



PROTOCOLO DE MUESTREO DE LOS MOLUSCOS¹

1.-PROCEDIMIENTOS DE MUESTREO

El muestreo se puede realizar con al menos tres propósitos.

Vigilancia epidemiológica
Brote epizootico o sospecha
Confirmación de diagnóstico

Recolección de especímenes

El muestreo debe realizarse de tal forma que permita la detección de la enfermedad en los animales infectados con un nivel de confianza del 95%. Para aquellos test en los que la sensibilidad y especificidad es conocida, se pueden usar métodos como FreeCalc (www.ausvet.com.au) o los que se relacionan en el capítulo 1. 1. 4 Requisitos de Vigilancia para el reconocimiento internacional de estatus *libre de infección* (Manual de Diagnostic Test for Aquatic Animals). Sin embargo, para aquellos tests de los que no se conozcan ni la sensibilidad ni la especificidad, el número de muestras que se han de tomar depende del tamaño de la población o lote (según la **tabla 1**).

TABLA 1

Tamaño de lote	Tamaño de muestra con un 2% de prevalencia	Tamaño de muestra con un 5% de prevalencia	Tamaño de muestra con un 10% de prevalencia
50	50	35	20
100	75	45	23
250	110	50	25
500	130	55	26
1000	140	55	27
2000	145	60	27
100000 o más	150	60	30

Recomendaciones específicas para el muestreo de moluscos

En aquellas enfermedades estacionales, es muy importante que el muestreo se programe en los periodos prepatencia o en los del ciclo de infección del agente patógeno. Se recomienda que el muestreo se realice en aquellos casos en los que la condición corporal disminuye p.e. después del desove porque es más fácil que se detecte el agente patógeno.

1. Muestreo debe cubrir todos los rangos de tamaños poblacionales o la población de edad más susceptible, si éste último se conoce.
2. Cualquier molusco con anomalías debe muestrearse (desarrollo anormal, huecos en las valvas, alta mortalidad y morbilidad). En los casos en los que la enfermedad curse de forma subclínica, se recomienda que los moluscos se pongan en cuarentena y que sean sometidos a diferentes agentes estresantes como p. e. superpoblación, cambios de temperatura o salinidad etc, porque así se aumenta la probabilidad de detectar la enfermedad.
3. Prevalencia.- Cuando se utilizan moluscos que están en el medio natural se necesita muestrear un gran número de animales porque ciertas enfermedades se presentan con una prevalencia muy baja p. e. 0,1% en la *Martelia Sydneyi*.
4. Tamaño de la zona donde están los moluscos .-El número de sitios a muestrear será mayor o menor dependiendo de si el área es grande o pequeña.

¹ Tema realizado del Manual of Diagnostic Test for Aquatic Animals SECCIÓN 2.2 Capítulo 1.2



5. Otros factores también deben tenerse en cuenta como densidad población, flujo de agua etc.

Envío de muestras

Las muestras de moluscos deben empaquetarse según los estándares que permitan que los moluscos permanezcan vivos y enviarse lo antes posible. Para ello, es necesaria una buena sincronización con el laboratorio, que además será informado del día de llegada con tiempo suficiente para preparar los materiales necesarios para el procesado de las muestras.

Como norma general, cuando los animales no puedan llegar vivos la fijación debe realizarse “in situ” si el estudio posterior es microscópico (óptico o electrónico).

Si han de realizarse estudios en los fluidos frescos, microbiológicos (micología, bacteriológica y virología) o del fluido de tioglicolato de Ray para cultivo de *Perkinsus spp*, no se puede enviar material fijado.

Las muestras deben ir acompañadas de la siguiente información:

Razón por la que se envían

Apariencia macroscópica

Parámetros medioambientales o de manejo que pudieran estar asociados a la mortalidad.

Origen y naturaleza de los moluscos (especie, edad si los moluscos son autóctonos o no).

Examen Macroscópico

El examen macroscópico debe incluir, en la medida de lo posible, el estudio de:

Comportamiento animal es muy difícil observar cambios en el comportamiento de los animales en aguas abiertas, pero esto es posible en **instalaciones de cría de larvas**. Signos anormales son: acumulación de alimento en los tanques, el pre-establecimiento de las larvas en el fondo de los tanques, acúmulos de tierra y detritus son signos de debilidad

Instalaciones de jóvenes y adultos acumulación de detritus en las branquias y el manto, retracción del manto del borde de la concha, falta de actividad (las almejas dejan de enterrarse, las vieiras dejan de nadar con su forma peculiar, y la vuelta a la posición correcta del abalone se pierde al voltear el molusco es incapaz de ponerse de nuevo sobre la valva ventral etc).

Aspecto de la concha en condiciones de cultivo también es normal que la superficie de la concha tenga otros organismos como esponjas, lombrices polychaete, larvas bivalvos y plantas. Sólo es alarmante si la cantidad hace que el bivalvo no pueda abrir las valvas y cuando va acompañado de debilidad. Las deformidades de la concha o su fragilidad no suelen ser signo de enfermedad pero un olor o color anormal si puede ser indicativo de una infección del tejido blando.

Interior de la concha y los tejidos blandos

Los moluscos se abrirán intentando no dañar ni los tejidos blandos ni órganos (manto, branquias, corazón y glándula digestiva) la superficie interna ha de estar limpia y suave. El grado de perforación de la concha puede ser observado si se pone a sobre un foco de luz potente y deben estudiarse las causas de perforaciones o formaciones de burbujas.

En los tejidos blandos se ha de prestar especial atención a los abscesos, pústulas, edemas, perlas etc.

Se deben anotar todos los hallazgos encontrados.

Examen de los stocks cuando hay una mortalidad anormal

En el momento en el que se produzca una mortalidad elevada en los criaderos de moluscos es necesario realizar una investigación inmediata para esclarecer la etiología de la mortalidad.

Ejemplos en los que es fácil detectar una mortalidad anormalmente alta en un periodo corto de tiempo p. e. en las instalaciones localizadas en zonas intermareas se realizan inspecciones cada 15 días o cuando en los criaderos de larvas se paraliza la producción de éstas.

Se realizará la recolección, fijación y almacenaje tanto de animales sospechosos como de sanos para realizar estudios histológicos, microbiológicos y moleculares comparativos.



2.-MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO

Debido a que los moluscos no tienen suero y por tanto no tienen anticuerpos circulantes, los métodos de diagnóstico son directos y se limitan fundamentalmente a detectar el agente causal. Además de la citología e histología, es de destacar el uso de sondas de ácidos nucleicos y anticuerpos monoclonales para detectar los agentes productores de las enfermedades. El desarrollo de las técnicas de diagnóstico basadas en la detección de ácidos nucleicos de los agentes patógenos, se ha desarrollado mucho en los últimos años, aunque no se pueden obviar los problemas de validación inherentes a dichas técnicas.

Existen al menos cuatro posibles métodos de diagnóstico

1. La Histología se recomienda como método de screening estándar, aporta mucha información imprescindible dado que no existe ningún signo patognomónico que pueda detectarse macroscópicamente en las enfermedades de los moluscos.
2. Improntas de tejidos.
3. Medio de cultivo de tioglicolato de Ray y microbiológicos siembra en placa para bacterias.
4. PCR (reacción de la polimerasa en cadena).

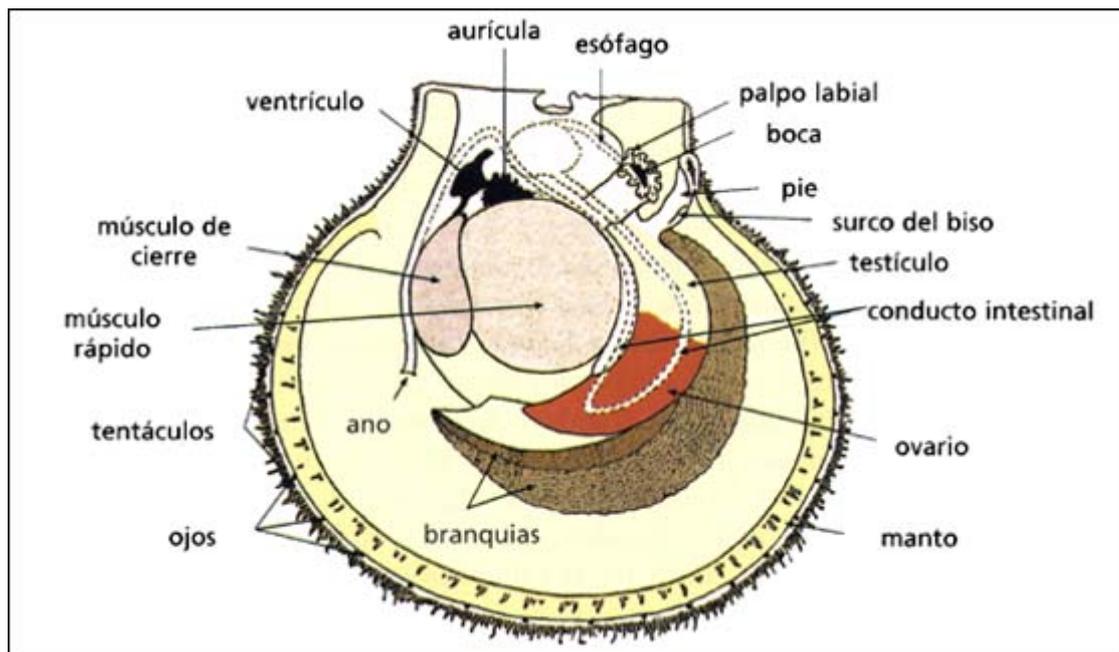
TECNICAS HISTOLÓGICAS

Como en toda técnica histológica el estudio histológico de los moluscos implica los siguientes pasos:

1. **Toma de muestras** son los moribundos o muertos recientemente (sólo minutos tras morir) los que se deben seleccionar. Se recogerá parte de la glándula digestiva incluyendo las branquias, manto y palpo labial, cuando sea posible (Figura 1). En especímenes grandes habrá que muestrear varias veces.
2. **Fijación de la muestra** en el caso de los moluscos es imprescindible abrir la concha para fijar los tejidos blandos. Se recomienda el uso de la solución de Davidson para histología porque preserva muy bien las estructuras de los tejidos y es la recomendada para la hibridación in situ con sonda de ADN. La solución de Carson es adecuada para microscopía electrónica. Como norma general se recomienda que una parte de los tejidos se use la de Davidson y para la otra la de Carson, si no se dispone de ninguna de las dos soluciones se puede usar agua de mar con 10% de formalina.

Aunque las siguientes fases son realizadas en los laboratorios de análisis, se describen para aquellos sitios alejados en los que el envío de muestras es difícil.

3. **Deshidratación** generalmente se usan máquinas que realizan todo el proceso.
4. **Embeber en parafina y cortar en secciones** de aproximadamente 2-3 μm se secan durante la noche a 60° C sobre los portales lo que hace que se elimine la humedad y que se adhieran las muestras a éstos.
5. **Teñir y montar en el porta**, antes de teñir, se realiza una inmersión en xileno para disolver la parafina (10-20 min) y después 10 min en etanol absoluto para quitar el disolvente, se rehidrata durante el mismo tiempo en agua. Tinción con hematoxilina eosina y observación en microscopio óptico (otras tinciones pueden realizarse como la de tricrómico para tejido conectivo etc).



Microscopía electrónica se usa con mucha frecuencia para confirmar las enfermedades en los moluscos por ello se señalan a modo indicativo las fases más importantes

1. **Toma de muestras** sólo se usarán muestras de los animales vivos. Los trozos no serán mayores de 1-2 cm
2. **Decalcificación** cuando sea necesario en larvas y juveniles de tamaño pequeño (500 mm).
3. **Fijación de la muestra** directamente con un 3% de glutaraldehído durante 1 hr lavar tres veces con bufer y fijar en ácido ósmico al 1%. Como norma general sirve cualquier formulación de tampón o ácido gutaraldehído con tal de que la osmolaridad de éstos sea la misma que los tejidos (1000 mOsm). Se puede realizar el glutaraldehído con agua de mar previamente filtrada por una membrana de 0,22 μm para esterilizarla.
4. **Deshidratación** en etanol al 70% una vez, al 95% dos veces, tres veces en etanol absoluto. Por último dos baños en óxido de propileno para realizar la **impregnación** antes de **embeber** los tejidos en resina epon 60 °C durante 48 hrs para que polimerice.
5. Preparar las **secciones** de 0,5-1 μm y colocar en los portas para en microscopio óptico localizar las zonas más interesantes que serán teñidas con 1% solución azul de toluidina a 90-100° C, secado, montado con una gota de resina y observar a microscopio óptico. Para el microscopio electrónico se cortarán ultrasecciones de 80-100 nm que se montan sobre rejillas de cobre y son teñidas con acetato de uranilo o citrato de plomo (específicos de microscopía electrónica).

MÉTODOS MOLECULARES

Los métodos moleculares como PCR, PCR-RFLP, secuenciación, hibridación “in situ” e inmunohistoquímica. En general tienen más sensibilidad que los métodos indirectos pero es muy importante que se realicen las validaciones oportunas (controles positivos y negativos fiables para detectar los falsos) y los controles de calidad para garantizar su robustez.

Para que sean fiables los resultados de éstos análisis las fases previas de “preparación de las muestras” son de extraordinaria importancia, por ello las señalamos a continuación.

Se debe usar contenedores nuevos y marcar con rotuladores indelebles los datos más relevantes de la muestra.

Algunos de los métodos para **preservar** y enviar los especímenes son:

Especímenes en hielo vivos o refrigerados si pueden llegar en 24 hr se meten en bolsas rodeadas de hielo húmedo todo ello se enviará en nevera



Especímenes congelados enteros congelar lo más rápidamente posible en campo con hielo seco o en el laboratorio a una temperatura de -20°C o inferior. En una caja corcho artificial aislante introducir las muestras rodeadas de hielo seco. Sólo cuando se empleen métodos de biología molecular.

Muestras preservadas en alcohol cuando la congelación no se puede realizar tanto el molusco entero como trozos de éste se pueden conservar en etanol de 90-95%.

Tejidos fijados para hibridación in situ e inmunohistoquímica los métodos clásicos de preservación son los adecuados como la solución de Davidson se debe evitar periodos de fijación superiores a 24-48 hrs.

