

03/05

PROYECTO FIP N° 2003-27

**“ESTATUS SANITARIO DE LOS MOLUSCOS DE
CULTIVO EN RELACIÓN A LAS ENFERMEDADES DE
ALTO RIESGO”**

INFORME FINAL

2005

PROYECTO FIP N° 2003-27

**“ESTATUS SANITARIO DE LOS MOLUSCOS DE
CULTIVO EN RELACIÓN A LAS ENFERMEDADES
DE ALTO RIESGO”**

INFORME FINAL

Unidad Ejecutora

PONT.UNIVERSIDAD CATÓLICA DE VALPARAÍSO

**FACULTAD DE RECURSOS NATURALES
ESCUELA DE CIENCIAS DEL MAR**

Investigador Principal

Mariel Campalans B.

Investigadores Asociados

Jacqueline Campalans B.
Inés Guerrero S.
Patricia Rojas Z.

Subcontrato

UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL NORTE

**SEDE COQUIMBO
FACULTAD DE RECURSOS NATURALES
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MARINA**

Co- Investigador

Karin Lohrmann S.

2005

INDICE

	Pág.
INTRODUCCION	1
OBJETIVOS	3
<u>Objetivo 4.1.</u>	
Determinación de la ocurrencia y frecuencia de aparición de patologías de Alto Riesgo en moluscos de importancia comercial	4
1.2. Antecedentes	4
1.3. Desarrollo Metodológico	10
1.3.1. Construcción de Base de Datos	10
1.3.2. Georreferenciación de los centros de cultivo	11
1.3.3. Identificación de las zonas de muestreo	12
1.3.4. Selección de los Centros	17
1.3.5. Tamaño de la Muestra	17
1.3.6. Sensibilización de los Productores	18
1.3.7. Periodo de Muestreo y Frecuencias	18
1.3.8. Transporte de las Muestras	22
1.3.9. Procesamiento Primario de las Muestras	24
1.3.10. Catastros	24
1.3.10.1. Catastro de parásitos en tejidos blandos	25
1.3.10.2. Catastro de poliquetos, <i>Polydora</i> sp. y Sabélidos en ostiones y abalones	25
1.3.10.3. Catastro <i>Bonamia</i> sp. en <i>O. chilensis</i>	27
1.4. Resultados Obtenidos	35
1.4.1. Catastro de parásitos en tejidos blandos	35
1.4.1.1. Abalón Japonés	35
1.4.1.2. Ostión del Norte	36
1.4.1.3. Abalón Rojo	39
1.4.1.4. Ostra del Pacífico	39
1.4.1.5. Ostra Chilena	41

1.4.2. Catastro de poliquetos, <i>Polydora</i> sp. y sabélidos	45
en ostión y abalones	45
1.4.2.1. Abalón Japonés	47
1.4.2.2. Ostión del Norte	48
1.4.2.3. Abalón Rojo	51
1.4.3. Catastro de <i>Bonamia</i> sp. en <i>O. chilensis</i>	51
1.4.3.1. Histología	54
1.4.3.2. Análisis Ultraestructural	56
1.4.3.3. Análisis Molecular	57
1.4.3.4. Caracterización Taxonómica	

Objetivo 4.2.

Comparación y análisis de protocolos de diagnóstico para las principales enfermedades de moluscos, desarrollados en la ejecución de los proyectos FIP N°95-32 y 2001-09

	62
2.1. Antecedentes	62
2.1.1. Enfermedades de moluscos de cultivo en el país	65
2.2. Desarrollo Metodológico	67
2.2.1. Revisión bibliográfica de instituciones de educación Superior	67
2.2.2. Resúmenes de trabajos de investigación de fondos concursables FONDEF y FIP	71
2.2.3. Búsqueda de documentos virtuales disponibles en Internet	72
2.2.4. Búsqueda en revistas de investigación en universidades Con carreras afines	75
2.3. Reunión de Trabajo	76
2.3.1. Resultados y Conclusiones	77
2.4. Comparación de protocolos proyecto FIP 95-32 y 2001-09	78

Objetivo 4.3.

Análisis de los factores ambientales asociados a la presencia de patologías relevantes en las poblaciones de moluscos de cultivo

	79
3.1. Antecedentes	79
3.2. Desarrollo Metodológico	82
3.2.1. Documentos disponibles en instituciones de educación superior con carreras afines	83
3.2.2. Revisión trabajos de investigación de fondos concursables	84
3.2.3. Publicaciones nacionales e internacionales (indexadas)	86
3.2.3.1. Publicaciones Nacionales	86
3.2.3.2. Publicaciones Internacionales	87
3.2.3.3. Resultados del Análisis	88
3.2.4. Variables ambientales asociadas a presencia de patologías	90
3.2.4.1. TSM Satelital	90
3.2.4.1.1. TSM X Región	90
3.2.4.1.2. TSM III Región	94
3.2.4.1.3. TSM IV Región	97
3.2.4.2. Clorofila a Satelital	100
3.2.4.2.1. Décima Región	100
3.2.4.2.2. Tercera y Cuarta Regiones	106
3.2.4.3. Salinidad	113

Objetivo 4.4.

Propuesta de medidas sanitarias para la prevención y/o control de enfermedades de alto riesgo en moluscos cultivados

	114
4.1. Antecedentes	114
4.1.1. Prevención del contacto entre patógeno y huésped	116
4.1.1.1. Intervención puntual	116
4.1.1.2. Intervención coordinada	117
4.1.2. Incremento de la resistencia natural o genética	117
4.1.3. Mejoramiento de la dieta e inmunización	118

ANEXOS

- ANEXO 1** : Ficha de los Centros de Cultivo
- ANEXO 2** : Carta Informativa a Productores
- ANEXO 3** : Ficha de las Muestras
- ANEXO 4** : Listado de proyectos FONDEF en el área de moluscos
- ANEXO 5** : Secuencia de la Región 5' de la SSU rDNA registrado bajo el número AF508801.
- ANEXO 6** : Homología fragmento 5' de la región 18S.
- ANEXO 7** : Información bibliográfica analizada.
- ANEXO 8** : Programa Seminario Internacional.
- ANEXO 9** : Versión en Inglés Publicación Internacional

INTRODUCCION

La importancia del diagnóstico de las enfermedades de moluscos de interés comercial está dada por la relevancia económica y social que éstos revisten, sobre todo en aquellas regiones del país de gran actividad acuícola y, además, por el peligro del traslado de individuos enfermos desde zonas enzoóticas hacia zonas libres del patógeno.

Dado que no se conoce si los moluscos de cultivo que son susceptibles a algunas de las enfermedades de declaración obligatoria estarán realmente libres de los agentes causantes de éstas, se hace necesario actualizar el conocimiento del estatus sanitario de los moluscos de cultivo en el país que son susceptibles a aquellas enfermedades clasificadas en Lista 1 y Lista 2 en el país, que fueron publicadas en el Diario Oficial el 3 de agosto de 2002. Un estudio sobre el conocimiento de los patógenos presentes en moluscos susceptibles de contraer enfermedades de alto riesgo, permitirá focalizar los esfuerzos de detección, mejorando la eficiencia de los recursos disponibles para el estudio específico de estos patógenos.

El acceso a nuevas técnicas de diagnóstico para la detección de patógenos específicos, como son los métodos moleculares, ha permitido mejorar la sensibilidad y especificidad en la identificación de patógenos como es el caso del parásito *Bonamia-like* descrito por Kern (1993) y detectado nuevamente en el estudio FIP 95-32. Además, estas técnicas han permitido resolver su afiliación taxonómica; los resultados de la técnica PCR aplicada a muestras de ostras provenientes de Calbuco, X región, indicarían que correspondería a una nueva especie de *Bonamia*, distinta a *B. ostreae* y *B. exitiosus* (Cochennec comp. pers.).

Un estudio de esta naturaleza contribuirá a disminuir la brecha que existe actualmente entre los altos índices de producción y el escaso conocimiento científico asociado al impacto sanitario de los moluscos de cultivo.

Finalmente, el conocer y mantener actualizado el estatus sanitario de los moluscos de importancia comercial adquiere mayor relevancia en la actualidad, debido a la creciente globalización y mayor protagonismo, a nivel, mundial que adquiere nuestro país, a través de los tratados de libre comercio que se han suscrito últimamente

OBJETIVOS

GENERAL:

Diagnosticar la presencia y prevalencia de las enfermedades de declaración obligatoria en moluscos de cultivo de importancia comercial.

ESPECIFICOS:

- 4.1 Determinación de la ocurrencia y frecuencia de aparición de patologías de alto riesgo en molusco de importancia comercial.
- 4.2 Comparación y análisis de protocolos de diagnóstico para las principales enfermedades de moluscos, desarrollados en la ejecución de los proyectos FIP N° 95-32 y 2001-09.
- 4.3 Análisis de los factores ambientales asociados a la presencia de patologías relevantes en las poblaciones de moluscos de cultivo.
- 4.4 Propuesta de medidas sanitarias para la prevención y/o control de enfermedades de alto riesgo en moluscos cultivados.

OBJETIVO 4.1:

Determinación de la ocurrencia y frecuencia de aparición de patologías de alto riesgo en moluscos de importancia comercial.

1.2. ANTECEDENTES

Dentro de las enfermedades de alto riesgo que afectan a los moluscos, las que han revestido mayor importancia son las producidas por parásitos protozoos. Los ejemplos más conocidos son *Marteilia refringens*, *Bonamia ostreae* y *Perkinsus marinus*, que han sido la causa de grandes epizootias en varios países. Las primeras fueron descritas por Comps en 1970 (citado por Figueras y Montes, 1988) y, además de ostras, afectan a mitílidos, presentando ciclos similares (Bautista, 1989). La Perkinsosis fue una de las primeras enfermedades marinas que atrajo considerablemente la atención, a causa de las epizootias causadas por el protozoo actualmente conocido como *Perkinsus marinus* en la ostra americana *Crassostrea virginica*. Esta enfermedad protozoaria fue reconocida a comienzos de la década de los cincuenta y llegó a ser el principal factor natural de pérdidas en la producción.

Fuera de estos descubrimientos asociados a los principales estudios de enfermedades epizooticas, se podría anotar algunos más recientes, entre los que se puede mencionar a algunas especies de *Bonamia*, recientemente clasificada como *B. exitiosus* (Hine *et al.*, 2001) y que se encuentran en *Tiostrea luraria*, y *T. lurida*

Muy relacionadas a las especies de *Bonamia* están *Mikrocytos mackini* y *M. roughleyi*, que causan mortalidades en dos géneros de ostras: *Crassostrea gigas* y *Saccostrea commercialis* respectivamente. *Mikrocytos sp.*, es ultra estructuralmente similar a *B. ostreae*, mostrando diferencias en la posición del nucléolo y la posible ausencia de mitocondria. La otra diferencia sería que se encuentra en ostras de género *Crassostrea* y *Saccostrea* pero no en *Tiostrea* (Perkins, 1993).

Dentro del grupo de enfermedades causadas por bacterias que se consideran de importancia en moluscos por haber sido clasificadas como enfermedades de alto riesgo en la Lista 2 de moluscos de la legislación chilena, como es la patología asociada a organismos rickettsiales. En 1992, Haaker *et al.* describen una enfermedad letal que afecta a los abalones de todos los tamaños y provoca letargo, retracción en los tejidos viscerales, atrofia del músculo del pie, lo que tiene efectos adversos en la habilidad que poseen los abalones para adherirse a los sustratos. Es una enfermedad crónica asociada a mortalidades masivas de poblaciones naturales de abalón negro (*Haliotis cracherodii*) en California, detectada a partir del año 1986. Se ha encontrado también en el abalón rojo, *Haliotis rufescens* (Moore et al. 2000). Las altas temperaturas aceleran el progreso de la enfermedad y disminuyen la sobrevivencia. Generalmente, a temperaturas entre 18°C y 20°C, la mortalidad se produce en un mes de la aparición de los signos clínicos. Esta enfermedad, conocida como Síndrome del Marchitamiento o deshidratación de los Abalones, ha sido ampliamente estudiada, clasificando a la bacteria rickettsial como *Candidatus Xenralioidis californiensis* (Friedman et al., 1997).

Además, existen otras enfermedades de importancia en moluscos, como son las provocadas por poliquetos perforadores del género *Polydora*. Dado su establecimiento en especies de importancia económica como ostras, ostiones y abalones, su estudio ha suscitado particular interés y discusión (Blake & Evans 1973; Martin & Britayev 1998). Los efectos negativos de su presencia y el elevado potencial reproductivo de estos gusanos (que le permiten alcanzar proporciones epidémicas en cultivos intensivos) hacen de la infestación polidórica un problema preocupante para el cultivo de moluscos.

Un poliqueto que afecta grandemente a los cultivos de abalón, pertenece a la familia *Sabellidae*. En el último tiempo los cultivos de abalón rojo *Haliotis rufescens* en Norteamérica han sufrido graves pérdidas económicas debido a la presencia de un poliqueto que, además de producir deformaciones en la concha y poros respiratorios de los organismos cultivados, retarda su crecimiento, disminuye su comerciabilidad y causa mortalidades (Arthur *et al.* 1994; Oakes & Fields 1996). Este epizoo ha sido identificado como *Terebrasabella heterouncinata* (Sabellidae) (Fitzhugh & Rouse 1999). Observaciones iniciales sobre el ciclo de vida, modo y tasa de infestación, efectos sobre el

crecimiento de *H. rufescens* y especificidad fueron realizadas por Kuris & Culver (1999). Estos autores señalan la posible introducción de esta peste a los Estados Unidos con abalones importados desde Sudáfrica. Ruck & Cook (1998) detallan las implicancias de la infestación por sabélidos para el cultivo de abalones en Sudáfrica.

En Chile, el conocimiento de las enfermedades de moluscos cuenta con pocos antecedentes los que hasta hace pocos años se restringían a la descripción de la presencia de algunos parásitos pluricelulares (Oliva et al., 1986; Carvajal 1988) y el reporte de desorden proliferativo celular en ostras de Chiloé (Mix y Breese, 1980).

Una investigación realizada por Kern en 1993 reporta la presencia de *Bonamia sp.* en *Ostrea chilensis*, que se presenta en el resumen del informe de la reunión anual de la National Shellfisheries Association Portland.

Posteriormente, Riquelme *et al.* (1995) inicia la publicación de la investigación realizada en problemas bacterianos de los cultivos larvales del ostión del norte.

En relación a enfermedades de origen bacteriano se destaca la presencia de *Vibrio anguillarum* (VAR), *V. alginolyticus* y *Aeromonas hydrophila*, en cultivos larvales de ostión (*Argopecten purpuratus*), siendo *A. hydrophila* altamente resistente a la mayoría de los antibióticos de uso común en acuicultura (Riquelme *et al.*, 1995).

Por otro lado, como se puede apreciar en Riquelme *et al.* (2000), los estudios de las bacterias en cultivo de larvas del ostión del norte han sido conducidos hacia la investigación de probióticos para mejorar la supervivencia de esta etapa del desarrollo del ostión.

El primer estudio referido al estado sanitario de moluscos de cultivo que contempla larvas, juveniles y adultos, se realizó mediante el proyecto FIP 95/32 ejecutado por la Universidad Católica de Valparaíso y permitió conocer los problemas patológicos de siete especies de cultivo en la X región y una de la IV región del país. Para la detección de las anomalías se realizaron cortes histológicos, los cuales permitieron la observación de siete condiciones patológicas (Campalans et al. 1997). En la ostra chilena (*Tiostrea chilensis*) fueron detectados dos tipos de protozoos, uno en la glándula digestiva y el otro en manto, túbulos digestivos y branquias; ninguno de ellos provocaba reacción del huésped ni daño en células. En esta misma especie se registraron, además, otras dos anomalías, una señalada como proliferación anormal del tejido de glándula digestiva (neoplasia) y la otra

correspondería a una alteración de los hemocitos, llamada parasitosis hemocítica; ninguna de ellas asociada a signos externos ni internos. En el estudio, el ostión del norte (*Argopecten purpuratus*) fue la única especie que presentó signos asociados a la condición descrita como retracción del manto y destrucción de la valva. Se describe a un posible protozoo tipo *Ascetospora* como el causante de esta patología, aunque estudios posteriores (tesis, consulta a expertos), no lograron aclarar la presencia del agente causante, asociándose esta patología, hasta el momento, a condiciones ambientales.

El chorito de cultivo (*Mytilus chilensis*) presentó dos anomalías, una de ellas descrita como neoplasia hemocítica afectando, a tejido digestivo y manto, y la otra se describe como una parasitosis hemocítica, afectando a células sanguíneas. En ninguna de estas dos anomalías los individuos afectados presentaron signos asociados. También para esta especie se describe un protozoo dentro de las células epiteliales de los túbulos digestivos, aunque no se observó ningún daño atribuido al protozoo.

En la ostra japonesa (*Crassostrea gigas*) se observaron plasmodios semejantes a los que presentan los protozoos haplosporidios en células epiteliales de manto, branquias, glándula digestiva y gónadas. Tampoco fue posible asociar daño en las células o signos externos en los individuos que presentaron esta condición. Las larvas de esta especie presentaron dos tipos de anomalías; una de ellas descrita como esferas gastrointestinales y la otra, como cuerpos electrodensos en las células ciliadas del velo.

Este primer catastro de enfermedades de moluscos de cultivo dio origen a varias publicaciones entre las que se cuenta la descripción de la neoplasia en *Mytilus chilensis* (Campalans et al., 1998) y en *Tiostrea chilensis* (Rojas et al., 1999), la descripción de las anomalías en ostra japonesa (González et al, 1999) y el trabajo sobre la parasitosis hemocítica en ostra chilena (Campalans et al., 2000). Asociado a esta investigación se realizó, posteriormente, una caracterización molecular del parásito intrahemocitos, en el Laboratorio de Referencia de la OIE en La Tremblade, Francia, cuyo resultado indicaría que se trata de una nueva especie de *Bonamia*, diferente de las descritas anteriormente (Cohenec, comunicación personal).

En el Cuadro 1 se resumen las enfermedades encontradas en moluscos de Chile.

CUADRO 1: Enfermedades y agentes patógenos de moluscos cultivados en Chile, registrados en publicaciones nacionales e internacionales, por agente.

Agente	Enfermedad	Referencia
BACTERIAS	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Pseudomonas, Moraxelas y Vibrios en cultivos larvales de Ostión del Norte ➤ Vibrios en <i>Argopecten purpuratus</i> ➤ <i>Aeromonas hydrophila</i> y <i>Vibrio alginolyticus</i> asociados a larvas de <i>Argopecten purpuratus</i> ➤ <i>Vibrio anguillarum</i> en tracto digestivo de <i>Mytilus chilensis</i> 	<p>Riquelme <i>et al.</i>, 1995</p> <p>Chavez <i>et al.</i>, 1994.</p> <p>Riquelme <i>et al.</i>, 1996</p> <p>Vial <i>et al.</i>, 1988</p>
PROTOZOOS	<ul style="list-style-type: none"> ➤ <i>Bonamia sp.</i> en Ostra chilena ➤ Parasitosis hemocítica (tipo <i>Bonamia</i>) en ostra chilena 	<p>Kern 1993</p> <p>Campalans <i>et al.</i>, 2000</p>
PARASITOS	<ul style="list-style-type: none"> ➤ <i>Edotea magellanica cunningham</i> (Isopoda Valvifera) en <i>Mytilus chilensis</i>. ➤ Alga <i>Coccomyxa parasitica</i> en <i>Mytilus edulis chilensis</i> 	<p>Jaramillo <i>et al.</i>, 1981</p> <p>Gray <i>et al.</i>, 1999</p>
ORIGEN INCIERTO	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Neoplasia en <i>Tiostrea chilensis</i> ➤ Neoplasia en <i>Mytilus chilensis</i> ➤ Esferas gastrointestinales en larvas de <i>Crassostrea gigas</i>. ➤ Cuerpos electrodensos en velo de larvas de <i>Crassostrea gigas</i>. 	<p>Mix & Breese, 1980</p> <p>Rojas <i>et al.</i>, 1999</p> <p>Campalans <i>et al.</i>, 1998</p> <p>González <i>et al.</i>, 1999</p> <p>González <i>et al.</i>, 1999</p>

Con la masificación del cultivo del pectínido *Argopecten purpuratus* se detectó y puso atención a una especie perforadora de *Polydora* causante de considerables pérdidas económicas. En Bahía Tongoy, donde se concentra gran parte de la actividad de cultivo del ostión del norte, este poliqueto fue caracterizado morfológicamente e identificado como *Polydora sp* por Basilio *et al* (1995). Con anterioridad, Cañete (1988) reporta a *Polydora cf. rickettsi* y *Dipolydora socialis* como epibiontes de *A. purpuratus* en la IV Región.

Polydora cf. rickettsi y *Dipolydora giardi* perforan las valvas de ostiones cultivados en la X Región (Sato-Okoshi & Takatsuka 2001). Actualmente, no se tienen registros de prevalencias o intensidades de infestación por *Polydora* y/o *Dipolydora* spp. en ostiones.

A pesar que en Japón se han identificado cuatro especies perforadores de conchas de abalón (Sato-Okoshi, 1999), sólo reportes no oficiales revelan la presencia de infestación polidórica en ambas especies de abalones cultivadas en Chile, generando discusión respecto a una posible introducción accidental de una especie de *Polydora* exótica al territorio nacional.

Dentro de este contexto se hace necesario evaluar prevalencias e intensidades de infestación e identidad específica de los polidóridos presentes en los centros de cultivo de abalones del país.

Respecto a los poliquetos sabélidos, no existen datos de prevalencia e intensidad de infestación por estos organismos que hayan sido reportados oficialmente para ninguna de las dos especies de abalones cultivadas en Chile. Sin embargo, se tienen registros de su presencia y efectos en cultivos de *H. rufescens* en la IV Región (Hurtado, 2000).

1.3. DESARROLLO METODOLOGICO

1.3.1 Construcción de base de datos

Como se planteó en la Propuesta Técnica, para dar cumplimiento a este objetivo se debía realizar muestreos de:

- Ostras Chilenas de la X Región,
- Ostras del Pacífico de las regiones IV y X,
- Abalón Rojo de las regiones III, V y X,
- Abalón Japonés de las regiones III y IV, y
- Ostión de Norte de las regiones III y IV,

en centros productores representativos, en términos de las patologías de alto riesgo de la especie objetivo. Para la selección de dichos centros era necesario disponer de información actualizada y georreferenciada de los centros productores de las especies bajo estudio, por lo que, en una primera etapa, se dispuso del "Listado de Concesiones de Acuicultura", base de datos disponible en la página web de la Subsecretaría de Pesca y que contiene los registros de concesiones, especies autorizadas y ubicación de los centros productores del país, hasta Octubre del 2001. Dado que este listado contenía información de todo el país y su formato era poco apropiado para el trabajo posterior, se seleccionó de allí sólo lo correspondiente a los centros productores de las regiones bajo estudio. Esta información se complementó y actualizó con el listado "Centros de Acuicultura de Cultivo de Moluscos", proporcionado por Departamento de Estadística de Sernapesca. Finalmente, se procedió a la búsqueda de información necesaria (dirección, teléfono, correo electrónico) para la ubicación de los centros productores. Como resultado de esta actividad se generó una base de datos ("Centros de Moluscos"), la cual ha sido actualizada durante los períodos de recolección de muestras, con la información recolectada a través de una ficha diseñada para ello (Anexo 1).

1.3.2 Georreferenciación de los Centros de Cultivo

Con la información contenida en el "Listado de Concesiones de Acuicultura", disponible en la página web de la Subsecretaría de Pesca, se creó una base datos Access cuyos principales campos son: identificador del centro, nombre empresa, R.U.T., posición geográfica (latitud y longitud) de cada vértice de concesión, especies autorizadas y superficie en hectáreas de los centros de cultivo de los moluscos de interés, ubicados en la III, IV y X Región.

Esta base datos fue ingresada al Sistema de Información Geográfica (SIG) IDRISI32. Con ella se generaron vectores (puntos y polígonos) que representan la ubicación de cada una de las concesiones de los centros de cultivo.

Con el propósito de establecer las diferentes zonas de cultivo de cada especie, se procedió a cartografiar la distribución espacial de la densidad de centros de cultivo por región y por especie.

1.3.3 Identificación de Zonas de Muestreo

Con los mapas proporcionados por el SIG, que se muestran en las figuras 1 a 7, se procedió a estratificar la población en zonas de muestreo, para cada especie. Para definir estas zonas, se consideró principalmente la variable “Accidente geográfico que determine aislamiento”. De esta forma se identificó para cada región y para cada especie, las zonas que se especifican en el Cuadro 1.

CUADRO 2: Zonas de Muestreo, por Región

ESPECIE	REGION	NOMBRE DE LA ZONA
Abalón Rojo Abalón Japonés Ostión del Norte	III	Caldera
Abalón Japonés Ostra del Pacífico	IV	Guanaqueros
Ostión del Norte	IV	Guanaqueros Tongoy
Abalón Rojo	V	Los Molles
Abalón Rojo	X	Dalcahue Chonchi
Ostra Chilena Ostra del Pacífico	X	Isla Continente

FIGURA 1: Distribución espacial de la densidad de centros de cultivo de ABALON JAPONES en la III Región.

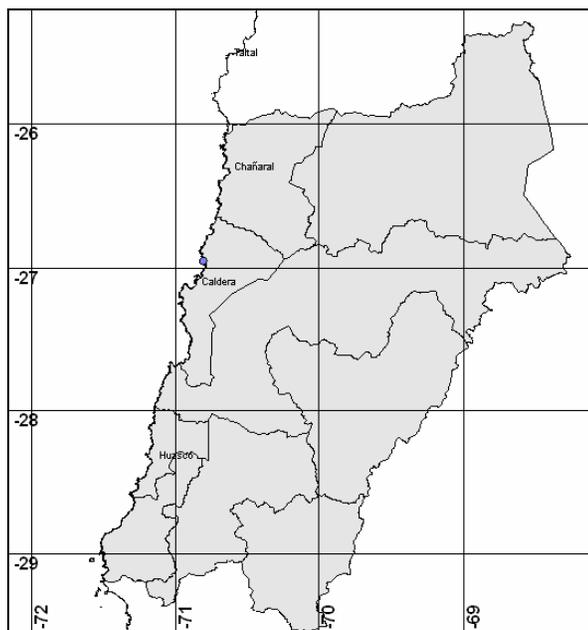


FIGURA 2: Distribución espacial de la densidad de centros de cultivo de OSTION DEL NORTE en la III Región.

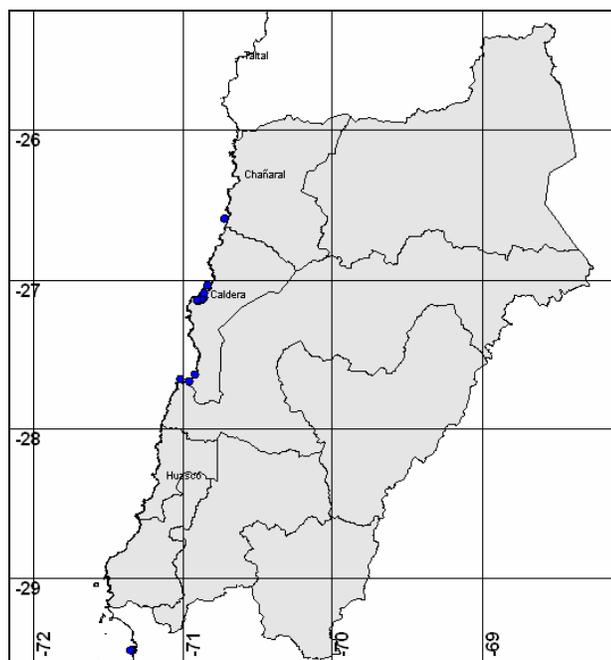


FIGURA 3: Distribución espacial de la densidad de centros de cultivo de OSTRA DEL PACIFICO en la IV Región.

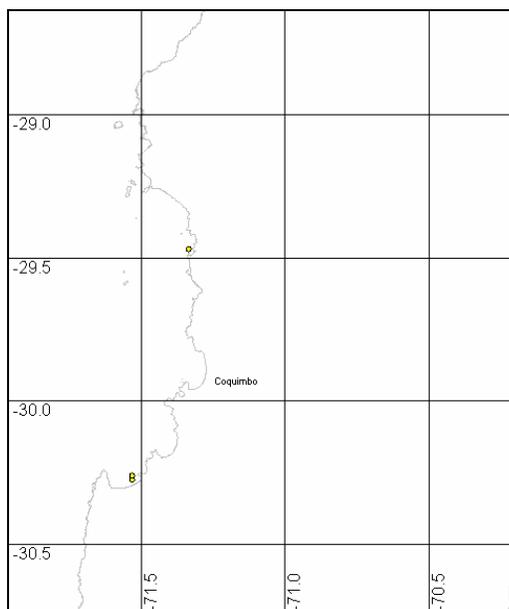


FIGURA 4: Distribución espacial de la densidad de centros de cultivo de OSTION DEL NORTE en la IV Región.

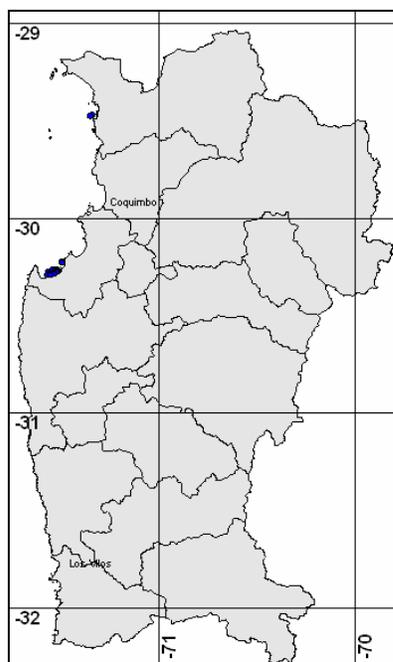


FIGURA 5: Distribución espacial de la densidad de centros de cultivo de ABALON ROJO en la X Región.

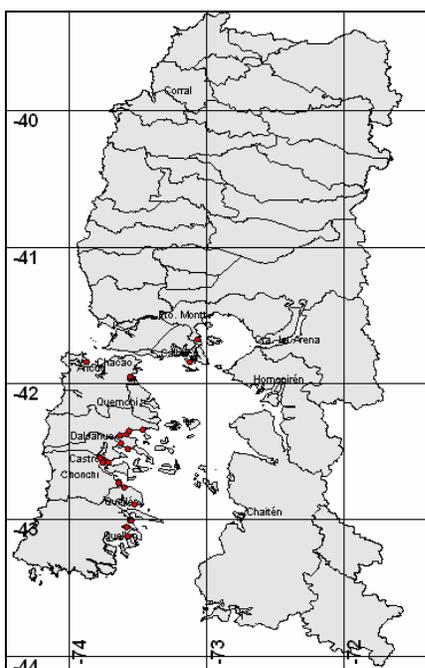


FIGURA 6: Distribución espacial de la densidad de centros de cultivo de OSTRA CHILENA en la X Región.

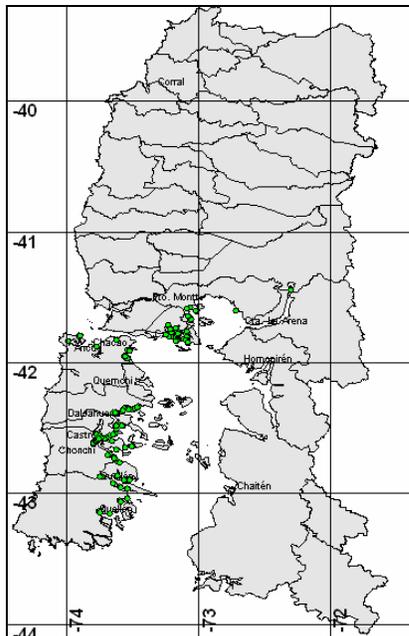
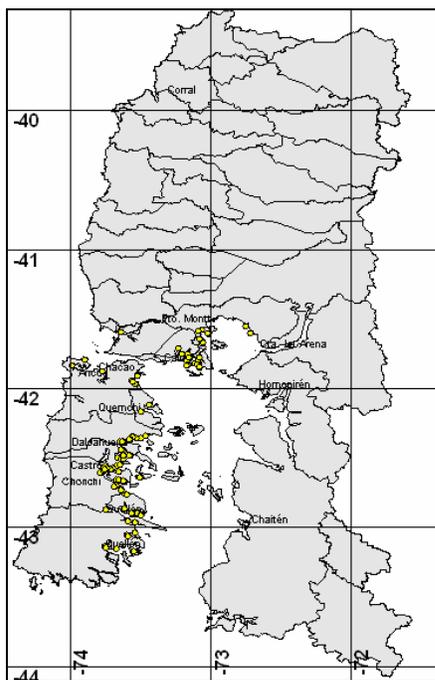


FIGURA 7: Distribución espacial de la densidad de centros de cultivo de OSTRA DEL PACIFICO en la X Región.



1.3.4 Selección de Centros

Una vez identificadas las Zonas de Muestreo, se hizo la búsqueda de formas de comunicación directa (números telefónicos, fax o correos electrónicos) de los centros ubicados en dichas zonas, a través de los sitios web www.páginasblancas.cl, www.telsur.cl y del Directorio de Acuicultura y Pesca de Chile, 2004.

Acogiendo lo establecido en el Manual OIE (2000) para maximizar las posibilidades de detectar patógenos en cada zona seleccionada, para el desarrollo del presente proyecto se consideró la selección de tres sitios de muestreo, por especie, en cada zona. Para la determinación de los puntos de muestreo, en principio, se consideró la densidad de los centros de cultivo.

1.3.5 Tamaño de la muestra

Para el cálculo del número de ejemplares a seleccionar, se consideró un porcentaje de incidencia del 7% y un nivel de confianza del 95%, lo que determinó un total de 60 especímenes, dentro de cada Zona.

De acuerdo a lo anterior, se estableció la obtención de 1800 ejemplares, distribuidos por especie y lugares de muestreo, como se explicita en el Cuadro 2

CUADRO 3: Número de ejemplares por especie y lugar de muestreo

Especie	Región	Nº de Muestreos	Nº Estimado de Zonas	Nº de ejemplares
Ostra Chilena	X	3	2	360
O. del Pacífico	IV - X	2	3	360
Abalón Rojo	III - V - X	2	4	480
Abalón Japonés	III - IV	2	2	240
Ostión del Norte	III - IV	2	3	360
TOTAL				1800

1.3.6 Sensibilización de los productores

A todos los productores que se les pudo conocer alguna forma de contacto directo (número telefónico, de fax o dirección e-mail) se les envió una carta (Anexo 2), donde se les informaba sobre el proyecto y se les solicitaba su cooperación. Terminado este proceso, el cual duró aproximadamente una semana, se procedió a contactar telefónicamente a los productores, a fin de explicarles con mayor precisión los objetivos del proyecto y las especies requeridas.

En esta etapa, aparecieron algunos problemas que incidieron en la elección de los puntos de muestreo, especialmente en la X región y específicamente para la Ostra Chilena:

- muchos de los centros contactados dijeron no producir las especies indicadas en los listados oficiales, o bien,
- las empresas ya no existían.

Con aquellos productores de las especies bajo estudio que decidieron colaborar con el proyecto, telefónicamente se concretó la donación de las muestras. Estas debieron ser retiradas en terreno una vez coordinadas las visitas con los jefes de los diferentes centros. En este momento, además, se verificó la información correspondiente al Centro, lo cual se registró en la Ficha de los Centros de Cultivo (Anexo 1)

1.3.7 Período de muestreo y frecuencias

De acuerdo a lo establecido en la formulación del proyecto, para el caso de la ostra chilena, donde se busca información del parásito tipo *Bonamia*, del cual se sabe, por estudios anteriores y por bibliografía (Hine, 1996), que tiene un ciclo anual relacionado con la época de reproducción, se determinó la realización de tres muestreos (Verano, Otoño, Invierno) durante el desarrollo del proyecto, los que se llevaron a efecto en las fechas que se muestran en los cuadros 4, 5, 6 y 7.

Debido a las dificultades a las que hubo que enfrentarse para conseguir las muestras de ostra chilena, los 60 especímenes recolectados en todos los muestreos de la Zona

Continente, y en el muestreo de Verano para la Zona Isla, provienen desde un sólo punto de muestreo, como se explicita en el Cuadro 7.

Tanto para abalones como para ostiones, donde el mayor interés es la infestación de sabélidos y polydora, cuyos ciclos están directamente relacionados con las alzas de temperatura, los muestreos se realizaron en dos oportunidades: Invierno y Verano. La misma periodicidad se utilizó para las ostras del Pacífico, donde el interés se centra en la búsqueda de patógenos en tejidos blandos.

En el muestreo de Verano, el cual se desarrolló en dos etapas: Diciembre y Enero, los centros de cultivo proporcionaron al menos 20 especímenes por centro.

Los centros muestreados, fecha de muestreo y número de ejemplares proporcionados, por especie, en cada región, se muestran en los cuadros siguientes.

CUADRO 4: Centros de Cultivo de III Región que participaron en el muestreo de Verano, por especie.

ESPECIE	FECHA DE MUESTREO		CENTRO DE CULTIVO	ZONA	TAMAÑO DE LA MUESTRA
ABALON ROJO	1ro.	30-10-2003	Compañía Pesquera Camanchaca	Caldera	70
	2do.	29-03-2004	Compañía Pesquera Camanchaca	Caldera	60
ABALON JAPONES	1ro.	16-12-2003	Vinycon Ltda.	Caldera(1)	40
		17-12-2003	Compañía Pesquera Camanchaca	Caldera(2)	60
	2do.	16-12-2003	Vinycon Ltda.	Caldera(1)	40
		17-12-2003	Compañía Pesquera Camanchaca	Caldera(2)	60
OSTION DEL NORTE	1ro.	8-01-2004	Cultivos Marinos Internacionales	Caldera	60
	2do.	22-04-2004	Cultivos Marinos Internacionales	Caldera	60

CUADRO 5: Centros de Cultivo de IV Región que participaron en el muestreo de Verano, por especie.

ESPECIE	FECHA DE MUESTREO		CENTRO DE CULTIVO	ZONA	TAMAÑO DE LA MUESTRA
ABALON JAPONES	1ro.	28-10-2003	Universidad Católica del Norte	Guanaqueros	60
	2do.	24-03-2004	Universidad Católica del Norte	Guanaqueros	60
OSTRA DEL PACIFICO	1ro.	9-12-2003	Aquanorte S.A.	Guanaqueros	30
		9-12-2003	Universidad Católica del Norte	Guanaqueros	27
	2do.	29-04-2004	Aquanorte S.A.	Guanaqueros	65
OSTION DEL NORTE	1ro.	28-01-2004	Cultivos Marinos Internacionales	Guanaqueros	59
		2-12-2003	Pesquera San José S.A.	Tongoy	60
	2do.	5-04-2004	Cultivos Marinos Internacionales	Guanaqueros	60
		4-04-2004	Pesquera San José S.A.	Tongoy	60

CUADRO 6: Centros de Cultivo de V Región que participaron en el muestreo de Verano, del Abalón Rojo.

ESPECIE	FECHA DE MUESTREO		CENTRO DE CULTIVO	ZONA	TAMAÑO DE LA MUESTRA
ABALON ROJO	1ro.	23-12-2003	South Pacific Abalone	Los Molles	40
	2do.	21-07-2004	South Pacific Abalone	Los Molles	60

CUADRO 7: Centros de Cultivo de X Región que participaron en el muestreo de Verano, por especie.

ESPECIE	FECHA DE MUESTREO	CENTRO DE CULTIVO	ZONA	TAMAÑO DE LA MUESTRA	
ABALON ROJO	1ro.	18-12-2003	Universidad Austral de Chile	Continente	10
		18-12-2003	Gran Mar S.A.	Isla	20
		18-12-2003	Enrique Cabrera	Isla	22
		18-12-2003	Campos Marinos	Isla	17
		27-01-2004	Cultivos Marinos Vilupulli	Isla	30
		29-01-2004	Carlos Rojas	Isla	20
		29-01-2004	Gustavo Rojas	Isla	39
	2do.	4-08-2004	Campos Marinos	Isla	20
		5-08-2004	Carlos Rojas	Isla	30
		5-08-2004	Gustavo Rojas	Isla	40
		5-08-2004	Cultivos Marinos Vilupulli	Isla	30
	OSTRA DEL PACIFICO	1ro.	18-12-2003	Empresa Pesquera Apiao Ltda..	Isla
17-12-2003			Julián Ruiz	Continente	33
28-01-2004			Cultivos Marinos del Pacífico	Isla	40
29-01-2004			Fundación Chiquihue	Continente	55
28-01-2004			Gustavo Rojas	Isla	32
2do.		4-08-2004	Empresa Pesquera Apiao Ltda..	Isla	40
		4-08-2004	Cultivos Marinos del Pacífico	Isla	40
		5-08-2004	Gustavo Rojas	Isla	40
		3-08-2004	Fundación Chiquihue	Continente	34

(Continuación CUADRO 7)

OSTRA CHILENA	1ro.	17-12-2003	Ostricultura Quihua	Continente	60
		18-12-2003	Ostras Hueihue	Isla	60
	2do.	20-04-2004	Ostricultura Quihua	Continente	50
		21-04-2004	Ostras Hueihue	Isla	30
		21-04-2004	Ostras Caulín	Isla	40
	3ro.	3-08-2004	Ostricultura Quihua	Continente	60
		5-08-2004	Ostras Hueihue	Isla	37
		5-08-2004	Ostras Caulín	Isla	35

1.3.8 Transporte de las Muestras

➤ ZONA NORTE

En todos los muestreos las especies fueron recolectadas desde los centros de cultivo, mantenidas en ambiente húmedo y trasladadas al Laboratorio de Histopatología de la Universidad Católica del Norte.

➤ V REGION

En el muestreo de Verano, los abalones fueron trasladados, el mismo día de su recolección, en una caja térmica con esponja humedecida con agua mar, desde Los Molles hasta el Laboratorio de Patologías Marinas de la Universidad Católica de Valparaíso (PUCV), donde se procedió a realizar el procesamiento primario. Posteriormente, se colocaron en fijador Davidson y traspasados a etanol al 70% y enviados vía terrestre al Laboratorio de Histopatología de la Universidad Católica del Norte (UCN). En el segundo muestreo, los especímenes fueron trasladados, vía terrestre, directamente desde Los Molles hasta el Laboratorio de Histopatología de la UCN.

➤ X REGION

Todos los individuos fueron recolectados directamente desde los centro de cultivo, donde se procedió según la especie.

Ostra Chilena

Las muestras fueron envueltas en esponja humedecida con agua de mar y embaladas en cajas térmicas a las cuales se les colocó hielo con el fin de mantenerlas vivas. Así fueron enviadas por transporte terrestre al Laboratorio de Patologías Marinas de la PUCV, donde luego de constatar su condición, se procedió a realizar el procesamiento primario.

Ostra del Pacífico

En el muestreo de Verano, que se desarrolló en dos etapas, el transporte de las muestras fue diferente para cada etapa:

- **Diciembre:** Una vez embaladas, las muestras se enviaron vía terrestre al Laboratorio de Patologías Marinas de la UCV, donde fueron colocadas en estanques de mantención en el Hatchery para luego realizarles el procesamiento primario. Posterior a esto, los tejidos ya fijados se enviaron, por transporte terrestre, al Laboratorio de Histopatología de la UCN para la obtención de los cortes histológicos.
- **Enero:** El procesamiento primario fue realizado en terreno. Las muestras ya fijadas se transportaron vía terrestre al Laboratorio de Histopatología de la UCN para la obtención de los cortes histológicos.

En el muestreo de Invierno se procedió de la misma forma que en la etapa de Enero.

Abalón Rojo

Al igual que en el caso de la Ostra del Pacífico, el muestreo de Verano se desarrolló en dos etapas (Diciembre-Enero). En ambas, las muestras recolectadas en los centros de cultivo fueron envueltas en esponja humedecida con agua de mar y embaladas en cajas térmicas a las cuales se les colocó hielo con el fin de mantenerlas vivas.

- **Diciembre:** Los especímenes embalados se enviaron vía terrestre al Laboratorio de Histopatología de la UCN.
- **Enero:** El procesamiento primario fue realizado en terreno. Las muestras ya fijadas se transportaron vía terrestre al Laboratorio de Histopatología de la UCN. Las valvas, previa identificación, se mantuvieron en ambiente húmedo para luego transportarlas, por tierra, hasta el Laboratorio de Patologías Marinas de la

PUCV, donde luego de mantenerlas en el Hatchery por 24 horas, se enviaron, debidamente embaladas e identificadas a la UCN para los análisis parasitológicos.

En el muestreo de Invierno se procedió de la misma forma que en la etapa de Enero.

1.3.9 Procesamiento Primario de las muestras

Los ejemplares obtenidos, previa rotulación para identificar su origen, número de muestreo, especie y número de individuo de la muestra, se procesaron dentro de las veinticuatro horas siguientes al muestreo.

Se hizo una búsqueda de cualquier anomalía o lesión de los tejidos, así como de cualquier deformación de la concha, organismos perforadores de la valva y los habitantes sobresalientes del manto. La presencia de alguna de estas anomalías se registró en la Ficha de las Muestras, (Anexo 3), especialmente diseñada para ello. En esta ficha también se registró la longitud de la concha o valvas, según corresponda.

Los moluscos se abrieron cuidando de no dañar los tejidos blandos, en particular, manto, branquias, corazón y glándula digestiva.

Se realizó un corte transversal a la altura de la glándula digestiva. El corte incluyó tejidos de glándula digestiva, manto y branquias, los cuales fueron depositados en estuches histológicos o cassettes, se rotularon y se colocaron en un recipiente que contenía solución de Davidson, donde se mantuvieron por un período de 24 horas. Una vez eliminado el fijador, se reemplazó con etanol al 70% donde se mantuvieron hasta el momento de su procesamiento mediante técnicas histológicas.

1.3.10 Catastros

Para la obtención específica de información relacionada con los catastros de patógenos de interés, se procedió de la siguiente manera:

1.3.10.1 Catastro de parásitos en tejidos blandos

Para la identificación de los parásitos putativos de alto riesgo en los tejidos blandos, se utilizó la técnica histológica estándar, recomendada en el Manual OIE (2000), reconocida herramienta de diagnóstico para realizar estudios generales.

Los tejidos se fijaron en solución de Davidson por un período máximo de 24 horas. Luego, los tejidos se transfirieron a etanol al 70%, se deshidrataron en etanol de graduación creciente, se aclararon en Xilol y se incluyeron en Paraplast. Se realizaron cortes de 5 µm, los cuales se tiñeron con hematoxilina-eosina (H&E)

Se procedió a la revisión cuidadosa de las preparaciones histológicas, poniendo especial atención en la glándula digestiva, nefridio y branquias. Se registró el sexo de aquellos individuos que presentaban algún desarrollo gamético.

Adicionalmente, de cada espécimen obtenido en los muestreos de la X Región, se extrajo un trozo de tejido para utilizarlo como réplica para estudios posteriores. Estos tejidos se conservaron en alcohol al 70%.

1.3.10.2 Catastro de Poliquetos, *Polydora* sp. y Sabélidos en ostiones y abalones

Para determinar la prevalencia o intensidad de la infestación, los organismos de la muestra fueron desconchados y las conchas se trasladaron en recipientes herméticos, individuales cuidando de mantener la humedad, hasta el Laboratorio de Histopalogía de la UCN.

Los ostiones y abalones muestreados fueron disectados para la remoción de sus partes blandas, y las conchas mantenidas en agua de mar fresca hasta su revisión.

Se procedió a colocar las conchas en una solución vermífuga donde permanecieron por un período de aproximadamente 3 horas a una temperatura de 15°C.

Las conchas de abalones y ostiones fueron fracturadas con un alicate y los gusanos fueron extraídos cuidadosamente con la ayuda de pinzas y agujas especiales. Los individuos removidos fueron mantenidos en cápsulas de petri con agua de mar microfiltrada hasta su identificación. La presencia de poliquetos y de las perforaciones ocasionadas por éstos fue examinada bajo una lupa estereoscópica.

Los poliquetos obtenidos fueron anestesiados con Cloruro de Magnesio isotónico preparado con agua de mar, montados sobre portaobjetos y observados bajo microscopio

óptico. La identificación de los poliquetos se basó en las siguientes características morfológicas: forma del prostomio y pigidio, presencia y número de ojos, patrones de pigmentación, distribución de las branquias y presencia de espinas modificadas.

Escala de intensidad de la infestación

Para determinar la intensidad de infestación en las valvas de los ostiones, se procedió a clasificarlos según el daño ocasionado por los poliquetos, en cinco categorías sugeridas por Basilio (1991), las cuales se relacionan con el aspecto macroscópico de las conchas en análisis y son:

Categoría 0: Ausencia de poliquetos pertenecientes al complejo polidórico y perforaciones en la superficie de la concha.

Categoría 1: Presencia de orificios en la superficie de la concha causados por poliquetos del complejo polidórico.

Categoría 2: Presencia de orificios en la superficie de la concha causados por poliquetos del complejo polidórico y presencia de manchas.

Categoría 3: Concha carcomida por efecto de orificios causados por gusanos del complejo polidórico.

Categoría 4: Concha descalcificada (traslúcida) por efecto de la presencia de orificios causados por poliquetos del complejo polidórico.

Categoría 5: Concha perforada por efecto de orificios causados por gusanos del complejo polidórico.

1.3.10.3 Catastro de *Bonamia* sp. en *O. chilensis*

Con este fin se aplicaron las siguientes técnicas de diagnóstico:

- **Tinción Hemacolor de Hemolinfa**

Se procedió a extraer hemolinfa desde la cavidad cardíaca, utilizando una jeringa de tuberculina. Los frotis obtenidos fueron secados al aire, fijados en metanol y teñidos con el kit hemacolor (Merck).

- **Tinción de Impresiones de Corazón**

Se extrajo el corazón y se imprimieron huellas en un portaobjeto; se dejaron secar al aire, se fijaron en metanol y se procedió a teñir con el kit hemacolor (Merck).

- **Histología:**

Para detectar la presencia de *Bonamia* y, a su vez, contrastar la tinción H&E, tradicionalmente utilizada para la histología, con la tinción de Gomori, en los muestreos de Verano y Otoño, se duplicó los tejidos fijados de las ostras. De acuerdo a esto, se realizaron 480 observaciones correspondiente a muestras provenientes de 120 ostras del muestreo de Verano y 120 del muestreo de Otoño.

En aquellos casos en que se detectó presencia de *Bonamia*, se cuantificó la intensidad de la infección utilizando la siguiente escala de intensidad propuesta por Hine (1991a).

Escala de Intensidad de la Infestación

Grado 1: Se observan muy pocas células *Bonamia* sp. (<10) después de una búsqueda intensiva en todos los tejidos, sin observar daños.

Grado 2: Se observan 1 a 2 *Bonamia* en cada hemocito infectado y no se encuentran signos asociados a daños en los tejidos.

Grado 3: La *Bonamia* se encuentra ampliamente diseminada, observándose sólo de 1 a 5 protozoos por hemocito infectado. Se presentan cambios histopatológicos leves.

Grado 4: Se observa *Bonamia* en todos los tejidos; frecuentemente se asocia a una hemocitosis. Las ostras que se encuentran en esta clasificación se consideran enfermas.

Grado 5: Abundancia de *Bonamia* en todos los tejidos (<16/hemocito). Con frecuencia se observa al protozoo extracelularmente. Además, se presenta hemocitosis y lesiones en los tejidos. Las ostras que se encuentran en esta clasificación se consideran moribundas.

Los resultados se registraron en fichas diseñadas para este propósito.

- **Análisis Molecular**

Con la finalidad de detectar el parásito tipo *Bonamia* desde ostra chilena en las localidades en estudio, se desarrolló el método de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los procedimientos descritos por Cochenec *et al.*, 2001.

Extracción de ADN

Se obtuvo el ADN de 120 muestras de ostra chilena. La extracción del ADN se realizó a partir de tejido branquial de la totalidad de las ostras colectadas en el muestreo de Verano. Los tejidos fueron suspendidos en 10 volúmenes del tampón de extracción (100 mM NaCl, 25 mM EDTA pH 8, 0,5% SDS) con proteinasa K (100 µg/ml). Después de una incubación durante la noche a 56°C, se extrajo el ADN genómico usando un protocolo de extracción de fenol/cloroformo seguido de precipitación con etanol (Sambrook *et al.* 1989), diluyendo a una concentración final de 50-100 ng/µL.

Reacción de PCR

La amplificación del ADN se realizó utilizando los partidores Bo-Boas, que amplifican un fragmento de 304 pares de bases de la región genómica que codifica la pequeña unidad ribosomal del parásito, Cuadro 8.

CUADRO 8: Descripción de los partidores utilizados para el segmento ribosomal del parásito *Bonamia sp.* (Cochenecc *et al.*, 2000).

PARTIDOR	SECUENCIA (5'→3')	TAMAÑO (Pb)
Bo	CATTTAATTGGTCGGGCCGC	304
Boas	GGGGGATCGAAGACGATCAG	
Cs1	CCTTTGTACACACCGCCCGT	1325
Cas1	GTAACGGGGAATCAGGGTTCG	

La reacción de PCR fue realizada en un volumen total de 50 µL, conteniendo cada microtubo 10 ng de ADN, 5µL de tampón de PCR 10X, 5µL de dNTP 2mM, 0,5µL de cada partidor y 0,5µL de *Taq* DNA polimerasa (Promega, Francia).

Las muestras eran desnaturalizadas durante 5 minutos a 94 °C seguido por 30 ciclos de amplificación de 1 minuto a 94 °C para desnaturalización, 1 minuto a 55 °C para complementación de bases y 1 minuto a 72 °C para elongación. Se realizó un último ciclo de elongación a 72 °C durante 10 minutos, para asegurar la completa polimerización del ADN. Todas estas reacciones fueron realizadas en un Termociclador Appligene.

La visualización de los productos obtenidos de la PCR fue realizada por electroforesis en gel de agarosa al 1,5%.

- **Análisis Ultraestructural**

Para realizar el estudio ultraestructural de *Bonamia sp.* se utilizó microscopía electrónica de transmisión (MET). Se hizo un primer muestreo a fines de diciembre de 2003, un segundo muestreo en mayo de 2004, y un tercer muestreo en agosto de 2004. Se cortaron trozos de no más de 1mm³ de glándula digestiva, corazón y branquias. Estos se fijaron en glutaraldehído al 2.5% en agua de mar filtrada a 0.22µm, por 1 a 2 horas a 4°C. Posteriormente se lavó tres veces en agua de mar filtrada a 0.22µm., se

postfijó en osmio reducido (ferrocianuro de potasio al 3% en una mezcla 1:1 con tetróxido de osmio al 2%) por dos horas. Se lavó dos veces con agua de mar, y una vez con agua destilada, tiñendo en bloque con acetato de uranilo al 2% por 1 hora (Hine, 1991). Se deshidrató en etanol, acetona, e incluyó en Epon 812 (Pelco). Se realizaron cortes semi-finos, los que fueron teñidos con azul de toluidina. Se realizaron cortes ultrafinos de aquellos bloques en que se detectó el parásito, los que fueron observados y fotografiados en un microscopio electrónico Zeiss EM 900, a 50kV.

Este estudio se realizó en el Laboratorio de Microscopía Electrónica de la Universidad de Valparaíso.

- **Caracterización Taxonómica**

Para dar cumplimiento a este punto fue necesario previamente comprobar la presencia del parásito *Bonamia-like*. Una vez establecida la presencia de una parasitosis intrahemocítica en las muestras analizadas, se tomó contacto con el Dr. Franck Berthe del Laboratorio IFREMER, La Tremblade, Francia, lo cual permitió la realización de una pasantía a dicho centro durante el período del 28 de Abril al 19 de Mayo. El objetivo de la pasantía fue lograr la identificación, usando métodos moleculares, del parásito encontrado por medio de técnicas histológicas en tejidos de ostra chilena. El protozoo detectado tiene semejanza con parásitos del género *Bonamia*, causante de infección por *Bonamia* sp., enfermedad considerada de declaración obligatoria por la OIE.

Las muestras a caracterizar taxonómicamente fueron obtenidas desde ostras de la X Región, durante el mes de Diciembre del año 2003 y se transportaron para análisis desde el laboratorio de Valparaíso hasta La Tremblade, Francia. Estas muestras consistían en trozos de tejido de branquia de ostra chilena suspendidos en alcohol 70%.

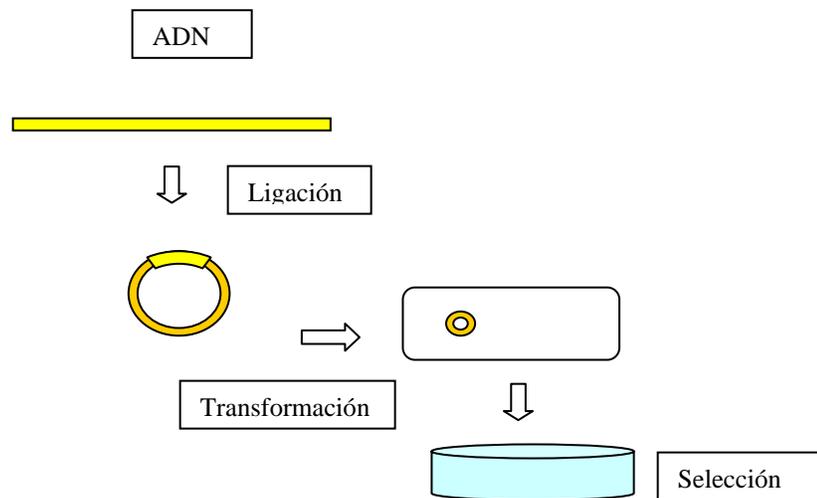
Clonación

La clonación de genes es una técnica muy usada cuando es necesario producir grandes cantidades de material genético destinado a ser secuenciado. La clonación implica cuatro pasos principales:

- 1) *el aislamiento y selección de fragmentos* del ADN de interés y su incorporación en un vector de clonación, empleando enzimas capaces de cortar y reunir las moléculas de ADN (endonucleasa de restricción y ligasa);
- 2) *la transformación genética* es la incorporación del ADN en un organismo receptor que sea capaz realizar la replicación del vector de clonación;
- 3) *la detección* de las células transformadas que contienen el ADN y el aislamiento de un cultivo puro y
- 4) *la producción* de grandes cantidades de células que contengan el fragmento clonado para el aislamiento y el estudio del ADN del clon.

En la figura 8 presentamos un resumen esquematizado de las principales etapas que componen el proceso de clonación de un fragmento de ADN.

FIGURA 8: Esquema de las principales etapas del proceso de clonación



En el caso específico del ADN del parásito tipo *Bonamia* encontrado en las ostras de la X Región, este procedimiento fue realizado en el Laboratorio de Referencia en Francia (Laboratorio de Patología y Genética perteneciente a IFREMER, Francia).

1) Aislamiento y selección de fragmentos del ADN

1.1 Aislamiento

Se realizó la extracción del ADN, la PCR y la posterior visualización del producto generado por la PCR de la siguiente manera:

- Digestión de los tejidos positivos a la presencia del parásito, predeterminados por histología. Los tejidos fueron suspendidos en 10 volúmenes del tampón de extracción (100 mM NaCl, 25 mM EDTA pH 8, 0,5% SDS) con proteinasa K (100 µg/ml).
- Extracción de ADN total usando kit QIAamp DNA mini kit, siguiendo las instrucciones del fabricante.
- Amplificación del ADN usando los partidores universales Cs1-Cas2, con la finalidad de evaluar el resultado de la extracción mediante la visualización del fragmento amplificado en gel de agarosa.
- Amplificación del ADN usando los partidores específicos Bo-Boas, comprobando la presencia del fragmento específico del parásito.
- Visualización de los productos obtenidos por PCR, por electroforesis en gel de agarosa al 1,5%

Una vez efectuados estos procedimientos, se seleccionaron tres muestras de ADN, extraído de los tejidos infectados con el parásito a identificar, ya que resultaron en un producto de PCR con una banda intensa, específica al género *Bonamia* y sin subproductos, de manera que los procedimientos posteriores tales como el clonaje y la secuenciación de estos productos proporcionarían los mejores resultados posibles.

1.2 Selección de los fragmentos

Con la finalidad de comparar el genoma del parásito encontrado en las ostras chilenas con las secuencias genómicas de los parásitos conocidos del tipo *Bonamia*, registrados en el Banco de datos GENE BANK, se ha secuenciado el fragmento de ADN correspondiente al segmento 18S e ITS-1 del parásito. Para esto, previamente se amplificaron y clonaron los fragmentos de interés. Con este propósito se

utilizaron diferentes combinaciones de partidores y se realizaron los siguientes procedimientos:

- Selección de las muestras que presentaron mejor amplificación por PCR en los procedimientos preliminares
- Amplificación del ADN de las muestras seleccionadas, usando los partidores específicos Suni-Boas, Bos2-Cas2 y Sbo-Ra58 para obtener el segmento completo de la subunidad ribosomal 18S e ITS-1
- Visualización de los productos obtenidos por electroforesis en gel de agarosa al 1,5%

2) Transformación genética

Es el procedimiento por el cual se incorpora el fragmento genómico deseado unido a un vector, en este caso un plasmidio, a una bacteria. Este procedimiento fue realizado usando kit TA Topo vector de la siguiente manera:

- Ligación de los múltiples productos de PCR al vector, con una DNA ligasa
- Transformación, el plasmidio que transporta el fragmento es reintroducido en la bacteria

3) Detección de las células transformadas

- Siembra en medio selectivo. LB sólido con ampicilina y X-gal
- Después del crecimiento de las colonias durante 24 horas, se seleccionaron las colonias que pueden contener el plasmidio recombinante
- Las colonias seleccionadas fueron sembradas en medio de crecimiento LB con Ampicilina
- Extracción de ADN de los clones usando kit *QIAamp DNA mini kit*
- Amplificación del ADN usando los partidores universales Cs1-Cas2
- Amplificación del ADN usando los partidores específicos Bo-Boas
- Visualización de los productos obtenidos por PCR por electroforesis en gel de agarosa al 1,5%

Posteriormente se realizó el secuenciamento parcial de la muestra del parásito a partir de los clones positivos, es decir que contienen los fragmentos deseados.

Análisis de las secuencias

Se ha buscado información de secuencias equivalentes en el banco de datos GENE BANK por medio del programa BLAST, programa establecido para encontrar homología con las secuencias almacenadas en el banco de datos (www.ncbi.nlm.nih.gov).

Las secuencias han sido alineadas utilizando el programa de búsqueda de Altschul, *et al.*, 1997.

1.4. RESULTADOS OBTENIDOS

1.4.1 Catastro de parásitos en tejidos blandos

1.4.1.1 Abalón japonés

Se realizó el análisis histológico de 320 especímenes provenientes de las zonas en estudio.

El análisis mediante esta técnica no detectó parásitos o posibles agentes patógenos ni organismos tipo Rickettsiales en glándula digestiva ni en otros tejidos. Sin embargo, se observa un aumento de un tipo de hemocito en nefridios (FOTO N°1) en 21 abalones de la muestra; además, se observa infiltración de branquias y glándula digestiva en dos de ellos.

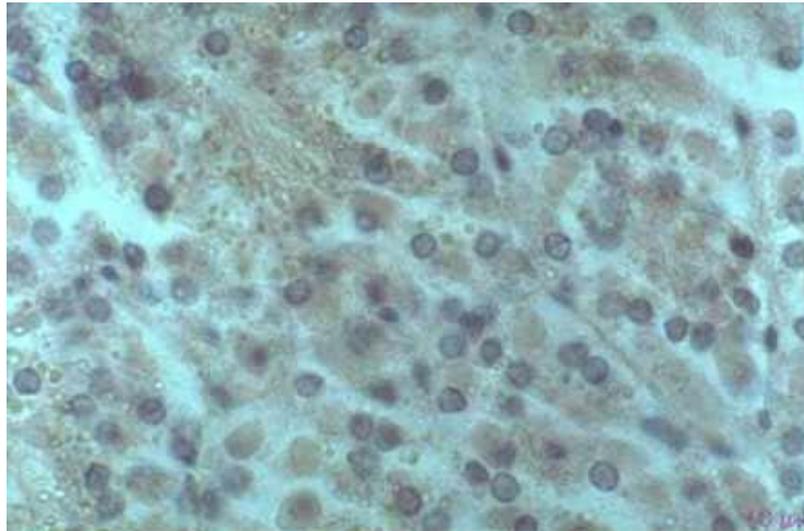


FOTO N°1: Infiltración Nefridio en Abalón Japonés

Este aumento de hemocitos es indicio de algún tipo de problema; sin embargo, no fue posible detectar ningún tipo de parásito que tuviese relación con la condición.

Otra de las anomalías observadas fue la desorganización de la glándula digestiva en 8 abalones de la muestra, lo que consiste en túbulos digestivos "desarmados" y/o epitelio parcialmente desprendido en el borde de la glándula digestiva. Además, se detectó un pequeño tumor en el borde de la glándula digestiva en uno de los ejemplares de la muestra.

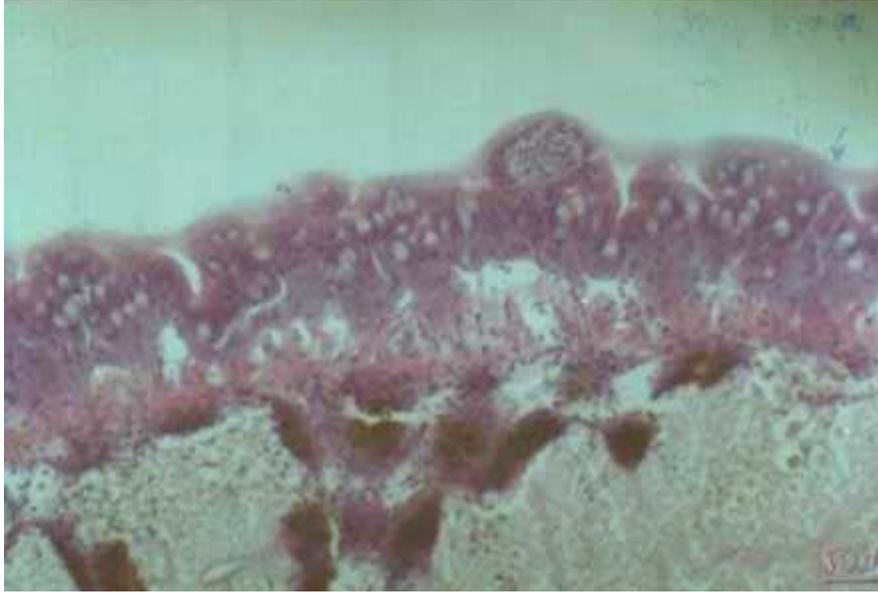


FOTO N°2: Tumor en Glándula Digestiva de Abalón Japonés

1.4.1.2 Ostión del Norte

El análisis histológico de los 120 ejemplares provenientes desde un centro de cultivo de la zona de Caldera, III Región, 60 de ellos obtenidos en el muestreo de Verano y 60 en el muestreo de Invierno, proporcionó los resultados que se muestran en el cuadro 9.

CUADRO 9: Patologías detectadas en muestras, III Región

PATOLOGIAS	1er. Muestreo (100%=60)	2do. Muestreo (100%=60)
RLO	0%	3%
Granulomas	0%	0%
Infiltraciones branquiales	13%	8%
Infiltraciones glandulares.	7%	3%
Concrescencia Nefridio	50%	68%

Para los 239 ejemplares provenientes de la IV Región, 120 de la Zona de Tongoy y 119 de la Zona de Guanaqueros, el análisis histológico proporcionó los resultados que se muestran en el cuadro 10.

CUADRO 10: Patologías detectadas en muestras, IV Región

PATOLOGIAS	1er. Muestreo		2do. Muestreo	
	Tongoy (100%=60)	Guanaqueros (100%=59)	Tongoy (100%=60)	Guanaqueros (100%=60)
RLO	0%	8%	0%	10%
Trichodina	17%	0%	79%	0%
Granulomas	11%	0%	11%	0%
Infiltraciones branquiales	20%	5%	7%	0%
Infiltraciones glandulares	8%	2%	13%	0%
Concrescencia Nefridio	47%	41%	40%	50%

La FOTO N°3 muestra un tejido de manto con presencia de granulomas.

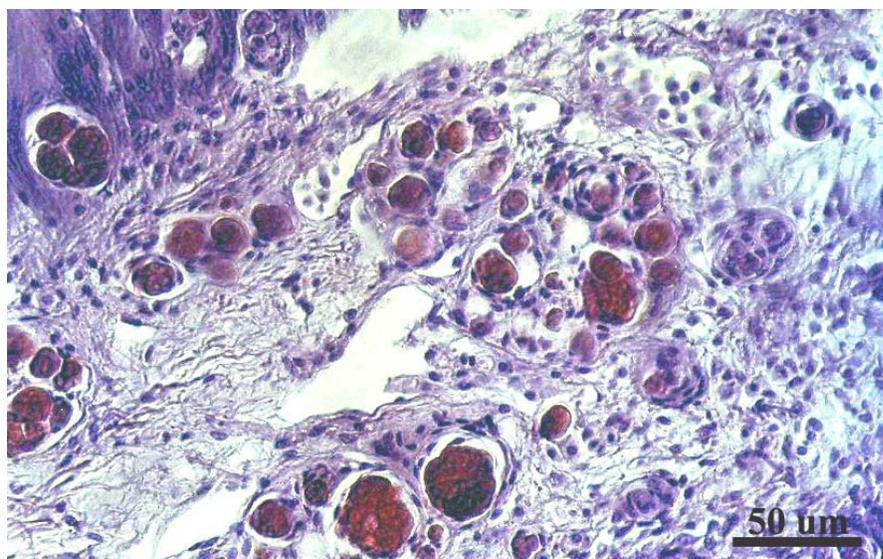


FOTO N°3: Granulomas en tejido de manto de Ostión del Norte

Durante la revisión de las muestras, se puso especial cuidado en el análisis de la glándula digestiva, nefridio, branquia y manto.

La presencia de bacterias tipo Rickettsiales, parásitos intracelulares que forman inclusiones basofílicas en el citoplasma de las células de los túbulos digestivos, es una condición que se encontró en muy baja intensidad (FOTO N°4).

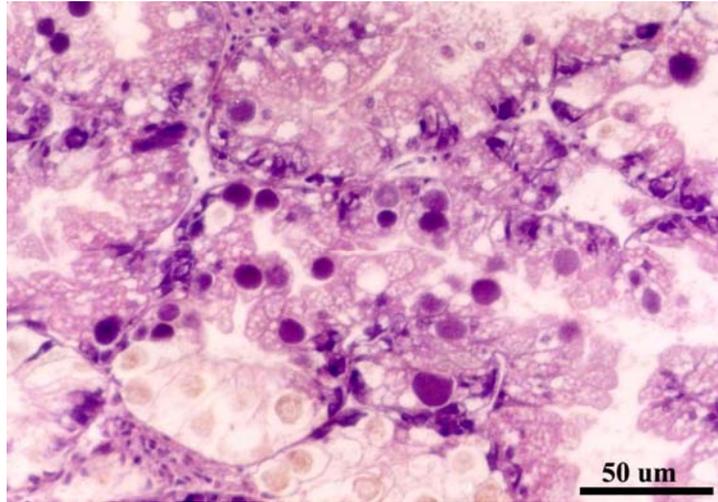


FOTO N°4: Inclusiones basofílicas en tubo digestivo de Ostión del Norte

Por otra parte, se detectó la presencia de concrecencia en el nefridio en un alto porcentaje de los ostiones de la muestra. Estas están formadas por carbonato de calcio y parecen ser una manera de excretar el exceso de éste (Lohrmann y Cruz, 2003).

También se detectó la presencia de *Trichodina* en las branquias en una gran cantidad de ejemplares provenientes de la Zona de Tongoy. Este protozoo ciliado no es un parásito, no obstante, puede provocar un problema en los bivalvos cuando se encuentra en grandes concentraciones, lo cual suele ocurrir en aguas de pobre calidad (Boussaid *et al.*, 1999; Lohrmann *et al.*, 2002).

La presencia de granulomas o nódulos es una condición que se presenta en los ostiones en la zona de Tongoy a lo largo del año, a pesar de los estudios realizados para determinar la causa, no ha sido posible aún asociarlo a patógenos, permaneciendo su origen incierto. (Campalans *et al.*, 1997, Gonzalez *et al.*, 1999, Herrera, 2000 y Lohrman *et al.*, 2003)

1.4.1.3 Abalón Rojo

Se analizaron 261 individuos correspondientes al muestreo de Verano de todas las regiones en estudio. En 34 de ellos, todos provenientes de la X Región. Zona Chonchi, se detectó presencia de RLO.

De los 239 individuos analizados correspondientes a la muestra de Invierno, 49 presentaron RLO, 31 de ellos provenientes de la Zona Chonchi y 18 de la Zona Dalcahue, X Región.

La FOTO N°5 muestra tejidos de la glándula digestiva infectados con RLO

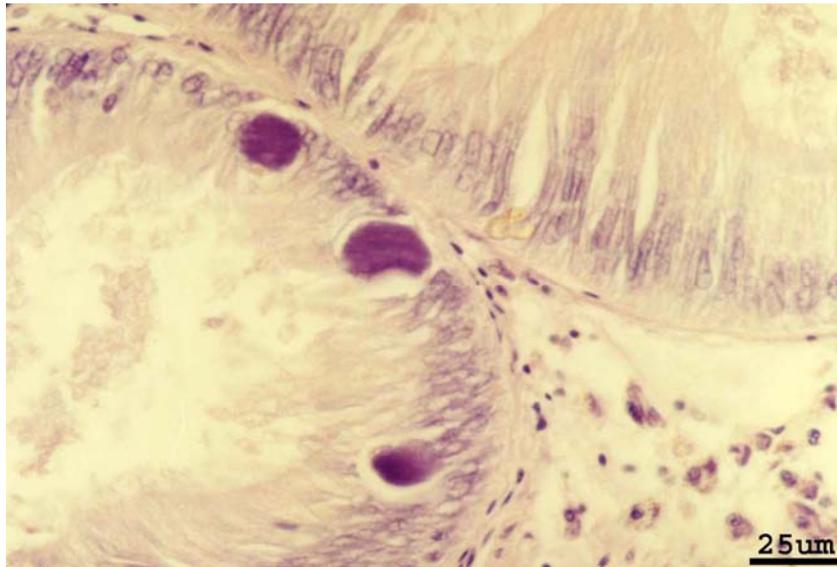


FOTO N°5: RLO en Glándula Digestiva de Abalón Rojo

1.4.1.4 Ostra del Pacífico

Se analizaron 247 individuos correspondiente al muestreo de Verano, 190 provenientes de la X Región y 57 de la IV Región. De los 88 ejemplares proveniente de la zona Continente de la X Región, en 8 se detectó la presencia de inclusiones basofílicas en las células epiteliales de los túbulos de la glándula digestiva (FOTO N°6). Esto también fue detectado en 9 de los individuos provenientes de la IV Región. En ambos casos correspondió a individuos de 5 años de edad, lo que estaría indicando que esta condición se asocia a individuos adultos (reproductores).

En el análisis histológico de los 219 individuos obtenidos en el muestreo de Invierno, no se detectó esta condición, probablemente debido a que las muestras no incluyeron reproductores.

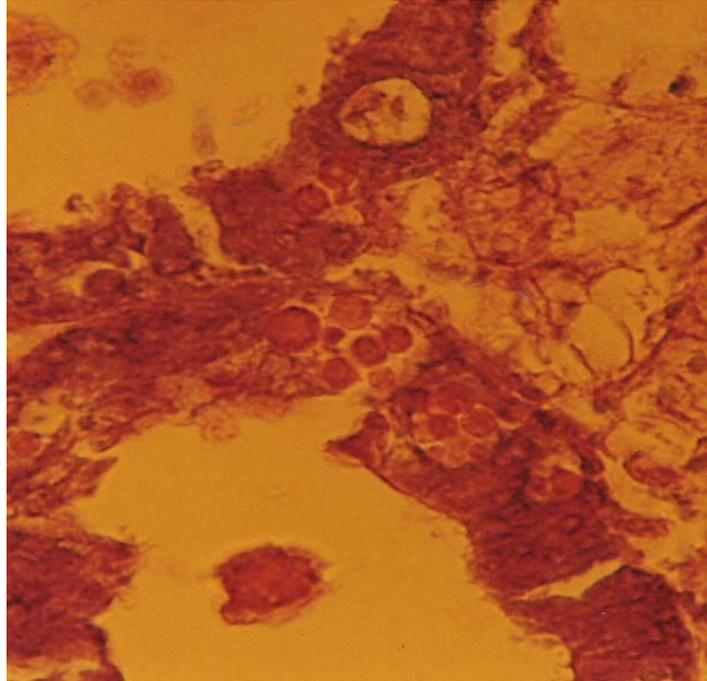


FOTO N°6: Inclusiones basofílicas en túbulos de la Glándula Digestiva de Ostra del Pacífico.

Otra condición detectada corresponde a la observación de microorganismos del tipo microsporidios (Foto 7) en los ovocitos de las hembras de *Crassostrea gigas*. Esta condición fue detectada en todas las zonas en estudio y en ambos periodos de muestreo. La intensidad de infección observada si bien fue constante, fue más bien baja, detectándose un promedio de una inclusión por ovocito y tres ovocitos afectados por individuo de la muestra.

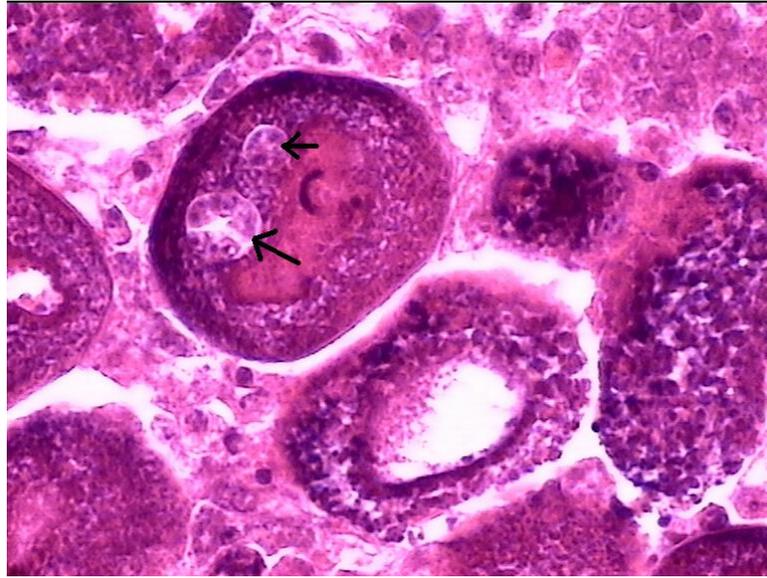


FOTO 7: Microorganismos tipo microsporidio en ovocitos de *Crassostrea gigas* (H&E).

1.4.1.5 Ostra Chilena

La observación de los tejidos de ostra chilena ha permitido registrar condiciones histopatológicas y anomalías que no representan, hasta el momento, enfermedades de alto riesgo para la producción.

- **Neoplasia:**

En el muestreo de Verano, esta condición fue detectada en 3 ostras, procedentes de la zona Isla, de 60 individuos analizados. En uno de ellos se presentó en una alta intensidad, con presencia de la condición en todos los tejidos observados. (FOTO N°8). La neoplasia fue detectada también en frotis de hemolinfa del mismo individuo (FOTO N°9).

En el muestreo de Otoño, esta condición se presentó principalmente en individuos provenientes de la zona Continente (13 de los 60 observados), detectándose sólo en uno de los 60 ejemplares analizados de la zona Isla.

En el muestreo de invierno, esta anomalía se presentó en 4 de los 60 ejemplares de la zona Continente y en 3 de los 70 provenientes de la zona Isla

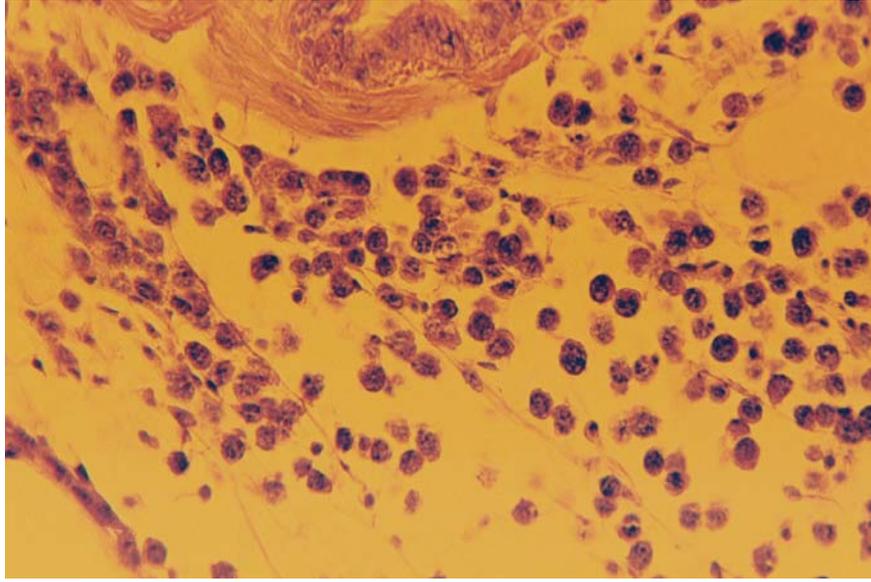


FOTO 8: Neoplasia hemocítica en Ostra chilena (H&E)

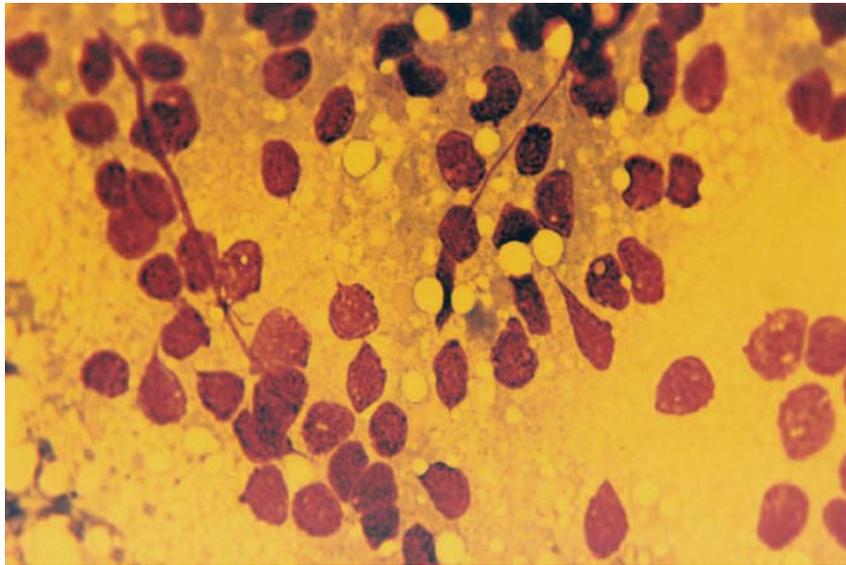


FOTO 9: Neoplasia en impresión de corazón de Ostra chilena, (Hemacolor).

La neoplasia observada es del tipo hemocítica y se caracteriza por presentar una gran proliferación de células mitóticamente activas. Dichas células presentan un núcleo que tiene el doble de tamaño (7 a 8 μ) que un hemocito normal (4 a 5 μ) y escaso o nulo citoplasma.

- **Presencia de Metazoos:**

Se observan dos tipos de metazoos en las muestras de verano de las ostras provenientes de las dos zonas en estudio. La prevalencia fue la misma para ambas zonas (4/60), con mayor incidencia del parásito en la zona de Ancud (6 trematodos en total).

A partir del análisis visual, los parásitos parecen ser los mismos en 7 de las ostras huéspedes (FOTO N°10), en tanto que un segundo tipo parece pertenecer a otra especie (FOTO N°11), éste se presenta sólo en una ostra proveniente de la zona de Ancud.

Los parásitos se localizan en el tejido del manto y glándula digestiva interno, aparentemente no parecen estar causando daño. Se esperaría una reacción de defensa del huésped como por ejemplo la encapsulación, donde el parásito es rodeado por hemocitos. Se espera obtener mayor información sobre metazoos que utilicen a la ostra como huésped primario para describir al parásito detectado.

Estos organismos parásitos no fueron observados en muestras de otoño ni invierno.



FOTO 10: Metazoo tipo 1 localizado en glándula digestiva de ostra chilena, zona Ancud (H&E).

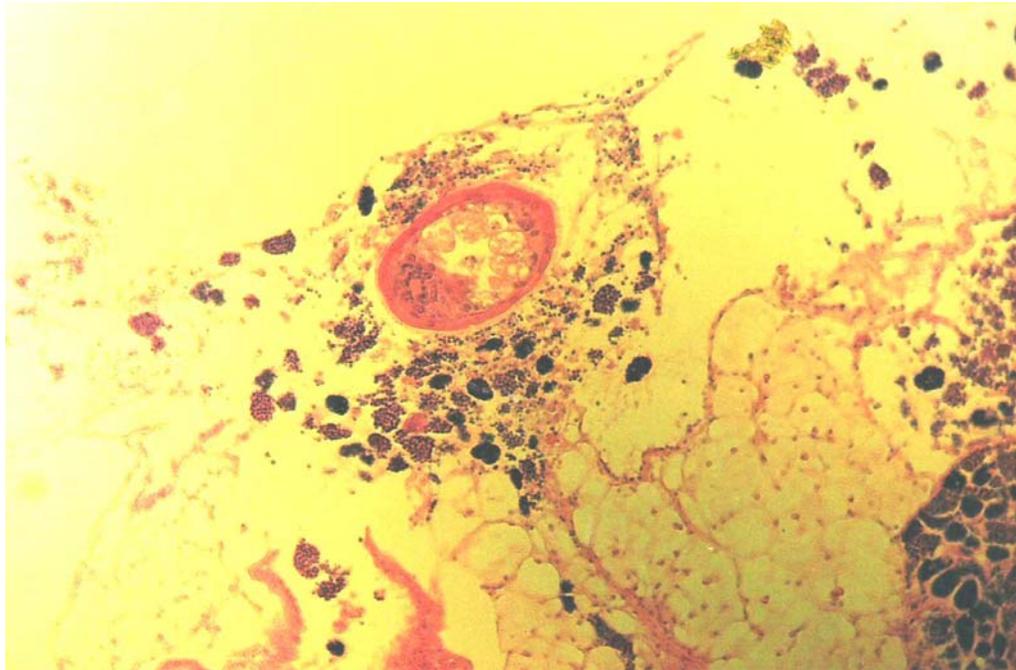


FOTO 11: Metazoo tipo 2 localizado en tejido gonadal de ostra chilena, zona Ancud

- **Infiltración Hemocítica:**

Se observa esta condición en muestras de ostras provenientes de ambas zonas. La infiltración se observó en tejido conectivo y, en algunos casos, se encuentra asociada a daño en la estructura celular.

Hasta este momento, no ha sido posible asociar esta condición a microorganismos patógenos en los casos observados en las ostras provenientes de las zonas Isla (3 casos) y Continente (2 casos).

La condición también se observó en las muestras de otoño e invierno en una frecuencia mayor, posiblemente asociada a la condición post-desove (otoño).

1.4.2 Catastro de Poliquetos, Polidora sp. y Sabélidos en ostiones y abalones

1.4.2.1 Abalón japonés

Los resultados obtenidos en el primer y segundo muestreo indican que existe una alta variación en el grado de infestación de los abalones analizados, diferencias que se manifestaron en todos los centros de cultivo muestreados.

En el primer muestreo los abalones provenientes del cultivo de la zona de Caldera(1) presentaron un alto grado de infestación, aunque existió una alta variación dentro de la muestra analizada reflejada en la alta desviación estándar registrada (Cuadro 11). Esta tendencia también se presentó en los ejemplares provenientes de la zona Caldera(2), pero con un grado de infestación menor al 50% con respecto a Caldera(1). Los abalones provenientes de la zona de Guanaqueros presentaron un bajo grado de infestación.

CUADRO 11: Longitud promedio de la concha de abalón japonés (*Haliotis discus hannai*), en las zonas de estudio en ambos muestreos.

LONGITUD	GUANAQUEROS	CALDERA
Primer muestreo	32,63±7,84	61,53±6,09
Segundo muestreo	42,1±6,0	17,4±2,6

En el segundo muestreo no se registraron poliquetos del complejo polidórico en los abalones provenientes de Caldera y, a diferencia de lo registrado en el primer muestreo.

Tanto para los abalones provenientes de Guanqueros y Caldera(1) existieron diferencias considerables en la frecuencia de gusanos del complejo polidórico en el primer y segundo muestreo (Cuadro 12).

CUADRO 12: Frecuencia de poliquetos del complejo polidórico en abalón japonés provenientes de las dos zonas en estudio durante ambos periodos de muestreo

Frecuencia poliquetos	CALDERA		GUANAQUEROS	
	1er Muestreo	2do Muestreo	1er Muestreo	2do Muestreo
0-2	0	54	46	1
3-5	2	0	3	5
6-8	0	0	0	4
9-11	2	0	0	7
12-14	3	0	0	6
15-17	3	0	0	7
>18	33	0	0	30
Tamaño Muestra	43	54	49	60

CUADRO 13: Especies pertenecientes al complejo polidórico presentes en abalón japonés provenientes de las dos zonas en estudio. Primer y segundo muestreo.

Especies	Caldera	Guanaqueros
<i>Polydora uncinata</i>	●	●
<i>Polydora rickettsi</i>	●	
<i>Dipolydora huelma</i>	●	
<i>Boccardia</i> spp.	●	

No se detectó la presencia de poliquetos sabélidos en ninguno de los ejemplares analizados provenientes de todos los centros de cultivo considerados en el estudio.

1.4.2.2 Ostión del Norte

De los 359 ostiones analizados durante el estudio, los mayores grados de infestación por polydoras se presentan en la zona de Caldera, seguido por Bahía Guanaqueros y Bahía Tongoy. Todos los ostiones analizados correspondieron a individuos adultos (Cuadro 14).

CUADRO 14: Longitud promedio de la muestra de ostiones de la 3ra y 4ta regiones (en mm.)

	CALDERA	GUANAQUEROS	TONGOY
Primer muestreo	72,62±4,14	72,70±4,34	72,81±4,26
Segundo muestreo	68,77±4,22	77,05±3,34	74,37±4,36

En el primer muestreo realizado, la mayor frecuencia de polidóridos en los ostiones analizados se registró en el rango de 0-4 gusanos por individuo, aunque en Bahía Tongoy los individuos mostraron un mayor número de gusanos en comparación a las otras dos bahías analizadas (Cuadro 15), a pesar que 19 de los ostiones provenientes de Bahía Guanaqueros presentaron mas de 25 gusanos por valva.

Durante el segundo muestreo se evidencia un aumento en la intensidad de la infestación, siendo considerablemente mayor el rango >25 para las zonas de Guanaqueros y Caldera (Cuadro 15).

La zona de Tongoy se mantiene como la de menor grado de infestación en ambos muestreos.

CUADRO 15: Número de individuos de la muestra de ostión del norte proveniente de las zonas en estudio, por rango de poliquetos presentes en las valvas durante los dos muestreos en el año en estudio.

Frecuencia poliquetos	CALDERA		GUANAQUEROS		TONGOY	
	1er M.	2do M.	1er M.	2do M.	1er M.	2do M.
0-4	54	2	28	1	31	21
5-9	4	2	5	2	24	30
10-14	3	3	2	8	3	9
15-19	0	5	0	9	1	1
20-24	0	2	4	3	0	0
7,25	0	45	19	40	1	0
Tamaño muestra	61	60	58	63	60	61

1.4.2.3 Abalón Rojo

En general, los abalones muestreados provenientes de todos los centros de cultivo analizados, tanto en el primer como en el segundo muestreo (Cuadro 16) presentaron promedios menores a un poliqueto por concha. El Cuadro 17 muestra el bajo grado de infestación que presentaron los abalones rojos analizados en este estudio.

CUADRO 16: Longitud promedio de la concha de abalón rojo (*Haliotis rufescens*) provenientes de las zonas en estudio. Ambos muestreos (mm).

	Caldera	Los Molles	Chonchi(1)	Chonchi(2)	Dalcahue(2)
Primer muestreo	27.05±4.14	25.46±6.56	55.94±5.15	33.98±4.07	72.25±6.80
Segundo muestreo	12.60±1.80	25.46±6.56	35.20±5.70	47.00±7.60	28.10±2.90

CUADRO 17: Abalones de la muestra clasificados por frecuencia de poliquetos en las valvas.

Frecuencia poliquetos	Caldera		Los Molles		Chonchi (1)		Chonchi (2)		Dalcahue (1)		Dalcahue (2)	
	1er M	2do M	1er M	2do M	1er M	2do M	1er M	2do M	1er M	2do M	1er M	2do M
0-2	58	60	49	60	29	30	38	33	15	9	20	20
3-5	0	0	0	0	1	0	0	5	5	5	0	0
6-8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0	0
9-11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0
12-14	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
15-17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6	0	0
Tamaño muestra	58	60	49	60	30	30	39	38	20	29	20	20

1

CUADRO 18: Especies pertenecientes al complejo polidórico presentes en abalón rojo. Primer y segundo muestreo.

Especies	Chonchi (1)	Chonchi (2)	Dalcahue (1)	Dalcahue (2)
<i>Polydora rickettsi</i>	●	●	●	
<i>Dipolydora huelma</i>	●	●	●	●
<i>Dipolydora giardi</i>		●	●	

No se detectó la presencia de poliquetos sabélidos en ninguno de los ejemplares analizados provenientes de todos los centros de cultivo considerados en el estudio.

Los ejemplares analizados, correspondientes al muestreo de verano en la X Región, presentaron perforaciones características de poliquetos pertenecientes al Complejo polidórico (*Polydora* y géneros relacionados). Estas se localizaron principalmente en el margen dorsal posterior de la concha, muescas de los poros respiratorios antiguos y en menor grado en los poros respiratorios nuevos y margen ventral medio de la concha.

Las perforaciones encontradas corresponden a dos orificios circulares de similar diámetro, unidos por un canal angosto. Por lo general, se proyecta mucus y sedimento

¹ Chonchi (1): Centro (a); Chonchi (2) Centro (b); Dalcahue (1) Quetalco; Dalcahue (2) Curaco de Velez.

acumulados por el poliqueto desde cada orificio. Hacia el interior de la concha se extienden las galerías abarcando superficies considerables, principalmente cuando se hallan en el margen dorsal posterior. En todos los casos, las galerías de *Polydora* se encontraron restringidas a la concha de *H. rufescens*, aisladas de las partes blandas del abalón.

Basado en el estudio detallado bajo microscopio óptico, se llegó a la conclusión que las especies horadoras corresponden a *Polydora rickettsi*, *Dipolydora huelma* y *Dipolydora giardi*.

Se desestimó la presencia del sabélido *Terebrasabella heterouncinata* (Fitzhugh & Rouse, 1999), dado que en ninguno de los abalones revisados se observó:

- Corona tenticular descrita para esta especie, o
- Presencia de marcas simples en el margen de la concha o deformación de la misma, ambos signos de infestación temprana y avanzada, respectivamente.

Por otra parte, el examen macroscópico de las conchas reveló la presencia de numerosas perforaciones simples concentradas principalmente sobre la región central del molusco. En algunos individuos, estas perforaciones son tan densas (116/cm²) que la concha adquiere un aspecto poroso y presenta pérdida de nácar en los sectores más antiguos. El origen de estos orificios no es atribuible a *Polydora*, *Dipolydora* o *Terebrasabella*, permaneciendo incierto.

1.4.3 Catastro de *Bonamia* sp. en *O. chilensis*

1.4.3.1 Histología

Del análisis histológico de los 120 especímenes obtenidos durante el primer muestreo, se detectó la presencia de un protozoo intracitoplasmático en los hemocitos de 5 ostras chilenas provenientes de la zona Continente y de 2 provenientes de la zona Isla.

La parasitosis hemocítica fue localizada en el tejido conectivo de manto, glándula digestiva y branquias. Cada uno de los ejemplares afectado presentó una infección generalizada en todo el tejido conectivo. Se observó, además, una alteración del tejido conectivo, especialmente en branquias donde se observan infiltración hemocítica. La intensidad de la infección fue clasificada como Grado 4 en las siete muestras, utilizando la metodología de Hine (1991). (FOTO N°12)

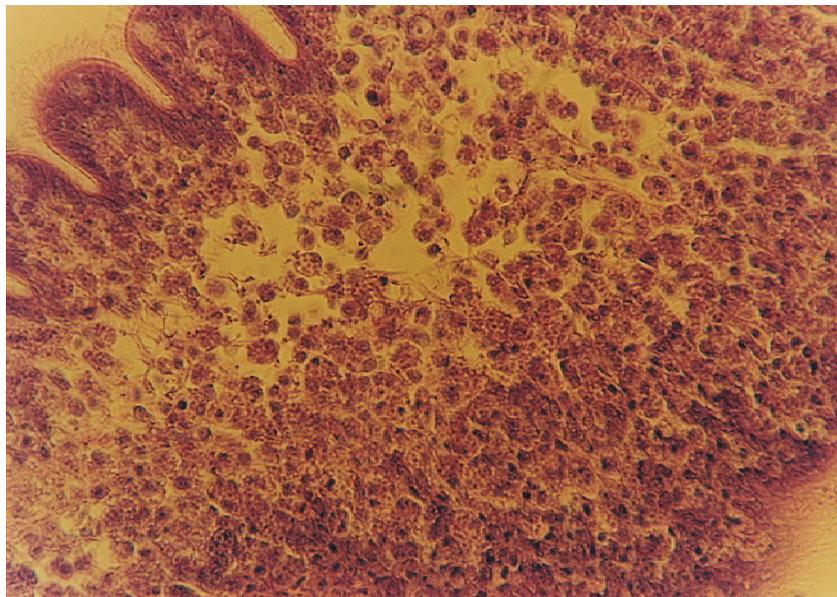


FOTO N°12: Tejido de Ostra infectada con *Bonamia* sp. Muestreo de Verano

Para el segundo muestreo, se realizó el análisis histológico a 120 ejemplares, 60 proveniente de la zona Continente y 60 de la zona Isla, detectándose la presencia de *Bonamia* sp. en un ejemplar de la zona Continente. Este patógeno se presentaba en todos los órganos. La intensidad de esta infección fue clasificada como Grado 5, según la escala

de Hine, debido a que se presentaba en forma extracelular acompañada de una hiperplasia generalizada (FOTO N°13).

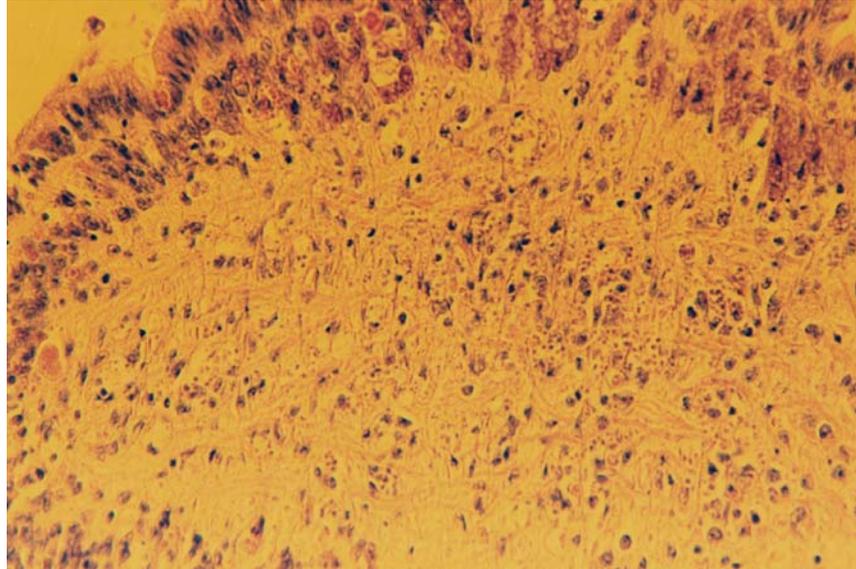


FOTO N°13: Tejido de Ostra infectada con *Bonamia* sp. Muestreo de Otoño

El análisis histológico realizado a 130 ejemplares obtenidos en el tercer muestreo, 60 proveniente de la zona Continente y 70 de la zona Isla, detectó la presencia de *Bonamia* sp. en 3 individuos de la zona Continente. En los tres casos esta infección fue clasificada como Grado 3, según la escala de Hine (FOTO N° 14)

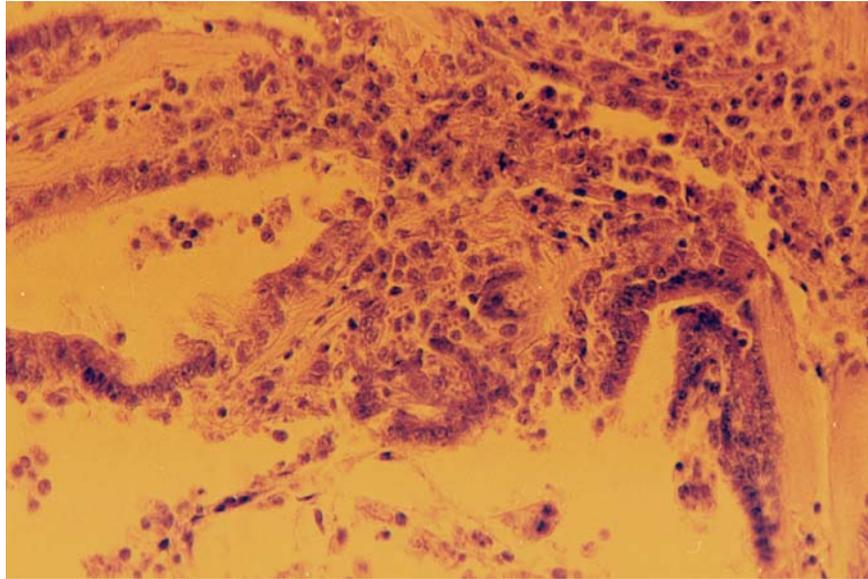


FOTO N°14: Tejido de Ostra infectada con *Bonamia* sp. Muestreo de Invierno.

1.4.3.2 Análisis Ultraestructural

- Muestreo de Verano:

En la FOTO N° 15 se observa un hemocito con tres células de *Bonamia* sp. en su interior. Cada una de estas era ligeramente ovoide, uninuclear, midiendo 1.81µm de diámetro.

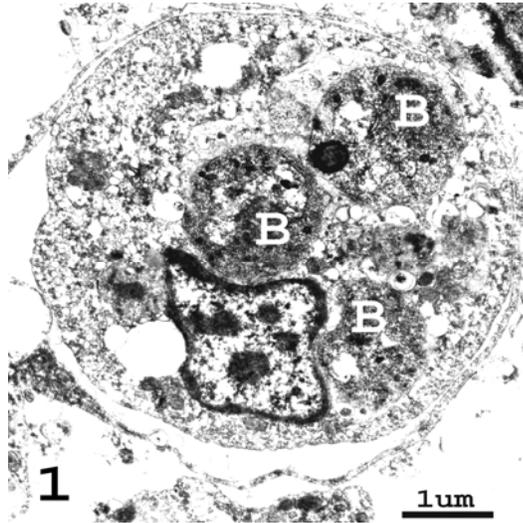


FOTO N°15: Hemocito infectado con tres células de *Bonamia* sp. Muestreo de Verano.

- Muestreo de Otoño:

En esta muestra se observan distintos estados de desarrollo. Las células eran todas uninucleadas, de forma ovoide, con diámetro de 2.2µm. Núcleo de forma esférica u ovoide, a veces ligeramente irregular, poco denso a los electrones. Los haplosporosomas eran esféricos a ovoides, presentes en número variable, y muchas veces asociados a las mitocondrias, las que mostraban un aspecto vacuolado. Retículo endoplasmático liso se observó como cortas hebras, y perfiles circulares de retículo anastomosado muy próximos al núcleo (FOTOS N°16 y N°17).

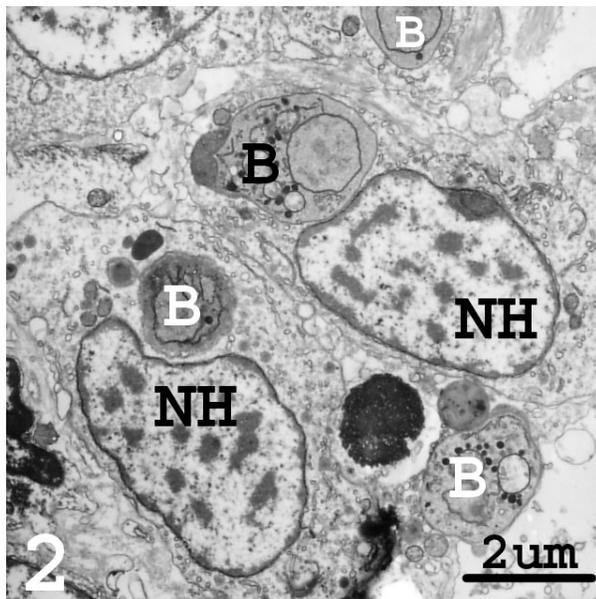


FOTO N°16: Hemocitos con *Bonamia* (B)., en el citoplasma de ésta se observan las mitocondrias, haplosporosomas y retículo. NH: núcleo hemocito.

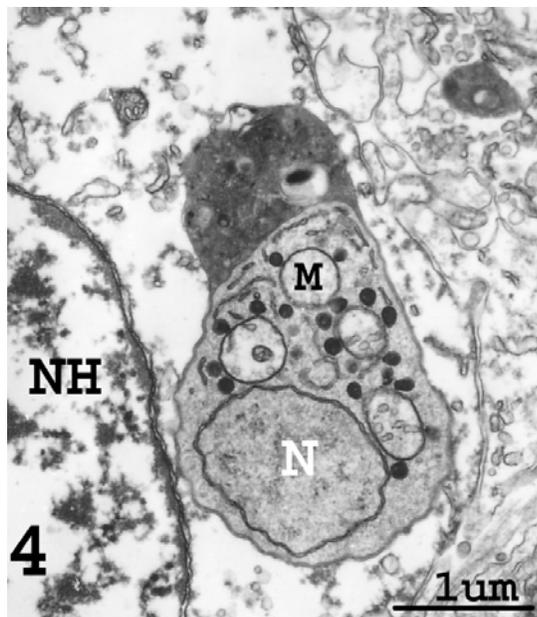


FOTO N°17: *Bonamia* de forma más elongada, núcleo (N), mitocondria (M), haplosporosomas, retículo liso, uno en perfil circular cerca del núcleo. A la izquierda se observa parte del núcleo del hemocito (NH).

1.4.3.3 Análisis Molecular

Reacción de PCR

La técnica de PCR desarrollada permitió detectar un total de 18 muestras positivas al parásito *Bonamia* entre 120 muestras totales, es decir, 15% de prevalencia. En el Cuadro 19 se presenta la distribución de las muestras positivas por localidad de procedencia.

CUADRO 19: Muestras positivas al parásito *Bonamia sp.* detectadas usando la técnica de la PCR, por localidad de procedencia

LOCALIDAD	ZONA DE MUESTREO	Nº(%) de ostras infectadas/examinadas
Canal Quihua (Calbuco)	Continente	11/60 (18,3 %)
Bahía Hueihue (Ancud)	Isla	7/60 (11,7%)
Total		18/120 (15%)

Comparación de técnicas

Se ha hecho una revisión exhaustiva de los tejidos extraídos de las ostras obtenidas en el muestreo realizado en el mes de Diciembre del 2003, razón por la cual se tomaron muestras adecuadas para utilizar dos técnicas de diagnóstico diferentes, Histología y PCR, a fin de compararlas. Los resultados obtenidos pueden observarse en el Cuadro 20.

CUADRO 20: Muestras positivas al parásito *Bonamia sp.*, por técnica utilizada

TECNICA	Nº(%) de ostras infectadas/examinadas
Histología	7/120 (5,8%)
PCR	18/120 (15%)
Total	18/120 (15%)

A pesar del pequeño número de muestras, se ha estimado la sensibilidad y especificidad de ambas técnicas, entendiendo como sensibilidad la capacidad de determinar

como positiva una muestra positiva, y especificidad como la capacidad de determinar como negativa una muestra verdaderamente negativa. Estos valores se presentan en el Cuadro 21.

CUADRO 21: Estimaciones de sensibilidad y especificidad, por técnica utilizada

TÉCNICA	SENSIBILIDAD	ESPECIFICIDAD
Histología	7/18 (38,9%)	102/113 (91,2%)
PCR	18/18 (100%)	102/102 (100%)

Estos resultados muestran la alta especificidad de ambas técnicas, las cuales presentan baja cantidad de falsos negativos. Cabe mencionar que el 100 % de las muestras fuerte y medianamente infectadas, detectadas por histología, también se detectaron por PCR. Considerando las muestras ligeramente infectadas, se detecta una sensibilidad mayor de la técnica PCR (100%) sobre la histología (38,9%).

1.4.3.4 Caracterización Taxonómica

Una vez revisados todos los cortes histológicos obtenidos de las ostras recolectadas en la X región durante el muestreo de Verano, se detectó la presencia del parásito tipo *Bonamia* en los hemocitos de 7 de ellas. A partir de tejidos de esas mismas ostras, preservados en alcohol 70%, se realizaron los procedimientos para obtener grandes cantidades de material genético con el objetivo de lograr la secuencia completa de la pequeña sub unidad ribosomal (SSU rDNA), segmento genómico de gran importancia y usualmente usado para análisis filogenético y taxonómico.

Secuencias obtenidas

Hasta el momento se ha secuenciado aproximadamente el 72% del SSU rDNA del parásito. Dos fragmentos de 915 y 482 pb, de las regiones 18S e ITS-1 respectivamente. Estos fragmentos fueron delimitados y amplificados usando las combinaciones de partidores Suni- Boas (Cuadro 22) y Sbo- Ra58 (Cuadro 23).

CUADRO 22: Secuencia de 915 pares de bases obtenida con los partidores Suni.Boas, que delimitan la región 18S de la pequeña subunidad ribosomal.

```
GTCTCAAGATTAAGCCATGCATGTCCAAGTATAAACACGTTTGTACTGTTCTNC
TGCAGAATGGCTCATTACAACAGTTATAGTTTATTTGACATTGCAACTGTTACA
CGGATAACCGTAGTAACCTAGGGCTAATACGTGACAAACCCTGCTCGCGGGAG
TGCATATTAGCTGAAAACCAATTTTGGTTGAATAATAATATTTGTTCGGATCGCG
TTGGCCTCGCCAGCGACATGTCATTCAAGTTTCTGACCTATCAGCTGGACGGTA
GGGTATTGGCCTACCGTGGCTTTGACGGGTAACGGGGAATGCGGGTTCGATTC
CGGAGAGGCAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCCACGGGAGGCAGCAGGTGC
GCAAATTACCCAATTCTGACTCAGAGAGGTAGTGACAAGAAATAACGATCGGC
GGCCTTCGGTTGCCTATTCGGAATGAGAACAATGTAAAAGCCTTATCGAATTCC
AGCGGAGGGCAAGCCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACCAGCTCCGCTAGCG
TATACTAAAGTTGTTGCTGTTAAAACGCTCGTAGTTGGATATCTGCCCCGCCC
GGCCGACTCGCGACGCACCTGCGCCTGCGGCCGGCCGCCGAGGCATAATTCA
GGAACGCCGGTCTGGCCATTCGATTGGTTCGGGCCGCTGGTCCTGATCCTTTACT
TTGAGAAAATTAAGTGCTCAAAGCAGGCTCGCGCCTGAATGCATTAGCATGG
AATAATAAGACACGACTTCGGCGCCGCCACTCGTGGCGGGTGTTTTGTGGTTT
TGAGCTGGAGTAATGATTGATAGAAACAATTGGGGGTGCTAGTATCGCCGGGC
CAGAGGTAAAATTCTTTAAGNACGGTGAGACTAACTTATGCGAAAGCATCACC
AAGCGTG
```

CUADRO 23: Secuencia de 482 pares de bases obtenida con los partidores Sbo-Ra58, que delimitan la región ITS-1 de la pequeña subunidad ribosomal.

```
GTAATCTTCAACGCGCACCCAAGTGGGGATAGATGATTGCAACTGTTTCATCTTG
AACAAAGGAATATCTAGTAAACGCAAGTCATCAACNTTGCATTGATTACGTCCCT
GCCCTTTGTACACACCGCCCGTCGCTTCTACCGATTGAATAATGAGGTGAATTA
GGTGGATAAGAGCCGCCTCGGCGCGTTCTTAGAAGCTTTGTGAACCTTGTTATT
TAGAGGAAGGAAAAGTCGTAACGAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGAT
CATTACTTTATTATTGTATGCAACAACAACATGCAAAAATATAAACCGCG
AACATTTCTGTTTTTAAAAATATTGCTGACTACCGATTTACACACAAAGCAAAC
GCATATATATTTTTATATACGNNGATTTGCAAGACAACATGCCGACATCAATC
TTTGCAATGGATGACTAGGCTCTCGCAACGATGAAGAACGCAGCGAAATGCG
```

Análisis de las secuencias

La secuencia obtenida después de la amplificación del ADN genómico con los partidores Suni-Boas, de tamaño de 915 pares de bases, fue comparada con las secuencias almacenadas en el banco de datos GENE BANK usando el programa BLAST. Esta secuencia, de la región 5' de la SSU rDNA presentó la mayor homología con su similar, del parásito *Bonamia roughleyi* (ex *Microcytos roughleyi*), registrado bajo el número AF508801 (Anexo 5) Además de presentar también homologías con secuencias de los parásitos *Bonamia exitiosa* (Ex *B. Exitiosus*), *B. Ostreae* y *Haplosporidium costale* (Cuadro 24)

CUADRO 24: Parásitos que presentaron mayor homología en la secuencia comparada (5´ de la SSU rDNA) y su respectivo número de referencia en la base de datos GENE BANK.

REFERENCIA GENBANK	PARÁSITO
gb AF508801	Mikrocytos roughleyi, 18S sub unidad ribosomal
gb AF337563.	Bonamia exitiosus, 18S sub unidad ribosomal
gb AF262995	Bonamia ostreae, 18S sub unidad ribosomal
gb AF387122	Haplosporidium costale, pequeña sub unidad ribosomal
gb U20858	Haplosporidium costale, pequeña sub unidad ribosomal

El partidor SBO, situado en la región 3´ del gen 18S, utilizado en combinación con el partidor RA58, localizado en la región 5´ del gen 5.8 S, permitió la amplificación del espacio de transcripción interno (ITS-1). Esta secuencia, de 482 pares de bases (Cuadro 23) permitió confirmar las homologías obtenidas anteriormente con el fragmento 5´ de la región 18S. La mayor homología se presenta con *Bonamia ostreae* (Anexo 6) En el Cuadro 26 se presenta un resumen de las secuencias registradas en el GENE BANK, que presentan mayor homología con la secuencia sometida a comparación.

CUADRO 25: Parásitos que presentaron mayor homología en la secuencia comparada (ITS-1) y su respectivo número de referencia en el GENE BANK.

REFERENCIA GENBANK	PARÁSITO
gb AF262995.1	Bonamia ostreae, 18S sub unidad ribosomal
gb AF162087.1	Bonamia ostreae, 18S sub unidad ribosomal
gb U19538.2	Haplosporidium Nelson, 16S sub unidad ribosomal
emb X74131.1	Haplosporidium nelsoni, pequeña sub unidad ribosomal
Dbj AB080597.1	Haplosporidium Nelson, pequeña sub unidad ribosomal
gb AF337563.1	Bonamia exitiosus, 18S sub unidad ribosomal

Hasta el momento no disponemos de la secuencia completa de la SSU rDNA, pero el análisis filogenético de las secuencias de ADN ya obtenidas confirman que este parásito

pertenece al Phylum *Haplosporidium*, con mayor similitud con especies del género *Bonamia*. Este análisis molecular en combinación con el análisis morfológico obtenido de la histología y de la microscopía electrónica complementan y confirman este diagnóstico.

OBJETIVO 4.2:

Comparación y análisis de protocolos de diagnóstico para las principales enfermedades de moluscos, desarrollados en la ejecución de los proyectos FIP N° 95-32 y 2001-09

2.1. ANTECEDENTES

Para el diagnóstico rutinario de las enfermedades de los moluscos son extensamente empleados los métodos tradicionales: histología y microscopía electrónica, los cuales se basan en características morfológicas y ultraestructurales de los patógenos y tejidos afectados. Las grandes limitaciones de estas técnicas de diagnóstico son su laboriosidad, baja sensibilidad y especificidad, es decir, que necesitan una gran densidad del patógeno para detectarlo y al mismo tiempo no son capaces de diferenciar patógenos de morfología similar. Por otro lado, el uso de estas técnicas, requiere mucha experiencia por parte del personal técnico, necesaria para distinguir eficazmente entre las células del molusco y las células parasitarias.

Para superar estas deficiencias, actualmente existe un gran número de equipos de investigación dedicados a desarrollar técnicas de biología molecular rápidas, sensibles y específicas para cada patógeno. En estos casos no importa la experiencia del analista, puesto que los resultados son objetivos y precisos. El inconveniente de estos métodos es que suelen ser de alto costo y, sobre todo, que todavía no están suficientemente optimizados para aplicarse rutinariamente como sistema de control de las enfermedades.

A pesar de las limitaciones de los métodos convencionales, la histología se debe usar inicialmente, después y paralelamente a cualquier otro tipo de examen, ya que esta técnica proporciona una enorme cantidad de información. Es particularmente importante porque los exámenes macroscópicos normalmente no identifican síntomas

patognomónicos. La mortalidad también se puede deber a diferentes patógenos en los bivalvos, lo cual se puede determinar por medio de la histología.

Ya que los moluscos no producen anticuerpos, tal como se conoce en vertebrados, los procedimientos inmunológicos útiles en detección precoz serían difíciles de llevar a cabo en estos organismos. Los métodos serológicos para propósitos de diagnóstico no son, obviamente, tomados en cuenta. Para la detección directa de agentes patógenos se utilizan pruebas moleculares, tales como anticuerpos monoclonales o sondas de ácido nucleico.

Las técnicas de diagnóstico para la detección de virus en moluscos, son quizás una de las áreas que muestra menor avance, debido al escaso desarrollo del cultivo celular y de tejidos de estos organismos, debiéndose utilizar microscopía electrónica para su detección. Además, las detecciones precoces de enfermedades son difíciles de llevar a cabo, porque no se han desarrollado procedimientos de diagnóstico inmunológicos debido a la ausencia de anticuerpos. Es así como en la mayoría de los casos no existen métodos convencionales para detectar infecciones subclínicas.

Cinco enfermedades relevantes aparecen en la lista de la Oficina Internacional de Epizootias de la OIE, aunque empiezan a surgir más conforme a un mayor esfuerzo que se enfoca en observaciones de mortalidad anormal y de producción en cultivo. El efecto perjudicial de los patógenos también se considera tanto la cantidad como la calidad de la producción. Dentro de las enfermedades y patógenos que se sabe afectan a los moluscos, la OIE identifica diez parásitos en cinco enfermedades. Estas enfermedades son: Bonamiosis (causada por *Bonamia ostreae* y *B. exitiosus*); Marteiliosis (*Marteilia refringens* y *M. sydneyi*); Microcitosis (*Mycrocitos mackini*, *M. roughleyi*); Haplosporidiosis (*Haplosporidium nelsoni*, *H. costale*) y Perkinsosis (*Perkinsus marinus* y *P. olseni*). (Cuadro 26).

CUADRO 26: Enfermedades de declaración obligatoria a la OIE y técnicas de diagnóstico recomendadas para cada una de ellas.

ENFERMEDADES DE MOLUSCOS	TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO
Infección por <i>Bonamia ostreae</i> Infección por <i>Bonamia exitiosus</i>	Impresiones de tejido en porta objetos, teñidos con kit comercial para células sanguíneas Histología, observación de morfología típica del patógeno
Infección por <i>Haplosporidium nelsoni</i> Infección por <i>Haplosporidium costale</i>	Examen citológico de glándula digestiva, branquias y manto en porta objeto, teñidas con kit comercial para células sanguíneas, observar morfología descrita Examen histológico de glándula digestiva, observación diferentes etapas del parásito
Infección por <i>Marteilia refrigens</i> Infección por <i>Marteilia sydneyi</i>	Examen citológico de glándula digestiva en porta objeto, teñida con kit comercial para células sanguíneas, observación de morfología típica del parásito Examen histológico de tejido digestivo, observación de morfología del parásito
Infección por <i>Mikrocytos roughleyi</i> Infección por <i>Mikrocytos mackin</i>	Examen citológico de tejido con absceso o úlcera teñidos con kit comercial para células sanguíneas, observar parásito en células sanguíneas o libres Examen histológico a tejido de zonas que contienen pústulas, abscesos o úlceras, observación del parásito en los hemocitos y alrededor de los abscesos
Infección por <i>Perkinsus marinus</i> Infección por <i>Perkinsus olseni/atlanticus</i>	Examen histológico de la masa visceral, observación de los trofozoitos típicos descritos Cultivo en medio de tioglicolato, observación después de la incubación y preparación con lugol, de morfología descrita del parásito

Algunas de las enfermedades de moluscos marinos, declarables a la OIE, contemplan agentes patogénicos que pertenecen a una o más especies del mismo género. Por ejemplo, la Haplosporidiosis cubre dos especies, *Haplosporidium nelsoni* y *H. costale*. Las pruebas de ADN o anticuerpos monoclonales pueden ser muy útiles en la detección de dichos agentes. Es el caso de *Haplosporidium sp* de la *Crassostrea gigas* (ostra del Pacífico) que fue identificado como *H. nelsoni* por medio del uso de secuencias de ADN en pequeñas unidades ribosomales de ADN (Stokes & Burreson, 1995).

2.1.1. Enfermedades en moluscos de cultivo en el país

Las enfermedades de alto riesgo de los moluscos de cultivo de nuestro país han sido establecidas a partir del Reglamento de Medidas de protección, control y erradicación de enfermedades de alto riesgo para las especies hidrobiológicas (D.S. N°319 del 24 de agosto de 2001), en cual se clasifican dichas enfermedades en Lista 1 y Lista 2, considerando su virulencia, prevalencia, nivel de diseminación o impacto económico.

De acuerdo a esto, las enfermedades de alto riesgo que afectan a los moluscos, se clasificaron de la siguiente forma:

CUADRO 27: Clasificación de enfermedades de alto riesgo para las especies de moluscos. Lista 1 y 2.

Lista 1:

<i>Enfermedad</i>	<i>Agente Causal</i>
Infección por <i>Bonamia exitiosa</i>	<i>Bonamia exitiosa</i>
Infección por <i>Bonamia ostreae</i>	<i>Bonamia ostreae</i>
Infección por <i>Mikrocytos roughleyi</i>	<i>Mikrocytos roughleyi</i>
Infección por <i>Haplosporidium nelsoni</i>	<i>Haplosporidium nelsoni</i>
Infección por <i>Marteilia refrigens</i>	<i>Marteilia refrigens</i>
Infección por <i>Marteilia sydneyi</i>	<i>Marteilia sydneyi</i>
Infección por <i>Mikrocytos mackini</i>	<i>Mikrocytos mackini</i>
Infección por <i>Perkinsus marinus</i>	<i>Perkinsus marinus</i>
Infección por <i>Perkinsus olseni/atlanticus</i>	<i>Perkinsus olseni/atlanticus</i>
Infección por <i>Haplosporidium costale</i>	<i>Haplosporidium costale</i>

Lista 2:

<i>Enfermedad</i>	<i>Agente Causal</i>
Infección por <i>Candidatus Xenohalictis californiensis</i>	<i>Candidatus Xenohalictis californiensis</i>
Infestación por <i>Terebrasabella heterouncinata</i>	<i>Terebrasabella heterouncinata</i>

Fuente: Resolución 1496 del 31 de Mayo de 2004, Subsecretaría de Pesca, Ministerio de Economía, Fomento y Reconstrucción.

Ninguna de las enfermedades presentes en la Lista 1 ha sido detectada en nuestro país, probablemente debido a que las investigaciones dirigidas al conocimiento de las patologías de estas especies han sido escasas, limitándose al conocimiento de los parásitos helmintos y bacterias.

Quizás, uno de los estudios más importantes y que sentó las bases para el inicio del estudio sistemático de las enfermedades de moluscos en el país, fue el proyecto FIP 95-32, el cual, aparte de proporcionar información relativa a las patologías presentes en el país, se recopiló información relacionada con los métodos de diagnóstico, prevención y tratamiento de las enfermedades de importancia para los moluscos de cultivo.

Posteriormente, con el proyecto FIP 2001-09 se recopiló información nacional sobre enfermedades de Salmónidos y moluscos de cultivo a través de encuestas a laboratorios de diagnóstico, revisión de boletines científicos y otras fuentes bibliográficas. Con esta información se elaboró una base de datos de los laboratorios que prestan servicio de diagnóstico de enfermedades de animales acuáticos y laboratorios de investigación en este campo, obteniéndose una visión sobre su especialidad, experiencia, equipos, personal y otras características que permiten conocer la capacidad de diagnóstico de los laboratorios y el nivel en que se encuentran con relación a una acreditación internacional.

Con esta información complementada con el debate de especialistas de la OIE y especialistas nacionales generado en el Seminario-Taller en el marco de ese estudio, se confeccionó una propuesta de técnicas de diagnóstico de acuerdo a la realidad del país y a los procedimientos aceptados internacionalmente, las que se encuentran descritas en el *Manual de Técnicas de Diagnóstico de Enfermedades de Salmónidos, Mitílidos, Pectínidos y Ostreidos*, Anexo III, (FIP 2001/09).

Debido al rápido desarrollo y mayor accesibilidad a nuevos métodos de diagnóstico basados principalmente en técnicas moleculares aceptadas internacionalmente, se hace necesaria una actualización de los estudios sobre métodos de diagnóstico aplicados en el país.

2.2 DESARROLLO METODOLÓGICO

Con la finalidad de realizar la revisión bibliográfica referente a los objetivos 4.2, 4.3 y 4.4 del proyecto, se recopilaron los documentos que contenían los procedimientos utilizados en estudios de poblaciones de moluscos, desarrollados tanto por las instituciones participantes en este proyecto, como aquellos realizados por otras instituciones y que se encontraban disponibles como informes técnicos de distribución restringida. Además, se incluyó los trabajos de tesis de universidades con carreras afines y resúmenes de congresos y seminarios. En general, se realizó una búsqueda de resultados de investigación en el área de los moluscos nacionales.

La búsqueda se realizó utilizando los siguientes métodos:

1. Búsqueda en bibliotecas de universidades con carreras afines:
 - Tesis de grado o memorias de titulación.
 - Informes de distribución restringida:
 - * Publicaciones no indexadas.
 - Resúmenes de congresos o yectos FIP.
2. Búsqueda en documentos virtuales disponibles en internet:
 - * Bibliotecas univseminarios.
 - Resúmenes de trabajos de investigación de fondos concursables (FONDEF, Fondecyt, etc.).
 - Informes finales de proersitarias.
 - Palabras claves, tales como: enfermedades de moluscos, patologías de moluscos, etc., utilizando buscadores universales.

2.2.1. Revisión bibliográfica de Instituciones de Educación Superior

Para este fin, se revisaron las bibliotecas de los Centros de Estudios y Universidades existentes en el país que desarrollan investigación en el área de interés. El Cuadro 28 detalla las universidades y centros de estudios de especies acuícolas del país, asociados a la investigación en el área científica y tecnológica seleccionados para el presente proyecto.

CUADRO 28: Universidades y Centros de Estudios Asociados a Investigación Científica y Tecnológica

UNIVERSIDAD/CENTRO EST.	DIRECCIÓN
Instituto de Biología Marina, Universidad de Valparaíso	- Av. Borgoño s/n. Reñaca, Viña del Mar
Facultad de Medicina Veterinaria Departamento de Patología Universidad de Concepción	- Av. Vicente Méndez 595, Chillán
Facultad de Ciencias del Mar Universidad Andrés Bello	- Manuel Montt 367, Providencia, Santiago
Ciencias del Mar. Universidad Arturo Prat	- Av. Matta 2065, Iquique
Instituto de Acuicultura Universidad de Magallanes	- Av. Bulnes 1855, Punta Arenas
Facultad de Veterinaria Universidad Mayor de Santiago	- Américo Vespucio Sur 357, Las Condes, Santiago
Departamento Acuicultura Universidad de Los Lagos	- Casilla 933, Osorno
Universidad Católica de la Santísima Concepción	- Casilla 297, Concepción
Facultad de Recursos del Mar Universidad de Antofagasta	- Av Angamos 601, Antofagasta
Instituto de Biología Universidad Católica de Valparaíso	- Av. Brasil 2950, Valparaíso
Escuela de Ciencias del Mar Universidad Católica de Valparaíso	- Av. Altamirano 1480, Valparaíso
Facultad de Veterinaria. Laboratorio de Patología Universidad Austral de Chile	- Casilla 567 Valdivia
Facultad de Ciencias Veterinarias Laboratorio Biotecnología Universidad Austral de Chile	- Casilla 567 Valdivia
Departamento de Biología Marina Departamento de acuicultura Universidad Católica del Norte	- Casilla 117. Coquimbo
Medicina Veterinaria Universidad de Chile	- Av. Santa Rosa 11735, Santiago
Laboratorio de Bioquímica y Virología, Facultad de Ciencias. Universidad de Valparaíso	- Errázuriz 2120, Casilla 5030, Valparaíso

En este proceso, se incluyó todos aquellos documentos de tesis realizados por los alumnos de las carreras de Ingeniería en Acuicultura, Ingeniería en Pesca, Biología Marina, Oceanografía y Medicina Veterinaria, según correspondiera el caso. A continuación, se presenta un resumen de todas las instituciones visitadas:

CUADRO 29: Instituciones de Educación Superior visitadas.

Universidad	Escuela o Facultad
Universidad Arturo Prat	Escuela de Ciencias del Mar
Universidad de Antofagasta	Facultad de Recursos del Mar
Universidad Católica del Norte	Facultad de Ciencias del Mar
Pont. Universidad Católica de Valparaíso	Escuela de Ciencias del Mar
Universidad Nacional Andrés Bello	Facultad de Ciencias del Mar
Universidad Mayor de Santiago	Facultad de Medicina Veterinaria
Universidad de Chile	Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias
Universidad de Concepción	Facultad de Recursos Naturales
Universidad Austral de Chile	Escuela de Ciencias del Mar

Una vez revisada la base de datos de cada biblioteca, se procedió a solicitar todos aquellos documentos que concordaran con los siguientes criterios de selección:

1. Tesis y documentos relacionados con patógenos o patologías de moluscos del país.
2. Tesis, documentos y presentaciones a congresos y seminarios relacionados con procedimientos de diagnóstico.

Luego de la recopilación y la selección de los documentos (Anexo 7), se procedió a su análisis y se eliminó todos aquellos que no presentaban información sobre protocolos de diagnóstico de las patologías en estudio. En los Cuadros 30 y 31 se presenta el resultado de este análisis.

CUADRO 30: Documentos de Tesis seleccionados en la etapa de búsqueda de información.

Nombre Entidad	Cita Bibliográfica
Universidad de Antofagasta	Vilches Meneses, Jorge S. 1993. <i>Patogenicidad de <u>Vibrio anguillarum</u> (var) en larvas de <u>Argopecten purpuratus</u> (Lamarck, 1819).</i>
Pontificia Universidad Católica de Valparaíso	Herrera, E.O. 1999. <i>Estudio de algunos factores asociados al cuadro patológico de Retracción del Manto en el Ostión del Norte, <u>Argopecten purpuratus</u>, cultivado en la X Región.</i>
Universidad Católica del Norte	Hurtado, Luz. 2000. <i>Descripción del proceso infectivo de poliquetos sabélidos en el abalón rojo <u>Haliotis rufescens</u> (Swainson, 1822). Tratamiento y control.</i>
Universidad Católica del Norte	Basilio, Canio. 1991. <i>Caracterización taxonómica y morfológica de <u>Polydora</u> sp. (Polychaeta: Spionidae), su mecanismo de infestación y daño provocado en la estructura valvar del ostión del norte <u>Argopecten purpuratus</u> en cultivo suspendido y banco natural.</i>

CUADRO 31: Listado de Seminarios seleccionados en la etapa de revisión.

Título	Año
Karin B. Lohrmann and Catherine Cruz. How healthy are Chilean scallops (<i>Argopecten purpuratus</i>) from Chile? 14 th International Pectinid Workshop, St. Petersburg, USA.	2003
Sánchez M. y M. Oliva. Endoparásitos metazoos y comensales perforadores de <i>Argopecten purpuratus</i> Lamarck, 1819, en el norte de Chile. ¿Indicadores de unidades poblacionales? XVII Congreso de Ciencias del Mar, Santiago, Chile, p. 147.	1997
K. Lohrmann & Y. Smith. Platelminfos parásitos en el Ostión del Norte, <i>Argopecten purpuratus</i> Lamarck, 1819. XIII Jornadas de Ciencias del Mar, p. 119	1993
Lohrmann K., Smith Y., Díaz S., Bustos M. & C. Cortés. Presencia de un tremátodo digeneo en <i>Argopecten purpuratus</i> provenientes de poblaciones naturales. IV Congreso Latinoamericano de Ciencias del Mar, p. 104.	1991

Uno de los problemas más comunes enfrentado durante la recopilación bibliográfica, fue el hecho que muchas de las universidades visitadas tienen campos de acción definidos, dedicándose a áreas determinadas como por ejemplo biotecnología, cultivos de algas, estudios de patologías de peces (Trucha arcoiris y Salmón), etc. De esto, es posible afirmar que el área de investigación sobre la detección y control de enfermedades de moluscos ha comenzado recién a desarrollarse en las instituciones de educación superior, exceptuando la Universidad de Chile, Universidad Católica del Norte y Pont. Universidad Católica de Valparaíso.

Se analizó todos los documentos de tesis y seminarios para detectar la información referente a los protocolos de diagnóstico para las principales enfermedades de moluscos, protocolos utilizados para el análisis histológico, microscopía electrónica, análisis bacteriológicos, virológicos, inmunológicos y moleculares y compararlos con los procedimientos señalados en el Manual de Procedimientos de Diagnóstico para Especies Acuáticas de la OIE (2000) y los estudios FIP N° 95-32 y 2001-09. De dicho análisis se concluyó que ninguno de los documentos presenta información sobre patologías de importancia para los moluscos e incluían en su mayoría información relativa a parásitos metazoarios, a excepción de las Tesis desarrolladas por Enzo Herrera y Luz Hurtado. La primera fue desarrollada a partir del Proyecto FIP 95-32 e incluye los protocolos de histología descritos en el Manual OIE y crecimiento en el medio FTM (Medio Tioglicolato Líquido) descrito en el Proyecto FIP 2001-09 y en el Manual OIE. La segunda describe los procesos de infección de sabélidos y entrega métodos de control que se describen en el Cuadro 31. No obstante, no presenta los protocolos de detección de los sabélidos, limitándose a describir el daño y procesos de introducción en la concha del abalón.

2.2.2. Resúmenes de trabajos de investigación de fondos concursables FONDEF y FIP.

En la búsqueda de Informes de proyectos y trabajos de investigación de fondos concursables con contenidos relacionados a los protocolos de diagnóstico, se procedió a la revisión y análisis de los resúmenes disponibles en las páginas web de FONDEF y FIP. De este análisis se desprende la información contenida en el Cuadro 32.

CUADRO 32: Trabajos de investigación de proyectos de investigación de fondos concursables relacionados con técnicas de diagnóstico.

Número de Proyecto	Nombre
D0111074 (FONDEF)	Desarrollo de nuevas técnicas para la prevención y control de enfermedades infecciosas y no infecciosas en los cultivos de abalón.

Según el análisis se determinó que dicho proyecto pretende desarrollar medidas de diagnóstico, prevención y control de las enfermedades infecciosas y no infecciosas de los abalones (*Haliotis* sp.) en cultivo en el país, mediante el uso de técnicas inmunológicas y biotecnológicas de vanguardia, como también la aplicación y desarrollo de otras tecnologías diagnósticas, de manejo del recurso, y de control de enfermedades actualmente no disponibles y por lo tanto no acreditados por la OIE.

Además, con ese estudio se desarrollará una Estrategia Integral para el Control y la Prevención de Enfermedades, que contempla la aplicación de sistemas de manejo de enfermedades específicas y se desarrollarán nuevos productos diagnósticos basados en inmunoreactivos e inmunoensayos para el diagnóstico de las principales enfermedades, el desarrollo y la implementación de cultivos celulares primarios y de una línea celular a partir de tejidos de Abalón rojo y japonés para el aislamiento de patógenos intracelulares (*Candidatus Xenohaliotis californiensis*) que producen mortalidad de abalones en cultivo.

Desafortunadamente, este proyecto aún se encuentra en etapa de desarrollo y no es posible aún contar con los resultados, por lo que no es posible pronunciarse sobre la competencia de los protocolos de diagnóstico.

2.2.3. Búsqueda en documentos virtuales disponibles en internet.

La obtención de documentos se realizó utilizando buscadores universales, usando palabras claves, tales como: Enfermedades Moluscos, Patologías Moluscos, etc. Con esta información se construyó el archivo RefBiblio, la cual fue presentada en el informe de avance del presente estudio. Luego, se realizó un análisis de esta información para seleccionar los trabajos pertinentes a los objetivos 4.2, 4.3 y 4.4, lo cual se llevó a cabo

ingresando a cada una de las direcciones virtuales presentadas en el archivo y seleccionando todos aquellos documentos pertinentes al estudio. De este análisis se detectó que muchas de las direcciones virtuales presentadas conducían a un mismo tipo de documento, como por ejemplo los documentos del Manual de Diagnóstico de la OIE o Synopsis of Infectious Diseases and Parasites of Commercially Exploited Shellfish de la DFO de Canadá, por lo que se procedió a eliminar los enlaces específicos y sólo dejar los enlaces generales de estas instituciones. Además, se detectó que muchos de las direcciones virtuales ya no existían o conducían a enlaces que si bien tienen relación con los moluscos en estudio, no presentan información relevante a las patologías o protocolos de diagnóstico. Finalmente, y como parte del análisis, se procedió a eliminar toda aquella información que conducía y presentaba información básica demasiado general y que no guardaban relación con los antecedentes requeridos para los objetivos 4.2, 4.3 y 4.4 del presente estudio.

Los resultados del análisis realizado se presentan en el Cuadro 33.

CUADRO 33: Revisión Bibliográfica Enfermedades de Moluscos

Contacto	Nombre	Temas
www.nisc.com.mx/productos/abfr.html	<i>CAB Aquaculture Subset (1984-presente). CAB INTERNATIONAL.</i>	Enfermedades de peces y moluscos, parasitología de peces y moluscos, producción acuícola de especies (nutrición, cría y genética), y aspectos nutricionales de peces en la dieta humana.
www.rr-americas.oie.int/RR-Americas/Enfermedadesmoluscos.htm	<i>Seminario sobre enfermedades de los animales acuáticos</i>	Aspectos básicos Manual OIE (Dr. Franck Berthe)
www.oie.int/esp/publicat/RT/E_RT15_2.htm	<i>Prevención de la propagación de las enfermedades de los animales acuáticos</i>	Resumen publicación
www.scirus.com/srsapp/search?q=Diseases+of+mollusks&ds=jnl&ds=web&g=s&t=all	<u><i>Áreas de Interés : ACUICULTURA</i></u>	
www.oie.int/esp/normes/fcode/E_00048.htm - 11k - En caché - Páginas similares	<u><i>Código Sanitario para los Animales Acuáticos - 2003 están los capítulos para todas las enfermedades de moluscos</i></u>	Código Sanitario OIE

(Continuación CUADRO 33)

www.iim.csic.es/MaryPesca/Octubre2002/Pagina4.html	<u>Mar y Pesca. Faro De Vigo. N 49</u>	1991), <i>Bonamia ostreae</i> (Hervio, 1992) y <i>Haplosporidium nelsoni</i> (Stokes et al ... (PCR Figueras))
www.ugr.es/~dpto_gen/tesis/ilopez.htm	<u>Departamento de Genética. Tesis Doctorales</u>	TESIS DOCTORALES. Estudio molecular integrado de las ostras y de su parásito
www.mispecies.com/legisl/ce/dec-03-729.pdf	<u>Formato de archivo: PDF/Adobe Acrobat - Versión en HTML</u>	en relación con <i>Bonamia ostreae</i> y Marteilia refringens [notificada con ... (Caso Irlanda)
www.europa.eu.int/comm/fisheries/doc_et_publ/factsheets/legal_texts/aqua/aquaculture/animal_disease_es.htm	<u>EUROPA - Pesca - Legislación - Acuicultura - Enfermedades ...</u>	un programa en relación con la <i>Bonamia ostreae</i> y la Marteilia refringens ...
www.mapya.es/jacumar/normativa/sanitaria3.asp?IdTipoSanidad=2&IdTitulo=9	<u>JACUMAR</u>	... los métodos de diagnóstico para la detección y la confirmación de la presencia
www.ugr.es/~secredei/memoria/Memoria2002-2003/cd/docencia_investigacion/departamentos/genetica.htm	<u>ACTIVIDADES CULTURALES</u>	... Nombre de la tesis: ESTUDIO MOLECULAR INTEGRADO DE LAS OSTRAS Y DE SU PARÁSITO,
www.geocities.com/acquapiscis/dmoie3.html	<u>MARTEILIOSIS</u>	... de ellos. Marteilia refringens : Huéspedes susceptibles: <i>Ostrea edulis</i> , (Basado en la OIE)
www.cde.ua.es/dsi/nov02vf.htm	<u>DSI - Política veterinaria y fitosanitaria - noviembre 2002</u>	... y métodos de diagnóstico para la detección y confirmación de la presencia de (Ley periodos de muestreo en la EU)
www.juntadeandalucia.es/agriculturaypesca/pesca/acuicultura/paginas/prog_posters.htm	<u>Pósters expuestos</u>	... Un nuevo método de diagnóstico molecular de Marteilia refringens mediante nested-PCR
www.todalaley.com/versumarioDOCEp250441s1.htm	<u>Sumario del Diario Oficial de las Comunidades Europeas de fecha 07 ...</u>	... y métodos de diagnóstico para la detección y confirmación de la presencia de (Resúmenes)
www.geocities.com/acquapiscis/dmoie4.html	<u>MICROCITOSIS</u>	... ellos. Mikrocytos mackini : Huéspedes susceptibles: <i>Crassostrea gigas</i> ,
www.geocities.com/christophbeck/enferm.html	<u>AquaTips-Enfermedades</u>	... 6 KB. Normativa y Situación del Uso de Fármacos en Acuicultura. 9 KB. Perkinsosis .
www.oie.int/fdc/eng/sp_diseasecard.htm	<u>Information available on the OIE site for the Aquatic Animal ...</u>	... Bonamiosis. Haplosporidiosis. Marteiliosis. Microcitosis. Perkinsosis . Enfermedades (Fichas técnicas OIE)

2.2.4. Búsqueda en revistas de investigación de universidades con carreras afines

Se procedió a analizar toda la información recopilada siguiendo los criterios establecidos en el punto anterior. De esta forma, se revisaron las publicaciones nacionales en revistas de investigación pertenecientes a las universidades con carreras afines (Cuadro 34), desestimando sólo una de las publicaciones presentadas por no guardar relación con la información de interés para este estudio.

CUADRO 34: Publicaciones nacionales en revistas de instituciones con carreras afines

Fecha	Título	Autor
2001	Anormalidades en larvas de <i>Argopecten purpuratus</i> (Lamarck, 1819) (Mollusca: Pectinidae), uno de los problemas en la producción artificial de semilla.	Miguel Avendaño, Marcel Le Pennec y Marcela Cantillanez Estud. Oceanol.20: 33-42.
2001	Diferenciación genética y morfológica entre dos poblaciones del pectinido <i>Argopecten purpuratus</i> de la costa norte de Chile.	D. Moraga, M. Avendaño, J. Peña, M. Le Pennec, A. Tanguy y J. Baron Estud. Oceanol.20: 51-60
1995	<i>Polydora</i> sp. (Spionidae), un poliqueto perforador de las valvas del ostión <i>Argopecten purpuratus</i> (Bivalvia: Pectinidae) en bahía Tongoy, Chile	Basilio, C.D., J. I. Cañete y N. Rozbaczylo Rev. Biol. Mar., Valparaíso 30(1): 71-77
2002	Bacterias en la hemolinfa de <i>Argopecten purpuratus</i> (Lamarck, 1819) (Bivalvia: Pectinidae)	García-Tello, V. Ardiles, y J. L. Fajardo Rev. biol. mar. oceanogr. 37 (2): 147-149

Según lo propuesto, se debía contrastar toda la información recopilada con los procedimientos señalados en el Manual OIE y construir un cuadro resumen de los métodos propuestos. Sin embargo, se consideró que esto no era necesario tomando en cuenta la poca información nacional disponible en relación con los protocolos de diagnóstico y, además, que la información desprendida del análisis se encuentra descrita en el Manual OIE. Por otra parte, la información científica detectada del análisis bibliográfico desarrollado está también basada en los protocolos estandarizados de la OIE (Cuadro 26).

Con la finalidad de proponer el método más adecuado, se procedió a presentar los métodos recopilados para cada patología o patógeno detectado en el país en la reunión de trabajo establecida en la propuesta técnica, en la cual se debía discutir los procedimientos y métodos de prevención y control que emanarán del Objetivo 4.4.

Esta reunión fue programada para la última semana de agosto y debía contar con la participación de los integrantes del equipo de trabajo de este proyecto, además de los representantes de las instituciones Sernapesca y Subsecretaría de Pesca, así como también los expertos nacionales del registro de expertos por categorías de Sernapesca.

2.3. Reunión de Trabajo

La reunión de trabajo se llevó a cabo el día 30 de agosto del presente año y contó con la participación de Marcelo Casali del Departamento de Sanidad Pesquera de Sernapesca, Ana María Skármeta de la Subsecretaría de Pesca, Mariel Campalans, Jefe de Proyecto y Karin Lohrmann de la Universidad Católica del Norte. Se excusó de participar el Sr. Marcos Godoy de Fundación Chile y parte del registro de expertos por categorías de Sernapesca, por compromisos adquiridos previamente en la ciudad de Pto. Montt.

Esta actividad tenía como objetivos presentar los métodos recopilados para cada patología o patógeno detectado en el país, discutir los procedimientos y métodos de prevención y control emanados del Objetivo 4.4. y proponer los métodos de diagnóstico más adecuados para las enfermedades de moluscos, a fin de ser utilizados en los laboratorios del país que trabajen en patologías de moluscos.

Con este fin se procedió a estructurar dicha reunión de la siguiente forma:

1. Presentación del Jefe de Proyecto sobre el marco de la reunión, marco de este estudio, comparación de técnicas utilizadas para la detección de enfermedades de alto riesgo.
2. Presentación del Programa de Manejo Sanitario Preventivo de Moluscos del presente estudio.
3. Discusión del Programa.

Como parte del debate generado, se trataron diversos temas, como por ejemplo la susceptibilidad a las enfermedades de alto riesgo del Ostión del Norte. En relación a este tema, se aclaró que si bien esta especie no forma parte de los programas de vigilancia, su

susceptibilidad a dichas enfermedades es más bien cuestionable. Esta característica es un criterio de Sernapesca, no adoptado por la Comunidad Europea, ya que para ésta la susceptibilidad o no susceptibilidad debe ser comprobada.

Luego, se procedió a presentar las enfermedades detectadas en el presente estudio y las técnicas utilizadas. En este punto se discutió sobre el diseño de muestreo y sobre los problemas enfrentados para la obtención de las muestras, los cuales tuvieron directa relación con el Listado de Concesiones. En relación a este punto, se abordó el tema del Programa de Vigilancia Activa, el cual debiera servir para conocer el estado actual de las concesiones, debido a que los centros están obligados a informar sus muestreos y para participar en los muestreos de este programa dichos centros deben necesariamente formar parte del Listado de concesiones. Además, se abordó específicamente la situación actual de la Ostra chilena en la X Región y la dificultad enfrentada para encontrar los centros de cultivo productores de la especie.

Por otra parte, se presentaron los hallazgos del parásito *Bonamia* sp. en ostra chilena y se explicaron las técnicas utilizadas para su detección, principalmente la histología y se expuso la comparación de las técnicas de diagnóstico propuestas por la OIE y las utilizadas en este estudio.

Finalmente, se abordó el tema de la revisión bibliográfica destinada a detectar las técnicas utilizadas en Chile y se discutió el hecho que no se ha detectado ni la existencia ni práctica de otras técnicas diferentes a las recomendadas por la OIE. En este aspecto, se discutió sobre la validación de otras técnicas, como por ejemplo el PCR, el cual no está validado por la OIE pero que a veces la valida como técnica de diagnóstico.

2.3.1. Resultados y conclusiones

Como parte de esta reunión de trabajo se tomaron diferentes acuerdos dirigidos a mejorar y ampliar la información disponible y obtenida a través del presente estudio. Es así como los expertos del sector público solicitaron la inclusión del tema de las concesiones para así detectar las irregularidades existentes.

Además, se solicita al equipo de trabajo incluir en el informe final del proyecto la "no-comprobación de la susceptibilidad a las enfermedades de alto riesgo" del Ostión del Norte.

Por otra parte, y tomado en cuenta el Manual de Diagnóstico de la OIE (2004) y la normativa vigente, se acuerda evitar referirse a las enfermedades como Bonamiosis, Perkinsosis, etc., sino más bien a infección por *Bonamia ostreae*, por ejemplo. Por lo cual se actualizó los Cuadros 27 y 28 del informe, acogiendo esta observación.

Debido a que la reunión debió ser suspendida por compromisos adquiridos con anterioridad de los participantes, quedó pendiente la presentación del Programa de Manejo Sanitario Preventivo de los Moluscos, Proyecto FIP 2003-27. Sin embargo, se acordó enviar la información vía correo electrónico a los representantes de los servicios, quienes debían remitir sus comentarios a la propuesta. No se recibió respuesta, por lo que se asume que no habrían observaciones importantes.

2.4. Comparación protocolos proyectos FIP 95-32 y FIP 2001-09

De la comparación y análisis de protocolos de diagnóstico entre los proyectos FIP 95-32 "*Desarrollo de un programa de detección y tratamiento de enfermedades en moluscos cultivados en Chile*" y FIP 2001-09 "*Técnicas de diagnóstico de enfermedades de salmónidos, mitílidos, pectínidos y ostréidos*" se pudo observar que si bien los procedimientos generales y específicos de análisis son en esencia los mismos, el proyecto FIP 2001-09 presenta una versión mucho más actualizada, presentando por ejemplo, un procedimiento más detallado en lo referente a la toma de muestras y métodos de diagnóstico.

Además, se observó que los procedimientos específicos del proyecto FIP 95-32 fueron hechos en base a Fisher, 1998, Elston, 1994 y OIE, 1995, mientras que el segundo, fue realizado enteramente en base al Manual de la OIE, 2000. Por este motivo, es posible detectar diferencias importantes en los análisis histológicos y citológicos y la ausencia total de toda información referente a la identificación confirmatoria del patógeno en el primer proyecto.

OBJETIVO 4.3:

Análisis de los factores ambientales asociados a la presencia de patologías relevantes en las poblaciones de moluscos de cultivo.

3.1. ANTECEDENTES

La expresión o no-expresión de un patógeno determinado en un huésped va a depender de la susceptibilidad de éste y de su capacidad de resistencia. Se define susceptibilidad como la capacidad de un huésped de dar cabida a las necesidades vitales de un parásito. Resistencia es la respuesta de un hospedador frente a la invasión por parte de un parásito. Esta respuesta puede ser de dos tipos, humoral o celular, siendo esta última llevada a cabo por los hemocitos (Sindermann 1990). Las respuestas defensivas de los hemocitos consisten en procesos como encapsulación, fagocitosis, inflamación y reparación de lesiones.

Se conoce que las variaciones naturales del ambiente tienen un rol importante en la defensa de muchos animales, y esto es más cierto aún para los moluscos marinos o estuarinos, cuya temperatura y salinidad interna, es muy parecida a las del medio ambiente, por lo tanto se encuentran sujetos a las fluctuaciones diurnas, con el ciclo de mareas y estacionales (Fisher, 1988). Existen diversos estudios sobre la acción de factores ambientales, en particular la temperatura y la salinidad, sobre la actividad de los hemocitos puesto que la resistencia que un molusco pueda tener frente a un patógeno, dependerá en buena medida de la capacidad defensiva de éstos (Chu 2000; Chu *et al.* 2002; Fisher 1988; Ford and Tripp 1996).

Existen además algunos estudios en que se correlacionan parámetros ambientales con la patogenicidad de los parásitos, especialmente para aquellos que se han estado estudiando por mayor número de años. Uno de los primeros casos registrados en la literatura fue la alta mortalidad de *Crassostrea virginica*. Al evaluar los efectos de efluentes de agua de una planta termo-eléctrica a temperaturas elevadas, 28-30°C, se detectó una mayor mortalidad de las ostras. Farley *et al.* 1972, describió un virus Herpes en estas

ostras, el que luego se encontró también en ostras a temperaturas normales (18-20 °C), sin causar mortalidades. El efecto de altas temperaturas en la expresión de virus en larvas de moluscos también ha sido reportado para la ostra del Pacífico (LeDeuff *et al.* 1996). Se sugiere que infecciones latentes podrían ser convertidas en infecciones patentes bajo el efecto de la temperatura, u otros factores ambientales (Sindermann 1990).

También se ha observado el efecto directo de factores ambientales en el desarrollo de *Perkinsus marinus*, un importante parásito de la ostra *C. virginica* a lo largo de la costa este de USA. Existen numerosos estudios sobre este patógeno, en que se ha encontrado que su desarrollo y patogenicidad son mayores a temperaturas y salinidades altas (Burreson & Ragone-Calvo 1996; Ford 1996; Ragone-Calvo & Burreson 1994).

Otros estudios señalan que la temperatura es el principal factor que afecta la patogenicidad de *Haploporidium nelsoni* sobre *C. virginica*.

En estudios *in vitro* realizados en abalón rojo, se comprobó el efecto estimulante de temperaturas elevadas sobre el agente rickettsial que ocasiona el síndrome del marchitamiento del pie (Moore *et al.* 2000; Vilchis *et al.* 2002).

El protozoo *Bonamia ostreae* presenta un ciclo de mortalidades que tiende a declinar después de dos o más años en que se presenta en una localidad. En estos lugares, la mortalidad en las ostras durante el primer año se aproxima a un 100% y luego tiende a declinar a niveles de 20% a 60% después que la *Bonamia* ha estado presente por dos o más años (Elston, 1994). La enfermedad se puede presentar en cualquier momento del año pero generalmente se asocia con el alza de las temperaturas que se producen durante primavera y verano. Los índices importantes de mortalidad ocurrirían cuando las temperaturas oscilan entre los 12°C y los 20°C y no con temperaturas superiores (Elston, 1994).

Para el caso de la Bonamiosis en el Hemisferio sur, se han podido conocer sus características epizootiológicas a través de los trabajos realizados por Hine. La investigación realizada por Hine en 1996 entrega una importante teoría, al investigar las mortalidades asociadas a *Bonamia* a lo largo de la historia de una zona de cultivo de Nueva Zelanda, concluyó que la población de ostras experimentaría grandes mortalidades cada 20 o 30 años, las cuales pueden ser atribuidas a la Bonamiosis. Hacia el término de estos amplios ciclos, la patogenicidad de *Bonamia* disminuiría, atribuyendo este fenómeno a la cinética del parásito. En este sentido, la dinámica de la población y la selección de

huéspedes resistentes (sobrevivientes) al parásito y la cinética de transmisión del protozoo, podría explicar la naturaleza cíclica de las mortalidades a gran escala.

El Cuadro 35 resume la información bibliográfica sobre los factores ambientales relacionados con las enfermedades.

CUADRO 35: Registro de factores ambientales relacionados a la expresión de los patógenos de alto riesgo.

Enfermedad	Agente	Huésped	Fact. Ambiental	Autor
Bonamiosis	<i>B. ostreae</i>	<i>O. edulis</i> <i>O. conchaphila</i> <i>T. puelchona</i> <i>T. angasi</i> <i>T. chilensis</i>	Aguas templadas 12°C - 20°C (verano)	OIE, 2000 Elston, 1994
	<i>B. sp. (exitiosus)</i>	<i>O. angasi</i> <i>O. densellamimelosa</i> <i>T. chilensis</i>		
Perkinsiosis	<i>P. marinus</i>	<i>Crassostrea virginica</i>	Salinidad menores a 12-15‰ No se presentan mortalidades serias.	Elston, 1994
	<i>P. olseni</i>	<i>Haliotis ruber</i> <i>H. cyclobates</i> <i>H. scaralis</i> <i>H. laevigata</i>	Temperaturas de 18 a 30°C Sobre 20% en aguas tropicales	OIE, 2000
Haplosporidiosis	<i>H. costale</i>	<i>Crassostrea virginica</i>	Salinidad sobre 15‰ Grandes mortalidades a 20‰ Temperaturas sobre 20°C no le favorecen	OIE, 2000
	<i>H. nelsoni</i>	<i>Crassostrea gigas</i> <i>Crassostrea virginica</i>		Elston, 1994
Marteiliosis	<i>M. refringens</i>	<i>O. edulis</i>	Temperaturas mayores a 17°C	OIE, 2000
	<i>M. sydney</i>	<i>S. commercialis</i> <i>S. chinata</i>	Altas salinidades limitan su manifestación clínica	

(Continuación CUADRO 35)

Microcitosis	<i>M. mackini</i>	<i>C. gigas</i>	Temperaturas menores a 12°C	OIE, 2000
	<i>M. roughleryi</i>	<i>S. commercialis</i>	En hemisferio sur con temperaturas bajas menores o iguales a 10°C y altas 5‰	
Sabellidosis	<i>Terabrasabella heteroucinata</i>	<i>H. refuscens</i> <i>H. fulgens</i> <i>H. corrugata</i> <i>H. midae</i> <i>Y otros gastrópodos</i>	Temperaturas entre 12 y 21°C	Finley & Friedman, 2000
Síndrome del Marchitamiento en abalones	<i>Candidatus Xenthaliotidis californiensis</i>	<i>H. cracherodii</i> <i>H. rufescens</i>	Alta temperatura, 18 a 20°C aceleran el desarrollo	Friedman, 2000

3.2. DESARROLLO METODOLÓGICO

La revisión bibliográfica establecida para este objetivo, se realizó esencialmente siguiendo la metodología y criterios de selección establecidos en el Objetivo 4.2 de la propuesta técnica. De esta forma, se revisó todos aquellos documentos nacionales e internacionales que tuvieran relación con los factores ambientales asociados a la presencia de patologías. Además, se consultó la base de datos de publicaciones especializadas disponibles en las Universidades participantes en este estudio.

Para la selección de los temas de interés, se utilizó los siguientes criterios:

1. Documentos y trabajos de investigación no indexados
 - Tesis y documentos de circulación restringida disponibles en las instituciones de educación superior con carreras a fines.
 - Trabajos de investigación con fondos concursables
2. Publicaciones indexadas desde 1995 a la fecha.
 - Publicaciones que incluyen sólo las enfermedades de declaración obligada a la OIE.
 - Publicaciones que incluyen las especies de interés para el estudio.

- Información relacionada a factores ambientales.

Estas publicaciones se han localizado consultando la base de datos de publicaciones especializadas disponibles en la Universidades participantes en este estudio y resumidas en el Cuadro 36.

CUADRO 36: Base de Datos de buscadores de revistas científicas disponibles en Biblioteca de la PUCV (www.biblioteca.ucv.cl/Bvirtual/index.htm) y UCN (www.ucn.cl/bidoc/e_revistas/default.asp#)

Servicio de la Biblioteca Virtual	Detalle
First Search OCLC	80 bases de datos referenciales. Abarca todas las áreas del conocimiento y almacena más de 250.000.000 registros.
SCIELO	Colección de revistas científicas de Latinoamérica y España (Proyecto Conycit).
Inside British Library	Acceso a publicaciones periódicas y conferencias disponibles en bibliotecas británicas. Abarca todas las áreas del conocimiento.
ISI Web of Sciences	
Journal online	Base de datos que contiene una amplia gama de revistas científicas.
PUBMED	Base de datos de revistas médicas (Acceso a técnicas de diagnóstico).
Science Direct de Elsevier	Base de Datos que contiene una amplia gama de literatura científica, técnica y médica.
ProQuest	Servicio online con acceso a miles de revistas y diarios.
Science Magazine	
Papers de Investigación	Servicio electrónico que contiene publicaciones en física, matemáticas, ciencias e informática, perteneciente a Cornell University.

3.2.1. Documentos disponibles en instituciones de educación superior con carreras afines.

Para obtener información nacional sobre los parámetros ambientales que podrían relacionarse con la expresión de los patógenos de alto riesgo, se realizó un análisis de las variables de interés, detectadas por bibliografía en cada zona de cultivo de las especies contempladas en este estudio.

Para tal efecto se efectuó una búsqueda exhaustiva en bibliotecas de universidades con carreras afines, incluyendo para este objetivo la carrera de Oceanografía (Cuadro 37).

CUADRO 37: Revisión bibliográfica documentos de Tesis Universidades chilenas.

Institución	Nombre
Universidad de Chile	Romero Ormazábal, Jaime M. 2002. <i>Microflora en ostras chilenas y su incidencia en la colonización por vibrios patógenos y en la descomposición post-cosecha.</i>
Universidad de Chile	Paratori Girardi, Marcela M. 2001. <i>Análisis del comportamiento biométrico y reproductivo de dos stocks de ostión del norte, <u>Argopecten purpuratus</u> (Lamarck, 1819).</i>
Pontificia Universidad Católica de Valparaíso	Alvarez Cortés, Jorge E. 2000. <i>Evaluación del efecto de la contaminación por concentraciones subletales de cobre, sobre el desarrollo embrionario y larval de <u>Mytilus chilensis</u>.</i>
Pontificia Universidad Católica de Valparaíso	Ortiz Cárdenas, Sara del Pilar. 1998. <i>Fluctuaciones espacio-temporales de las características físicas y químicas del agua de mar frente a Coquimbo (35°C).</i>

Del análisis de estos documentos se desprende que si bien se abordan temas relacionados con variables ambientales, muchos de los textos recopilados durante el informe de avance (Anexo 7) no presentan información sobre la influencia de éstos sobre la presencia o desarrollo de las enfermedades de alto riesgo y se abordan temas como por ejemplo los métodos bioquímicos para la identificación de bacterias, presencia de coliformes fecales, etc.

3.2.2. Revisión trabajos de investigación fondos concursables.

De la revisión de trabajos de investigación de fondos concursables (FONDEF) e informes finales de proyectos FIP se encontró y analizó los siguientes trabajos pertinentes a este objetivo (Cuadro 38).

CUADRO 38: Resumen de los proyectos financiados por fondos concursables.

Número de Proyecto	Nombre
Proyecto FIP 99-23	Diseño de monitoreo ambiental para las actividades de acuicultura en la zona Sur - Austral.
Proyecto FIP 96-55	Investigación de variables que influyen en el desarrollo de piure blanco en cultivos de ostión
Proyecto FIP 94-01	Evaluación del efecto de mitigación de aporte de nutrientes al medio, al desarrollar policultivos marinos de salmónidos

De la revisión de los proyectos realizados o en realización con los fondos concursables (FONDEF), no se encontró ningún proyecto pertinente a este objetivo. A pesar de haber bastante investigación financiada en el área de los moluscos, la mayoría de los proyectos apunta hacia el desarrollo de nuevas tecnologías de cultivo, diversificación de los cultivos y fomento a la producción, siendo escasas las inversiones en relación al estado sanitario de los cultivos o variables ambientales que influyen en su desarrollo, tanto de los moluscos como en patologías. Los proyectos FONDEF en el área de moluscos se detallan en el Anexo 5.

Con respecto al proyecto FIP 96-55 *“Investigación de variables que influyen en el desarrollo de piure blanco en cultivos de ostión”*, se indican factores biológicos, físicos y químicos que influyen en el crecimiento y desarrollo del piure blanco, factores que pueden ser usados como información para relacionar con la aparición de condiciones patológicas de los moluscos de cultivo.

El proyecto FIP 94-01 *“Evaluación del efecto de mitigación de aporte de nutrientes al medio, al desarrollar policultivos marinos de salmónidos”*, entre sus objetivos específicos considera evaluar el aporte de nutrientes al medio, lo que entrega algo de información acerca de parámetros ambientales que pueden tener relación con el desarrollo de patologías asociadas a ciertas condiciones ambientales.

3.2.3. Publicaciones Nacionales e Internacionales (indexadas)

La información nacional e internacional sobre los parámetros ambientales relacionados con la expresión de los patógenos de alto riesgo, se obtuvo del análisis de las publicaciones internacionales relacionadas con el aspecto epizootiológico de los patógenos de alto riesgo. Los Cuadros 39 y 40 presentan las publicaciones, nacionales e internacionales, que fueron seleccionadas y analizadas para determinar su pertinencia con lo establecido en este objetivo.

3.2.3.1. Publicaciones Nacionales

El análisis de las publicaciones nacionales recopiladas (Anexo 7) se realizó siguiendo la metodología descrita anteriormente. Una vez analizada cada una de ellas, se procedió a seleccionar las que tenían directa relación con lo establecido en este Objetivo (Cuadro 39).

Del análisis realizado, se pudo constatar que si bien las publicaciones recopiladas con anterioridad (Anexo 7) describen en su mayoría condiciones o parámetros ambientales, muchas de ellas no guardan relación con la presencia de las patologías en estudio. Es así, como por ejemplo en la publicación "*Influencia de la luz en la maduración sexual de hembras Octopus mimus*" se establece que la maduración en condiciones de cautiverio ocurre bajo condiciones pobres de luz y que al aumentar la exposición a ésta se retarda la maduración. Sin embargo, no se analiza ni desarrolla la influencia de la iluminación sobre el desarrollo o presencia de patologías de interés. De la misma forma, en la publicación "*Catálogo descriptivo de los moluscos litorales (Gastropoda y Pelecypoda) de la zona de Antofagasta, 23°S (Chile)*" se entrega información relativa a la diagnosis referencial, distribución geográfica, característica de la concha, datos biológicos y características ecológicas observadas en terreno de cientos de moluscos, pero no se aborda el tema de las condiciones ambientales en relación a las patologías de moluscos.

Por otro lado, las publicaciones "*Establecimiento de bacterias benéficas en el tracto digestivo y gónada de adultos de Argopecten purpuratus (Lamarck, 1819) en cultivo masivo*" y "*Utilización de biopelículas bacterianas en el asentamiento de larvas de*

Argopecten purpuratus (Lamarck 1819) en un hatchery comercial" aportan datos importantes sobre el rol que juegan las interacciones bacteria - microalga en ambientes marinos y dulceacuícolas, ya que en ellas se definen las posibles aplicaciones que puede tener el conocimiento de estas interacciones en el manejo de las aguas costeras y sistemas acuícolas.

CUADRO 39: Publicaciones en revistas de universidades con carreras a fines

Fecha	Título	Autor
1997	Necesidad de crear una reserva marina de ostiones en el Banco de la Rinconada (Antofagasta - II Región, Chile)	Miguel Avendaño y Marcela Cantillanez Estud. Oceanol.16: 109-113.
1997	Estudio de los requerimientos nutricionales del ostión del norte <i>Argopecten purpuratus</i> (Lamarck, 1819) durante el acondicionamiento reproductivo.	A. Farías, I. Uriarte y P. Varas Rev. biol. mar. oceanogr. 32 (2): 127-136
2001	Establecimiento de bacterias benéficas en el tracto digestivo y gónada de adultos de <i>Argopecten purpuratus</i> (Lamarck, 1819) en cultivo masivo.	R. E. Avendaño-Herrera, M. Dekovic y C. E. Riquelme Rev. biol. mar. oceanogr. 36 (1): 31-41
2002	Utilización de biopelículas bacterianas en el asentamiento de larvas de <i>Argopecten purpuratus</i> (Lamarck 1819) en un hatchery comercial	R.E. Avendaño-Herrera, C.E. Riquelme y F. Silva Rev. biol. mar. oceanogr. 37 (1): 35-41

3.2.3.2. Publicaciones Internacionales

El análisis de las publicaciones internacionales recopiladas para el proyecto se realizó siguiendo la metodología descrita anteriormente. Una vez analizada cada una de ellas, se procedió a seleccionar las que tenían directa relación con lo establecido en este Objetivo (Cuadro 40).

Del análisis realizado se detectó que todas las publicaciones tenían relación directa con la influencia de condiciones o parámetros ambientales en la presencia y/o desarrollo de las patologías de alto riesgo en estudio. Es así como por ejemplo se detectó información relativa la influencia del medioambiente en la transmisión de *Marteilia refringens* y los efectos sinérgicos de la temperatura, salinidad y concentración de células infecciosas en la

infección por *Perkinsus marinus* en ostras. Además, se analizó información sobre la influencia de la temperatura en la diseminación de un virus tipo herpes en *Triostrea chilensis*. Finalmente, se analizaron datos sobre los efectos de eventos de agua dulce en la infección de *P. marinus* en la sobrevivencia de las ostras y los patrones de estacionales de intensidad de este agente.

CUADRO 40: Publicaciones internacionales analizadas.

Año	Título	Autor
1998	"Experimental transmission of <u>Marteilia refringens</u> with special consideration of its life cycle"	Berthe, Franck C.J. et al. DAO 34:135-144.
1997	"Disease processes of the parasite <u>Perkinsus marinus</u> in eastern oyster <u>Crassostrea virginica</u> : minimum dose infection initiation, and interaction of temperatures, salinity and infective cell dose".	Chu, F.L.E., A.K. Volety. DAO 28:61-68.
1998	"Replication of a herpes-like virus in larvae of the flat oyster <u>Tiostrea chilensis</u> at ambient temperatures".	Hine, P.M. et al. DAO 32:161-171.
2003	"Environmental significance of freshets in reducing <u>Perkinsus marinus</u> infection in eastern oysters <u>Crassostrea virginica</u> : potential management applications".	La peyre, Megan et al. MEPS 248:165-176.
1999	"Effects of temperature on herpes-like virus detection among hatchery-reared larval Pacific oyster <u>Crassostrea gigas</u> "	Le Deuff, R.M. et al. MEPS 190:179-188.
1998	" <u>Perkinsus marinus</u> tissue distribution and seasonal variation in oysters <u>Crassostrea virginica</u> from Florida, Virginia and New York"	Oliver, L.M et al. DAO 34-51-61.
2003	"Systematic evaluation of factors controlling <u>Perkinsus marinus</u> transmission dynamics in lower Chesapeake Bay".	Ragone C. et al. DAO 56:75-86.
2000	"Transmission of the haplosporidian parasite MSX <u>Haplosporidium nelsoni</u> to the eastern oyster <u>Crassostrea virginica</u> in an upweller system".	Sunila, J. et al. DAO 42-153-155.

3.2.3.3. Resultados del Análisis

En el Cuadro 41 se presenta una comparación entre los factores ambientales determinados a partir de la revisión bibliográfica, y los factores ambientales presentados durante los periodos de muestreos en las diferentes zonas en estudio.

CUADRO 41: Registro de factores ambientales relacionados a la expresión de los patógenos de alto riesgo y la situación en Chile.

Infección por	Huésped	Factores Ambientales	
		Registrados en la Literatura	En Chile durante este estudio
<i>Bonamia ostreae</i>	<i>O. edulis</i> <i>O. conchaphila</i> <i>O. chilensis</i> <i>T. puelchana</i> <i>T. angasi</i>	Temperaturas entre 12 °C-20 °C	Temperaturas de la X región: 9 °C-20 °C
<i>Bonamia exitiosa</i>	<i>T. angasi</i> <i>O. densellamimelosa</i> <i>O. chilensis</i>		
<i>Bonamia roughleyi</i>	No hay especies susceptibles en Chile	Temperaturas menores o iguales a 10 °C	Temperaturas de la X región: 9 °C-20 °C
<i>Perkinsus marinus</i>	No hay especies susceptibles en Chile	Salinidades menores a 12-15‰, mortalidades bajas Temperaturas de 18 a 30°C, mortalidades sobre 20%	Salinidades de las regiones III a X: sobre 30‰
<i>Perkinsus olseni</i>			
<i>Haplosporidium costale</i>	No hay especies susceptibles en Chile	Salinidad entre 15-20‰, mortalidades altas Temperaturas sobre 20°C no le favorecen	Salinidades de las regiones III a X: sobre 30‰
<i>Haplosporidium nelsoni</i>			
<i>Marteilia refringens</i>	No hay especies susceptibles en Chile	Temperaturas mayores a 17 °C Altas salinidades limitan su manifestación clínica	Salinidades de las regiones III a X: sobre 30‰
<i>Marteilia sidneyi</i>			
<i>Terebrasabella heterouncinata</i>	<i>Haliotis rufescens</i> <i>H. fulgens</i> <i>H. corrugata</i> <i>H. midae</i> Otros gastrópodos	Temperaturas entre 12 °C-21 °C	Temperaturas en la III y IV región: 13 °C-23 °C, en la X región: 9 °C-20 °C
Candidatus <i>Xenthaliotidis californiensis</i>	<i>Haliotis rufescens</i> <i>H. chacherodii</i>	Temperaturas entre 18°C-20 °C	Temperaturas en la III y IV región: 13 °C-23 °C

3.2.4. Variables ambientales asociadas a la presencia de patología

3.2.4.1. TSM Satelital

En el Laboratorio de Teledetección y SIG (LT&SIG) de ECM-PUCV se adquirieron, procesaron y generaron imágenes satelitales de temperatura superficial del mar (TSM) obtenidas del sensor AVHRR a bordo del satélite NOAA para el muestreo Primavera - Verano y del sensor MODIS a bordo del satélite AQUA para los muestreos de Otoño - Invierno para toda las regiones en estudio. La fecha y zona geográfica de las imágenes corresponden con el período y localización de los muestreos efectuados.

3.2.4.1.1. TSM X Región

- **Muestreo Primavera - Verano**

Para caracterizar las condiciones de TSM reinantes durante la primera etapa de muestreo (Diciembre 2003), se generó una imagen del día 15 de Diciembre de 2003 que abarca la zona entre los 41-43°S y 72-74°W de la X Región (Fig. N°9). La imagen muestra la distribución espacial de la TSM cuyos valores varían entre los 9 y 13,3°C. Las TSM más bajas se encuentran en la parte sur del mar interior de Chiloé asociadas a la influencia de las masas de agua fría de origen subantártico; además, se observa que el Estuario del Reloncaví aporta aguas entre 9,5 y 10,5°C al seno del mismo nombre. Las TSM más cálidas (11,5 a 13,3°C) se observan entre el seno del Reloncaví y hasta los 42°30'S en el mar interior de Chiloe. Esta información coincide con la medición de temperatura realizada *in situ* al momento del muestreo en la localidad de Rilán, la cual fue de 13°C a 5 metros de profundidad.

Durante la segunda etapa de muestreo (Enero 2004) realizado en la X Región (Fig.N°10), se generó una imagen del día 23 de Enero de 2004 de la misma zona de la imagen de TSM del primer muestreo. La imagen muestra la TSM cuyos valores varían entre los 12,2 y 18°C, encontrándose las TSM más bajas en la parte sur del mar interior de Chiloé asociadas a la influencia de las masas de agua fría de origen subantártico.

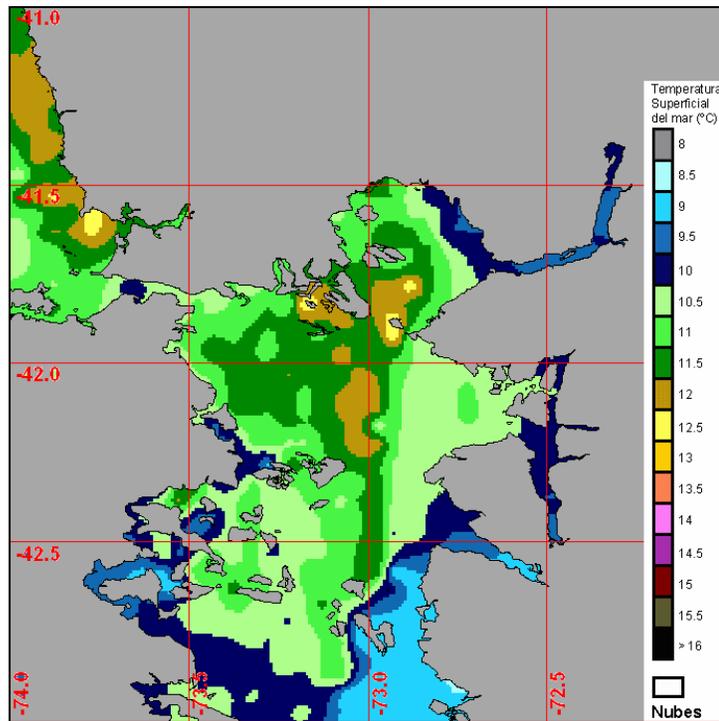


Figura N°9: Imagen satelital de TSM del 15 de Diciembre de 2003.

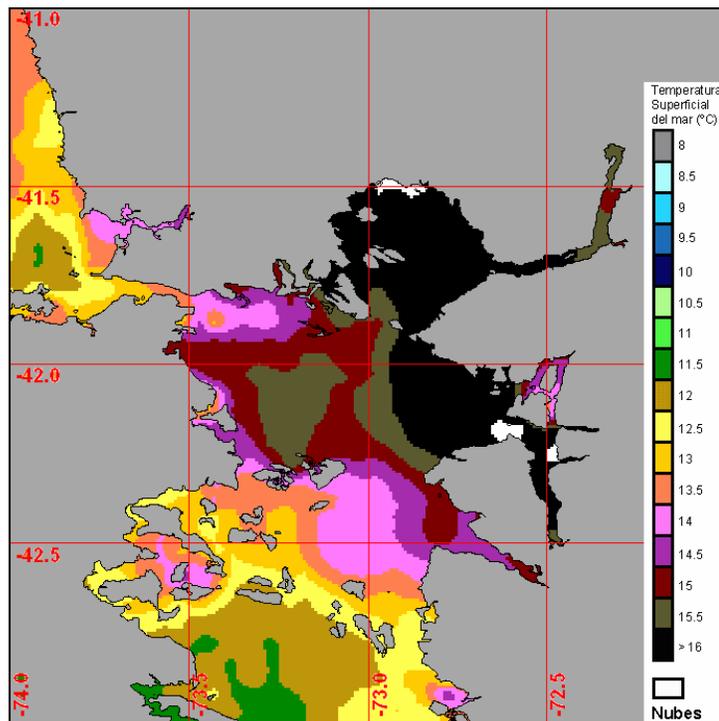


Figura N°10: Imagen satelital de TSM del 23 de Enero de 2004.

- **Muestreo Otoño - Invierno**

A nivel de mesoescla, la estructura térmica superficial del mar interior de Chiloé presente durante los muestreos de otoño e invierno (abril y agosto) se estudia con imágenes semanales de TSM, las cuales permiten una visión sinóptica del área.

La primera imagen semanal de otoño, que cubre el periodo entre el 14 y 21 de Abril de 2004, muestra una distribución espacial de la TSM cuyos valores varían entre 9,6°C y 14,9°C, con un promedio espacial de toda el área marina con datos equivalentes a 11,9°C (Fig. N°11). En la segunda imagen semanal (22-29 Abril) se observa un aumento de la TSM (Fig. N°12) con respecto a la semana anterior. En efecto se registran TSM que varían entre 9,3 y 15,6°C, con un promedio espacial de 12,5°C.

Para estudiar los muestreos de invierno, se generaron dos imágenes semanales que muestran la distribución espacial de la TSM. La primera imagen (27 de julio al 3 de agosto) muestra valores que fluctuaron entre los 8° y 11,4°C, con un promedio espacial de 10,3°C (Fig. N°13). En la segunda imagen (4-11 de agosto) se observa un leve aumento de la TSM (Fig. N°14) con respecto a la semana anterior. En efecto se registran TSM que varían entre 9,6° y 12°C, con un promedio espacial de 10,7°C.

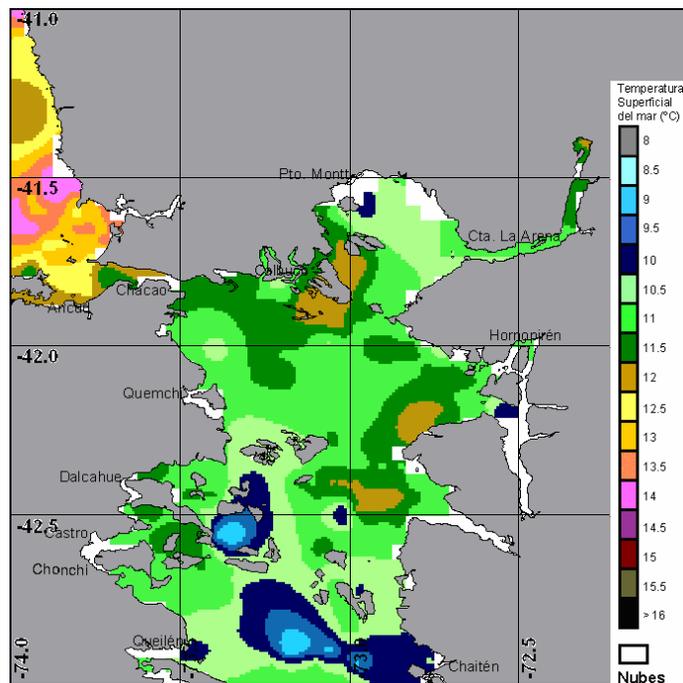


Figura N°11: Imagen satelital de TSM del período comprendido entre el 14 y 21 de Abril de 2004

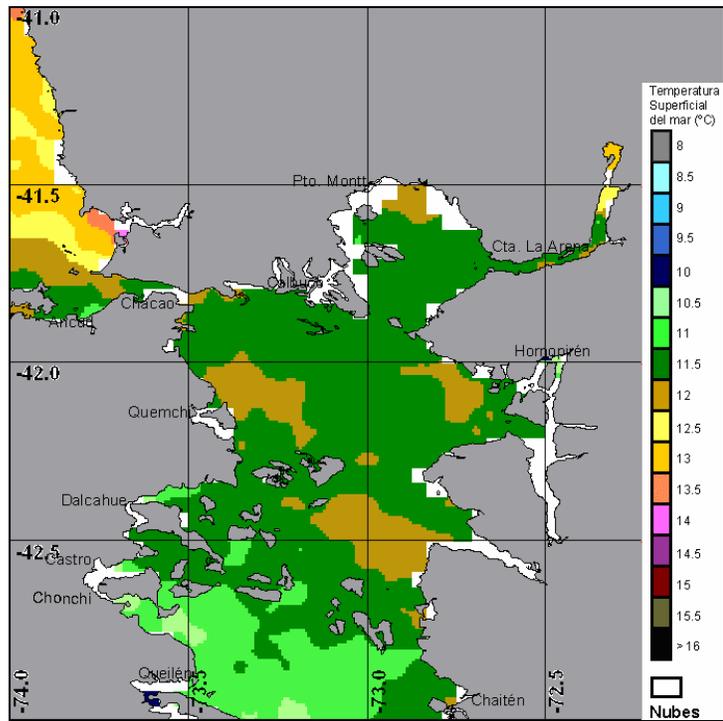


Figura N°12: Imagen satelital de TSM del período comprendido entre el 22 y 29 de Abril de 2004.

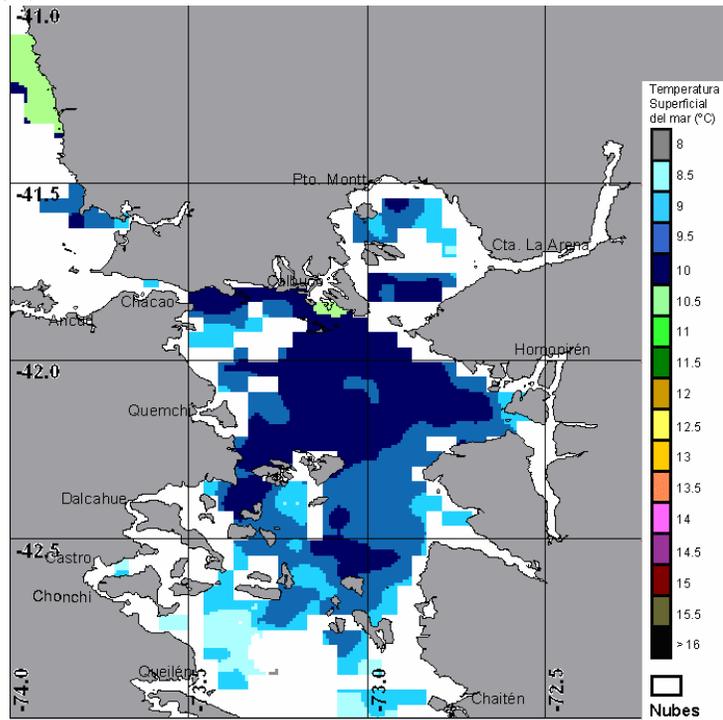


Figura N°13: Imagen satelital de TSM del período comprendido entre el 27 de Julio y 03 de Agosto de 2004.

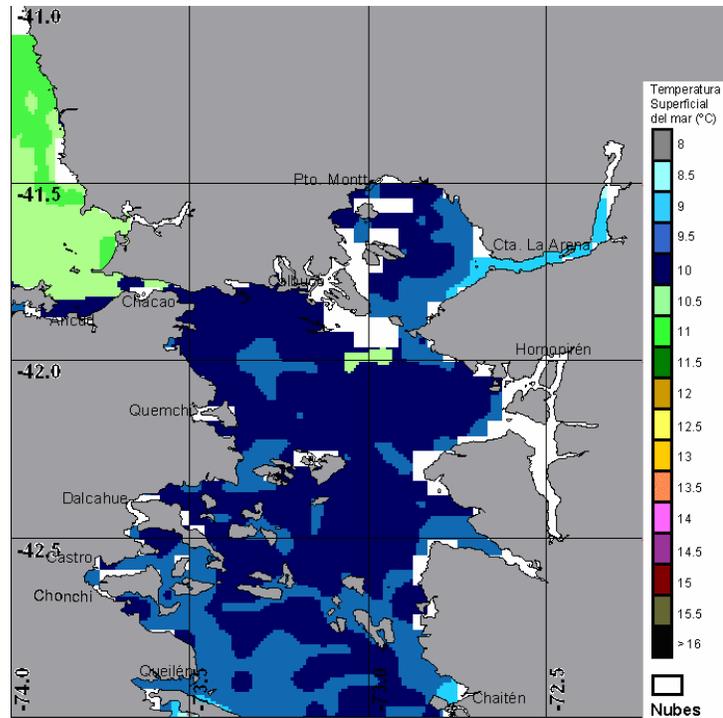


Figura N°14: Imagen satelital de TSM del período comprendido entre el 04 y 11 de Agosto de 2004

3.2.4.1.2. TSM III Región

- **Muestreo Primavera - Verano**

Durante el muestreo (Enero 2004) realizado en la III Región se generó una imagen del día 15 de Diciembre de 2003 (Fig. N°15). La imagen muestra la TSM cuyos valores varían entre los 14,2 y 19,3°C, encontrándose las TSM más bajas en las zonas costeras asociadas a eventos de surgencia producidos por los vientos Sur y Sur-Oeste predominantes en la zona y período de estudio. Dos focos de surgencia costera se observan, uno situado al norte de Caldera con TSM de 15 a 16°C, y otro localizado al sur de Huasco cuya superficie de influencia de aguas frías (14 a 15°C) es mayor. Caldera se encuentra afectado por aguas de tipo mezcla entre frías surgentes y cálidas de origen subtropical, con TSM que fluctúan entre los 16,3 y 17,2°C.

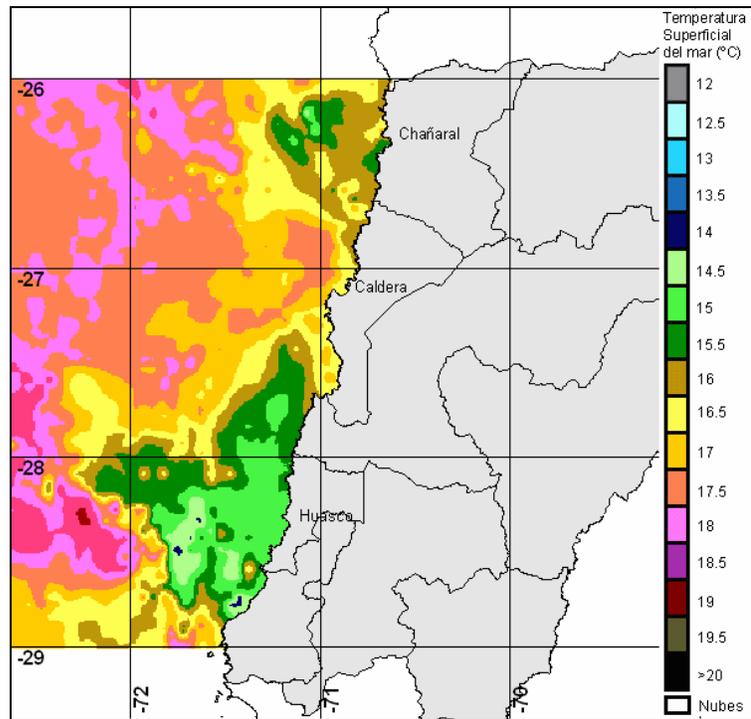


Figura N°15: Imagen satelital de TSM del 15 de Diciembre de 2003.

●Muestreo Otoño - Invierno

Para caracterizar la distribución de la TSM durante el muestreo realizado el 29 de Marzo de 2004 en Caldera, se generó una imagen semanal correspondiente al período del 24 – 31 de Marzo (Fig. N°16). La imagen muestra valores entre 15° y 21°C, registrando el área marina de Caldera un rango entre 18° y 18,5°C. En la zona costera desde Caldera hacia el sur, se observan aguas más frías que en el sector oceánico producto de los eventos de surgencia costera inducida por vientos sur sur-oeste. En efecto, se observa un marcado frente térmico 10 mn al oeste de Caldera pasando de TSM de 18°C hasta 20,7° en el sector oceánico.

Durante el muestreo del 22 de Abril de 2004, se observó una condición más fría en la TSM que la registrada en el primer muestreo (Fig. N°16), tal como se evidencia en la imagen semanal de TSM del período entre 22 y 29 de Abril (Fig. N°17). La distribución de la TSM muestra un rango de valores entre 15,8° y 20,6°C, registrándose un gradiente perpendicular a la costa con menores magnitudes en la zona costera. El área marina de Caldera registra valores entre 16,4° y 16,8°C, presentando las menores magnitudes cercanas a la costa.

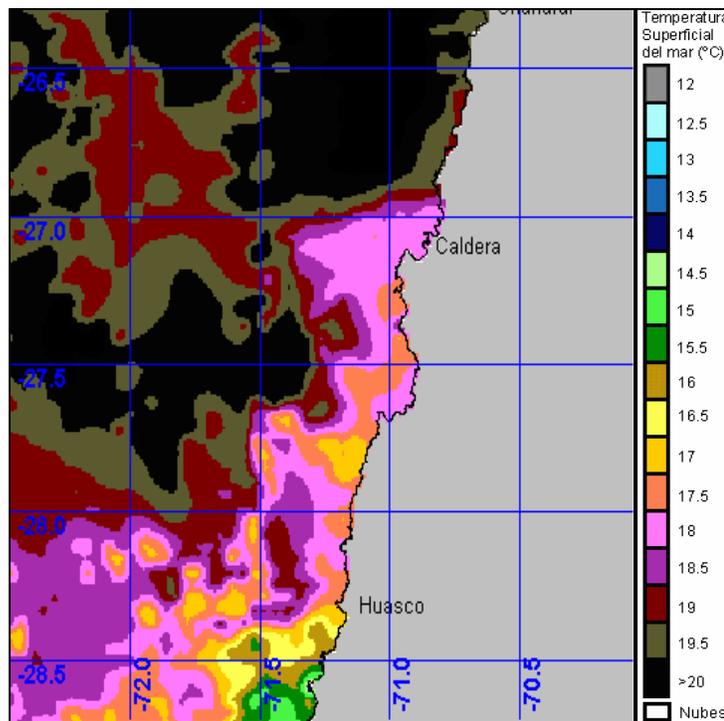


Figura N°16: Imagen satelital de TSM de la III Región para el período comprendido entre el 24 y 31 de Marzo de 2004.

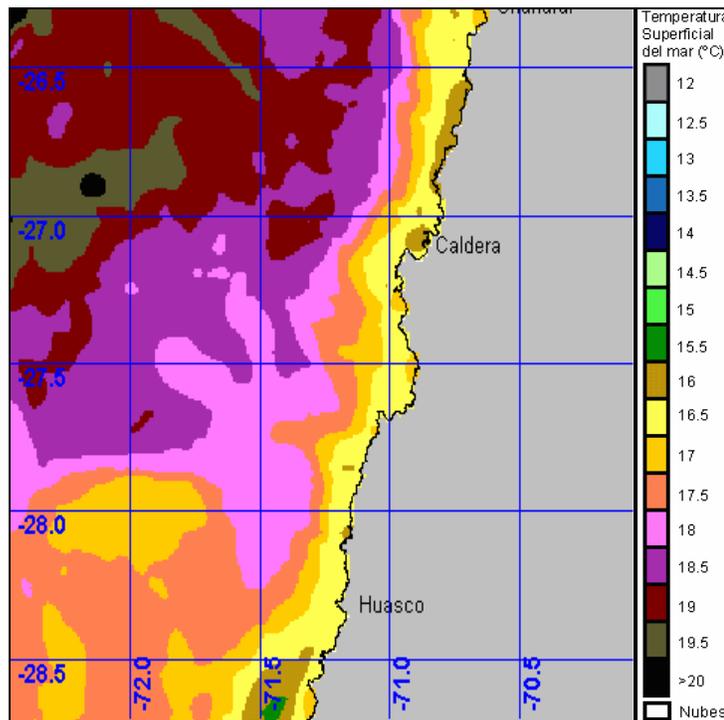


Figura N°17: Imagen satelital de TSM de la III Región para el período comprendido entre el 22 y 29 de Abril de 2004.

3.2.4.1.3. TSM IV Región

- **Muestreo Primavera - Verano**

Para el muestreo (Enero 2004) realizado en la IV Región se generó una imagen del día 09 de Diciembre de 2003 (Fig. N°18). La imagen muestra la TSM cuyos valores varían entre los 13,3 y 17,8°C, encontrándose las TSM más bajas en las zonas costeras asociadas a eventos de surgencia producidos por los vientos Sur y Sur-Oeste predominantes en la zona y período de estudio. Dos focos de surgencia costera se observan en el área, el más grande en intensidad y extensión está situado entre Punta Lengua Vaca y 20 mn al norte de Los Vilos, caracterizado por TSM que fluctúan entre los 13,6 y 15,5°C cuya influencia alcanza las 90 mn hacia el océano. Otro foco de surgencia es observado al sur de Los Vilos cuya superficie de influencia de aguas frías (13,3 a 15,5°C) alcanza las 60 mn. La Bahía de Tongoy presenta TSM entre los 15,4 y 16,3°C encontrándose afectada por aguas frías surgentes que llegan por el oeste de Punta Lengua Vaca y por aguas más cálidas que provienen del norte de Bahía Guanaqueros.

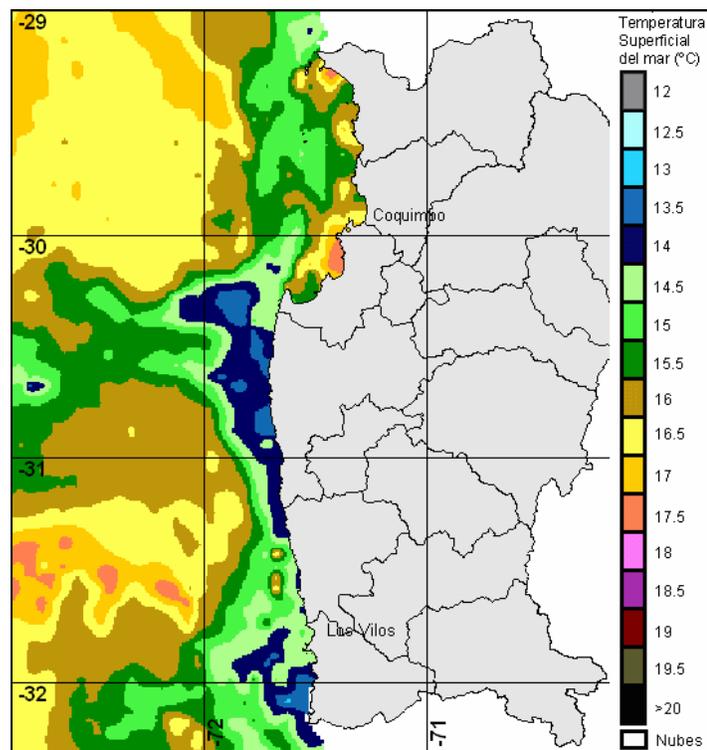


Figura N°18: Imagen satelital de TSM del 09 de Diciembre de 2003.

- **Muestreo Otoño - Invierno**

Para caracterizar la distribución de la TSM durante el muestreo realizado el 24 de Marzo de 2004 en Coquimbo, se generó una imagen semanal correspondiente al período del 24 – 31 de Marzo (Fig. N°19). Se observa que en el área de estudio los valores de TSM fluctuaron entre 14° y 19°C, encontrándose valores bajos en la zona costera. En el área marina de Coquimbo se observaron magnitudes entre 16,2° y 16,8°C, mientras que más al norte y hacia el sector oceánico la TSM muestra menores valores.

La condición de la estructura térmica superficial durante los muestreos efectuados el 4 (Coquimbo y Tongoy) y 5 (Guañeros) de Abril, es estudiada con la imagen semanal de TSM satelital del período comprendido entre el 1 y 8 de Abril (Fig. N°20). En nivel de mesoescala, el área en estudio presenta TSM entre 15,5° y 19,7°C, encontrándose los menores valores (< 16,5) en la zona de surgencia costera al sur de Punta Lengua Vaca (al oeste de la bahía de Tongoy). Al analizar la variabilidad espacial por zona de muestreo, se tiene que para la bahía de Coquimbo se presentaron valores entre 17,6° y 18°C; para la Bahía de Guañeros entre 17,6 y 17,7°C; y en la Bahía de Tongoy entre 16,9° y 17,2°C.

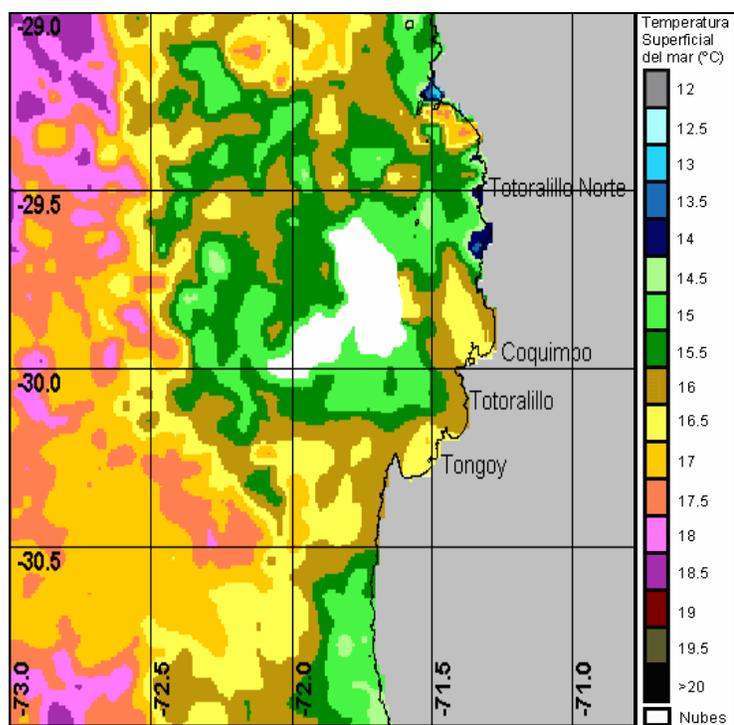


Figura N°19: Imagen satelital de TSM de la IV Región para el período comprendido entre el 24 y 31 de Marzo de 2004

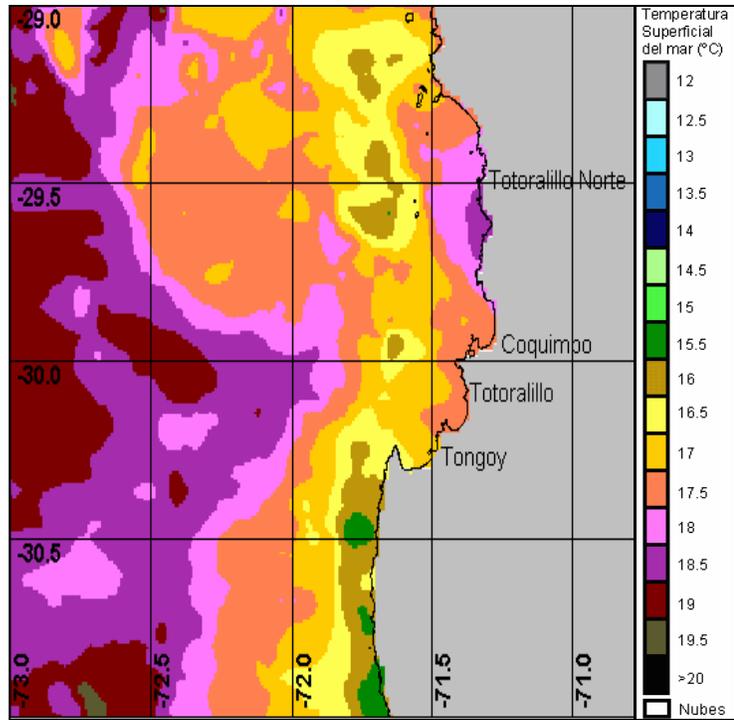


Figura N°20: Imagen satelital de TSM de la IV Región para el período comprendido entre el 01 y 08 de Abril de 2004.

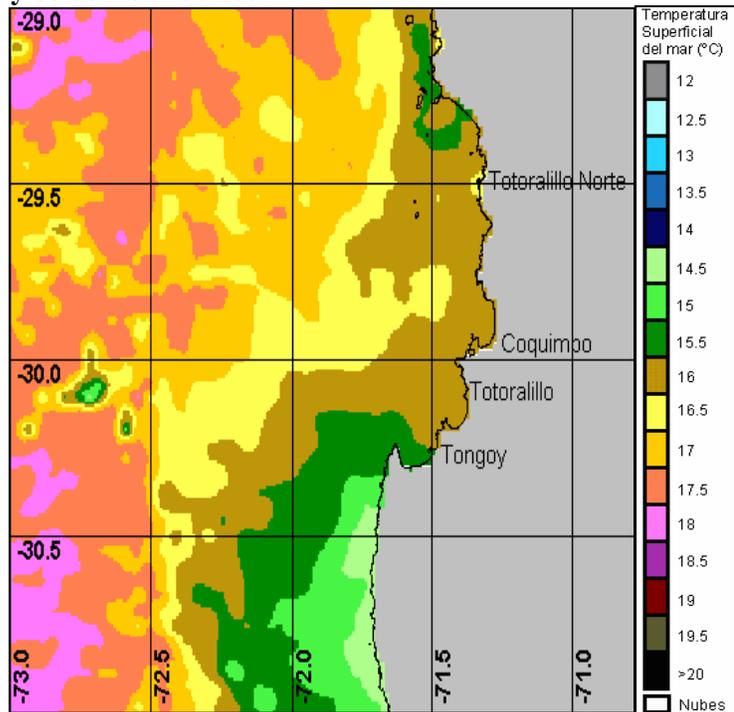


Figura N°21: Imagen satelital de TSM de la IV Región para el período comprendido entre el 22 y 29 de Abril de 2004.

El muestreo realizado el 29 de Abril de 2004 en Totalillo Norte es estudiado con la imagen semanal de TSM del período comprendido entre el 22 y 29 de Abril (Fig. N°21). En la mesoescala, la distribución espacial de TSM fluctuó en la región entre 14,5° y 18,5°C, encontrándose los menores valores ($< 16^{\circ}\text{C}$) en la zona de surgencia costera al sur de la Bahía de Tongoy. La condición de la TSM en el área marina de Totalillo Norte varía entre 16,5° y 16,7°C.

3.2.4.2. Clorofila *a* Satelital

3.2.4.2.1. Décima Región

En el Laboratorio de Teledetección y SIG (LT&SIG) de ECM-PUCV se adquirieron, procesaron y generaron imágenes satelitales de concentración de clorofila (Cloa) obtenidas del sensor MODIS a bordo del satélite AQUA.

A nivel de mesoescala, la productividad de las aguas del mar interior de Chiloé durante los muestreos Primavera - Verano es estudiada con imágenes de Cloa que permiten una visión sinóptica del área (Fig. N°22). La imagen muestra la distribución espacial de la Cloa cuyos valores varían desde 0,7 a 41 mg/m^3 , con un promedio espacial de toda el área marina con datos equivalente a 5,3 mg/m^3 . Los valores más bajos (0,7 a 2 mg/m^3) de Cloa se localizan en la parte sur del mar interior de Chiloé asociados con la influencia de aguas de origen subantártico. Altas concentraciones de Cloa se observan en el seno del Reloncaví, principalmente al sur del estuario y al sur de Calbuco. Al comparar las imágenes satelitales de TSM y Cloa, se puede observar que las altas concentraciones de fitoplancton pueden estar asociadas a la presencia de mayores temperaturas (Fig. N°9) y a la influencia de aguas estuarinas ricas en nutrientes.

Para estudiar las condiciones de productividad del área en estudio de la X Región se generó una imagen de Enero de 2004 que muestra la distribución espacial de Cloa promedio mensual (Fig. N°23). En Enero de 2004 se observa un aumento en la productividad con respecto a Diciembre de 2003, registrándose valores de Cloa que varían entre 0,9 y 40 mg/m^3 con un promedio espacial de 8,2 mg/m^3 para toda el área marina en estudio. La presencia de áreas de alta concentración podrían estar asociadas a la influencia de aguas de mayor temperatura (Fig. N°10).

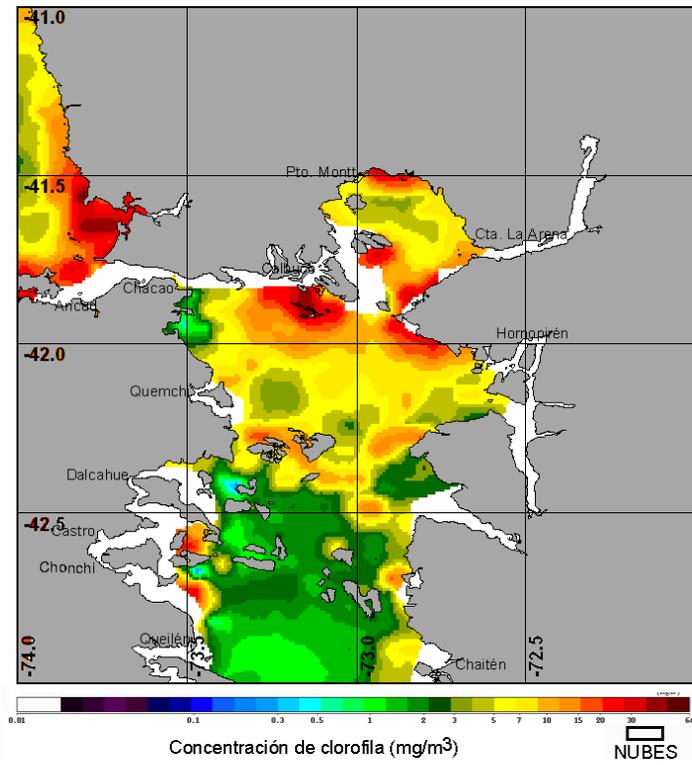


Figura N°22: Imagen satelital de Concentración de clorofila *a* de Diciembre de 2003

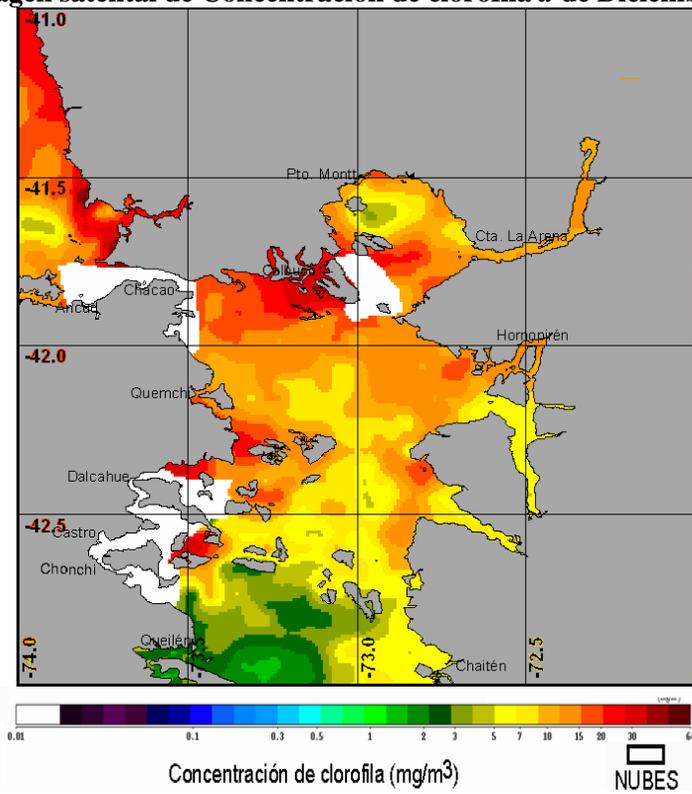


Figura N°23: Imagen satelital de Concentración de clorofila *a* de Enero de 2004.

Para estudiar las condiciones de productividad del muestreo Otoño - Invierno (abril y agosto de 2004) se generan imágenes semanales de Cloa que permiten una visión sinóptica del área.

La primera imagen semanal de otoño, que cubre el periodo entre el 14 y el 21 e3 abril, muestra una distribución espacial de Cloa, cuyos valores varían desde 0,2 a 15 mg/m³, con un promedio espacial de toda el área marina con datos equivalentes a 1,9 mg/m³ (Fig. N°24). En la mayor parte del área se encuentran valores bajo 1 mg/m³, encontrándose las menores magnitudes en la zona de Pto. Montt y al sur de Quemchi, asociado a aguas de origen subantártico. Areas con altas concentraciones (2 - 15 mg/m³) se localizan en la costa continental del mar interior, asociados a la desembocadura de los esteros Reloncaví, Comau, Huelqui y Chaitén. En el sector norte fuera del mar de Chiloé se registran altos valores en la zona costera continental principalmente en la Bahía Maullín; Ancud registra valores de Cloa de entre 3 y 6 mg/m³.

La segunda imagen semanal (22-29 Abril) correspondiente al otoño de 2004 (Fig. N°25), presenta un notable aumento de la concentración de clorofila con respecto a la semana anterior (Fig. N°24), cuyos valores fluctuaron entre 0,6 y 45 mg/m³ con un promedio espacial de toda el área de 7,5 mg/m³. Los menores valores (0,6 – 2 mg/m³) se registraron al sur de Castro y en el sector oceánico norte fuera del mar interior. Se observa una amplia cobertura de altas (5 – 45 mg/m³) concentraciones de clorofila en el seno de Reloncaví, en la desembocadura de los esteros Comau, Huelqui, y en la costa insular entre Ancud y Dalcahue. Este notable aumento de la concentración de clorofila puede estar asociado al período (22 al 28 Abril) de días sin precipitación registrado después de continuas precipitaciones (Fig. N°26), lo cual favoreció la reproducción del fitoplancton. Este aumento de Cloa también estaría asociado con el incremento de la TSM (Fig. N°12).

Para estudiar las condiciones de productividad del área en estudio de la X Región durante los muestreos de invierno, se generaron dos imágenes semanales que muestran la distribución espacial de la Cloa. La primera imagen semanal (27 de Julio al 3 de Agosto) muestra valores que fluctuaron entre 0,25 y 5,2 mg/m³, con un promedio espacial equivalente a 0,8 mg/m³ (Fig. N°27). La segunda imagen (Fig. N°28) semanal (4 – 11

Agosto) presenta un marcado aumento con respecto a la semana anterior (Fig. N°28), fluctuando los valores entre 0,5 y 47 mg/m³ con un promedio espacial igual a 5 mg/m³. Se observa una amplia cobertura de altas (5 – 47 mg/m³) concentraciones de clorofila en el seno de Reloncaví, en la desembocadura de los esteros Comau y Huelqui. Este notable aumento de la concentración de clorofila puede estar asociado al período (3 al 11 Agosto) de días sin precipitación (Fig. N°29), lo cual favoreció la reproducción del fitoplancton. Este aumento de Cloa también estaría asociado con el incremento registrado en la TSM (Fig. N°14).

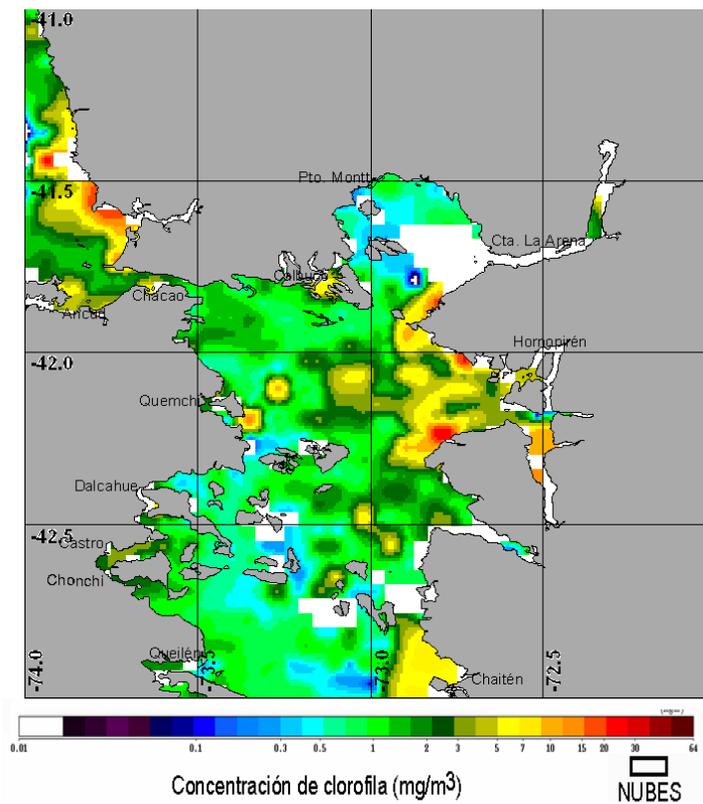


Figura N°24: Imagen satelital de Concentración de clorofila *a* del período comprendido entre el 14 y 21 de Abril de 2004.

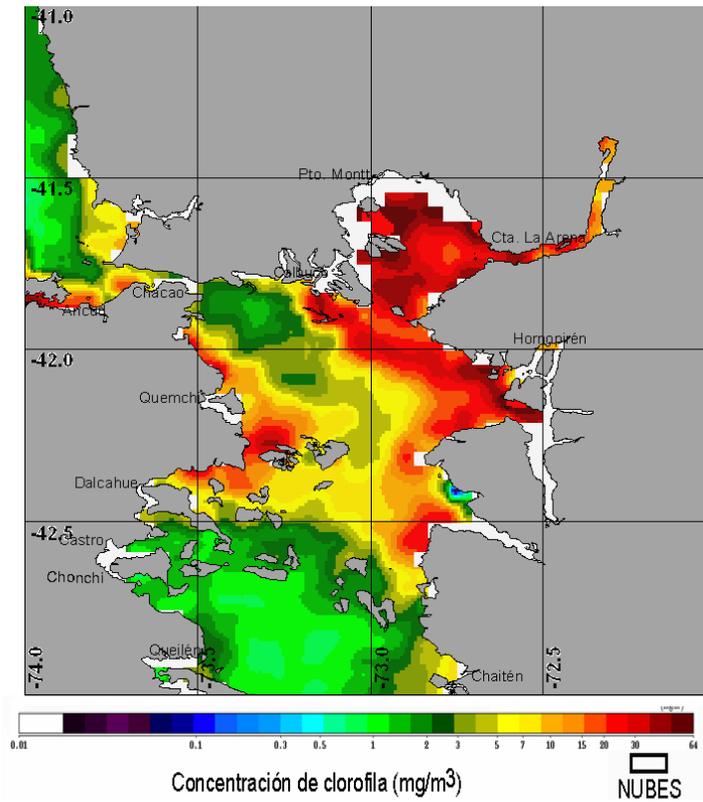


Figura N°25: Imagen satelital de Concentración de clorofila *a* del período comprendido entre el 22 y 29 de Abril de 2004.

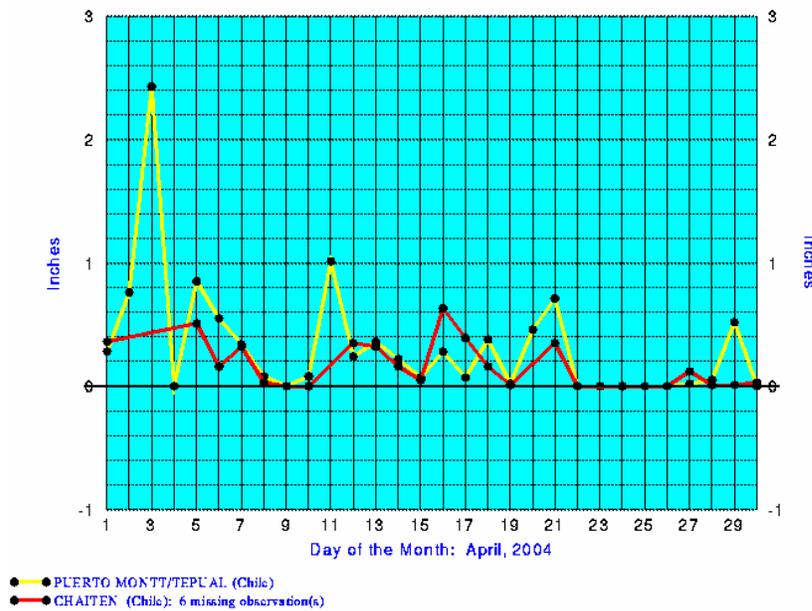


Figura N°26: Registro de precipitaciones diarias durante abril de 2004 en las estaciones meteorológicas de Puerto Montt y Chaitén.

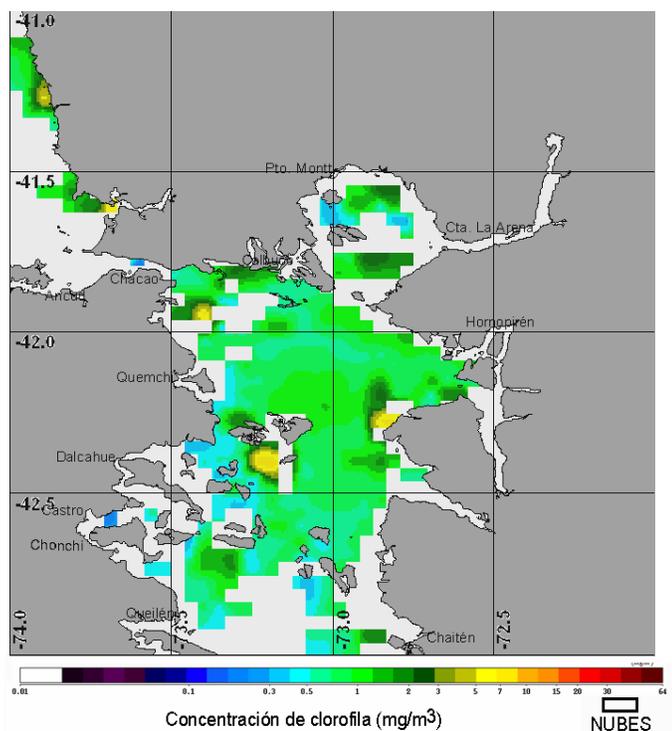


Figura N°27: Imagen satelital de Concentración de clorofila *a* del período comprendido entre el 27 de Julio y 3 de Agosto de 2004.

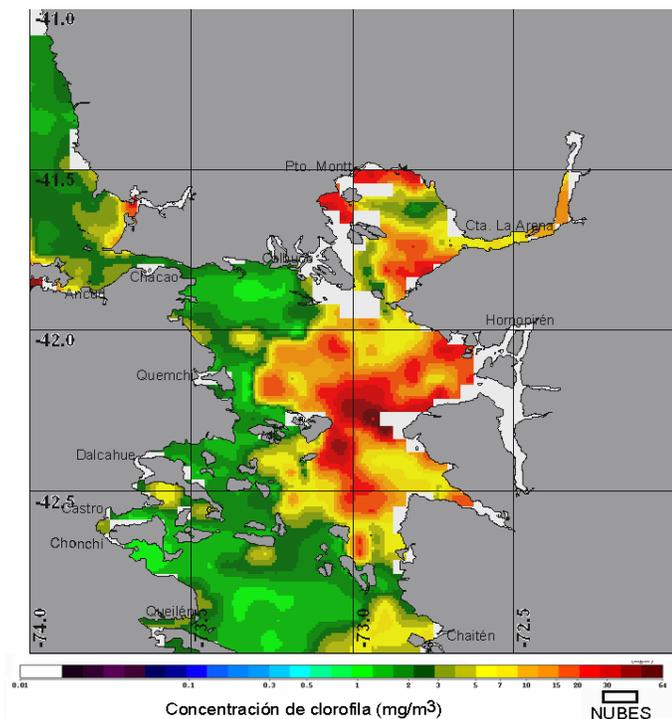


Figura N°28: Imagen satelital de Concentración de clorofila *a* del período comprendido entre el 4 y 11 de Agosto de 2004.

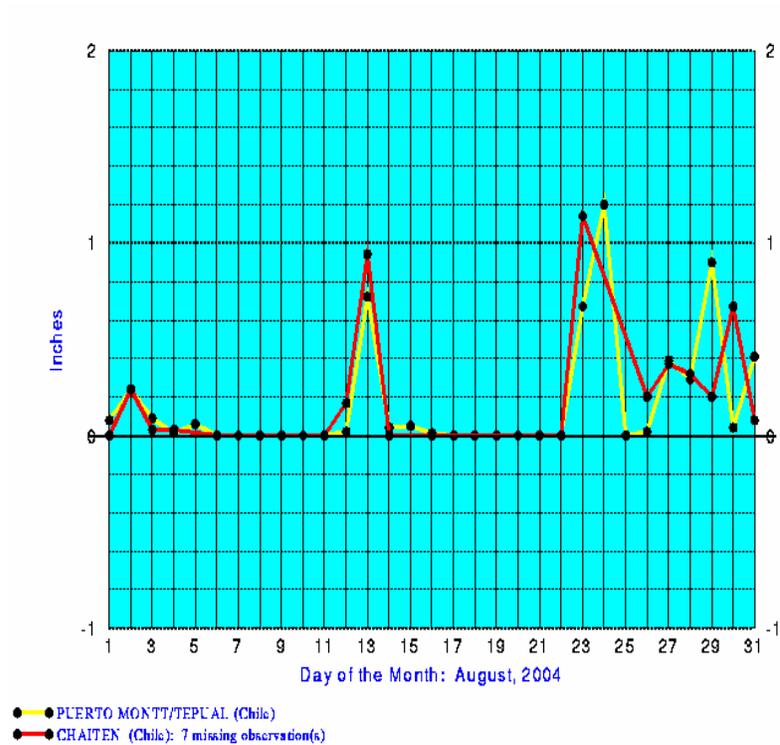


Figura N°29: Registro de precipitaciones diarias durante agosto de 2004 en las estaciones meteorológicas de Puerto Montt y Chaitén.

3.2.4.2.2. Tercera y Cuarta Regiones

Para caracterizar la productividad durante Diciembre de 2003 en la III y IV Regiones, se generó una imagen de Cloa promedio mensual (Fig. N°30 y 31). Se observa una alta productividad en la zona de estudio debido a la alta presencia de surgencias costeras inducidas por los vientos predominantes Sur y Suroeste. Los valores de Cloa varían entre 0,25 y 32 mg/m³. Un marcado gradiente longitudinal es observado, con altas concentraciones (> 5 mg/m³) de clorofila en las zonas costeras, principalmente asociadas a focos de surgencia de aguas más frías (14-16°C).

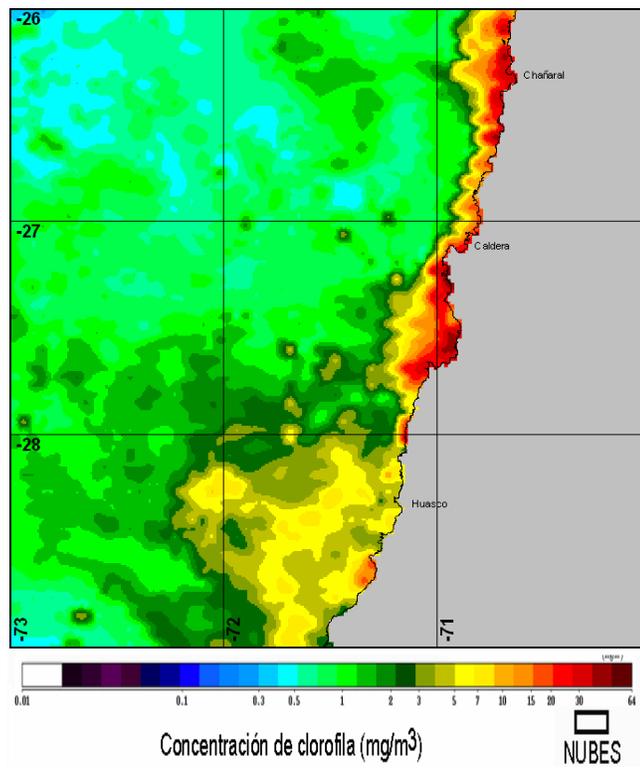


Figura N°30: Imagen satelital de Concentración de clorofila *a* de Diciembre de 2003.

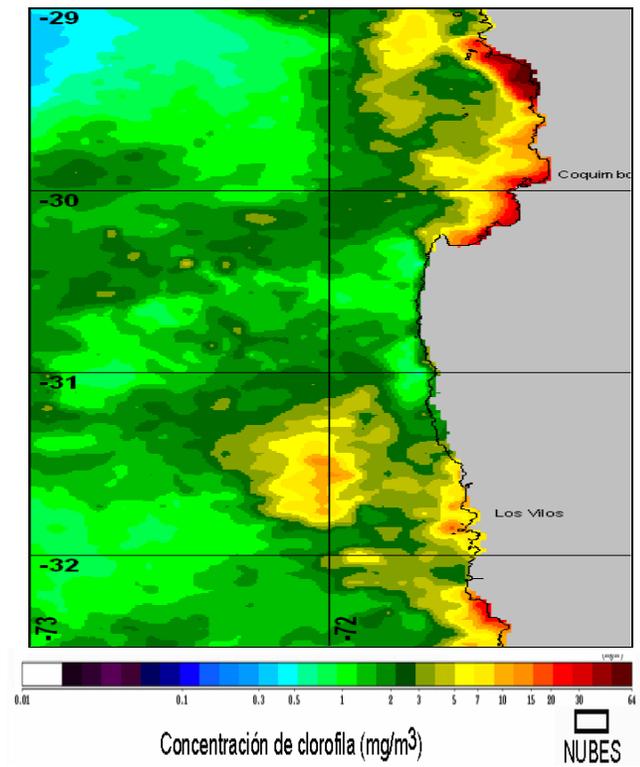


Figura N°31: Imagen satelital de Concentración de clorofila *a* de Diciembre de 2003.

Para estudiar las condiciones de productividad del muestreo Otoño - Invierno (Marzo y Abril de 2004) en la III Región, se generaron imágenes semanales de Cloa que permiten una visión sinóptica del área.

La primera imagen semanal que cubre el período entre el 24 y 31 de Marzo de 2004, muestra una distribución espacial de la Cloa cuyos valores varían desde 0,2 a 25 mg/m³ (Fig. N°32). La presencia en la zona costera desde Caldera hacia el Sur de aguas frías surgentes, con alta productividad biológica es evidenciado en la imagen de Cloa. En efecto, durante el muestreo del 29 de Marzo realizado en el área marina de Caldera se registraron “blooms” de fitoplancton con concentraciones de clorofila *a* entre 7 y 21 mg/m³ (Fig. N°32). Al igual que la TSM, se observa un marcado frente de clorofila 10 mn al oeste de Caldera, gradiente de productividad que varía de concentraciones cercanas a 20 mg/m³ en el sector costero y hasta 0,5 mg/m³ en el sector oceánico. Se observa una alta correlación entre la distribución de TSM (Fig.1) y Cloa (Fig. 3), encontrándose bajas (< 0,5 mg/m³) concentraciones de clorofila en las aguas oceánicas cálidas (> 19°C) de origen sub-tropical, mientras que las altas concentraciones (> 2 mg/m³) de fitoplancton se asocian más bien a las aguas frías (< 18°C) costeras.

Durante el muestreo del 22 de Abril de 2004, se observó una condición de menos productividad biológica (Fig. N°33) en la zona costera que en el primer muestreo (Fig. N°32), no obstante la cobertura de valores bajos (< 0,5 mg/m³) es bastante menor en el sector oceánico. Para toda el área de estudio, los valores de Cloa fluctuaron entre 0,18 y 12 mg/m³. El área marina de Caldera registra valores entre 1,4 y 3,4 mg/m³, presentando las mayores magnitudes cercanas a la costa. Se observa una alta correlación entre la distribución de TSM (Fig. N°17) y Cloa (Fig. N°33), encontrándose bajas (< 0,5 mg/m³) de concentraciones de clorofila en las aguas oceánicas cálidas (> 19°C) de origen sub-tropical, mientras que las altas concentraciones (> 2 mg/m³) de fitoplancton se asocian a las aguas frías (< 17°C) costeras.

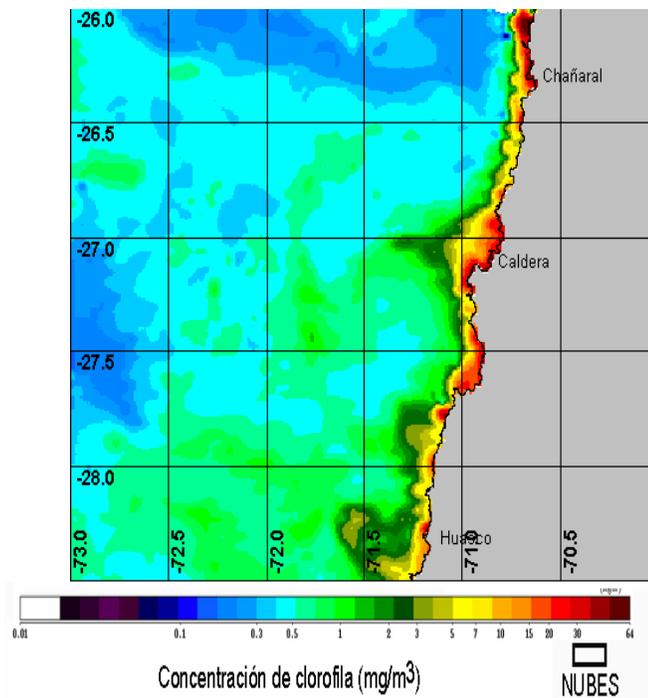


Figura N°32: Imagen satelital de Concentración de clorofila *a* de la III Región para el período comprendido entre el 24 y 31 de Marzo de 2004.

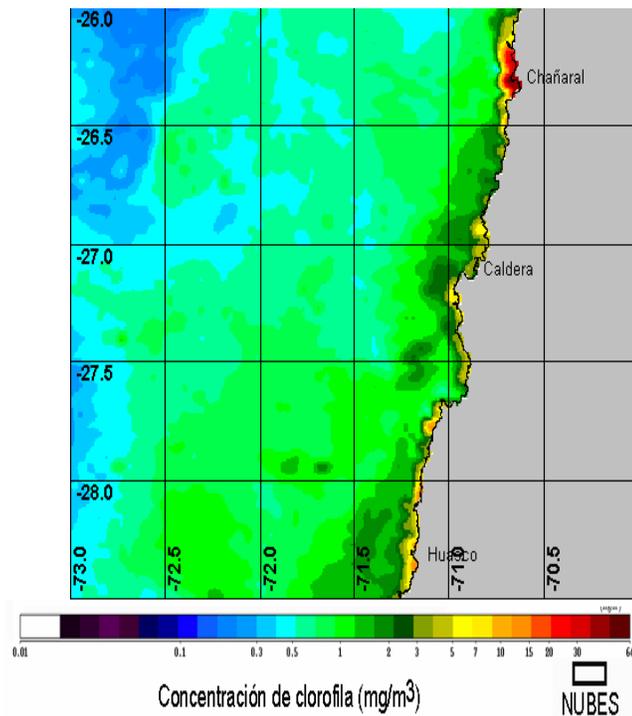


Figura N°33: Imagen satelital de clorofila *a* de la III Región para el período comprendido entre el 22 y 29 de Abril de 2004.

Para estudiar las condiciones de productividad del muestreo Otoño - Invierno (Marzo y Abril de 2004) en la IV Región, se generaron imágenes semanales de Cloa que permiten una visión sinóptica del área.

La imagen semanal (24-31 Marzo) de Cloa satelital es utilizada para caracterizar la productividad biológica durante el muestreo realizado el 24 de Marzo en Coquimbo (Fig. N°34). A nivel de mesoescala, la distribución espacial de la Cloa en la región varía entre 0,3 y 10 mg/m³. Durante el período no se registra Cloa satelital en Coquimbo debido a la persistente cobertura nubosa.

La condición de la productividad biológica durante los muestreos efectuados el 4 (Coquimbo y Tongoy) y 5 (Guañaqueros) de Abril, es estudiada con la imagen semanal de Cloa satelital del período comprendido entre el 1 y 8 de Abril (Fig. N°35). La distribución espacial de la Cloa en el área de estudio presenta una alta variabilidad, registrándose valores entre 0,3 y 30 mg/m³. La presencia de valores bajos de Cloa (< 0,5 mg/m³) localizados al oeste de los 72°30'W estarían asociados a la influencia de las aguas oceánicas cálidas (< 19°C) de origen sub-tropical (Fig. N°20). Las altas concentraciones de Cloa se ubican en las primeras 10 millas náuticas frente a la costa. Al analizar la variabilidad espacial por zona de muestreo, se tiene que para la bahía de Coquimbo se presentaron valores entre 5 y 10,5 mg/m³; para la Bahía de Guañaqueros entre 6 y 14 mg/m³; y en la Bahía de Tongoy entre 8 y 16 mg/m³.

El muestreo realizado el 29 de Abril de 2004 en Totoralillo Norte es estudiado con la imagen semanal de Cloa satelital del período comprendido entre el 22 y 29 de Abril (Fig. N°36). En la mesoescala, la distribución espacial de Cloa fluctuó en la región entre 0,4 y 38 mg/m³, encontrándose los más altos valores (> 2 mg/m³) en la zona costera. La condición de la Cloa en el área marina frente a Totoralillo Norte indica la presencia de altas concentraciones de fitoplancton, cuyos valores fluctuaron entre 25 y 30 mg/m³.

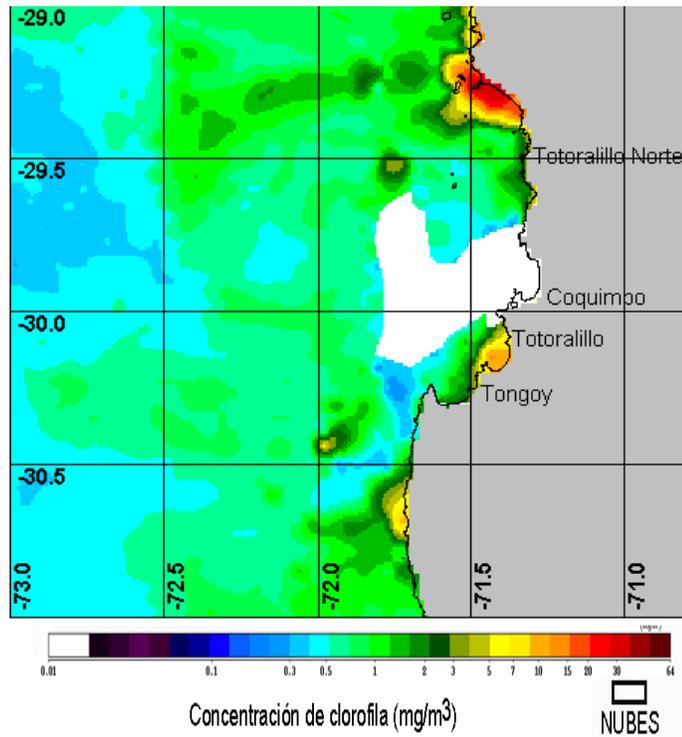


Figura N°34: Imagen satelital de Concentración de clorofila *a* de la IV Región para el período comprendido entre el 24 y 31 de Marzo de 2004.

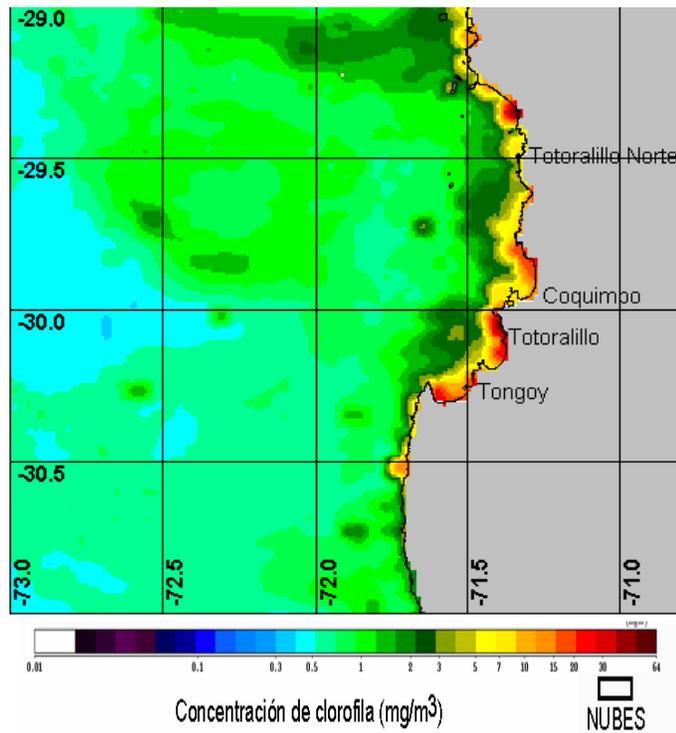


Figura N°35: Imagen satelital de clorofila *a* de la IV Región para el período comprendido entre el 01 y 08 de Abril de 2004.

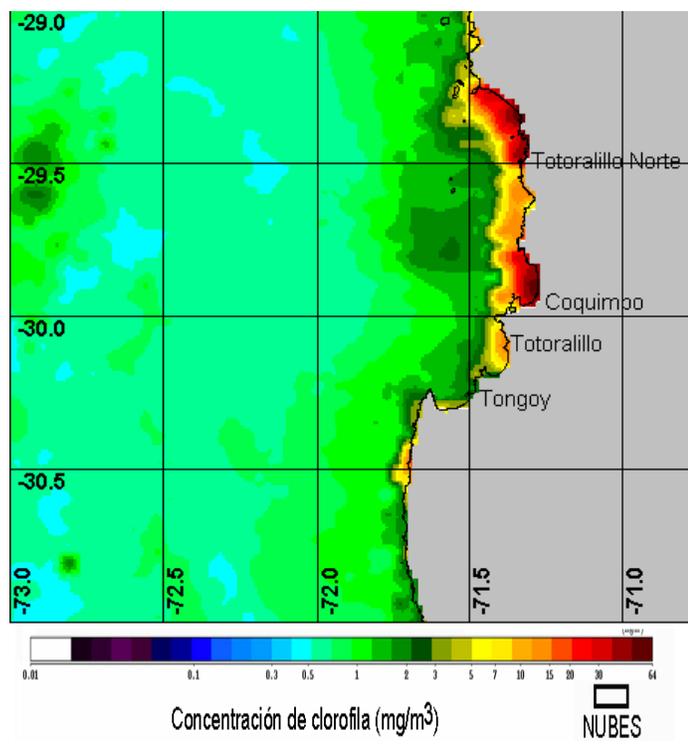


Figura N°36: Imagen satelital de clorofila *a* de la IV Región para el período comprendido entre el 22 y 29 de Abril de 2004.

3.2.4.3. Salinidad

El análisis químico de salinidad se realizó en el Laboratorio de Oceanografía Química de la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, utilizando como método de análisis un refractómetro, el cual arrojó los siguientes resultados:

CUADRO 42: Resultados análisis químico de salinidad muestreos Primavera - Verano.

Región	Mes	Resultado
X Región (Calbuco)	Diciembre - Enero	32 psu
X Región (Ancud)	Enero	33 psu
III Región	Diciembre	35 psu
IV Región	Diciembre	35 psu

CUADRO 43: Resultados análisis químico de salinidad muestreos Otoño - Invierno

Región	Mes	Resultado
X Región	Agosto	34 psu
III Región	Agosto	34,9 psu
IV Región	Agosto	34,8 psu

OBJETIVO 4.4:

Propuesta de medidas sanitarias para la prevención y/o control de enfermedades de alto riesgo en moluscos cultivados.

4.1. ANTECEDENTES

En general, los moluscos no presentan respuestas específicas a los agentes invasores y parecen depender de la fagocitosis y factores pre-existentes en la hemolinfa para su supervivencia.

Debido a la ausencia de una memoria inmunológica, la sobrevivencia está determinada por diferencias individuales de los huéspedes para enfrentar al patógeno, de modo que los individuos sobrevivientes puedan quedar inmunes a futuros encuentros con el mismo patógeno, aunque sólo después de la exposición de varias generaciones a un patógeno virulento (Sinderman, 1990). Esta es la razón por la cual no existen medidas de control efectivas para la erradicación de los patógenos de alto riesgo aplicables a los moluscos.

A grandes rasgos, los mecanismos de prevención y control se resumen en los siguientes puntos:

1. No trasladar individuos susceptibles a un área epizootica, ni trasladar individuos desde estas áreas.
2. Intentar desarrollar poblaciones resistentes a las enfermedades cultivando a los sobrevivientes.
3. Se debe estudiar la historia de vida y ecología de los patógenos para así poder determinar los estados vulnerables de éste o las condiciones ambientales que le resulten restrictivas.

Teniendo en cuenta los factores relación huésped/parásito, es cada vez más importante el análisis de riesgos en la prevención de la transmisión de patógenos.

En el siguiente cuadro se presenta un resumen de dicha información:

CUADRO 44: Medidas de control y recomendaciones generales para la prevención y control de enfermedades de alto riesgo en moluscos de cultivo.

Enfermedad	Medida de Control	Recomendación
Bonamiosis	No hay	<ul style="list-style-type: none"> • Bajar densidad. • Bajar temperatura • Prevenir transferencia y/o introducción de zonas infectadas a zonas libres.
Haplosporidiosis	Ninguna conocida	<ul style="list-style-type: none"> • Desarrollo de semillas de ostras resistentes.
Perkinsosis	Ninguna conocida	<ul style="list-style-type: none"> • Desarrollo de cepas resistentes pero sólo en zonas enzoóticas
Microcitosis <i>M. mackini</i>	En zonas enzoóticas, reubicar las ostras a niveles de marea alta durante periodo crucial de transmisión (abril-mayo)	
<i>M. roughleri</i>	No se conocen	
Marteiliosis	Ninguna conocida. Mecanismos de erradicación no han funcionado	<ul style="list-style-type: none"> • Alta salinidad parece suprimir la manifestación clínica de la enfermedad. • Abstenerse de transferir o introducir ostras infectadas desde aguas enzoóticas en aguas no infectadas.

Fuente: Resumen de informe del Dr. Franck Berthe presentado en el Seminario de la OIE, Costa Rica (2000).

En el desarrollo del Proyecto FIP 95-32, se explican los distintos aspectos que deben tenerse en cuenta en un manejo sanitario preventivo de moluscos, los que se reproducen a continuación.

El manejo preventivo de las enfermedades puede ser vista desde los siguientes aspectos:

- 1.- Prevención de contacto entre patógeno y huésped
- 2.- Incremento de la resistencia natural o genética (mejoramiento genético)
- 3.- Mejoramiento de la dieta
- 4.- Inmunización

4.1.1. Prevención de contacto entre patógeno y huésped

Este tipo de prevención está sustentado por dos modalidades de intervención:

- 1.- Intervención puntual sobre los moluscos disponibles
- 2.- Intervención coordinada a través de programas de prevención nacionales o internacionales.

4.1.1.1. Intervención puntual

La mayoría de las prácticas de manejo en un sistema de cultivo de moluscos son conocidas y se encuentran controladas por los cultivadores entre ellas se pueden mencionar:

- mantención de densidades adecuadas
- limpieza y lavado de individuos
- desdobles y raleos

Sin embargo, existen prácticas preventivas para el caso de enfermedades específicas, es el caso de la mayoría de las patologías causadas por protozoos como *Perkinsus*, *Bonamia* y *Haplosporidios*.

Entre las medidas de prevención y manejo se puede mencionar las de tipo general como son:

- Evitar introducir lotes infectados en áreas en donde no se ha reportado la enfermedad
- Utilizar reproductores libres de patógenos específicos para la obtención de semilla
- Mantener un programa de chequeos patológicos periódicos a fin de conocer el status sanitario del área de cultivo

- Utilizar los factores ambientales tales como salinidad y temperatura para favorecer el estado de salud normal.
- Mantener en lo posible densidades bajas para reducir el riesgo de transmisión de agentes patógenos.

Existen otras medidas dirigidas a situaciones más específicas de determinadas patologías como serían el manejo del área en el caso de erradicación de *Bonamia*, en el cual Elston (1990), sugiere sacar completamente las ostras del área de cultivo por un período de al menos tres años y emplear dos años más para exámenes en grupos introducidos.

4.1.1.2. Intervención Coordinada

Este aspecto está relacionado con la intervención a través de programas de prevención nacional y/o internacional. Con este método se trata de interrumpir la transmisión de agentes patógenos en zonas mas o menos amplias. Esto puede llevarse a cabo destruyendo las fuentes de infección (individuos contaminados), y sustituyendo los lotes por individuos libres de enfermedades específicas.

Los programas internacionales han sido entregados por la Oficina Internacional de Epizootias de la Organización Mundial de Sanidad Animal a través de la publicación del Código Sanitario Internacional para los Animales Acuáticos (1995), en el que se señalan las pautas necesarias para controlar la diseminación de agentes patógenos que revistan importancia desde el punto de vista socioeconómico y/o sanitario a nivel nacional, y que afecten al comercio internacional, las cuales se citan como enfermedades de declaración obligada.

Hasta el momento ninguna de las enfermedades listadas en el citado Código está claramente identificada en los moluscos cultivados en Chile.

4.1.2. Incremento de la resistencia natural o genética

Esta forma de prevención está relacionada con la obtención de poblaciones con buena tasa de crecimiento, conversión alimenticia y resistencia a enfermedades. Al respecto existen

numerosos trabajos en vertebrados que apuntan al valor de las cepas genéticamente resistentes para reducir el problema de las enfermedades.

El objetivo de la mejora genética desde el punto de vista de la prevención, es oponer a las causas de la enfermedad un terreno genético menos susceptible o más refractario. Para lo cual se pueden emplear métodos de selección, cruzamiento o manipulación genética.

De acuerdo a investigaciones realizadas en este campo habría cierta herencia en la resistencia a algunas enfermedades protozoarias. En el trabajo realizado por Elston *et al.* (1987) sobre la resistencia de *Ostrea edulis* a la infección por *Bonamia ostreae* encontró que existían cepas de la Ostra que demostraron ser más resistentes a este parásito. En dicha investigación se observaron tasas de mortalidades diferentes al colocar ostras planas de variados orígenes bajo condiciones idénticas. Estas observaciones estarían indicando que existe una resistencia en las ostras que se desarrollaría después de varias generaciones de sobrevivientes a la enfermedad.

Este descubrimiento demuestra la capacidad biológica de *Ostrea edulis* para desarrollar resistencia a la enfermedad (*B. ostreae*) y es una opción de manejo útil en aquellos lugares donde el patógeno es enzoótico.

Los estudios realizados sobre fecundación cruzada en ostras han sido realizados hasta ahora en forma experimental con resultados promisorios, sin embargo es necesario realizar mayores investigaciones para su aplicación al manejo preventivo de enfermedades.

La manipulación genética mediante la inducción de triploides se ha realizado en ostras de género *Crassostrea* con el fin de obtener individuos con mejores tasas de crecimiento, se espera que con el desarrollo de este tipo de investigación se obtenga en el futuro individuos resistentes a enfermedades específicas mediante herramientas genéticas.

4.1.3. Mejoramiento de la dieta e Inmunización

Son herramientas de prevención potenciales de usar en los moluscos, sin embargo es necesario realizar mayor investigación en estos campos. Hasta el momento para invertebrados existe sólo la vacuna comercial contra la bacteria *Gaffkia homari* para la langostas *Homarus americanus*.

4.2. DESARROLLO METODOLÓGICO

Para dar cumplimiento a este objetivo se determinaron los mismos procedimientos de búsqueda de información detallados en la metodología del Objetivo 4.2. De esta forma, se procedió a revisar la literatura sobre cada uno de los patógenos causantes de enfermedades de alto riesgo, compilando y analizando la información en relación a la prevención y el control de éstas.

Esta actividad se comenzó a llevar a cabo desde el comienzo del proyecto y concluyó la semana previa a la realización de la reunión de trabajo descrita en el Objetivo 4.2.

4.2.1. Publicaciones Internacionales

La revisión de los documentos que tienen relación con la prevención y control de las enfermedades de alto riesgo que afectan a las especies involucradas en este proyecto, se realizó principalmente utilizando los catálogos electrónicos disponibles en las universidades que participan en la realización de este proyecto, así como también en sitios web específicos pertenecientes a las organizaciones internacionales y revistas científicas que desarrollan estudios en patologías de organismos acuáticos (OIE, FAO, Aquaculture, DAO, etc.). Como una forma de limitar la búsqueda, se utilizó como criterio de selección la inclusión de sólo aquellas publicaciones más recientes, por lo que se recopilamos publicaciones científicas a partir del año 1995.

La información recopilada (Cuadro 45) fue analizada siguiendo la misma metodología descrita en los Objetivos 4.2 y 4.3.

CUADRO 45: Publicaciones internacionales analizadas

Año	Título	Autor y cita
1995	Future of biotechnology-based control of disease in marine invertebrates.	Bachere, Mialhe <i>et al.</i> . MOL MAR BIOL BIOTECH 4 (4): 275-283 DEC 1995.
1995	Establishment of an experimental-infection protocol for the flat oyster, <u>Ostrea edulis</u> , with the intrahaemocytic protozoan parasite, <u>Bonamia ostreae</u> -application in the selection of parasite-resistant oysters.	Bachere, Hervio D. <i>et al.</i> Aquaculture 132 (3-4):183-194 MAY 1 1995.
1998	Selecting the flat oyster <u>Ostrea edulis</u> (L) for survival when infected with the parasite <u>Bonamia ostreae</u> .	Naciri-Graven Y. <i>et al.</i> J EXP MAR BIOL ECOL 224(1): 91-107 JUN 1 1998.
1999	Technological constraints to disease prevention and control in aquatic animals, with special reference to pathogen detection	Sharon McGladdery FAO Fisheries Technical Paper 395
1999	The need for molecular tools in the study of mollusc pathogens	P.M. Hine FAO Fisheries Technical Paper 395
2001	Molecular diagnosis of fish and shellfish diseases: present status and potential use in disease control.	Cunningham, Carey O. Aquaculture 206 (2002) 19-55.
2001	Living with bonamiasis: Irish research since 1987.	Culloty S.C., M.F. Mulcahy. HYDROBIOLOGIA 465 (1-3): 181-186 dec 2001.
2001	An investigation into the relative resistance of Irish flat oysters <u>Ostrea edulis</u> L. To the parasite <u>Bonamia ostreae</u> (Pichot <i>et al.</i> 1980).	Culloty, S.C. <i>et al.</i> Aquaculture 199 (3-4): 229-244 AUG 1 2001.
2001	Seminario sobre enfermedades de los animales acuáticos: Enfermedades de los moluscos"	Puntarenas, Costa Rica, 26-30 de marzo, 2001
2001	Use of particle filtration and UV irradiation to prevent infection by <u>Haplosporidium nelsoni</u> (MSX) and <u>Perkinsus marinus</u> (Dermo) in hatchery-reared larval and juvenile oysters.	Ford, S.E. <i>et al.</i> Aquaculture 194 (1-2): 37-49 MAR 1 2001.
2003	Determining culture strategies in populations of the European flat oyster, <u>Ostrea edulis</u> , affected by bonamiosis.	Montes, J. <i>et al.</i> Aquaculture 220 (1-4): 175-182 APR 14 2003.
2002	El análisis de riesgo como ayuda a la toma de decisiones para controlar y prevenir las enfermedades de los animales.	Zepeda Sein, Cristóbal (E 70 SG 10.pdf)

Del análisis realizado de las publicaciones recopiladas durante el desarrollo del presente estudio (Anexo 7), es posible afirmar que la mayoría de ellas guarda directa relación con las medidas de prevención y/o control de las enfermedades de alto riesgo involucradas en este estudio. Es así, como por ejemplo se abordan temas sobre el uso de métodos biotecnológicos para prevenir, manejar y controlar las enfermedades de moluscos. Además, se aborda el tema del desarrollo de técnicas moleculares para el análisis e identificación de patógenos de moluscos, así como también se presentan resúmenes de los métodos ya publicados para el diagnóstico molecular de las enfermedades descritas en las listas de la Comisión Europea. Se plantea la habilidad que poseen dichas técnicas para identificar las especies patógenas y discriminar bajo el nivel de las especies e identificar cepas.

4.2.2. Fondos concursables

De la revisión de trabajos de investigación de fondos concursables e informes finales de proyectos FONDEF, Conycit y FIP se encontraron los siguientes trabajos pertinentes a este objetivo (Cuadro 46).

El análisis de los trabajos de investigación con fondos concursables reveló una serie de iniciativas de los diferentes grupos de trabajo especializados en moluscos, orientadas principalmente a la mejora en la producción por medio de innovaciones en cuanto a diversidad de especies y desarrollo de nuevas tecnologías de cultivo. Apenas un proyecto trata en forma directa el problema sanitario de los moluscos, específicamente en Abalón “*Desarrollo de nuevas técnicas para la prevención y control de enfermedades infecciosas y no infecciosas en los cultivos de abalón (D01I1074)*”, e incluye un programa de vigilancia sanitaria. Un reducido número de trabajos aborda de manera indirecta el mejoramiento de la producción a través de la disminución de mortalidades en etapas claves del desarrollo como por ejemplo la etapa de producción de semillas, aplicando novedosas tecnologías (Cuadro 38). Trabajos como “*Investigación y desarrollo de tecnologías para la utilización de probióticos en el cultivo del ostión del norte (D97I2033)*” o la “*Optimización inmunológica y genética de péptidos endógenos antimicrobianos en ostiones (Argopecten purpuratus) para aumentar su capacidad exportadora (D99I1055)*” plantean nuevos y

promisorios desafíos, pero esos proyectos están en fase de ejecución y sus resultados no están disponibles para ser analizados.

CUADRO 46: Proyectos FIP y FONDEF relacionados con medidas de control y prevención

Número de Proyecto	Nombre
D01I1074	Desarrollo de nuevas técnicas para la prevención y control de enfermedades infecciosas y no infecciosas en los cultivos de abalón.
D02I1129	Investigación y desarrollo de reproductores y semilla de calidad genética y sanitaria para la sustentabilidad del cultivo del abalón japonés (<i>Haliotis discus hannai</i>).
D97I2033	Investigación y desarrollo de tecnologías para la utilización de probióticos en el cultivo del ostión del norte <i>Argopecten purpuratus</i> , Lamarck1819.
D99I1055	Optimización inmunológica y genética de péptidos endógenos antimicrobianos en ostiones (<i>Argopecten purpuratus</i>) para aumentar su capacidad exportadora.
AQ02I1001	Incrementar la eficiencia productiva de cultivos acuícolas: mejoramiento genético mediante el uso de marcadores de ADN.
D00I1168	Optimización de la producción de semillas de invertebrados marinos de importancia comercial mediante la utilización de biopelículas microbiana.
Conicyt 2000-2-35	Caracterización de péptidos antimicrobianos en moluscos bivalvos de interés acuícola para su aplicación en el control de enfermedades

También existen interesantes iniciativas en el campo del mejoramiento genético de especies acuícolas, siguiendo la tendencia mundial de desarrollar herramientas tecnológicas conducentes al mejoramiento de las variedades acuícolas de cultivo en materia de productividad, pero también buscando marcadores específicos para resistencia de enfermedades, determinantes de consanguinidad, etc. Dentro de este contexto podemos

incluir trabajos como el desarrollo de marcadores genéticos que, aunque en fase inicial en las especies acuícolas de nuestro país, llevará en el mediano o largo plazo, a seleccionar variedades más resistentes.

En ese contexto, el estado ha apoyado a equipos de trabajo mediante la aprobación de proyectos como el Fondef [AQ02I1001](#) “Incrementar la eficiencia productiva de cultivos acuícolas: mejoramiento genético mediante el uso de marcadores de ADN”. La implementación de estas nuevas tecnologías propiciarán el desarrollo de marcadores específicos a las diferentes necesidades de la producción acuícola y la formación de personal especializado, ocupando la infraestructura y capacidades de los profesionales del área en el país para desarrollar esta tecnología de punta en materia de marcadores genéticos como RAPD-SCAR, SSR, SNP, mDNA e ITS, en el genoma de grupos de especies acuícolas como peces, moluscos, crustáceos. De esta manera incrementar la eficiencia de los programas de cría

A pesar de lo anterior, y después de la revisión de los trabajos indicados en Anexo 5, podemos deducir una orientación en las investigaciones en moluscos hacia el mejoramiento de la producción, con poca intensidad hacia los problemas sanitarios, probablemente porque hasta ahora no existen registros de grandes mortalidades asociadas a patógenos.

4.3. Contacto Expertos Extranjeros

Tal como se explicó en la propuesta técnica, en un comienzo siete expertos extranjeros comprometieron su apoyo en el desarrollo del presente proyecto, así como también su participación en el Seminario Internacional.

Luego de la adjudicación del proyecto, se procedió a contactar nuevamente a todos los expertos, con el fin de determinar la fecha apropiada para el desarrollo del Seminario, evitando que éste interfiriera con sus respectivas agendas. En un principio se había planeado realizar el evento en el mes de julio o principios de agosto. De los siete expertos contactados, 6 expresaron su imposibilidad de asistir en dicha fecha, ya que en algunos casos éste interfería con sus agendas académicas o estaban comprometidos para asistir a otros seminarios internacionales. Por este motivo, se procedió a solicitar al Consejo del

Fondo de Investigación Pesquera el otorgamiento de un mes adicional para la entrega del informe final del presente proyecto.

Dada la respuesta afirmativa por parte del Consejo, se propuso como nueva fecha la primera semana de octubre. En aquella oportunidad sólo la Dra. Natalie Cochenec, del Laboratorio de Referencia de Moluscos de la OIE, desestimó la invitación, porque una vez más interfería con la agenda de su laboratorio. Sin embargo, la Dra. Cochenec ha sido de gran apoyo en todo relacionado con la identificación del patógeno *Bonamia-like*. Más adelante, y ya comenzado el proceso de adquisición de pasajes internacionales para los expertos, el Dr. Vasily Radashevskiy, del Centro de estudios do mar, Universidade Federal do Paraná, Brazil, expresó su imposibilidad de asistir, debido a que se encontraba en Rusia.

Los expertos internacionales que finalmente participaron en el Seminario Internacional se presentan en el Cuadro 47.

CUADRO 47: Expertos Internacionales que participaron en el Seminario Taller Internacional.

Nombre	Area	Institución
Dra. Susan Bower	Mickrocitos	Fisheries and Oceans Canada, Pacific Biological Station, Canadá
Dr. Eugene Burreson	Perkinsus	Virginia Institute of Marine Science (VIMS), Estados Unidos.
Dra. Carolyn S. Friedman	RLOs	School of Aquatic and Fishery Sciences, University of Washington, USA.
Dr. Franck Berthe	Marteiliosis	Canada Research Chair in Aquatic Health Science Mollusc Health, University of Prince Edward Island, Canadá.
Dr. Mike Hine	Bonamia	National Institute of Water and Atmospheric Research, Kilbirnie, Wellintong, New Zealand.

4.4. Seminario Internacional

El Seminario Internacional "*Estado Actual de las Enfermedades de Alto Riesgo en Moluscos de Cultivo*" se llevó a cabo los días 5 y 6 de Octubre de 2004, en la ciudad de Coquimbo. Para este efecto, se contó con la participación de destacados expertos internacionales y nacionales, con los cuales se tuvo la oportunidad de conocer y debatir

sobre los principales temas involucrados en la presencia y/o control de las enfermedades de Alto Riesgo en moluscos de cultivo.

Esta actividad se organizó en dos áreas de discusión. Durante el primer día se discutió sobre temas relacionados con "Políticas Nacionales e Internacionales de Control y prevención", donde se abordaron temas tales como las políticas sanitarias para el cultivo de moluscos en Chile, Programas Sanitarios de Moluscos en nuestro país, estado de programas sanitarios en Estados Unidos y la situación sanitaria de los cultivos de las especies involucradas en este estudio. De la misma forma, el segundo día se destinó para la discusión de los "Aspectos Epizootiológicos de las Enfermedades de Declaración Obligada", donde se abordaron temas como medidas de control y prevención de las enfermedades en estudio, presencia anual de la *Bonamia* en nuestro país, afiliación taxonómica del aislado chileno de *Bonamia* sp. y la epizootiología de las diferentes enfermedades de alto riesgo en estudio.

Finalmente, el seminario tuvo una afluencia de público de cerca de 75 personas, provenientes de diversas áreas del conocimiento de los moluscos, como por ejemplo profesionales del área pública (Sernapesca) de las diversas regiones, profesionales de las universidades, invitados de las empresas que proporcionaron muestras de moluscos para el estudio y profesionales de las principales empresas productoras de las especies en estudio en el país (Fotos 18-20).



FOTO 18: Vista general participantes Seminario Internacional



FOTO 19: Invitados y Expertos participantes en Seminario Internacional



FOTO 20: Vista general participantes Seminario Internacional

4.4.1. Expertos Internacionales



FOTO 21: (De izquierda a derecha) Dr. Mike Hine, Dr. Eugene Burreson, Dr. Franck Berthe, Dr. Carolyn Friedman y Dr. Susan Bower.

Se contó con la participación de los cinco expertos internacionales más destacados a nivel mundial en lo relativo a las enfermedades de alto riesgo en moluscos de cultivo (Foto 21). Es así como se contó con la presencia del Dr. Eugene Burreson del VIMS, Estados Unidos, quien expuso sobre el estado de los programas sanitarios y su impacto en el sector acuícola y sobre la Epizootiología de la Perkinsosis. También se contó con la participación de la Dra. Carolyn Friedman de la Universidad de Washington, Estados Unidos, quien abordó el tema de los hallazgos de RLOs en abalones, los métodos de diagnóstico, su distribución y las medidas y políticas de control. Por otra parte, el Dr. Mike Hine del Ministerio de Agricultura y Forestal de Nueva Zelanda, abordó el tema de las especies conocidas de *Bonamia*, su distribución e identificación ultraestructural. Finalmente, la Dra. Susan Bower, de la Estación Biológica del Pacífico, Canadá, expuso sobre el tema de la epizootiología de la *Mickrocitosis*, los factores ambientales que afectan su desarrollo y las técnicas de manejo preventivo y el Dr. Franck Berthe, quien abordó el tema de los aspectos epizootiológicos de la *Marteilia* y sus posibles escenarios en nuestro país.

4.4.2. Expertos Nacionales

Para abordar la temática relacionada con el escenario chileno, se contó con la participación de dos representantes del sector público (Sernapesca y Subpesca) quienes participaron en la jornada destinada a las Políticas de Manejo Sanitario, los tres expertos nacionales del Listado de Expertos en Moluscos de Subpesca y otros dos expertos nacionales (Foto 22-25).

Es así como se contó con la participación de Ana María Skármeta, del Departamento de Acuicultura de Subpesca, quien abordó el tema sobre las políticas sanitarias para el cultivo de moluscos en nuestro país; Marcelo Casali, del Departamento de Sanidad Pesquera de Sernapesca, quien expuso sobre los programas sanitarios de moluscos, su aplicación y adaptaciones al sector; Mariel Campalans B., Jefe de Proyecto, quien expuso sobre la presencia anual del protozoo *Bonamia* sp. en ostras de cultivo de la X Región; Marcos Godoy, de Fundación Chile, quien abordó el tema de la situación sanitaria de los cultivos de abalones en nuestro país; Jaqueline Campalans B., quien expuso sobre la afiliación taxonómica de *Bonamia* sp., aislado chileno; Karin Lohrmann, de la Universidad Católica del Norte, quien se refirió a la situación sanitaria de los cultivos de ostiones en nuestro país; y finalmente, Iván Cañete, de la Universidad de Magallanes, quien abordó el tema de las medidas de control, manejo y prevención de los poliquetos en cultivos de moluscos de importancia comercial.



FOTO 22: Marcelo Casali, Depto Sanidad Pesquera, Sernapesca.



FOTO 23: Ana María Skármeta, Subsecretaría de Pesca



FOTO 24: Iván Cañete, Universidad de Magallanes



FOTO 25: Marcos Godoy, Fundación Chile

4.4.3. Resultados y Conclusiones del Seminario Internacional

El Seminario Internacional programado dentro de las actividades de este estudio, fue realizado sin mayores contratiempos contando con la participación de todos los expertos comprometidos, tanto nacionales como internacionales, cumpliendo con la totalidad del programa propuesto (Anexo 8).

Durante las ponencias y rueda de preguntas de las mesas redondas, el público participó activamente, demostrando interés y dominio de los temas, lo que fue posible porque la audiencia estuvo conformada por profesionales que trabajan en el área, tanto productores de moluscos como académicos y profesionales de instituciones públicas

Los puntos principales mencionados por los participantes, podemos clasificarlos en dos grandes temas: los programas sanitarios relativos a moluscos y las enfermedades de importancia en moluscos.

Los puntos abordados durante el primer día por los expositores nacionales ahondaron en la normativa sanitaria vigente en Chile y los cambios que están siendo realizados, estimándose que la clasificación de enfermedades de alto riesgo para Chile, estarán definidas en Mayo del 2005.

El panelista internacional se refirió a la experiencia de la aplicación de los programas sanitarios en el estado de Virginia de USA.

La mesa redonda de esta jornada estuvo a cargo de Susan Bower de Fisheries and Oceans Canadá. Durante la ronda de preguntas fueron abordados los temas de la aplicación de los programas en relación a las dificultades de implementarse en las situaciones de los pequeños productores.

Las jornadas dedicadas a las enfermedades del Abalón, de la Ostra Chilena, del Ostión del Norte y aquellas dedicadas a conocer el estado actual de las enfermedades de declaración obligada a la OIE, fueron seguidas de una mesa redonda en donde se debatieron los temas de su epizootiología y las preguntas estuvieron enfocadas a conocer la posibilidad que las especies cultivadas en Chile puedan ser afectadas por las patologías ausentes. Los expertos internacionales plantearon que es difícil que se presente la enfermedad causada por *Perkinsus marinus* y *P. olseni*, debido a las temperaturas y salinidades presentes en las

regiones de cultivo del país, pero quedaría abierta la posibilidad de contraer el resto de las enfermedades puesto que la temperatura es favorable para la expresión de enfermedades de declaración obligada a la OIE; no obstante se debe tener especial cuidado cuando se ingrese la especie susceptible que actualmente no se encuentran presentes en el país

4.5. Propuesta de medidas sanitarias para la prevención y/o control de enfermedades de alto riesgo en moluscos cultivados.

La revisión bibliográfica de las publicaciones seleccionadas para este fin se pueden clasificar en dos grupos:

1. Publicaciones que se refieren en forma específica a medidas puntuales para prevenir y controlar patologías predeterminadas.
2. Publicaciones que se refieren al empleo de técnicas de punta para la identificación segura de aquellas patologías o patógenos que son de declaración obligada a la OIE.

En lo que se refiere a las publicaciones descritas en el punto 2, mientras estas técnicas no sean aceptadas por la OIE, resultará poco apropiado recomendarlas; no obstante, el desarrollo científico-tecnológico de nuestro país permite la implementación y uso de técnicas de punta y su uso contribuirá a la validación de ellas.

La OIE resulta ser la organización que marca la pauta para todo programa que incluya métodos de diagnóstico. Por otro lado, este organismo incluye protocolos para controlar la diseminación de enfermedades acuáticas mediante el uso de sistemas de certificación y reportes que requieren una infraestructura nacional basada en leyes y una red de especialistas en salud de animales acuáticos, la cual debe incluir técnicos, inspectores y patólogos.

Es este el sistema que ha sido implementado en el país con la aparición del Reglamento Sanitario y los Programas de Vigilancia Oficial de Moluscos 2004 del Servicio Nacional de Pesca, el cual se divide en Programa de Vigilancia Activa, Programas Sanitarios Generales y los Programas de Vigilancia Pasiva. Este aspecto de la legislación

nacional es la garantía internacional que avala la implementación de zonas para controlar una enfermedad de declaración obligatoria presente en el país y permitirán el reconocimiento de la OIE para declarar zona o país libre.

Este tipo de programas de prevención estaría basado en un análisis de riesgo destinado a evitar la posibilidad de contraer la patología o patógeno ya detectado en el país y presente en algunas áreas. Sin embargo, este tipo de análisis no puede ser implementado totalmente hasta que se determinen las áreas libres y las áreas contaminadas para el patógeno específico.

Es así como por ejemplo, una vez determinada la presencia de RLOs en abalones rojos (*Haliotis rufescens*) en nuestro país, detección confirmada a través del desarrollo del presente estudio, el programa debería estar dirigido a controlar la diseminación y a la implementación de medidas de control específico para detener su propagación.

En lo referente a la diseminación, para establecer las zonas libres o afectadas, en el Código OIE (2004), se señalan algunas pautas que se deben establecer con anterioridad:

1. Identificar las causas biológicas básicas de la presencia y extensión de la enfermedad (vectores, ciclos, portadores, patógeno, etc.).
2. Determinar la duración de los períodos libres de enfermedad antes de declarar una zona libre.
3. Determinar los estándares de vigilancia (frecuencia de muestreo, programas de cuarentena, etc.).

La propuesta de medidas sanitarias específicas para el caso de Chile se presenta en dos partes:

1. Medidas preventivas.
2. Medidas de control que se explican dentro de los programas de erradicación.

Esta propuesta está basada en la bibliografía consultada, las conclusiones del seminario y en la revisión del proyecto FIP 95/32.

4.5.1. Medidas Preventivas

La prevención puede ser abordada a partir del Sistema de Vigilancia Activa de nuestro país, la que determina una revisión semestral de las patologías de alto riesgo y un control sobre los movimientos de las especies en producción.

La prevención es vista como una intervención coordinada

a a partir de la normativa nacional (con reglamentos sobre la importación de especies y reglamentos sanitarios de control interno) y, además, la voluntad de los productores. El sistema propuesto por el Estado bastaría para manejar los cultivos en forma preventiva, frente a la aparición de patógenos o patologías que impliquen mortalidades. En ese sentido, en el Reglamento se promueve la acción, sin señalar como debe realizarse, de los productores para mantener programas preventivos dirigidos a las especies en cautiverio, tales como:

- a) Fomento de las *Buenas Prácticas* de manejo del cultivo: referido a los manuales de procedimientos para limpieza e higiene del recinto, de los sistemas de cultivo, de las especies cultivadas.
- b) Los Manuales de procedimientos para realizar manejo en el cultivo: se registraría la periodicidad de los desdobles el destino de los individuos descartados.
- c) Procedimientos para realizar reproducción y obtención de semillas etc.

Esto debiera bastar para que el productor adopte una actitud preventiva en sus cultivos. Por otra parte, la prevención también es vista como una intervención puntual, dentro de la cual y como resultado del análisis de la literatura que aborda el manejo preventivo presumiendo el conocimiento del estatus sanitario de la región o país, se sugieren las siguientes medidas generales:

- Evitar introducir lotes sin certificación en áreas donde no se ha reportado enfermedad.
- Utilizar reproductores libres de patógenos específicos.
- Mantener programas de supervisión del estado de salud.

- Manejar los factores ambientales evitar al patógeno específico.

Además, se sugieren las siguientes medidas a adoptar en áreas bajo vigilancia (cuarentena):

- Prohibir el movimiento desde estas zonas a áreas libres a pesar de un resultado negativo de laboratorio tomando en cuenta que no es posible asegurar que un resultado negativo de un diagnóstico indique ausencia de organismos causantes.
- Realizar capacitación a trabajadores relacionados con el cultivo para informar sobre cuidados y restricciones para manejar lotes infectados.
- Prohibir la devolución de especies anormales al mar o sus vísceras.
- Colocar folletos informativos en dependencias.
- Los traslados son posibles solamente desde áreas con bajos niveles de patógenos hacia áreas con niveles altos. Lo contrario no es recomendable, si se requiere deberán realizarse chequeos de salud bajo norma

4.5.2. Medidas de Control y Terapia

Teniendo en cuenta que la única patología de alto riesgo detectada en este estudio es la enfermedad del marchitamiento del pié del abalón rojo (*Haliotis rufescens*), cuyo agente causal es el Candidatus *Xenohaliotis californiensis*, se deberían determinar las áreas o centros libres a fin de aplicar la zonificación mencionada por el Código OIE y aplicar la vigilancia para mantener áreas libres y propender a erradicar al agente causal de las áreas afectadas.

4.5.2.1. Identificación de centros libres y centros afectados

La identificación de los centros libres y afectados debe estar basada en el monitoreo de los centros productores del país de las especies susceptibles, los cuales se encuentran disponibles en el listado de concesiones y en el uso de la red de laboratorios autorizados por Sernapesca utilizando las técnicas de diagnóstico señaladas por la OIE. Aunque es posible aplicar modernas técnicas de diagnóstico a fin de maximizar la sensibilidad, especificidad y

minimizar el tiempo para la identificación de una muestra de la población en estudio, se deben considerar los costos involucrados en el uso de dichas técnicas. En ese sentido, el Estado debiera señalar las técnicas de diagnóstico estándar para el país. En este punto será necesario recurrir al tamaño mínimo de población señalado en la OIE, cuando se realiza vigilancia. Para el caso que de sospecha de una enfermedad de alto riesgo no descrita para el país, se debe considerar una prevalencia mínima del 2%, por lo que el tamaño de la muestra debe ser de 150 individuos.

4.5.2.2. Determinación de los límites de las zonas

Es posible abordar esta función a partir de los siguientes supuestos:

- 1) los límites son Geográficos y no dependen de la especie en cultivo.
- 2) los límites dependen de la especie susceptible.
- 3) los límites dependen de la especie y del agente patógeno.

En el programa de vigilancia Activa se define a zona como *“un área costera bien delimitada geográficamente que constituye un sistema hidrológico homogéneo”*. Esta definición es aplicable cuando no existe registro del patógeno de alto riesgo y se presupone a la zona “libre”. No obstante, se estima que no es posible recurrir a los límites geográficos sin considerar a la especie, puesto que la mayoría de los patógenos de alto riesgo son especies específicas. Por otro lado, la diseminación de los patógenos depende tanto de características ambientales como del propio agente, por lo tanto se propone considerar límites en función de la distribución geografía de cada especie susceptible y del agente detectado. De esa manera, los límites para cada enfermedad detectada en el país estarán en función del patógeno y la distribución geográfica de la especie afectada.

4.5.2.3. Aplicación de programas de erradicación

Estos programas debieran estar clasificados según el patógeno de alto riesgo detectado en el país y una vez que se analicen los resultados del programa de vigilancia activa en todas especies susceptibles. Las recomendaciones y métodos que se han

detectado a través de la bibliografía y consulta a expertos internacionales (conclusiones del seminario) se presentan a continuación:

4.5.2.3.1. Incremento de la resistencia natural o genética:

La selección genética más utilizada para los casos de patógenos endémicos ha sido el uso de sobrevivientes como reproductores desde aquellas poblaciones afectadas por la patología, de esta forma se selecciona el gen de la resistencia a un patógeno específico. Las otras herramientas de mejoramiento genético son incipientes y requieren de mayor estudio para su recomendación.

Para el caso de la *Bonamia* sp., en donde existen antecedentes de cepas de ostras más resistentes, es posible sugerir el cambio de cepas a lugares donde *Bonamia* es endémica. No se detectaron antecedentes bibliográficos suficientes para sugerir esta herramienta en caso de presentarse otra patología diferente a *Bonamia* sp.

4.5.2.3.2. Medidas relacionadas con el centro afectado:

La literatura señala que cuando el patógeno detectado es una especie específica, se puede sugerir la rotación de especies en el cultivo por un tiempo que asegure la eliminación del patógeno. Esta medida presupone un conocimiento biológico acabado del patógeno detectado.

En situaciones similares, también se puede optar por dejar sin especies el área del centro de cultivo por algún tiempo hasta comprobar que no se reproduce el cuadro patológico

4.5.2.3.3. Aplicación de medidas terapéuticas

Este tipo de medidas han sido descritas para ser aplicadas cuando el patógeno es bacteriano. Este es el caso de los organismos tipo rickettsiales (RLOs) en abalones, las dosis sugeridas y la duración se muestran en el Cuadro 49. No existe otro patógeno de alto riesgo que pueda ser controlado con antibioterapias.

4.5.3. Medidas Específicas de Control

En esta etapa se presentan las medidas de control para las enfermedades de alto riesgo en estudio (Cuadro 48) y que han sido recopiladas a través de la revisión bibliográfica prevista en los Objetivos 4.2, 4.3 y 4.4 de este proyecto y, además, de la discusión y reuniones personales sostenidas con los expertos internacionales y nacionales que participaron en el Seminario Internacional.

CUADRO 48: Medidas Específicas de control para las enfermedades de alto riesgo en estudio.

Enfermedad	Agente Causal	Medida de Control
Infección por <i>Perkinsus marinus</i>	<i>Perkinsus marinus</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Bajar la salinidad a menos de 15 ppt para evitar la actividad de la enfermedad. • Limitar la exposición a altos índices de salinidad a una sola estación de crecimiento, en caso que sea necesario trasladar semillas susceptibles desde zonas con bajos índices de salinidad a zonas con altos índices para el crecimiento final y acondicionamiento. • Minimizar mortalidades trasladando ostras después del periodo de infección que se produce a comienzos del verano. • Cosechar durante la primavera. • Utilizar cepas resistentes producidas en hatcheries y cultivadas utilizando técnicas acuícolas. • Mantener las ostras que sobreviven a una epizootia, ya que probablemente poseen resistencia natural y utilizarlas como reproductores. • Evitar el traslado de ostras nativas desde áreas infectadas a áreas no infectadas.
Infección por <i>Mikrocytos roughleyi</i> Infección por <i>Mikrocytos mackini</i>	<i>Mikrocytos roughleyi</i> <i>Mikrocytos mackini</i>	<ul style="list-style-type: none"> • No importar semillas de ostras que hayan estado expuestas a la microcitosis. • No volver a sembrar en áreas intermareales hasta después de la primavera. • Sacar todas las ostras > de dos años de las áreas intermareales y ponerlas en sistemas submareales previo a la primavera. • Subir la temperatura. (> de 15°C).

<p>Infección por <i>Candidatus Xenohalictis californiensis</i></p>	<p><i>Candidatus Xenohalictis californiensis</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> • No mover especies desde zonas endémicas a zonas libres. • Realizar inspecciones anuales para monitorear el desarrollo de RLOs. • Utilizar oxitetraciclina en el alimento al 15% durante 15 días
<p>Infección por <i>Bonamia ostreae</i> Infección por <i>Bonamia exitiosus</i></p>	<p><i>Bonamia ostreae</i> <i>Bonamia exitiosus</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> • No se conocen. • Se recomienda reducir la densidad del stock y bajar la temperatura del agua, ya que esto suprime la manifestación clínica de la enfermedad. • Se recomienda evitar la introducción o traslado de ostras desde aguas enzoóticas con <i>Bonamia</i> spp. a aguas históricamente libres de ella. • Se recomienda utilizar ostras resistentes.
<p>Infección por <i>Marteilia refrigens</i> Infección por <i>Marteilia sydneyi</i></p>	<p><i>Marteilia refrigens</i> <i>Marteilia sydneyi</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> • Se recomienda aumentar la salinidad ya que esto suprime la manifestación clínica de la enfermedad. • Se recomienda evitar la introducción o traslado de ostras o mitílidos desde aguas enzoóticas con <i>Marteilia</i> spp. a aguas históricamente libres de ella.
<p>Infección por <i>Haplosporidium nelsoni</i> Infección por <i>Haplosporidium costale</i></p>	<p><i>Haplosporidium nelsoni</i> <i>Haplosporidium costale</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> • No se conocen. • Se recomienda reducir la densidad del stock y bajar la temperatura del agua, ya que esto suprime la manifestación clínica de la enfermedad. • Se recomienda evitar la introducción o traslado de ostras desde aguas enzoóticas con <i>Haplosporidium</i> spp. a aguas históricamente libres de ella.
<p>Infestación por <i>Terabrasabella heterouncinata</i></p>	<p><i>Terabrasabella heterouncinata</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> • Utilizar microcápsulas • Cubrir las conchas con cera virgen • Lavar los individuos con agua dulce • Limpiar los reproductores en Hatcherías • Monitorear la abundancia de larvas polydoras en el plancton • Adquirir semillas o reproductores certificados • Tratar las micro-cavidades con ultrasonido para destruir los huevos y juveniles de los sabélidos (1-10 minutos). • Utilizar sustancias tóxicas solubles al agua. • Monitorear las instalaciones para evitar futuras liberaciones de gusanos adultos. • Eliminar y destruir el debris que pueda captar gusanos desde las instalaciones.

		<ul style="list-style-type: none">• Sacar de las instalaciones los huéspedes o huéspedes potenciales para evitar la transmisión.
--	--	--

4.6. Manuscrito en Inglés

En el informe pre-final de este estudio, se presentó un borrador de la publicación internacional, cuyo título tentativo era "*Estatus Sanitario de las especies Haliotidos, Ostréidos y Pectínidos cultivados en Chile*".

En esta versión en español se presentaban los principales resultados de este proyecto, junto con el análisis y discusión de éstos. En base a dicho documento se procedió a preparar la versión en inglés, la cual constituye el Anexo 9 de este informe y se presenta bajo el nombre de:

"Sanitary status of cultured molluscs in Chile in relation to O.I.E listed diseases"

El documento se encuentra en estos momentos en etapa de adecuación lingüística con un hablante nativo y posterior a ello se realizarán los contactos pertinentes para presentarlo a una revista de difusión internacional.

CONCLUSIONES DEL ESTUDIO

En las cinco especies consideradas para este estudio (*H. rufescens*, *H. hannai*, *O. chilensis*, *C. giga*, *A. purpuratus*) se detectó una variada cantidad de condiciones patológicas, la mayoría sin mayor importancia, como lo fueron los parásitos metazoarios detectados en glándula digestiva de las ostras chilenas; también se consideran sin relevancia las trichodinas en Ostión del Norte y los numerosos protozoos comensales del tracto digestivo de la mayoría de las especies de bivalvos.

La excepción la constituye la presencia de la patología “Neoplasia Hemocítica en ostras chilenas”, la cual se presenta asociada a daño en todos los tejidos y se considera que los individuos afectados (12% en otoño) no son recuperables. Por lo tanto, sin estar considerada como una patología de alto riesgo, su efecto en las especies cultivadas en la zona de Calbuco no es despreciable, ya que podría estar señalando la sensibilidad de la especie ante situaciones de contaminación orgánica, sumado al periodo de baja condición después del desove.

Más relevante aún, se detectaron dos condiciones patológicas relacionadas con enfermedades de alto riesgo definidas por la OIE y en la Lista 1 y 2 de la normativa nacional: “El Síndrome del Marchitamiento del Pie del Abalón” detectada en el abalón rojo (*H. rufescens*) y *Bonamia* sp. tipo *exitiosa* en ostra chilena, ambas detectadas en la X Región.

El Síndrome del Marchitamiento del Pie del Abalón ha visto favorecido su desarrollo como resultado de las escasas medidas sanitarias adoptadas por los centros que presentaron la infección. Tal como se ha establecido, los dos centros productores que presentaron este problema, pertenecen a familias ribereñas que se sustentan mediante el cultivo en pequeña escala de varias especies de moluscos.

Como el abalón es una especie introducida en Chile en forma reciente, es poco probable que la enfermedad sea provocada por algún parásito autóctono, siendo lo más probable que el agente haya sido introducido a través de reproductores traídos desde localidades donde el parásito existe.

Los pequeños productores de abalón de la X Región han adquirido las semillas desde hatchery de Coquimbo. Sin embargo, en este estudio no fue detectado el parásito en los ejemplares de la IV Región, esto se debería a que las medidas de control que se estarían tomando desde que se detectó el problema han sido efectivas, situación que no se estaría realizando de manera eficiente entre los productores de la X Región.

Por otro lado, el parásito tipo *Bonamia*, detectado por primera vez en el Proyecto FIP 95-32, fue nuevamente detectado, confirmando su presencia y con niveles relativamente altos de prevalencia (16%). Los estudios de Kern, 1993, Campalans *et. al* 2000 y éste permiten afirmar que este agente es endémico de la región.

A pesar de no existir información que relacione la presencia del parásito a mortalidades, se debe investigar el efecto que podría tener en los niveles de producción de ostras.

Los estudios realizados durante el presente proyecto orientados hacia la determinación taxonómica del parásito, nos llevan a clasificarlo como un parásito del tipo *Haplosporidio*, tanto por estudios moleculares, como por análisis ultraestructural.

La ultraestructura de *Bonamia* sp. de ostra chilena en Chile no deja lugar a dudas que se trata de una especie de *Bonamia*, ya que presenta características propias de este grupo, como es la presencia de un núcleo con nucleolo excéntrico, los haplosporosomas (que son propios de todo el phylum *Haplosporidia*, al que pertenece *Bonamia*). El tamaño es un poco menor al de *Bonamia exitiosa*, parásito de la *Ostrea chilensis* en Nueva Zelanda y se parece más al de *Bonamia ostreae*, parásito de *Ostrea edulis*. Sin embargo, los perfiles de retículo liso circular nunca se encuentran en *B. Ostrea*, pero sí en *B. exitiosa* (Hine y Wesley, 1994).

El análisis filogenético de las secuencias obtenidas desde el parásito tipo *Bonamia* de las ostras de la X Región, confirman que éste pertenece al Phylum Haplosporidium y su mayor similitud es con las especies del género *Bonamia*. Considerando, además, sus características ultraestructurales, las cuales confirman la afiliación taxonómica obtenida por medio del análisis de las secuencias genómicas de la subunidad ribosomal, indicando además que el parásito sería una *Bonamia* del tipo *exitiosa*.

BIBLIOGRAFIA

- Andree, K.B., C.S. Friedman, J.D. Moore and R.P. Hedrick. 2000. A polymerase chain reaction assay for the detection of genomic DNA of a Rickettsiales-like prokaryote associated with withering syndrome in California abalone. *Journal of Shellfish Research* 19: 213-218.
- Arthur, P. F., G. A. Trevelyan, R. C. Fields and F. R. Oakes. 1994. Population growth of a parasitic sabellid polychaete and the influence of tank cleaning. The Abalone Farm Inc. Technical paper. 6 p.
- Austin, B. and B. A. Austin (Eds.) 1991. *Methods for the microbiological examination of fish and shellfish*. John Wiley & Sons. N. Y. 316 p.
- Basilio, C. D. Cañete, J. I. and N. Rozbaczylo. 1995. *Polydora* sp. (Sipionidae), un poliqueto perforador de la valva de ostión *Argopecten purpuratus* (Bivalvia: Pectinidae) en Bahía Tongoy, Chile. *Revista Biología Marina, Valparaíso*, 30(1): 71-77.
- Bautista, P. C. 1989. *Tecnología de cultivo*. Ed. Mundi-Prensa. Castelló, 37, Madrid. España. 167 pp. Bower, S. J. Blackbourn and G. R. Meyer: "Diseases of Cultured Japanese scallop (*Patinopecten purpuratus*) in British Columbia Canada", 4º International Colloq. Pathol. Marine , Aquaculture, pp 67-68.
- Blake J.A. and J.W. Evans 1973. *Polydora* and related genera as borers in mollusk shells and other calcareous substrates (Polychaeta: Spionidae). *Veliger* 15(3): 235-249
- Boussaid B., Gripari JL., Tige G. and G. Doraange. 1999. *Trichodina* sp. Infestatio of *Crassostrea gigas* oysters in Brittany, France. *Journal of Invertebrate Pathology* 73:339-342.
- Burreson, E.M. and L.M. Ragone-Calvo. 1996. Epizootiology of *Perkinsus marinus* disease of oysters in Chesapeake Bay, with emphasis on data since 1985. *Journal of Shellfish Research* 15(1): 17:34.

- Campalans, M., P. Rojas and M. González. 2000. Haemocytic parasitosis in the farmed oyster *Tiostrea chilensis*. Bull. Eur. Ass. Fish Pathol. 20(1): 31-33.
- Campalans, M.; González, M. and P. Rojas. 1998. Neoplasia in *Mytilus chilensis* cultivated in Chiloé Island (Chile). Bull.Eur.Ass.Fish Pathol. 18(3):93
- Campalans, M.; Rojas, P.; Sepúlveda, J.; Pascual, J.; Guerrero, I.; Riquelme, C. y Castro, R. 1997. Desarrollo de un Programa de Detección y Tratamiento de Enfermedades en Moluscos Cultivados en Chile. Proyecto FIP N°95-32/97.
- Cañete, J. 1988. Efecto de *Polydora* en cultivo de pectínidos, con referencia al ostión del norte (*Argopecten purpuratus*). Pag: 50-60 en: H. Flores y J. Maureira, eds. Cuarto Taller de Acuicultura "Problemática actual en el cultivo de la ostra japonesa y ostión del Norte". Universidad Católica del Norte, Coquimbo.
- Carvajal, J. 1988. Patología de moluscos y repoblación. Invest. Pesq. (Chile) 35: 123-128.
- Cochennec, N., F. Le Rou, F. Berthe and A. Gerard. 2000. Detection of *Bonamia ostreae*. Based on small Subunit Ribosomal Probe. Journal of Invertebrate Pathology. 76. pg. 26-32.
- Cochran, W. G. 1972. Técnicas de Muestreo. Continental México, pp:109-111.
- Comps, M. 1970. La maladie des branches chez les huitres du genre *Crassostrea*, caractéristiques et évolutions des altérations, processus de cicatrisation. Revue des Travaux de l'Institut des Peches Maritimes 34(1): 23-44.
- Couch, J. A. and J. W. Fournie. 1993. (Editors). Pathology of Marine and Estuarine Organisms. Advances in Fisheries Science. 552 p.
- Chavez, C. and S.C. Riquelme. 1994. Analysis of the bacteriological quality of *Argopecten purpuratus* breeders, for their use in aquaculture. Rev. Latinoam Acuicult. N° 43, pp: 96-99.
- Cheng, T. 1993. Noninfectious diseases of marine mollusks. In: J. A. Couch and J. W. Fournie (Editors), Pathobiology of Marine and Estuarine Organisms. pp 289-318.
- Chu, F.L. 2000. Defense mechanisms in marine bivalves. In: Nagabhushanam R. editor. Recent Advances in Marine Biotechnology. Immunobiology and Pathology: Science Publishers, Inc., Enfield (NH), USA, Plymouth, UK. p 1-42.

- Chu, F.L.E. A.K. Volety, R.C. Hale and Y. Huang. 2002. Cellular responses and disease expression in oysters (*Crassostrea virginica*) exposed to suspended field-contaminated sediments. *Marine Environmental Research* 53: 17-35.
- Diggles, B.K., N. Cochenec-Laureau and P.M. Hine. 2003. Comparison of diagnostic techniques for *Bonamia exitiosus* from flat oysters *Ostrea chilensis* in New Zealand. *Aquaculture* 220: 145-156.
- Eastman, J.R. 2001. IDRISI 32 V. 2.1. Clarck University, Worcester, M.A., USA, 298pp.
- Elston, R. 1994. Diseases of shellfish. In: J.C. Thoesen (Editor), Suggested Procedures for the detection and Identification of Certain Finfish and Shellfish Pathogens. 4th Edition, version 1, Fish Healt Section, American Fisheries Society.
- Elston R.A. 1990. Mollusc Diseases: Guide for the Shellfish Farmer. Washington Sea Grant Program. Distributed by University of Washington Press. 73 p.
- Elston, R. A., M. L. Kent and M. T. Wilkinson. 1987. Resistance of *Ostrea edulis* to *Bonamia ostreae* infection. *Aquaculture* 64:237-242.
- Farley, C.A., W. Banfiled, G. Kasnic and W. Foster. 1972. Oyster Herpes-Type Virus. *Science* 178: 759-760.
- Figueras, A. J. and J. Montes. 1988. Aber Disease of Edible oyster caused by *Martelia refringens*. En: Diseases processes in Marine Bivalve Molluscs. Bethesda Maryland American Fisheries Society. Special Publication 18. USA.
- Fisher, W.S. 1988. Environmental influence on bivalve hemocyte function. In: Fisher W.S., editor. Disease Processes in Marine Bivalve Molluscs. Bethesda, Maryland American Fisheries Society Special Publication. p. 225-237.
- Fitzhugh, K. and G. Rouse. 1999. A remarkable new genus and species of fan worm (Polychaeta: Sabellidae: Sabellinae) associated with marine gastropods. *Invertebrate Biology* 118(4): 357-390.
- Ford, S.E. 1996. Range extension by the oyster parasite *Perkinsus marinus* into the northeastern United States: response to climate change? *Journal of Shellfish Research* 15(1): 45-56.
- Ford, S.E. and M.R. Tripp. 1996. Diseases and Defense Mechanisms. In: Eble AF, editor. The Eastern Oyster *Crassostrea virginica*: Maryland Sea Grantt College, College Park, Maryland. pp. 581-660.

- Friedman, C.S. 1996. Update on abalone withering syndrome. *Alolkoy, The publication of the Channel Islands National Marine Sanctuary* 9: 9.
- Friedman, C.S., M. Thomson, C. Chun, P. Haaker and R.P. Hedrick. 1997. Withering syndrome of the black abalone, *Haliotis cracherodii* (Leach): water temperature, food availability, and parasites as possible causes. *Journal of Shellfish Research* 16: 403-411.
- Friedman, C.S., T. Robbins, J.L. Jacobsen and J.D. Shields. 2000a. The cellular immune response of black abalone, *Haliotis cracherodii* Leach, with and without Withering Syndrome. (Abstract) *Journal of Shellfish Research* 19: 514.
- Friedman, C.S., T. Robbins, J.D. Moore, J.D. Shields, K.B. Andree, K.A. Beauchamp, D.B. Antonio and R.P. Hedrick. 2000b. "Candidatus *Xenohaliotis californiensis*", a newly described bacterial pathogen and etiological agent of abalone withering syndrome. (Abstract) *Journal of Shellfish Research* 19: 645.
- Friedman, C.S.; G. Trevelyan; T.T. Robbins, E. P. Mulder and R. Fields. 2003. Development of an oral administration of oxytetracycline to control losses due to withering syndrome in cultured red abalone *Haliotis refescens*. *Aquaculture* 224: 1-23.
- Gardner, G.R., J.C. Harshbarger, J.L. Lake, T.K. Sawyer, K.L. Price, M.D. Stephenson, P.L. Haaker and H.A. Togstad. 1995. Association of prokaryotes with symptomatic appearance of withering syndrome in black abalone *Haliotis cracherodii*. *Journal of Invertebrate Pathology* 66: 111-120.
- González, M.; Rojas, P. y Campalans, M. 1999. Anomalías Celulares en Larvas de Ostra Japonesa (*Crassostrea gigas*) Provenientes de Cultivo. *Invest. Mar., Valparaíso*, 27: 111-114.
- Gray, A.P.; Lucas, I.A.N.; Seed, R. y Richardson, C.A. 1999. *Mytilus edulis chilensis* infested with *Coccomyxa parasítica* (Chlorococcales, Coccomyxaceae). *Journal of Molluscan Stud* vol. 65, n° 3, pp: 289-294.
- Haaker, P. L. and D. O. Parker. 1992. Mass mortality and withering syndrome in black abalone, *Haliotis cracherodii*, in California. *Abalone of the World. Biology, Fisheries and Culture*. S. A. G. d. Proo, Fishing News Books. 1: 215-224.

- Herrera, E. 1999 Estudio de algunos factores asociados al cuadro patológico de Retracción del Manto en el Ostión del Norte, *Argopecten purpuratus*, cultivados en la X Región. Tesis Escuela de Ciencias del Mar. Universidad Católica de Valparaíso, 66 p.
- Hine, P.M. 1991. 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. 1991. The annual pattern of infection by *Bonamia* sp. in New Zealand flat oysters, *Tiostrea chilensis*. Aquaculture 93: 241-251.
- Hine, P.M. 1991a. The annual pattern of infection by *Bonamia* sp. in New Zealand flat oysters, *Tiostrea chilensis*. Aquaculture 93: 241-252.
- Hine, P.M. 1992b. Ultrastructural observations on the annual infection pattern of *Bonamia* sp. in flat oysters *Tiostrea chilensis*. Disease of Aquatic Organisms 11: 163-171.
- Hine, P.M. and Wesney, B. 1994. The functional cytology of *Bonamia* sp. (Haplosporidia) infecting oysters (*Tiostrea chilensis*): an ultracytochemical study. Diseases of Aquatic Organisms 20:207-217.
- Hine, P. M. 1996. The ecology of *Bonamia* and decline of bivalve molluscs. New Zealand. Diseases of Aquatic Organisms 47:63-72.
- Hine, P.M., N. Cochenec-Laureau, F.C. Berthe. 2001. *Bonamia exitiosus* n.sp. (Haplosporidia) infecting flat oysters *Ostrea chilensis* in New Zealand. Diseases of Aquatic Organisms 47: 63-72.
- Hurtado, L. 2000. Descripción del proceso infectivo de poliquetos sabélidos en el abalón rojo *Haliotis rufescens* (Swanson, 1822). Tratamiento y control. Memoria para optar al título de Ingeniero en Acuicultura. Universidad Católica del Norte, Coquimbo. 64p.
- Jaramillo, E.; Navarro, J. and J. Winter,. 1981. The Association Between *Mytilus chilensis* Hupe (Bivalvia, Mytilidae) and *Edotea magellanica* Cunningham (Isopoda, Valvífera) in Southern Chile. Biol., Bull., Mar. Biol. Lab., Woods Hole. Vol. 160, N°. 1, pp. 107-113.

- Kern, F. G. 1993. Shellfish health inspections of Chilean and Australian oysters. *Abstracts, Annual Meetings*. National Shellfisheries Association Portland, Oregon.
- Kismohandaka, G., W. Roberts, R.P. Hedrick and C.S. Friedman. 1993. Investigation of physiological parameters of black abalone with withering syndrome. (Abstract) *Journal of Shellfish Research* 12: 131-132.
- Kuris, A.M., R.J. Schmitt and R. Hedrick. 1994. Abalone wasting disease: role of coccidian parasites and environmental factors. In: none (eds), *California Sea Grant Biennial Report of Completed Projects 1990-92*. California Sea Grant College, La Jolla, C.A. pp. 120-123.
- Kinne, O. (Ed.). 1983. *Diseases of Marine Animals*. Volume II. Biologische Anstalt Helgoland. Germany. 610 p.
- LeDeuff, L.M., T. Renault, A. Gérard. 1996. Effects of temperature on herpes-like virus detection among hatchery-reared larval Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Diseases of Aquatic Organisms* 24: 149-157.
- Lohrmann K.B., Brand A.R. and S.W. Feist. 2002. Comparison of the parasites and pathogens present in a cultivated and in a wild population of scallop (*Argopecten purpuratus*, Lamarck 1819) in Tongoy Bay, Chile. *Journal of Shellfish Research* 21(2):557-561.
- Lohrmann K.B., Cruz C. 2003. How healthy are Chilean scallops (*Argopecten purpuratus*) from Chile. April 23-29, 2003. St. Petersburg, Florida. P 16-17.
- Mackin, J.G., H.M. Owen and A. Collier. 1950. Preliminary note on the occurrence of a new protistan parasite, *Dermocystidium marinum* n. sp. in *Crassostrea virginica* (Gmelin). *Science* 111: 328-329.
- Martin, D and T Britayev. 1998. Symbiotic Polychaetes: review of known species. *Oceanographic Marine Biology Annual Revision*. 36: 217-340.
- Mix, M.C. and Breese, W. P. 1980. A Cellular Proliferative Disorder in Oysters (*Ostrea chilensis*) from Chiloé, South America. *J. Inver. Pathol.* 36: 123-124.
- Moore, J. D., T. T. Robbins. 2000. Withering syndrome in farmed red abalone *Haliotis rufescens*: thermal induction and association with a gastrointestinal rickettsiales-like prokaryote. *Journal of Aquatic Animal Health* 12: 26-34.

- Oakes, F. R. and R. C. Fields. 1996. Infestation of *Haliotis rufescens* shells by a sabellid polychaete. *Aquaculture* 140: 139-143.
- Office International des Epizooties. 2000. Diagnostic Manual for Aquatic Animal Diseases. 3rd. Edition 237 p.
- Office International des Epizooties. 2000. Código Sanitario Internacional para los Animales Acuáticos. 3^a. Edición. 153 p.
- Oliva, M.; Herrera, H.; Matulic, J. y B. Severino. 1986. Parasitismo en el ostión del norte *Chlamys purpuratus* (L) *Parasitol al día*. 8: 83-86.
- Perkins, F. O. 1993. Infections diseases of Molluscs. *Pathology of Marine and Estuarine Organisms*. J. A. Couch and J. W. Fourine Eds. CRC Press, Inc, 552 p.
- Ragone-Calvo, L.M., E. Burrenson. 1994. Characterization of over wintering infections of *Perkinsus marinus* (apicomplexa) in Chesapeake Bay oysters. *Journal of Shellfish Research* 13(1): 123-130.
- Riquelme, C.; Araya, R. y Escribano, R. 2000. Selective Incorporation of Bacteria by *Argopecten purpuratus* Larvae: Implications for the Use of Probiotics in Culturing Renau Systems of the Chilean Scallop.
- Riquelme, C.; Toranzo, A.E.; Barja, J.L.; Vergara, N. y Araya, R. 1996. Association Of *Aeromonas hydrophila* and *Vibrio alginolyticus* with Larval Mortalities of Scallop (*Argopecten purpuratus*) *J. Invertebr. Pathol.* Vol 67, N°3, pp. 213-218.
- Riquelme, C.; Hayashida, G.; Vergara, N.; Vasquez, A.; Morales, Y. y P. Chavez. 1995. Bacteriology of the scallop *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819) cultured in Chile. *Aquaculture* 138:49-60.
- Rojas, P.; Campalans, M. y González, M. 1999. Hemocytic Neoplasia in the Chilean oyster (*Tiostrea chilensis*) Cultured in the South of Chile. *New Record. Inv. Mar., Valparaíso*, 27: 15-18.
- Ruck, K. and P. Cook. 1998. Sabellid infestations in the shells of South African molluscs: implications for abalone mariculture. *Journal of Shellfish Research* 17(3): 693-699
- Sambrook, J., E.F. Fritsch & T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning: A laboratory Manual*, 2nd edition Cold Spring Harbor, N.Y., Cold Harbor Laboratory Press).

- Sato-Okoshi W. 1999. Polydorid species (Polychaeta: Spionidae) in Japan, with descriptions of morphology, ecology and burrow structure. 1. Boring species. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 79: 831-848
- Sato-Okoshi W and Takatsuka M. 2001. *Polydora* and related genera (Polychaeta, Spionidae) around Puerto Montt and Chiloé Island (Chile), with description of a new species of *Dipolydora*. *Bulletin of Marine Science* 68(3): 485-503
- Shaw, B.L. and H.I. Battle. 1957. The gross and microscopic anatomy of the digestive tract of the oyster *Crassostrea virginica*. *Canadian Journal of Zoology* 35: 325-347.
- Shields, J.D., F.O. Perkins and C.S. Friedman. 1996. Hematological pathology of wasting syndrome in black abalone. (Abstract) *Journal of Shellfish Research* 15: 498.
- Sindermann, C.J. 1990. Disease in shellfish culture. *Principal Diseases of Marine Fish and Shellfish*: Academic Press, Inc. p. 311-356.
- Steinbeck, J. R., J.M. Groff, C.S. Friedman, T. McDowell and R.P. Hedrick. 1992. Investigation into a mortality among populations of the Californian black abalone, *Haliotis cracherodii*, on the central coast of California, USA. In: Shepard, S.A., M.J. Tegner and S.A. Guzman del Proo (eds), *Abalone of the World: Biology, Fisheries and Culture*. (Proceedings of the 1st International Symposium on Abalone: 203-213.
- Stokes, N.A. & Burreson, E.M. 1995. A sensitive and specific DNA probe for the oyster pathogen *Haplosporidium nelsoni*. *J. Euk. Microbiol.*, 42: 350-357.
- Thoesen, J. C, (Ed) 1994. Blue Book. Versión I: Suggested Procedures for the Detection and Identification of Certain Fish and Shellfish Pathogens. Fourth Edition. Fish Health Section. American Fisheries Society.
- Toro, J.E. y Chaparro, O.R. 1990. Cultivo de Moluscos en Chile. En: A. Hernández (Editor), *Cultivo de moluscos en América Latina*. Programa de Pesquerías para América Latina. CIID-Canadá. Ancud-Chile. pp. 231-263
- Van Blaricom, G.R., J.L. Ruediger, C.S. Friedman, D.D. Woodard and R.P. Hedrick. 1993. Discovery of withering syndrome among black abalone *Haliotis cracherodii*

Leach, 1814, populations at San Nicolas Island, California. Journal of Shellfish Research 12: 185-188.

Vial, M., Teuber, C.; Costabal, P.; Poblete, T.; Donoso, T. & Gebauer, M. 1988. The presence of *Vibrio anguillarum* (Canestrini) in the digestive tract of *Mytilus chilensis* (Hupe). Biota, Vol.4, N° 2, 119-124.

Vilchis, I.L., K.L. Riser, P.K. Dayton, J.D. Moore, T.T. Robbins, C.S. Friedman. 2002. Incorporating environmental variability into fisheries management: the role of El Niño in the collapse of the California red abalone. Coquimbo, Chile. p. 73.

Referencias electrónicas:

www.ncbi.nlm.nih.gov

www.aqua.cl/noticias/index.php?doc. Cultivo de moluscos crece 31,1% y alcanza las 70,7 mil t. Noticia publicada el 02/11/2004.

www.paginasblancas.cl

www.telsur.cl

A N E X O S

- ANEXO 1: Ficha de los Centros de Cultivo**
- ANEXO 2: Carta Informativa a Productores**
- ANEXO 3: Ficha de las Muestras**
- ANEXO 4: Listado de Proyectos FONDEF en el área de Moluscos**
- ANEXO 5: Secuencia de la Región 5' de la SSU rDNA registrado bajo el número AF508801.**
- ANEXO 6: Homología fragmento 5' de la región 18S.**
- ANEXO 7: Información bibliográfica analizada.**
- ANEXO 8: Programa Seminario Internacional.**
- ANEXO 9: Versión en Inglés Publicación Internacional**

ANEXO 2: Carta Informativa a Productores

Señor(es)
Fundación Chile
Productor Abalón Rojo
Ancud

De mi consideración:

Me es grato saludarle e informar a Ud. que la P. Universidad Católica de Valparaíso se ha adjudicado recientemente el proyecto del Fondo de Investigación Pesquera FIP 2003-27 "Estatus Sanitario de los Moluscos de Cultivo en relación a las Enfermedades de Alto Riesgo", el cual será llevado a cabo por la Escuela de Ciencias del Mar de esta Universidad, en conjunto con la Universidad Católica del Norte.

Este proyecto fue solicitado por el Consejo de Investigación Pesquera dada la escasa información relativa al estado sanitario de los moluscos de cultivo y la necesidad de contar con ella por parte del Estado (Subsecretaría de Pesca y Servicio Nacional de Pesca) y de este modo adoptar medidas eficaces de prevención y control.

Con el fin de dar cumplimiento a los objetivos planteados en el estudio, será necesario realizar un análisis de muestras de Ostra Chilena, Ostra del Pacífico, Ostión del Norte, además de Abalón Rojo y Abalón Japonés.

Dentro de las actividades para desarrollar este gran objetivo, está la realización de un muestreo bianual en los centros de cultivo. Los individuos obtenidos serán sometidos a diversos análisis de laboratorio. Para tal efecto, deseamos contar con su valiosa cooperación para la obtención de muestras de Abalón Rojo desde su centro de cultivo.

Agradeciendo su atención y colaboración le saluda cordialmente,

Mariel Campalans B.
Jefe de Proyecto
Escuela de Ciencias del Mar

ANEXO 3: Ficha de las Muestras

REGISTRO DE LAS MUESTRAS

Nombre del Centro de Cultivo
Código

Nº de Unidades		Ostra del Pacífico		Abalón Rojo	
Fecha del Muestreo				Hora del Muestreo	:

Nº Muestra	Longitud (mm)	Sexo		
1				
2				
3				
4				
5				
6				
7				
8				
9				
10				
11				
12				
13				
14				
15				
16				
17				
18				
19				
20				
21				
22				
23				
24				
25				
26				
27				
28				
29				
30				

ANEXO 4 : Listado de Proyectos FONDEF en el área de moluscos

[D01I1110](#) Biotecnología aplicada a la producción de choro zapato (*Choromytilus chorus*) para potenciar su cultivo en Chile.

[D01I1127](#) Investigación y desarrollo biotecnológico para la exportación de crustáceos y moluscos in vivo.

[D01I1163](#) Desarrollo de la tecnología para la producción de semillas de pectínidos australes con importancia comercial (*Chlamys patagonica* y *Chlamys vitrea*) en Magallanes.

[AQ02I1001](#) Incrementar la eficiencia productiva de cultivos acuícolas: mejoramiento genético mediante el uso de marcadores de ADN.

[AQ02I1007](#) Desarrollo de tecnologías y normas para la detoxificación de toxinas marinas en moluscos de importancia comercial.

[AQ02I1020](#) Sistematización de la producción de semilla de moluscos y equinodermos, a través del desarrollo y estandarización de técnicas de acondicionamiento de reproductores.

[D00I1019](#) Cultivo del recurso loco (*Concholepas concholepas*) como alternativa de abastecimiento de materia prima para la industria procesadora de recursos hidrobiológicos.

[D00I1141](#) Innovaciones tecnológicas para repoblamiento y producción de lapas chilenas de exportación (*Fisurella latimarginata* y *F. cumingi*) en áreas de manejo y centros de cultivo.

[D00I1142](#) Cultivo de gastrópodos marinos de interés comercial en el sur de Chile.

[D00I1144](#) Investigación y desarrollo tecnológico del cultivo de algas y su utilización por invertebrados herbívoros en Chile.

[D00I1168](#) Optimización de la producción de semillas de invertebrados marinos de importancia comercial mediante la utilización de biopelículas microbiana.

[D00T1061](#) Desarrollo integral del cultivo de abalón japonés en estanques en el norte de Chile.

[D01I1060](#) Desarrollo de alimentos para sustentar las bases de cultivos de especies no tradicionales de peces y moluscos de importancia comercial.

[D01I1110](#) Biotecnología aplicada a la producción de choro zapato (*Choromytilus chorus*) para potenciar su cultivo en Chile.

[D01I1127](#) Investigación y desarrollo biotecnológico para la exportación de crustáceos y moluscos in vivo.

[D01I1142](#) Incremento de la producción en las áreas de manejo a través de la incorporación de semillas de erizo y talos de algas.

[D01I1163](#) Desarrollo de la tecnología para la producción de semillas de pectínidos australes con importancia comercial (*Chlamys patagonica* y *Chlamys vitrea*) en Magallanes.

[D01T1013](#) Diseño de una estrategia de transferencia tecnológica para la producción masiva de almejas de pequeño calibre para la industria procesadora.

[D01T1021](#) Comercialización de semillas y transferencia tecnológica del cultivo de semilla y de juveniles de navaja de mar a empresas y pescadores artesanales de la VIII y X regiones.

[D02I1098](#) Optimización de tecnologías para la captación natural de semillas de *Argopecten purpuratus* en el norte de Chile.

[D02I1131](#) Acuicultura para la recuperación del recurso macha *Mesodesma donacium* (Lamarck, 1818) en áreas de manejo de comunidades artesanales.

[D02I1160](#) Desarrollo de la tecnología de cultivo de la navajuela (*Tagelus dombeii*), en la zona centro sur de Chile.

[D91S1035](#) Fomento de investigación científica y tecnológica para el manejo de recursos marinos, acuicultura y evaluación de impacto ambiental en la zona norte de Chile.

[D92I1019](#) Tecnologías para la detección rápida de toxinas naturales marinas (mareas rojas).

[D96F1015](#) Inspección sanitaria en el terminal pesquero metropolitano para la modernización del sistema de distribución de pescados y mariscos.

[D96F1017](#) Fortalecimiento de la infraestructura del centro de investigaciones marinas de Quintay para contribuir al desarrollo de la maricultura.

[D96I1095](#) Desarrollo del cultivo de navaja (*Ensis macha*) en la octava región.

[D96I1102](#) Desarrollo integral del cultivo de abalón japonés en estanques en el norte de Chile.

[D97I2012](#) Aumento de la competitividad del sector pesquero artesanal a través de la optimización de la operación de las áreas de manejo.

[D98I1081](#) Bases biológicas y tecnológicas para la producción masiva de almejas de pequeño calibre para la industria procesadora chilena.

[D99I1073](#) El cultivo de la navaja (*Ensis macha*): una alternativa viable para el sector productivo nacional.

[D99I1087](#) Desarrollo científico-tecnológico de la larvicultura de invertebrados marinos.

[D99I1088](#) Desarrollo de tecnologías para la captación de semillas de loco (*Concholepas concholepas*) para su posterior cultivo intensivo en la XI región

[D99I1099](#) Cultivo suspendido del abalón japonés en el mar.

ANEXO 5: Secuencia de la Región 5' de la SSU rDNA registrado bajo el número AF508801

gi|27463628|gb|AF508801.1 Mikrocytos roughleyi 18S ribosomal RNA gene, partial sequence
Length = 951

Score = 1631 bits (823), Expect = 0.0
Identities = 890/909 (97%), Gaps = 3/909 (0%)
Strand = Plus / Plus

Bonamia sp. : GATTAAGCCATGCATGTCCAAGTATAAACACGTTTGTACTGTTCTNCTGCAGAATGGCTCATTACAACAGTTATAGTTTA
M. roughleyi: GATTAAGCCATGCATGTCCAAGTATAAACACGTTTGTACTGTGAAACTGCAGA-TGGCTCATTACAACAGTTATAGTTTA

Bonamia sp. : TTTGACATTGCAACTGTTACACGGATAACCGTAGTAACCTAGGGCTAATACGTGACAAACCCTGCTCGCGGGAGTGCATA
M. roughleyi: TTTGACATTG-AACTGTTACACGGATAACCGTAGTAACCTAGGGCTAATACGTGACAAACCCTGCTCGCAGGAGTGCATA

Bonamia sp. : TTAGCTGAAAACCAATTTTGGTTGAATAATAATATTTGTTCGGATCGCGTTGGCCTCGCCAGCGACATGTCATTCAAGTTT
M. roughleyi: TTAGCTGAAAACCAACTTTTGGTTGAATAATAATATTTGTTCGGATCGCGTTGGCCTCGCCAGCGACATGTCATTCAAGTTT

Bonamia sp. : CTGACCTATCAGCTGGACGGTAGGGTATTGGCTACCGTGGCTTTGACGGGTAACGGGGAATGCGGGTTCGATTCCGGAG
M. roughleyi: CTGACCTATCAGCTTGACGGTAGGGTATTGGCTACCGTGGCTTTGACGGGTAACGGGGAATGCGGGTTCGATTCCGGAG

Bonamia sp. : AGGCAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCCACGGGAGGCAGCAGGTGCGCAAATTACCCAATTCTGACTCAGAGAGGTAGT
M. roughleyi: AGGCAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCCACGGGAGGCAGCAGGTGCGCAAATTACCCAATTCTGACTCAGAGAGGTAGT

Bonamia sp. : GACAAGAAATAACGATCGGCGGCCCTTCGGTTGCCTATTTCGGAATGAGAACAATGTAAAAGCCTTATCGAATTCAGCGGA
M. roughleyi: GACAAGAAATAACGATCGGCGGCCCTTCGGTTGCCTATTTCGGAATGAGAACAATGTAAAAGCCTTATCGAATTCAGCGGA

Bonamia sp. : GGGCAAGCCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACCAGCTCCGCTAGCGTATACTAAAGTTGTTGCTGTTAAAACGCTCGTA
M. roughleyi: GGGCAAGCCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACCAGCTCCGCTAGCGTATACTAAAGTTGTTGCTGTTAAAACGCCCCTA

Bonamia sp. : GTTGATATCTGCCCCGCCGGCCGGACTCGCGACGCACCTGCGCCTGCGGCGGCCGCGCCGAGGCATAATTCAGGAACG
M. roughleyi: GTTGATATCTGCCCCGCCGGCCGGACTCGCGACGCACCTGCGCCTGCGGCGGCCGCGCCGGGGCATAATTCAGGAACG

Bonamia sp. : CCGTCTGGCCATTCGATTGGTCGGGCCGCTGGTCCTGATCCTTTACTTTGAGAAAATTAAGTGCTCAAAGCAGGCTCG
M. roughleyi: CCGTCTGGCCATTTAATTGGTCGGGCCGCTGGTCCTGATCCTTTACTTTGAGAAAATTAAGTGCTCAAAGCAGGCTCG

Bonamia sp. : CGCCTGAATGCATTAGCATGGAATAATAAGACACGACTTCGGCGCCGCACTCGTGCGGGTGTGTTTGTGGTTTTGAGC
M. roughleyi: CGCCTGAATGCATTAGCATGGAATAATAAGACACGACTTCGGCACCGCCACTCGTGCGGGTGTGTTTGTGGTTTTGAGC

Bonamia sp. : TGGAGTAATGATTGATAGAAACAATTGGGGTGTAGTATCGCCGGCCAGAGGTAATAATCTTTAAGNACGGTGAGACT
M. roughleyi: TGGAGTAATGATTGATAGAAACAATTGGGGTGTAGTATCGCCGGCCAGAGGTAATAATCTTTAATTCCGGTGAGACT

Bonamia sp. : AACTTATGCGAAAGCA-TCACCAAGCGTG
M. roughleyi: AACTTATGCGGAAGCATTACCAAGCGTG

ANEXO 6: Homología fragmento 5' de la región 18S.

Alineamiento de secuencias Sbo-Ra58
Región ITS-1 de *Bonamia ostreae* (AF262995) y *Bonamia sp.*
96% de identidad.

<i>Bonamia sp.</i>	G T A A T C T T C A A C G C G C A C C C A A G T G G G G
<i>Bonamia ostreae</i>	G T A A T C T T C A A C G C G C A C C C A A G T T G G G
<i>Bonamia sp.</i>	A T A G A T G A T T G C A A C T G T T C A T C T T G A A
<i>Bonamia ostreae</i>	A T A G A T G A T T G C A A T T G T T C A T C T T G A A
<i>Bonamia sp.</i>	C A A G G A A T A T C T A G T A A A C G C A A G T C A T
<i>Bonamia ostreae</i>	C A A G G A A T A T C T A G T A A A C G C A A G T C A T
<i>Bonamia sp.</i>	C A A C N T T G C A T T G A T T A C G T C C C T G C C C
<i>Bonamia ostreae</i>	C A A C - T T G C A T T G A T T A C G T C C C T G C C C
<i>Bonamia sp.</i>	T T T G T A C A C A C C G C C C G T C G C T T C T A C C
<i>Bonamia ostreae</i>	T T T G T A C A C A C C G C C C G T C G C T T C T A C C
<i>Bonamia sp.</i>	G A T T G A A T A A T G A G G T G A A T T A G G T G G A
<i>Bonamia ostreae</i>	G A T T G A A T A A T G A G G T G A A T T A G G T G G A
<i>Bonamia sp.</i>	T A A G A G C C G C C T C G G C G C G T T C T T A G A A
<i>Bonamia ostreae</i>	T A A G A G C - - G C T C - - C G C G T T C T T A G A A
<i>Bonamia sp.</i>	G C T T T G T G A A C C T T G T T A T T T A G A G G A A
<i>Bonamia ostreae</i>	G C T T C G T G A A C C T T G T T A T T T A G A G G A A
<i>Bonamia sp.</i>	G G A A A A G T C G T A A C G A G G T T T C C G T A G G
<i>Bonamia ostreae</i>	G G A A A A G T C G T A A C A A G G T T T C C G T A G G
<i>Bonamia sp.</i>	T G A A C C T G C G G A A G G A T C A T T A C
<i>Bonamia ostreae</i>	T G A A C C T G C G G A A G G A T C A T T A C

ANEXO 7: Información bibliográfica analizada.

1. Información Bibliográfica Analizada para el Objetivo 4.2.

- Documentos de Tesis seleccionados en la primera etapa de búsqueda de información.

Nombre Entidad	Cita Bibliográfica
Universidad Arturo Prat	Sánchez A. Monique. 2000. <i>"Determinación del uso potencial de parásitos y comensales como marcadores biológicos de unidades poblacionales del Ostión del Norte, en el norte de Chile". 2000.</i>
Universidad Arturo Prat	Zamora, Mauricio. 1998. <i>"Análisis bioquímicos e histológicos de la glándula digestiva y musculatura como fuente energética base del evento reproductivo de la hembra del <u>Octopus minus gold</u> (1852)".</i>
Universidad Austral de Chile	Ruiz Leiva, Roberto Ariel. 2003. <i>"Caracterización cuantitativa y cualitativa de las poblaciones de diatomas bentónicas utilizadas como alimento de semillas de abalón rojo (<u>Haliotis rufescens</u>) en la zona de San Antonio, Quellón".</i>
Universidad de Chile	Araya Clericus, Javier A. 1980. <i>Estudios biológicos para el cultivo de ostras (<u>Ostrea chilensis</u>, Philippi, 1845) en el estuario Quempillén, Ancud-Chiloé: cuantificación del crecimiento comparativo en sustrato natural y artificial en distintas edades.</i>
Universidad Mayor de Santiago	Araos Domínguez, Olga A. 2000. <i>Utilización de bioensayos como método de evaluación toxicológica de recursos hídricos en la VI región.</i>
Universidad de Antofagasta	Vilches Meneses, Jorge S. 1993. <i>Patogenicidad de <u>Vibrio anguillarum</u> (var) en larvas de <u>Argopecten purpuratus</u> (Lamarck, 1819).</i>
Universidad de Antofagasta	Cifuentes, Sandoval, Valenzuela. <i>Efectos patológicos de la infección causada por <u>Proctoeces humboldtii</u> en tejido gonádico de <u>Fissurella crassa</u>.</i>
Universidad de Antofagasta	Vásquez, Ana Ma. <i>Efectos de <u>Proctoeces lintoni</u> (digenea) en la composición celular de la hemolinfa de <u>Fissurella crassa</u>.</i>
Pontificia Universidad Católica de Valparaíso	Maritano Jeria, Liliana. 1981 <i>Determinación del ciclo reproductivo del ostión (<u>Chlamys purpurata</u>) (Lamarck, 1819), de la zona de Valparaíso, mediante un estudio histológico de sus gónadas. 1981</i>

Pontificia Católica de Valparaíso	Universidad	Tapia Almonacid, María Soledad. 1998. <i>Producción de organismos triploides de Ostra japonesa (<u>Crassostrea gigas</u>, Thumberg, 1973).</i>
Universidad del Norte	Católica del	Hurtado, Luz. 2000. <i>Descripción del proceso infectivo de poliquetos sabélidos en el abalón rojo <u>Haliotis rufescens</u> (Swainson, 1822). Tratamiento y control.</i>
Universidad del Norte	Católica del	Basilio, Canio. 1991. <i>Caracterización taxonómica y morfológica de <u>Polydora</u> sp. (Polychaeta: Spionidae), su mecanismo de infestación y daño provocado en la estructura valvar del ostión del norte <u>Argopecten purpuratus</u> en cultivo suspendido y banco natural.</i>
Universidad del Norte	Católica del	Montecinos, Rodrigo. 1994. <i>Ciliados (Ciliophora) frecuentes del sedimento existente en cultivos larvales de <u>Argopecten purpuratus</u> Lamarck: Taxonomía e historia natural.</i>

- **Listado de Seminarios seleccionados durante la primera etapa de revisión.**

Título	Año
Karin B. Lohrmann and Catherine Cruz. How healthy are Chilean scallops (<u>Argopecten purpuratus</u>) from Chile? 14 th International Pectinid Workshop, St. Petersburg, USA.	2003
González M. Teresa y Marcelo Valdebenito. Infección por <u>Proctoeces lintoni</u> en dos lapas submareales de la IV Región. XXI Congreso de Ciencias del Mar, Viña del Mar, p. 41.	2001
Valderrama Catherine L., René Durán y Doris Oliva. Parasitosis y castración parasitaria en la almeja juliana <u>Tawera gayi</u> . XXI Congreso de Ciencias del Mar, Viña del Mar, p. 103.	2001
Valderrama K., D. Brown y B. Campos. Efecto castrador de un parásito tremátodo sobre <u>Eurhomalea lenticulares</u> (Mollusca: Bivalvia) extraídas desde la rada de "El Algarrobo", V Región. XIX Congreso de Ciencias del Mar, Antofagasta, P. 201.	1999
Aracena O., I.M. López y V. Jeréz. Parásitos en la gónada de los bivalvos <u>Ensis macha</u> y <u>Tagelus dombeii</u> en la VIII Región, Chile. IV Congreso Latinoamericano de Malacología (IV CLAMA), Coquimbo, Chile, p.68.	1999
Sánchez M. y M. Oliva. Endoparásitos metazoos y comensales perforadores de <u>Argopecten purpuratus</u> Lamarck, 1819, en el norte de Chile. ¿Indicadores de unidades poblacionales? XVII Congreso de Ciencias del Mar, Santiago, Chile, p. 147.	1997

Oliva M., D.A. Olivares y M. Clarke. Castración parasitaria en <i>Concholepas concholepas</i> . XV Jornadas de Ciencias del Mar, Coquimbo, Chile, p. 90.	1995
K. Lohrmann & Y. Smith. Platelminfos parásitos en el Ostión del Norte, <i>Argopecten purpuratus</i> Lamarck, 1819. XIII Jornadas de Ciencias del Mar, p. 119	1993
Lohrmann K., Smith Y., Díaz S., Bustos M. & C. Cortés. Presencia de un tremátodo digeneo en <i>Argopecten purpuratus</i> provenientes de poblaciones naturales. IV Congreso Latinoamericano de Ciencias del Mar, p. 104.	1991

2. Información Bibliográfica Analizada para el Objetivo 4.3.

- **Revisión bibliográfica documentos de Tesis Universidades chilenas.**

Universidad Arturo Prat	Lotina Silva, Rodrigo. 1999. "Incidencia ectoparasitaria del género <i>Polydora</i> (<i>Polychaeta spionidae</i>) sobre el crecimiento de la Ostra del Pacífico, bajo condiciones de cultivo (I región)".
Universidad de Concepción	Torres Reyes, César E. 1996. "Aspectos bacteriológicos del medio natural relacionados con el sistema de cultivo del ostión del norte <i>Argopecten purpuratus</i> (Lamarck, 1819) en Bahía Coliumo, VIII región".
Universidad Austral de Chile	Nuñez Mayorga, Mario. 2002. "Sustitución y suplementación de dieta viva con dieta inerte (emulsiones lipídicas) y su interacción con la temperatura en función del rendimiento larvario del Ostión del Norte, <i>Argopecten purpuratus</i> , en condiciones controladas".
Universidad de Chile	Fonck O'Brien, Erika A. 1981. Crecimiento de juveniles de abalón rojo (<i>Haliotis rufescens</i> , Swainson 1822) alimentados en acuarios con microalgas de la IV región, Chile.
Universidad de Chile	Zambrano González, Daniel A. 1998. Evaluación técnico-económica del calentamiento del agua en el cultivo del abalón y turbot.
Universidad de Chile	Romero Ormazábal, Jaime M. 2002. Microflora en ostras chilenas y su incidencia en la colonización por vibrios patógenos y en la descomposición post-cosecha.
Universidad de Chile	Paratori Girardi, Marcela M. 2001. Análisis del comportamiento biométrico y reproductivo de dos stocks de ostión del norte, <i>Argopecten purpuratus</i> (Lamarck, 1819).

Universidad Nacional Andrés Bello	Lapena Videla, José Luis. 2001. <i>Evaluación del efecto temperatura y el retardo de la fecundación sobre la eficacia de la fertilización y desarrollo temprano de <u>Argopecten purpuratus</u> (Lamarck, 1819) (Bivalvia Pectinidae).</i>
Pontificia Universidad Católica de Valparaíso	Rojas Henríquez, Nora. 2001. <i>Distribución de materia orgánica, carbono y nitrógeno y diagnosis temprana en sedimentos de la zona de canales entre los golfos Coronado y Elefante, Chile.</i>
Pontificia Universidad Católica de Valparaíso	Celedón Canessa, Victoria. 2001. <i>Sedimentología y morfología submarina de la Región de los Canales, entre Puerto Montt y el Estrecho de Magallanes (Chile).</i>
Pontificia Universidad Católica de Valparaíso	Alvarez Cortés, Jorge E. 2000. <i>Evaluación del efecto de la contaminación por concentraciones subletales de cobre, sobre el desarrollo embrionario y larval de <u>Mytilus chilensis</u>.</i>
Pontificia Universidad Católica de Valparaíso	Ortiz Cárdenas, Sara del Pilar. 1998. <i>Fluctuaciones espaci-temporales de las características físicas y químicas del agua de mar frente a Coquimbo (35°C).</i>
Pontificia Universidad Católica de Valparaíso	Maturana Acevedo, Jenny. 1998. <i>Distribución de materia orgánica, carbono total, carbono orgánico, carbono inorgánico, nitrógeno orgánico y fósforo total, en los sedimentos superficiales de la zona de los canales australes, entre Pto. Montt y Laguna San Rafael</i>
Pontificia Universidad Católica de Valparaíso	García Larraguibel, Wanda A. 1996. <i>Estudio experimental del deterioro que causa el metal pesado cobre sobre el chorito maico <u>Penemytilus purpuratus</u></i>
Pontificia Universidad Católica de Valparaíso	Curkovic Vásquez, Sandro. 1998. <i>Estudio de factibilidad técnico-económico de un cultivo de abalón (<u>Haliotis discus lannai</u>) en Chile.</i>
Pontificia Universidad Católica de Valparaíso	Rosenblum Kirshlon, Hernán. 1998. <i>Crecimiento y mortalidad de loco (<u>Concholepas concholepas</u>) (Burguiere, 1789) en el sector de Ventanas-Horcón (V región, Chile).</i>

- **Publicaciones en revistas de universidades con carreras a fines**

Fecha	Título	Autor
1995	Influencia de la luz en la maduración sexual de hembras <i>Octopus minus</i>	Óscar Zúñiga R., Alberto Olivares P. y Luis Ossandón R. <i>Estud. Oceanol.</i> 14: 75-76
1997	Necesidad de crear una reserva marina de ostiones en el Banco de la Rinconada (Antofagasta - II Región, Chile)	Miguel Avendaño y Marcela Cantillanez <i>Estud. Oceanol.</i> 16: 109-113.
1998	Catálogo descriptivo de los moluscos litorales (Gastropoda y Pelecypoda) de la zona de Antofagasta, 23° S (Chile).	Nury Guzmán, Sheyla Saa & Luc Ortlieb. <i>Estud. Oceanol.</i> 17: 17-86.
1997	Estudio de los requerimientos nutricionales del ostión del norte <i>Argopecten purpuratus</i> (Lamarck, 1819) durante el acondicionamiento reproductivo.	A. Farías, I. Uriarte y P. Varas <i>Rev. biol. mar. oceanogr.</i> 32 (2): 127-136
1999	Niveles de tolerancia a cobre (Cu ⁺²) en vibrionáceas asociadas al bivalvo <i>Argopecten purpuratus</i> (Lamarck, 1819).	M. Jorquera, A. Camaño, M. A. Mondaca y C. Riquelme <i>Rev. biol. mar. oceanogr.</i> 34 (2): 315-324
2000	Condiciones paleoambientales de sedimentación y preservación de materia orgánica en bahía Mejillones del Sur (23° S), Chile.	J. Valdés, L. López, S. LoMónaco y L. Ortlieb <i>Rev. biol. mar. oceanogr.</i> 35 (2): 169-180
2001	Establecimiento de bacterias benéficas en el tracto digestivo y gónada de adultos de <i>Argopecten purpuratus</i> (Lamarck, 1819) en cultivo masivo.	R. E. Avendaño-Herrera, M. Dekovic y C. E. Riquelme <i>Rev. biol. mar. oceanogr.</i> 36 (1): 31-41
2002	Utilización de biopelículas bacterianas en el asentamiento de larvas de <i>Argopecten purpuratus</i> (Lamarck 1819) en un hatchery comercial	R.E. Avendaño-Herrera, C.E. Riquelme y F. Silva <i>Rev. biol. mar. oceanogr.</i> 37 (1): 35-41

3. Información Bibliográfica Analizada para el Objetivo 4.4.

- **Publicaciones internacionales en etapa de análisis**

Año	Título	Autor y cita
1995	Future of biotechnology-based control of disease in marine invertebrates.	Bachere, Mialhe <i>et al.</i> MOL MAR BIOL BIOTECH 4 (4): 275-283 DEC 1995.
1995	Establishment of an experimental-infection protocol for the flat oyster, <i>Ostrea edulis</i> , with the intrahaemocytic protozoan parasite, <i>Bonamia ostreae</i> -application in the selection of parasite-resistant oysters.	Bachere, Hervio D. <i>et al.</i> Aquaculture 132 (3-4):183-194 MAY 1 1995.
1998	Selecting the flat oyster <i>Ostrea edulis</i> (L) for survival when infected with the parasite <i>Bonamia ostreae</i> .	Naciri-Graven Y. <i>et al.</i> J EXP MAR BIOL ECOL 224(1): 91-107 JUN 1 1998.
1999	Technological constraints to disease prevention and control in aquatic animals, with special reference to pathogen detection	Sharon McGladdery FAO Fisheries Technical Paper 395
1999	The need for molecular tools in the study of mollusc pathogens	P.M. Hine FAO Fisheries Technical Paper 395
2000	Influence of parentage upon growth on <i>Ostrea edulis</i> : evidence for inbreeding depression.	Naciri-Graven, Y. <i>et al.</i> GENET RES 76 (2):159-168 OCT 2000.
2001	Molecular diagnosis of fish and shellfish diseases: present status and potential use in disease control.	Cunningham, Carey O. Aquaculture 206 (2002) 19-55.
2001	Living with bonamiasis: Irish research since 1987.	Culloty S.C., M.F. Mulcahy. HYDROBIOLOGIA 465 (1-3): 181-186

		dec 2001.
2001	Population bottleneck and effective size in <u>Bonamia ostreae</u> - resistant populations of <u>Ostrea edulis</u> as inferred by microsatellite markers.	Launey, S. <i>et al.</i> GENET RES 78 (3):259-270 DEC 2001.
2001	An investigation into the relative resistance of Irish flat oysters <u>Ostrea edulis</u> L. To the parasite <u>Bonamia ostreae</u> (Pichot <i>et al.</i> 1980).	Culloty, S.C. <i>et al.</i> Aquaculture 199 (3-4): 229-244 AUG 1 2001.
2001	Seminario sobre enfermedades de los animales acuáticos: Enfermedades de los moluscos"	Puntarenas, Costa Rica, 26-30 de marzo, 2001
2001	Use of particle filtration and UV irradiation to prevent infection by <u>Haplosporidium nelsoni</u> (MSX) and <u>Perkinsus marinus</u> (Dermo) in hatchery-reared larval and juvenile oysters.	Ford, S.E. <i>et al.</i> Aquaculture 194 (1-2): 37-49 MAR 1 2001.
2003	Determining culture strategies in populations of the European flat oyster, <u>Ostrea edulis</u> , affected by bonamiosis.	Montes, J. <i>et al.</i> Aquaculture 220 (1-4): 175-182 APR 14 2003.
2002	El análisis de riesgo como ayuda a la toma de decisiones para controlar y prevenir las enfermedades de los animales.	Zepeda Sein, Cristóbal (E 70 SG 10.pdf)

- Informes finales proyectos FIP y FONDEF relacionados con medidas de control y prevención

Número de Proyecto	Nombre
PROYECTO FIP 97-41	Herramientas metodológicas para definir los usos de áreas con bancos naturales en la XI Región.
PROYECTO FIP 94-01	Evaluación del efecto de mitigación de aporte de nutrientes al medio, al desarrollar policultivos marinos de salmónidos
D01I1074	Desarrollo de nuevas técnicas para la prevención y control de enfermedades infecciosas y no infecciosas en los cultivos de abalón.
D00T1058	Producción de semillas microbiológicamente controladas y servicios complementarios para la industria acuícola
D00T1066	Mejoramiento de la producción de recursos naturales con apoyo de imágenes satelitales.
D02I1095	Optimización de la producción ambientalmente limpia de triploides de ostión del norte <i>Argopecten purpuratus</i> .
D02I1108	Uso de fotocatalisis heterogénea para el tratamiento de agua en sistemas de recirculación en la acuicultura intensiva nacional.
D02I1129	Investigación y desarrollo de reproductores y semilla de calidad genética y sanitaria para la sustentabilidad del cultivo del abalón japonés (<i>Haliotis discus hannai</i>).
D97I2033	Investigación y desarrollo de tecnologías para la utilización de probióticos en el cultivo del ostión del norte <i>Argopecten purpuratus</i> , Lamarck1819.
D98I1044	Investigación y desarrollo de una tecnología limpia para la inducción a triploidía de ostra japonesa y ostión del norte.
D99I1055	Optimización inmunológica y genética de péptidos endógenos antimicrobianos en ostiones (<i>Argopecten purpuratus</i>) para aumentar su capacidad exportadora.

ANEXO 8: Programa Seminario Internacional

SEMINARIO INTERNACIONAL

"Estado Actual de las Enfermedades de Alto Riesgo en Moluscos de Cultivo"

Este evento ha sido planificado dentro de las actividades programadas para la ejecución del proyecto FIP 2003-27 "Estatus Sanitario de los Moluscos de Cultivo en relación a las Enfermedades de Alto Riesgo", y forma parte de los estudios impulsados por las autoridades gubernamentales para conocer el estatus sanitario de las poblaciones de cultivo que pertenezcan a las especies susceptibles de contraer enfermedades de clasificación obligada y peligrosas de la OIE.

Este evento tiene como objetivo principal discutir sobre medidas de prevención y control de las enfermedades de alto riesgo.

PROGRAMA

5 DE OCTUBRE

- | | |
|-------|--|
| 09:00 | Inscripción |
| 09:30 | Palabras de Bienvenida, autoridad PUCV o UCN. |
| 09:45 | Presentación de Temas y Marco del Proyecto FIP |

**Expositor: Mariel Campalans B.
Jefe de Proyecto
Pont. Universidad Católica de Valparaíso
CHILE**

Políticas Nacionales e Internacionales de Control y prevención

- 10:00 "Políticas Sanitarias para el cultivo de Moluscos en Chile"
- Expositor: Ana María Skármeta**
Representante Comité Técnico Reglamento
Sanitario. Depto. Acuicultura.
Subsecretaría de Pesca
CHILE
- 10:30 "Programas Sanitarios de Moluscos: Aplicación y Adaptaciones al sector productivo"
- Expositor: Marcelo Cassali**
Médico Veterinario
Depto. de Sanidad Pesquera
Servicio Nacional de Pesca
CHILE
- 11:00 CAFE
- 11:15 "Estado de los programas sanitarios y su impacto en el sector acuícola".
- Expositor: Dr Eugene Burrenson**
Virginia Institute of Marine Science (VIMS)
Gloucester Point, Virginia
ESTADOS UNIDOS
- 12:00 Mesa redonda
- Moderador: Dr. Susan Bower**
Fisheries and Oceans Canada
Pacific Biological Station
CANADA

- 13:00 RECESO
- 14:30 "Situación Sanitaria de los Cultivos de Abalones en Chile"
- Expositor: Marcos Godoy**
Veterinario
Fundación Chile
CHILE
- 15:00 "Descubrimientos de RLO's en abalones: métodos de diagnóstico, distribución y medidas y políticas de control".
- Expositor: Dr Carolyn Friedman**
Assistant Professor
School of Aquatic and Fishery Sciences
University of Washington
ESTADO UNIDOS
- 16:00 "Situación Sanitaria de los Ostiones en Chile"
- Expositor: Karin Lohrmann Sheffield**
Facultad Ciencias del Mar
Universidad Católica del Norte
CHILE
- 16:30 Mesa Redonda
- Moderador: Dr Franck Berthe**
Canada Research Chair in Aquatic Health Science
Mollusc Health
Department of Pathology & Microbiology
University of Prince Edward Island

6 DE OCTUBRE

Aspectos Epizootiológicos de las Enfermedades de Declaración Obligada

- 09:00 "Medidas de Control, manejo y prevención de poliquetos plagas en cultivos de moluscos de importancia comercial".
- Expositor: Juan I. Cañete**
Facultad de Ciencias
Universidad de Magallanes
CHILE
- 10:00 "Presencia anual del protozoo *Bonamia* sp. en Ostra chilena de cultivo"
- Expositor: Mariel Campalans B.**
Escuela de Cs. del Mar
Pont. Universidad Católica de Valparaíso
CHILE
- 10:30 "Afiliación taxonómica de *Bonamia* sp., aislado chileno"
- Expositor: Dr. Jacqueline Campalans B.**
Escuela de Cs. del Mar
Pont. Universidad Católica de Valparaíso
CHILE
- 11:00 "Especies conocidas de *Bonamia*: distribución e identificación ultraestructural".
- Expositor: Dr. Mike Hine**
National Centre for Disease Investigation
Ministry of Agriculture and Forestry
NUEVA ZELANDA
- 12:00 Mesa Redonda
- Moderador: Dr. Eugene Burrenson**
Virginia Institute of Marine Science (VIMS)
Gloucester Point, Virginia
ESTADOS UNIDOS

- 13:00 RECESO
- 14:30 "Epizootiología de la Microcitosis: factores ambientales que afectan el desarrollo de la enfermedad y las técnicas de manejo preventivo".
- Expositor: Dr Susan Bower**
Fisheries and Oceans Canada
Pacific Biological Station
CANADA
- 15:30 "Aspectos epizootiológicos de la Marteilia: posible presencia del parásito en huéspedes chilenos. Proyección del impacto en la producción".
- Expositor: Dr Franck Berthe**
Canada Research Chair in Aquatic Health Science
Mollusc Health
Department of Pathology & Microbiology
University of Prince Edward Island
- 16:30 CAFE
- 16:45 "Aspectos epizootiológicos de la Perkinsosis: factores ambientales que influyen en el desarrollo de la enfermedad y las estrategias de manejo para controlarlas".
- Expositor: Dr Eugene Burrenson**
Virginia Institute of Marine Science
(VIMS) Gloucester Point, Virginia
ESTADOS UNIDOS
- 17:45 Cocktail de Clausura

ANEXO 9

Versión En Inglés Publicación Internacional

Sanitary status of cultured molluscs in Chile in relation to O.I.E listed diseases

Mariel Campalans¹ and Karin Lohrmann²

¹Escuela de Ciencias del Mar, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso

Avda. Altamirano 1480, Valparaíso, Chile

²Facultad de Ciencias del Mar, Universidad Católica del Norte

Larrondo 1281, Coquimbo, Chile

INTRODUCTION

Mollusc culture is an important economic and social activity in Chile. The main native cultured species are scallops (*Argopecten purpuratus*), mussels (*Mytilus chilensis*, *Chorus mytilus chorus*, *Aulacomya ater*) and the flat oyster (*Ostrea chilensis*). Several clam species (*Mulinia chilensis*, *Mesodesma donacium*, *Tagelus dombeii*) are starting to be cultured at a model scale, as well as some limpets (*Fisurella* spp.). Farmed exotic species are red abalone (*Haliotis rufescens*), Japanese abalone (*Haliotis discus hannai*), and the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*).

Culture conditions may stress the organisms, benefiting the development of diseases, as well as providing better conditions through crowding for the transmission of pathogens. In Chile, not much research has been carried out on mollusc diseases, and most of it involves metazoan parasites. Clams (Bahamonde, Lopez, 1962; Carvajal, 1976; Carvajal, Escalante, 1983; Osorio, Castillo, 1984; Valderrama et al., 2004), scallops (Lohrmann, Smith, 1993; Lohrmann et al., 1991; Mateo et al., 1975; Oliva, Sánchez, 1996; Oliva et al., 1986), mussels (Lasiak, 1991), gastropods (Cañas, Lozada, 1987; George-Nascimento et al., 1998; Oliva, 1992) are intermediate hosts for larval cestodes and trematodes. Metazoan parasites may damage their hosts, castrating them (Mateo et al., 1975; Oliva, 1992; Valderrama et al., 2004) and making them look unappetizing for human consumption; however, they do not cause any diseases to the molluscs.

Information on protistan or prokaryotic parasites is scarce, and only some of it has been published. Haemic neoplasia is a pathological condition of still unknown origin, described from *Ostrea chilensis* (Campalans et al., 2000; Mix, Breese, 1980) and *Mytilus chilensis* (Campalans et al., 1998). A microsporidian was reported from oocytes of *Eurhomalea lenticularis* (Olivares, Brown, 1996), and a *Bonamia*-like parasite was described from *O. chilensis* (Campalans et al., 2000; Kern, 1993). Rickettsiales-like organisms (RLOs) have been reported from scallops (*Argopecten purpuratus*), with no evidence of damage to the host (Lohrmann et al., 2002).

The increasing exporting and importing movements of molluscs, plus the international necessity for surveillance and zoning made the fisheries governmental agency (Subsecretaría de Pesca) elaborate two lists of high risk diseases for molluscs in Chile, which were released in January 2002. These lists are assessed each year by a group of national experts, and modified, if necessary. List 1 includes all OIE listed diseases, excluding those known to be present in Chile. On the other hand, list 2 includes the OIE listed diseases that are present in Chile, and/or other infections or infestations considered of high risk in the country.

In 2004, a surveillance programme was established for those species susceptible to any of the list 1 or list 2 diseases. Thus, Japanese oyster, *Crassostrea gigas*, and the abalones *Haliotis rufescens* and *Haliotis discus hannai* farmers are obliged to perform twice a year a macroscopic and histological screening of 30 animals, which must be performed by an authorized laboratory. The farmer of species not known to be susceptible to any of these pathogens may willingly adhere to this surveillance programme, but the financial cost must be completely undertaken by them.

In an effort of getting a better understanding of the current sanitary status of cultured molluscs in Chile, the governmental agency (Subsecretaría de Pesca) made a call for proposals, considering the screening of list 1 and 2 high risk disease susceptible species, plus a complete screening of the related literature. Thus, in 2003, the *Sanitary Status of cultured molluscs in relation to high risk diseases* fund project began.

MATERIALS AND METHODS

Five mollusc species were studied: *Crassostrea gigas*, *Haliotis rufescens*, *Haliotis discus hannai*, *Ostrea chilensis*, and *Argopecten purpuratus*. Histology was performed on the soft tissues and the shells of abalones and scallops were searched for polychaetes as well. Eight sampling zones were selected considering the geographical distribution of the culture centres (Figure 1). Table 1 shows the zones and the species sampled from each one.

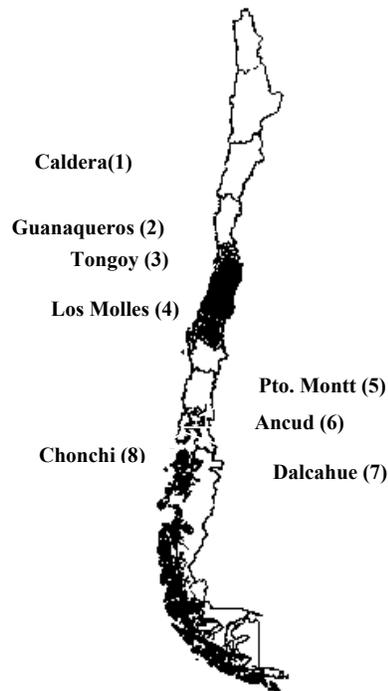


Table 1: Sampling zones and species sampled from each one

ZONE	Location	Species
Zone 1	Caldera	Red abalone, Japanese abalone, Northern scallop
Zone 2	Guanaqueros	Japanese abalone, Northern scallop
Zone 3	Tongoy	Northern scallop, Pacific oyster
Zone 4	Los Molles	Red abalone
Zone 5	Puerto Montt - Calbuco	Chilean oyster, Pacific oyster
Zone 6	Ancud	Chilean oyster
Zone 7	Dalcahue	Pacific oyster, Red abalone
Zone 8	Chonchi	Red abalone

Two samplings were performed for all species: Spring-Summer 2003 and Fall-Winter 2004. Sixty specimens were sampled from each zone on each opportunity. When possible, a minimum of 20 individuals from each farm in the same zone was sampled. An additional sampling was performed in April for *Ostrea chilensis* (Table 2).

The surface temperature of the sea was registered during the sampling periods and satellite maps were generated for each zone.

Table 2: Species, zones and number of specimens sampled

Especies	Number of samplings	Corresponding zone	Number of specimens
Chilean oyster	3	5 and 6	360
Pacific oyster	2	3, 5 and 7	360
Red abalone	2	1,4,7 and 8	480
Japanese abalone	2	1 and 2	240
Northern scallop	2	1,2 and 3	360
		TOTAL	1800

Histology

A standard section through the digestive gland, to include gills, mantle and kidney, was excised, placed in tissue embedding cassettes, and fixed in Davidson's fluid for 24 hours (Shaw, Battle, 1957). They were then transferred to 70% ethanol, and further processed for histology. Five µm thick sections were stained with haematoxylin and eosin, and carefully searched for any putative pathogens. Photographs were taken with an Eclipse E600 microscope.

Transmission Electron Microscopy (TEM)

TEM was performed only on *Ostrea chilensis*, for describing the ultrastructure of *Bonamia* sp., due to the impossibility to macroscopically detect the oysters infected with the parasite. Samples for TEM from each of the 120 oysters sampled at the end of

December 2003 (Summer), and in August 2004 (Winter) were taken. An additional sample of 10 oysters was sampled for TEM in May.

Small, 1mm³ pieces of digestive gland and gills were fixed in 2.5% glutaraldehyde in filtered seawater (0.22µm), washed once in filtered seawater, and kept at 4°C, until the results of histology showed which ones were infected. They were then washed twice with filtered seawater, and further processed for TEM. They were post-fixed for two hours in 1% reduced osmium tetroxide (1:1 mixture of 3% aqueous Potassium Ferrocyanide and 2% Osmium Tetroxide). After washing three times with filtered seawater (0.22µm), rinsed twice in distilled water, stained for 1 hour “en bloc” with 2% aqueous uranyl acetate, dehydrated in ethanol, washed in acetone, and embedded in Medcast (Pelco), semi-thin sections, 1 µm thick, were cut on a Reichert Ultracut S microtome, and stained with toluidine blue. Ninety nm thin sections were cut with a diamond knife, collected on copper grids, and stained with aqueous uranyl acetate and lead citrate. The sections were viewed with a Zeiss EM 900 electron microscope at 50 kV, and photographs were taken.

RESULTS

Abalones

No significant findings can be reported from the soft tissues of Japanese abalones.

However, different is the situation for red abalones. Basophilic inclusions with rickettsia like organisms (RLOs) were observed in the post-esophagus and digestive gland (Figures 2a and b). Most of them were observed intracellularly, but some could also be seen in the lumina of the digestive tract. In more severe cases diverse degrees of metaplasia was also observed (Figure 3). Eighty four out of 480 red abalones had RLOs, as shown in Table 3.

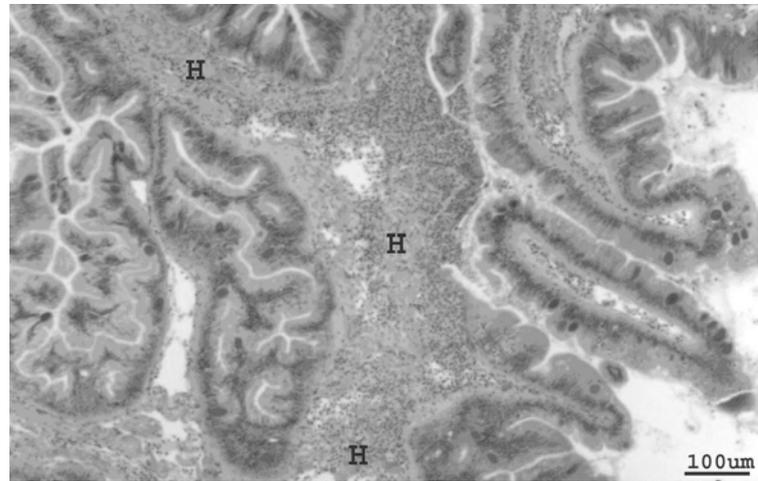


Figure 2a: Rickettsiales-like organisms (RLOs) in post-oesophagus of red abalone.

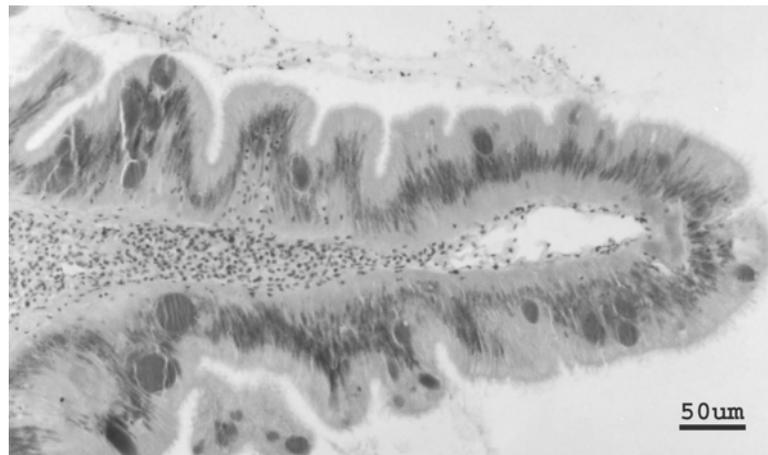


Figure 2b: Higher power image of figure 2a.

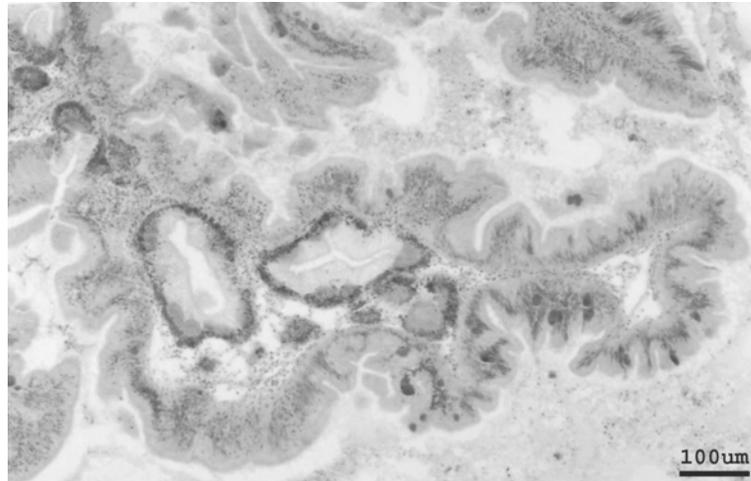


Figure 3: Metaplasia of digestive gland in red abalone. Two digestive tubules can still be recognized (DGT). Arrows point to some of the inclusions with RLOs. Stain: H-E.

Table 3: Number of red abalones with RLOs for each zone in summer and winter

Zone	Summer	Winter	TOTAL
Zone 5	0/60	0/60	0/120
Zone 6	0/49	0/60	0/109
Zone 7	0/39	18/60	18/99
Zone 8	35/112	31/40	66/152
Total	35/260 (13%)	49/220 (22%)	84/480 (17%)

Scallops

One histology slide was examined from each scallop sampled. The following presumptive parasites, prokaryotes and protistans, were detected:

Rickettsiales-like organisms (RLOs)

These organisms appeared as basophilic, generally spheric-shaped inclusion bodies, mostly intracellular, but sometimes also present in lumina of digestive tubules (Fig.4).

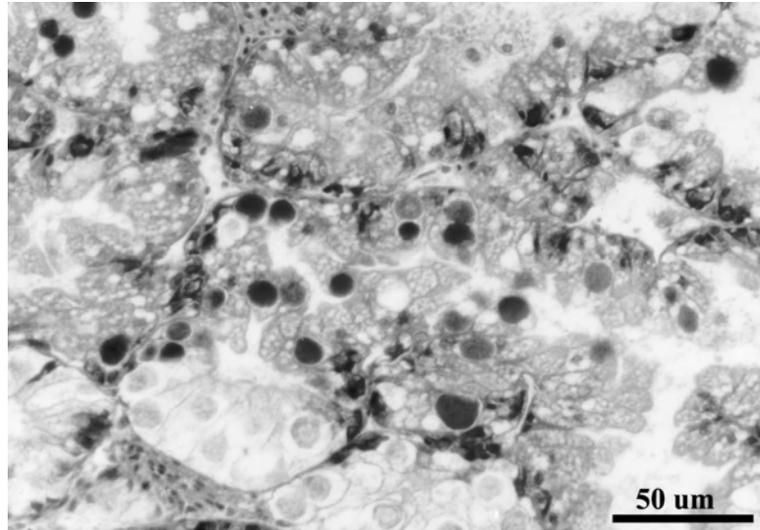


Figure 4: Digestive gland tubules (DGT) in scallop, *Argopecten purpuratus* with RLOs. Stain: H-E.

Trichodina sp.

The ciliate protozoan *Trichodina* sp. was found loosely attached to the gill filaments, but no damage to the host was detected. It was dome-shaped, with a horseshoe-shaped macronucleus. A ciliated spiral band was observed encircling the oral region, the basal disc was surrounded by a ciliary girdle (Fig. 5).

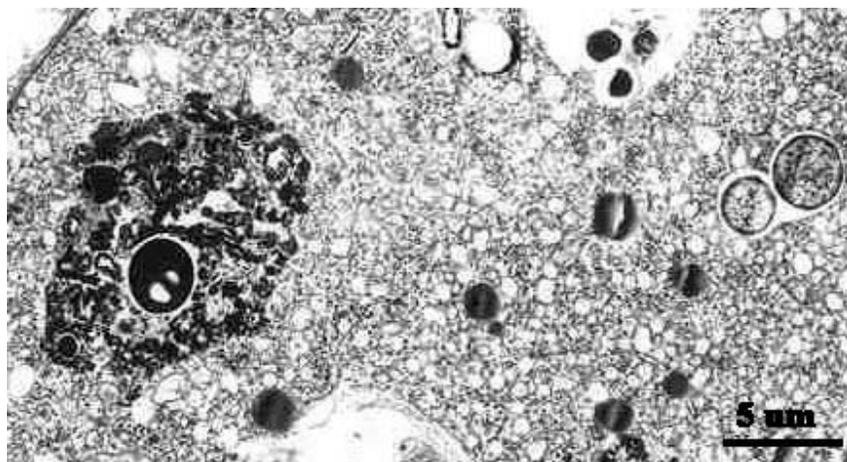


Figure 5: *Trichodina* sp. in scallop, *Argopecten purpuratus*. Part of a gill filament (GF) can be observed, and four *Trichodinid* ciliates. The horseshoe shaped macronucleus is clearly visible. Stain: H-E.

Granulomas

They were present in the mantle edge, on the fold facing the shell. Some degrading material with abundant ceroid was surrounded by fibroblast-like cells, forming small “swirl lesions”, which gathered together with more lesions of this kind (Fig. 6). Some of these granulomas could be seen in the epithelia, seeming to migrate through them, and could also be found outside the mantle.

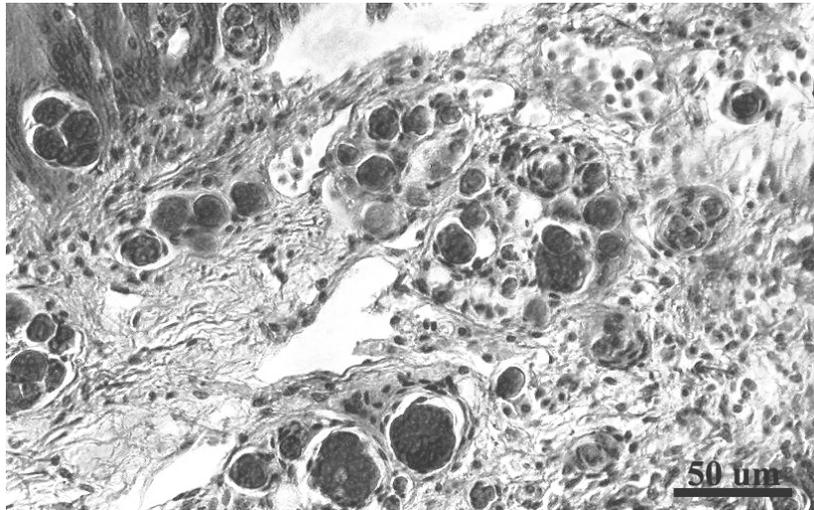


Figure 6: Mantle of scallop, *Argopecten purpuratus*, with granulomas. E: epithelium. Stain: H-E.

The prevalence of each of these findings is shown in table 4 (zones 1, 2 and 3, and both sampling periods).

Table 4: Findings on scallops for each zone, in summer and in winter

	Zone 1		Zone 2		Zone 3	
	Summer	Winter	Summer	Winter	Summer	Winter
Rickettsia-like organisms (RLOs)	0/61	2/60	4/59	6/60	0/60	0/61
<i>Trichodina</i> sp.	0/61	0/60	0/59	0/60	10/60	48/61
Granulomas	0/61	5/60	0/59	0/60	8/60	7/61

Oysters

No significant finding can be reported for the Japanese oyster, *Crassostrea gigas*.

The Chilean oyster (*Ostrea chilensis*) showed two pathological conditions, an haemocytic neoplasia (Fig. 7a and b), and a protozoan parasite, *Bonamia* sp.

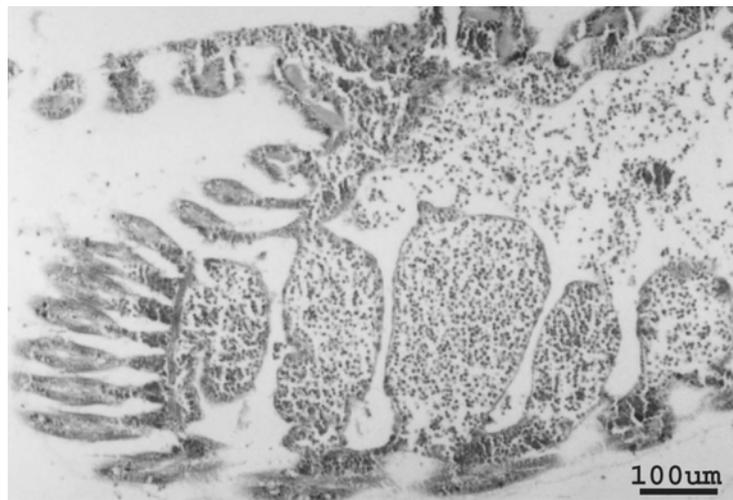


Figure 7: Neoplasia in the Chilean oyster, *Ostrea chilensis*. Dilated gill filament, with numerous haemocytes

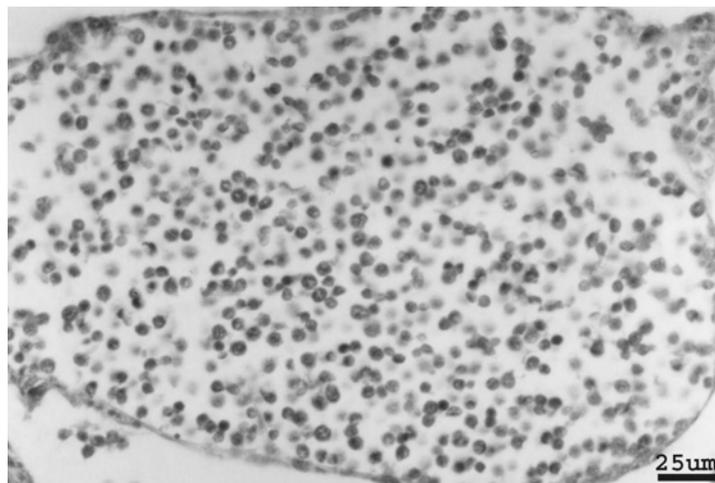


Figure 7b: higher power image of 7a. Stain: H-E.

Table 6 shows the prevalence of haemocytic neoplasia in Summer, Fall and Winter from zones 5 and 6.

Table 6: Prevalence of haemocytic neoplasia in *Ostrea chilensis*

Zone	SUMMER	FALL	WINTER	TOTAL
ZONE 5	0/60	13/60	4/60	17/180
ZONE 6	2/60	1/60	3/70	6/190
TOTAL	2/120 (3%)	14/120 (12%)	7/130 (5%)	23/370 (6%)

The parasite *Bonamia* sp. was detected as intracellular inclusions in haemocytes, sometimes also extracellularly (Fig 8). Table 7 shows the prevalence for the three sampling periods and both zones.

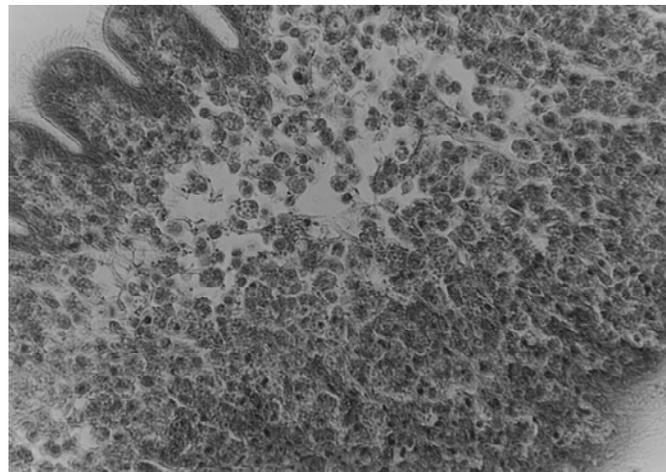


Figure 8: Heavy gill infiltration in Chilean oyster infected with *Bonamia* sp. H: haemocytes. Stain: H-E.

Table 7: Prevalence of *Bonamia* sp. in *Ostrea chilensis*

ZONE	SUMMER	FALL	WINTER	TOTAL
ZONE 5	5/60	1/60	3/60	9/180
ZONE 6	2/60	0/60	0/70	2/190
TOTAL	7/120	1/120	3/130	11/370

Ultrastructure of *Bonamia* sp.

Figure 9 shows a low power TEM image of one haemocyte with two *Bonamia* cells. *Bonamia* cells were slightly ovoid, measuring from 1.8 to 2.2 μm . The nucleus was electron lucent, with a spherical to ovoid shape, sometimes slightly irregular, with an eccentric nucleolus (Fig. 10). The haplosporosomes were spherical to ovoid, in variable number, and sometimes close to mitochondria, which had a blasted appearance.

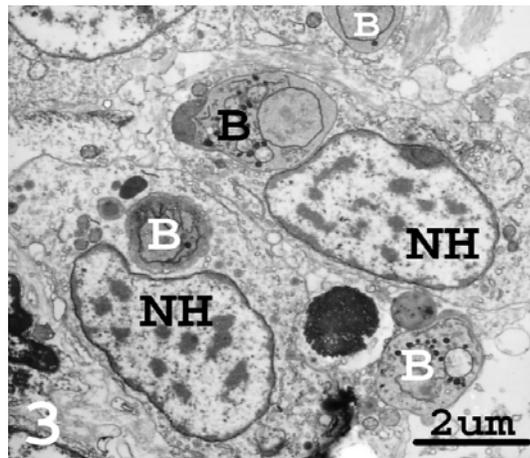


Figure 9: Transmission electron microscopy (TEM) image of one haemocyte, and part of another one with *Bonamia* sp. cells in their interior. Hn: nucleus of haemocyte; Bn: nucleus of *Bonamia* sp. M: mitochondria in *Bonamia* sp.

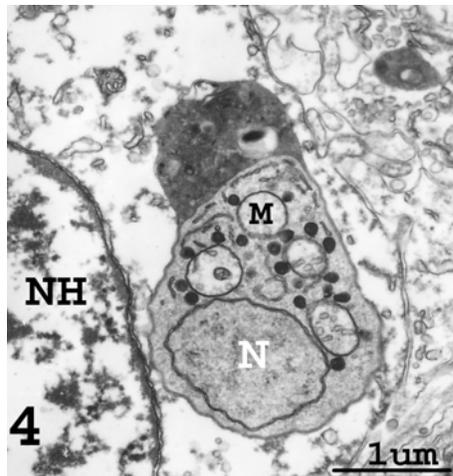


Figure 10: TEM image of one *Bonamia* sp. cell (B1) and part of another one (B2) place in the cytoplasm of a haemocyte. On the left side of the photograph, part of the nucleus of the haemocyte (Hn) can be observed. N: nucleus, M: mitochondria, HM: mitochondria of haemocyte.

DISCUSSION

The results of this study and those from earlier studies help to conclude that molluscs cultured in Chile are generally healthy. However, two parasites that may cause O.I.E. listed diseases have been detected: RLOs in red abalones (*Haliotis rufescens*), and *Bonamia*, possibly *Bonamia exitiosa*, in the Chilean oyster (*Ostrea chilensis*). Other putative pathogenic parasite maybe neoplasia in *O. chilensis*.

The RLOs detected in red abalones from Chiloe Island presumably correspond to Candidatus *Xenohaliotis californiensis* (Figures 2a and 2b). This pathogen was found through the complete year of study. Notwithstanding, it was not possible to associate any mortality to this pathology, maybe due to the temperature ranges present in the affected zone. The masses of water where the affected abalones are kept do not exceed the 14°C in Summer, showing an annual average range of 12.5°C. This situation may be ascribed to the cold masses of water (sub-Antarctic origin) affecting the inner area of the island, which could be affecting the bacteria pathogenesis, causing the disease to become chronic, and affecting the growth of individuals.

None of the detected abnormalities in scallops correspond to any of the O.I.E. listed diseases. However, it was possible to detect the presence of granulomas and tricodinas. Scallops sampled from zones 2 and 3 showed the pathologic condition known as "mantle retraction", presenting granulomas at the edges. This condition was also present in the gills but at a lower scale.

The neoplasia in the Chilean oyster (*Ostrea chilensis*) from zone 5 (Calbuco), where the most severe cases were detected (22% of the individuals) may be indicating that oysters could be more vulnerable to viruses or pollutants during the post-spawning period. However, chemical studies to the water column and sediments are needed to determine the relation of the organic pollution to this type of neoplasia.

Table 7, (prevalence of *Bonamia* sp. in *Ostrea chilensis*), shows that the highest prevalence of the parasite occurs in summer (5.8%) and the lowest occurs in Fall (0,8%), when a highest protozoa dissemination would be expected in oyster haemocytes.

Many reasons can be pointed out to explain the differences with the *Bonamia* pattern described by Hine (1996). One of them could be that the sampling might have been carried out on Summer *Bonamia* survivor species. Another reason could be that

the neoplasia could have masked the *Bonamia* parasite. Finally, it can be suggested that the egg re-absorption period may take place before in New Zealand, so the sampling periods should be carried out in March in Chile, as there the water temperature starts to decrease.

The differences detected in the *Bonamia* prevalence in zone 5 and 6 might be related to the annual temperature pattern. Calbuco (zone 5) presents high temperatures in Summer (19°C); on the other hand, Ancud (zone 6) shows an historical cold temperature pattern, presenting a 12,5°C annual average range (Torres et al., 1995). During this study, the zone 6 temperature did not exceed the 13,5°C in Summer; however, zone 5 showed temperatures exceeding the 20°C during the same period. This condition may be influencing the egg laying and re-absorption periods.

The ultrastructural description of *Bonamia* sp. in *Ostrea chilensis* in shows that the studied parasite seems to belong to the *Bonamia* genus. The size of the nucleus is smaller than the one observed in *Bonamia exitiosa*, the *Ostrea chilensis* parasite in New Zealand, being more similar to *Bonamia ostreae*, the *Ostrea edulis* parasite. However, the round smooth reticulum profiles are not found in *B. ostreae*, but can be detected in *B. exitiosa* (Hine and Wesley, 1994). The morphologic information obtained suggests the *Bonamia* is similar to *B. exitiosa* (Hine, personal communication).

Literature Cited

- Bahamonde, N., Lopez, M.T., 1962. *Proboscidosaccus mesodesmatis* n. sp. parásito de *Mesodesma donacium* Lamarck. (Cestoda, Tetraphyllidea). Investigaciones Zoológicas Chilenas 8, 43-56.
- Campalans, M., González, M., Rojas, P., 1998. Neoplasia in *Mytilus chilensis* cultivated in Chiloé Island (Chile). Bull. Eur. Ass. of Fish Pathol. 18, 93-95.
- Campalans, M., Rojas, P., Gonzalez, M., 2000. Haemocytic parasitosis in the farmed oyster *Tiostrea chilensis*. Bull. Eur. Ass. Fish Pathol. 20.
- Cañas, P., Lozada, E., 1987. Nota sobre un tremátodo digeneo endoparásito del loco *Concholepas concholepas* Bruguiere 1789 (Gastropoda:Muricidae). Parasitología al Día 11, 173-176.
- Carvajal, J., 1976. Machas infestadas con larvas de céstodos tetrafilididos en Coquimbo. Chile Pesquero 9, 9-10.
- Carvajal, J., Escalante, H., 1983. Nota sobre una larva de céstodo parásito en la almeja peruana *Donax peruvianus*. Parasitología al Día 7, 89-90.
- George-Nascimento, M., Balboa, L., Aldana, M., Olmos, V., 1998. Las lapas *Fiosurella* spp. (Mollusca:Archaeogastropoda) y el pejesapo *Sicyases sanguineus* (Pisces:Gobiesocidae) son huéspedes secuenciales de *Proctoeces lintoni* (Digenea:Fellodistomidae) en Chile. Revista Chilena de Historia Natural 71, 169-176.
- Kern, F.G., 1993. Shellfish health inspections of Chilean and Australian oysters, Annual Meeting. National Shellfisheries Association, Portland, Oregon, pp. 366.
- Lasiak, T., 1991. Bucephalid trematode infections in mytilid bivalves from the rocky intertidal of southern Chile. Journal of Molluscan Studies 58, 29-36.
- Lohrmann, K., Smith, Y., 1993. Platelmintos parásitos en el ostión del Norte, *Argopecten purpuratus* Lamarck, 1819, XIII Jornadas de Ciencias del Mar, Viña del Mar, Chile, pp. 119.
- Lohrmann, K., Smith, Y., Díaz, S., Bustos, M., Cortés, C., 1991. Presencia de un tremátodo digeneo en *Argopecten purpuratus* provenientes de poblaciones naturales., IV Congreso Latinoamericano de Ciencias del Mar, Coquimbo, Chile, pp. 104.
- Lohrmann, K.B., Brand, A.R., Feist, S.W., 2002. Comparison of the parasites and pathogens present in a cultivated and in a wild population of scallops (*Argopecten purpuratus* Lamarck, 1819) in Tongoy Bay, Chile. Journal of Shellfish Research 21, 557-561.
- Mateo, E., D., C.P., L., E.G., C., R.L., 1975. Parásito causante de castración de la Concha de Abanico. Biol. Lima 18, 81-86.
- Mix, M.C., Breese, W.P., 1980. A cellular proliferative disorder in oysters (*Ostrea chilensis*) from Chiloé, Chile, South America. Journal of Invertebrate Pathology 36, 123-124.
- Oliva, M., Sánchez, M., 1996. Parásitos del ostión *Argopecten purpuratus* en ambiente natural y sistemas de cultivo. In: Concepción, U. (Ed.), XVI Jornadas de Ciencias del Mar, Concepción, pp. 98.
- Oliva, M., Herrera, H., Matulic, J., Severino, B., 1986. Parasitismo en el Ostión del Norte *Chlamys (Argopecten) purpuratus* (Lamarck, 1819). Parasitología al Día 10, 83-86.

- Oliva, M.E., 1992. Parasitic castration in *Fisurella crassa*(Archaeogastropoda) due to an adult digenea, *Proctoeces lintoni* (Fellodistomidae). Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro 87, 37-42.
- Olivares, C., Brown, D., 1996. Evidence of a protista parasite in *Eurhomalea lenticularis* (Sowerby) (Mollusca: Bivalvia): one case of intraoocytarian meroparasitism. In: Sergio Letelier, O.G., Enrique Arias (Ed.), Fourth International Congress of Medical & Applied Malacology. International Society for Medical and Applied Malacology, Santiago, Chile, pp. 182.
- Osorio, C., Castillo, M., 1984. Almejas comestibles (*Venus antiqua*) infectadas por tremátodos. Parasitología al Día 8, 117-118.
- Shaw, B.L., Battle, H.I., 1957. The gross microscopic anatomy of the digestive tract of the oyster *Crassostrea virginica* (Gmelin). Canadian Journal of Zoology 35, 325-347.
- Valderrama, K., Oliva, M., Campos, B., Brown, D., 2004. Parasitic castration of *Eurhomalea lenticularis* (Bivalvia: Veneridae) by a digenetic trematode: quantitative histological analysis. Diseases of Aquatic Organisms 59, 151-158.