Susana Darriba Couñago



Atlas de Histopatoloxía Moluscos bivalvos mariños

Histopathological Atlas Marine bivalve molluscs

XUNTA DE GALICIA

Susana Darriba Couñago



Atlas de Histopatoloxía

Moluscos bivalvos mariños

Histopathological Atlas Marine bivalve molluscs

XUNTA DE GALICIA

Consellería do Mar

Santiago de Compostela 2016

Edita: Intecmar. Xunta de Galicia (Consellería do Mar)

1.ª edición: Santiago de Compostela, marzo de 2017

© Xunta de Galicia (Consellería do Mar), 2016, da edición
Edificios administrativos - San Caetano, s/n
15781 Santiago de Compostela
http://mar.xunta.gal/

© Susana Darriba Couñago, dos textos e das fotografías

Maquetación e impresión: Tórculo Comunicación Gráfica, S. A. Depósito legal: C 165-2017 ISBN: 978-84-453-5245-8

Este documento pode ser reproducido total ou parcialmente, por calquera medio, sempre que se cite explicitamente a súa procedencia.

Índice Contents

	Introdución
	Introduction
I	Procariotas
I	Prokaryota
II	Protozoos
П	Protozoa 45
III	Metazoos
Ш	Metazoa
IV	Outros patóxenos 117
IV	Other pathogens 119
v	Alteracións patolóxicas
V	Pathological alterations 137

Dende que nos primeiros noventa foi editado o "Plan de ordenación dos recursos pesqueiros e marisqueiros de Galicia", son numerosos os títulos publicados pola Consellería do Mar, contribuíndo a agrandar o acervo marítimo-pesqueiro nas máis diversas materias, e mesmo chegando, dalgunha maneira, a formar unha sorte de pequenas coleccións.

Evidentemente, todas teñen o seu mérito, pero —quizabes por influencia profesional— eu sinto unha especial proximidade e simpatía por aquelas publicacións caracterizadas pola súa utilidade práctica. Publicacións que constitúen auténticos instrumentos de consulta, manuais de aprendizaxe ou ferramentas de traballo.

Este "Atlas de histopatoloxía de moluscos bivalvos" ten toda esa vocación. Non se trata dun libro para lucir nun andel nin para deleitarse coa súa lectura nunha tarde de domingo. É unha obra destinada a ser apalpada por quen se queira achegar á patoloxía de moluscos bivalvos, sobre todo á hora clave de identificar simbiontes e axentes patóxenos ao microscopio.

Nótase que a súa autora, a Dra. Susana Darriba, o concibiu así, porque foi ela quen escolleu o formato, dotándoo dun espiral que facilita o seu manexo e a visión das fotografías de preparacións histolóxicas que incorpora. E teño para min que, consciente ou non, fixo unha magnífica guía, que resultará fundamental na formación e cualificación de futuros patólogos en moluscos bivalvos.

Foi a Unidade de Patoloxía do Intecmar o primeiro laboratorio europeo en acadar, no seu ámbito, a súa acreditación segundo a norma UNE-EN ISO/IEC 17.025, o que dá proba da súa competencia; e agora, este atlas que se nutre do traballo desenvolvido nesta unidade, vén encher unha carencia sentida internacionalmente, polo que estou convencida de que terá unha acollida extraordinaria en calquera latitude onde o marisco de cuncha teña relevancia, o cal non deixa de ser outro motivo para que os galegos nos sintamos orgullosos de contar cun Instituto que é referencia mundial no seu.

> Rosa María Quintana Carballo Conselleira do Mar

Since the "Galician fisheries and shellfisheries resources management plan", published in the early 90s, numerous titles have been published by the Galician Ministry of the Sea, contributing to enhance the marine-fishery collection in several topics and achieving a sort of little collections.

Obviously, all of them have their value, but – perhaps due to my professional influence – I feel a special proximity and sympathy for those publications characterized for their practical utility. Publications which constitute real tools like manual books, tutorials or work tools.

This "Histopathological Atlas of Marine Bivalve Molluscs" focuses all that. It is not a book to show on a shelf neither a book for a leisure time on a Sunday evening. It is a book to be touched for someone who wants to start up in bivalve mollusc pathology, especially a tool to identify symbionts and pathological agents by optical microscope.

It is noticeable that the author, Dr Susana Darriba, conceived it for that purpose, she chose the design, outfitting it with a spiral allowing an easy management as well as the proper vision of the pictures included. I firmly think that, consciously or not, she did a great guide, which will be essential for the training and qualification of forthcoming bivalve mollusc pathologists.

The Pathology Unit of the INTECMAR was the first European laboratory achieving the accreditation in histopathological techniques of bivalve molluscs, following the UNE-EN ISO/IEC 17.025 norm, which is a clear evidence of their competence. Now, this Atlas nourished with the work of this Unit, comes to fill an international gap. Therefore, I am convinced that it will be extremely welcomed in any latitude where shellfish has relevance, being again another reason for us, Galician people, to be proud of having an Institute like Intecmar which is a worldwide reference in their field.

> **Rosa María Quintana Carballo** Galician Minister of the Sea



Introdución Introduction

INTRODUCIÓN | 11

palabra **patoloxía** fai referencia ao **estudo das enfermidades**, provén do grego *pathos* (πάθος), que significa 'enfermidade' e *loguía* (λογία), que significa 'estudo' ou 'tratado'. A **histopatoloxía** é unha das ramas da Patoloxía, que se encarga do **estudo dos tecidos para o diagnóstico de enfermidades**.

Cómpre resaltar, que o concepto de "enfermidade" ten distintas acepcións en función de que nos esteamos referindo ao concepto biolóxico ou ao considerado pola lexislación vixente. Así pois, dende o punto de vista biolóxico, "enfermidade" é a alteración prexudicial do estado de saúde dun organismo. Porén, a Organización Mundial da Sanidade Animal (OIE) defínea como a infección, clínica ou non, por un ou varios axentes, entendendo por infección a mera presenza do axente, aínda que estea latente e non cause danos.

A histopatoloxía baséase na observación de seccións dos tecidos ao microscopio para avaliar a existencia de alteracións na súa morfoloxía, a presenza de alteracións celulares, de organismos patóxenos ou de elementos alleos ao individuo, para chegar a un diagnóstico do estado sanitario do individuo.

No estudo das enfermidades de moluscos bivalvos a técnica histolóxica é fundamental, xa que é a única técnica que permite avaliar o estado xeral dos individuos e recadar información dos distintos organismos que se atopan en simbiose co bivalvo, avaliar se causan danos nos tecidos, o alcance das lesións, o grao de infección, a resposta do hospedador, etc. Todos estes aspectos son de gran relevancia, tendo en conta que non sempre a presenza dun axente biolóxico pode estar alterando o estado de saúde dos individuos.

Segundo isto, é preferible denominar como organismos "simbiontes" en xeral a todos aqueles organismos que se identifican vivindo no bivalvo, xa que non todos chegan a actuar como parasitos. Algúns están considerados como meros comensais; sen descartarse que en determinadas situacións a súa presenza poida provocar efectos negativos para o hospedador converténdose en parasitos.

Nos últimos anos están tomando cada vez máis forza outras técnicas de diagnóstico, como as moleculares, pero segue a ser a histoloxía a técnica de referencia cando o que se pretende é facer unha vixilancia do estado

zoosanitario das poboacións e tamén como punto de partida ante o estudo dun episodio de mortaldade.

A formación do persoal que participa nas distintas fases dun ensaio histopatolóxico é o punto máis crítico do ensaio, especialmente no relativo á observación ao microscopio para identificar organismos patóxenos e á valoración final para establecer o diagnóstico.

Existen numerosas publicacións científicas, libros e capítulos de libros que tratan de axentes patóxenos que infectan a diferentes especies de moluscos bivalvos, tanto en Galicia como noutras zonas do mundo. Non obstante, non existe un atlas histopatolóxico que reúna o amplo abano de organismos que entran en simbiose cos bivalvos mariños e que poden chegar a alterar o estado normal do individuo.

Esta publicación pretende cubrir esta lagoa e servir de guía para facilitar a identificación de organismos simbiontes e alteracións patolóxicas que se atopan en bivalvos mariños das nosas costas.

O **Atlas** está estruturado en capítulos que conteñen unha breve introdución e numerosas fotografías dos organismos simbiontes ou alteracións patolóxicas obxecto de cada capítulo. As fotografías son orixinais e foron realizadas sobre preparacións histolóxicas, tinguidas con hematoxilinaeosina, e procesados integramente na Unidade de Patoloxía do Intecmar.

O procesamento das mostras faise seguindo as especificacións incluídas no procedemento normalizado de traballo PNT-H-05-T. Este procedemento resúmese nos seguintes pasos: apertura e observación macroscópica de posibles anomalías; fixación en Dadvison dun fragmento de vianda que conteña manto, gónada, branquia e glándula dixestiva fundamentalmente; deshidratación con alcohois de gradación crecente; aclarado con xileno; infiltración e inclusión en parafina; corte ao micrótomo e tinción con hematoxilina-eosina para observación ao microscopio óptico.

Tendo en conta que este atlas ten por obxecto servir de guía de consulta durante a observación ao microscopio óptico de preparacións histolóxicas de bivalvos mariños, non se entra en detalles científicos sobre as patoloxías ás que se fai referencia. Evitáronse pois as referencias bibliográficas, explicacións sobre ciclos de vida, mecanismos de transmisión e toda aquela información que corresponde a outro tipo de publicacións.

Os tres primeiros capítulos inclúen simbiontes pertencentes a tres grandes grupos de organismos vivos (procariotas, protozoos e metazoos). No cuarto capítulo integráronse outros axentes patóxenos que non pertencen aos tres grupos mencionados e que son minoritarios. O quinto capítulo recolle aquelas alteracións patolóxicas que tamén son habituais e que resultan, xeralmente, máis difíciles de identificar que os organismos simbiontes. Aínda que a histoloxía non é suficiente para poder identificar organismos a nivel de especie, inclúense os nomes científicos daqueles simbiontes que foron identificados pola comunidade científica empregando as técnicas necesarias para iso.

The word **Pathology** refers to **the study of diseases**, it derives from the Greek *pathos* ($\pi \dot{\alpha} \theta \sigma \varsigma$), which means "disease" or "suffering" and *loguía* ($\lambda \sigma \gamma i \alpha$), which means "study" or "treatise". **Histopathology** is a Pathology brand, dealing with **the study of tissues for diseases diagnostic**.

It must be stated that the concept "disease" embraces different meanings depending on the biological concept or according to the regulations currently in force. Therefore, "disease" from a biological point of view is the harmful alteration of the health status of an organism. Nevertheless, the World Organization for Animal Health (OIE) defines it as clinical or non-clinical infection with one or more aetiological agents; infection is understood as the presence of a multiplying, or otherwise developing, or latent pathogenic agent in a host.

Histopathology is based on microscopic observation of tissue sections in order to value the existence of morphological alterations, the presence of cellular alterations, pathogenic organisms or external elements, in order to attain a diagnosis of the health of individuals.

Regarding bivalve mollusc diseases, their study using the histological technique is essential, because it is the only technique which allows a general status valuation of specimens together with information on simbionts, if these lead to tissue damage, lesion spreading, infection level, host reaction and so on. This information is higly important, taking into account that biological agents (simbionts) do not always alter the sanitary status of individuals.

According to this, on the whole, all organisms living in any bivalve are named as "simbionts" organisms, as not all of them might act as parasites. Several are regarded as commensals, but without discarding that sometimes their presence could lead negative effects to their hosts, turning out into parasites.

In last years, other diagnostic techniques, like molecular ones, are becoming more usual, but histology still is the reference technique when zoosanitary status of populations is to be done as well as starting point to study a mortality event. Workers' training is the most critical point of any histopathological essay, mainly in what regards to the pathogens identification and the final valuation to diagnose.

There are many scientific papers, books and book chapters dealing with pathogens infecting bivalve molluses, both in Galicia as in other parts of the world. However, there is no any histopathological atlas gathering together the wide range of organisms inhabiting marine bivalves and which could alter the normal status of individuals.

This publication aims to fill this lack, being a guide making easier the identification of simbionts and pathological alterations found in Galician marine bivalves.

The atlas is organized in chapters, each containing a short introduction and many photographs of simbiont organisms or related pathological alterations dealt with in the chapter. All the photographs are original and were taken over histological slides, stained with haematoxylin-eosin and they were full processed in the Pathological Unit of the Intecmar.

Samples processing is conducted according to the specifications included in the internal procedure PNT-H-05-T. This procedure is summarized in the next steps: opening and macroscopic observation of potential abnormalities; fixation of a meat fragment (mantle, gonad, gills and digestive gland mainly) with Dadvison's fixative; dehydration passing through a serial of growing gradation alcohols; clearing in xylene; paraffin infiltration and inclusion; microtome sectioning and staining with haematoxylin-eosin for optical microscopic observation.

Taking into account that the main objective of this atlas is to be used as a reference guide during optical microscopic observation of marine bivalves slides, scientific details on the above-mentioned pathologies are not included. Bibliographic references, life cycle explanations, transmission mechanisms and information concerning other type of publications, were avoided.

First three chapters include symbionts of three large live groups of organisms (Prokaryota, Protozoa and Metazoan). In the fourth chapter, other minority pathogen agents, not belonging to the previous three groups, were included. The fifth chapter deals with pathological alterations which are commonly observed and generally more difficult to identify than symbiont organisms. Given that identification at specific level is not possible using just histopathology, only those scientific names of symbiont species identified by research community, applying the required techniques, were included and used.



I Procariotas I Prokaryota

Introdución

Os organismos **procariotas** están formados por unha única célula que é do tipo "procariota". Este tipo celular é o máis sinxelo, son células máis pequenas que as eucariotas, adoitan posuír unha parede que recobre a membrana celular, carecen de núcleo e non presentan orgánulos especializados. O material xenético está libre no citoplasma nunha zona denominada "nucleoide".

Os organismos procariotas están comunmente presentes nos moluscos bivalvos en diversos órganos. Por unha banda, poden aparecer bacterias libres, asociadas en moitos casos con procesos de necrose tisular, sendo moi abundantes en individuos moribundos. Pero o máis relevante, dende o punto de vista da histopatoloxía, son os quistes con procariotas detectados nas branquias e as colonias de organismos procariotas que aparecen en distintos órganos e en diversas especies de bivalvos.

Debido a que mediante a observación ao microscopio óptico de preparacións histolóxicas non é doado saber se os organismos procariotas están en células do hospedador (intracelulares) e non é posible coñecer certos detalles morfolóxicos, entre outros é necesario recorrer á microscopía electrónica de transmisión para caracterizar este tipo de simbiontes, que soen ser, ou ben rickettsias ou chlamydias.

Para efectos do estudo histopatolóxico poden nomearse como **quistes de procariotas** ou **quistes bacterianos** as colonias de procariotas que se observan nas branquias rodeadas dunha envolta eosinófila, que adoitan ser de gran tamaño e localizarse sobresaíndo como bolsas ou bochas (figuras 1 e 2).

Por outra banda, nomearanse como colonias de **organismos procariotas intracelulares** (OPI) (figuras 3 a 12) aquelas colonias nas que, mediante o microscopio óptico, pode observarse un lixeiro granulado indicativo de que están compostas por multitude de organismos individuais e que aparecen dentro das células do bivalvo.

No caso de non ter evidencias da localización da colonia no interior dunha célula do hospedador rexistraranse simplemente como colonias de **organismos procariotas** (OP) (figuras 13 a 16).

Introduction

Prokaryotic organisms are unicellular, with a single "prokaryotic" cell. This kind of cells have the simplest organization; they are smaller than eukaryotic cells, usually with a wall covering the cellular membrane, non nucleated and devoid of specialized organelles. Genetic material is free in cytoplasm in an area named "nucleoid".

Prokaryotes are commonly found in different organs of bivalve molluscs. On the one hand, they can appear as free bacteria, sometimes associated with tissue necrosis processes, being so very common in moribund individuals. On the other hand, taking into account their histopathology, cysts enclosing prokaryotes found in bivalve gills as well as prokaryotic colonies found in different bivalve organs are the most remarkable.

Because just with sections for routine light microscopy is not easy to know that prokaryotes are inside host cells (intracellular) as well as certain morphological details, this kind of symbionts, usually rickettsias or chlamydias, are characterized by transmission electronic microscopy, among other methods.

For the purpose of the histopathology study, those colonies of prokaryotes observed in gills surrounded by an eosinophilic cover can be named as **prokaryotic cysts** or **bacterial cysts**, they are usually large, overhanging and appearing as bags or blisters (Figures 1 and 2).

Furthermore, those colonies, which appear inside host cells, showing light granular appearance under optical microscope, stating that they consist of many individual organisms will be named as **intracellular prokaryotic organisms** (IPO) (Figures 3 to 12).

When lack of evidence regarding the location of single colonies inside cells, these colonies are then registered just as colonies of **prokaryotic organisms** (PO) (Figures 13 to 16).





Fig. 1 Quistes bacterianos en branquia de berberecho.

> Fig. 1 Bacterial cysts in a gill of cockle.

Fig. 2 Quistes bacterianos en branquia de berberecho.

A frecha sinala a envoltura eosinófila que os caracteriza.

Fig. 2 Bacterial cysts in a gill of cockle. Arrow points to their characteristic eosinophilic cover.





Colonias de organismos procariotas intracelulares (frechas) en branquia de ameixa.

Fig. 3

Colonies of intracellular prokaryotic organisms (arrows) in a gill of clam.

Fig. 4

Colonias de organismos procariotas intracelulares (frechas) en branquia de ameixa.

Fig. 4

Colonies of intracellular prokaryotic organisms (arrows) in a gill of clam.





Colonias de organismos procariotas intracelulares en branquia de ameixa.

Fig. 5

Colonies of intracellular prokaryotic organisms in a gill of clam.

Fig. 6

Colonia de organismos procariotas intracelulares en branquia de ameixa.

Fig. 6

Colony of intracellular prokaryotic organisms in a gill of clam.







Colonias de organismos procariotas intracelulares (frechas) en branquia de mexillón.

Fig. 7

Colonies of intracellular prokaryotic organisms (arrows) in a gill of mussel.

Fig. 8

Colonias de organismos procariotas intracelulares (estrelas) en branquia de mexillón.

Fig. 8

Colonies of intracellular prokaryotic organisms (stars) in a gill of mussel.



Colonias de organismos procariotas intracelulares en glándula dixestiva de ameixa.

Fig. 9

Colonies of intracellular prokaryotic organisms in the digestive gland of clam.

Fig. 10

Colonia de organismos procariotas intracelulares en glándula dixestiva de ameixa.

Fig. 10

Colony of intracellular prokaryotic organisms in the digestive gland of clam.





Colonia de organismos procariotas intracelulares (frecha) en glándula dixestiva de ameixa.

Fig. 11

Colony of intracellular prokaryotic organisms (arrow) in the digestive gland of clam.

Fig. 12

Colonia de organismos procariotas intracelulares (estrela) en glándula dixestiva de ameixa.

Fig. 12

Colony of intracellular prokaryotic organisms (star) in the digestive gland of clam.



Colonias de organismos procariotas en palpo labial de ameixa.

Fig. 13

Colonies of prokaryotic organisms in labial palp of clam.

Fig. 14

Colonias de organismos procariotas en palpo de ameixa.

Fig. 14

Colonies of prokaryotic organisms in labial palp of clam.



Colonia de organismos procariotas en manto de berberecho.

Fig. 15

Colony of prokaryotic organisms in the mantle of cockle.

Fig. 16

Colonia de organismos procariotas en manto de berberecho.

Fig. 16

Colony of prokaryotic organisms in the mantle of cockle.



II Protozoos II Protozoa

Introdución

Os **protozoos** son organismos formados por unha única célula "eucariota", que é o tipo celular máis complexo. As diferenzas principais respecto das células procariotas son o maior tamaño das eucariotas, a presenza dun núcleo diferenciado, onde se atopa o material xenético organizado en cromosomas e a existencia, no citoplasma, de orgánulos membranosos especializados.

Hai unha gran variedade de protozoos que infectan a bivalvos mariños. Algúns deles son causantes de enfermidades que poden ser letais, como a marteiliose, a bonamiose e a perkinsose.

Destacan pois os protozoos do xénero Marteilia (figuras 17 a 26), Bonamia (figuras 27 a 28) e Perkinsus (figuras 29 e 30), dos que en Galicia atopamos as especies Marteilia refringens, Marteilia cochillia, Marteilia octospora, Bonamia ostreae, Bonamia exitiosa, e Perkinsus olseni. Cómpre sinalar que, xeralmente, a través da microscopía óptica non pode facerse a identificación a nivel de especie; salvo que xa estea probada a súa identificación complementando con outras técnicas (microscopía electrónica e técnicas moleculares como a reacción en cadea da polimerasa (PCR), entre outras). Estes protozoos adoitan ser específicos, tal que en Galicia, a día de hoxe, só a ostra plana (Ostrea edulis) é infectada por protozoos do xénero Bonamia, namentras que M. refringens aparece principalmente no mexillón (Mytilus galloprovincialis) e esporadicamente na ostra plana. M. cochillia afecta ao berberecho común (Cerastoderma edule) e Marteilia octospora ao longueirón vello (Solen marginatus). Por outra banda, Perkinsus olseni pode detectarse en calquera das especies de ameixa e esporadicamente en berberecho común.

A *Bonamia* é un parasito do filo **Haplosporidia**, parasitos obrigados ou hiperparasitos duha ampla variedade de invertebrados. Polo que, ademais da *Bonamia*, non é raro atopar outros haplosporidios, xeralmente en estadio de **plasmodio** (fase multinucleada) en moluscos bivalvos, especialmente de ameixas (figura 31), navallas (figura 32) ou de berberecho (figura 33). O que é mais raro é atopalos en estado de **espora** (figura 34).

A continuación incluíronse diversas fotografías dun dos grupos máis variado e que máis abunda, **os ciliados**. Este grupo está integrado por organismos que adoitan considerarse comensais; pero que se acadan intensidades moi elevadas poden impedir o correcto funcionamento dos órganos nos que aparece. Os máis habituais son os ciliados, que poden aparecer libres entre as láminas branquiais ou na cavidade paleal (figuras 35 e 36) ou adheridos ás células da branquia, alimentándose do interior destas (figuras 37 e 38). Tamén poden atoparse ciliados na glándula dixestiva (figura 39 a 42) ou adheridos ao manto (figuras 43 e 44), alimentándose do interior das células do hospedador.

As **gregarinas** son outro grupo de protozoos que poden aparecer como simbiontes en bivalvos mariños, concretamente do xénero *Nematopsis* (figura 45), que adoitan aparecer con niveis de prevalencia elevados aínda que a intensidades baixas. Nalgúns casos aparecen en intensidades moderadas, chegando a provocar reaccións hemocitarias que cómpre rexistrar.

A continuación incluíronse fotografías de **coccidios** renais (figuras 47 e 48), que tamén poden aparecer en calquera bivalvo, aínda que sen provocar danos nos tecidos ou reaccións por parte do hospedador, en termos xerais.

Os protozoos incluídos na figura 46 son moi similares a algunha das fases dos coccidios, aínda que foron identificados como gregarinas por diversos patólogos.

Finalmente, incluíronse tamén fotografías dunhas **microcélulas** (tipo *Mikrocytos*) detectadas en ameixa xaponesa (*Ruditapes philippinarum*). Estas microcélulas son intracelulares, podendo pasar desapercibidas como simples reaccións hemocitarias (infiltracións) a poucos aumentos (figura 49).

Introduction

Protozoans are unicellular organisms, encompassed within the Eucaryotes, being the ones with the most complex cell type. The main differences of these when compared with procariotic cells are their larger size, the presence of a nucleus carrying genetic material arranged in chromosomes, and the occurrence of membrane-bound organelles in the cytoplasm.

There is a wide range of protozoans infecting marine bivalves. Several cause diseases which can be lethal, like marteiliosis, bonamiosis and perkinsosis.

Then, protozoans of the genus *Marteilia* (Figures 17 to 26), *Bonamia* (Figures 27 to 28) and *Perkinsus* (Figures 29 to 30) are worth to be named. The species *Marteilia refringens*, *Marteilia cochillia*, *Marteilia octospora*, *Bonamia ostreae*, *Bonamia exitiosa* and *Perkinsus olseni*, are to be found in Galicia. It must be emphasized that it is not always possible to identify symbionts at species level just by light microcopical observation; unless specific identification is already stated with other techniques like electronic microscopy or molecular techniques—for instance polymerase chain reaction (PCR)—.

These protozoans tend to infect specific hosts. In Galicia, up to date, only flat oyster (*Ostrea edulis*) is infected by protozoa species of the genus *Bonamia* while *M. refringens* infects mainly mussel (*Mytilus galloprovincialis*) and only occasionally flat oyster. Moreover, *M. cochillia* infects common cockle (*Cerastoderma edule*) and *Marteilia octospora* the grooved razor shell (*Solen marginatus*). Besides, *Perkinsus olseni* can be found infecting any clam species or occasionally common cockle.

Bonamia is a parasite belonging to the phylum **Haplosporidia**, species of that genus are obligated parasites or hyperparasites of a wide range of invertebrates. It is not uncommonly found other Haplosporidiae, generally in **plamodia** stage (multinucleated phase) in bivalve molluscs, mainly in clams (Figure 31), razor clams (Figure 32) or cockles (Figure 33). But, besides, it is uncommon to find them in the **spore** stage (Figure 34).

46 | CAPÍTULO II

Below, they are include several photographs of **ciliates**, one of the most varied and abundant groups of protozoans. This group includes organisms which are usually regarded as commensals, but when in very high intensities they could cause dysfunctions in the infected organs. Most commonly ciliates are found living free between gill lamellae or globally dispersed within the paleal cavity in general (Figures 35 and 36) or attached to the host gill cells, feeding on their contents (Figure 37 and 38). Besides, ciliates are also found on the digestive gland (Figure 39 to 42) or attached to the mantle (Figure 43 and 44), feeding on the contents of host cells.

Gregarines are other protozoan group which can be simbionts of marine bivalves, in particular species of the genus *Nematopsis* (Figure 45), which is usually present in high prevalence, though with low intensities. Sometimes the infection could be even higher, causing haemocytic reactions worth to be registered.

It follows renal coccidian photographs (Figures 47 and 48). These coccidian may infect bivalves, though usually they do not tend to cause any damage or host reaction.

Protozoa showed in figure 46 are very similar to any coccidian stage even though they were identified as gregarine-like by several pathologists.

Finally, photographs of **microcells** (*Mikrocytos*-like) detected in Manila clam (*Ruditapes philippinarum*) were included (Figures 49 and 50). These microcells are intracellular and might be unnoticed as common haemocytic reactions (infiltration) at low magnification (Figure 49).





Estados iniciais (frecha) de *Marteilia refringens* en epitelio dixestivo de mexillón.

Fig. 17

Initial stages (arrow) of *Marteilia refringens* in the digestive epithelium of mussel.

Fig. 18

Estados avanzados (estrelas) de *M. refringens* en túbulos dixestivos de mexillón.

Fig. 18

Advanced stages (stars) of *M. refringens* in digestive tubules of mussel.







Estados iniciais (frecha) de *M. refringens* en epitelio dixestivo de ostra plana.

Fig. 19

Initial stages (arrow) of *M. refringens* in the digestive epithelium of flat oyster.

Fig. 20

Estados avanzados (estrelas) de *M. refringens* en túbulos dixestivos de ostra plana.

Fig. 20

Advanced stages (stars) of *M. refringens* in digestive tubules of flat oyster.



Estados iniciais (frechas) de *Marteilia cochillia* en túbulos dixestivos de berberecho común.

Fig. 21

Initial stages (arrows) of *Marteilia cochillia* in digestive tubules of common cockle.

Fig. 22

Estados iniciais de *M. cochillia* en túbulos dixestivos de berberecho común.

Fig. 22

Initial stages of *M. cochillia* in digestive tubules of common cockle.



Estados avanzados (frechas) de *M. cochillia* en túbulos dixestivos de berberecho común.

Fig. 23

Advanced stages (stars) of *M. cochillia* in digestive tubules of common cockle.

Fig. 24

Estados avanzados (estrelas) de *M. cochillia* en túbulos dixestivos de berberecho.

Fig. 24

Advanced stages (stars) of *M. cochillia* in digestive tubules of common cockle.





Estados iniciais (frechas) de *Marteilia octospora* en túbulos dixestivos de longueirón vello.

Fig. 25

Initial stages (arrows) of *Marteilia octospora* in digestive tubules of grooved razor shell.

Fig. 26

Estados avanzados de *M. octospora* en túbulos dixestivos de longueirón vello.

Fig. 26

Advances stages of *M. octospora* in digestive tubules of grooved razor shell.



Bonamia sp. infectando hemocitos de ostra plana (frechas).

Fig. 27

Bonamia sp. infecting haemocytes of flat oyster (arrows).

Fig. 28

Bonamia sp. infectando hemocitos de ostra plana. As frechas sinalan exemplos claros de hemocitos coas microcéulas no seu citoplasma.

Fig. 28

Bonamia sp. infecting haemocytes of flat oyster. Arrows point to clear examples of haemocytes with microcells inside their cytoplasms.



Perkinsus olseni en glándula dixestiva de ameixa. Obsérvase reacción hemocitaria ao redor dos focos.

Fig. 29

Perkinsus olseni in the digestive gland of clam. Haemocytic reaction around focuses is observed.

Fig. 30

P. olseni en glándula dixestiva de ameixa. Obsérvanse trofozoitos (punta de frecha) e tomontes con trofozoitos en formación (frecha).

Fig. 30

P. olseni in the digestive gland of clam. Trophozoites (arow head) and tomonts with developing trophozoites (arrow) are showed.



Plasmodios de haplosporidio en epitelio dixestivo de ameixa.

Fig. 31

Plasmodia of haplosporidia in digestive epithelium of clam.

Fig. 32

Plasmodios de haplosporidio en glándula dixestiva de navalla.

Fig. 32

Plasmodia of haplosporidia in the digestive gland of razor clam.



Plasmodios de haplosporidio (*Haplosporidun* edule) en berberecho común.

Fig. 33

Plasmodia of haplosporidia (*Haplosporidium* edule) in common cockle.

Fig. 34

Esporas de haplosporidio (*H. edule*) en dixestivo de berberecho común (estrela) e plasmodios en fase de esporulación (frechas).

Fig. 34

Spores of haplosporidia (*H. edule*) in the digestive gland of common cockle (star) and plasmodia during sporulation (arrows).





Fig. 35 Ciliado libre entre láminas branquiais de mexillón.

Fig. 35

Free ciliate between gill lamellae of clam.

Fig. 36 Ciliados libres (*Trichodina* sp.) en branquias de ameixa.

Fig. 36 Free ciliates (*Trichodina* sp.) in gills of clam.



Ciliados tipo *Sphenophrya* en branquias de berberecho común.

Fig. 37

Ciliates Sphenophrya-like in gills of common cockle.

Fig. 38

Ciliados tipo *Hypocomella* en branquias de berberecho común.

Fig. 38 Ciliates *Hypocomella*-like in gills of common cockle.


Ciliados (*Isocomides mytili*) en glándula dixestiva de mexillón.

Fig. 39

Ciliates (*Isocomides mytili*) in the digestive gland of mussel.

Fig. 40

Ciliados (I. mytili) en glándula dixestiva de mexillón.

Fig. 40 Ciliates (*I. mytili*) in the digestive gland of mussel.



Ciliados tipo *Ancistrocoma* en glándula dixestiva de ostra plana.

Fig. 41

Ciliates *Ancistrocoma*-like in the digestive gland of flat oyster.

Fig. 42

Ciliados tipo *Ancistrocoma* en glándula dixestiva de ostra plana.

Fig. 42

Ciliates *Ancistrocoma*-like in the digestive gland of flat oyster.

50 µm





Fig. 43 Ciliados adheridos ao manto de ostra plana.

Fig. 43

Ciliates attached to the mantle of flat oyster.

Fig. 44

Detalle dos ciliados enganchados ao manto de ostra plana.

Fig. 44 Detail of ciliates attached to the mantle of flat oyster.



Fig. 45 *Nematopsis* sp. (frechas) en branquia de ameixa.

Fig. 45

Nematopsis sp. (arrows) in gill of clam.

Fig. 46 Protozoos tipo gregarina (frechas) en epitelio dixestivo de ameixa.

Fig. 46 Gregarine-like in digestive gland of clam.





Fig. 47 Coccidios en ril de ameixa.

Fig. 47 Coccidia in kidney of clam.

Fig. 48

Coccidios en diferentes estados de desenvolvemento en ril de berberecho común.

Fig. 48

Coccidia in different developmental stages in kidney of common cockle.





Infiltración hemocitaria en tecido muscular de ameixa xaponesa causada por microcélulas tipo *Mikrocytos*.

Fig. 49

Haemocytic infiltration in muscle tissue of Manila clam caused by *Mikrocytos*-like microcells.

Fig. 50

Detalle da infiltración hemocitaria onde se poden observar as microcélulas (frecha) tipo *Mikrocytos* en ameixa xaponesa.

Fig. 50

Detail of the haemocytic reaction where *Mikrocytos*-like microcells (arrow) are observed in Manila clam.



III Metazoos III Metazoa

Introdución

Os **metazoos** son organismos pluricelulares, heterótrofos e están formados por células "eucariotas" que se organizan en tecidos, órganos, sistemas e aparatos, os cales interveñen na realización das tres funcións vitais dos seres vivos: nutrición, relación e reprodución.

Entre os organismos simbiontes detectados en bivalvos mariños, atopamos metazoos pertencentes aos filos Arthropoda e Platyhelminthes fundamentalmente. Así pois, é moi habitual atopar diversos **copépodos** (Arthropoda), fases larvarias dunha gran variedade **trematodos** (Platyhelminthes), larvas de **cestodos** (Platyhelminthes) e **turbelarios** (Platyhelmintes).

O **copépodo** simbionte de bivalvos mariños máis coñecido é o *Mytilicola intestinalis* (figuras 51 e 52) que vive no dixestivo dos mexillóns, fundamentalmente, e que aínda que pode causar danos no epitelio dixestivo non adoita asociarse con problemas nos individuos infectados. Outras especies de copépodos poden aparecer en diversas localizacións (figuras 53 e 54).

Os vermes planos (Platyhelmintes) teñen unha ampla representación entre os metazoos simbiontes de bivalvos mariños. Na maior parte dos casos trátase de fases larvarias, pero no caso dos **turbelarios** son exemplares adultos os que poden aparecer tanto en branquias (*Urastoma* sp.) (figuras 55 e 56) como en glándula dixestiva (*Paravortex* sp.) (figuras 57 e 58). O *Paravortex* sp. é vivíparo e atópase en moitas ocasións incubando embrións en distintas fases de desenvolvemento (Figura 58). Hai controversias sobre o papel dos turbelarios como meros comensais, no caso do *Urastoma* non é raro observar danos na branquia (figura 55).

Os **trematodos** son, sen dúbida, os metazoos máis destacables no que respecta á histopatoloxía de bivalvos mariños. Ademais de aparecer varias especies e en distintas fases larvarias, os seus efectos nos individuos infectados son importantes podendo ocasionar castración, alteracións no crecemento, na locomoción ou incluso a morte.

Os trematodos poden utilizar aos bivalvos como hospedadores primarios ou secundarios en función da fase larvaria na que se atopen. No seu ciclo de vida os hospedadores definitivos adoitan ser peixes ou aves. Nos bivalvos que actúan como hospedadores primarios os trematodos aparecen como esporoquistes. Estes poden estar nun estado inicial no que apenas se observan bolas xerminais (figuras 59 e 60), con cercarias no seu interior (figuras 61 a 66), ou incluso con metacercarias (figura 67) ou con ambos tipos de larvas (figura 68), que poden atoparse en distintas fases de desenvolvemento. Cando actúan como hospedadores secundarios pódense observar metacercarias enquistadas (figuras 69 a 70) ou núas (figuras 71 e 72).

Os **cestodos** son outro grupo de vermes planos dos que tamén podemos atopar fases larvarias en glándula dixestiva de bivalvos mariños (figuras 73 e 74), aínda que a súa presenza non é tan relevante como a dos trematodos.

METAZOOS | 87

Introduction

Metazoa are heterotrophic multicellular organisms, with eukaryote cells arranged in tissues, organs, systems and apparatus, which participate in three vital functions of living organisms: nutrition, relation and reproduction.

Among those Metazoa found in marine bivalves, there are mainly Metazoa of Arthropoda and Platyhelminthes phyla. For instance, the following are commonly found; several **Copepoda** (Arthropoda), larval stages of a wide variety of **Trematoda** (Platyhelminthes), some larvae of **Cestoda** (Platyhelminthes) and **Turbelaria** (Platyhelminthes).

The best-known symbiotic **Copepoda** species in marine bivalves is *Mytilicola intestinalis* (Figures 51 and 52) living mainly in the mussel digestive system. Though it may cause damage to mussel digestive epithelium, it is not usually be related with problems in infected bivalves. Other species of copepods could appear in different locations (Figures 53 and 54).

Flatworms (Platyhelmintes) are among the organisms with wide presence in marine bivalves Metazoa, usually being symbiont, especially during their larval stages; however, **Turbelaria** appear as adult individuals either in gills (Urastoma sp.) (Figures 55 and 56) or in the digestive gland (*Paravortex* sp.) (Figures 57 and 58). *Paravortex* sp. is viviparous, many times observed incubating embryos in different developmental stages (Figure 58). There is controversy about their presence just as commensals; gill damage could be observed in the case of *Urastoma* (Figure 55).

Trematoda are, no doubt, the most notable metazoa in relation with marine bivalve histopathology. Several species in different larval stages, infecting bivalves, are to be found. Moreover, their effects can be significant in infected hosts, for instance castration, growth and locomotion alterations or even death.

Trematoda can use bivalves as primary or secondary host depending on their larval stage. Long their life cycles, fishes and birds are mostly the definitive hosts. In those bivalve species, acting as first intermediate hosts, Trematoda appear as sporocysts, with hardly germinal balls inside (Figures 59 and 60) or with just some cercaria in different developmental stages

88 | CAPÍTULO III

(Figures 61 to 66) or even with metacercaria inside (Figures 67) or both (Figure 68). When bivalves act as secondary hosts, encysted (Figures 69 and 70) or unencysted metacercaria (Figures 71 and 72) can be observed.

Cestoda are another group of flatworms which can be found as larval stages infecting the digestive gland of marine bivalves (Figure 73 and 74), though their presence is not so important as that of Trematoda.



Cortes lonxitudinais de copépodos, *Mytilicola intestinalis*, en intestino de mexillón.

Fig. 51

Copepods longitudinal sections, *Mytilicola intestinalis*, in the intestine of mussel.

Fig. 52

Corte transversal de copépodo (*M. intestinalis*) en intestino de mexillón.

Fig. 52

Copepod transversal section (*M. intestinalis*) in the intestine of mussel.



Corte lonxitudinal saxital dun copépodo en berberecho.

Fig. 53

Sagittal longitudinal section of a copepod in a common cockle.

Fig. 54

Corte lonxitudinal frontal de un copépodo en glándula dixestiva de ameixa.

Fig. 54

Frontal longitudinal section of a copepod in the digestive gland of clam.



Turbelario, Urastoma sp. en branquia de mexillón.

Obsérvase reacción hemocitaria e alteración da anatomía branquial.

Fig. 55

Turbellaria, Urastoma sp. in a gill of mussel.

Haemocytic reaction and alteration of gill anatomy are observed.

Fig. 56

Turbelario, *Urastoma* sp. en branquia de mexillón. Obsérvase o epitelio ciliado (frecha).

> Fig. 56 Turbellaria, *Urastoma* sp. in a gill of clam. Ciliate epithelium is observed (arrow).



Turbelario do xénero *Paravortex* en estómago de berberecho.

Fig. 57

Turbellaria of the genus *Paravortex* in the stomach of common cockle.

Fig. 58

Turbelarios (*Paravortex* sp.) en estómago de berberecho.

Un dos turbelarios está cheo de embrións en distintas fases de desenvolvemento (frecha).

Fig. 58

Turbellaria (*Paravortex* sp.) in the stomach of common cockle.

One of them is full of embryos in different developmental stages (arrow).



Esporoquiste de trematodo en estado inicial de formación en manto de mexillón.

Fig. 59

Initial stage of development of Trematoda sporocyst in the mantle of mussel.

Fig. 60

Esporoquiste de trematodo en estado inicial de formación en manto de mexillón. Obsérvanse bolas xerminais no interior.

Fig. 60

Initial stage of development of Trematoda sporocyst in the mantle of mussel. Germinal balls can be seen inside.



Esporoquistes (*Proctoeces maculatus*) con cercarias en diferentes fases de desenvolvemento en manto de mexillón.

Fig. 61

Sporocysts (*Proctoeces maculatus*) containing cercaria in different stages of development in the mantle of mussel.

Fig. 62

Detalle dun esporoquiste (*P. maculatus*) con cercarias en diferentes fases de desenvolvemento en manto de mexillón.

Fig. 62

Detail of sporocyst (*P. maculatus*) containing cercaria in different stages of development in the mantle of mussel.



Esporoquistes con cercarias en diferentes fases de desenvolvemento en ameixa babosa.

Fig. 63

Sporocysts with cercaria in different stages of development in pullet carpet shell.

Fig. 64

Detalle dun esporoquiste con cercarias en diferentes fases de desenvolvemento en ameixa rubia.

Fig. 64

Detail of sporocyst containing cercaria in different developmental stages in yellow carpet shell.



Esporoquistes con cercarias en diferentes fases de desenvolvemento en berberecho común.

Fig. 65

Sporocysts containing cercaria in different stages of development in common cockle.

Fig. 66

Esporoquistes con cercarias en diferentes fases de desenvolvemento en berberecho común.

Fig. 66

Sporocysts containing cercaria in different stages of development in common cockle.



Esporoquistes con metacercarias enquistadas (*Monorchis parvus*) en berberecho común.

Fig. 67

Sporocysts with encysted metacercaria (*Monorchis parvus*) in common cockle.

Fig. 68

Esporoquistes con cercarias (punta de frecha) e metacercarias núas (frecha) (*Gymnophallus choledochus*) en berbercho común.

Fig. 68

Sporocysts with cercaria (arrow head) and unencysted metacercaria (arrow) (*Gymnophallus choledochus*) in common cockle.



Metacercaria enquistada en pé de mexillón cunha lixeira reacción hemociataria ao redor.

Fig. 69

Encysted metacercaria in the foot of mussel, surrounded by a light haemocytic reaction.

Fig. 70

Metacercaria enquistada en manto de ameixa.

Fig. 70 Encysted metacercaria in the mantle of clam.





Metacercarias núas (*Meiogymnophallus minutus*) envoltas polo manto na zona da charnela en berberecho. A maioría están hiperparasitadas por microsporidios e algunhas xa totalmente desintegradas.

Fig. 71

Unencysted metacercaria (*Meiogymnophallus minutus*) enclosed by the mantle, just below the hinge of cockle. Most of them are hyperparasitized by microsporidia and some of them are totally disintegrated.

Fig. 72

Metacercarias núas (*M. minutus*) envoltas polo manto na zona da charnela en berberecho común.

Fig. 72

Unencysted metacercaria (*M. minutus*) enclosed by the mantle, just below the hinge in common cockle.



Fig. 73 Larvas de cestodos en estómago de ameixa.

Fig. 73

Cestoda larvae in the stomach of clam.

Fig. 74

Fase larvaria de cestodo en estómago de ameixa.

Fig. 74 Cestoda larval stage in the stomach of clam.



IV Outros patóxenos IV Other pathogens

Introdución

Inclúense neste capítulos outro tipo de axentes que poden resultar patóxenos para os moluscos bivalvos e que non se poden encadrar nos grupos que ocuparon os capítulos anteriores.

Tal é o caso dos **microsporidios**, que son eucariotas e parasitos intracelulares obrigados. A súa posición taxonómica é un tanto incerta, tempo atrás considerábanse como protozoos primitivos; pero estudos máis recentes establecen a súa proximidade cos fungos. Nos moluscos bivalvos podemos atopar microsporidios do xénero *Steinhausia* parasitando ovocitos de calquera especie, especialmente de mexillón (figuras 75 e 76), ou tamén microsporidios non identificados en células epiteliais, fundamentalmente en ameixa (figuras 77 e 78). Por outra banda, os microsporidios tamén poden aparecer hiperparasitando organismos que están parasitando os propios moluscos, como no caso do microsporidio do xénero *Nosema* que hiperparasita a *Marteilia refringens* en mexillón ou a *Marteilia cochillia* en berberecho (figura 79). O microsporidio hiperparásito máis común en bivalvos aparece en larvas de trematodos (figura 80).

Incluímos tamén neste capítulo as **microalgas** do xénero *Cocomixa* que parasitan o mexillón de rocha nalgunhas zonas de Galicia e do resto do mundo, provocando unha importante reacción nos tecidos nos que aparece causando granulomas (figuras 81 e 82).

Finalmente, recóllense tamén neste capítulo fotografías das alteracións celulares provocadas por virus. Os **virus** non están considerados como células, propiamente ditas, senón como entidades acelulares que necesitan introducirse en células para multiplicarse. Podería dicirse que marcan a barreira entre o vivo e o inerte, xa que non realizan funcións propias dos seres vivos, como a nutrición e á relación, simplemente se multiplican. Durante a observación ao microscopio óptico de preparacións histolóxicas é imposible a observación dos virus debido ao seu pequeno tamaño; nembargante poden observarse alteracións que provocan nas células que infectan e que se corroboran empregando a microscopía electrónica de transmisión. Así pois, podemos recoñecer un tipo de inclusión basófila, en células gonadais de ostra rizada que foron estudadas por outras técnicas

concluíndo que se trataba de células xerminais infectadas por virus do tipo papiloma ou polyoma (figuras 83 e 84). Polo tanto, aínda que a técnica histolóxica non permite diagnosticar a presenza de virus nos tecidos dos bivalvos, débese rexistrar a detección de inclusións basófilas, ou eosinófilas, en células dos tecidos dos moluscos, especialmente se aparecen en tamaños ou intensidades destacables para o seu posterior estudo por outras técnicas.

Introduction

In this chapter are included those potential pathogen organisms found in bivalve molluses not belonging to the groups earlier dealt with in previous chapters.

Among these are the **Microsporidia**, eukaryotic and intracellular obligate parasites. They have an uncertain taxonomic position as they were regarded as primitive Protozoa some years ago, but recent studies have found out that they are related to Fungi. It can be bound microsporidia of the genus *Steinhausia* parasiting ovocytes of any species of bivalve molluscs, mainly mussels (Figures 75 and 76) or unidentified microsporidia species in epithelial cells, mainly in clams (Figures 77 and 78). Besides, microporidia may appear hyperparasiting *Marteilia refringens* in mussels or *Marteilia cochillia* in common cockles (Figure 79). The most common hyperparasite microsporidia in bivalve mollusc is that found in trematoda larvae (Figure 80).

Others included in this chapter are **microalgae** of the genus *Cocomixa* which parasites wild mussels in some Galician areas and other parts of the world. As a consequence, a significant reaction in the tissues is observed with the development of granulomas associated with microalgae (Figures 81 and 82).

Finally, photographs of cellular alterations caused by **virus** are also included in this chapter. Viruses can not be regarded as cells, being instead acellular entities which need invade cells to multiply themselves. They are arguably the barrier between life and inert, due to not carrying out characteristic functions of living organisms, as nutrition or relation; they only reply themselves within the cells of hosts. They can not be observed in histological slides with optic microscope owing to their small size; however, the alterations they produce can be detected. Their presence can be corroborated using transmission electron microscopy: given that, we can recognize a type of basophilic inclusion bodies in gonadal cells of Pacific oysters which were studied by other techniques concluding that they corresponded to papiloma or polyoma-like virus infecting germ cells (Figures 83 and 84). Therefore, albeit histological technique is not suitable to virus diagnosis, it is needed to register the presence of basophilic or eosinophilic inclusions in bivalve tissues. Registration is important specially if they achieve relevant sizes or intensities for their posterior study by other techniques.







Ovocitos de mexillón infectados por microsporidios (Steinhausia mytilovum) (frechas).

Fig. 75

Mussel oocytes infected by microsporidia (*Steinhausia mytilovum*) (arrows).

Fig. 76

Ovocito de mexillón infectados por microsporidios (*S. mytilovum*).

Fig. 76

Mussel oocyte infected by microsporidia (*S. mytilovum*).



Fig. 77 Microsporidios en epitelio estomacal de ameixa.

Fig. 77

Microsporidia in the stomach epithelium of clam.

Fig. 78 Detalle dos microsporidios infectando células epiteliais.

Fig. 78 Detail of microsporidia infecting epithelial cells.





Microsporidios (*Nosema* sp.) (estrela) hiperparasitando un esporanxio de *Marteilia cochillia*.

Fig. 79

Microsporidian (*Nosema* sp.) (star) hyperparasiting an sporangia of *Marteilia cochillia*.

Fig. 80

Microsporidios hiperparasitando larva de trematodo.

Fig. 80 Microsporidia hyperparasiting a trematode larva.



Granuloma asociado a microalgas (*Cocomixa* sp.) en manto de mexillón.

Fig. 81

Granuloma associated with microalgae (*Cocomixa* sp.) in the mantle of mussel.

Fig. 82

Detalle das microalgas (frecha) no interior dos hemocitos.

Fig. 82

Detail of microalgae cells (arrow) inside haemocytes.





Inclusión basófila (estrela) en folículo gonadal de ostra rizada debido a infección por virus.

Fig. 83

Basophilic inclusion (star) in a gonadal follicle of Pacific oyster due to viral infection.

Fig. 84

Detalle da inclusión basófila en folículo gonadal de ostra rizada.

Fig. 84

Detail of the basophilic inclusion in a gonadal follicle of a Pacific oyster.



V Alteracións patolóxicas V Pathological alterations

Introdución

Este capítulo recolle fotografías de órganos nos que se rexistran alteracións do estado normal. Non se trata pois da identificación de organismos simbiontes, senón da busca de evidencias de situacións anormais e da identificación de alteracións nas propias células do individuo.

As células sanguíneas dos moluscos (hemocitos) teñen un papel principal na defensa do organismo, debido á súa capacidade para inxerir e destruír axentes estraños (fagocitose). Ante a presenza de axentes alleos ao hospedador, que tanto poden ser parasitos como partículas inorgánicas ou substancias prexudiciais que están a causar danos nos tecidos, prodúcese un proceso de inflamación. A inflamación implica a chegada dun número elevado de hemocitos á zona danada para a destrución do axente alleo, unha limpeza dos restos celulares que se produzan e a reparación final do dano xerado.

A detección de zonas con densidades elevadas de hemocitos, denominado **reacción hemocitaria** ou infiltración hemocitaria (figuras 85 e 86), supón unha evidencia de que se está a producir unha situación anómala. Ás veces a reacción hemocitaria detéctase en torno a un parasito, polo que sería evidente a causa desa reacción (figura 85); pero en moitos casos non é así (figura 86). Cómpre indicar que a presenza de infiltracións no tecido gonadal adoita estar ligado ao ciclo de desenvolvemento gonadal e non a un estado anormal ou patolóxico. De feito, o estado de reabsorción gonadal consiste na chegada de grandes cantidades de hemocitos á gónada para limpar os folículos de gametos residuais.

Unha reacción hemocitaria pode derivar nun foco definido e claramente diferenciado do resto do tecido, en moitos casos incluso delimitado por hemocitos que se modifican para ter forma alongada. Nese caso estaríamos ante un **granuloma**, no que pode ser recoñecible o axente ante o que se está defendendo o bivalvo (figura 87) ou, pola contra, pode que o axente causal non apareza na sección histolóxica (figura 88) ou que non sexa facilmente identificable (figuras 89 e 90), ou que se trate de un axente descoñecido como ocorre nos granulomas asociados a células ou parasitos non identificados (CPX - *cockle parasite X*), característicos de berberecho (figuras 91 e 92).

Outra situación que cómpre rexistrar durante a observación microscópica das seccións histolóxicas dos tecidos é a presenza destacable das denominadas **brown cells** (figuras 93 e 94). Aínda que este tipo de células non está considerado como verdadeiros hemocitos, a súa presenza evidencia unha reacción ante elementos prexudiciais para o organismo. A súa función parece relacionada con procesos de degradación e detoxificación; relacionándose incluso coa exposición do individuo a contaminantes químicos.

Outro tipo de alteracións nas que se centra este capítulo son as alteracións de células supostamente do individuo converténdose en células neoplásicas, ao perder o control sobre as súas funcións metabólicas nos tecidos e iniciar unha multiplicación descontrolada. Adoitan ser células máis grandes que as súas predecesoras cunha relación núcleo/citoplasma elevada, os núcleos poden ter formas variadas (pleomórficos) e anormais, incluso algúns poden ser multinucleados e moitas obsérvanse nalgunha fase de multiplicación celular (figuras mitóticas).

O berberecho é a especie de bivalvo no que é máis habitual atopar células neoplasias, que adoitan diseminarse a través del sistema circulatorio infiltrando tecidos doutros órganos (**neoplasia diseminada**). Debido a que é habitual atopar dous tipos, ou dúas formas de manifestarse as células neoplásicas, faise unha diferenciación entre a neoplasia diseminada tipo A (figuras 95 e 96) e tipo B (figuras 97 a 100). A diferenza fundamental consiste en que as células da neoplasia tipo B non son tan grandes como no caso da neoplasia tipo A e os núcleos non adoptan formas tan variadas e anormais (figura 100). A presenza de células neoplásicas noutros bivalvos é esporádica, como en ostra plana (figuras 101 e 102), mexillón (figuras 103 e 104) ou longueirón vello.

Outro tipo de neoplasma (tumor) que pode observarse en bivalvos mariños nas costas galegas é o **xerminoma**, que consiste na presenza dunha masa de células neoplásicas na gónada (figuras 105 e 106). Neste caso as células que se volven neoplásicas son células da línea xerminal que, en lugar de seguir coa súa función de multiplicarse e diferenciarse en gametos, se multiplican dun xeito anormal formando un tapiz no que parece que perden a súa individualidade.

Introduction

This chapter includes photographs of organs in which any alteration of normal structure is observed. Therefore, it deals not with identification of symbiontic organisms but with evidences of abnormal situations and host cell alterations.

Mollusc blood cells (haemocytes) have a highlighted function in the organism defence, due to their capacity for ingest and destroy foreign agents (phagocytosis). An inflammation process occurs when foreign agents –parasites, inorganic particles or prejudicial substances- are present causing a host damage. During the inflammation process, a high number of haemocytes arrives to the damaged place in order to destroy the foreign agent; then these haemocytes clean cellular residues and repair the ultimate shortcomings.

Detection of areas with high densities of haemocytes, the so called **haemocytic reaction** or infiltration (Figures 85 and 86), is the evidence of an anomalous situation. Sometimes the haemocytic reaction is detected surrounding a parasite: in that case the reaction cause is evident (Figure 85), but in many situations that is not the case (Figure 86). It is worthy to mention that gonadal infiltrations tend to be related with the gonadal development and not with an abnormal or pathological situation. In fact, the gonadal reabsortion stage consists in the income of great quantities of haemocytes to clean follicles from residual gametes.

An haemocytic reaction can turn into a defined focus, clearly differentiated from the remain tissue, in many cases even it can be delimitated by elongated modified haemocytes. This would be a **granuloma**, in which the causal agent might be recognizable (Figure 87) or not. The agent might be not recognizable due to it was not found in the slide section (Figures 88) or because being not easily identifiable (Figures 89 and 90) or because being an unknown parasite, as the case of granuloma specific of cockles associated with unknown cells or parasites (cocke parasite X - CPX) (Figures 91 and 92).

The outstanding presence of **brown cells** (Figures 93 and 94) is recommended to be registered during microscopical observation of histological slides. Though these type of cells are not considered as true haemocytes, their presence makes evident a reaction of dangerous elements for the organism. Their function seems to be related with degradation or detoxified processes or even with exposition to chemical compounds.

Other type of alterations included in this chapter are those of the supposed individual's own cells which turn into neoplastic cells, when they loose the control over metabolic functions and initiate an uncontrolled multiplication. They tend to be larger cells than their antecessors, with high nucleus-cytoplasm ratio, pleomorphic and abnormal, some could be even multinucleated and mitotic figures are often observed.

Common cockle is the bivalve species in which neoplastic cells are more prevalent. Those cells tend to disseminate through circulatory system, infiltrating tissues of other organs (**disseminated neoplasia**). Due to the fact that there are usually observed two types or phases of neoplastic cells, we differentiate between type A (Figures 95 and 96) and type B (Figures 97 and 100). The main differences are that type B neoplastic cells are smaller than type A and they have nucleus without so abnormal and varied forms (Figure 100). The presence of neoplastic cells in other bivalves is sporadic in Galicia, such as in flat oyster (Figures 101 and 102), mussel (Figure 103 and 104) or in grooved razor shell.

Another type of neoplasm (tumour) which can be observed in Galician marine bivalves is the **germinoma**. It consists on the presence of a mass of gonadal neoplastic cells (Figures 105 and 106). In this case, germinal cells are the antecessors, which turn into neoplastic cells instead of continuie their function of multiplying and differentiating into gametes. They have an abnormal multiplication, developing a layer and seeming to lose their individuality.



Reacción hemocitaria asociada á presenza dun copépodo.

Fig. 85

Haemocytic reaction asociated to the presence of a copepod.

Fig. 86

Reacción hemocitaria en glándula dixestiva. Fig. 86 Haemocytic reaction in the digestive gland.




Granuloma asociado a *Perkinsus olseni* en glándula dixestiva de ameixa.

Fig. 87

Granuloma asociated to *Perkinsus olseni* in the digestive gland of clam.

Fig. 88 Granuloma en glándula dixestiva de mexillón.

Fig. 88 Granuloma in the digestive gland of a mussel.



Fig. 89 Granuloma (estrela) en pe de berberecho.

Fig. 89

Granuloma (star) in the foot of common cockle.

Fig. 90

Detalle do granuloma anterior en pe de berberecho onde se poden observar restos dun axente non identificado.

Fig. 90

Detail of the former granuloma in the foot of common cockle where unidentified agent remains are observed.







Granulomas asociados a células non identificadas en manto de berberecho.

Fig. 91

Granulomas associated with unidentified parasite in the mantle of cockle.

Fig. 92

Detalle do granuloma anterior no que se observan células non identificadas en berberecho ("cockle parasite X" ou CPX) (frechas) fagocitados por hemocitos do hospedador.

Fig. 92

Detail of the former granuloma where some unidentified cells (cockle parasite X - CPX) (arrows) phagocyted by host haemocytes, are observed.



Fig. 93 Células tipo "Brown cells" en branquia de ameixa.

Fig. 93

Brown cells-like in a gill of clam.

Fig. 94 Células tipo "Brown cells" en branquia de ameixa.

> Fig. 94 Brown cells-like in a gill of clam.



Neoplasia diseminada (tipo A) en branquia de berberecho. Nótese a presenza de núcleos anormais (punta de frecha) e dalgunha figura mitótica (frecha).

Fig. 95

Disseminated neoplasia (type A) in a gill of common cockle. Abnormal nuclei (arrowhead) and some mitotic figures (arrow) are noticeable.

Fig. 96

Neoplasia diseminada (tipo A) en glándula dixestiva de berberecho. Nótese a presenza de núcleos anormais (punta de frecha) e de figuras mitóticas (frecha).

Fig. 96

Disseminated neoplasia (type A) in the digestive gland of common cockle. Abnormal nuclei (arowhead) and some mitotic figures (arrow) are noticeable.



Neoplasia diseminada (tipo B) infiltrando tecido conectivo da branquia dun berberecho (estrela) e diseminándose a través de vasos sanguíneos (triángulo).

Fig. 97

Disseminated neoplasia (type B) infiltrating connective tissue of a gill of common cockle (star) and disseminating through out the blood vessels (triangle).

Fig. 98

Detalle da figura anterior con células neoplásicas (tipo B) infiltrando tecido conectivo na branquia.

Fig. 98

Detail of the former figure in which neoplastic cells (typeB) infiltrating connective tissue of a gill, are observed.



Detalle da figura anterior onde se pode apreciar a disposición en tapiz das células neoplásicas (tipo B) e algunha figura mitótica (frecha).

Fig. 99

Detail of the former figure in which neoplastic cells (Type B) lay as a carpet and with some mitotic figures (arrow).

Fig. 100

Detalle da figura 97 onde se observan as células neoplásicas diseminándose a través dun vaso sanguíneo. As figuras mitóticas tamén son habituais (frecha).

Fig. 100

Detail of figure 97 in which neoplastic cells spreading through a blood vessel are observed. Mitotic figures are also common (arrow).





Neoplasia diseminada en glándula dixestiva de ostra plana.

Fig. 101

Disseminated neoplasia in the digestive gland of flat oyster.

Fig. 102

Neoplasia diseminada en glándula dixestiva de ostra plana. A frecha sinala unha célula en mitose.

Fig. 102

Disseminated neoplasia in the digestive gland of flat oyster. Arrow points to a mitotic cell.



Neoplasia diseminada en glándula dixestiva de mexillón.

Fig. 103

Disseminated neoplasia in the digestive gland of mussel.

Fig. 104

Neoplasia diseminada en glándula dixestiva de mexillón. As frechas sinalan células en mitose.

Fig. 104

Disseminated neoplasia in the digestive gland of mussel. Arrows point to mitotic cells.



Xerminoma (estrela) en folículos gonadales de longueirón.

Fig. 105

Germinome (star) in gonadal follicle of pod razor clam.

Fig. 106

Xerminoma (estrela) en folículos gonadales de longueirón.

Fig. 106

Germinome (star) in gonadal follicles of pod razor clam.





