189, AY295194, AF150987	AY876319, AY876322, AY876329,
<i>P. honshuensis</i>	DQ516696, DQ516697, DQ516698, DQ516699, DQ516700, DQ516701	DQ516680, DQ516682, DQ516684
<i>P. beihaiensis</i>	EU068080, EU068095, EF204015, EF204050	EF526448, EF526451
<i>P. qugwadi</i>	AF151528	
<i>Prorocentrum micans</i>		X16108

Table 4. Percentage of perkinsosis PCR-positive cases detected with the genus-specific PCR assay in each location and clam species and identification of the Perkinsus species by two diagnostic methods, RFLP and DGGE. The number of positive cases appears within brackets. Note that in 53 cases (out of 144 positive cases by the genus-specific PCR assay), the PCR product was insufficient to allow subsequent RFLP analysis for Perkinsus species identification

Host species	Sampling site	Sample size	Genus-specific PCR	RFLP	DGGE
<i>R. decussatus</i>	Ortigueira	30	30,0% (9)	<i>P. olseni</i> (6)	<i>P. olseni</i> (8)
	O Barqueiro	30	43,3% (13)	<i>P. olseni</i> (12)	<i>P. olseni</i> (10)
	Viveiro	30	0	-	-
	Foz	30	0	-	-
	Lourizán	30	66,7% (20)	<i>P. olseni</i> (13)	<i>P. olseni</i> (14)
	A Toxa	30	73,3% (22)	<i>P. olseni</i> (16)	<i>P. olseni</i> (21)
<i>R. philippinarum</i>	Pontedeume	30	46,7% (14)	<i>P. olseni</i> (2)	<i>P. olseni</i> (13)
	Camarinas	30	0	-	-
	Carril	30	0	-	-
<i>V. corrugata</i>	Arcade	30	20,0% (6)	<i>P. olseni</i> (1)	<i>P. olseni</i> (4) <i>P. chesapeakei</i> (2)
	Ferrol	30	93,3% (28)	<i>P. olseni</i> (17)	<i>P. olseni</i> (19)
	A Coruña	30	66,7% (20)	<i>P. olseni</i> (13)	<i>P. olseni</i> (10)
	Vilanova de Arousa	30	40,0% (12)	<i>P. olseni</i> (11)	<i>P. olseni</i> (11)
<i>P. rhomboides</i>	Illa de Arousa	30	0	-	-
	Cangas	30	0	-	-
	Illa de Arousa	30	0	-	-

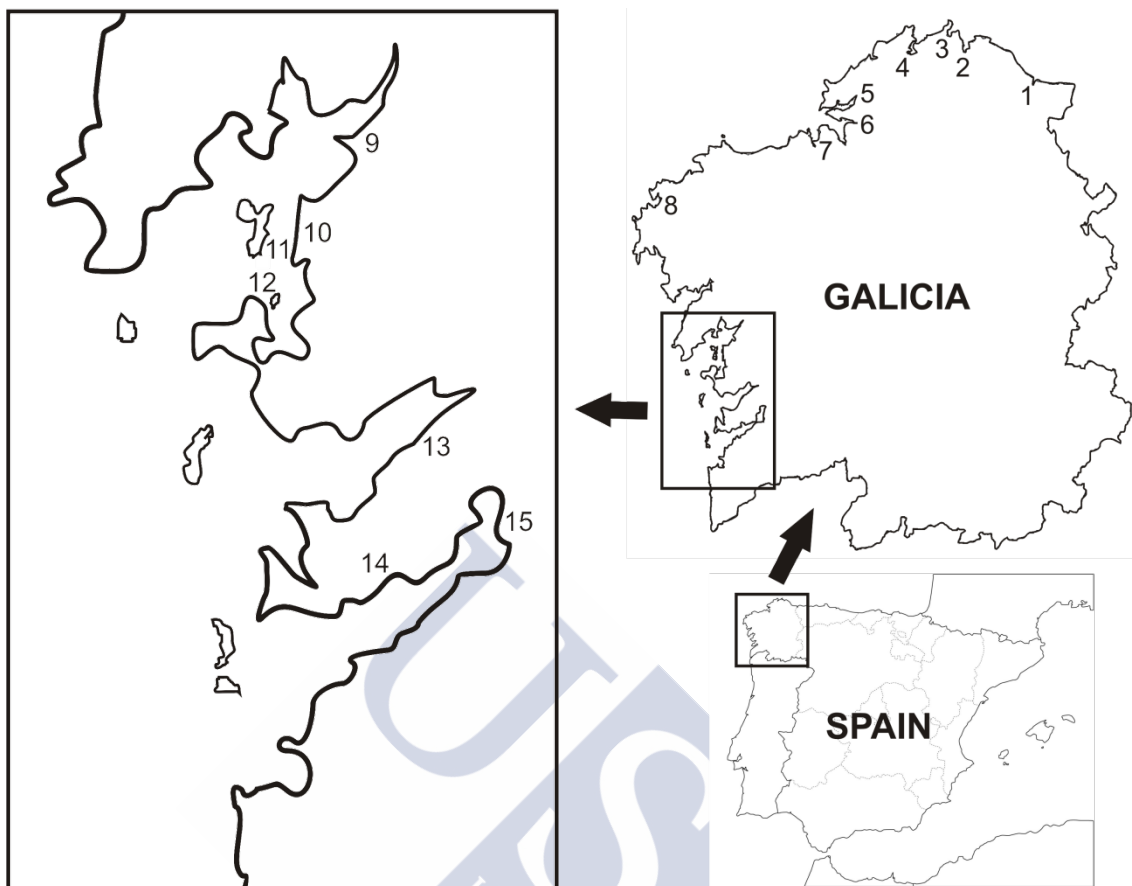


Fig.1. Maps showing the location of the sampled beds along the Galician coast. 1: Foz. 2: Viveiro. 3: O Barqueiro. 4: Ortigueira. 5: Ferrol. 6: Pontedeume. 7: A Coruña. 8: Camariñas. 9: Carril. 10: Vilanova de Arousa. 11: Illa de Arousa. 12: Illa da Toxa; 13: Lourizan. 14: Cangas do Morrazo. 15: Arcade.

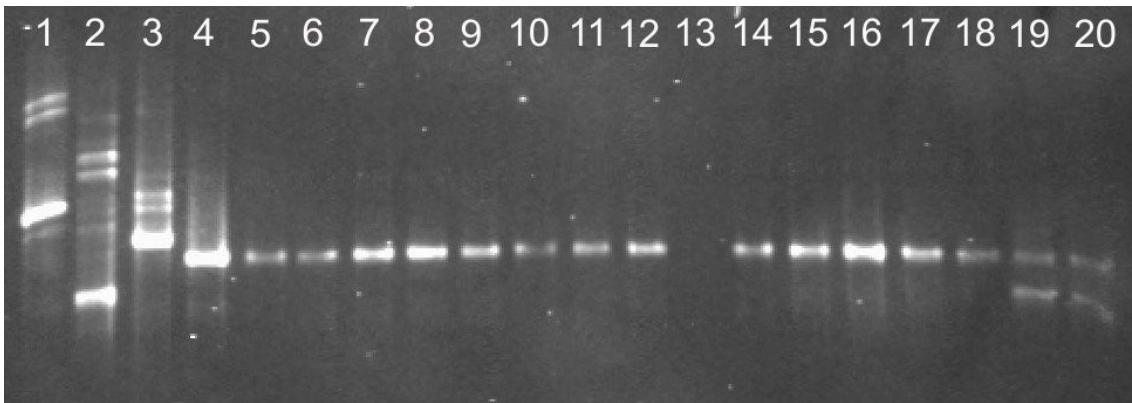


Fig.2. DGGGE profiles of *Perkinsus* species in a 8% w/v polyacrilamide gel. Lanes 1 to 4: LSU-PCR products obtained from in vitro cultured cells of *P. marinus*, *P. chesapeaki*, *P. mediterraneus* and *P. olseni*, respectively. Lanes 5 to 12 and 14 to 18: LSU-PCR products amplified from clam samples, indicating infection with *P. olseni*. Lanes 19 and 20: LSU-PCR products amplified from clam samples, indicating infection with *P. olseni* and *P. chesapeaki*.



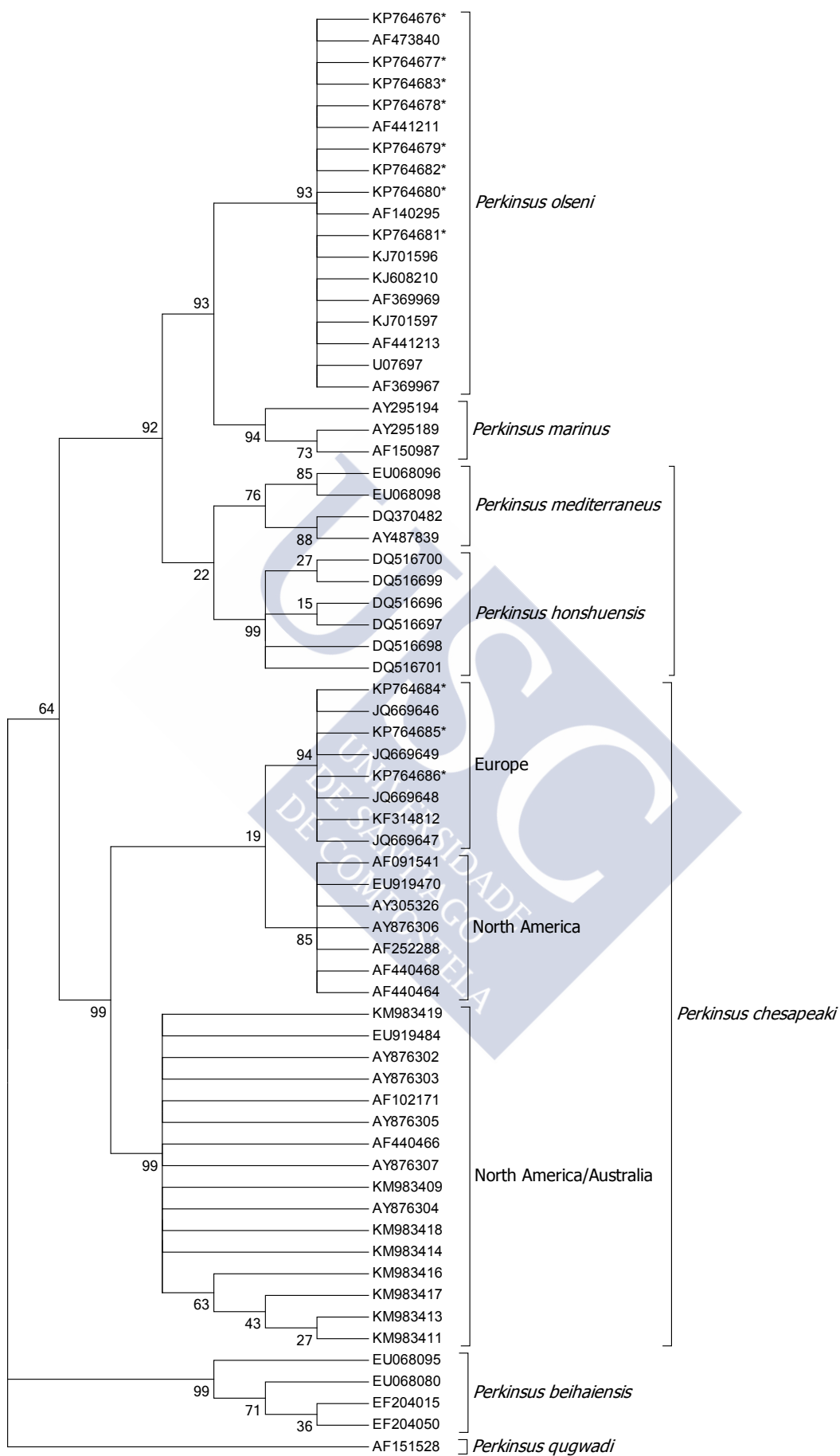


Fig.3. Maximum-likelihood analysis showing the taxonomic position of the *Perkinsus chesapeaki* and *P. olseni* ITS sequences obtained in this study. Numbers at branch nodes indicate bootstrap confidence values in percent. (\*) Sequences obtained in this study.

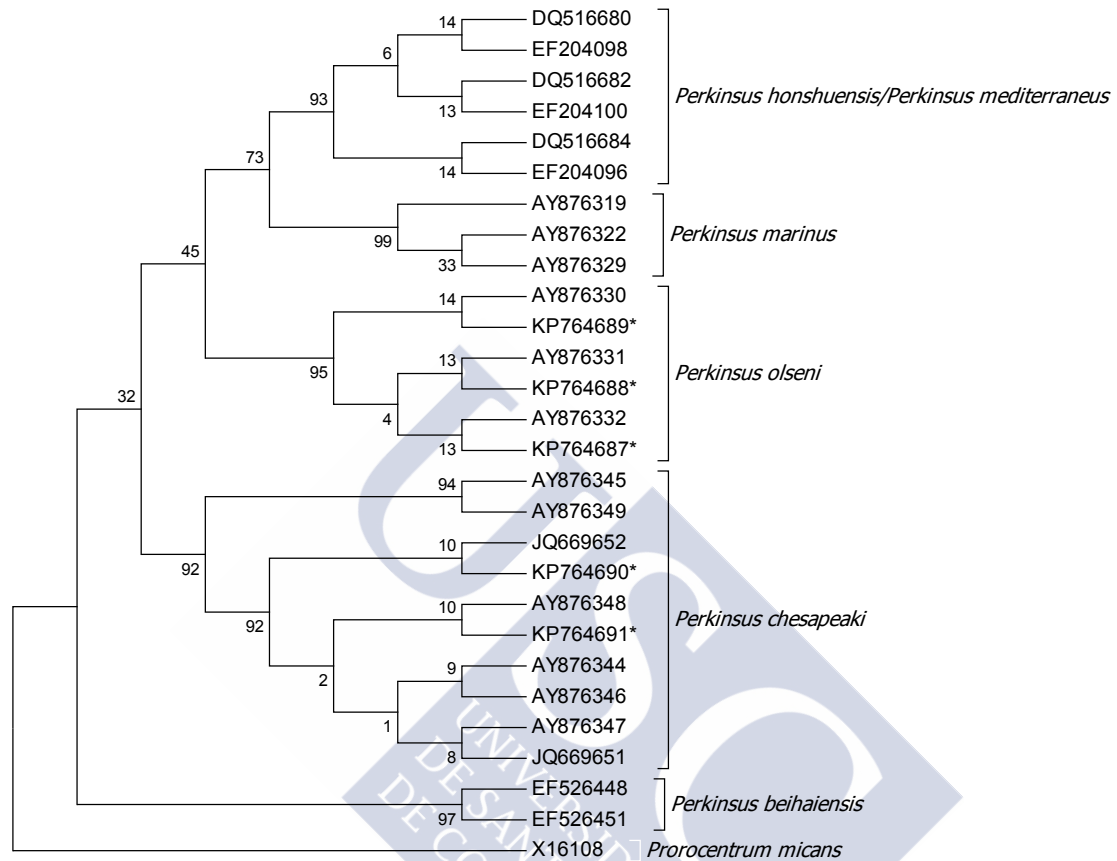


Fig.4. Maximum-likelihood analysis showing the taxonomic position of the *Perkinsus chesapeaki* and *P. olseni* LSU sequences obtained in this study. Numbers at branch nodes indicate bootstrap confidence values in percent. (\*) Sequences obtained in this study.

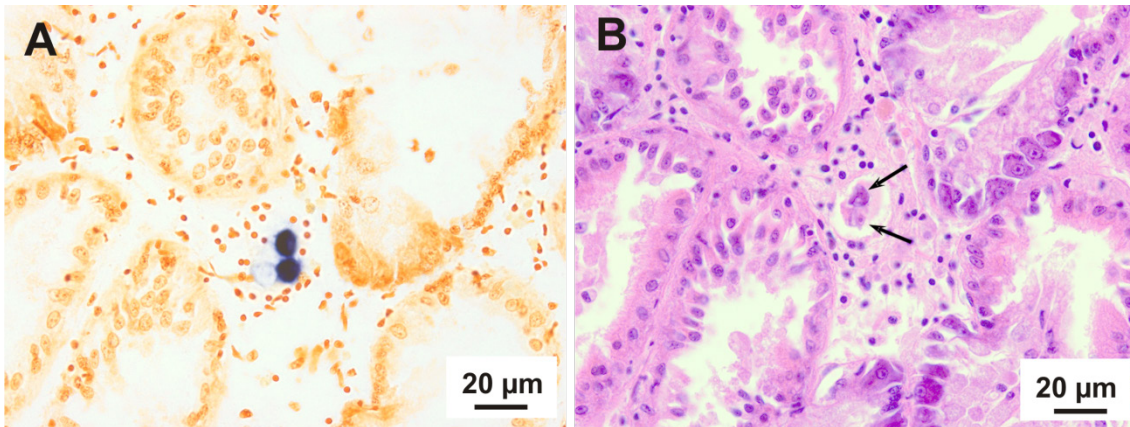


Fig.5. Micrographs of two serial histological sections through the digestive gland of a clam *Ruditapes philippinarum* infected with *Perkinsus chesapeaki*. A: In situ hybridization with *PchesLSU-485DIG* probe showing blue deposits of hybridization. B: Section stained with Harris' haematoxylin and eosin showing parasites (arrows).



## SECCIÓN III: ENFERMEDADES EMERGENTES



***Esta sección se ha publicado en las revistas:***

*Diseases of Aquatic Organisms 109: 55-80. 2014*  
Autores: A. Villalba, D. Iglesias, A. Ramilo, S. Darriba,  
J. M. Parada, E. No, E. Abollo, J. Molaes, M. J. Carballal

*(Andrea Ramilo fue responsable de la caracterización  
molecular y PCR diagnóstica de Marteilia cochillia)*

*Diseases of Aquatic Organisms 110: 71-79. 2014*  
Autores: A. Ramilo, D. Iglesias, E. Abollo,  
M. González, S. Darriba, A. Villalba



## **Cockle *Cerastoderma edule* fishery collapse in the Ría de Arousa (Galicia, NW Spain) associated with the protistan parasite *Marteilia cochillia***

**Antonio Villalba<sup>1,\*</sup>, David Iglesias<sup>1</sup>, Andrea Ramilo<sup>1</sup>, Susana Darriba<sup>2</sup>,  
José M. Parada<sup>1</sup>, Edgar No<sup>1</sup>, Elvira Abollo<sup>3</sup>, José Molares<sup>1</sup>, María J. Carballal<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Centro de Investigacións Mariñas (CIMA), Consellería do Medio Rural e do Mar, Xunta de Galicia,  
36620 Vilanova de Arousa, Spain

<sup>2</sup>Instituto Tecnolóxico para o Control do Medio Mariño de Galicia (INTECMAR), Consellería do Medio Rural e do Mar,  
Xunta de Galicia, 36611 Vilagarcía de Arousa, Spain

<sup>3</sup>Centro Tecnolóxico del Mar - Fundación CETMAR, 36208 Vigo, Spain





**Infection of Manila clams  
*Ruditapes philippinarum* from Galicia (NW Spain)  
with a *Mikrocytos*-like parasite**

**Andrea Ramilo<sup>1</sup>, David Iglesias<sup>1,2</sup>, Elvira Abollo<sup>3</sup>, Mar González<sup>1</sup>, Susana Darriba<sup>2</sup>,  
Antonio Villalba<sup>1,\*</sup>**

<sup>1</sup>Centro de Investigacións Mariñas, Consellería do Medio Rural e do Mar, Xunta de Galicia, 36620 Vilanova de Arousa, Spain

<sup>2</sup>Instituto Tecnolóxico para o Control do Medio Mariño de Galicia (INTECMAR), Consellería do Medio Rural e do Mar,  
Xunta de Galicia, 36611 Vilagarcía de Arousa, Spain

<sup>3</sup>Centro Tecnolóxico del Mar - Fundación CETMAR, 36208 Vigo, Spain







## **DISCUSIÓN GENERAL**



## DISCUSIÓN GENERAL

Como señalaba Poulin (2003), desde una perspectiva biológica, nuestro mundo se está convirtiendo en una comunidad unificada a lo largo del planeta. El comercio internacional y el movimiento de personas, animales y alimentos han provocado una dispersión global de los parásitos y de los vectores de las enfermedades. Las actividades humanas están transformando el mundo en una comunidad ecológica gigante con el consecuente incremento de enfermedades infecciosas emergentes en las poblaciones animales. Asociadas a los grandes movimientos de especies, hay una epidemiología potencial así como consecuencias evolutivas (Zarlenga *et al.*, 2014). Desde una perspectiva epidemiológica clásica, cuando un patógeno aparece por primera vez en una población de hospedadores “naive”, tanto porque se produjo una introducción del parásito o de sus hospedadores en la nueva área, su dinámica puede seguir dos trayectorias extremas, con una gama de posibilidades intermedias: el patógeno se extingue localmente o inicia un brote epidémico. Los parásitos co-invasores pueden ser más virulentos para los nuevos hospedadores nativos que para los propios hospedadores “alien” con los que se produjo la introducción (Lymbery *et al.*, 2014). La probabilidad de que los hospedadores introducidos sobrevivan al proceso de translocación probablemente será inversamente proporcional a la virulencia de los parásitos que portan a su nuevo rango geográfico, ya que la mayoría de las introducciones implican unos pocos individuos que se transportan a condiciones ambientales diferentes a las de origen o poco favorables (Blackburn *et al.*, 2011). Por ello, los parásitos con menor virulencia en su hospedador natural tienen mayor probabilidad de ser co-introducidos (Strauss *et al.*, 2012). Si la virulencia del parásito difiere entre el hospedador alien en el que ha coevolucionado y el nuevo hospedador nativo, es por tanto, más probable que el cambio que se experimente vaya en la dirección de aumento de la virulencia en el nuevo hospedador, teniendo efectos catastróficos en las poblaciones hospedadoras nativas (Lymbery *et al.*, 2014).

En el estudio correspondiente a esta tesis doctoral se ha trabajado con enfermedades parasitarias introducidas -bonamiosis, perkinsosis, marteiliosis y mikrocitosis- que tienen un fuerte impacto sobre la especie hospedadora nativa y para las que actualmente no se ha podido establecer una estrategia de lucha efectiva. Como ya hemos señalado la bonamiosis es la principal responsable del declive del sector ostrícola en Galicia, la marteiliosis ha colapsado una pesquería importante como es la del berberecho en nuestra región y el brote de mikrocitosis provocó mortalidades masivas de almeja japonesa. En los últimos años se ha constatado de forma global un incremento de las enfermedades en las poblaciones de moluscos bivalvos, si bien es cierto, que parte de este incremento también se podría atribuir a una mejora en los métodos diagnósticos y a una mayor vigilancia de las enfermedades. Un ejemplo de ello es el aumento notable de estudios sobre la perkinsosis desde que se estableció y optimizó la metodología para el cultivo del parásito, la cual facilitó el desarrollo de técnicas de diagnóstico que son esenciales para la descripción de nuevas especies, para el establecimiento de nuevos mapas epidemiológicos, así como para realizar estudios de filogenia más robustos (Fernández-Robledo *et al.*, 2014). Las técnicas moleculares, basadas fundamentalmente en la tecnología de la PCR, han revolucionado el diagnóstico clínico y veterinario, incluyendo

la acuicultura, y han desplazado a los métodos tradicionales de identificación de patógenos como son el cultivo de microorganismos, la propagación de virus en líneas celulares o la histología. Estas técnicas aportan la capacidad de caracterizar rápidamente y sin ambigüedades organismos sospechosos de causar un brote de la enfermedad, lo que es primordial para poder modular los esfuerzos dirigidos hacia el control de las enfermedades. Un ejemplo de su éxito se refleja en el hecho de que desde 1977 hasta 2011 se han publicado más de 2.000 artículos de investigación que describen métodos basados en el ADN para la detección, identificación y/o cuantificación de parásitos y ectoparásitos (Hunt, 2011).

En esta Memoria se presentan resultados que suponen un avance en el desarrollo de protocolos moleculares específicos y sensibles para la identificación y el diagnóstico de las principales enfermedades que afectan al cultivo de moluscos bivalvos tanto en Galicia como en sus áreas de distribución a nivel mundial. Actualmente siguen existiendo lagunas en el conocimiento de estas enfermedades y su impacto, siendo la identificación y caracterización del agente patógeno fundamental para la investigación, la comprensión de la epidemiología de las mismas y de las posibles intervenciones que se puedan desarrollar para minimizar su efecto. Cuando se desarrollan nuevos métodos de diagnóstico, un tema crítico y que supone siempre un desafío es la validación de los mismos, con el fin de establecer la sensibilidad y especificidad de las nuevas técnicas. De este hecho depende el éxito y fiabilidad del control sanitario que se ejerza, ya que los métodos de diagnóstico que se apliquen deberían siempre cumplir con los requisitos de alta sensibilidad, especificidad, reproducibilidad, repetibilidad, exactitud e idoneidad. Tras detectar en 2008 la coexistencia de dos especies de *Bonamia* altamente patógenas infectando a la ostra plana en Galicia, nos propusimos desarrollar un método diagnóstico que nos permitiese evaluar epidemiológicamente ambas especies. Los ensayos diseñados en este estudio para el diagnóstico de la bonamiosis han mostrado tener una mayor sensibilidad y especificidad, que las propias técnicas recomendadas actualmente por la OIE. Este hecho no pasó desapercibido al Laboratorio Europeo de Referencia de Enfermedades de Moluscos (EURL), que en 2013 realizó una evaluación de los ensayos presentados en esta memoria con el fin de determinar las técnicas diagnósticas más adecuadas para la enfermedad. El EURL realizó una prueba en anillo en la que 17 laboratorios, entre los que se encontraban Laboratorios Nacionales de Referencia de diferentes países, probaron diferentes protocolos de PCR para la detección y caracterización de las especies de *Bonamia* (<http://forms.ifremer.fr/lgpmm/registration-form-for-the-2013-ilc-01-test-and-comparison-study-of-bonamia-pcr-techniques/>). Entre estos protocolos se encontraban: las PCR genéricas recomendadas por la OIE, descritas por Carnegie *et al.* (2000) y Cochenne *et al.* (2000), las TaqMan PCR genéricas descritas por Corbeil *et al.* (2006b) y Marty *et al.* (2006), la PCR específica para *B. ostreae* diseñada por Robert *et al.* (2009) y los protocolos de PCR convencional y PCR en tiempo real descritos en este estudio. Además, se incluyeron dos nuevas PCR específicas desarrolladas por Longshaw *et al.* (2013) posteriores a las diseñadas en este estudio: una para *B. exitiosa* y otra para *B. ostreae*. De estos 17 laboratorios 6 de ellos compararon la PCR Bo-Boas (Cochenne *et al.*, 2000), seguida por una prueba RFLP (Cochenne-Laureau *et al.*, 2003a), con la PCR en tiempo real descrita en esta memoria. Los resultados mostraron que la PCR en tiempo real es ligeramente más específica y mucho más sensible que la PCR Bo/Boas y destaca que es

una técnica recomendable para realizar programas de vigilancia, ya que su alta sensibilidad minimiza el riesgo de obtener resultados falsos negativos. Además, se demostró que su reproducibilidad es alta y mayor que la de la PCR Bo-Bas, ya que con la PCR en tiempo real se encontraron menores diferencias entre los resultados de los 6 laboratorios. EL EURL concluyó que la PCR en tiempo real específica para *B. exitiosa* y *B. ostreae*, descrita en este estudio, puede ser incluida en el Manual Diagnóstico de la OIE como método recomendado (European Reference Laboratory for Molluscan Diseases, 2014). A pesar de que las otras PCR diagnósticas citadas no fueron probadas por el número de laboratorios participantes en la prueba en anillo planeado inicialmente, los resultados obtenidos indican que las PCR convencionales específicas para *B. exitiosa* y *B. ostreae* desarrolladas en este estudio, ofrecen unos resultados mucho mejores en términos de fiabilidad que las PCR convencionales específicas descritas por Longshaw *et al.* (2013). La PCR convencional específica para *B. exitiosa*, así como la PCR multiplex para el diagnóstico de *B. exitiosa* y *B. ostreae*, han permitido detectar por primera vez *B. exitiosa* en Portugal, infectando la ostra plana *O. edulis*. La presencia de esta especie pasó desapercibida mediante el ensayo de PCR Bo-Boas recomendado por la OIE (Batista *et al.*, 2015).

El procedimiento de PCR multiplex es la primera técnica descrita capaz de detectar *B. ostreae* y *B. exitiosa* en un único ensayo. El Centro de Investigaciones Marinas (CIMA) de la Xunta de Galicia y el Centro Tecnológico del Mar solicitó su patentabilidad en septiembre de 2011, presentando la documentación correspondiente ante la Oficina Española de Patentes y Marcas. En marzo de 2014 el Boletín Oficial de la Propiedad Industrial (BOPI) publicó la concesión de la patente que lleva por título “Procedimiento para detectar e identificar *Bonamia ostreae* y *Bonamia exitiosa* en un único ensayo de reacción en cadena de la polimerasa”, con el número de concesión P 201131549 (ver anexo I). Existe un registro de kits diagnósticos para diversas enfermedades validados y certificados por la OIE, entre los que se incluyen kits basados en la tecnología de PCR como el denominado “IQ 2000<sup>TM</sup> WSSV Detection and Prevention System” para el diagnóstico de la enfermedad de las manchas blancas (WSSV) producida por un virus que provoca elevadas mortalidades en varias especies de camarones, o el kit “Check&Trace Salmonella” basado en PCR multiplex para el serotipado molecular de esta bacteria (OIE, 2015). La comercialización en forma de kit diagnóstico de la PCR multiplex para *B. exitiosa* y *B. ostreae* y su validación y certificación por la OIE podría ser una herramienta de gran ayuda para el control de la bonamiosis.

El estudio epidemiológico de *B. exitiosa* y *B. ostreae* permitió la detección temprana de ambas especies en semilla de pequeña talla y evidenció que *B. exitiosa* está ampliamente distribuida a lo largo del litoral gallego y perfectamente adaptada a este ecosistema. Estos datos junto con la detección de *B. exitiosa* infectando *O. edulis* en Cataluña y en otros países europeos como Italia, Francia, Reino Unido y Portugal (Narcisi *et al.*, 2010; Arzul *et al.*, 2011; Carrasco *et al.*, 2012a; Longshaw *et al.*, 2013; Batista *et al.*, 2015) indican que esta especie debería ser eliminada de la lista de enfermedades exóticas del Reglamento Europeo de Sanidad Animal y debería incluirse en la lista de enfermedades no-exóticas (Anonymous, 2006).

Para mejorar el diagnóstico molecular de *B. exitiosa*, también se diseñó un protocolo de ISH específico, que mostró valores de sensibilidad superiores a los de la técnica histológica. Otra ventaja de la técnica molecular es que permite realizar una identificación inequívoca y no sujeta a un criterio subjetivo, mientras que el diagnóstico histológico se ve fuertemente influido por la experiencia del analizador, principalmente en la áreas geográficas de coexistencia de ambas especies. Evaluando objetivamente la ISH, la laboriosidad, el tiempo requerido y el coste económico hacen que no sea una herramienta molecular enfocada a diagnósticos rutinarios, sin embargo, es una técnica muy recomendable para confirmar nuevos casos positivos de *B. exitiosa* en áreas y hospedadores que se creían libres de esta especie, tanto si el diagnóstico se realiza por técnicas de PCR como histológicas. Aunque las técnicas de PCR son muy sensibles, no ofrecen información sobre la viabilidad del parásito ni sobre el estado de la infección, siendo necesario realizar una confirmación visual empleando técnicas microscópicas altamente sensibles como puede ser la ISH (Burreson, 2008). La ISH específica para *B. exitiosa* ofrece la misma información que la histología pero con la especificidad y sensibilidad de los métodos moleculares, por lo que es una prueba imprescindible tanto confirmatoria como en la búsqueda de posibles hospedadores reservorios o transportadores de la enfermedad.

La viabilidad de la aplicación de las herramientas moleculares para el diagnóstico específico de las especies de *Bonamia* va ineludiblemente ligada al propósito que se persigue, al coste económico que suponen su aplicación y a la dificultad técnica intrínseca a las mismas. A pesar de que la dificultad técnica no es asumible por el sector primario, sería muy fácil su implementación en centros especializados, como pueden ser los laboratorios de referencia nacionales e internacionales, laboratorios de investigación o centros analíticos públicos y privados. El coste de la aplicación de estos métodos de forma rutinaria varía en función de la técnica a aplicar.

En este estudio también se han diseñado dos procedimientos moleculares para el estudio de la perkinsosis. Como ya se ha señalado, el esfuerzo investigador en torno a la perkinsosis es muy elevado lo que origina que el número de especies del género *Perkinsus*, su rango geográfico y la lista de especies hospedadoras crezca y evolucione continuamente, siendo éste el gupo de protozoos parásitos de moluscos con un rango de distribución geográfica mayor (Fernández-Robledo *et al.*, 2014). Este hecho junto al elevado movimiento comercial de especies de moluscos que existe en Galicia, hizo que se plantease como objetivo de esta tesis doctoral realizar un cribado molecular de otras posibles especies de *Perkinsus* que pudiesen infectar diferentes especies de almejas en Galicia. El planteamiento clásico de realizar una PCR genérica seguida de clonación y posterior PCR-RFLPs o PCR-secuenciación se estimó como muy laboriosa y costosa para abordar un cribado poblacional. Otras técnicas como el “Next Generation Sequencing” (NGS) recibieron la misma evaluación. Finalmente se emprendió el desarrollo de un nuevo ensayo de PCR-DGGE, que tuviese poder de discriminación para detectar de forma simultánea diferentes especies de *Perkinsus*, incluso cuando alguna de ellas cursase la infección de forma leve. Los resultados obtenidos muestran que esta técnica, a pesar de su escaso desarrollo en el campo de la patología de moluscos y su incipiente entrada en desuso, ha proporcionado resultados importantes en la identificación de especies de

*Perkinsus*, así como en la detección de infecciones multiespecíficas. A ello se suma su coste moderado y fácil análisis. *P. chesapeaki* es una especie descrita originalmente en la costa noreste de EE. UU., pero su posterior detección en Europa y Australia (Arzul *et al.*, 2012; Carrasco *et al.*, 2014; Dang *et al.*, 2015) muestra que es una especie que se adapta bien a diferentes condiciones macro- (distribución geográfica amplia) como micro-ambientales (diferentes especies hospedadoras), lo que da evidencias de su capacidad colonizadora. Disponer del registro de *P. chesapeaki* en el ecosistema gallego, permitirá realizar una monitorización de esta especie para poder evaluar su evolución y su potencial impacto en las poblaciones de moluscos bivalvos. El estudio epidemiológico iniciado en Galicia se extendió al Mar Mediterráneo, ya que es un área geográfica en la que se ha realizado un esfuerzo menor en el estudio de la enfermedad. Además del diagnóstico molecular de la perkinsosis se diseñó un ensayo de ISH específico para la detección de *P. mediterraneus*. Este ensayo permitió confirmar las infecciones, detectadas por PCR, de *P. mediterraneus* en nuevos hospedadores.

En esta tesis doctoral se ha abordado la identificación y caracterización molecular de dos parásitos nuevos responsables de causar elevadas mortalidades de almeja japonesa y berberecho en Galicia. La detección de *Mikrocytos* sp. en almeja japonesa tiene gran importancia debido a que *R. philippinarum* es una especie cosmopolita, cultivada en muchos países y con abundantes importaciones. El gran desconocimiento de la biología del género *Mikrocytos*, incluyendo distribución geográfica, rango hospedador, posición filogenética, interacción hospedador-parásito-medioambiente y ciclo de vida, no permite hacer una valoración de la introducción de esta especie en aguas gallegas y los factores que originaron el brote epidémico, aunque las condiciones ambientales y la co-infección con el agente de la enfermedad de anillo marrón (BRD) que presentaban las almejas japonesas pudieron favorecer la multiplicación y transmisión del parásito. *Mikrocytos* sp. no se ha detectado en Galicia desde el año 2009 (datos aportados por el INTECMAR), pero la ausencia de conocimiento hace que sea necesario realizar una vigilancia sanitaria rigurosa para poder controlar nuevos brotes epidémicos, así como su propagación a otras áreas.

El parásito Paramyxido, causante de drásticas mortalidades de berberecho de la Ría de Arousa desde el año 2012 se identificó por técnicas moleculares como *M. cochillia*. Actualmente, las poblaciones de berberecho en la Ría de Arousa se encuentran totalmente diezmadas por la enfermedad. La adaptación a un nuevo ambiente de parásitos monoxénicos introducidos, ej. *B. exitiosa*, es siempre más sencilla que la de parásitos con ciclo de vida indirecto (Dobson y May, 1986; Bauer, 1991; Torchin y Mitchell, 2004). En este último grupo se encontraría probablemente *M. cochillia*, de la cual aún se desconoce su ciclo de vida, pero hay evidencias de que en otras especies del género, como *M. refringens* y *M. sydneyi*, diferentes especies de copépodos y poliquetos, respectivamente, actúan como hospedadores intermediarios en el ciclo biológico. Por tanto, es probable que existan hospedadores intermediarios relacionados con la introducción e invasión de *M. cochillia* en Galicia y que puedan actuar como reservorios de la enfermedad.

La caracterización molecular de *Mikrocytos* sp. y *M. cochillia* ha permitido realizar un diagnóstico inequívoco de estas especies parasitas responsables de la mortalidades

masivas de almejas y berberechos. Esta caracterización puede ser la base para el diseño de nuevos test diagnósticos que permitan profundizar en la epidemiología y ciclo de vida de estas especies, con el fin de poder esclarecer su introducción en Galicia y realizar un control sanitario efectivo de ambas enfermedades que evite su dispersión a nuevas áreas y hospedadores. De hecho, la utilización de estos procedimientos de diagnóstico parece imprescindible en la búsqueda del hospedador intermediario de *M. cochillia* en aguas gallegas, paso crucial para poder arbitrar medidas de gestión de la marteiliosis del berberecho en Galicia.

En el futuro, la secuenciación de todo el genoma de los parásitos y la definición de una amplia gama de marcadores genéticos para su uso en herramientas de diagnóstico específicos y sensibles pueden ofrecer oportunidades únicas para abordar cuestiones relativas a la compleja red de factores biológicos y ecológicos que intervienen en las interacciones entre los parásitos, sus hospedadores y el medio ambiente. El uso integrado de herramientas moleculares (ómicas) y bioinformáticas avanzadas puede ser crucial para apuntalar la investigación de la biología de las enfermedades, en una escala antes imposible, y podría proporcionar perspectivas sin precedentes para el diseño de métodos de diagnóstico y de intervención totalmente nuevos para frenar el desarrollo de las enfermedades.





## **CONCLUSIONES**



## CONCLUSIONES

1. Se han diseñado las primeras PCR diagnósticas específicas para *B. exitiosa*: PCR convencional, PCR en tiempo real y PCR multiplex.
2. La alta especificidad y, en especial, la alta sensibilidad de los ensayos de PCR convencional, PCR en tiempo real y PCR multiplex específicos para *B. exitiosa* y *B. ostreae*, los convierten en protocolos idóneos para ser incluidos en el Manual Diagnóstico de la OIE como métodos recomendados para el diagnóstico de ambos parásitos.
3. La PCR multiplex diseñada para la detección simultánea de *B. exitiosa* y *B. ostreae* permite un diagnóstico rápido y económico de ostras parasitadas. Esta técnica se ha patentado y su comercialización en forma de kit de detección de ambas especies podría ser muy útil para el control sanitario de ostras frente a la bonamiosis.
4. Las PCR convencional y PCR en tiempo real para *B. ostreae* y *B. exitiosa* son ensayos que permiten realizar una detección de ambos patógenos en etapas muy tempranas de crecimiento. Esto permitirá a los ostricultores realizar una selección previa de semilla libre de patógenos, para importar lotes de alta calidad sanitaria para estas enfermedades, garantizando una mayor supervivencia en los lotes destinados a engorde.
5. El protozoo *B. exitiosa* es un parásito perfectamente adaptado al ecosistema marino gallego y debería ser eliminado de la lista de enfermedades exóticas de la Directiva europea 2006/88/EC e incluido en su lista de enfermedades de no exóticas.
6. Se han diseñado por primera vez ensayos de ISH específicos para *B. exitiosa* y *P. mediterraneus*, herramientas muy útiles para confirmar infecciones de estos parásitos en nuevos hospedadores y áreas libres de la enfermedad.
7. Se ha ampliado el rango geográfico y hospedador de *P. olseni*, *P. mediterraneus* y *P. chesapeakei*.
8. El ensayo PCR-DGGE es una herramienta útil para realizar estudios de control y vigilancia de las especies de *Perkinsus* presentes en un área geográfica.
9. Se ha identificado por primera vez un parásito del tipo *Mikrocytos* en la almeja *R. philippinarum*, en varias zonas de Galicia y en asociación con mortalidad alta de almeja.
10. Se ha identificado el parásito *M. cochillia* como causante del colapso de la pesquería del berberecho en la ría de Arousa. Se ha diseñado un ensayo de PCR convencional para el diagnóstico específico de este parásito.





## **BIBLIOGRAFÍA**



## BIBLIOGRAFÍA

- Abbe, G. R., McCollough, C. B., Barker, L. S., Dungan, C. F., 2010. Performance of disease-tolerant strains of eastern oyster (*Crassostrea virginica*) in the Patuxent River, Maryland, 2003 to 2007. *Journal of Shellfish Research* 29, 161-175.
- Abbott, C. L., Meyer, G. R., 2014. Review of *Mikrocytos* microcell parasites at the dawn of a new age of scientific discovery. *Diseases of Aquatic Organisms* 110, 25-32.
- Abbott, C., 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. *Diseases of Aquatic Organisms* 93, 243-250.
- Abbott, C. L., Meyer, G. R., Lowe, G., Kim, E., Johnson, S. C., 2014. Molecular taxonomy of *Mikrocytos boweri* sp. nov. from Olympia oysters *Ostrea lurida* in British Columbia, Canada. *Diseases of Aquatic Organisms* 110, 65-70.
- Abollo, E., Casas, S. M., Ceschia, G., Villalba, A., 2006. Differential diagnosis of *Perkinsus* species by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism assay. *Molecular and Cellular Probes* 20, 323-329.
- Abollo, E., Ramilo, A., Casas, S. M., Comesaña, P., Cao, A., Carballal, M. J., Villalba, A., 2008. First detection of the protozoan parasite *Bonamia exitiosa* (Haplosporidia) infecting flat oyster *Ostrea edulis* grown in European waters. *Aquaculture* 274, 201-207.
- Abollo, E., Villalba, A., 2011. Enfermedades causadas por parásitos del grupo haplosporidia. En: Figueras, A., Novoa, B., (eds) *Enfermedades de Moluscos Bivalvos de Interés en Acuicultura*. Fundación Observatorio Español de Acuicultura, Madrid, p 285-329.
- Abollo, E., Villalba, A., 2013. Guía de autocontrol – Virus herpes de ostreidos. Centro Tecnológico del Mar – Fundación CETMAR. Vigo.
- Adl, S. M., Simpson, A. G., Farmer, M. A., Andersen, R. A., Anderson, O. R., Barta, J. R., Bowser, S. S., Brugerolle, G., Fensome, R. A., Fredericq, S., James, T. Y., Karpov, S., Kugrens, P., Krug, J., Lane, C. E., Lewis, L. A., Lodge, J., Lynn, D. H., Mann, D. G., McCourt R. M., Mendoza, L., Moestrup, O., Mozley-Standridge, S. E., Nerad, T. A., Shearer, C. A., Smirnov, A. V., Spiegel, F. W., Taylor, M. F., 2005. The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 52, 399-451.
- Adl, S. M., Simpson, A. G., Lane, C. E., Lukeš, J., Bass, D., Bowser, S. S., Brown, M. W., Burki, F., Dunthorn, M., Hampl, V., Heiss, A., Hoppenrath, M., Lara, E., Le Gall, L., Lynn, D. H., McManus, H., Mitchell, E. A., Mozley-Standridge, S. E., Parfrey, L. W., Pawłowski, J., Rueckert, S., Shadwick, R. S., Schoch, C. L., Smirnov, A., Spiegel, F. W., 2012. The revised classification of eukaryotes. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 59, 429-93.

- Adlard, R. D., Nolan, M. J., 2015. Elucidating the life cycle of *Marteilia sydneyi*, the aetiological agent of QX disease in the Sydney rock oyster (*Saccostrea glomerata*). *International Journal for Parasitology* 45, 419-26.
- Ahn, K. J., Kim, K. H., 2001. Effect of temperature and salinity on in vitro zoosporulation of *Perkinsus* sp. in Manila clams *Ruditapes philippinarum*. *Diseases of Aquatic Organisms* 48, 43-46.
- Aladaileh, S., Nair, S. V., Birch, D., Raftos, D. A., 2007. Sydney rock oyster (*Saccostrea glomerata*) hemocytes: morphology and function. *Journal of Invertebrate Pathology* 96, 48-63.
- Alderman, D. J., 1979. Epizootiology of *Marteilia refringens* in Europe. *Marine Fisheries Review* 41, 67-69.
- Allam, B., Carden, W. E., Ward, J. E., Ralph, G., Winnicki, S., Pales Espinosa, E., 2013. Early host-pathogen interactions in marine bivalves: Evidence that the alveolate parasite *Perkinsus marinus* infects through the oyster mantle during rejection of pseudofeces. *Journal of Invertebrate Pathology* 113, 26-34.
- Álvarez, J. A., Gómez, A., 2007. Herramientas bioinformáticas para el análisis genómico. En: Martínez, P., Figueras, A., (eds) *Genética y Genómica en Acuicultura*. Fundación Observatorio Español de Acuicultura, Madrid, p 849-889.
- Anderson, R. S., 1999a. *Perkinsus marinus* secretory products modulate superoxide anion production by oyster (*Crassostrea virginica*) haemocytes. *Fish and Shellfish Immunology* 9, 51-60.
- Anderson, R. S., 1999b. Lack of hemocyte chemiluminescence stimulation by *Perkinsus marinus* in eastern oysters *Crassostrea virginica* with Dermo disease. *Journal of Aquatic Animal Health* 11, 179-182.
- Anderson, R. S., Paynter, K. T., Burrenson, E. M., 1992. Increased reactive oxygen intermediate production by hemocytes withdrawn from *Crassostrea virginica* infected with *Perkinsus marinus*. *Biological Bulletin* 183, 476-481.
- Anderson, R. S., Unger, M. A., Burrenson, E. M., 1996. Enhancement of *Perkinsus marinus* disease progression in TBT-exposed oysters (*Crassostrea virginica*). *Marine Environmental Research* 42, 177-180.
- Anderson, T. J., Adlard, R. D., Lester, R. J. G., 1995. Molecular diagnosis of *Marteilia sydneyi* (Paramyxea) in the Sydney rock oyster, *Saccostrea commercialis* (Angas). *Journal of Fish Diseases* 18, 507-510.
- Andreu, B., 1968. Pesquería y cultivo de mejillones y ostras en España. *Publicaciones Técnicas de la Junta de Estudios de la Pesca* 7, 303-320.

- Anonymous, 2006. Dredge oyster (OYU5)- Foveaux Strait. Fisheries working group report to NZ Ministry of Fisheries. [http://services.fish.govt.nz/fishresourcespublic/Plenary2006/OYU\\_5\\_06.pdf](http://services.fish.govt.nz/fishresourcespublic/Plenary2006/OYU_5_06.pdf). p 164-179.
- Aranguren, R., Poisa-Beiro, L., Villalba, A., Figueras, A., 2011. Marteiliosis en moluscos. En: Figueras, A., Novoa, B., (eds) Enfermedades de Moluscos Bivalvos de Interés en Acuicultura. Fundación Observatorio Español de Acuicultura, Madrid, p 245-282.
- Aranguren, R., Costa, M. M., Novoa, B., Figueras, A., 2012. Detection of herpesvirus variant (OsHV-1 mu var) in Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) in Spain and development of a rapid method for its differential diagnosis. Bulletin of the European Association of Fish Pathologists 32, 24-29.
- Arzul, I., Gagnaire, B., Bond, C., Chollet, B., Morga, B., Ferrand, S., Robert, M., Renault, T., 2009. Effects of temperature and salinity on the survival of *Bonamia ostreae*, a parasite infecting flat oysters *Ostrea edulis*. Diseases of Aquatic Organisms 85, 67-75.
- Arzul, I., Langlade, A., Chollet, B., Robert, M., Ferrand, S., Omnes, E., Lerond, S., Couraleau, G. Y., Joly, J., François, C., Garcia, C., 2011. Can the protozoan parasite *Bonamia ostreae* infect larvae of flat oysters *Ostrea edulis*?. Veterinary Parasitology 179, 69-76.
- Arzul, I., Chollet, B., Michel, J., Robert, M., Garcia, C., Yoly, J. P., François, C., Miossec, L., 2012. One *Perkinsus* species may hide another: characterization of *Perkinsus* species present in clam production areas of France. Parasitology 139, 1757-1771.
- Arzul, I., Chollet, B., Boyer, S., Bonnet, D., Gaillard, J., Baldi, Y., Robert, M., Joly, J. P., Garcia, C., Bouchouca, M., 2014. Contribution to the understanding of the cycle of the protozoan parasite *Marteilia refringens*. Parasitology 141, 227-240.
- Audemard, C., Barnaud, A., Collins, C. M., Le Roux, F., Sauriau, P. G., Coustau, C., Blachier, P. G., Berthe, F. C. J., 2001. Claire ponds as an experimental model for *Marteilia refringens* life-cycle studies: new perspectives. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 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, 315-323.
- Audemard, C., Sajus, M. C., Barnaud, A., Sautour, B., Sauriau, P. G., Berthe, F. J., 2004a. Infection dynamics of *Marteilia refringens* in flat oyster *Ostrea edulis* and copepod *Paracartia grani* in a claire pond of Marennes-Oléron Bay. Diseases of Aquatic Organisms 21, 103-111.

- Audemard, C., Reece, K. S., Burreson, E. M., 2004b. Real-time PCR for detection and quantification of the protistan parasite *Perkinsus marinus* in environmental waters. *Applied and Environmental Microbiology* 70, 6611-6618.
- Audemard, C., Carnegie, R. B., Bishop, M. J., Peterson, C. H., Burreson, E. M., 2008. Interacting effects of temperature and salinity on *Bonamia* sp. parasitism in the Asian oyster *Crassostrea ariakensis*. *Journal of Invertebrate Pathology* 98, 344-350.
- Audemard, C., Carnegie, R. B., Hill, K. M., Peterson, C. H., Burreson, E. M., 2014. *Bonamia exitiosa* transmission among, and incidence in, Asian oyster *Crassostrea ariakensis* under warm euhaline conditions. *Diseases of Aquatic Organisms* 110, 143-150.
- Auffret, M., Poder, M., 1985. Recherches sur *Marteilia maurini*, parasite de *Mytilus edulis* sur les cotes de Bretagne nord. *Revue des Travaux de l'Institut des Pêches Maritimes* 47, 105-109.
- Auzoux-Bordenave, S., Vigario, A. M., Ruano, F., Domart-Coulon, I., Doumenc, D., 1995. In vitro sporulation of the clam pathogen *Perkinsus atlanticus* (Apicomplexa, Perkinsea) under various environmental conditions. *Journal of Shellfish Research* 14, 469-475.
- Azevedo, C., 1989. Fine structure of *Perkinsus atlanticus* n. sp. (Apicomplexa, Perkinsea) parasite of the clam *Ruditapes decussatus* from Portugal. *Journal of Parasitology* 75, 627-635.
- Bachvaroff, T. R., Handy, S. M., Place, A. R., Delwiche, C. F., 2011. Alveolate phylogeny using ribosomal proteins. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 58, 223-233.
- Bachvaroff T. R., Gornik, S. G., Concepcion, G. T., Waller, R. F., Mendez, G. S., Lippmeier, J. C., Delwiche, C. F., 2014. Dinoflagellate phylogeny revisited: Using ribosomal proteins to resolve deep branching dinoflagellate clades. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 70, 314-322.
- Balouet, G., 1977 *Marteilia refringens*-considerations of the life cycle and development of Abers disease in *Ostrea edulis*. International Symposium Haplosporidian and Haploporidian-like Diseases of Shellfish, Gloucester Point, VA (EE. UU). En: Haplosporidian and Haplosporidian like diseases of shellfish. An international symposium held at the Virginia Institute of the Marine Science, Gloucester Point, Virginia (EE. UU) 41, 64-66.
- Balouet, G., 1979 *Marteilia refringens* -Considerations of the life cycle and development of Aber disease in *Ostrea edulis*. *Marine Fishery Review* 41, 64-66.
- Balouet, G., Cahour, A., Chastel, Y. C., 1979. Epidémiologie de la maladie de la glande digestive de l'huître plate: hypothèse sur le cycle de *Marteilia refringens*. *Haliotis* 8, 323-326.

- Balseiro, P., Montes, A., Ceschia, G., Gestal, C., Novoa, B., Figueras, A., 2007. Molecular epizootiology of the European *Marteilia* spp., infecting Mussels (*Mytilus galloprovincialis* and *M. edulis*) and oysters (*Ostrea edulis*): an update. Bulletin of the European Association of Fish Pathologists 27, 148-156.
- Balseiro, P., Montes, J., Fernández, R., Novoa, B., Figueras, A. (2010). Comparison of diagnostic techniques to detect the clam pathogen *Perkinsus olseni*. Diseases of Aquatic Organisms 90, 143-151.
- Barber, B. J., Mann, R., 1991. Sterile triploid *Crassostrea virginica* (Gmelin 1791) grow faster than diploids but are equally susceptible to *Perkinsus marinus*. Journal of Shellfish Research 10, 445-450.
- Batista, F. M., López-Sanmartín, M., Grade, A., Navas, J. I., Ruano, F., 2015. Detection of *Bonamia exitiosa* in the European flat oyster *Ostrea edulis* in southern Portugal. Journal of Fish Diseases doi: 10.1111/jfd.12396.
- Bauer, O. N., 1991. Spread of parasites and diseases of aquatic organisms by acclimatization: a short review. Journal of Fish Biology 39, 679-686.
- Baud, J. P., Gerard, A., Naciri-Graven, Y., 1997. Comparative growth and mortality of *Bonamia ostreae*-resistant and wild flat oysters, *Ostrea edulis*, in an intensive system. I. First year of experiment. Marine Biology 130, 71-79.
- Bebiano, M. J., 1995. Effects of pollutants in the Ria Formosa Lagoon, Portugal. Science of the Total Environment 171, 107-115.
- Belhssen, O., Kodad, S., Talbaoui, E., Orbi, A., 2008. The Moroccan plan of zoosanitary surveillance of shellfish. En: Villalba, A., (ed) Workshop for the analysis of the impact of perkinsosis to the European shellfish industry, Centro de Investigacións Mariñas, Consellería de Pesca e Asuntos Marítimos da Xunta de Galicia, Vilanova de Arousa. Centro Tecnológico del Mar – Fundación CETMAR, Vigo, p 156.
- Berthe, F. C. J., Hine, P. M., 2003. *Bonamia exitiosa* Hine *et al.*, 2001 is proposed instead of *B. exitiosus* as the valid name of *Bonamia* sp. infecting flat oysters *Ostrea chilensis* in New Zealand. Diseases of Aquatic Organisms 57, 181.
- Berthe, F. C. J., Pernas, M., Zerabib, M., Haffner, P., Thébault, A., Figueras, A. J., 1998. Experimental transmission of *Marteilia refringens* with special considerations for its life cycle. Diseases of Aquatic Organisms 34, 135-144.
- Berthe, F. C. J., Le Roux, F., Peyretailade, E., Peyret, P., Rodriguez, D., Gouy, M., Vivares, C. P., 2000. Phylogenetic analysis of the small subunit ribosomal RNA of *Marteilia refringens* validates the existence of Phylum Paramyxia (Desportes and Perkins, 1990). Journal of Eukaryotic Microbiology 47, 288-293.
- Berthe, F. C. J., Le Roux, F., Adlard, R., Figueras, A., 2004. Marteiliosis in molluscs: a review. Aquatic Living Resources 17, 433-448.

- Bezemer, B., Butt, D., Nell, J., Adlard, R., Raftos, D., 2006. Breeding for QX disease resistance negatively selects one form of the defensive enzyme, phenoloxidase, in Sydney rock oysters. *Fish and Shellfish Immunology* 20, 627-36.
- Bishop, M., Carnegie, R., Stokes, N., Peterson, C., Bureson, E., 2006. Complications of a non-native oyster introduction: facilitation of a local parasite. *Marine Ecology Progress Series* 325, 145-152.
- Blackbourn, J., Bower, S. M., Meyer, G. R., 1998. *Perkinsus qugwadi* sp. nov. (incertae sedis), a pathogenic protozoan parasite of Japanese scallops, *Patinopecten yessoensis*, cultured in British Columbia, Canada. *Canadian Journal of Zoology* 76, 942-953.
- Blackburn, T. M., Pyšek, P., Bacher, S., Carlton, J. T., Duncan, R. P., Jarošík, V., Wilson, J. R., Richardson, D. M., 2011. A proposed unified framework for biological invasions. *Trends in Ecology and Evolution* 26, 333-339.
- Bonami, J. P., Grizel, H., Vago, C., 1971. Recherches sur une maladie épizootique de l'huître plate, *Ostrea edulis* Linné. *Revue des Travaux de l'Institut des Pêches Maritimes* 35, 415-418.
- Bower, S. M., 1988. Circumvention of mortalities caused by Denman Island oyster disease during mariculture of Pacific oysters. *American Fisheries Society Special Publication* 18, 246-248.
- Bower, S. M., 2010. Synopsis of Infectious Diseases and Parasites of Commercially Exploited Shellfish. [http://www.pac.dfo-mpo.gc.ca/sci/shelldis/toc\\_e.htm](http://www.pac.dfo-mpo.gc.ca/sci/shelldis/toc_e.htm).
- Bower, S. M., 2015. Synopsis of Infectious Diseases and Parasites of Commercially Exploited Shellfish: *Mikrocytos* spp. of Oysters.
- Bower, S.M., Blackbourn, J., Meyer, G. R., Nishimura, D. J. H., 1992. Diseases of cultured scallops (*Patinopecten yessoensis*) in British Columbia, Canada. *Aquaculture* 107, 201-210.
- Bower, S. M., McGladdery, S. E., Price, I. M., 1994. Synopsis of infectious diseases and parasites of commercially exploited shellfish. *Annual Review of Fish Diseases* 4, 1-199.
- 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. *Diseases of Aquatic Organisms* 29, 111-116.
- Bower, S. M., Blackbourn, J., Meyer, G. R., 1998. Distribution, prevalence, and pathogenicity of the protozoan *Perkinsus qugwadi* in Japanese scallops, *Patinopecten yessoensis*, cultured in British Columbia, Canada. *Canadian Journal of Zoology* 76, 954-959.

- Bower, S. M., Bate, K., Meyer, G. R., 2005. Susceptibility of juvenile *Crassostrea gigas* and resistance of *Panope abrupta* to *Mikrocytos mackini*. *Journal of Invertebrate Pathology* 88, 95-99.
- Boyer, S., Chollet, B., Bonnet, D., Arzul, I., 2013. New evidence for the involvement of *Paracartia grani* (Copepoda, Calanoida) in the life cycle of *Marteilia refringens* (Paramyxia). *International Journal for Parasitology* 43, 1089-1099.
- Brehélin, M., Bonami, J. R., Cousserans, F., Vivares, C.P., 1982. True plasmodial forms exist in *Bonamia ostreae*, a pathogen of the European flat oyster *Ostrea edulis*. *Comptes Rendus De L Academie Des Sciences Serie Iii-Sciences De La Vie-Life Sciences* 295, 45-48.
- Buchanan, J. T., Cheng, T. C., La Peyre, J. F., Cooper, R. K., Tiersch, T. R., 2001a. *In vitro* transfection of adult eastern oysters *Crassostrea virginica*. *Journal of the World Aquaculture Society* 32, 286-299.
- Buchanan, J. T., Nickens, A. D., Cooper, R. K., Tiersch, T. R., 2001b. Transfection of eastern oysters *Crassostrea virginica* embryos. *Marine Biotechnology* 3, 322-335.
- Bucke, D., 1988. Pathology of bonamiasis. *Parasitology Today* 4, 174-176.
- Bulgakov, A. A., Park, K. I., Choi, K. S., Kim, H. K., Cho, M., 2004. Purification and characterisation of a lectin isolated from the Manila clam *Ruditapes philippinarum* in Korea. *Fish & Shellfish Immunology* 16, 487-499.
- Burki, F., Corradi, N., Sierra, R., Pawlowski, J., Meyer, G. R., Abbott, C. L., Keeling, P. J., 2013. Phylogenomics of the intracellular parasite *Mikrocytos mackini* reveals evidence for a mitosome in Rhizaria. *Current Biology* 23, 1541-1547.
- Burreson, E. M., 2005. Haplosporidia (haplosporidians). En Rohde, K., (ed) *Marine Parasitology*, CSIRO; Collingwood, Victoria, Australia, p 23-25.
- Burreson, E. M., 2008. Misuse of PCR assay for diagnosis of mollusc protistan infections. *Diseases of Aquatic Organisms* 80, 81-83.
- Burreson, E. M., Reece, K. S., 2006. Spore ornamentation of *Haplosporidium nelsoni* and *Haplosporidium costale* (Haplosporidia), and incongruence of molecular phylogeny and spore ornamentation in the haplosporidia. *Journal of Parasitology* 92, 1295-1301.
- Burreson, E. M., Ragone Calvo, L. M., La Peyre, J. F., Counts, F., Paynter, K. T., 1994. Acute osmotic tolerance of cultured cells of the oyster pathogen *Perkinsus marinus* (Apicomplexa:Perkinsida). *Comparative Biochemistry and Physiology, series A*, 109, 575-582.

- Burreson, E. M., Stokes, N. A., Carnegie, R. B., Bishop, M. J., 2004. *Bonamia* sp. (Haplosporidia) found in nonnative oysters *Crassostrea ariakensis* in Bogue Sound, North Carolina. *Journal of Aquatic Animal Health* 16, 1-9.
- Burreson, E. M., Reece, K. S., Dungan, C. F., 2005. Molecular, morphological, and experimental evidence support the synonymy of *Perkinsus chesapeaki* and *Perkinsus andrewsi*. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 52, 258-270.
- Bushek, D., Allen, S. K., Alcox, K. A., Gustafson, R., Ford, S. E., 1997. Response of *Crassostrea virginica* to *in vitro* cultured *Perkinsus marinus*: preliminary comparison of three inoculation methods. *Journal of Shellfish Research* 16, 479-485.
- Bushek, D., Ford, S. E., Chintala, M. M., 2002. Comparison of *in vitro*-cultured and wild-type *Perkinsus marinus*. III. Fecal elimination and its role in transmission. *Diseases of Aquatic Organisms* 51, 217-225.
- Bushek, D., Landau, B., Scarpa, E., 2008. *Perkinsus chesapeaki* in stout razor clams *Tagelus plebeius* from Delaware Bay. *Diseases of Aquatic Organisms* 78, 243-247.
- Butt, D., Raftos, D., 2007. Immunosuppression in Sydney rock oysters (*Saccostrea glomerata*) and QX disease in the Hawkesbury River, Sydney. *Marine and Freshwater Research* 58, 213-221.
- Butt, D., Raftos, D., 2008. Phenoloxidase-associated cellular defence in the Sydney rock oyster, *Saccostrea glomerata*, provides resistance against QX disease infections. *Developmental & Comparative Immunology* 32, 299-306.
- Butt, D., Shaddick, K., Raftos, D., 2006. The effect of low salinity on phenoloxidase activity in the Sydney rock oyster, *Saccostrea glomerata*. *Aquaculture* 251, 159-166.
- Cadoret, J. P., Boulo, V., Gendreau, S., Mialhe, E., 1997a. Promoters from *Drosophila* heat shock protein and cytomegalovirus drive transient expression of luciferase introduced by particle bombardment into embryos of the oyster *Crassostrea gigas*. *Journal of Biotechnology* 56, 183-189.
- Cadoret, J. P., Gendreau, S., Delecheneau, J. M., Rousseau, C., Mialhe, E., 1997b. Microinjection of bivalve eggs: application in genetics. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 6, 72-77.
- Calvo, G. W., Burreson, E. M., 1994. *In vitro* and *in vivo* effects of eight chemotherapeutants on the oyster parasite *Perkinsus marinus* (Mackin, Owen, and Collier). *Journal of Shellfish Research* 13, 101-107.
- Camacho, A. P., Villalba, A., Beiras, R., Labarta, U., 1997. Absorption efficiency and condition of cultured mussels (*Mytilus edulis galloprovincialis* Linnaeus) of Galicia (NW Spain) infected by parasites *Marteilia refringens* Grizel *et al* and *Mytilicola intestinalis* Steuer. *Journal of Shellfish Research* 16, 77-82.

- Campalans, M., Rojas, P., Gonzalez, M., 2000. Haemocytic parasitosis in the farmed oyster *Tiostrea chilensis*. Bulletin of the European Association of Fish Pathologists 20, 31-33.
- Cao, A., Fuentes, J., Comesaña, P., Casas, S. M., Villalba, A., 2009. A proteomic approach envisaged to analyse the bases of oyster tolerance/resistance to bonamiosis. Aquaculture 295, 149-156.
- Carballal, M. J., Villalba, A., López, C., 1998. Seasonal variation and effects of age, food availability, size, gonadal development and parasitism on the hemogram of *Mytilus galloprovincialis*. Journal of Invertebrate Pathology 72, 304-312.
- Carella, F., Aceto, S., Marrone, R., Maiolino, P., De Vico, G., 2010. *Marteilia refringens* infection in cultured and natural beds of mussels (*Mytilus galloprovincialis*) along the Campanian coast (Tirrenian Sea, South of Italy). Bulletin of the European Association of Fish Pathologists 30, 189-196.
- Carnegie, R. B., Cochenec-Laureau, N., 2004. Microcell parasites of oysters: Recent insights and future trends. Aquatic Living Resources 17, 519-528.
- Carnegie, R. B., Barber, B. J., Culloty, S. C., Figueras, A. J., Distel, D. L., 2000. Development of a PCR assay for detection of the oyster pathogen *Bonamia ostreae* and support for its inclusion in the Haplosporidia. Diseases of Aquatic Organisms 42, 199-206.
- Carnegie, R. B., Barber, B. J., Distel, D. L., 2003a. Detection of the oyster parasite *Bonamia ostreae* by fluorescent *in situ* hybridization. Diseases of Aquatic Organisms 55, 247-252.
- Carnegie, R. B., Meyer, G. R., Blackbourn, J., Cochenec-Laureau, N., Berthe, F. C. J., Bower, S. M., 2003b. Molecular detection of the oyster parasite *Mikrocytos mackini*, and a preliminary phylogenetic analysis. Diseases of Aquatic Organisms 54, 219-227.
- Carnegie, R. B., Burreson, E. M., Hine, P. M., Stokes, N. A., Audemard, C., Bishop, M. J., Peterson, C. H., 2006. *Bonamia perspora* n. sp (Haplosporidia), a Parasite of the Oyster *Ostreola equestris*, is the First *Bonamia* Species Known to Produce Spores. Journal of Eukaryotic Microbiology 53, 232-245.
- Carnegie, R. B., Stokes, N. A., Audemard, C., Bishop, M. J., Wilbur, A. E., Alphin, T. D., Posey, M. H., Peterson, C. H., Burreson, E. M., 2008. Strong seasonality of *Bonamia* sp. infection and induced *Crassostrea ariakensis* mortality in Bogue and Masonboro Sounds, North Carolina, USA. Journal of Invertebrate Pathology 98, 335-343.
- Carnegie, R. B., Hill, K. M., Stokes, N. A., Burreson, E. M., 2014. The haplosporidian *Bonamia exitiosa* is present in Australia, but the identity of the parasite described as *Bonamia* (formerly *Mikrocytos*) *roughleyi* is uncertain. Journal of Invertebrate Pathology 115, 33-40.

- Carrasco, N., López-Flores, I., Alcaraz, M., Furones, M. D., Berthe, F. C., Arzul, I., 2007. Dynamics of the parasite *Marteilia refringens* (Paramyxea) in *Mytilus galloprovincialis* and zooplankton populations in Alfacs Bay (Catalonia, Spain). *Parasitology* 134, 1541-50.
- Carrasco, N., Arzul, I., Chollet, B., Robert, M., Joly, J. P., Furones, M. D., Berthe, Y. F. C., 2008. Comparative experimental infection of the copepod *Paracartia grani* with *Marteilia refringens* and *Marteilia maurini*. *Journal of Fish Diseases* 31, 497-504.
- Carrasco, N., Roque, A., Andree, K. B., Rodgers, C., Lacuesta, B., Furones, M. D., 2011. A *Marteilia* parasite and digestive epithelial virosis lesions observed during a common edible cockle *Cerastoderma edule* mortality event in the Spanish Mediterranean coast. *Aquaculture* 321, 197-202.
- Carrasco, N., Villalba, A., Andree, K. B., Engelsma, M. Y., Lacuesta, B., Ramilo, A., Gairín, I., Furones, M. D., 2012a. *Bonamia exitiosa* (Haplosporidia) observed infecting the European flat oyster *Ostrea edulis* cultured on the Spanish Mediterranean coast. *Journal of Invertebrate Pathology* 110, 307-313.
- Carrasco, N., Andree, K. B., Lacuesta, B., Roque, A., Rodgers, C., Furones, M. D., 2012b. Molecular characterization of the *Marteilia* parasite infecting the common edible cockle *Cerastoderma edule* in the Spanish Mediterranean coast. A new *Marteilia* species affecting bivalves in Europe?. *Aquaculture* 324-325, 20-26.
- Carrasco, N., Hine, P. M., Durfort, M., Andree, K. B., Malchus, N., Lacuesta, B., González, M., Roque, A., Rodgers, C., Furones, M. D., 2013. *Marteilia cochillia* sp. nov., a new *Marteilia* species affecting the edible cockle *Cerastoderma edule* in European waters *Aquaculture* 412-413, 223-230.
- Carrasco, N., Rojas, M., Aceituno, P., Andree, K. B., Lacuesta, B., Furones, M. D., 2014. *Perkinsus chesapeaki* observed in a new host, the European common edible cockle *Cerastoderma edule*, in the Spanish Mediterranean coast. *Journal of Invertebrate Pathology* 117, 56-60.
- Casas, S. M., Villalba, A., 2012. Study of perkinsosis in the grooved carpet shell clam *Ruditapes decussatus* in Galicia (NW Spain). III. The effects of *Perkinsus olseni* infection on clam reproduction. *Aquaculture* 356-357, 40-47.
- Casas, S. M., La Peyre, J. F., 2013. Identifying factors inducing trophozoite differentiation into hypnospores in *Perkinsus* species. *European Journal of Protistology* 49, 201-209.
- Casas, S. M., Villalba, A., Reece, K. S., 2002. Study of perkinsosis in the carpet shell clam *Tapes decussatus* in Galicia (NW Spain). I. Identification of the aetiological agent and in vitro modulation of zoosporulation by temperature and salinity. *Diseases of Aquatic Organisms* 50, 51-65.

- Casas, S. M., Grau, A., Reece, K. S., Apakupakul, K., Azevedo, C., Villalba, A., 2004. *Perkinsus mediterraneus* n. sp., a protistan parasite of the European flat oyster *Ostrea edulis* from the Balearic Islands, Mediterranean Sea. *Diseases of Aquatic Organisms* 58, 231-244.
- Cavalier-Smith, T., Chao, E. E., 2003. Phylogeny and classification of phylum Cercozoan (Protozoa). *Protistology* 154, 341-358.
- Cavalier-Smith, T., Chao, E. E., 2004. Protoalveolate phylogeny and systematics and the origins of Sporozoa and dinoflagellates (phylum Myzozoa nom. nov.). *European Journal of Protistology* 40, 185-212.
- Cerviño, A., 2011. Ciclo reproductivo, cultivo en criadero y en el medio natural de la almeja babosa *Venerupis pullastra* (Montagu, 1803). Tesis doctoral. Universidad de Santiago de Compostela.
- Chagot, D., Comps, M., Boulo, V., Ruano, F., Grizel, H., 1987. Histological study of a cellular reaction in *Ruditapes decussatus* infected by a protozoan. *Aquaculture* 67, 260-261.
- Chintala, M. M., Bushek, D., Ford, S. E., 2002. Comparison of *in vitro*-cultured and wild-type *Perkinsus marinus*. I. Dosing methods and host response. *Diseases of Aquatic Organisms* 51, 203-216.
- Choi, K.S., Park, K. I., 1997. Report on the occurrence of *Perkinsus* spp. in the Manila clams, *Ruditapes philippinarum*, in Korea. *Journal of Aquaculture* 10, 227-237.
- Choi, K. S., Wilson, E. A., Lewis, D. H., Powell, E. N., Ray, S. M., 1989. The energetic cost of *Perkinsus marinus* parasitism in oysters: quantification of the thioglycollate method. *Journal of Shellfish Research* 8, 125-131.
- Choi, K. S., Park, K. I., Lee, K. W., Matsuoka, K., 2002. Infection intensity, prevalence and histopathology of *Perkinsus* sp. in the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*, in Isahaya Bay, Japan. *Journal of Shellfish Research* 21, 119-125.
- Chu, F., 1996. Laboratory investigations of susceptibility, infectivity and transmission of *Perkinsus marinus* in oysters. *Journal of Shellfish Research* 15, 57-66.
- Chu, F., Greene, K. H., 1989. Effect of temperature and salinity on *in vitro* culture of the oyster pathogen, *Perkinsus marinus* (Apicomplexa: Perkinsea). *Journal of Invertebrate Pathology* 53, 260-268.
- Chu, F., Hale, R. C., 1994. Relationship between pollution and susceptibility to infectious diseases in the eastern oyster, *Crassostrea virginica*. *Marine Environmental Research* 38, 243-256.
- Chu, F., La Peyre, J. F., 1993. Development of disease caused by the parasite *Perkinsus marinus* and defense-related hemolymph factors in three populations of oysters from the Chesapeake Bay, USA. *Journal of Shellfish Research* 12, 21-27.

- Cigarría, J., Elston, R., 1997. Independent introduction of *Bonamia ostreae*, a parasite of *Ostrea edulis*, to Spain. *Diseases of Aquatic Organisms* 29, 157-158.
- Clark, M. S., Thorne, M. A., Vieira, F. A., Cardoso, J. C., Power, D. M., Peck, L. S., 2010. Insights into shell deposition in the Antarctic bivalve *Laternula elliptica*: gene discovery in the mantle transcriptome using 454 pyrosequencing. *BMC Genomics* 11, 1471-2164.
- Claver-Derqui, A., 1990. Datos sobre Marteiliosis en la provincia de Cadiz. Acta III Congreso Nacional de Acuicultura, p 885.
- Cochennec, N., Le Roux, F., Berthe, F., Gerard, A., 2000. Detection of *Bonamia ostreae* based on small subunit ribosomal probe. *Journal of Invertebrate Pathology* 76, 26-32.
- Cochennec-Laureau, N., Reece, K., Berthe, F., Hine, P., 2003a. *Mikrocytos roughleyi* taxonomic affiliation leads to the genus *Bonamia* (Haplosporidia). *Diseases of Aquatic Organisms* 54, 209-217.
- Cochennec-Laureau, N., Auffret, M., Renault, T., Langlade, A., 2003b. Changes in circulating and tissue-infiltrating hemocyte parameters of European flat oysters, *Ostrea edulis*, naturally infected with *Bonamia ostreae*. *Journal of Invertebrate Pathology* 83, 23-30.
- Comesaña, P., Casas, S. M., Cao, A., Abollo, E., Arzul, I., Morga, B., Villalba, A., 2012. Comparison of haemocytic parameters among flat oyster *Ostrea edulis* stocks with different susceptibility to bonamiosis and the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Journal of Invertebrate Pathology* 109, 274-286.
- Comps, M., 1970. Observations sur les causes d'une mortalité anormale des huîtres plates (*Ostrea edulis* L.) dans le bassin de Marennes. *Revue des Travaux de l'Institut des Pêches Maritimes* 34, 317-326.
- Comps, M., 1976. *Marteilia lengehi* n. sp., parasite de l'huître *Crassostrea cucullata* Born. *Revue des Travaux de l'Institut des Pêches Maritimes* 40, 347-349.
- Comps, M., 1983. Etude morphologique de *Marteilia christenseni* sp. n. parasite du lavignon *Scrobicularia piperata* P. (mollusque pelecypode). *Revue des Travaux de l'Institut des Pêches Maritimes* 47, 99-104.
- Comps, M., Grizel, H., Papayanni, Y., 1982. Parasitic diseases due to *Marteilia maurini* in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. ICES, Copenhagen, Denmark, p 3.
- Corbeil, S., Arzul, I., Robert, M., Berthe, F., Besnard-Cochennec, N., Crane, M. S., 2006a. Molecular characterisation of an Australian isolate of *Bonamia exitiosa*. *Diseases of Aquatic Organisms* 71, 81-85.

- Corbeil, S., Arzul, I., Diggles, B., Heasman, M., Chollet, B., Berthe, F., Crane, M., 2006b. Development of a TaqMan PCR assay for the detection of *Bonamia* species. *Diseases of Aquatic Organisms* 71, 75-80.
- Coss, C. A., Robledo, J. A. F., Ruiz, G. M., Vasta, G. R., 2001a. Description of *Perkinsus andrewsi* n. sp. isolated from the Baltic clam (*Macoma balthica*) by characterization of the ribosomal RNA locus, and development of a species-specific PCR- based diagnostic assay. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 48, 52-61.
- Coss, C. A., Robledo, J. A. F., Vasta, G. R., 2001b. Fine structure of clonally propagated in vitro life stages of a *Perkinsus* sp. isolated from the Baltic clam *Macoma balthica*. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 48, 38-51.
- Cranfield, H. J., Dunn, A., Doonan, I. J., Michael, K. P., 2005. *Bonamia exitiosa* epizootic in *Ostrea chilensis* from Foveaux Strait, southern New Zealand between 1986 and 1992. *ICES Journal of Marine Science* 62, 3-13.
- 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. *Diseases of Aquatic Organisms* 64, 85-90.
- Culloty, S. C., Mulcahy, M. F., 1996. Season-, age-, and sex-related variation in the prevalence of bonamiasis in flat oysters (*Ostrea edulis* L) on the south coast of Ireland. *Aquaculture* 144, 53-63.
- Culloty, S. C., Mulcahy, M. F., 2001. Living with bonamiasis: Irish research since 1987. *Hydrobiologia* 465, 181-186.
- Culloty, S. C., Novoa, B., Pernas, M., Longshaw, M., Mulcahy, M. F., Feist, S. W., Figueras, A., 1999. Susceptibility of a number of bivalve species to the protozoan parasite *Bonamia ostreae* and their ability to act as vectors for this parasite. *Diseases of Aquatic Organisms* 37, 73-80.
- Culloty, S., Cronin, M. A., Mulcahy, M. F., 2001. An investigation into the relative resistance of Irish flat oysters *Ostrea edulis* L. to the parasite *Bonamia ostreae* (Pichot et al., 1980). *Aquaculture* 199, 229-244.
- Culloty, S., Cronin, M. A., Mulcahy, M. F., 2004. Potential resistance of a number of populations of the oyster *Ostrea edulis* to the parasite *Bonamia ostreae*. *Aquaculture* 237, 41-58.
- da Silva, P. M., Fuentes, J., Villalba, A., 2005. Growth, mortality and disease susceptibility of oyster *Ostrea edulis* families obtained from brood stocks of different geographical origins, through on-growing in the Ría de Arousa (Galicia, NW Spain). *Marine Biology* 147, 965-977.

- da Silva, P. M., Comesaña, P., Fuentes, J., Villalba, A., 2008. Variability of haemocyte and haemolymph parameters in European flat oyster *Ostrea edulis* families obtained from brood stocks of different geographical origins and relation with infection by the protozoan *Bonamia ostreae*. *Fish & Shellfish Immunology* 24, 551-563.
- da Silva, P. M., Fuentes, J., Villalba, A., 2009. Differences in gametogenic cycle among strains of the European flat oyster *Ostrea edulis* and relationship between gametogenesis and bonamiosis. *Aquaculture* 287, 253-265.
- da Silva, P. M., Scardua, M. P., Vianna, R. T., Mendonça, R. C., Vieira, C. B., Dungan, C. F., Scott, G. P., Reece, K. S., 2014. *Two Perkinsus spp. infect Crassostrea gasar* oysters from cultured and wild populations of the Rio São Francisco estuary, Sergipe, northeastern Brazil. *Journal of Invertebrate Pathology* 119, 62-71.
- Dang, C., Lambert, C., Soudant, P., Delamare-Deboutteville, J., Zhang, M. M., Chan, J., Green, T. J., Le Goïc, N., Barnes, A. C., 2011. Immune parameters of QX-resistant and wild caught *Saccostrea glomerata* hemocytes in relation to *Marteilia sydneyi* infection. *Fish & Shellfish Immunology* 31, 1034-1040.
- Dang, C., Cribb, T. H., Cutmore, S. C., Chan, J. L., Henault, O., Barnes, A. C., 2013. Parasites of QX-resistant and wild-type Sydney rock oysters (*Saccostrea glomerata*) in Moreton Bay, SE Queensland, Australia: Diversity and host response. *Journal of Invertebrate Pathology* 112, 273-277.
- Dang, C., Dungan, C. F., Scott, G. P., Reece, K. S., 2015. *Perkinsus* sp. infections and in vitro isolates from *Anadara trapezia* mud arks of Queensland, Australia. *Diseases of Aquatic Organisms* 113, 51-58.
- De Faveri, J., Smolowitz, R. M., Roberts, S. B., 2009. Development and validation of a real time quantitative PCR assay for the detection and quantification of *Perkinsus marinus* in the eastern oyster, *Crassostrea virginica*. *Journal of Shellfish Research* 28, 459-464.
- De la Ballina, N., Ramilo, A., Villalba, A., Cao, A., 2013. Proteomic approach to identify markers of resistance to bonamiosis in the proteins of the oyster *Ostrea edulis* haemolymph. *Fish & Shellfish Immunology* 34, 1692-1752.
- de la Herrán, R., 1998. Utilidad del ADN satélite y ADN ribosómico en la filogenia, taxonomía y diagnosis de enfermedades de peces y almejas. Tesis Doctoral. Universidad de Granada.
- de la Herrán, R., Garrido-Ramos, M. A., Navas, J. I., Ruiz Rejón, C., Ruiz Rejón, M., 2000. Molecular characterization of the ribosomal RNA gene region of *Perkinsus atlanticus*: its use in phylogenetic analysis and as a target for a molecular diagnosis. *Parasitology* 120, 345-353.

- Desportes, I., 1984. The Paramyxea Levine 1979: an original example of evolution towards multicellularity. *Origins Life* 13, 343-352.
- Desportes, I., Lom, J., 1981. Affinités de *Paramyxa paradoxa* Chatton, 1911, parasite de *Poecilochaetus serpens* (Annélide polychète) avec les Marteliidae Sprague, parasites d'huîtres et du crustacé *Orchestia gammarellus*. *Comptes rendus hebdomadaires des seances de l'Academy des Sciences, Serie D* 292, 627-632.
- Desportes, I., Nashed, N. N., 1983. Ultrastructure of sporulation in *Minchinia dentali* (Arvy), an haplosporean parasite of *Dentalium entale* (Scaphopoda, Mollusca); taxonomic implications. *Protistologica* 19, 435-460.
- Desportes, I., Ginsburger-Vogel, T., 1977. Affinities of the genus *Marteilia*, parasite of oysters (Aber disease) and of the crustacean *Orchestia gammarellus* (Pallas) with the myxosporida, Actinomyxida and Paramyxida. *Comptes rendus hebdomadaires des seances de l'Academydes Sciences, Serie D* 285, 1111-1114.
- Dinamani, P., Hine, P. M., Jones, J. B., 1987. Occurrence and characteristics of the haemocyte parasite *Bonamia* sp. in the New Zealand dredge oyster *Tiostrea lutaria*. *Diseases of Aquatic Organisms* 3, 37-44.
- Directiva 2006/88/CE del Consejo de 24 de octubre de 2006 relativa a los requisitos zoonosanitarios de los animales y de los productos de la acuicultura, y a la prevención y el control de determinadas enfermedades de los animales acuáticos. *Diario Oficial de la Unión Europea* (24.11.2006).
- Dobson, A. P., May, R. M., 1986. Patterns of invasions by pathogens and parasites. En: Mooney, H. A., Drake, J. A., (eds) *Ecology and Biological Invasions of North America and Hawaii*. Springer-Verlag, Berlin, p 58-76.
- Doonan, I. J., Cranfield, H. J., Michael, K. P., 1994. Catastrophic reduction of the oyster, *Tiostrea chilensis* (Bivalvia, Ostreidae), in Foveaux Strait, New Zealand, due to infestation by the protistan *Bonamia* sp. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research* 28, 335-344.
- Dove, M. C., Nell, J. A., Mcorrie, S., O'Connor, W. A., 2013a. Assessment of QX and winter mortality disease resistance of mass selected sydney rock oysters, *Saccostrea glomerata* (Gould, 1850), in the Hawkesbury River and Merimbula Lake, NSW Australia. *Journal of Shellfish Research* 32, 681-687.
- Dove, M. C., Nell, J. A., O'Connor, W. A., 2013b. Evaluation of the progeny of the fourth-generation Sydney rock oyster *Saccostrea glomerata* (Gould, 1850) breeding lines for resistance to QX disease (*Marteilia sydneyi*) and winter mortality (*Bonamia roughleyi*). *Aquaculture Research* 44, 1791-1800.

- Dungan, C. F., Hamilton, R. M., 1995. Use of the tetrazolium-based cell proliferation assay to measure effects of *in vitro* conditions on *Perkinsus marinus* (Apicomplexan) proliferation. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 42, 379-388.
- Dungan, C. F., Reece, K. S., 2006. *In vitro* propagation of two *Perkinsus* spp. parasites from Japanese Manila clams *Venerupis philippinarum* and description of *Perkinsus honshuensis* n. sp. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 53, 316-326.
- Dungan, C. F., Hamilton, R. M., Hudson, K. L., McCollough, C. B., Reece, K.S., 2002. Two epizootic diseases in Chesapeake Bay commercial clams, *Mya arenaria* and *Tagelus plebius*. *Diseases of Aquatic Organisms* 50, 67-78.
- Dungan, C. F., Reece, K. S., Moss, J. A., Hamilton, R. M., Diggles, B. K., 2007. *Perkinsus olseni* *in vitro* isolates from the New Zealand clam *Austrovenus stutchburyi*. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 54, 263-270.
- Dungan, C. F., Carnegie, R. B., Hill, K. M., McCollough, C. B., Laramore, S. E., Kelly, C.J., Stokes, N. A., Scarpa, J., 2012. Diseases of oysters *Crassostrea ariakensis* and *C. virginica* reared in ambient waters from the Choptank River, Maryland and the Indian River Lagoon, Florida. *Diseases of Aquatic Organisms* 101, 173-183.
- Edwards, M. C., Gibbs, R. A., 1994. Multiplex PCR: advantages, development, and applications. *PCR Methods Applied* 3, S65-75.
- Eid, J., Fehr, A., Gray, J., Luong, K., Lyle, J., Otto, G., Peluso, P., Rank, D., Baybayan, P., Bettman, B., Bibillo, A., Bjornson, K., Chaudhuri, B., Christians, F., Cicero, R., Clark, S., Dalal, R., Dewinter, A., Dixon, J., Foquet, M., Gaertner, A., Hardenbol, P., Heiner, C., Hester, K., Holden, D., Kearns, G., Kong, X., Kuse, R., Lacroix, Y., Lin, S., Lundquist, P., Ma, C., Marks, P., Maxham, M., Murphy, D., Park, I., Pham, T., Phillips, M., Roy, J., Sebra, R., Shen, G., Sorenson, J., Tomaney, A., Travers, K., Trulson, M., Vieceli, J., Wegener, J., Wu, D., Yang, A., Zaccarin, D., Zhao, P., Zhong, F., Korlach, J., Turner, S., 2009. Real-time DNA sequencing from single polymerase molecules. *Science* 323, 133-138.
- 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.
- Elandalloussi, L. M., Leite, R. B., Rodrigues, P. M., Afonso, R., Cancela, M. L., 2008. Effect of the herbicide Roundup (R) on *Perkinsus olseni* *in vitro* proliferation and *in vivo* survival when infecting a permissive host, the clam *Ruditapes decussatus*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 80, 512-515.
- Elandalloussi, L. M., Carrasco, N., Roque, A., Andree, K., Furones, M. D., 2009. First record of *Perkinsus olseni*, a protozoan parasite infecting the commercial clam *Ruditapes decussatus* in Spanish Mediterranean waters. *Journal of Invertebrate Pathology* 100, 50-53.

- El Bour, M., Dellali, M., Boukef, I., Lakhal, F., Mraouna, R., El Hili, H. A., Klena, J., 2012. First assessment of Perkinsosis and brown ring disease co-infection in *Ruditapes decussatus* in the North Lake of Tunis (southern Mediterranean Sea). *Journal of the Marine Biological Association of the UK* 92, 1579–1584.
- Elgharsalli, R., Aloui-Bejaoui, N., Salah, H., Chollet, B., Joly, J. P., Robert, M., Couraleau, Y., Arzul, I., 2013. Characterization of the protozoan parasite *Marteilia refringens* infecting the dwarf oyster *Ostrea stentina* in Tunisia. *Journal of Invertebrate Pathology* 112, 175-183.
- Elston, R. A., Farley, C. A., Kent, M. L., 1986. Occurrence and significance of bonamiasis in European flat oysters *Ostrea edulis* in North America. *Diseases of Aquatic Organisms* 2, 49-54.
- Elston, R. A., Kent, M. L., Wilkinson, M. T., 1987 Resistance of *Ostrea edulis* to *Bonamia ostreae* infection. *Aquaculture* 64, 237-242.
- Elston, R. A., Dungan, C. F., Meyers, T. R., Reece, K. S., 2004. *Perkinsus* sp. infection risk for Manila clams, *Venerupis philippinarum* (Adams and Reeve, 1850) on the Pacific coast of north and central America. *Journal of Shellfish Research*, 23, 101-105.
- Elston, R. A., Moore, J., Abbott, C. L., 2012. Denman Island disease (causative agent *Mikrocytos mackini*) in a new host, Kumamoto oysters *Crassostrea sikamea*. *Diseases of Aquatic Organisms* 102, 65-71.
- Engelsma, M., Voorbergen-Laarman, M., 2009. Diagnostic tools to detect and distinguish *Bonamia ostreae* and *B. exitiosa*. En: Report from the Annual Meeting and Technical Workshop of the National Reference Laboratories for Molluscs Diseases, La Tremblade, Francia, p 30–31.
- Engelsma, M. Y., Kerkhoff, S., Roozenburg, I., Haenen, O. L. M., van Gool, A., Sistermans, W., Wijnhoven, S., Hummel, H., 2010. Epidemiology of *Bonamia ostreae* infecting European flat oysters *Ostrea edulis* from Lake Grevelingen, The Netherlands. *Marine Ecology Progress Series* 409, 131-142.
- Engelsma, M. Y., Culloty, S. C., Lynch, S. A., Arzul, I., Carnegie, R. B., 2014. *Bonamia* parasites: a rapidly changing perspective on a genus of important mollusc pathogens. *Diseases of Aquatic Organisms* 110, 5-23.
- European Reference Laboratory for Molluscan Diseases, 2014. Comparison of two PCR assays for the detection of parasites of the genus *Bonamia* in the context of an interlaboratory comparison test. Internal report, 10th September 2014.
- Faisal, M., Macintyre, E. A., Adham, K. G., Tall, B. D., Kothary, M. H., La Peyre, J. F., 1998. Evidence for the presence of protease inhibitors in eastern (*Crassostrea virginica*) and Pacific (*Crassostrea gigas*) oysters. *Comparative Biochemistry and Physiology*, series B, 121, 161-168.

- Faisal, M., La Peyre, J. F., Elsayed, E. E., 1999. Bacitracin inhibits the oyster pathogen *Perkinsus marinus* *in vitro* and *in vivo*. *Journal of Aquatic Animal Health* 11, 130-138.
- FAO, Organización de las Naciones Unidas para la alimentación y la agricultura, 2004. Programa de información de especies acuáticas. *Ostrea edulis*. Texto de Gouletquer, P. En: Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO, Roma.
- FAO, Organización de las Naciones Unidas para la alimentación y la agricultura, 2015. El estado mundial de la pesca y la acuicultura (SOFIA 2014).
- Farley, C. A., Wolf, P. H., Elston, R. A., 1988. A long-term study of 'microcell' disease in oysters with a description of a new genus, *Mikrocytos* (g. n.), and two new species, *Mikrocytos mackini* (sp. n.) and *Mikrocytos roughleyi* (sp. n.). *Fish Bulletin* (Wash D C) 86, 581-594.
- Feist, S. W., Hine, P. M., Bateman, K. S., Stentiford, G. D., Longshaw, M., 2009. *Paramarteilia canceri* sp. n. (Cercozoa) in the European edible crab (*Cancer pagurus*) with a proposal for the revision of the order Paramyxida Chatton, 1911. *Folia Parasitologica* 56, 73-85.
- Fernández-Robledo, J. A., Vasta, G. R., Record, N. R., 2014. Protozoan parasites of bivalve molluscs: literatura follows cultura. *Plos One* 9, e100872.
- Figueras, A. J., 1991. *Bonamia* status and its effects in cultured flat oysters in Ría de Vigo, Galicia (N.W. Spain). *Aquaculture* 93, 225-233.
- Figueras, A. J., Jardon, C. F., Caldas, J. R., 1991. Diseases and parasites of rafted mussels (*Mytilus galloprovincialis* Lmk): preliminary results. *Aquaculture* 99, 17-33.
- Figueras, A., Robledo, J. A. F., Novoa, B., 1992. Occurrence of haplosporidian and *Perkinsus*-like infections in carpet-shell clams, *Ruditapes decussatus* (Linnaeus, 1758), of the Ría de Vigo (Galicia, NW Spain). *Journal of Shellfish Research* 11, 377-382.
- Figueras, A., Robledo, J. A. F., 1994. *Bonamia ostreae* present in flat oysters (*Ostrea edulis*) does not infect mussels (*Mytilus galloprovincialis*). *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* 14, 98-100.
- Figueras, A. J., Robledo, J. A. F., Novoa, B., 1996. Brown ring disease and parasites in clams (*Ruditapes decussatus* and *R. philippinarum*) from Spain and Portugal. *Journal of Shellfish Research* 15, 363-368.
- Fischer, S. G., Lerman, L. S., 1983. DNA fragments differing by single basepair substitutions are separated in denaturing gradient gels: correspondence with melting theory. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 80, 1579 -1583.

- Fong, D., Rodriguez, R., Koo, K., Sun, J., Sogin, M. L., Bushek, D., Littlewood, D. T., Ford, S. E., 1993. Small subunit ribosomal RNA gene sequence of the oyster parasite *Perkinsus marinus*. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 2, 346-50.
- Ford, S. E., Haskin, H. H., 1988. Management strategies for MSX (*Haplosporidium nelsoni*) disease in eastern oysters. *American Fisheries Society Special Publication* 18, 249-256.
- Ford, S. E., Chintala, M. M., Bushek, D., 2002. Comparison of *in vitro*-cultured and wild-type *Perkinsus marinus*. I. Pathogen virulence. *Diseases of Aquatic Organisms* 51, 187-201.
- Frank-Lawale, A., Allen, S. K., Degremont, L., 2014. Breeding and Domestication of eastern oyster (*Crassostrea virginica*) lines for culture in the mid-atlantic, USA: line development and mass selection for disease resistance . *Journal of Shellfish Research* 33, 153-165.
- Friedman, C. S., Perkins, F. O., 1994. Range extension of *Bonamia ostreae* to Maine, USA. *Journal of Invertebrate Pathology* 64, 179-181.
- Friedman, C. S., McDowell, T., Groff, J. M., Hollibaugh, J. T., Manzer, D., Hedrick, R. P., 1989. Presence of *Bonamia ostreae* among populations of the European flat oyster *Ostrea edulis* Linne in California USA. *Journal of Shellfish Research* 8, 133-138.
- Friedman, C. S., Brown, H. M., Ewing, T. W., Griffin, F. J., Cherr, G. N., 2005. Pilot study of the Olympia oyster *Ostrea conchaphila* in the San Francisco Bay estuary: description and distribution of diseases. *Diseases of Aquatic Organisms* 65, 1-8.
- Fuentes, J., Villalba, A., Zapata, C., Alvarez, G., 1994. Influence of mussel stock and culture environment on the infections by *Marteilia refringens* and *Myticola intestinalis* in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Conference International Symposium on the Aquatic Animal Health, Seattle, (EE. UU)*, p 55.
- Gaffney, P. M., Bushek, D., 1996. Genetic aspects of disease resistance in oysters. *Journal of Shellfish Research* 15, 135-140.
- Gagné, N., Cochenec, N., Stephenson, M., McGladdery, S. S., Meyer, G. R., Bower, S. M., 2008. First report of a *Mikrocytos*-like parasite in European oysters *Ostrea edulis* from Canada after transport and quarantine in France. *Diseases of Aquatic Organisms* 80, 27-35.
- Garcia, C., Arzul, I., Robert, M., Chollet, B., Joly, J. P., Miossec, L., Francois, C., 2009. Detection of atypical *Marteilia refringens* in mussels, *Mytilus edulis* in France. *Journal of Shellfish Research* 28, 688.
- Garcia, C., Thebault, A., Degremont, L., Arzul, I., Miossec, L., Robert, M., Chollet, B., Francois, C., Joly, J. P., Ferrand, S., Kerdudou, N., Renault, T., 2011. Ostreid herpesvirus 1

- detection and relationship with *Crassostrea gigas* spat mortality in France between 1998 and 2006. *Veterinary Research* 42,73.
- Garcia, C., Arzul, I., Joly, J. P., Guichard, B., Chollet, B., Omnes, E., Haond, C., Robert, M., Lupo, C., François, C., 2012. *Mikrocytos* like protozoans and the shellfish *Donax trunculus* mortality events in France. *Journal of Shellfish Research* 31, 273.
- 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. *Journal of Shellfish Research* 25, 619-624.
- Goedken, M., Morsey, B., Sunila, I., de Guise, S., 2005. Immunomodulation of *Crassostrea gigas* and *Crassostrea virginica* cellular defense mechanisms by *Perkinsus marinus*. *Journal of Shellfish Research* 24, 487-496.
- Goggin, C. L., Barker, S. C., 1993. Phylogenetic position of the genus *Perkinsus* (Protista, Apicomplexa) based on small subunit ribosomal RNA. *Molecular and Biochemical Parasitology* 60, 65-70.
- Goggin, C. L., Lester, R. J. G., 1995. *Perkinsus*, a protistan parasite of abalone in Australia: a review. *Marine and Freshwater Research* 46, 639-646.
- Goggin, C. L., Sewell, K. B., Lester, R. J. G., 1989. Cross-infection experiments with Australian *Perkinsus* species. *Diseases of Aquatic Organisms* 7, 55-59.
- Goggin, C. L., Mcgladdery, S. E., Whyte, S. K., Cawthorn, R. J., 1996. An assessment of lesions in bay scallops *Argopecten irradians* attributed to *Perkinsus karlssoni* (Protozoa, Apicomplexa). *Diseases of Aquatic Organisms* 24, 77-80.
- Gomez-Chiarri, M., Warren, W. C., Guo, X., Proestou, D., 2015. Developing tools for the study of molluscan immunity: The sequencing of the genome of the eastern oyster, *Crassostrea virginica*. *Fish & Shellfish Immunology* 46, 2-4.
- Gouletquer, F., Héral, M., 1997. History, present conditions and future of the molluscan fisheries of North America and Europe. Marine Molluscan production trends in France: from fisheries to aquaculture. *Marine Fishery Review*, NOAA, technical Report NMFS 129, 137-164.
- Green, T. J., Dixon, T. J., Devic, E., Adlard, R. D., Barnes, A. C., 2009. Differential expression of genes encoding anti-oxidant enzymes in Sydney rock oysters, *Saccostrea glomerata* (Gould) selected for disease resistance. *Fish & Shellfish Immunology* 26, 799-810.
- Grizel, H., 1979. *Marteilia refringens* and oyster disease – recent observations. *Marine Fishery Review* 41, 38-39.
- Grizel, H., 1985. Etudes des récentes épizooties de l'huître plate *Ostrea edulis* L. et de leur impact sur l'ostréiculture bretonne. Tesis Doctoral. Université des Sciences et Techniques de Languedoc, Montpellier (Francia).

- Grizel, H., Tigé, G., 1973. La maladie de la glandule digestive d'*Ostrea edulis* linne. Journal du Conseil International pour L'exploitation de la mer. C.M.K.13, 1-7.
- 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. Science et Pêche, Bulletin de L' Institut des Pêches maritimes 240, 7-29.
- Grizel, H., Mialhe, E., Chagot, D., Boulo, V., Bachère, E., 1988. Bonamiasis: a model study of diseases in marine molluscs. American Fisheries Society Special Publication 18, 1-4.
- Hamaguchi, M., Suzuki, N., Usuki, H., Ishioka, H., 1998. *Perkinsus* protozoan infection in short-necked clam *Tapes (=Ruditapes) philippinarum* in Japan. Fish Pathology 33, 473-480.
- Harismendy, O., Ng, P. C., Strausberg, R. L., Wang, X., Stockwell, T. B., Beeson, K. Y., Schork, N. J., Murray, S. S., Topol, E. J., Levy, S., Frazer, K. A., 2009. Evaluation of next generation sequencing platforms for population targeted sequencing studies. Genome Biology 10, R32.
- Hartikainen, H., Ashford, O. S., Berney, C., Okamura, B., Feist, S. W., Baker-Austin, C., Stentiford, G. D., Bass, D., 2014a. Lineage-specific molecular probing reveals novel diversity and ecological partitioning of haplosporidians. The ISME Journal 8, 177-186.
- Hartikainen, H., Stentiford, G. D., Bateman, K. S., Berney, C., Feist, S. W., Longshaw, M., Okamura, B., Stone, D., Ward, G., Wood, C., Bass, D., 2014b. Mikrocytids are a broadly distributed and divergent radiation of parasites in aquatic invertebrates. Current Biology 24, 807-12.
- He, Y., Yu, H., Bao, Z., Zhang, Q., Guo, X., 2012. Mutation in promoter region of a serine protease inhibitor confers *Perkinsus marinus* resistance in the eastern oyster (*Crassostrea virginica*). Fish & Shellfish Immunology 33, 411-417.
- He, Y., Jouaux, A., Ford, S. E., Lelong, C., Sourdaire, P., Mathieu, M., Guo, X., 2015. Transcriptome analysis reveals strong and complex antiviral response in a mollusc. Fish & Shellfish Immunology 46, 131-144.
- Hégaret, H., da Silva, P. M., Sunila, I., Shumway, S. E., Dixon, M. S., Alix, J., Wikfors, G. H., Soudant, P., 2009. *Perkinsosis* in the Manila clam *Ruditapes philippinarum* affects responses to the harmful-alga, *Prorocentrum minimum*. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 371, 112-120.
- Herrbach, B., 1971. Sur une affection parasitaire de la glande digestive de l'huître plate, *Ostrea edulis* Linné. Revue des Travaux de l'Institut des Pêches Maritimes 35, 79-87.

- Hervio, D., Bachere, E., Boulo, V., Cochenec, N., Vuillemin, V., Le Coguc, Y., Cailletaux, G., Mazurié, J., Mialhe, E., 1995. Establishment of an experimental-infection protocol for the flat oyster, *Ostrea edulis*, with the intrahaemocytic protozoan parasite, *Bonamia ostreae* - application in the selection of parasite-resistant oysters. *Aquaculture* 132, 183-194.
- 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). *Journal of Invertebrate Pathology* 67, 72-79.
- Hill, K. M., Carnegie, R. B., Aloui-Bejaoui, N., El Gharsalli, R., White, D. M., Stokes, N. A., Burreson, E. M., 2010. Observation of a *Bonamia* sp. infecting the oyster *Ostrea stentina* in Tunisia, and a consideration of its phylogenetic affinities. *Journal of Invertebrate Pathology* 103, 179-185.
- Hill, K. M., Stokes, N. A., Webb, S. C., Hine, P. M., Kroeck, M. A., Moore, J. D., Morley, M. S., Reece, K. S., Burreson, E. M., Carnegie, R. B., 2014. Phylogenetics of *Bonamia* parasites based on small subunit and internal transcribed spacer region ribosomal DNA sequence data. *Diseases of Aquatic Organisms* 110, 33-54.
- Hillis, D. M., Dixon, M. T., 1991. Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. *Quarterly Review of Biology* 66, 411-53.
- Hine, P. M., 1991a. Ultrastructural observations on the annual infection pattern of *Bonamia* sp. in flat oysters *Tiostrea chilensis*. *Diseases of Aquatic Organisms* 11, 163-171.
- Hine, P. M., 1991b. The annual pattern of infection by *Bonamia* sp in New Zealand flat oysters, *Tiostrea chilensis*. *Aquaculture* 93, 241-251.
- Hine, P. M., 1996. The ecology of *Bonamia* and decline of bivalve molluscs. *New Zealand Journal of Ecology* 20, 109-116.
- Hine, P. M., Cochenec-Laureau, N., Berthe, F., 2001a. *Bonamia exitiosus* n. sp (Haplosporidia) infecting flat oysters *Ostrea chilensis* in New Zealand. *Diseases of Aquatic Organisms* 47, 63-72.
- Hine, P. M., Bower, S. M., Meyer, G. R., Cochenec-Laureau, N., Berthe, F. C. J., 2001b. Ultrastructure of *Mikrocytos mackini*, the cause of Denman Island disease in oysters *Crassostrea* spp. and *Ostrea* spp. in British Columbia, Canada. *Diseases of Aquatic Organisms* 45, 215-227.
- Hoffman, E. E., Powell, E. N., Klinck, J. M., Saunders, G., 1995. Modelling diseased oyster populations. I. Modelling *Perkinsus marinus* infections in oysters. *Journal of Shellfish Research* 14, 121-151.
- Hudson, E. B., Hill, B. J., 1991. Impact and spread of bonamiosis in the UK. *Aquaculture* 93, 279-285.

- Hunt, P. W., 2011. Molecular diagnosis of infections and resistance in veterinary and human parasites. *Veterinary Parasitology* 180, 12-46.
- Itoh, N., Oda, T., Yoshinaga, T., Ogawa, K., 2003. Isolation and 18S ribosomal DNA gene sequences of *Marteilioides chungmuensis* (Paramyxea), an ovarian parasite of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Diseases of Aquatic Organisms* 54, 163-169.
- Itoh, N., Meyer, G. R., Tabata, A., Lowe, G., Abbott, C. L., Johnson, S. C., 2013. Rediscovery of the Yesso scallop pathogen *Perkinsus qugwadi* in Canada, and development of PCR tests. *Diseases of Aquatic Organisms* 104, 83-91.
- Itoh, N., Yamamoto, T., Kang, H. S., Choi, K. S., Green, T. J., Carrasco, N., Awaji, M., Chow, S., 2014. A novel Paramyxean parasite, *Marteilia granula* sp. nov. (Cercozoa), from the digestive gland of Manila clam *Ruditapes philippinarum* in Japan. *Fish Pathology* 49, 181-193.
- Joubert, C., Piquemal, D., Marie, B., Manchon, L., Pierrat, F., Zanella-Cleon, I., Cochenec-Laureau, N., Gueguen, Y., Montagnani, C., 2010. Transcriptome and proteome analysis of *Pinctada margaritifera* calcifying mantle and shell: focus on biomineralization. *BMC Genomics* 11, 1471-2164.
- Kang, Y. S., Kim, Y. M., Park, K. I., Cho, S. K., Choi, K. S., Cho, M., 2006. Analysis of EST and lectin expressions in hemocytes of manila clams (*Ruditapes philippinarum*) (Bivalvia: mollusca) infected with *Perkinsus olseni*. *Developmental & Comparative Immunology* 30, 1119-1131.
- Karagiannis, D., Vatsos, I. N., Theodoridis, A., Angelidis, P., 2013. Effect of culture system on the prevalence of parasites of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819). *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society* 62, 113-122.
- Katkansky, S. C., Dahlstrom, W. A., Warner, R. W., 1969. Observations on survival and growth of the European flat oyster, *Ostrea edulis*, in California. *California Fish and Game* 55, 69-74.
- Kern, F. G., 1993. Shellfish health inspections of Chilean and Australian oysters. *Journal of Shellfish Research* 12, 366.
- Kim, Y. M., Park, K. I., Choi, K. S., Alvarez, R. A., Cummings, R. D., Cho, M., 2006. Lectin from the Manila clam *Ruditapes philippinarum* is induced upon infection with the protozoan parasite *Perkinsus olseni*. *Journal of Biological Chemistry* 281, 26854-26864.
- Kim, J. Y., Kim, Y. M., Cho, S. K., Choi, K. S., Cho, M., 2008a. Noble tandem repeat galectin of Manila clam *Ruditapes philippinarum* is induced upon infection with the protozoan parasite *Perkinsus olseni*. *Developmental & Comparative Immunology* 32, 1131-1141.

- Kim, J. Y., Adhya, M., Cho, S. K., Choi, K. S., Cho, M., 2008b. Characterization, tissue expression, and immunohistochemical localization of MCL3, a C-type lectin produced by *Perkinsus olseni*-infected Manila clams (*Ruditapes philippinarum*). *Fish & Shellfish Immunology* 25, 598-603.
- Kleeman, S. N., Adlard, R. D., 2000. Molecular detection of *Marteilia sydneyi*, pathogen of Sydney rock oysters. *Diseases of Aquatic Organisms* 40, 137-146.
- Kleeman, S. N., Adlard, R. D., Lester, R. J. G., 2002 a. Detection of the initial infective stages of the protozoan parasite *Marteilia sydneyi* in *Saccostrea glomerata* and their development through to sporogenesis. *International Journal for Parasitology* 32, 767-784.
- Kleeman, S. N., Le Roux, F., Berthe, F., Adlard, R. D., 2002b. Specificity of PCR and *in situ* hybridisation assays designed for detection of *Marteilia sydneyi* and *M. refringens*. *Parasitology* 125, 131-141.
- Krantz, G. E., 1994. Chemical inhibition of *Perkinsus marinus* in two *in vitro* culture systems. *Journal of Shellfish Research* 13, 131-136.
- Kroeck, M. A., Montes, J., 2005. Occurrence of the haemocyte parasite *Bonamia* sp. in flat oysters *Ostrea puelchana* farmed in San Antonio Bay (Argentina). *Diseases of Aquatic Organisms* 63, 231-235.
- Kroeck, M. A., Semenas, L., Morsan, E. M., 2008. Epidemiological study of *Bonamia* sp. in the native flat oyster, *Ostrea puelchana* from San Matías Gulf (NW Patagonia, Argentina). *Aquaculture* 276, 5-13.
- Kuchel, R. P., Aladaileh, S., Birch, D., Vella, N., Raftos, D. A., 2010. Phagocytosis of the protozoan parasite, *Marteilia sydneyi*, by Sydney rock oyster (*Saccostrea glomerata*) hemocytes. *Journal of Invertebrate Pathology* 104, 97-104.
- La Peyre, J. F., Chu, F. E., Meyers, J. M., 1995a. Hemocytic and humoral activities of eastern and Pacific oysters following challenge by the protozoan *Perkinsus marinus*. *Fish & Shellfish Immunology* 5, 179-190.
- La Peyre, J. F., Chu, F. E., Vogelbein, W. K., 1995b. *In vitro* interaction of *Perkinsus marinus* merozoites with eastern and Pacific oyster haemocytes. *Developmental & Comparative Immunology* 19, 291-304.
- La Peyre, M. K., Casas, S. M., La Peyre, J. F., 2006. Salinity effects on viability, metabolic activity and proliferation of three *Perkinsus* species. *Diseases of Aquatic Organisms* 71, 59-74.
- La Peyre, M. K., Casas, S. M., Villalba, A., La Peyre, J. F., 2008. Determination of the effects of temperature on viability, metabolic activity and proliferation of two *Perkinsus*

- species, and its significance to understanding seasonal cycles of perkinsosis. *Parasitology* 135, 505-519.
- La Peyre, J. F., Xue, Q. G., Itoh, N., Li, Y., Cooper, R. K., 2010. Serine protease inhibitor cvSI-1 potential role in the eastern oyster host defense against the protozoan parasite *Perkinsus marinus*. *Developmental & Comparative Immunology* 34, 84-92.
- Laing, I., Dunn, P., Peeler, E. J., Feist, S. W., Longshaw, M., 2014. Epidemiology of *Bonamia* in the UK, 1982 to 2012. *Diseases of Aquatic Organisms* 110, 101-111.
- Lallias, D., Arzul, I., Heurtebise, S., Ferrand, S., Chollet, B., Robert, M., Beaumont, A. R., Boudry, P., Morga, B., Lapègue, S., 2008. *Bonamia ostreae*-induced mortalities in one-year old European flat oysters *Ostrea edulis*: experimental infection by cohabitation challenge. *Aquatic Living Resources* 21, 423-439.
- Le Roux, F., Audemard, C., Barnaud, A., Berthe, F. C. J., 1999. DNA probes as potential tools for the detection of *Marteilia refringens*. *Marine Biotechnology* 1, 588-597.
- Le Roux, F., Lorenzo, G., Peyret, P., Audemard, C., Figueras, A., Vivarès, C., Gouy, M., Berthe, F. C. J., 2001. Molecular evidence for the existence of two species of *Marteilia* in Europe. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 48, 449-454.
- Leethochavalit, S., Chalermwat, K., Suchart Upatham, E., Choi, K. S., Sawangwong, P., Kruatrachue, M., 2004. Occurrence of *Perkinsus* sp. in undulated surf clams *Paphia undulate* from the Gulf of Thailand. *Diseases of Aquatic Organisms* 60, 165-171.
- Leite, R. B., Afonso, R., Cancela, M. L., 2004. *Perkinsus* sp. infestation in carpetshell clams, *Ruditapes decussatus* (L), along the Portuguese coast. Results from a 2-year survey. *Aquaculture* 240, 39-53.
- Leite, R. B., Brito, A. B., Cancela, M. L., 2008. An oxygen molecular sensor, the HIF prolyl 4-hydroxylase, in the marine protist *Perkinsus olseni*. *Protist* 159, 355-368.
- Leite, R. B., Afonso, R., Cancela, M. L., 2011. Herbicides and Protozoan Parasite Growth Control: Implications for New Drug Development, *Herbicides, Theory and Applications*, Prof. Marcelo Larramendy (ed), ISBN: 978-953-307-975-2, InTech, DOI: 10.5772/13345. Available from: <http://www.intechopen.com/books/herbicides-theory-and-applications/herbicides-and-protozoan-parasite-growth-control-implications-for-new-drug-development>.
- Leite, R. B., Milan, M., Coppe, A., Bortoluzzi, S., dos Anjos, A., Reinhardt, R., Saavedra, C., Patarnello, T., Cancela, M. L., Bargelloni, L., 2013. mRNA-Seq and microarray development for the Grooved Carpet shell clam, *Ruditapes decussatus*: a functional approach to unravel host-parasite interaction. *BMC Genomics* 14: 741.

- Lerman, L. S., Beldjord, C., 1999. Comprehensive mutation detection with denaturing gradient gel electrophoresis. En: Cotton, R. G. H., Edkins, E., Forrest, S., (eds) Mutation Detection. Oxford University Press, New York (EE. UU.), p 35-61.
- Lester, R. J. G., Davis, G. H. G., 1981. A new *Perkinsus* species (Apicomplexa, Perkinsea) from the abalone *Haliotis ruber*. Journal of Invertebrate Pathology 37, 181-187.
- Levine, N. D., 1978. *Perkinsus* gen. n. and other new taxa in the protozoan phylum Apicomplexa. Journal of Parasitology 64, 549.
- Liang, Y. B., Zhang, X. C., Wang, L. J., Yang, B., Zhang, Y., Cai, C. L., 2001. Prevalence of *Perkinsus* sp. in the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*, along the northern coast of the Yellow Sea in China. Oceanologia et Limnologia Sinica 32, 502-511.
- Liang, Y. B., Zhang, X. C., Chen, H. X., Wang, C. D., 2008. Effects of temperature and salinity on *Perkinsus atlanticus* disease triggering of clams *Ruditapes philippinarum*. Marine Environmental Science 27, 1-5.
- Longshaw, M., Feist, S. W., Matthews, A., Figueras, A., 2001. Ultrastructural characterisation of *Marteilia* species (Paramyxia) from *Ostrea edulis*, *Mytilus edulis* and *Mytilus galloprovincialis* in Europe. Diseases of Aquatic Organisms 44, 137-142.
- Longshaw, M., Stone, D. M., Wood, G., Green, M. J., White, P., 2013. Detection of *Bonamia exitiosa* (Haplosporidia) in European flat oysters *Ostrea edulis* cultivated in mainland Britain. Diseases of Aquatic Organisms 106, 173-179.
- López, C., Darriba, S., 2006. Presence of *Marteilia* sp. (Paramyxia) in the razor clam *Solen marginatus* (Pennant, 1777) in Galicia (NW Spain). Journal of Invertebrate Pathology 92, 97-99.
- López-Flores, I., de la Herrán, R., Garrido-Ramos, M. A., Navas, J. I., Ruiz-Rejón, C., Ruiz Rejón, 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.
- Lopez-Flores, I., Suárez-Santiago, V. N., Longet, D., Saulnier, D., Chollet, B., Arzul, I., 2007a. Characterization of actin genes in *Bonamia ostreae* and their application to phylogeny of the Haplosporidia. Parasitology 134, 1941-1948.
- López-Flores, I., Navas, J. I., Garrido, M. A., Ruiz, C., Ruiz, M., de la Herrán, R., 2007b. Utilización de marcadores moleculares para el diagnóstico e identificación taxonómica de protozoos parásitos en bivalvos. En: Martínez, P., Figueras, A., (eds) Genética y Genómica en Acuicultura. Fundación Observatorio Español de Acuicultura, Madrid, p 795-846.
- López-Flores, I., Garrido-Ramos, M. A., de la Herrán, 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. *Molecular and Cellular 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). *Diseases of Aquatic Organisms* 82, 79-87.
- Lund, E. D., Soudant, P., Chu, F. E., Harvey, E., Bolton, S., Flowers, A., 2005. Effects of triclosan on growth, viability and fatty acid synthesis of the oyster protozoan parasite *Perkinsus marinus*. *Diseases of Aquatic Organisms* 62, 217-224.
- Lymbery, A. J., Morine, M., Kanani, H. G., Beatty, S. J., Morgan, D. L., 2014. Co-invaders: The effects of alien parasites on native hosts. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife* 3, 171-117.
- Lynch, S. A., Armitage, D. V., Wylde, S., Mulcahy, M. F., Culloty, S. C., 2005. The susceptibility of young prespawning oysters, *Ostrea edulis*, to *Bonamia ostreae*. *Journal of Shellfish Research* 24, 1019-1025.
- Lynch, S., Armitage, D., Wylde, S., Culloty, S., Mulcahy, M., 2007. Investigating the possible role of benthic macroinvertebrates and zooplankton in the life cycle of the haplosporidian *Bonamia ostreae*. *Experimental Parasitology* 115, 359-368.
- Lynch, S. A., Abollo, E., Ramilo, A., Cao, A., Culloty, S. C., Villalba, A., 2010. Observations raise the question if the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, can act as either a carrier or a reservoir for *Bonamia ostreae* or *Bonamia exitiosa*. *Parasitology* 137, 1515-1526.
- Lynch, S. A., Carlsson, J., Reilly, A. O., Cotter, E., Culloty, S. C., 2012. A previously undescribed ostreid herpes virus 1 (OsHV-1) genotype detected in the pacific oyster, *Crassostrea gigas*, in Ireland. *Parasitology* 139, 1526-1532.
- Lynch, S. A., Flannery, G., Hugh-Jones, T., Hugh-Jones, D., Culloty, S. C., 2014. Thirty-year history of Irish (Rossmore) *Ostrea edulis* selectively bred for disease resistance to *Bonamia ostreae*. *Diseases of Aquatic Organisms* 110, 113-121.
- 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 di sease (*Mikrocytosis*) in oysters. *Journal of Invertebrate Pathology* 88, 89-94.
- Mackin, J. G., 1951. Histopathology of infection of *Crassostrea virginica* (Gmelin) by *Dermocystidium marinum* Mackin, Owen and Collier. *Bulletin of Marine Science of the Gulf and Caribbean* 1, 72-87.
- Mackin, J. G., 1962. Oyster disease caused by *Dermocystidium marinum* and other microorganisms in Louisiana. *Publications of the Institute of Marine Science, University of Texas* 7, 132-229.

- Mackin, J. G., Boswell, J. L., 1956. The life cycle and relationships of *Dermocystidium marinum*. Proceedings of the National Shellfisheries Association 46, 112-115.
- Mackin, J. G., Ray, S. M., 1966. The taxonomic relationships of *Dermocystidium marinum* Mackin, Owen, and Collier. Journal of Invertebrate Pathology 8, 544-545.
- Mackin, J. G., Owen, H. M., Collier, A., 1950. Preliminary note on the occurrence of a new protistan parasite, *Dermocystidium marinum* n. sp. in *Crassostrea virginica* (Gmelin). Science 111, 328-329.
- Maeno, Y., Yoshinaga, T., Nakajima, K., 1999. Occurrence of *Perkinsus* species (Protozoa, Apicomplexa) from Manila clam *Tapes philippinarum* in Japan. Fish Pathology 34, 127-131.
- Mahou, X. M., 2008. Implementación y gobernanza: La política de marisqueo en Galicia. Escola Galega de Administración Pública (EGAP), Santiago de Compostela, p 1-310.
- Marquis, N. D., Record, N. R., Fernandez Robledo, J. A., 2015. Survey for protozoan parasites in Eastern oysters (*Crassostrea virginica*) from the Gulf of Maine using PCR-based assays. Parasitology International 64, 299-302.
- Marsh, A. G., Gauthier, J. D., Vasta, G. R., 1995. A semiquantitative PCR assay for assessing *Perkinsus marinus* infections in the eastern oyster, *Crassostrea virginica*. Journal of Parasitology 81, 577-583.
- Martin, A. G., Gérard, A., Cochenec, N., Langlade, A., 1993. Selecting flat oysters, *Ostrea edulis*, for survival against the parasite *Bonamia ostreae*: assessment of the resistance of a first selected generation. En: Barnabé, G., Kestemont, P., (eds) Production, environment and quality. Bordeaux Aquaculture '92. Special Publication Number 18. European Aquaculture Society, Gante (Bélgica), p 545-554.
- Martín-Gómez, L., Villalba, A., Abollo, E., 2012. Identification and expression of immune genes in the flat oyster *Ostrea edulis* in response to bonamiosis. Gene 492, 81-93.
- Martín-Gómez, L., Villalba, A., Carballal, M. J., Abollo, E., 2014a. Molecular characterisation of TNF, AIF, dermatopontin and VAMP genes of the flat oyster *Ostrea edulis* and analysis of their modulation by diseases. Gene 533, 208-217.
- Martín-Gómez, L., Villalba, A., Kerkhoven, R. H., Abollo, E., 2014b. Role of microRNAs in the immunity process of the flat oyster *Ostrea edulis* against bonamiosis. Infection, Genetics and Evolution 27, 40-50.
- Marty, G., Bower, S., Clarke, K., Meyer, G., Lowe, G., Osborn, A., Chow, E., Hannah, H., Byrne, S., Sojonky, K., Robinson, J., 2006. Histopathology and a real-time PCR assay for detection of *Bonamia ostreae* in *Ostrea edulis* cultured in western Canada. Aquaculture 26, 33-42.

- Massó, J., 1978. La enfermedad de la glándula digestiva de la ostra ("*Ostrea edulis* L.") en las Rías Bajas. Boletín Instituto Español de Oceanografía 251, 125-140.
- McArdle, J., McKiernan, F., Foley, H., Jones, D., 1991. The current status of *Bonamia* disease in Ireland. Aquaculture 93, 273-278.
- McDowell, I. C., Nikapitiya, C., Aguiar, D., Lane, C. E., Istrail, S., Gomez-Chiarri, M., 2014. Transcriptome of american oysters, *Crassostrea virginica*, in response to bacterial challenge: insights into potential mechanisms of disease resistance. Plos One 9, e105097.
- McGladdery, S. E., Cawthorn, R. J., Bradford, B. C., 1991. *Perkinsus karlssoni* n. sp. (Apicomplexa) In bay scallops *Argopecten irradians*. Diseases of Aquatic Organisms 10, 127-137.
- McLaughlin, S. M., Tall, B. D., Shaheen, A., Elsayed, E. E., Faisal, M., 2000. Zoosporulation of a new *Perkinsus* species isolated from the gills of the softshell clam *Mya arenaria*. Parasite 7, 115-122.
- Meng, X., Tian, X., Liu, M., Nie, G., Jiang, K., Wang, B., Wang, L., 2014. The transcriptomic response to copper exposure by the gill tissue of Japanese scallops (*Mizuhopecten yessoensis*) using deep-sequencing technology. Fish & Shellfish Immunology 38, 287-293.
- Menike, U., Lee, Y., Oh, C., Wickramaarachchi, W. D. N., Premachandra, H. K. A., Park, S. C., Lee, J., De Zoysa, M., 2014. Oligo-microarray analysis and identification of stress-immune response genes from manila clam (*Ruditapes philippinarum*) exposure to heat and cold stresses. Molecular Biology Reports 41, 6457-6473.
- Metzker, M. L., 2005. Emerging technologies in DNA sequencing. Genome Research 15, 1767-1776.
- Metzker, M. L., 2010. Sequencing technologies - the next generation. Nature Reviews Genetics 11, 31-46.
- 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. Journal of Invertebrate Pathology 88, 89-94.
- Meyers, J. A., Burreson, E. M., Barber, B. J., Mann, R., 1991. Susceptibility of diploid and triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg 1793) and eastern oysters, *Crassostrea virginica* (Gmelin 1791), to *Perkinsus marinus*. Journal of Shellfish Research 10, 433-437.
- Mialhe, E., Bachere, E., Chagot, D., Grizel, H., 1988 Isolation and purification of the protozoan *Bonamia ostreae* (Pichot et al 1980), a parasite affecting the flat oyster *Ostrea edulis* L. Aquaculture 71, 293-299.

- Montes, J., 1990. Development of *Bonamia ostreae* parasitosis of flat oyster, *Ostrea edulis*, from Galicia, northwest Spain. En: Perkins, F. O., Cheng, T. C., (eds) Pathology in marine aquaculture. Academic Press, New York (EE. UU.), p. 223–227.
- Montes J, Lama, A., 1992. Present status of bonamiasis in Galicia (NW Spain). Bulletin of the European Association of Fish Pathologists 12, 131-133.
- Montes, J., Melendez, M., 1987. Data on the parasitism of *Bonamia ostreae* in the flat oyster of Galicia, Northwest coast of Spain. Aquaculture 67, 195-198.
- Montes, J., Villalba, A., Lopez, M., Carballal, M. J., Mourelle, S., 1991. Bonamiasis in native flat oysters (*Ostrea edulis* L) from 2 intertidal beds of the Ortigueira estuary (Galicia, NW Spain) with different histories of oyster culture. Aquaculture 93, 213-224.
- Montes, J., Anadon, R., Azevedo, C., 1994. A possible life-cycle for *Bonamia ostreae* on the basis of electron-microscopy studies. Journal of Invertebrate Pathology 63, 1-6.
- Montes, J. F., Durfort, M., García-Valero, J., 1995. Characterization and localization of a Mr 225 kDa polypeptide specifically involved in the defence mechanisms of the clam *Tapes semidecussatus*. Cell and Tissue Research 280, 27-37.
- Montes, J. F., Durfort, M., García-Valero, J., 1996. When the venerid clam *Tapes decussatus* is parasitized by the protozoan *Perkinsus* sp. it synthesizes a defensive polypeptide that is closely related to p225. Diseases of Aquatic Organisms 26, 149-157.
- Montes, J. F., Durfort, M., García-Valero, J., 2001. Parasitism by the protozoan *Perkinsus atlanticus* favours the development of opportunistic infections. Diseases of Aquatic Organisms 46, 57-66.
- Montes, J., Ferro-Soto, B., Conchas, R. F., Guerra, A., 2003. Determining culture strategies in populations of the European flat oyster, *Ostrea edulis*, affected by bonamiosis. Aquaculture 220, 175-182.
- Moreira, R., Balseiro, P., Romero, A., Dios, S., Posada, D., Novoa, B., Figueras, A., 2012. Gene expression analysis of clams *Ruditapes philippinarum* and *Ruditapes decussatus* following bacterial infection yields molecular insights into pathogen resistance and immunity. Developmental & Comparative Immunology 36, 140-149.
- Moreira, R., Milan, M., Balseiro, P., Romero, A., Babbucci, M., Figueras, A., Bargelloni, L., Novoa, B., 2014. Gene expression profile analysis of Manila clam (*Ruditapes philippinarum*) hemocytes after a *Vibrio alginolyticus* challenge using an immune-enriched oligo-microarray. BMC Genomics 15, 267.
- Morga, B., Arzul, I., Chollet, B., Renault, T., 2009. Infection with the protozoan parasite *Bonamia ostreae* modifies *in vitro* haemocyte activities of flat oyster *Ostrea edulis*. Fish & Shellfish Immunology 26, 836-842.

- Morga, B., Renault, T., Faury, N., Chollet, B., Arzul, I., 2011a. Cellular and molecular responses of haemocytes from *Ostrea edulis* during *in vitro* infection by the parasite *Bonamia ostreae*. *International Journal for Parasitology* 41, 755–764.
- Morga, B., Arzul, I., Faury, N., Segarra, A., Chollet, B., Renault, T., 2011b. Molecular responses of *Ostrea edulis* haemocytes to an *in vitro* infection with *Bonamia ostreae*. *Developmental & Comparative Immunology* 35, 323–333.
- Morga, B., Renault, T., Faury, N., Arzul, I., 2012. New insights in flat oyster *Ostrea edulis* resistance against the parasite *Bonamia ostreae*. *Fish & Shellfish Immunology* 32, 958–968.
- Morvan, A., Inagawa, S., Comps, M., Bachère, E., 1997. *In vitro* activity of the Limulus antimicrobial peptide tachyplesin I on marine bivalve pathogens. *Journal of Invertebrate Pathology* 69, 177–182.
- Moss, J. A., Burreson, E. M., Reece, K. R., 2006. Advanced *Perkinsus marinus* infections in *Crassostrea ariakensis* maintained under laboratory conditions. *Journal of Shellfish Research* 25, 65–72.
- Moss, J. A., Burreson, E. M., Cordes, J. F., Dungan, C. F., Brown, G. D., 2007. Pathogens in *Crassostrea ariakensis* and other Asian oyster species: implications for non-native oyster introduction to Chesapeake Bay. *Diseases of Aquatic Organisms* 77, 207–233.
- Moss, J. A., Xiao, J., Dungan, C.F., Reece, K.S. (2008). Description of *Perkinsus beihaiensis* n. sp., a new *Perkinsus* sp. parasite in oysters of Southern China. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 55, 117–130.
- Myers, R. M., Maniatis, T., Lerman, L. S., 1987. Detection and localization of single base changes by denaturing gradient gel electrophoresis. *Methods in Enzymology* 155, 501–527.
- Naciri-Graven, Y., Martin, A. G., Baud, J. P., Renault, T., Gérard, A., 1998. Selecting the flat oyster *Ostrea edulis* (L.) for survival when infected with the parasite *Bonamia ostreae*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 224, 91–107.
- Naciri-Graven, Y., Haure, J., Gérard, A., Baud, J. P., 1999. Comparative growth of *Bonamia ostreae* resistant and wild flat oyster *Ostrea edulis* in an intensive system. II. Second year of experiment. *Aquaculture* 171, 195–208.
- Narcisi, V., Arzul, I., Cargini, D., Mosca, F., Calzetta, A., Traversa, D., Robert, M., Joly, J. P., Chollet, B., Renault, T., Tiser, P. G., 2010. Detection of *Bonamia ostreae* and *B. exitiosa* (Haplosporidia) in *Ostrea edulis* from the Adriatic Sea (Italy). *Diseases of Aquatic Organisms* 89, 79–85.

- Navas, J. I., 2008. Principales patologías de la almeja fina, *Ruditapes decussatus* (Linnaeus 1758), del litoral onubense, con especial referencia a la parasitosis por *Perkinsus olseni* Lester y Davis, 1981: diagnóstico, transmisión y efectos sobre la almeja. Tesis doctoral. Universidad de Sevilla.
- Navas, J. I., Castillo, M. C., Vera, P., Ruiz-Rico, M., 1992. Principal parasites observed in clams, *Ruditapes decussatus* (L.), *Ruditapes philippinarum* (Adams et Reeve), *Venerupis pullastra* (Montagu) and *Venerupis aureus* (Gmelin), from the Huelva coast (S.W. Spain). *Aquaculture* 107, 193-199.
- Newton, K., Peters, R., Raftos, D., 2004. Phenoloxidase and QX disease resistance in Sydney rock oysters (*Saccostrea glomerata*). *Developmental & Comparative Immunology* 28, 565-569.
- Nikapitiya, C., McDowell, I. C., Villamil, L., Muñoz, P., Sohn, S., Gomez-Chiarri, M., 2014. Identification of potential general markers of disease resistance in American oysters, *Crassostrea virginica* through gene expression studies. *Fish & Shellfish Immunology* 41, 27-36.
- Norton, J. H., Shepherd, M. A., Perkins, F. P., Prior, H. C., 1993. *Perkinsus*-like infection in farmed golden-lipped pearl oyster *Pinctada maxima* from the Torres Strait, Australia. *Journal of Invertebrate Pathology* 62, 105-106.
- Novoa, B., Posada, D., Figueras, A., 2005. Polymorphisms in the sequences of *Marteilia* internal transcribed spacer of the ribosomal RNA genes (ITS-1) in Spain: genetic types are not related with bivalve hosts. *Journal of Fish Diseases* 28, 331-338.
- O'Farrell, C., La Peyre, J. F., Paynter, K. T., Burreson, E. M., 2000. Osmotic tolerance and volume regulation in in vitro cultures of the oyster pathogen *Perkinsus marinus*. *Journal of Shellfish Research* 19, 139-145.
- O'Donoghue, P. J., Phillips, P.H., Shepherd, S. A., 1991. *Perkinsus* (Protozoa: Apicomplexa) infections in abalone from South Australian waters. *Transactions of the Royal Society of South Australia* 115, 77-82.
- Oehrens-Kissner, E. M., Doldan, M. S., Zaidman, P. C., Morsan, E. M., Kroeck, M. A., 2014. Bonamiosis status in natural *Ostrea puelchana* beds in San Matías Gulf (Patagonia, Argentina), 14 years after an epizootic. *Diseases of Aquatic Organisms* 110, 135-142.
- OIE (Organización Mundial de Sanidad Animal), 2012a. Manual de pruebas de diagnóstico para los animales acuáticos. Infección con *Bonamia ostreae*, capítulo 2.4.3, 1-13.
- OIE (Organización Mundial de Sanidad Animal), 2012b. Manual de pruebas de diagnóstico para los animales acuáticos. Infección con *Bonamia exitiosa*, capítulo 2.4.2, 1-12.

- OIE (Organización Mundial de Sanidad Animal). 2012c. Manual de pruebas de diagnóstico para los animales acuáticos. Infección con *Marteilia refringens*, capítulo 2.4.4, 1-13.
- OIE (Organización Mundial de Sanidad Animal). 2012d. Manual de pruebas de diagnóstico para los animales acuáticos. Infección con *Mikrocytos mackini*, capítulo 2.4.8, 1-10.
- OIE (Organización Mundial de Sanidad Animal), 2014. Código Sanitario para los Animales Acuáticos. Enfermedades de los moluscos, título 11.
- Oliver, J. L., Lewis, T. D., Faisal, M., Kaattari, S. L., 1999. Analysis of the effects of *Perkinsus marinus* proteases on plasma proteins of the eastern oyster (*Crassostrea virginica*) and the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). Journal of Invertebrate Pathology 74, 173-183.
- Ordás, M. C., Gómez-León, J., Figueras, A., 2001. Histopathology of the infection by *Perkinsus atlanticus* in three clam species (*Ruditapes decussatus*, *R. philippinarum* and *R. pullastra*) from Galicia (NW Spain). Journal of Shellfish Research 20, 1019-1024.
- Panko, C., Encomio, V., Barreto, J., Volety, A. K., 2008. *In vitro* and *in vivo* evaluation of quinine as a potential anti-protozoal for the eastern oyster parasite *Perkinsus marinus*. Journal of Shellfish Research 27, 789-793.
- Pardo, B. G., Cao, A., Vilas, R., Abollo, E., Villalba, A., Martínez, P., 2011. Microsatellite marker development in the protozoan parasite *Perkinsus olseni*. Diseases of Aquatic Organisms 94, 161-165.
- Pardo, B. G., Millán, A., Fernández, C., Alvarez-Dios, J. A., Gómez-Tato, A., Cao, A., Ramilo, A., Carballal, M. J., Villalba, A., Martínez, P., 2013. Identification of candidate genes involved in responses of *Ostrea edulis* to bonamiosis based on oligo-microarray analysis. Fish & Shellfish Immunology 34, 1670-1671.
- Park, K. I., Choi, K. S., 2001. Spatial distribution of the protozoan parasite *Perkinsus* sp. found in the Manila clams, *Ruditapes philippinarum*, in Korea. Aquaculture 203, 9-22.
- Park, K., Choi, K. S., Choi, J. W., 1999. Epizootiology of *Perkinsus* sp. found in the manila clam *Ruditapes philippinarum* in Komsoe Bay, Korea. Korean Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 32, 303-309.
- Park, K. I., Park, Y. M., Lee, J., Choi, K. S., 2002. Development of a PCR assay for detection of the protozoan parasite *Perkinsus*. Korean Journal of Environmental Biology 20, 109-117.
- Park, K. H., Park, J. K., Lee, J., Choi, K. S., 2005. Use of molecular markers for species identification of Korean *Perkinsus* sp isolated from Manila clams *Ruditapes philippinarum*. Diseases of Aquatic Organisms 66, 255-263.

- Park, K. I., Ngo, T. T. T., Choi, S. D., Cho, M., Choi, K. S., 2006a. Occurrence of *Perkinsus olseni* in the venus clam *Protothaca jedgeensis* in Korean waters. *Journal of Invertebrate Pathology* 93, 81-87.
- Park, K. I., Figueras, A., Choi, K. S., 2006b. Application of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the study of reproduction in the Manila clam *Ruditapes philippinarum* (Mollusca: Bivalvia): II. Impacts of *Perkinsus olseni* on clam reproduction. *Aquaculture* 251, 182-191.
- Park, K., Yang, H. S., Kang, H. S., Cho, M., Park, K. J., Choi, K. S., 2013. Isolation and identification of *Perkinsus olseni* from feces and marine sediment using immunological and molecular techniques. *Journal of Invertebrate Pathology* 105, 261-269.
- Pascual, S., Villalba, A., Abollo, E., Garci, M., González, 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.
- Pauletto, M., Milan, M., Moreira, R., Novoa, B., Figueras, A., Babbucci, M., Patarnello, T., Bargelloni, L., 2014. Deep transcriptome sequencing of *Pecten maximus* hemocytes: A genomic resource for bivalve immunology. *Fish & Shellfish Immunology* 37, 154-165.
- Pecher, W. T., Mohammad, R. A., Schott, E. J., Fernandez-Robledo, J. A., Roth, L., Berg, S. T., Vasta, G. R., 2008. Assessment of the northern distribution range of selected *Perkinsus* species in Eastern oysters (*Crassostrea virginica*) and hard clams (*Mercenaria mercenaria*) with the use of PCR-based detection assays. *Journal of Parasitology* 94, 410-422.
- Peeler, E. J., Reese, R. A., Cheslett, D. L., Geoghegan, F., Power, A., Thrush, M. A., 2012. Investigation of mortality in Pacific oysters associated with Ostreid herpesvirus-1 mu Var in the Republic of Ireland in 2009. *Preventive Veterinary Medicine* 105, 136-143.
- Penna, M. S., Khan, M., French, R. A., 2001 Development of a multiplex PCR for the detection of *Haplosporidium nelsoni*, *Haplosporidium costale* and *Perkinsus marinus* in the eastern oyster (*Crassostrea virginica*, Gmelin 1971). *Molecular and Cellular Probes* 15, 385-390.
- Pérez Camacho, A., Cuña, M., 1985. First data on raft culture of Manila clam (*Ruditapes philippinarum*) in the Ria de Arosa (NW Spain). *ICES C.M.* 1985/F:43: 22 p.
- Pérez-Camacho, Villalba, A., Beiras, R., Labarta, U., 1996. Absorption efficiency and condition of cultured mussels (*Mytilus edulis galloprovincialis* Linnaeus) of Galicia (NW Spain) by parasites *Marteilia refringens* Grizel et al. and *Mytilicola intestinalis* Steuer. *Journal of Shellfish Research* 16, 77-82.

- Perkins, F. O., 1975. Fine structure of *Minchinia* sp. (Haplosporida) sporulation in the mud crab *Panopeus herbstii*. Marine Fisheries Review 37, 46-60.
- Perkins, F. O., 1976a. Zoospores of the oyster pathogen, *Dermocystidium marinum*. I. Fine structure of the conoid and other sporozoan-like organelles. Journal of Parasitology 62, 959-974.
- Perkins, F. O., 1976b. Ultrastructure of sporulation in the European flat oyster pathogen, *Marteilia refringens* - Taxonomic implications. Journal of Protozoology 23, 64-74.
- Perkins, F. O., 1979. Cell structure of shellfish pathogens and hyperparasites in the genera *Minchinia*, *Urosporidium*, *Haplosporidium* and *Marteilia* - Taxonomic implications. Marine Fisheries Review 41, 25-37.
- Perkins, F. O., 1987. Protistan parasites of commercially significant marine bivalve mollusks - life-cycles, ultrastructure, and phylogeny. Aquaculture 67: 240-243.
- Perkins, F. O., 1988. Structure of protistan parasites found in bivalve molluscs. American Fisheries Society Special Publication 18, 93-111.
- Perkins, F. O., 1993. Infectious diseases of molluscs. En: Couch, J. A., Fournie, J. W., (eds) Advances in Fisheries Science: Pathobiology of marine and estuarine organisms. CRC Press, Boca Raton (EE. UU.), p 255-287.
- Perkins, F. O., 1996. The structure of *Perkinsus marinus* (Mackin, Owen and Collier, 1950) Levine, 1978 with comments on taxonomy and phylogeny of *Perkinsus* spp. Journal of Shellfish Research 15, 67-87.
- Perkins, F. O., Menzel, R. W., 1966. Morphological and cultural studies of a motile stage in the life cycle of *Dermocystidium marinum*. Proceedings of the National Shellfisheries Association 56, 23-30.
- Perkins, F. O., Wolf, P. H., 1976. Fine structure of *Marteilia sydneyi* sp. n. - Haplosporidian pathogen of Australian oysters. Journal of Parasitology 62, 528-538.
- Pernas, M., Novoa, B., Berthe, F., Tafalla, C., Figueras, A., 2001. Molecular methods for the diagnosis of *Marteilia refringens*. Bulletin of the European Association of Fish Pathologists 21, 200-208.
- Peters, R., Raftos, D. A., 2003. The role of phenyloxidase suppression in QX disease outbreaks among Sydney rock oysters (*Saccostrea glomerata*). Aquaculture 223, 29-39.
- Philipp, E. E., Kraemer, L., Melzner, F., Poustka, A. J., Thieme, S., Findeisen, U., Schreiber, S., Rosenstiel, P., 2012. Massively parallel RNA sequencing identifies a complex immune gene repertoire in the lophotrochozoan *Mytilus edulis*. Plos One 7, 20.

- Pichot, Y., Comps, M., Tigé, G., Grizel, H., Rabouin, M. A., 1980. Recherches sur *Bonamia ostreae* gen. n., sp. n., parasite nouveau de l'huître plate *Ostrea edulis* L. Revue des Travaux de L'Institut des Pêches Maritimes 43, 131-140.
- Pierce, J. C., Maloy, W. L., Sa, Ivador, L., Dungan, C. F., 1997. Recombinant expression of the antimicrobial peptide polyphemusin and its activity against the -protozoan oyster pathogen *Perkinsus marinus*. Molecular Marine Biology and Biotechnology 6, 248-259.
- Polanco, E., Montes, J., Outon, J., Melendez, M. I., 1984. Situation pathologique du stock d'huîtres plates en Galice (Espagne) en relation avec *Bonamia ostreae*. Haliotis 14, 91-95.
- Polinski, M., Lowe, G., Meyer, G., Corbeil, S., Colling, A., Caraguel, C., Abbott, C. L., 2015. Molecular detection of *Mikrocytos mackini* in Pacific oysters using quantitative PCR. Molecular and Biochemical Parasitology 200, 19-24.
- Poulin, R., 2003. Parasites in a global village: food, emerging diseases, and evolution. Journal of Parasitology 89, 271-276.
- Powell, E. N., Klinck, J. M., Hofmann, E. E., 1996. Modeling diseased oyster populations. II. Triggering mechanisms for *Perkinsus marinus* epizootics. Journal of Shellfish Research 15, 141-165.
- Prado-Alvarez, M., Gestal, C., Novoa, B., Figueras, A., 2009. Differentially expressed genes of the carpet shell clam *Ruditapes decussatus* against *Perkinsus olseni*. Fish & Shellfish Immunology 26, 72-83.
- Pretto, T., Zambon, M., Zivettini, M., Carbulotto, G., Boffo, L., Rossetti, F., Arcangeli, G., 2014. Massive mortality in Manila clams (*Ruditapes philippinarum*) farmed in de Lagoon of Venice, caused by *Perkinsus olseni*. Bulletin of the European Association of Fish Pathologists 34, 43-53.
- Quayle, D. B., 1961. Denman Island oyster disease and mortality, 1960. Manuscript No. 713, Report Series (Biological) Fisheries Research Board of Canada, Ottawa.
- Quayle, D. B., 1982. Denman Island oyster disease 1960-1980. BC Shellfish Mariculture Newsletter 2, 1-5.
- Quayle, D. B., 1988. Pacific oyster culture in British Columbia. Canadian Bulletin of Fisheries and Aquatic Sciences 218, 241.
- Queiroga, F. R., Marques-Santos, L. F., Hégaret, H., Soudant, P., Farias, N. D., Schlindwein, A. D., da Silva, P. M., 2013. Immunological responses of the mangrove oysters *Crassostrea gasar* naturally infected by *Perkinsus* sp. in the Mamanguape Estuary, Paraíba state (Northeastern, Brazil). Fish & Shellfish Immunology 35, 319-327.

- Ragone Calvo, L. M., Dungan, C. F., Roberson, B. S., Burreson, E. M., 2003a. Systematic evaluation of factors controlling *Perkinsus marinus* transmission dynamics in lower Chesapeake Bay. *Diseases of Aquatic Organisms* 56, 75-86.
- Ragone Calvo, L. M., Calvo, G. W., Burreson, E. M., 2003b. Dual disease resistance in a selectively bred eastern oyster, *Crassostrea virginica*, strain tested in Chesapeake Bay. *Aquaculture* 220, 69-87.
- Ray, S. M., 1954. Biological studies of *Dermocystidium marinum*. The Rice Institute Pamphlet (Special issue) 41, 1-114.
- Ray, S. M., 1966. A review of the culture method of detecting *Dermocystidium marinum* with suggested modifications and precautions. *Proceedings of the National Shellfisheries Association* 54, 55-69.
- Reece, K. S., Bushek, D., Hudson, K. L., Graves, J. E., 2001. Genetic distribution of *Perkinsus marinus* genetic strains along Atlantic and Gulf coasts of the USA. *Marine Biology* 139, 1047-1055.
- Reece, K., Siddall, M., Stokes, N., Burreson, E., 2004. Molecular phylogeny of the Haplosporidia based on two independent gene sequences. *Journal of Parasitology* 90, 1111-1122.
- Reece, K. S., Dungan, C. F., Burreson, E. M., 2008. Molecular epizootiology of *Perkinsus marinus* and *P. chesapeaki* infections among wild oysters and clams in Chesapeake Bay, USA. *Diseases of Aquatic Organisms* 82, 237-248.
- Renault, T., Cochenec, N., Grizel, H., 1995. *Bonamia ostreae*, parasite of the European flat oyster, *Ostrea edulis*, does not experimentally infect the Japanese oyster, *Crassostrea gigas*. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* 15, 78-80.
- Reymond, H., 1991. Dynamique de la chaîne hétérotrophe benthique des marais maritimes en période estivale et son impact sur les productions aquacoles de carnivores: *Penaeus japonicus*, un modèle d'étude. Tesis doctoral, Université Pierre et Marie Curie, Paris VI.
- Robert, M., García, C., Chollet, B., López-Flores, I., Ferrand, S., François, C., Joly, J. P., Arzul, I., 2009. Molecular detection and quantification of the protozoan *B. ostreae* in the flat oyster *Ostrea edulis*. *Molecular and Cellular Probes* 2, 264-271.
- 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 Resources* 4, 265-274.
- Robledo, J. A. F., Figueras, A., 1995. The effects of culture-site, depth, season and stock source on the prevalence of *Marteilia refringens* in cultured mussels (*Mytilus galloprovincialis* LMK) from Galicia. *Journal of Parasitology* 81, 354-363.

- Robledo, J. A. F., Gauthier, J. D., Coss, C. A., Wright, A. C., Vasta, G. R., 1998. Species-specificity and sensitivity of a PCR-based assay for *Perkinsus marinus* in the eastern oyster, *Crassostrea virginica*: a comparison with the fluid thioglycollate assay. *Journal of Parasitology* 84, 1237-1244.
- Robledo, J. A. F., Wright, A. C., Marsh, A. G., Vasta, G. R., 1999. Nucleotide sequence variability in the nontranscribed spacer of the rRNA locus in the oyster parasite *Perkinsus marinus*. *Journal of Parasitology* 85, 650-656.
- Robledo, J. A. F., Coss, C. A., Vasta, G. R., 2000. Characterization of the ribosomal RNA locus of *Perkinsus atlanticus* and development of a polymerase chain reaction-based diagnostic assay. *Journal of Parasitology* 86, 972-978.
- Robledo, J. A. F., Nunes, P. A., Cancela, M. L., Vasta, G. R., 2002. Development of an *in vitro* clonal culture and characterization of the rRNA gene cluster of *Perkinsus atlanticus*, a protistan parasite of the clam *Tapes decussatus*. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 49, 414-422.
- Rodríguez, F., Navas, J. I., 1995. A comparison of gill and hemolymph assays for the thioglycollate diagnosis of *Perkinsus atlanticus* (Apicomplexa, Perkinsea) in clams, *Ruditapes decussatus* (L.) and *Ruditapes philippinarum* (Adams et Reeve). *Aquaculture* 132, 145-152.
- Rodríguez, F., Godoy, T., Navas, J. I., 1994. Cross-infection with *Perkinsus atlanticus* in *Ruditapes decussatus*, *Ruditapes philippinarum* and *Venerupis pullastra*. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* 14, 24-27.
- Ronaghi, M., Uhlen, M., Nyren, P., 1998. A sequencing method based on real-time pyrophosphate. *Science* 281, 365.
- Rosa, R. D., de Lorgeril, J., Tailliez, P., Bruno, R., Piquemal, D., Bachere, E., 2012. A hemocyte gene expression signature correlated with predictive capacity of oysters to survive *Vibrio* infections. *BMC Genomics* 13, 252.
- Roubal, F. R., Masel, J., Lester, R. J. G., 1989. Studies on *Marteilia sydneyi*, agent of QX disease in the Sydney rock oyster, *Saccostrea commercialis*, with implications for its life cycle. *Australian Journal of Marine and Freshwater Research* 40, 155-167.
- Ruano, F., Cachola, R., 1986. Outbreak of a severe epizootic of *Perkinsus marinus* (Levin-78) at Ria de Faro clam's culture beds. En: *Proceedings of 2nd International Colloque Pathology Marine Aquatic (PAMAQ 11)*. Oporto. Portugal, p 41-44.
- Ruiz, M., Darriba, S., Rodriguez, R., Lopez, C., 2015. *Marteilia* sp. and other parasites and pathological conditions in *Solen marginatus* populations along the Galician coast (NW Spain). *Diseases of Aquatic Organisms* 112, 177-184.

- Russell, S., S. Frasca J. R., Sunila, I., 2004. Application of a multiplex PCR for the detection of protozoan pathogens of the eastern oyster *Crassostrea virginica* in field samples. *Diseases of Aquatic Organisms* 59, 85-91.
- Sagristà, 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.
- Sagristà, E., Durfort, M., Azevedo, C., 1996. Ultrastructural study of the parasite, *Perkinsus atlanticus* (Apicomplexa), on the clam *Ruditapes philippinarum*, in the Mediterranean. *Scientia Marina* 60, 283-288.
- Saldarriaga, J. F., McEwan, M. L., Fast, N. M., Taylor, F. J., Keeling, P. J., 2003. Multiple protein phylogenies show that *Oxyrrhis marina* and *Perkinsus marinus* are early branches of the dinoflagellate lineage. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53, 355-365.
- 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.
- Santmarti, M. M., Garcia, V. J., Montes, J., Pech, A., Durfort, M., 1995. Seguimiento del protozoo *Perkinsus* sp., en las poblaciones de *Tapes decussatus* y *Tapes semidecussatus* del Delta del Ebro. En: Castelló, F., Calderer, A., (eds) *Actas del V Congreso Nacional de Acuicultura*, 1995, S. Carlos de la Rápita. Universidad de Barcelona, p 260-265.
- Scanlon, C. H., Ragone Calvo, L. M., Burreson, E. M., 1997. The potential for transmission of *Perkinsus marinus* by fecal matter from the Eastern oyster, *Crassostrea virginica*. *Journal of Shellfish Research* 16, 332.
- Schott, E. J., Pecher, W. T., Okafor, F., Vasta, G. R., 2003. The protistan parasite *Perkinsus marinus* is resistant to selected reactive oxygen species. *Experimental Parasitology* 105, 232-240.
- 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. *Diseases of Aquat Organisms* 79, 229-235.
- Siddall, M. E., Reece, K. S., Graves, J. E., Burreson, E. M., 1997. 'Total evidence' refutes the inclusion of *Perkinsus* species in the phylum Apicomplexa. *Parasitology* 115, 165-176.
- Simonian, M., Nair, S. V., Nell, J. A., Raftos, D. A., 2009. Proteomic clues to the identification of QX disease-resistance biomarkers in selectively bred Sydney rock oysters, *Saccostrea glomerata*. *Journal of Proteomics* 73, 209-17.

- Sobral, P., Widdows, J., 1997. Influence of hypoxia and anoxia on the physiological responses of the clam *Ruditapes decussatus* from southern Portugal. *Marine Biology* 127, 455-461.
- Sokolova, I. M., Oliver, J. D., Leamy, L. J., 2006. An AFLP approach to identify genetic markers associated with resistance to *Vibrio vulnificus* and *Perkinsus marinus* in eastern oysters. *Journal of Shellfish Research* 25, 95-100.
- Soudant, P., Chu, F., Volety, A., 2013. Host-parasite interactions: Marine bivalve molluscs and protozoan parasites, *Perkinsus* species. *Journal of Invertebrate Pathology* 114, 196-216.
- Spiers, Z. B., Gabor, M., Fell, S. A., Carnegie, R. B., Dove, M., O'Connor, W., Frances, J., Go, J., Marsh, I. B., Jenkins, C., 2014. Longitudinal study of winter mortality disease in Sydney rock oysters *Saccostrea glomerata*. *Diseases of Aquatic Organisms* 110, 151-164.
- Sprague, V., 1954. Protozoa. *Fishery Bulletin of the Fish and Wildlife Service* 89, 243-256.
- Stelter, K., El-Sayed, N. M., Seeber, F., 2007. The expression of a plant-type ferredoxin redox system provides molecular evidence for a plastid in the early dinoflagellate *Perkinsus marinus*. *Protist* 158, 119-130.
- Strauss, A., White, A., Boots, M., 2012. Invading with biological weapons: the importance of disease-mediated invasions. *Functional Ecology* 26, 1249-1261.
- Sunila, I., Labanca, J., 2003. Apoptosis in the pathogenesis of infectious diseases of the eastern oyster *Crassostrea virginica*. *Diseases of Aquatic Organisms* 56, 163-170.
- 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*. *Diseases of Aquatic Organisms* 65, 9-16.
- Takahashi, M., Yoshinaga, T., Waki, T., Shimokawa, J., Ogawa, K., 2009. Development of a PCR-RFLP method for differentiation of *Perkinsus olseni* and *P. honshuensis* in the Manila clam *Ruditapes philippinarum*. *Fish Pathology*, 44, 185-188.
- Tanguy, A., Guo, X., Ford, S. E., 2004. Discovery of genes expressed in response to *Perkinsus marinus* challenge in Eastern (*Crassostrea virginica*) and Pacific (*C. gigas*) oysters. *Gene* 338, 121-131.
- Tasumi, S., Vasta, G. R., 2007. A tandem repeat galectin from hemocytes of the oyster *Crassostrea virginica* is a receptor for the protistan parasite *Perkinsus marinus*. *Glycobiology* 18, 951.

- Thompson, P. C., 2010. Sex, dispersal, and deep divergence: the population genetics of the protistan parasite *Perkinsus marinus*. Tesis doctoral. University of Maryland, College Park, MD.
- Thompson, P. C., Rosenthal, B. M., Hare, M. P., 2011. An evolutionary legacy of sex and clonal reproduction in the protistan oyster parasite *Perkinsus marinus*. *Infection, Genetics and Evolution* 11, 598-609.
- Thompson, P. C., Rosenthal, B. M., Hare, M. P., 2014. Hybridization between previously isolated ancestors may explain the persistence of exactly two ancient lineages in the genome of the oyster parasite *Perkinsus marinus*. *Infection, Genetics and Evolution* 24, 167-176.
- Tigé, G., Rabouin, M. A., 1976 Etude d'un lot de moules transférées dans un centre touché par l'épizootie affectant l'huître plate. Conseil International pour l'Exploration de la Mer C.M; K21, 1-10.
- Tigé, G., Grizel, H., Comps, M., 1980. Données sur le nouveau parasite de l'huître plate. Situation épidémiologique. Conseil International pour l'Exploration de la mer 39, p 15.
- Tomkinson, A. E., Vijayakumar, S., Pascal, J. M., Ellenberger, T., 2006. DNA ligases: structure, reaction mechanism, and function. *Chemical Reviews* 106, 687-99.
- Torchin, M. E., Mitchell, C. E., 2004. Parasites, pathogens, and invasions by plants and animals. *Frontiers in Ecology and Environment* 2, 183-190.
- Trapnell, C., Salzberg, S. L., 2009. How to map billions of short reads onto genomes. *Nature Biotechnology* 27, 455-457.
- Trottet, A., Roy, S., Tamigneaux, E., Lovejoy, C., Tremblay, R., 2008. Impact of suspended mussels (*Mytilus edulis* L.) on plankton communities in a Magdalen Islands lagoon (Quebec, Canada): a mesocosm approach. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 365, 103-115.
- Ulrich, P. N., Ewart, J. W., Marsh, A. G., 2007. Prevalence of *Perkinsus marinus* (Dermo), *Haplosporidium nelsoni* (MSX), and QPX in bivalves of Delaware's inland bays and quantitative, high-throughput diagnosis of Dermo by QPCR. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 54, 520-526.
- Umeda, K., Yoshinaga, T., 2012. Development of real-time PCR assays for discrimination and quantification of two *Perkinsus* spp. in the Manila clam *Ruditapes philippinarum*. *Diseases of Aquatic Organisms* 99, 215-225.
- Valencia, J. M., Bassitta, M., Picornell, A., Ramon, C., Castro, A. J., 2014. New data on *Perkinsus mediterraneus* in the Balearic Archipelago: locations and affected species. *Diseases of Aquatic Organisms* 112, 69-82.

- van Banning, P., 1979. Haplosporidian diseases of imported oysters, *Ostrea edulis*, on Dutch estuaries. *Marine Fisheries Review* 41, 8-18.
- van Banning, P., 1982. Some aspects of the occurrence, importance and control of the oyster pathogen *Bonamia ostreae* in Dutch oyster culture. En: Payne, C. C., Burgues, H. D., (ed.) *Invertebrate pathology and microbial control. Proceedings, IIIrd International Colloquium on Invertebrate Pathology, XVth Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology, 1982, University of Sussex, Brighton, U.K.*, p 261-265.
- Van Banning, P., 1987. Further results of the *Bonamia ostreae* challenge tests in Dutch oyster culture.
- van Banning, P., 1991. Observations on bonamiosis in the stock of the European flat oyster, *Ostrea edulis*, in the Netherlands, with special reference to the recent developments in Lake Grevelingen. *Aquaculture* 93, 205-211.
- Vasta, G. R., Sullivan, J. T., Cheng, T. C., Marchalonis, J. J., Warr, G. W. 1982. A cell membrane-associated lectin of the oyster hemocyte. *Journal of Invertebrate Pathology* 40, 367-377.
- Vasta, G. R., Cheng, T. C., Marchalonis, J. J., 1984. A lectin on the hemocyte membrane of the Oyster (*Crassostrea virginica*). *Cellular Immunology* 88, 475-488.
- Vilas, R., Cao, A., Pardo, B. G., Fernández, S., Villalba, A., Martínez, P., 2011. Very low microsatellite polymorphism and large heterozygote deficits suggest founder effects and cryptic structure in the parasite *Perkinsus olseni*. *Infection, Genetics and Evolution* 11, 904-911.
- Villalba, A., Figueras, A., 2011. Estrategias de lucha frente a enfermedades de moluscos bivalvos. En: Figueras, A., Novoa, B., (eds) *Enfermedades de Moluscos Bivalvos de Interés en Acuicultura*. Fundación Observatorio Español de Acuicultura, Madrid, p 515-541.
- Villalba, A., Mourelle, S. G., López, M. C., Carballal, M. J., Azevedo, C., 1993a. Marteiliasis affecting cultured mussels *Mytilus galloprovincialis* of Galicia (NW Spain). 1. Etiology, phases of the infection, and temporal and spatial variability in prevalence. *Diseases of Aquatic Organisms* 16, 61-72.
- Villalba, A., Mourelle, S. G., Carballal, M. J., López, M. C., 1993b. Effects of infection by the protistan parasite *Marteilia refringens* on the reproduction of cultured mussels *Mytilus galloprovincialis* in Galicia (NW Spain). *Diseases of Aquatic Organisms* 17, 205-213.
- Villalba, A., López, M. C., Carballal, M. J., 1993c. Parasites and pathologic conditions of three clam species, *Ruditapes decussatus*, *Venerupis pullastra*, and *Venerupis rhomboides*,

- in the Galician rias. Actas del IV Congreso Nacional de Acuicultura. Centro de Investigaciones Mariñas, Pontevedra, España, p 551-556.
- Villalba, A., Mourelle, S. G., Carballal, M. J., López, M. C., 1997. Symbionts and diseases of farmed mussels *Mytilus galloprovincialis* throughout the culture process in the Rías of Galicia (NW Spain). Diseases of Aquatic Organisms 31, 127-139.
- Villalba, A., Kimberly, R. S., Ordás, C. M., Casas, S. M., Figueras, A., 2004. Perkinsosis in molluscs: a review. Aquatic Living Resources 17, 411-432.
- 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. Diseases of Aquatic Organisms 65, 257-267.
- Villalba, A., da Silva, P. M., Fuentes, J., 2007. La producción de estirpes de *Ostrea edulis* tolerantes a la bonamiosis como solución para el engorde de la ostra plana en Galicia. En: Cerviño, A., Guerra, A., Pérez, C., (eds) XII Congreso Nacional de Acuicultura. Tomo II, Centro de Investigacións Mariñas, Vilanova de Arousa, p 1499-1504.
- Villalba, A., Gestal, C., Casas, S. M., Figueras, A., 2011. Perkinsosis en moluscos. En: Figueras, A., Novoa, B., (eds) Enfermedades de Moluscos Bivalvos de Interés en Acuicultura. Fundación Observatorio Español de Acuicultura, Madrid, p 183-242.
- Villamil, L., Gómez-León, J., Gómez-Chiarri, M., 2007. Role of nitric oxide in the defenses of *Crassostrea virginica* to experimental infection with the protozoan parasite *Perkinsus marinus*. Developmental & Comparative Immunology 31, 968-977.
- Virvilis, C., Angelidis, P., 2006. Presence of the parasite *Marteilia* sp in the flat oyster (*Ostrea edulis* L) in Greece. Aquaculture 259, 1-5.
- Volety, A. K., Chu, F. L. E., 1994. Comparison of infectivity and pathogenicity of two life stages, meront (trophozoite) and prezoosporangia stages of the oyster pathogen *Perkinsus marinus* in Eastern oysters *Crassostrea virginica* (Gmelin 1971). Journal of Shellfish Research 13, 521-527.
- Volety, A. K., Chu, F. L. E., 1995. Suppression of chemiluminescence of eastern oyster (*Crassostrea virginica*) haemocytes by the protozoan parasite *Perkinsus marinus*. Developmental & Comparative Immunology 19, 135-142.
- Wang, S., Peatman, E., Hong, L., Bushek, D., Ford, S. E., Kucuktas, H., Quilang, J., Li, P., Wallace, R., Wang, Y. P., Guo, X. M., Liu, Z. J., 2010a. Microarray analysis of gene expression in eastern oyster (*Crassostrea virginica*) reveals a novel combination of antimicrobial and oxidative stress host responses after dermo (*Perkinsus marinus*) challenge. Fish & Shellfish Immunology 29, 921-929.

- Wang, Z., Liang, Y., Lu, X., 2010b. Use of histopathology, PCR and *in situ* hybridization methods to detect the parasite *Mikrocytos* sp. in Pacific oyster *Crassostrea gigas* from the northern coast of the Yellow Sea, China. *Aquatic Living Resources* 23, 125-130.
- Wesche, S. J., Adlard, R. D., Lester, R. J. G., 1999 Survival of spores of the oyster pathogen *Marteilia sydneyi* (Protozoa, Paramyxia) as assessed using fluorogenic dyes. *Diseases of Aquatic Organisms* 36, 221-226.
- Wolf, P. H., 1979. Life cycle and ecology of *Marteilia sydneyi* in the Australian oyster, *Crassostrea commercialis*. *Marine Fisheries Review* 41, 70-72.
- Wu, S., Wang, C., Lin, X., Wang, Z., Li, X., Liu, J., Deng, J., Qiu, S., 2011. Infection prevalence and phylogenetic analysis of *Perkinsus olseni* in *Ruditapes philippinarum* from East China. *Diseases of Aquatic Organisms* 96, 55-60.
- Xie, Z., Xie, L., Fan, Q., Pang, Y., Deng, X., Xie, Z. Q., Liu, J., Khan, M. I., 2013. A duplex quantitative real-time PCR assay for the detection of *Haplosporidium* and *Perkinsus* species in shellfish. *Parasitology Research* 112, 1597-1606.
- Xue, Q. G., Renault, T., 2000. Enzymatic activities in European flat oyster, *Ostrea edulis*, and Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, hemolymph. *Journal of Invertebrate Pathology*. 76, 155-163.
- Xue, Q. G., Waldrop, G. L., Schey, K. L., Itoh, N., Ogawa, M., Cooper, R. K., 2006. A novel slow-tight binding serine protease inhibitor from eastern oyster (*Crassostrea virginica*) plasma inhibits perkinsin, the major extracellular protease of the oyster protozoan parasite *Perkinsus marinus*. *Comparative Biochemistry Physiology, series B*, 145, 16-26.
- Yu, Z., Guo, X., 2006. Identification and mapping of disease-resistance QTL in the eastern oyster, *Crassostrea virginica* Gmelin. *Aquaculture* 254, 160-170.
- Yu, H. Y., He, Y., Wang, X. X., Zhang, Q. Q., Bao, Z. M., Guo, X. M., Polymorphism in a serine protease inhibitor gene and its association with disease resistance in the eastern oyster (*Crassostrea virginica* Gmelin). *Fish & Shellfish Immunology* 30, 757-762.
- Zabaleta, A. I., Barber, B. J., 1996. Prevalence, intensity, and detection of *Bonamia ostreae* in *Ostrea edulis* L in the Damariscotta River area, Maine. *Journal of Shellfish Research* 15, 395-400.
- Zarlenga, D. S., Hoberg, E., Rosenthal, B., Mattiucci, S., Nascetti, G., 2014. Anthropogenics: human influence on global and genetic homogenization of parasite populations. *Journal of Parasitology* 100, 756-72.
- Zhang, X. C., Liang, Y. B., Fan, J. F., Zhang, W., Pu, H. Y., Liang, B., Chen, H. X., Song, L. C., 2005. Identification of *Perkinsus*-like parasite in Manila clam, *Ruditapes philippinarum* using DNA molecular marker at ITS region. *Acta Oceanologica Sinica* 24, 139-144.

- Zhang, H., Campbell, D. A., Sturm, N. R., Dungan, C. F., Lin, S., 2011. Spliced leader rRNAs, mitochondrial gene frameshifts and multi-protein phylogeny expand support for the genus *Perkinsus* as a unique group of Alveolates. *Plos One* 6 (5) e19933.
- Zhang, L. L., Li, L., Zhu, Y. B., Zhang, G. F., Guo, X. M., 2014. Transcriptome analysis reveals a rich gene set related to innate immunity in the eastern oyster (*Crassostrea virginica*). *Marine Biotechnology* 16, 17-33.





## ABREVIATURAS

ADN: ácido desoxirribonucleico

ADNr: ácido desoxirribonucleico ribosómico

ARN: ácido ribonucleico

ATP: adenosín tri-fosfato

DDBJ: Banco de Datos de ADN de Japón

DGGE: electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante

EBI: Instituto Europeo de Bioinformática

EC: células endosomales

EST: marcador de secuencia expresada

NCBI: Centro Nacional para la Información Biotecnológica

EURL: Laboratorio de Referencia de la Unión Europea

FAO: Food and Agriculture Organization of the United Nations

FISH: hibridación *in situ* con fluorescencia

FRET: transferencia de energía fluorescente mediante resonancia

IGS: espaciadores intergénicos

ISH: hibridación *in situ*

ITS1: espaciador transcrito interno 1

ITS2: espaciador transcrito interno 2

LSU: subunidad grande ribosómica

MPS: secuenciación masiva paralela

MROs: orgánulos mitocondriales reducidos

NGS: secuenciación de nueva generación

NTS: espaciador no transcrito

OIE: Organización Mundial de Sanidad Animal

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

QC: células quiescentes

RFLPs: polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción

RFTM: método de cultivo en caldo de tioglicolato

ROS: radicales tóxicos de oxígeno

SAR: supergrupo taxonómico que incluye los grupos Stramenopiles, Alveolata y Rhizaria

SOP: Procedimientos Operativos Estándar

T<sub>m</sub>: temperatura de fusión

VC: células vesiculares





## **ANEXOS**



## ANEXO I



Nº SOLICITUD 201131549  
Nº PUBLICACIÓN ES2402282  
TITULAR/ES  
CENTRO TECNOLÓGICO DEL MAR - FUNDACION CETMAR  
CENTRO DE INVESTIGACIONES MARIÑAS. DIRECCION XERAL DE  
DESENVOLVEMENTO PESQUEIRO, CONSELLERIA DO MAR. XUNTA DE GALICIA  
FECHA EXPEDICIÓN 07/07/2014

**CERTIFICADO-TÍTULO  
DE  
PATENTE DE INVENCIÓN**

Cumplidos los requisitos previstos en la vigente Ley 11/1986, de 20 de Marzo, de Patentes, se expide el presente CERTIFICADO-TÍTULO, acreditativo de la concesión de la Patente de Invención. Ha sido tramitada y concedida con realización del Informe sobre el Estado de la Técnica y sin examen previo de los requisitos sustantivos de patentabilidad.

Se otorga al titular un derecho de exclusiva en todo el territorio nacional, bajo las condiciones y con las limitaciones previstas en la Ley de Patentes. La duración de la patente será de **veinte años** contados a partir del 26/09/2011.

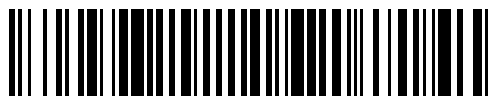
La patente se concede sin perjuicio de tercero y sin garantía del Estado en cuanto a la validez y a la utilidad del objeto sobre el que recae.

Para mantener en vigor la patente concedida, deberán abonarse las tasas anuales establecidas, que se pagarán por años adelantados. Asimismo, deberá explotarse el objeto de la invención, bien por su titular o por medio de persona autorizada de acuerdo con el sistema de licencias previsto legalmente, dentro del plazo de cuatro años a partir de la fecha de solicitud de la patente, o de tres años desde la publicación de la concesión en el Boletín Oficial de la Propiedad Industrial.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Ana R.', is written over a faint watermark of the Spanish coat of arms.



Fdo.: Ana María Redondo Mínguez  
El Director del Departamento de Patentes e Información Tecnológica P.D. El Jefe de Servicio de Actuaciones Administrativas



11 Número de publicación: **2 402 282**

21 Número de solicitud: 201131549

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2006.01)

12 SOLICITUD DE PATENTE A1

22 Fecha de presentación:

**26.09.2011**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**30.04.2013**

71 Solicitantes:

**CENTRO TECNOLOGICO DEL MAR - FUNDACION  
CETMAR (50.0%)  
Eduardo Cabello, s/n.  
36208 VIGO (Pontevedra) ES y  
CENTRO DE INVESTIGACIONES MARIÑAS.  
DIRECCION XERAL DE DESENVOLVEMENTO  
PESQUEIRO, CONSELLERIA DO MAR. XUNTA DE  
GALICIA (50.0%)**

72 Inventor/es:

**ABOLLO RODRIGUEZ, Elvira;  
VILLALBA GARCIA, Antonio y  
RAMILO ALVAREZ, Andrea**

74 Agente/Representante:

**CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel**

54 Título: **PROCEDIMIENTO PARA DETECTAR E IDENTIFICAR BONAMIA OSTREAE Y BONAMIA  
EXITIOSA EN UN ÚNICO ENSAYO DE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA.**

57 Resumen:

La presente invención es un procedimiento para detectar e identificar *Bonamia ostreae* y *Bonamia exitiosa* en un único ensayo de reacción en cadena de la polimerasa. El procedimiento comprende aislar el ADN presente en una muestra de tejido de ostra, realizar un ensayo de reacción en cadena de la polimerasa sobre el ADN extraído, utilizando una mezcla que comprende cebadores específicos para *B. ostreae* y *B. exitiosa* en la región ITS1 y un cebador común para ambas especies en el gen 18S ARNr, y detectar las secuencias nucleotídicas amplificadas. Asimismo, la invención también proporciona un kit para detectar e identificar *Bonamia ostreae* y *Bonamia exitiosa*, que comprende los cebadores mencionados anteriormente, fragmentos de ADN clonados de la región a amplificar para *B. ostreae* y *B. exitiosa*, desoxinucleótidos trifosfato, tampón de reacción y manual de instrucciones.

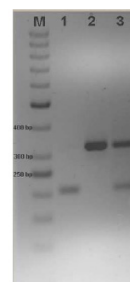


Fig. 1

ES 2 402 282 A1

## DESCRIPCIÓN

**PROCEDIMIENTO PARA DETECTAR E IDENTIFICAR *BONAMIA OSTREAE* Y  
*BONAMIA EXITIOSA* EN UN ÚNICO ENSAYO DE REACCIÓN EN CADENA DE  
LA POLIMERASA**5 **CAMPO DE LA INVENCION**

La presente invención se refiere a sondas de ADN procedentes de la región 18S-ITS1 del ADNr, para su utilización en la detección específica de *Bonamia ostreae* y *Bonamia exitiosa* en tejidos de ostra, mediante un procedimiento de reacción en cadena de la polimerasa multiplex. El procedimiento es de aplicación en el sector de la acuicultura para el control del estado de salud de los moluscos bivalvos, tanto en poblaciones naturales como cultivadas. Ambas especies patógenas son de declaración obligatoria, estando prohibidos los movimientos comerciales de animales enfermos a zonas legalmente reconocidas como libres de la enfermedad.

15 **ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

El género *Bonamia* agrupa actualmente cuatro especies de protozoos que infectan a varias especies de ostra en diferentes zonas del mundo. Dos de estas especies, *B. ostreae* y *B. exitiosa*, son altamente patógenas, siendo responsables de mortandades masivas de ostras tanto en el hemisferio Norte como Sur. *Bonamia ostreae* es una especie parásita que infecta a la ostra plana *Ostrea edulis* en Europa, los EE. UU., Canadá y Marruecos mientras que *Bonamia exitiosa* parasita a las especies de ostra *Ostrea chilensis* (= *Tiostrea chilensis* = *Tiostrea lutaria*) en Nueva Zelanda, *Ostrea angasi* en Australia y recientemente se ha descrito infectando a *Ostrea edulis* en Europa, aunque limitada en su extensión a Galicia (España), algunos puntos del litoral atlántico y mediterráneo francés y a la costa italiana del mar Adriático.

La Organización Mundial de Salud Animal ha incluido ambas especies, *B. ostreae* y *B. exitiosa*, en la lista de enfermedades que deben ser notificadas. La normativa europea recoge también que estas especies deben ser objeto de vigilancia, aunque *B. exitiosa* tiene consideración de enfermedad exótica pues en el momento de la redacción de la normativa no se había detectado esta especie en Europa.

Los métodos para la detección e identificación de *Bonamia ostreae* y *B. exitiosa* a partir de muestras de ostra se basan en métodos microscópicos (frotis,

## ES 2 402 282 A1

histopatología y microscopía electrónica), métodos inmunológicos de detección antígeno-anticuerpo (Ag-Ac) y técnicas moleculares de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) e hibridación *in situ* (ISH). Sin embargo todos estos métodos adolecen de una serie de problemas: (1) los métodos citohistológicos y el método de  
5 detección Ag-Ac ofrece baja especificidad y baja sensibilidad en infecciones leves o latentes; (2) aunque el empleo de la microscopía electrónica ofrece buena especificidad su empleo en tareas rutinarias de detección y diagnóstico no es viable debido a la lentitud del proceso, la alta especialización profesional para efectuar un correcto diagnóstico y el propio coste de la técnica; y (3) las técnicas moleculares de  
10 PCR e ISH ofrecen una mayor sensibilidad que los métodos histocitológicos, pero carecen en su mayoría de especificidad.

Se han descrito diferentes procedimientos para la detección por PCR convencional de *Bonamia ostreae*. Estos procedimientos utilizan sondas que hibridan sobre el gen  
15 18S del ARN ribosomal, el cual es un gen altamente conservado entre las especies de *Bonamia* por lo que las sondas no son específicas de especie. Un ejemplo es el procedimiento que utiliza los cebadores Bo-Boas en el que se detectan todos los haplosporidios englobados en la categoría de microcélulas, así como especies del género *Haplosporidium* (Cochennec, N. et al., 2000. Detection of *Bonamia ostreae*  
20 based on small subunit ribosomal probe. J. Invertebr. Pathol. 76, 26-32). Otros dos ejemplos son el procedimiento que utiliza los cebadores CF-CR (Carnegie, R.B. et al., 2000. Development of a PCR assay for detection of the oyster pathogen *Bonamia ostreae* and support for its inclusion in the Haplosporidia. Dis. Aquat. Org. 42, 199-206) y el procedimiento que utiliza los cebadores BOG-F y BOG-R (Abollo, E. et al., 2008. First detection of the protozoan parasite *Bonamia exitiosa* (Haplosporidia) infecting flat oyster *Ostrea edulis* grown in European waters. Aquaculture 274, 201-207) amplifican *B. ostreae* y *B. exitiosa* y otras especies. Ninguno de estos procedimientos de PCR es específico de especie, por lo que la identificación específica se debe realizar en un ensayo posterior mediante  
25 secuenciación o análisis de longitud de los polimorfismos de restricción (PCR-RFLPs).  
30

Empleando la misma región diana del ADN, el gen 18S del ARNr, también se ha desarrollado un ensayo de PCR cuantitativa descrito en Marty et al. (Marty, G. et al.,  
35 2006. Histopathology and a real-time PCR assay for detection of *Bonamia ostreae* in

## ES 2 402 282 A1

*Ostrea edulis* cultured in western Canada. Aquaculture 261, 33-42) para la detección de las especies de *Bonamia*. Recientemente, también se ha desarrollado otro ensayo de PCR cuantitativa para *Bonamia ostreae* empleando como región diana en el diseño de los cebadores específicos el gen de la actina (Robert, M. et al., 2009. Molecular detection and quantification of the protozoan *B. ostreae* in the flat oyster *Ostrea edulis*. Molecular and Cellular Probes 2 (6), 264-271). Este último ensayo a diferencia de la invención propuesta no permite la detección simultánea y específica de ambas especies patógenas, *Bonamia ostreae* y *B. exitiosa*, en un único ensayo.

Para un diagnóstico seguro de los organismos patógenos utilizando la tecnología de las sondas de ADN, estas deben ser muy específicas (es decir no deben presentar reacciones de cruzamiento con los ácidos nucleicos de otros organismos) y muy sensibles (es decir deben detectar los niveles iniciales de infección por los patógenos). A pesar de disponer de secuencias de dominio público en los bancos de genes no se conoce *a priori* a partir de qué genes del genoma pueden derivarse estas secuencias de sonda específicas. En la bibliografía no se presenta ninguna evidencia de que se puedan desarrollar sondas muy específicas en la región ITS1, pero sí se recogen los numerosos intentos fallidos de desarrollar sondas específicas a partir del gen 18S del ARNr (descritos en los dos párrafos anteriores). La selección de sondas que resulten específicas para *B. ostreae* y *B. exitiosa* no resulta evidente para el experto en la materia a partir de la información disponible en el estado de la técnica. La presente invención proporciona sondas especie-específicas derivadas de la región espaciadora ITS1 y una sonda común derivada del gen 18S del ARNr para la identificación de *B. ostreae* y *B. exitiosa*.

El problema que plantea la técnica es la identificación simultánea y específica en un único ensayo de los patógenos *Bonamia ostreae* y *Bonamia exitiosa*, responsables de la bonamiosis en especies de ostra. La solución que propone la presente invención es un procedimiento de detección específica de *Bonamia ostreae* y *Bonamia exitiosa* en tejidos de ostra que comprende la realización de una PCR multiplex que utiliza cebadores específicos para *B. ostreae* y *B. exitiosa* en la región ITS1 y un cebador común para ambas especies en el gen 18S ARNr, identificados por las secuencias SEQ ID NO: 1, 2 y 3.

## ES 2 402 282 A1

**DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION**

La presente invención es un procedimiento para detectar e identificar *Bonamia ostreae* y *Bonamia exitiosa* en un único ensayo de reacción en cadena de la polimerasa, que comprende:

- 5 a) aislar el ADN presente en una muestra de tejido de ostra,  
b) realizar dicho ensayo de reacción en cadena de la polimerasa sobre el ADN extraído en a) utilizando una mezcla de cebadores que comprende cebadores específicos para *B. ostreae* y *B. exitiosa* en la región ITS1 y un cebador común para ambas especies en el gen 18S ARNr, identificados por las secuencias SEQ ID NO:  
10 1, 2 y 3 y  
c) detectar las secuencias nucleotídicas amplificadas como resultado de dicha reacción en cadena de la polimerasa.

Una realización de la invención es el procedimiento de la invención, donde se utilizan  
15 cebadores que tienen una identidad del 95% respecto a los cebadores identificados por las secuencias SEQ ID NO: 1, 2 y 3. Una realización preferente es un procedimiento de la invención donde dicha identidad es del 85%. Y una realización más preferente es un procedimiento de la invención donde dicha identidad es del  
20 75%.

En la presente solicitud, dicho porcentaje de identidad en una secuencia determinada se calcula teniendo en cuenta que un 95% de identidad significa que un  
25 95% de residuos de la secuencia completa de los cebadores identificados por las secuencias SEQ ID NO: 1, 2 y 3 son idénticos a los residuos de la secuencia determinada.

La presente invención proporciona un nuevo método rápido y específico de identificación de los patógenos responsables de la bonamiosis en Europa, *Bonamia ostreae* y *B. exitiosa*, permitiendo en la misma reacción de PCR identificar ambas  
30 especies de forma rápida, específica e inequívoca.

En el procedimiento de la invención se realiza una reacción de amplificación Multiplex, en la cual pueden identificarse simultáneamente un fragmento de las  
35 secuencias 18SrRNA-ITS1, que proceden de *B. ostreae* y *B. exitiosa*.

## ES 2 402 282 A1

El procedimiento utiliza como cebadores tres oligonucleótidos, un oligonucleótido común para ambas especies y dos oligonucleótidos específicos para cada una de las especies. El procedimiento amplifica un fragmento de ADN de 208 pb para *B. ostreae* y de 330 pb para *B. exitiosa* en una única reacción de PCR y no amplifica el ADN de otras especies de *Bonamia* o géneros relacionados, ni el ADN de los moluscos hospedadores, siendo los cebadores diseñados altamente específicos e informativos.

El procedimiento presenta una sensibilidad superior a los métodos oficiales establecidos por la Organización Mundial de Sanidad Animal. El ejemplo 6 muestra cómo el procedimiento de la invención es más sensible en la identificación de *B. ostreae* y *B. exitiosa* que el examen microscópico de preparaciones histológicas y el análisis molecular mediante PCR-RFLPs. El procedimiento de la invención detectó más casos positivos de infección por *B. ostreae* y por *B. exitiosa* que las otras dos técnicas. El procedimiento de la invención es también más económico y rápido que las otras dos técnicas ya que tras las PCR no es necesario recurrir a los costosos procedimientos de secuenciación o al empleo de enzimas de restricción para la identificación específica.

Otra realización de la invención es un kit para detectar e identificar *Bonamia ostreae* y *Bonamia exitiosa* en un único ensayo de reacción en cadena de la polimerasa, que comprende:

- a) los cebadores específicos para *B. ostreae* y *B. exitiosa* en la región ITS1 y un cebador común para ambas especies en el gen 18S del ARNr, identificados por las secuencias SEQ ID NO: 1, 2 y 3,
- b) fragmentos de ADN clonados de la región a amplificar para *B. ostreae* y *B. exitiosa*,
- c) desoxinucleótidos trifosfato,
- d) tampón de reacción y
- e) manual de instrucciones que detalla el procedimiento a seguir.

Los fragmentos de ADN clonados de la región a amplificar para *B. ostreae* y *B. exitiosa* están presentes en el kit para la realización de un control positivo de identificación de *B. ostreae* y *B. exitiosa*, que permite determinar el correcto funcionamiento de los componentes del kit.

## ES 2 402 282 A1

Una realización preferente es el kit de la invención donde dichos desoxinucleótidos trifosfatos son dATP, dCTP, dGTP y dTTP a una concentración final de 200  $\mu$ M.

- 5 Otra realización preferente es un kit de la invención donde dicho tampón de reacción es 50 mM de cloruro de potasio, 10 mM de Tris-HCl (pH 8.3 a temperatura ambiente) y 1,5 mM de cloruro de magnesio.

**TEXTO LIBRE DE LA LISTA DE SECUENCIAS**

- 10 A continuación se aporta una traducción al español del texto libre que aparece en la lista de secuencias.

SEQ ID NO: 1. Cebador de inicio de *Bonamia ostreae* y de *Bonamia exitiosa*.

SEQ ID NO: 2. Cebador antisentido de *Bonamia ostreae*.

- 15 SEQ ID NO: 3. Cebador antisentido de *Bonamia exitiosa*.

SEQ ID NO: 4. Gen 18S de ARN ribosomal, secuencia parcial; ITS1; gen 5.8 S de ARN ribosomal, secuencia parcial; de *Bonamia ostreae*.

(36)..(55) Cebador identificado por la SEQ ID NO: 1.

(224)..(243) Cebador identificado por la SEQ ID NO: 2 (secuencia antisentido).

- 20 SEQ ID NO: 5. Gen 18S de ARN ribosomal, secuencia parcial; ITS1; gen 5.8 S de ARN ribosomal, secuencia parcial; de *Bonamia exitiosa*.

(36)..(55) Cebador identificado por la SEQ ID NO: 1.

(344)..(364) Cebador identificado por la SEQ ID NO: 3 (secuencia antisentido).

- 25 **BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS**

- La figura 1 muestra los patrones de bandas obtenidos en un gel de agarosa al 2% mediante PCR multiplex. La calle M muestra el marcador de peso molecular; la calle 1 muestra un amplificado de 208 pb al emplear ADN de ostra infectada por *B. ostreae*; la calle 2 muestra un amplificado de 330 pb al emplear ADN de ostra infectada por *B. exitiosa*; y, la calle 3 muestra un amplificado de 208 pb y otro de 330 pb al emplear ADN de ostra infectada por *B. ostreae* y *B. exitiosa*.
- 30

- La figura 2 muestra los amplificados obtenidos en un gel de agarosa al 2% mediante PCR multiplex empleando como templado el ADN de *Ostrea edulis* infectada por *B. ostreae* (1), *B. exitiosa* (2), ambas especies de *Bonamia*, *B. ostreae* y *B. exitiosa* (3),
- 35

## ES 2 402 282 A1

*Haplosporidium armoricanum* (4) y *Perkinsus mediterraneus* (5); *Crassostrea gigas* infectada por *Haplosporidium nelsoni* (6) y *Mikrocytos mackini* (7); *Ruditapes decussatus* infectada por *Perkinus olseni* (8); y *Mytilus galloprovincialis* infectado por *Marteilia refringens* (9); control negativo (10).

5

La figura 3 muestra los diferentes perfiles de restricción obtenidos al digerir los productos de PCR obtenidos con los cebadores Bo-Boas con la restrictasa *Bgl*I. M, marcador de peso molecular; 1, *Bonamia ostreae*; 2, *B. exitiosa*; 3, co-infección por ambas especies.

10

### **MODOS DE REALIZACIÓN PREFERENTE**

#### **Ejemplo 1. Diseño de cebadores específicos**

Se alinearon un total de 21 secuencias de ADN depositadas en el GenBank, pertenecientes a 17 especies diferentes. Las secuencias que se emplearon son las siguientes: *Ostrea edulis* (OEU88709, versión 1, fecha de creación 04.03.1997), *Urosporidium crescens* (U47852, versión 2, fecha de creación 14.06.2001), parásito tipo haplosporidio que infecta a la almeja *Ruditapes decussatus* (AY435093, versión 1, fecha de creación 01.04.2004) y *Haliotis iris* (AF492442, versión 1, fecha de creación 24.10.2003), *Haplosporidium louisiana* (U47851, versión 2, fecha de creación 14.06.2001), *Haplosporidium nelsoni* (X74131, versión 1, fecha de creación 06.06.2003), *Haplosporidium costale* (AF387122, versión 1, fecha de creación 01.06.2001), *Haplosporidium edule* (DQ458793, versión 1, fecha de creación 29.03.2007), *Haplosporidium pickfordi* (AY452724, versión 1, fecha de creación 14.02.2005), *Haplosporidium lusitanicum* (AY449713, versión 1, fecha de creación 14.02.2005), *Minchinia tapetis* (AY449710, versión 1, fecha de creación 14.02.2005), *Minchinia chitonis* (AY449711, versión 1, fecha de creación 14.02.2005), *Minchinia teredinis* (U20319, versión 1, fecha de creación 09.08.1995), *Bonamia ostreae* (AF262995, versión 1, fecha de creación 30.07.2001), *Bonamia perspora* (DQ356000, versión 1, fecha de creación 03.07.2006), *Bonamia roughleyi* (AF508801, versión 1, fecha de creación 02.01.2003), *Bonamia exitiosa* (DQ312295, versión 1, fecha de creación 27.06.2007, AF337563, versión 1, fecha de creación 02.09.2001, EU016528, versión 1, fecha de creación 08.03.2008) y *Bonamia* sp. (AY542903, versión 2, fecha de creación 04.03.2011, AY860060, versión 1, fecha de creación 09.01.2006).

30

## ES 2 402 282 A1

El alineamiento múltiple de las secuencias se realizó empleando el programa informático Clustal W. En base al alineamiento obtenido se seleccionaron las regiones sobre las que se diseñaron los cebadores, empleando para ello el programa Primer3. Los oligonucleótidos seleccionados fueron el BONAM-F (identificado por la secuencia SEQ ID NO: 1), BOSTRE-R (identificado por la secuencia SEQ ID NO: 2) y BEXIT-R (identificado por la secuencia SEQ ID NO: 3). Para la realización de la PCR multiplex empleamos el oligonucleótido identificado por la secuencia SEQ ID NO: 1 como cebador de inicio en la reacción de amplificación, siendo su secuencia común para *B. ostreae* y *B. exitiosa*. La especificidad viene dada por los cebadores antisentido, cebador identificado por la secuencia SEQ ID NO: 2 y cebador identificado por la secuencia SEQ ID NO: 3, que solo presentan homología de secuencias con *B. ostreae* y *B. exitiosa*, respectivamente. Los cebadores identificados por las secuencias SEQ ID NO: 1 y 2 amplifican un fragmento de ADN de *B. ostreae* de 208 pb; mientras que los cebadores identificados por las secuencias SEQ ID NO: 1 y 3 amplifican un fragmento de ADN de *B. exitiosa* de 330 pb.

**Ejemplo 2. Aislamiento del ADN en muestras de tejidos de ostra**

El ADN de cada una de las ostras estudiadas se extrajo a partir de pequeños fragmentos de branquias y gónada, empleando el método comercial Wizard® Genomic DNA Purification Kit, siguiendo las etapas que figuran a continuación:

- (a) Se añadió 600 µl de Nuclei Lysis Solution a un eppendorf de 1,5 ml y se mantuvo en hielo.
- (b) Se añadieron las muestras a estos eppendorf y se homogeneizó de forma manual con un pistilo estéril.
- (c) Se incubó a 65°C durante 30 minutos.
- (d) A continuación, se añadió 3 µl de solución RNasa (4 mg/ ml) al lisado nuclear, invirtiendo los tubos 5 veces para obtener un buen mezclando de la muestra. Se incubó a 37°C durante 30 minutos y se dejó enfriar la muestra a temperatura ambiente durante 5 minutos.
- (e) Se añadió 200 µl de Protein Precipitation Solution y se agitó vigorosamente en un vortex a alta velocidad (40 Hrzt) durante 20 segundos, enfriando a continuación la muestra en hielo durante 5 minutos.
- (f) Se centrifugó durante 4 minutos a 16.000 x g.

## ES 2 402 282 A1

(g) Con ayuda de una pipeta se retiró cuidadosamente el sobrenadante que contiene el ADN (se desecha el precipitado de proteínas) y se transfirió a un tubo limpio de 1, 5 ml que contenía 600  $\mu$ l de isopropanol a temperatura ambiente.

5 (h) Se mezcló cuidadosamente la solución por inversión y se centrifugó a temperatura ambiente durante 1 minuto a 16.000  $\times g$  para precipitar el ADN que se ve en el fondo del tubo como un precipitado de color blanco. Cuidadosamente, se decantó el sobrenadante.

10 (i) Se añadió 600  $\mu$ l de etanol 70% a temperatura ambiente y se invirtió el tubo cuidadosamente varias veces para lavar el ADN. Se centrifugó durante 1 minuto a 16.000  $\times g$  a temperatura ambiente.

(j) Cuidadosamente se aspiró el etanol y se dejó secar el precipitado al aire durante 10-15 minutos.

(k) Para rehidratar el precipitado de ADN se añadió 100  $\mu$ l de disolución 10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 1 mM EDTA (pH 8.0).

15 (l) El ADN extraído se cuantificó por espectrofotometría empleando el equipo SmartSpec Plus Spectrophotometer (Bio-Rad Laboratorios) y se almacenó a -20°C hasta ser usado.

### 20 **Ejemplo 3. Amplificación de fragmentos de ADN en muestras de tejidos de ostra**

En la amplificación se utilizó la siguiente mezcla de reacción: en un volumen final de 25  $\mu$ l de tampón de amplificación (10 mM Tris-HCl [pH 8,3], 50 mM KCl, 1,5mM MgCl<sub>2</sub>) se añadieron los cuatro desoxinucleótidos (dATP, dCTP, dGTP y dTTP) a una concentración final de 200  $\mu$ M para cada uno de ellos, los tres cebadores (75 picomoles de los cebadores identificado por las secuencias SEQ ID NO: 2 y 3 y 150 picomoles del cebador representado con la SEQ ID NO: 1), 0,625 unidades de Taq ADN polimerasa y 200 ng de ADN extraído a partir de los tejidos de ostra plana.

30 La mezcla de reacción se sometió a amplificación en un termociclador Biometra Tgradient en las siguientes condiciones: un primer paso de desnaturalización del ADN a 94°C durante 2 minutos; seguido de 35 ciclos consistentes en una desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, hibridación a 57,5 °C durante 45 segundos y extensión de la nueva cadena a 72°C durante 1 minuto; seguido de un paso final de extensión a 72°C durante 7 minutos.

35

## ES 2 402 282 A1

Los productos de PCR obtenidos se visualizaron mediante electroforesis horizontal en gel de agarosa al 2% en tampón TAE 1X (0,04 M Tris-acetato, 1 mM EDTA; pH 8,2) que se tiñó con 5 µl de bromuro de etidio (10 µg/µl). Se cargaron en el gel 8 µl de cada producto de PCR mezclado con 2 µl de tampón de carga. Las condiciones de electroforesis fueron de 80 V durante 45 minutos. Para la visualización de los amplicones los geles se escanearon con el sistema de documentación *GelDoc XR documentation system* (Bio-Rad Laboratories). El tamaño de los amplificados se determinó en cada uno de los geles mediante comparación en paralelo con el marcador de peso molecular *GeneRuler 50 bp DNA ladder* (Fermentas).

**Ejemplo 4. Detección e identificación de *B. ostreae* y *B. exitiosa* en muestras de tejidos de ostra**

La figura 1 muestra los patrones de bandas obtenidos con la PCR multiplex al emplear ADN de ostra infectado por *Bonamia* spp. En la calle 1 se observa una banda de un peso molecular en torno a los 200 pb que se correspondería con un amplificado de *B. ostreae*; en la calle 2 se observa una banda de un peso molecular en torno a los 330 pb, que se correspondería con un amplificado de *B. exitiosa*; mientras que en la calle 3 se observan las dos bandas anteriormente descritas, correspondiéndose a una infección por ambas especies, *B. ostreae* y *B. exitiosa*, en el mismo individuo hospedador.

Para verificar la identidad específica de los amplificados, las bandas fueron separadas del gel con ayuda de un bisturí y el ADN se purificó empleando el método comercial *MinElute Gel Extraction kit* (Qiagen). A continuación, estos amplicones se secuenciaron empleando un equipo de secuenciación ABI PRISM™ 3100 (Applied Biosystems) y usando el método comercial BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems). Todos los amplicones se secuenciaron empleando el cebador de inicio común para ambas especies en la PCR multiplex. Las secuencias obtenidas se analizaron empleando el programa ChromasPro version 1.32 Technelysium Pty Ltda., que permite la limpieza manual de las secuencias, editarlas y copiarlas. Todas las secuencias generadas se usaron en una búsqueda de similitud usando la herramienta bioinformática BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) en los servidores web del *National Center of Biotechnology Information*, que permitió la identificación específica de cada una de las secuencias obtenidas.

## ES 2 402 282 A1

Los resultados del BLAST mostraron que los productos de PCR de 208 pb tenían una identidad del 100% con la secuencia de *B. ostreae* depositada en el GenBank con el nº de registro AF262995, versión 1, fecha de creación 30.07.2001; mientras que los productos de PCR de 330 pb mostraron una identidad del 100% con la secuencia de *B. exitiosa* depositada en el GenBank con el nº de registro EU016528, versión 1, fecha de creación 08.03.2008.

**Ejemplo 5. Detección e identificación de *B. ostreae* y *B. exitiosa* en muestras problema de tejidos de ostra infectadas con diversos parásitos**

La especificidad de los cebadores diseñados fue probada empíricamente empleando ADN genómico de diferentes individuos de *Ostrea edulis*, libres de infección e infectados por diferentes patógenos: *Bonamia ostreae*, *B. exitiosa*, ambas especies de *Bonamia*, *Haplosporidium armoricanum* y *Perkinsus mediterraneus*. También se empleó ADN genómico de la ostra japonesa *Crassostrea gigas* infectada por *Haplosporidium nelsoni* y *Mikrocytos mackini*, *Venus verrucosa* infectada por *Perkinus olseni* y *Mytilus galloprovincialis* infectado por *Marteilia refringens*. Como control negativo se empleó un tubo con la mezcla de reacción sin ADN. Como se ilustra en la figura 2, los oligonucleótidos mostraron una elevada especificidad, ya que amplificaron la muestra de *Ostrea edulis* infectada por ambas especies de *Bonamia*, dando lugar a amplificados del tamaño esperado, mientras que para el resto de las muestras ensayadas no se obtuvo amplificación ni del ADN del parásito ni del hospedador.

**Ejemplo 6. Comparación del procedimiento de la invención con otras técnicas de diagnóstico de la bonamiosis**

Para evaluar la sensibilidad y eficacia de la metodología desarrollada abordamos la comparación con otras técnicas de diagnóstico de la bonamiosis: el examen microscópico de preparaciones histológicas y el análisis molecular mediante PCR-RFLPs.

Para ello, analizamos un total de 90 individuos de ostra plana procedentes de bateas ubicadas en la Ría de Arosa. Para el análisis histológico, de cada uno de los individuos se tomó una porción sagital de unos 5 mm de espesor que contenía branquia, masa visceral y manto. El tejido se fijó en solución de Davidson, se

## ES 2 402 282 A1

deshidrató incubando en una serie sucesiva de alcoholes, se transfirió a xileno y se incluyó en parafina. De cada una de las muestras se realizaron cortes de 5  $\mu\text{m}$  de espesor, que se tiñeron con hematoxilina de Harris y eosina y se observaron al microscopio óptico (1000 X) para diagnosticar la presencia de *Bonamia* spp.

5

Para el análisis molecular se fijó en etanol 99° una porción de branquia y otra de gónada de cada uno de los individuos. Para la extracción de ADN se empleó el método comercial Wizard® *Genomic DNA Purification Kit*, siguiendo los pasos que se detallaron anteriormente. Para la amplificación por PCR se emplearon los cebadores Bo-Boas descritos por Cochenec et al. Para la amplificación, la mezcla de reacción fue la siguiente: en un volumen final de 25  $\mu\text{l}$  de tampón de amplificación (10 mM Tris-HCl [pH 8,3], 50 mM KCl, 1,5mM  $\text{MgCl}_2$ ) se añadieron los dNTPs a una concentración final de 200  $\mu\text{M}$  para cada uno de ellos, los dos cebadores a una concentración de 75 picomoles, 0,625 unidades de Taq DNA polimerasa y 200 ng de ADN extraído a partir de los tejidos de ostra plana. La mezcla de reacción se sometió a amplificación en un termociclador Biometra Tgradient en las siguientes condiciones: un primer paso de desnaturalización del ADN a 94°C durante 2 minutos; seguido de 35 ciclos consistentes en una desnaturalización a 94°C durante 1 minuto, hibridación a 55 °C durante 1 minuto y extensión de la nueva cadena a 72°C durante 1 minuto; seguido de un paso final de extensión a 72°C durante 7 minutos. Para la identificación a nivel de especie de los productos amplificados se procedió al análisis de los polimorfismos de longitud de los fragmentos de restricción. Para ello, los productos de PCR amplificados con los cebadores Bo-Boas se digirieron con la restrictasa *Bgl* I. Todas las reacciones de restricción se realizaron en un volumen final de 15  $\mu\text{l}$  conteniendo 2.400 ng de ADN, 1,5  $\mu\text{l}$  de buffer de la enzima y 6 U de la enzima *Bgl* I. Las digestiones se realizaron a 37 °C durante 3 horas, seguido de una incubación de 20 minutos a 65 °C para inactivar la enzima. Para visualizar los patrones de restricción, se realizó una electroforesis horizontal en geles de agarosa al 2% siguiendo las mismas condiciones que las descritas anteriormente. En el gel se cargaron 15  $\mu\text{l}$  del producto de restricción mezclado con 1  $\mu\text{l}$  de buffer de carga. En los geles se observaron tres perfiles de restricción diferentes. Un patrón con dos fragmentos de 120 y 180 pares de bases (pb) que se corresponde a *B. ostreae*; un segundo patrón con un fragmento de 300 pb que se corresponde a *B. exitiosa*; y un tercer patrón con tres fragmentos de 120, 180 y 300 pb que se corresponde al perfil

30

## ES 2 402 282 A1

de restricción de *B. ostreae* y *B. exitiosa* (co-infecciones). Los perfiles de restricción obtenidos se ilustran en la figura 3.

Los resultados del estudio histopatológico mostraron que de los 90 individuos  
 5 analizados, en 33 se identificó bonamiosis, de ellos 10 estaban infectados por *B. ostreae* exclusivamente, 22 por *B. exitiosa* exclusivamente y 1 por ambas especies (Tabla 1). Los resultados obtenidos por PCR-RFLPs muestran que de las 90 ostras analizadas, en 32 se detectó bonamiosis, de ellas 13 estaban infectadas por *B. ostreae* exclusivamente, 19 por *B. exitiosa* exclusivamente y ninguna estaba co-  
 10 infectada por ambas especies (Tabla 1). Los resultados obtenidos por PCR multiplex muestran que de los 90 individuos analizados, en 64 se identificó bonamiosis, de ellos 24 estaban infectados por *B. ostreae* exclusivamente, 22 por *B. exitiosa* exclusivamente y 18 estaban co-infectados por ambas especies (Tabla 1). Teniendo en cuenta las 3 técnicas de diagnóstico, de los 90 individuos analizados, en 24  
 15 ostras se detectó infección exclusivamente por *B. ostreae* mediante alguna de las técnicas, en 25 ostras se detectó infección exclusivamente por *B. exitiosa* y 18 ostras estaban co-infectados por ambas especies (Tabla 1).

20 *Tabla 1. Se recoge el número y el porcentaje de ostras Ostrea edulis que se detectan infectadas por B. ostreae, por B. exitiosa o por ambas especies a la vez, tras analizar un total de 90 ostras con 3 técnicas diagnósticas: examen microscópico de cortes histológicos, PCR-RFLP y PCR multiplex.*

Especie identificada	Técnica empleada			
	Histología	PCR-RFLPs	PCR multiplex	Todas las técnicas
<i>B. ostreae</i>	10 (11,1%)	13 (14,4%)	24 (26,7%)	24 (26,7%)
<i>B. exitiosa</i>	22 (24,4%)	19 (21,1%)	22 (24,4%)	25 (27,7%)
<i>B. ostreae</i> & <i>B. exitiosa</i>	1 (1,1%)	0 (0%)	18 (20,0%)	18 (20,0%)
Bonamiosis	33 (36,7%)	32 (35,6%)	64 (71,1%)	66 (73,3%)

## ES 2 402 282 A1

La técnica PCR multiplex mostró una elevada sensibilidad, ya que detectó más casos positivos de infección por *B. ostreae* y por *B. exitiosa* que las otras dos técnicas. Todos los casos de infección por *B. ostreae* que se detectaron por histología o PCR-RFLPs también fueron positivos por PCR multiplex. Todos los  
5 casos de infección por *B. exitiosa* que se detectaron por PCR-RFLPs también se detectaron mediante PCR multiplex, pero 3 casos de infección por *B. exitiosa* detectados por histología no se detectaron por PCR multiplex. Comparando los diagnósticos obtenidos tomando las técnicas por parejas, mediante tablas de contingencia 2x2, y utilizando la prueba estadística de  $X^2$ , las comparaciones para el  
10 diagnóstico de *B. ostreae* demostraron que las diferencias de distribución en casos positivos y negativos entre la técnica histológica y la técnica de PCR multiplex fueron significativas ( $P < 0,05$ ) así como las diferencias entre la de PCR-RFLPs y la PCR multiplex. Sin embargo, no fueron significativas ( $P > 0,05$ ) las diferencias observadas entre la técnica histológica y la de PCR-RFLPs. En el caso del diagnóstico de *B.*  
15 *exitiosa*, la situación fue similar, de forma que las diferencias entre la técnica histológica y la técnica de PCR multiplex fueron significativas ( $P < 0,05$ ), también lo fueron las diferencias entre la técnica de PCR-RFLPs y la PCR multiplex, mientras que no lo fueron ( $P > 0,05$ ) las diferencias observadas entre la técnica histológica y la de PCR-RFLPs.

20 El análisis de la concordancia entre las técnicas de diagnóstico tomadas de dos en dos, utilizando el coeficiente de Cohen (kappa) como medida de conformidad de la concordancia y de acuerdo con tablas de contingencia, mostró que para el diagnóstico de *B. ostreae* el grado de concordancia entre PCR multiplex e histología es débil (kappa = 0,275), entre PCR multiplex y PCR-RFLPs es débil (kappa = 0,336)  
25 y entre histología y PCR-RFLPs es adecuado (kappa = 0,712). Para el diagnóstico de *B. exitiosa*, el grado de concordancia entre PCR multiplex e histología es moderado (kappa = 0,460), entre PCR multiplex y PCR-RFLPs es moderado (kappa = 0,551) y entre histología y PCR-RFLPs es moderado (kappa = 0,579).

## ES 2 402 282 A1

**REIVINDICACIONES**

1. Un procedimiento para detectar e identificar *Bonamia ostreae* y *Bonamia exitiosa* en un único ensayo de reacción en cadena de la polimerasa, que comprende:
  - a) aislar el ADN presente en una muestra de tejido de ostra,
  - 5 b) realizar dicho ensayo de reacción en cadena de la polimerasa sobre el ADN extraído en a) utilizando una mezcla de cebadores que comprende cebadores específicos para *B. ostreae* y *B. exitiosa* en la región ITS1 y un cebador común para ambas especies en el gen 18S ARNr, identificados por las secuencias SEQ ID NO: 1, 2 y 3 y
  - 10 c) detectar las secuencias nucleotídicas amplificadas como resultado de dicha reacción en cadena de la polimerasa.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, donde se utilizan cebadores que tienen una identidad del 95% respecto a los cebadores identificados por las secuencias SEQ ID NO: 1, 2 y 3.
- 15 3. Procedimiento según la reivindicación 2, donde dicha identidad es del 85%.
4. Procedimiento según la reivindicación 2, donde dicha identidad es del 75%.
5. Un kit para detectar e identificar *Bonamia ostreae* y *Bonamia exitiosa* en un único ensayo de reacción en cadena de la polimerasa, que comprende:
  - a) los cebadores específicos para *B. ostreae* y *B. exitiosa* en la región ITS1 y un
  - 20 cebador común para ambas especies en el gen 18S del ARNr, identificados por las secuencias SEQ ID NO: 1, 2 y 3,
  - b) fragmentos de ADN clonados de la región a amplificar para *B. ostreae* y *B. exitiosa*,
  - c) desoxinucleótidos trifosfato,
  - 25 d) tampón de reacción y
  - e) manual de instrucciones que detalla el procedimiento a seguir.
6. Kit según la reivindicación 5, donde dichos desoxinucleótidos trifosfatos son dATP, dCTP, dGTP y dTTP a una concentración final de 200  $\mu$ M.
7. Kit según una de las reivindicaciones 5 ó 6, donde dicho tampón de reacción es
- 30 50 mM de cloruro de potasio, 10 mM de Tris-HCl (pH 8.3 a temperatura ambiente) y 1,5 mM de cloruro de magnesio.

ES 2 402 282 A1

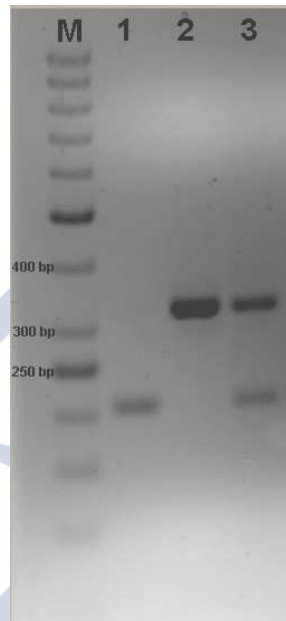


Fig. 1

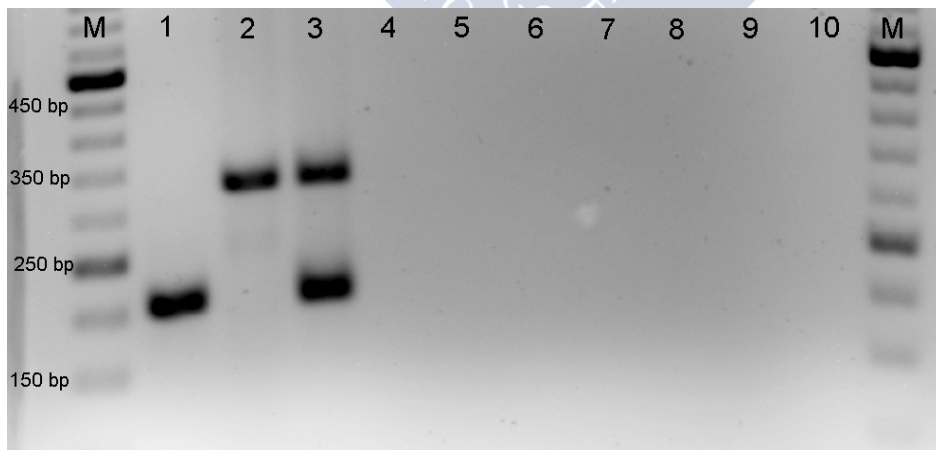


Fig. 2

ES 2 402 282 A1

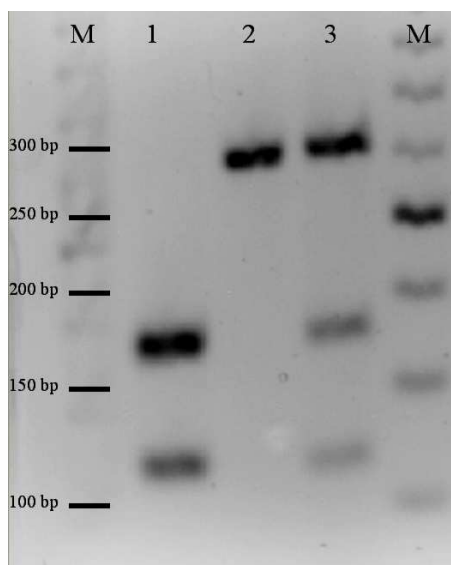


Fig. 3

## ES 2 402 282 A1

## LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> CENTRO TECNOLÓGICO DEL MAR - Fundación CETMAR  
CENTRO DE INVESTIGACIONES MARIÑAS. DIRECCIÓN XERAL DE  
DESENVOLVEMENTO PESQUEIRO, CONSELLERÍA DO MAR, XUNTA DE GALICIA.
- <120> PROCEDIMIENTO PARA DETECTAR E IDENTIFICAR BONAMIA OSTREAE Y  
BONAMIA EXITIOSA EN UN ÚNICO ENSAYO DE REACCIÓN EN CADENA DE LA  
POLIMERASA
- <130> P1549-2011
- <160> 5
- <170> PatentIn version 3.3
- <210> 1  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence
- <220>  
<223> Bonamia ostreae and Bonamia exitiosa forward primer
- <400> 1  
ttacgtccct gccctttgta 20
- <210> 2  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence
- <220>  
<223> Bonamia ostreae reverse primer
- <400> 2  
tcgcggttga attttatcgt 20
- <210> 3  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence
- <220>  
<223> Bonamia exitiosa reverse primer
- <400> 3  
aagattgatg tcggcatgtc t 21
- <210> 4  
<211> 386  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence
- <220>  
<223> Bonamia ostreae 18S ribosomal RNA gene, partial sequence;  
internal transcribed spacer 1; 5.8S ribosomal RNA gene, partial  
sequence.

## ES 2 402 282 A1

```

<220>
<221> misc_feature
<222> (36)..(55)
<223> Primer identified by SEQ ID NO: 1

<220>
<221> misc_feature
<222> (200)..(359)
<223> ITS1

<220>
<221> misc_feature
<222> (224)..(243)
<223> Primer identified by SEQ ID NO: 2 (reverse sequence)

<400> 4
atatctagta aacgcaagtc atcaacttgc attgattacg tcctgcctt ttgtacacac 60
cgcccgctcgc ttctaccgat tgaataatga ggtgaattag gtggataaga gcgctccgcg 120
ttcttagaag cttcgtgaac cttgttattt agaggaagga aaagtcgtaa caaggtttcc 180
gtaggtgaac ctgcggaagg atcattacac cacattttat tgcacgataa aattcaaccg 240
cgaaccacaca ttttattatt gcaaactctg gctacagatt gacaacacaa atgcagcgca 300
aggaatttgc gcaatgactt tgcgcaaagt tcttgcgctg caaaactccc gacaacagtc 360
tttgcaatgg atgactaggc tctcgc 386

<210> 5
<211> 386
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Bonamia exitiosa 18S ribosomal RNA gene, partial sequence;
internal transcribed spacer 1; 5.8S ribosomal RNA gene, partial
sequence.

<220>
<221> misc_feature
<222> (36)..(55)
<223> Primer identified by SEQ ID NO: 1

<220>
<221> misc_feature
<222> (204)..(361)
<223> ITS1

<220>
<221> misc_feature
<222> (344)..(364)
<223> Primer identified by SEQ ID NO: 3 (reverse sequence)

<400> 5
atatctagta aacgcaagtc atcaacttgc attgattacg tcctgcctt ttgtacacac 60

```

## ES 2 402 282 A1

cgcccgtcgc ttctaccgat tgaataatga ggtgaattag gtggataaga gccgcctcgg	120
cgcgttctta gaagctttgt gaaccttggt atttagagga aggaaaagtc gtaacaaggt	180
ttccgtaggt gaacctgcgg aaggatcatt attatactta tatttgttta ttattgcaaa	240
ataaaaacat ttataaaaac cgcgaacctc gttcttttaa ttaattttgc tgactaccga	300
ttactacac aaacgcaaaa agcatataca tatgactttt gcaagacatg ccgacatcaa	360
tctttgcaat ggatgactag gctctc	386



OFICINA ESPAÑOLA  
DE PATENTES Y MARCAS  
  
ESPAÑA

- ① N.º solicitud: 201131549  
② Fecha de presentación de la solicitud: 26.09.2011  
③ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤ Int. Cl.: C12Q1/68 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	ROBERT M. et al. Molecular detection and quantification of the protozoan <i>Bonamia ostreae</i> in the flat oyster, <i>Ostrea edulis</i> . Molecular and Cellular Probes. 2009. Vol 23, páginas: 264-271, página 264, resumen; Página 265, apartado 2.5.	1-7
A	CORBEIL S. et al. Development of a TaqMan PCR assay for the detection of <i>Bonamia</i> species. Inter-Research 2006. Vol 71, páginas: 75-80, página 75, resumen; página 76, columna 2.	1-7
A	ABOLLO E. et al. First detection of the protozoan parasite <i>Bonamia exitiosa</i> (Haplosporidia) infecting flat oyster <i>Ostrea edulis</i> grown in European waters. Aquaculture. 2007. Vol 274, páginas: 201-207, Página 201, resumen; página 202, apartado 2.3.	1-7
<p>Categoría de los documentos citados  X: de particular relevancia  Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría  A: refleja el estado de la técnica</p> <p>O: referido a divulgación no escrita  P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud  E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud</p>		
<p><b>El presente informe ha sido realizado</b>  <input checked="" type="checkbox"/> para todas las reivindicaciones      <input type="checkbox"/> para las reivindicaciones n.º:</p>		
<p><b>Fecha de realización del informe</b> 17.12.2012</p>	<p><b>Examinador</b> M. D. García Grávalos</p>	<p><b>Página</b> 1/4</p>

## INFORME DEL ESTADO DE LA TÉCNICA

Nº de solicitud: 201131549

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12Q

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, NPL, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, USPTO PATENT DATABASE, PUBMED, GOOGLE PATENTS, GOOGLE SCHOLAR, EBI.



## OPINIÓN ESCRITA

Nº de solicitud: 201131549

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 17.12.2012

**Declaración**

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-7	<b>SI</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-7	<b>SI</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

**Base de la Opinión.-**

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.



## OPINIÓN ESCRITA

Nº de solicitud: 201131549

**1. Documentos considerados.-**

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	ROBERT M. et al. Probes. 2009. Vol 23, páginas: 264-271.	2009
D02	CORBEIL S. et al. Inter-Research 2006. Vol 71, páginas: 75-80.	2006
D03	ABOLLO E. et al. Aquaculture. 2007. Vol 274, páginas: 201-207.	2007

**2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración**

La presente invención divulga un procedimiento para detectar e identificar los protozoos parásitos de ostras, *Bonamia ostreae* y *Bonamia exitiosa*, en un único ensayo de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La PCR se realiza con el ADN extraído de una muestra de tejido de ostra, empleando una mezcla de cebadores específicos, en la región ITS1, para ambas especies y un cebador común, en el gen 18S ARNr, para ambas especies. Dichos cebadores se corresponden con las secuencias SEQ ID NO: 1-3 (reivindicaciones 1-4). La invención se refiere también a un kit para detectar ambos organismos (reivindicaciones 5-7).

El documento D01 divulga un método de detección del protozoo parásito de ostras, *Bonamia ostreae*, por PCR a tiempo real, empleando el gen de la actina como región diana para diseño de cebadores específicos (ver página 264, resumen; página 265, apartado 2.5).

El documento D02 divulga un método de detección de especies del género *Bonamia* mediante PCR a tiempo real, empleando para diseño de cebadores específicos la región ITS-1 (ver página 75, resumen; página 76, columna 2).

El documento D03 divulga un método de detección del protozoo parásito de ostras, *Bonamia exitiosa*, por PCR-RFLPs, empleando cebadores CF y CR (ver página 201, resumen; página 202, apartado 2.3).

**1. NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 6.1 y Art. 8.1 LP 11/1986)**

La presente invención divulga un procedimiento para detectar e identificar los protozoos parásitos de ostras, *Bonamia ostreae* y *Bonamia exitiosa*, en un único ensayo de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), empleando una mezcla de cebadores específicos que se corresponden con las secuencias SEQ ID NO: 1-3.

**1.1 REIVINDICACIONES 1-7**

Los documentos D01-D03 divulgan un procedimiento para detectar e identificar diferentes especies de *Bonamia*, entre las que se encuentran *B. ostreae* y *B. exitiosa*, pero ninguno de ellos anticipa que se detecten ambas especies en un único ensayo, ni emplean los mismos cebadores.

En base a lo expuesto, se concluye que el objeto de las reivindicaciones 1-7 no se encuentra en el estado de la técnica y no podría haber sido deducido del mismo por un experto en la materia a partir de lo divulgado en los documentos D01-D03. Ninguno de estos documentos, tomados independientemente o en combinación, anticipa un procedimiento para detectar e identificar los protozoos parásitos de ostras, *Bonamia ostreae* y *Bonamia exitiosa*, en un único ensayo de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), empleando una mezcla de cebadores específicos que se corresponden con las secuencias SEQ ID NO: 1-3.

En consecuencia, las reivindicaciones 1-7 cumplen los requisitos de novedad y actividad inventiva (Art. 6.1 y Art. 8.1 LP11/1986).

## ANEXO II

### Listado de publicaciones incluidas en la tesis doctoral

---

#### Artículos publicados

---

- Ramilo, A.**, Navas, J. I., Villalba, A., Abollo, E., 2013. Species-specific diagnostic assays for *Bonamia ostreae* and *B. exitiosa* in European flat oyster *Ostrea edulis*: conventional, real-time and multiplex PCR. *Diseases of Aquatic Organisms* 104, 149-161.
- Villalba, A., Iglesias, D., **Ramilo, A.**, Darriba, S., Parada, J. M., No, E., Abollo, E., Molares, J., Carballal, M. J., 2014. Cockle *Cerastoderma edule* fishery collapse in the Ría de Arousa (Galicia, NW Spain) associated with the protistan parasite *Marteilia cochillia*. *Diseases of Aquatic Organisms* 109, 55-80.
- Ramilo, A.**, Iglesias, D., Abollo, E., González, M., Darriba, S., Villalba, A., 2014. Infection of Manila clams *Ruditapes philippinarum* from Galicia (NW Spain) with a *Mikrocytos*-like parasite. *Diseases of Aquatic Organisms* 110, 71-79.
- Ramilo, A.**, Villalba, A., Abollo, A., 2014. Species-specific oligonucleotide probe for detection of *Bonamia exitiosa* (Haplosporidia) using *in situ* hybridisation assay. *Diseases of Aquatic Organisms* 110, 81-91.
- Ramilo, A.**, González, M., Carballal, M. J., Darriba, S., Abollo, E., Villalba, A., 2014. Oysters parasites *Bonamia ostreae* and *B. exitiosa* co-occur in Galicia (NW Spain): spatial distribution and infection dynamics. *Diseases of Aquatic Organisms* 110, 123-133.
- Ramilo, A.**, Carrasco, N., Reece, K. S., Valencia, J. M., Grau, A., Aceituno, P., Rojas, M., Gairin, I., Furones, M. D., Abollo, E., Villalba, A., 2015. Update of information on perkinsosis in NW Mediterranean coast: Identification of *Perkinsus* spp. (Protista) in new locations and hosts. *Journal of Invertebrate Pathology* 125, 37-41.

---

#### Artículos en revisión

---

- Ramilo, A.**, Pintado, J., Villalba, A., Abollo, E. *Perkinsus olseni* and *P. chesapeaki* detected in a survey of perkinsosis of various clam species in Galicia (NW Spain) using PCR-DGGE as a screening tool. *Journal of Invertebrate Pathology*.

---

#### Patente

---

- Ramilo, A.**, Abollo, E., Villalba, A., 2014. Procedimiento para detectar e identificar *Bonamia ostreae* y *Bonamia exitiosa* en un único ensayo de reacción en cadena de la polimerasa. Nº de concesión P201131549 (España). Centro Tecnológico del Mar-Fundación CETMAR y Centro de Investigaciones Marinas (Xunta de Galicia).

## Listado de publicaciones relacionadas con la tesis doctoral

- Abollo, E., **Ramilo, A.**, Casas, S. M., Comesaña, P., Cao, A., Carballal, M. J., Villalba, A., 2008. First detection of the protozoan parasite *Bonamia exitiosa* (Haplosporidia) infecting flat oyster *Ostrea edulis* grown in European waters. *Aquaculture* 274, 201-207.
- Lynch, S., Abollo, E., **Ramilo, A.**, Cao, A., Culloty, S., Villalba, A., 2010. Observations raise the question if the pacific oyster, *Crassostrea gigas*, can act as either a carrier or a reservoir for *Bonamia ostreae* or *Bonamia exitiosa*. *Parasitology* 137, 1515-1526.
- Carrasco, N., Villalba, A., Andree, K. B., Engelsma, M. Y., Lacuesta, B., **Ramilo, A.**, Gairín, I., Furones, M. D., 2012. *Bonamia exitiosa* (Haplosporidia) observed infecting the European flat oyster *Ostrea edulis* cultured on the Spanish Mediterranean coast. *Journal of Invertebrate Pathology* 110, 307-313.
- Da Silva, P. M., Vianna, R. T., Guertler, C., Pinho-Ferreira, L., Nunes-Santana, L., Fernández-Boo, S., **Ramilo, A.**, Cao, A., Villalba, A., 2013. First report of the protozoan parasite *Perkinsus marinus* in South America, infecting mangrove oysters *Crassostrea rhizophorae* from Paraíba River (NE, Brazil). *Journal of Invertebrate Pathology* 113, 96-103.
- Flannery, G., Lynch, S. A., Longshaw, M., Stone, D., Martin, P., **Ramilo, A.**, Villalba, A., Culloty, S. C., 2014. Interlaboratory variability in screening for *Bonamia ostreae*, a protistan parasite of the European flat oyster *Ostrea edulis*. *Diseases of Aquatic Organisms* 110, 93-99.



