

# Marteilioza ostryg – choroba inwazyjna mięczaków

AGNIESZKA PĘKALA, EWA PAŹDZIOR

Zakład Chorób Ryb Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego,  
Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

Pękala A., Paździor E.

## Marteiliosis of oysters – an invasive disease of molluscs

### Summary

*Marteilia refringens* is a protistan belonging to the phylum Paramyxea. This parasite is the causative agent of marteiliosis, a lethal disease that causes mass mortality among molluscs, especially flat oysters (*Ostrea edulis*). The susceptible species of molluscs also include blue mussels (*Mytilus edulis*) and Mediterranean mussels (*M. galloprovincialis*). Depending on the host species, two types of *M. refringens* have been distinguished: type O, diagnosed in oyster; and type M., occurring in mussels. A new genetic type C is suspected to occur in molluscs belonging to the *Cerastoderma edule* species. *M. refringens* displays tropism to digestive epithelium, and in heavy infections the parasite causes total damage of the digestive gland. The presence of these parasites in a mussel only weakens the host. The life-cycle of *M. refringens* is complex. The transmission of the parasite presumably also involves other host species, such as in copepods and zooplankton. The development of the parasite is seasonal and strictly related to water temperatures. The diagnosis of marteiliosis is carried out by tissue imprints, histology and molecular methods. The treatment of marteiliosis is impossible, and therefore the only way to control the disease is to prevent the spread of the pathogen. Marteiliosis of oysters is listed as an O.I.E notifiable disease and classified as a non-exotic disease, according to Council Directive 2006/88/EC.

**Keywords:** *Marteilia refringens*, flat oysters, mollusc diseases

Hodowla mięczaków od lat ma ważne znaczenie ekonomiczne dla wielu państw europejskich i z każdym rokiem przynosi coraz większe zyski. W Europie najprężniej rozwija się hodowla omułek, której wielkość produkcji w 2004 r. została oszacowana na 589 952 ton, co stanowiło równowartość 383 milionów euro (www.fao.org). Wszelkie zaburzenia zdrowotne występujące w procesie produkcji tych zwierząt prowadzące do ich śnięć, powodują ogromne straty finansowe. Najgroźniejszymi chorobami mięczaków w Europie są marteilioza ostryg wywoływana przez pierwotniaka należącego do typu *Paramyxea* (3) oraz bonamioza, której czynnikiem etiologicznym jest pasożyt *Bonamia ostreae*. O znaczeniu tych jednostek chorobowych dla stanu zdrowia mięczaków świadczy fakt, że znajdują się one na liście chorób OIE (21), jak również, zgodnie z dyrektywą Rady 2006/88/WE dotyczącą wymogów w zakresie zdrowia zwierząt akwakultury i produktów akwakultury oraz zapobiegania niektórym chorobom zwierząt wodnych i zwalczania tych chorób, zaliczone zostały do chorób nieegzotycznych zwierząt akwakultury (13).

Marteilioza ostryg diagnozowana jest w wielu krajach Unii Europejskiej. Powszechnie występuje we Francji, Grecji, Włoszech, Portugalii, Hiszpanii, Wielkiej Brytanii, a także w Chorwacji oraz Maroku i Albanii (17, 21). Na inwazje najbardziej wrażliwe są rodzime gatunki ostryg, czyli ostryga europejska potocznie zwana jadalną (*Ostrea edulis*), jak również omułka z gatunków omułek jadalny (*Mytilus edulis*) oraz omułek śródziemnomorski (*M. galloprovincialis*) (5, 28). W zależności od gatunku mięczaka występują dwa typy *M. refringens*: typ O diagnozowany jest u ostryg, natomiast typ M u omułek (19, 26). Najnowsze badania molekularne prowadzone nad *M. refringens* wykazały prawdopodobieństwo występowania jeszcze trzeciego typu pierwotniaka, określonego jako typ C, który obserwuje się u mięczaków z gatunku *Cerastoderma edule* (9). Wyniki przeprowadzonych badań, opartych o analizę sekwencji oraz porównanie wybranych fragmentów rybosomalnego DNA (18S, ITS-1, IGS), wymagają jednak jeszcze potwierdzenia, istnieje bowiem uzasadnione przypuszczenie, że typ C *M. refringens* może być nowym gatunkiem pasożytów z rodzaju *Marteilia* (9).

Oprócz ostryg europejskich i omułek plazmodia *M. refringens* diagnozowane były również u ostryg z gatunków: *O. chilensis*, *O. puelchana*, *O. angasi*, *O. denselamellosa*, a także małży *Solen marginatus* i *Chamelea gallina* (5, 18, 20). Komórki *M. refringens* wykrywano także u ostryg pacyficznych (*Crassostrea gigas*) (7) oraz amerykańskich (*C. virginica*) (24), jednak inwazje te nie wpływały na pogorszenie stanu zdrowotnego tych gatunków zwierząt. Występowanie pasożyta u dwóch wymienionych gatunków ostryg związane jest z nietypową i raczej przypadkową lokalizacją pierwotniaka, na którą zapewne zasadniczy wpływ ma sposób odżywiania mięczaków, określanych jako organizmy filtrujące. Lista gatunków mięczaków, u których może występować *M. refringens* jest długa i wciąż niekompletna, diagnozowane są bowiem komórki podobne do *M. refringens*, których ostateczna identyfikacja budzi wątpliwości. Niezidentyfikowane do gatunku pasożyty określane są wtedy jako *Marteilia* sp. Przypadki takich identyfikacji miały miejsce u mięczaków z gatunków m.in.: *Cardium edule*, *Tapes rhomboides*, *T. pullastra*, *Ensis minor*, *E. siliqua* (5).

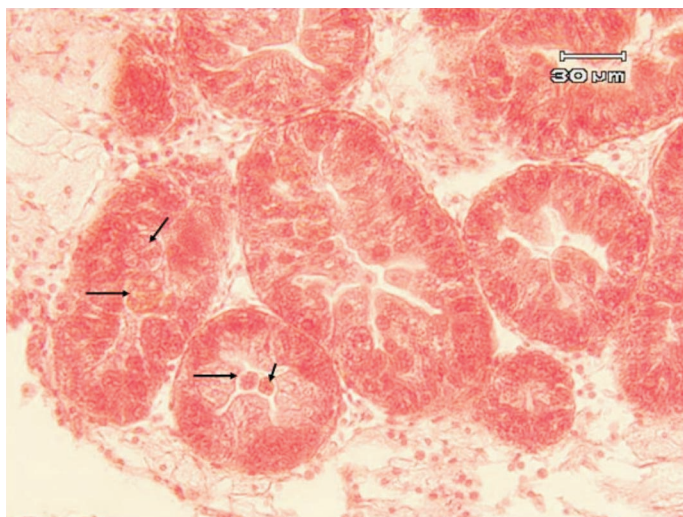
*M. refringens* wykazuje powinowactwo do układu trawiennego mięczaków. Młode stadia rozwojowe pasożyta najczęściej obserwowane są w tkance nabłonkowej początkowego odcinka przewodu pokarmowego, żołądka oraz w płaszczu, rzadziej w skrzelach (16). Dorosłe formy rozwojowe natomiast umiejscawiają się w nabłonku gruczołów trawiennych, a przy dużej intensywności inwazji również w ich świetle (1) (ryc. 1). Najlepiej poznanym etapem, najprawdopodobniej złożonego cyklu rozwojowego *M. refringens*, jest jego rozwój w organizmie ostryg. Proces sporulacji *M. refringens* zachodzi w nabłonku gruczołów trawiennych (1), gdzie w świetle zwiększających rozmiary komórek pierwotnych, w wyniku podziałów mitotycznych jądra, powstają komórki potomne, zwane wtórnymi, które z kolei również ulegają kolejnym podziałom. W świetle komórek pierwotnych powstaje około 8 ko-

mórek wtórnych, a wewnątrz nich komórki III rzędu (5). Komórka pierwotna wypełniona komórkami wtórnymi i III rzędu uwolniona zostaje do światła gruczołów trawiennych, a następnie do środowiska wodnego. Na tym etapie inwazji komórki pierwotne powodują prawie całkowite zniszczenie nabłonka gruczołów trawiennych mięczaka (1). Inwazja *M. refringens* o dużym nasileniu znacząco obniża więc zdolności absorpcyjne składników pokarmowych ostryg, powodując tym samym spadek ich indeksu zdrowotnego (8, 14).

Istnieje wiele pytań i hipotez dotyczących cyklu rozwojowego *M. refringens*. Na przestrzeni lat poczynione zostały różne próby eksperymentalnego zarażania ostryg pasożytem w celu zbadania bezpośredniej transmisji patogenu, nie przyniosły one jednak zadowalających efektów (5, 16). Na podstawie wyników przeprowadzonych badań wysnuto więc teorię o istnieniu potencjalnego żywiciela pośredniego. Przypuszcza się, że są nimi m.in. widłonogi z gatunków *Paracartia grani* i *Oithona* sp. oraz z rzędu *Harpacticoida* (2). Wektorami choroby jest ponadto wiele gatunków zooplanktonu, jak również nicienie należące do gatunku *Lineus gisserensis*, a także parzydełkowce *Cereus pendunculatus* (2, 11).

Rozwój pasożyta, a więc jego sporulacja i transmisja, jest zjawiskiem sezonowym, ściśle uzależnionym od temperatury wody. *M. refringens* nie jest obserwowany zimą i wczesną wiosną w organizmie żywiciela albo też występuje sporadycznie, bowiem graniczna wartość temperatury, w której zahamowany zostaje jego rozwój, wynosi 17°C (2, 5), istnieją jednak informacje o przypadkach diagnozowania pasożyta w wodzie o temperaturze wynoszącej 9°C (15). W państwach Europy Zachodniej temperatura wody wynosząca 17°C powszechnie występuje u ujść rzek oraz w zatokach, dlatego inwazja *M. refringens* rzadko ma miejsce na otwartym morzu (16). Czynniki predysponującymi do wystąpienia choroby są również wysokie zasolenie wody oraz jej intensywna wymiana (2). Poza organizmem gospodarza *M. refringens* może przeżyć od kilku dni do 2-3 tygodni, w zależności od warunków środowiskowych.

Inwazja *M. refringens* jest letalna dla ostryg. Śnięcia następujące drugiego roku inwazji obserwowane są w lecie oraz wczesną jesienią i sięgają 50-90% obsady (1). Objawy kliniczne choroby związane są z uszkodzeniami tkanek i narządów, jakie wywołuje pasożyt w organizmie. Obserwuje się osłabienie kondycji, spadek masy ciała, zahamowanie wzrostu. Głównym objawem marteiliozy jest odbarwienie gruczołów trawiennych. W fazie terminalnej choroby osłabione ostrygi nie są zdolne do zamknięcia muszli. Śmierć zwierząt następuje w wyniku uszkodzenia gruczołów trawiennych i zaczopowania ich światła komórkami pasożyta (5) (ryc. 1). Inwazja *M. refringens* u omułek z gatunków *M. edulis* oraz *M. galloprovincialis* doprowadza jedynie do osłabienia ich kondycji oraz spowolnienia gametogenezy (5, 12, 28).

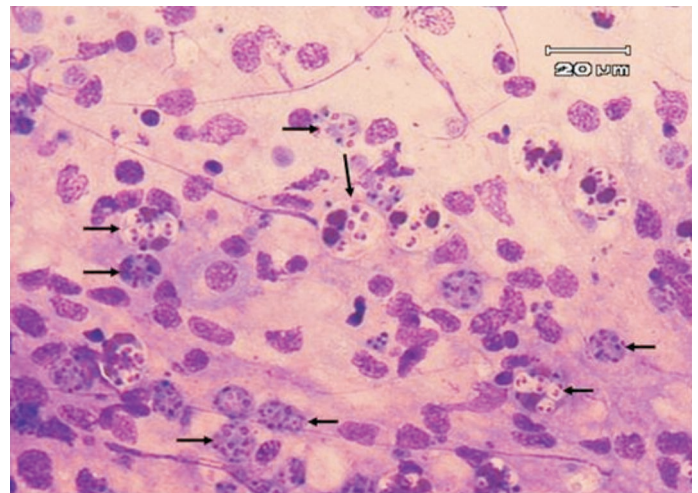


Ryc. 1. *Marteilia refringens* w gruczołach trawiennych ostrygi europejskiej (barwienie H+E, pasożyty wskazane strzałkami). Fot. A. Pękala

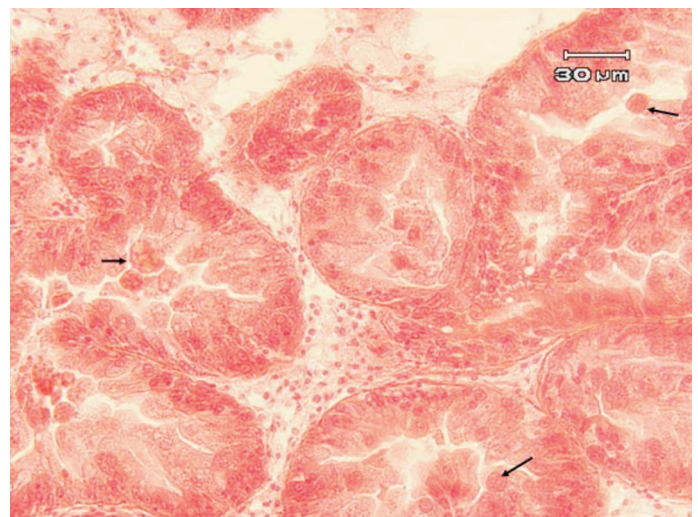
Wystąpienie ponadnormatywnych śnieć mięczaków jest zawsze sygnałem do przeprowadzenia badań laboratoryjnych zmierzających do ustalenia przyczyny zaburzeń zdrowotnych w populacji. Techniki laboratoryjne standardowo wykorzystywane do wykrywania inwazji *M. refringens* ograniczają się do badań umożliwiających morfologiczną identyfikację patogenu w badanym materiale (3, 5). Pierwszą z tych technik jest mikroskopowa ocena preparatów odciskowych. Polega ona na wykonaniu odcisku tkanek mięczaków na szkiełku podstawowym, jego utrwaleniu i zabarwieniu, a następnie ocenie preparatu w kierunku obecności *M. refringens* (5) (ryc. 2). W diagnostyce chorób mięczaków rutynowo przeprowadza się badania histologiczne, które umożliwiają dokładną lokalizację pasożyta oraz obserwację stopnia zmian patologicznych w tkankach gospodarza (3, 5) (ryc. 3). Jako metodę potwierdzającą stosuje się często badanie w mikroskopie elektronowym, które dostarcza dokładnych informacji na temat ultrastruktury oraz morfologii pierwotniaków (3, 5). Wszystkie wyżej wymienione techniki są jednak czasochłonne, wymagają specjalistycznego wyposażenia oraz doświadczonego personelu. Rozwój metod wykorzystujących biologię molekularną sprawił, że obecnie wykonuje się badania mięczaków znacznie szybciej, z większą czułością, dokładnością, wysoką swoistością i specyficznością (4, 5, 6, 22, 25). Zastosowanie znalazły zarówno klasyczny PCR, jak również hybrydacja *in situ* (3, 10, 12, 19, 27). Ta ostatnia metoda polega na wykrywaniu określonej sekwencji DNA w badanym materiale za pomocą sondy, umożliwiając wykrycie zarówno obecności patogenu, jak również jego rozmieszczenia w tkankach gospodarza.

Techniki molekularne są niewątpliwie bardzo dobrym narzędziem diagnostycznym, jednak zawsze wykorzystywanym jako potwierdzenie metody histologicznej (21). Mięczaki jako organizmy filtrujące wodę i w ten sposób pozyskujące niezbędne do życia składniki pokarmowe pochłaniają wraz z nią patogeny, które nie muszą być związane z organizmem i wywoływać inwazji. Bardzo wysoka czułość metod molekularnych w takich sytuacjach jednoznacznie wskazywać będzie na wynik dodatni badania, dlatego właśnie metoda histologiczna zawsze wykorzystywana jest w diagnostyce chorób mięczaków (21).

Hodowla mięczaków odbywa się w naturalnych, otwartych akwenach. Z tego powodu leczenie chorób mięczaków jest praktycznie niemożliwe. Jedynym sposobem walki z patogenami jest zapobieganie ich rozprzestrzenianiu się. Skuteczny nadzór nad stanem zdrowia zwierząt akwakultury, w tym mięczaków, odbywa się poprzez zapobieganie ich występowaniu, a w przypadku pojawienia się ognisk chorobowych, poprzez ich zwalczanie. Wytyczne w tym zakresie zawarte zostały w dyrektywie Rady 2006/88/WE z dnia 24 października 2006 r. dotyczącej stanu zdrowia zwierząt akwakultury i ich produktów (13).



Ryc. 2. *Martellia refringens* w gruczołach trawiennych ostrygi europejskiej (preparat odciskowy barwiony zestawem Hemacolor, Merck; pasożyty wskazane strzałkami). Fot. A. Pękala



Ryc. 3. *Martellia refringens* w gruczołach trawiennych ostrygi europejskiej (barwienie H+E, pasożyty wskazane strzałkami). Fot. A. Pękala

Uwzględniając zagrożenia stanu zdrowotnego mięczaków wynikające z możliwości rozprzestrzeniania się jednostek chorobowych, należy zwrócić uwagę na sytuację w naszym kraju. W Polsce komercyjna produkcja mięczaków nie jest możliwa ze względu zarówno na warunki klimatyczne, jak i środowiskowe. Zbyt niskie zasolenie wód Morza Bałtyckiego, ich termika oraz zanieczyszczenie powodują, że występujący powszechnie w polskiej strefie brzegowej omulek jadalny (*M. edulis*) dorasta jedynie do rozmiarów wynoszących 1-3 cm. Zjawisko to, zwane karłowaceniem, jest normalnym procesem związanym z wysładzaniem wody (23). Badania dzikich populacji omulek w kierunku występowania chorób nieegzotycznych, w tym głównie wywołanych przez *M. refringens* prowadzone są w Zakładzie Chorób Ryb PIWet-PIB od 2007 r. i dotychczas uzyskano jedynie wyniki ujemne. Prawdopodobieństwo wystąpienia zarówno chorób egzotycznych, jak i nieegzotycznych mięczaków w polskiej

strefie brzegowej Morza Bałtyckiego jest znikome, aczkolwiek nie niemożliwe.

Podsumowując należy stwierdzić, że zwierzęta akwakultury, a szczególnie mięczaki, choć odległe i wydawałoby się egzotyczne dla polskiej rzeczywistości, są istotnym elementem sektora produkcji zwierzęcej. Zagrożenia związane z rozprzestrzenianiem się chorób mięczaków i samymi chorobami są stale kontrolowane również w naszym kraju.

### Piśmiennictwo

- Alderman D. J.: Epizootiology of *Marteilia refringens* in Europe. *Mar. Fishery Rev.* 1979, 41, 67-69.
- Audemard C., Barnaud A., Collins C. M., Le Roux F., Sauriau P. G., Coustau C., Blachier P., Berthe F. C. J.: Claire ponds as an experimental model for *Marteilia refringens* life-cycle studies: new perspectives. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 2001, 257, 87-108.
- Berthe F. C. J.: Development and validation of DNA-based diagnostic techniques with particular reference to bivalve mollusc pathogens, [w:] Walker P., Subasinghe R.: DNA-based Molecular Diagnostic Techniques. Research Needs for Standardization and Validation of the Detection of Aquatic Animal Pathogens and Diseases. FAO Fish. Tech. Pap. Bangkok, Tajlandia 2000, 395, 64-70.
- Berthe F. C. J., Burreson E., Hine M.: Use of molecular tools for molluscs disease diagnosis. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.* 1999, 19, 277-278.
- Berthe F. C. J., La Roux F., Adlard R. D., Figueras A.: *Marteiliosis* in molluscs: A review. *Aquat. Living Resour.* 2004, 17, 433-448.
- Berthe F. C. J., Le Roux F., Peyretailade E., Peyret P., Rodriguez D., Gouy M., Vivares C. P.: The existence of the phylum *Paramyxea* Desportes and Perkins, 1990 is validated by the phylogenetic analysis of the *Marteilia refringens* small subunit ribosomal RNA. *J. Euk. Microbiol.* 2000, 47, 288-293.
- Cahour A.: *Marteilia refringens* and *Crassostrea gigas*. *Mar. Fish. Rev.* 1979, 41, 19-20.
- Camacho A. P., Villalba A., Beiras R., Labarta U.: Absorption efficiency and condition of cultured mussels (*Mytilus edulis galloprovincialis* Linnaeus) of Galicia (NW Spain) infected by parasites *Marteilia refringens*. *J. Shellfish Res.* 1997, 16, 77-82.
- Carrasco N., Andree K. B., Lacuesta B., Roque A., Rodgers Ch., Furonos M. D.: Molecular characterization of the *Marteilia* parasite infecting the common edible cockle *Cerastoderma edule* in the Spanish Mediterranean coast: A new *Marteilia* species affecting bivalves in Europe? *Aquaculture* 2012, 324-325, 20-26.
- Carrasco N., Arzul I., Berthe F. C. J., Furonos M. D.: In situ hybridization detection of initial infective stages of *Marteilia refringens* (*Paramyxea*) in its host *Mytilus galloprovincialis*. *J. Fish Dis.* 2008, 31, 153-157.
- Carrasco N., Lopez-Flores I., Alcaraz M., Furonos M. D., Berthe F. C. J., Arzul I.: Dynamics of the parasite *Marteilia refringens* (*Paramyxea*) in *Mytilus galloprovincialis* and zooplankton populations in Alfacs Bay (Catalonia, Spain). *Parasitology* 2007, 134, 1541-1550.
- Carrasco N., Roque A., Andree K. B., Rodgers Ch., Lacuesta B., Furonos M. D.: A *Marteilia* parasite and digestive epithelial virosis lesions observed during a common edible cockle *Cerastoderma edule* mortality event in the Spanish Mediterranean coast. *Aquaculture* 2011, 321, 197-202.
- Dyrektorywa Rady 2006/88/WE z dnia 24 października 2006 r. w sprawie wymogów w zakresie zdrowia zwierząt akwakultury i produktów akwakultury oraz zapobiegania niektórym chorobom zwierząt wodnych i zwalczania tych chorób. *Dz. U. WE L 328/14*, 2006.
- Figueras A. J., Jardon C. F., Caldés J. R.: Diseases and parasites of rafted mussel (*Mytilus galloprovincialis* Lmk): preliminary results. *Aquaculture* 1991, 99, 17-33.
- Gombac M.: *Marteiliosis* in Slovene Mediterranean mussels (*Mytilus galloprovincialis*). Report of the Annual Meeting and Eighth Combined Technical Workshop of the National Reference Laboratories for Mollusc Diseases. La Rochelle, France 2011, 35.
- Grizel H.: Etude des récentes épizooties de l'huitre plate (*Ostrea edulis* Linné) et leur impact sur l'ostréiculture bretonne. *Praca dokt., Université des Sciences et Techniques du Languedoc, Montpellier*, France 1985.
- Lewbart G. A.: *Invertebrate Medicine*. Wiley-Blackwell, Oxford, UK 2011, 14.
- Lopez-Flores I., Garrido-Ramos M. A., Herran de la R., Ruiz-Rejon C., Ruiz-Rejon M., Navas J. I.: Identification of *Marteilia refringens* infecting the razor clam *Solen marginatus* by PCR and in situ hybridization. *Mol. Cell Probes* 2008, 22, 151-155.
- Lopez-Flores I., Herran de la R., Garrido-Ramos M. A., Navas J. I., Ruiz-Rejon C., Ruiz-Rejon M.: The molecular diagnosis of *Marteilia refringens* and differentiation between *Marteilia* strains infecting oysters and mussels based on the rDNA IGS sequence. *Parasitology* 2004, 129, 411-419.
- Lopez-Flores I., Robles F., Valencia J. M., Grau A., Villalba A., Herran de la R., Garrido-Ramos M. A., Ruiz-Rejon C., Ruiz-Rejon M., Navas J. I.: Detection of *Marteilia refringens* using nested PCR and in situ hybridization in *Chamaelea gallina* from the Balearic Islands (Spain). *Dis. Aquat. Org.* 2008, 82, 79-87.
- Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals. World Organisation for Animal Health, Paris 2009.
- Mialhe E., Bachere E., Boulo V., Cadoret J. P., Saraiva J., Carrera L., Rousseau C., Cedeno V., Calderon J., Colwell R. R.: Future of biotechnology-based control of disease in marine invertebrates. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 1995, 4, 275-283.
- Rajski A.: *Zoologia*. Tom 2. Część systematyczna. PWN, Warszawa 1984, 127-154.
- Renault T., Cochennec N., Chollet B.: *Marteiliosis* in American oysters *Crassostrea virginica* reared in France. *Dis. Aquat. Org.* 1995, 23, 161-164.
- Roux F. Le., Audemard C., Barnaud A., Berthe F. C. J.: DNA probes as potential tools for the detection of *Marteilia refringens*. *Mar. Biotechnol.* 1999, 1, 588-597.
- Roux F. Le., Lorenzo G., Peyret P., Audemard C., Figueras A., Vivares C., Gouy M., Berthe F. C. J.: Molecular evidence for the existence of two species of *Marteilia* in Europe. *J. Euk. Microbiol.* 2001, 48, 449-454.
- Thébault A., Bergman S., Pouillot R., Le Roux F., Berthe F. C. J.: Validation of in situ hybridisation and histology assays for the detection of the oyster parasite *Marteilia refringens*. *Dis. Aquat. Org.* 2005, 65, 9-16.
- Villalba A., Mowelle S. G., Lopez M. C., Carballal M. J., Azevedo C.: *Marteiliasis* affecting cultured mussels *Mytilus galloprovincialis* of Galicia (NW. Spain). Etiology, phases of the infection, and temporal and spatial variability in prevalence. *Dis. Aquat. Org.* 1993, 16, 61-72.

Adres autora: dr Agnieszka Pękala, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy;  
e-mail: A.Pekala@piwet.pulawy.pl