Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C.

TESIS

Distribución y prevalencia de *Perkinsus marinus* y Herpesvirus OsHV-1 en *Crassostrea corteziensis y Crassostrea gigas* en el estado de Sinaloa.

Por:

TERESA DE JESÚS PINEDA GARCÍA

TESIS APROBADA POR LA:

UNIDAD MAZATLÁN EN ACUICULTURA Y MANEJO AMBIENTAL

Como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRÍA EN CIENCIAS

Diciembre del 2011

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del director del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD).

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión del director de tesis.

Dr. Ramón Pacheco Aguilar
Director General

APROBACIÓN

Los miembros del comité asignados para revisar la tesis de Teresa de Jesús Pineda García, la han encontrado satisfactoriamente y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias.

M. en C. Leobardo Montoya Rodríguez
Director de Tesis

Dr. Jorge Abelardo Cáceres Martínez
Asesor

Dra. Rebeca Vásquez Yeomans
Asesor

Dra. María Cristina Chávez Sánchez
Asesor

Dra. Silvia Alejandra García Gasca
Asesor

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para mis estudios de Maestría.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. (CIAD) por el apoyo brindado durante mis estudios.

Al Dr. Marco Linné Unzueta Bustamante, Director de Acuicultura del Instituto Nacional de Pesca por su apoyo para el desarrollo del proyecto.

Al Instituto de Sanidad Acuícola, A. C., por el apoyo otorgado para el análisis de las muestras.

Al Consejo Estatal de Ciencia y Tecnología de Sinaloa (COECYT) por la beca otorgada para la terminación de la tesis.

A mi director de tesis de tesis M. en C. Leobardo Montoya Rodríguez por recibirme en el su laboratorio, por su paciencia y dedicación para la elaboración de esta tesis.

Al Dr. Jorge Cáceres Martínez y la Dra. Rebeca Vásquez Yeomans por permitirme forma parte de su proyecto, por sus enseñanzas y dedicación en la elaboración de esta tesis.

Al comité de tesis por su valiosa asesoría y aportación a esta tesis.
M. en C. Leobardo Montoya Rodríguez
Dr. Jorge Cáceres Martínez
Dra. Rebeca Vásquez Yeomans
Dra. María Cristina Chávez Sánchez
Dra. Silvia Alejandra García Gasca

A mis compañeros de laboratorio por el apoyo técnico durante los muestreos y por su valiosa amistad que me brindaron durante mi estancia en Ensenada.
M. en C. Jenniffer N. Villalva de la Vega
M. en C. Ananda Aracely Navarro Barrera
M. en C. Rocío Parra Laca
M. en C. Josef Amín Chávez Romero

A la M. en C. Yanet Guerrero Rentería, técnico del laboratorio de Biología y Patología de Organismos Acuáticos del Departamento de Acuicultura del CICESE, por el apoyo técnico y asesoría en las técnicas de Cultivo de Tioglicolato e Histología.
A la M. en C. Gissel Tinoco Orta por su apoyo técnico en la elaboración de cortes histológicos.

Al Comité Estatal de Sanidad Acuícola del Estado de Sinaloa (CESASIN) por el apoyo en el desarrollo de este proyecto.

A los Biólogos Pesqueros del CESASIN Fernando López López y José Manuel Pérez Flores por su apoyo durante los muestreos.

A los productores de ostión que amablemente colaboraron en el estudio.

A la M. en C. Martha Olivia Palomec Antonio, I.B.T Víctor Álvarez López y el B.P. Luis Adrián Gámez Alejo por el apoyo técnico en el Laboratorio de Virología.

A mis compañeros y amigos de Maestría Citlalic, Jary, Sarahi, Linda, Elda, Alan, Rocío, Efrén, Martín, Oscar y Carlos por el tiempo que compartimos.

A Jorge Alberto Duran Niebla por el apoyo técnico en la biblioteca y el centro de cómputo.

Y a todas aquellas personas que de una u otra forma, colaboraron o participaron en la realización de esta tesis.

DEDICATORIA

A mis padres María Emilia y José Miguel por su apoyo, confianza y amor.

A mis hermanos Nadia y Miguel.

A mi novio Gerardo quien me apoyo en todo momento.

CONTENIDO

	Página
AGRADECIMIENTOS	**IV**
DEDICATORIAS	**VI**
CONTENIDO	**VII**
LISTA DE FIGURAS	**X**
LISTA DE TABLAS	**XII**
RESUMEN	**XIV**
CAPÍTULO I. Introducción.	**1**
CAPÍTULO II. Antecedentes.	**3**
II.1 Importancia de *Perkinsus marinus* y del virus OsHV-1 para el cultivo del ostión.	**3**
II.1.1 *Perkinsus marinus.*	**3**
II.1.2 Características de *Perkinsus marinus.*	**5**
II.1.3 Ciclo de vida.	**5**
II.1.4 Hospederos.	**7**
II.1.5 Métodos de diagnóstico.	**8**
II.1.6 Distribución geográfica.	**9**
II.2 Herpesvirus del ostión OsHV-1.	**9**
II.2.1 Características de Herpesvirus OsHV-1.	**11**
II.2.2 Ciclo de replicación.	**12**
II.2.3 Hospederos.	**12**
II.2.4 Métodos de diagnóstico.	**13**
II.2.5 Distribución geográfica.	**13**
CAPÍTULO III. Justificación, Hipótesis y Objetivos.	**14**
III.1 Justificación.	**14**
III.2 Hipótesis.	**14**
III.3 Objetivo general.	**15**
III.4 *Objetivos particulares.*	**15**

CONTENIDO (continuación)

	Página
CAPÍTULO IV. Materiales y métodos.	**16**
IV.1 Área de Estudio	**16**
IV.2 Técnicas de diagnóstico.	**17**
IV.2.1 Análisis clínico.	**17**
IV.2.2. Incubación en FTM (Ray, 1966).	**19**
IV.2.3 Análisis Histopatológico.	**20**
IV.2.4 Evaluación y determinación de la infección.	**21**
IV.3 Extracción de ADN a partir de tejido branquial y manto.	**22**
IV.4 Preparación de la Reacción de PCR.	**23**
IV.4.1 Preparación de la Reacción de PCR para *P. marinus* y OsHV-1.	**23**
IV.5 Análisis estadístico.	**25**
CAPÍTIULO V. Resultados	**26**
V.1 Parámetros Físico-Químicos de los sitios de muestreos.	**26**
V.2 Análisis en fresco.	**26**
V.3 Incubación e intensidad de *P. marinus* en FTM (Ray, 1966).	**27**
V.4 Análisis Histopatológico.	**28**
V 5. Intensidad de *Perkinsus marinus*	**32**
V.6 Detección de *P. marinus* por medio de la PCR.	**33**
V.7 Detección de OsHV-1 por medio de la PCR.	**33**
V.8 Distribución, prevalencia e intensidad de *Perkinsus marinus.*	**34**
V.9 Comparación de las tres técnicas utilizadas para la detección de *P. marinus.*	**35**

CONTENIDO (continuación)

	Página
CAPÍTULOVI. Discusión, Conclusiones y Recomendaciones	**40**
VI.1 *Perkinsus marinus*	**40**
VI.2 Herpesvirus OsHV-1	**42**
VI.3 Comparación de técnicas	**43**
VI.4 Conclusiones	**46**
VI.5 Recomendaciones	**47**
CAPÍTILO VII. Bibliografía	**48**
ANEXO	**57**

LISTA DE FIGURAS

Figura		**Página**
1	Ciclo de vida de *Perkinsus marinus* en el ostión *Crassostrea virginica*.	**6**
2	Tejido branquial de ostión infectado por Herpesvirus OsHV-1	**12**
3	Ubicación de las lagunas costeras y las zonas de muestreo en el Estado de Sinaloa.	**17**
4	Anatomía del ostión *Crassostrea gigas,* sin la valva derecha, mostrando los ejes dorsal y ventral, manto izquierdo y manto derecho recogido para mostrar las branquias.	**18**
5	Grados de intensidad de infección por *Perkinsus* en FTM.	**20**
6	Corte transversal del ostión donde se muestran los órganos internos.	**21**
7	Prevalencia e intensidad de las erosiones branquiales observadas durante el análisis macroscópico en *C. corteziensis* de poblaciones silvestres y cultivadas del estado de Sinaloa (Octubre-Noviembre del 2010).	**27**
8	Análisis clínico de las muestras de ostión placer *Crassostrea corteziensis* con el cuerpo blando expuesto para la toma de muestras.	**28**
9	Preparación de Tejido de manto infectado, cultivado en FTM donde se muestran las hipnosporas características de *Perkinsus sp*. después de 8 días de incubación.	**28**
10	Comparación de tejidos de *Crassostrea corteziensis* sanos e infectados por *Perkinsus marinus*.	**30**
11	Epitelio columnar ciliar del estómago de *Crassostrea corteziensis* infectado por *Perkinsus marinus*.	**31**
12	Epitelio columnar ciliar del estómago de *Crassostrea corteziensis* en donde se aprecia una infección severa por *Perkinsus marinus*.	**31**

Figura LISTA DE FIGURAS (continuación)

13	Tejido del manto de *Crassostrea corteziensis* en donde se aprecia una infección severa por *Perkinsus marinus*.	**32**
14	Tejido gonádico de *Crassostrea corteziensis* en donde se aprecia una infección severa por *Perkinsus marinus*.	**32**
15	Detección de *P. marinus* por medio de PCR en *Crassostrea corteziensis* del estado de Sinaloa.	**33**
16	Gel de agarosa al 1.5% para el análisis de productos de PCR en la detección del Herpesvirus del Ostión (OsHV-1) en dos especies de ostión colectadas en el estado de Sinaloa.	**34**
17	Distribución, prevalencia e intensidad de *Perkinsus marinus* en *Crassotrea corteziensis* en Sinaloa.	**36**
18	Prevalencia e intensidad de *Perkinsus marinus* en el ostión de placer, *Crassostrea corteziensis*, en el estado de Sinaloa.	**38**
19	Prevalencia de *Perkinsus marinus* en *Crassostrea corteziensis* S: silvestre, C: de cultivo *y Crassostrea gigas** con relación a los parámetros de temperatura y salinidad de las 9 localidades estudiadas del estado de Sinaloa.	**39**
20	Correlación entre prevalencia en intensidad de *P. marinus* con respecto a la temperatura °C y salinidad UPS.	**39**

LISTA DE TABLAS

Tabla		**Página**
1	Especies de *Perkinsus* y sus principales hospederos.	**8**
2	Especies de hospederos de Herpesvirus OsHV-1 en diferentes moluscos bivalvos.	**13**
3	Combinaciones posibles de las tres técnicas y su resultado propuesto para la prevalencia final.	**22**
4	Componentes y concentraciones finales para la detección de *P. marinus* por PCR.	**24**
5	Componentes y concentraciones finales para la detección de OsHV-1 por PCR.	**24**
6	Condiciones de amplificación para la detección de *P. marinus* por PCR.	**24**
7	Componentes de amplificación para la detección de OsHV-1 por PCR.	**25**
8	Prevalencias e intensidad de *Perkinsus sp*. en FTM	**29**
9	Intensidad de la infección en la técnica histológica.	**33**

LISTA DE TABLAS (continuación)

Tabla		**Página**
10	Localidades y especies analizadas para la detección de *Perkinsus marinus*.	**34**
11	Localidades y especies analizadas para la detección de OsHV-1.	**35**
12	Combinaciones de resultados obtenidos del análisis de las muestras procesadas con tres técnicas diferentes, donde se muestra el resultado definitivo (RD) y el porcentaje obtenido con cada una de las combinaciones encontradas.	**37**
13	Prueba Q de Cochran para las técnicas de diagnóstico de *Perkinsus marinus*.	**37**
14	Prueba Q de Cochran para las técnicas de diagnóstico de *Perkinsus marinus* Tioglicolato y PCR	**38**
15	Comparación de tallas de *C. corteziensis* y *C. gigas*.	**40**

RESUMEN

La producción de ostión en el noroeste de México está representada por el ostión Japonés *Crassostrea gigas* y por el ostión de Placer *Crassostrea corteziensis*. Ambas especies pueden ser afectadas por parásitos que merman su producción, entre ellos *Perkinsus marinus* (Protozoa) que ha provocado mortalidades recurrentes en poblaciones naturales y de cultivo del ostión americano *Crassostreas virginica* a lo largo de las costas del Atlántico y del Norte del Golfo de México, y recientemente, se ha encontrado en *C. corteziensis* en el Estado de Nayarit.

Por otro lado, el Herpesvirus OsHV-1 que es el agente responsable de mortalidades en el ostión Japonés y otros moluscos bivalvos, se ha detectado en *C. gigas* cultivado en diferentes localidades del Noroeste de México. El presente trabajo tiene por objetivo determinar la posible presencia de estos parásitos en poblaciones naturales y de cultivo de los ostiones producidos en el Estado de Sinaloa. Así mismo se plantea una comparación entre las técnicas de diagnóstico para *P. marinus*. Para tal efecto, fueron examinadas nueve localidades de seis lagunas costeras. Cada muestra consistió de entre 30 y 120 ejemplares de *C. corteziensis* adultos y muestras de entre 30 y 50 ejemplares de *C. gigas* cuando estuvieron disponibles los cultivos. Se obtuvieron fracciones de tejido de branquia, manto y recto para su cultivo en Medio de Fluido de Tioglicolato (FTM); adicionalmente se tomó una muestra de tejido de branquia y manto para el análisis de ADN con la técnica de PCR con iniciadores específicos para la identificación de *P. marinus* y del virus OsHV-1. El resto del tejido blando se utilizó para el análisis histopatológico. De los parásitos buscados, solamente se detectó a *P. marinus* en *C. corteziensis*, sus prevalencias fueron del 1.26% al 60%, mientras que la intensidad de la infección fue de ligera a severa. Los valores de prevalencia más altas se registraron en poblaciones silvestres. El análisis histopatológico de los animales infectados mostró un desarrollo de la enfermedad similar a la reportada en *C. virginica*. No se encontraron evidencias de infección de *P. marinus* en *C. gigas*. El virus OsHV-1 no se detectó en ninguna de las especies y localidades estudiadas. Para un diagnóstico correcto de *P. marinus* es necesario obtener un resultado positivo en al menos dos de las tres técnicas. En un resultado positivo por FTM y negativo por las otras dos técnicas, el análisis debe ser repetido. La comparación entre técnicas de diagnóstico para *P. marinus* nos indicó que la técnica de PCR fue la más efectiva con un 84.65% de efectividad. Se recomienda aplicar medidas de bioseguridad para evitar la dispersión del parásito en la región.

Palabras Claves: *Crassostrea corteziensis*, *Crassostrea gigas*, *Perkinsus marinus*, OsHV-1, distribución, prevalencia.

CAPÍTULO I. Introducción

La producción de ostión en México actualmente ha alcanzado cerca de 48 000 toneladas de las cuales el 86% se deben a los sistemas extensivos, un 11% proviene de sistemas controlados y el resto de la pesca en bancos naturales. La producción anual en Sinaloa alcanzó 197 toneladas métricas ocupando el décimo lugar de los trece estados productores de ostión a nivel nacional, por debajo de Veracruz, Tabasco, Tamaulipas, Baja California, Nayarit, Baja California Sur, Sonora, Campeche y Guerrero (CONAPESCA, 2010). Las especies de interés comercial que se explotan y se cultivan actualmente son *Crassostrea. corteziensis* y *C. gigas.*

La explotación de ostiones en la costa del Pacífico mexicano se remonta a las poblaciones nómadas costeras quienes utilizaban este recurso con fines alimenticios y de ornato (Cáceres-Martínez, 1997). El ostión de Placer ha sido la especie nativa dominante que ha sustentado esta pesquería, mientras que la producción de ostión por acuicultura en la región comenzó con el ostión japonés, introducido en el año de 1972, el cultivo de ostión se ha extendido a la especie nativa *C. corteziensis*, de tal manera que actualmente en la región se producen alrededor de 800 toneladas de *C. gigas* y alrededor de 300 toneladas de *C. corteziensis* (Castillo-Durán *et al*., 2010).

El cultivo de *C. corteziensis* se lleva a cabo en balsas, en módulos de cajas ostreofilas en suspensión y en costales sobre camas (estructuras de metal) en la zona intermareal. El ostión Japonés se cultiva en módulos de cajas ostreófilas en suspensión y en algunos de los casos se utilizan camas en la zona intermareal. Este último sistema es utilizado en Baja California Sur y en algunos lugares de Sonora y Sinaloa (Maeda-Martínez, 2008).

Durante el desarrollo de estos cultivos, se han observado mortalidades, inusuales afectando al ostión japonés en diversos estadios de desarrollo. En el caso de larvas, semilla y juveniles de esta especie, se han documentado episodios de mortalidad claramente asociados con la presencia de Herpesvirus, especialmente en los estados vecinos de Sonora, Baja California y Baja California Sur (Vásquez-Yeomans, *et al*. 2004a; Vásquez-Yeomans y Cáceres-Martínez, 2004b). También se han documentado episodios de mortalidad afectando a todos los estadios de desarrollo en diferentes

cultivos ostrícolas del estado, asociados con las altas temperaturas registradas en verano, algunas de las cuales han sido causadas por el fenómeno natural "El Niño" (Góngora-Gómez, *et al*., 2010). Otros episodios de mortalidad del ostión en Sinaloa han sido asociados con problemas de contaminación, presumiblemente provocados por metales pesados y plaguicidas (Góngora-Gómez *et al*., 2010).

Los contaminantes han contribuido con la eutrofización de las lagunas costeras del Estado de Sinaloa, provocando áreas de alta productividad, y turbidez. Por otra parte la mayoría de las lagunas de Sinaloa son someras, con poca circulación y en algunos de los casos los cultivos ostrícolas se encuentran en esas zonas, estos factores y en conjunto con las altas temperaturas hacen que las especies cultivadas estén en constante estrés y susceptibles a patógenos oportunistas. De hecho, estos factores han sido asociados con mortalidades del ostión japonés en diversas partes del mundo, particularmente durante el verano, cuando dichas condiciones son especialmente frecuentes. A estos episodios se les ha denominado "mortalidades de verano" (Soletchnick *et al.*, 1998; Berthelin *et al*., 2000; Ropert *et al.*, 2008). Por su parte Chavez-Villalva *et al.*, (2005) reporta que los bancos naturales de ostión de placer, han venido disminuyendo e incluso en algunos de los casos han desaparecido debido a causas desconocidas en los estados de Sonora y Sinaloa.

A pesar de la importancia que actualmente tiene la producción de ostiones en el estado de Sinaloa, y en general en México, no se cuenta con estudios sistemáticos enfocados a conocer la distribución prevalencia, e intensidad de infección de los principales patógenos reportados en la región (*P. marinus* y Herpesvirus OsHV-1) para *C. corteziensis y C. gigas* en el estado. El presente estudio se enfocó a determinar la posible distribución, presencia, prevalencia e intensidad de la infección de los parásitos mencionados y así contribuir a generar las bases necesarias para establecer un programa sanitario para el control de los mismos. En este mismo sentido, se llevó al cabo una comparación entre las técnicas de diagnóstico para *P. marinus*.

CAPÍTULO II. Antecedentes

II.1 Importancia de *Perkinsus marinus* y Herpesvirus OsHV-1 para el cultivo del ostión.

La Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) reconoce a las siguientes enfermedades de los moluscos bivalvos como notificables a la comunidad internacional y sujetas a control: *Bonamia ostreae*, *Bonamia exitiosa*, *Haplosporidium nelsoni*, *Martelia refrigens*, *Perkinsus olseni* y *P. marinus.*

Las especies de *Perkinsus sp.* son reconocidas en todo el mundo como el agente causal de la enfermedad en diversos moluscos de importancia económica. Debido a la importancia ecológica de moluscos filtradores, las mortalidades en poblaciones naturales tienen un gran impacto en el equilibrio ecológico. Así mismo, estos episodios de mortalidad en las poblaciones cultivadas provocan un gran impacto en el ámbito económico y social (Robledo *et al*., 2008).

Los agentes patógenos virales son capaces de causar muertes masivas en cultivos acuícolas, a menudo son altamente infecciosos y fácilmente transmisibles (Renault y Novoa, 2004). Las principales familias de virus que afectan a los moluscos son: Herpesviridae, Papovaviridae, Togaviridae, Retroviridae, Reoviridae, Birnaviridae y Picornaviridae (Farley *et al*., 1972; Farley, 1976; Farley, 1978; Oprandy *et al*., 1981; Meyers, 1979; Rasmussen, 1986; Bower, 2001).

El OsHV-1 causa una enfermedad infecciosa que se puede transmitir tanto vertical como horizontalmente (Arzul *et al*., 2001a y c; Barbosa-Solomieu *et al*., 2005) y provoca importantes mortalidades, con frecuencia en verano; en cultivos de larvas y juveniles (semilla) de diversas especies de moluscos bivalvos.

II.1.1 *Perkinsus marinus*

Perkinsus marinus, es conocido como el agente causal de la enfermedad llamada “Dermo” y considerada como la causa en la reducción de poblaciones nativas de *Crassostrea virginica* en la costa Este de los Estados Unidos, se cree que su origen se dio en poblaciones de *C. virginica* de la costa Sudoeste y del Golfo de México en E.U.A.

El traslado de ostiones nativos de esa zona, que portaban al parásito, hacia zonas libres y las condiciones de cultivo, con altas densidades, favorecieron su desarrollo dando lugar a episodios de infección con mayor virulencia (Burreson *et al.*, 1994; Andrews, 1996; Reece *et al*., 2001).

Los primeros reportes que se documentaron de *P. marinus* en las costas mexicanas del Golfo de México, son en el año de 1992 afectando a *C. virginica* en Tabasco (Burreson *et al*, 1994) y a finales de los 90´s fue registrado en los estados de Tamaulipas, Veracruz, Tabasco y Campeche (Aguirre-Macedo *et al.*, 2007).

A pesar de que a mediados de los años 90´s ocurrieron altas mortalidades del ostión americano en México, poco se sabe de la relación de las mismas con la presencia de *P. marinus*. Asimismo, existe poca información sobre su distribución y abundancia (Aguirre-Macedo *et al.*, 2007).

La costa del Pacífico de América del Norte, hasta el 2006 había sido considerada libre de este parásito. Sin embargo, en investigaciones realizadas durante el 2007 en las costas de Nayarit se reportó la presencia de *P. marinus* en el ostión de placer *C. corteziensis* en poblaciones de cultivos de dos estuarios en Boca de Camichín y en Pozo Chino, mediante la técnicas de Medio Fluido de Tioglicolato (FTM por sus siglas en inglés Fluid Thioglycollate Medium), además en un análisis histopatológico encontraron una prevalencia del 1-5 % en Boca de Camichin y del 1-6% en Pozo Chino. Por medio de esta técnica observaron la presencia de estadios celulares característicos a *Perkinsus* sp. Posteriormente la identidad del parásito se confirmó en muestras de ADN de ostiones mediante la técnica de PCR basadas en iniciadores específicos para la especie de *P. marinus* **(**Cáceres-Martínez *et al*., 2008).

Recientemente Enríquez–Espinoza *et al.*, (2010) reportaron la presencia de *P. marinus* en *C. gigas* cultivado en el estado de Sonora. Sin embargo este estudio se realizó con pocos organismos, las imágenes histológicas que presentan no corresponden a *Perkinsus sp*. y los resultados obtenidos por PCR no parecen concluyentes por lo que se requiere un estudio más profundo para determinar la presencia de *P. marinus* en *C. gigas* y sus efectos.

II.1.2 Características de *Perkinsus marinus*

Perkinsus marinus es un parásito facultativo intracelular que causa enfermedad de "Dermo" en el ostión americano *C. virginica*, y existen reportes de impactos severos en poblaciones naturales y de cultivo a lo largo del Atlántico y costas del Golfo de México.

En ostiones con infección avanzada de *P. marinus* se puede observar coloración pálida del manto y la glándula digestiva, disminución del índice de condición, severo enflaquecimiento, débil cierre de sus valvas, así como también disminución en el crecimiento. Ocasionalmente, pueden aparecer pústulas blanquecinas en el tejido blando. A nivel de hemolinfa, se puede detectar un aumento en la actividad de las lisozimas y se da una desorganización del tejido conectivo y células epiteliales (Cáceres-Martínez, 2002).

El principal patrón de la enfermedad está dado por transmisión horizontal (de hospedero a hospedero), debido a que todos los estadios de vida son infectivos. Los ostiones al morir o desintegrarse liberan células viables del parásito en la columna de agua y son ingeridos por otro hospedero, posteriormente invade el sistema digestivo, branquias y manto. Muchos de los investigadores han concluido que la causa principal de la muerte por la enfermedad Dermo es debida a la lisis tisular y la obstrucción de los vasos hemolinfáticos. La infección es frecuentemente letal para *C. virginica* aproximadamente a un año o dos después de la infección, y la muerte se ve asociada con los periodos de mayor temperatura en el agua o inmediatamente después de estos (Burreson *et al.,* 1994; O´Farrel *et al.,* 2000; Villalva *et al.,* 2005).

En algunos casos las poblaciones de ostiones expuestos a este patógeno, se infectan y mueren liberando células infecciosas. Por tal motivo las tasas de mortalidad incrementan con el paso del tiempo, debido al gran número de células viables del parásito liberadas en el agua por organismos muertos (Ewart y Ford, 1993).

II.1.3 Ciclo de vida

En el ciclo de vida de *P. marinus* podemos encontrar dos fases o ciclos que son: a) fase vegetativa y b) fase de vida libre o resistencia (Fig. 1).

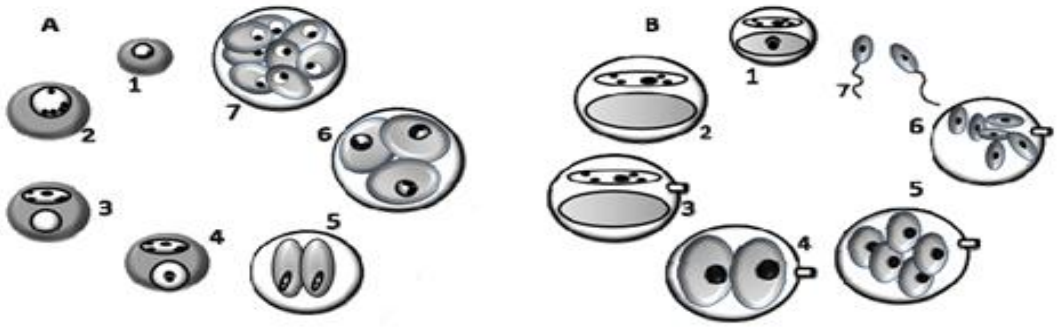

Figura 1. Ciclo de vida de *Perkinsus marinus* en el ostión *Crassostrea virginica*.
A: Estadio vegetativo. **1-2:** Trofozoito inmaduro; **3-4:** Trofozoito maduro; **5-6:** Divisiones interna del trofozoito; **7:** Tomonte con trofozoitos inmaduros en su interior. **B**: Estadio de vida libre. **1-2:** Trofozoitos libres que aumentan de tamaño y pierden el vaculoplasto; **3-4:** Trofozoitos que comienzan a madurar y generan un poro con un túbulo de descarga; **5-6:** Formación de esporas, por palintomia, con dos flagelos denominadas zoosporas; **7:** Disolución del tapón del túbulo y liberación de las zoosporas móviles. (Tomado de Perkins, 1996 y modificado por Parra-Laca ,2010).

Dentro del ostión *C. virginica* el ciclo de desarrollo de *Perkinsus* se inicia con la fase vegetativa teniendo como resultado la formación de estructuras denominadas trofozoitos que pueden ser observadas mediante histología. La multiplicación vegetativa ocurre dentro del tejido del hospedero en el cual el trofozoito inmaduro (1A-2A), desarrolla una gran vacuola con un vaculoplasto, un núcleo y nucléolo central el cual le da las características de un trofozoito maduro (3A-4A). Los trofozoitos maduros comienzan una división interna (palintomia) durante la cual el nucléolo reduce su tamaño a través de las tres primeras cariocinesis y es cuando el núcleo deja de percibirse (5A-6A). Como resultado de esta división, se forman de 8 a 16 trofozoitos inmaduros que son liberados por la pared del tomonte (7A).

La fase de vida libre o de resistencia de *Perkinsus sp*., ha sido observada en ostiones moribundos infectados por el parásito, y se ha visto la generación de una estructura de resistencia conocida como hipnospora o prezoosporangia (Excepto de *P. qugwadi*) (Fig. 4) y su presencia se ha corroborado en ensayos *in vitro* de *Perkinsus* sp. en FTM (Perkins, 1968). Las hipnosporas sobreviven un largo periodo en condiciones ambientales adversas y conservan su capacidad de zoosporular, por lo que se consideran un estadio de resistencia dentro del ciclo de *Perkinsus* (Casas *et al*., 2002). En

condiciones favorables, la hipnospora desarrolla un poro con un túbulo de descarga (B3-B4), el cual está cubierto por un tapón de material de la pared secundaria que se forma en la propia pared del trofozoito. Posteriormente, se produce la palintomia (B5-B6) formándose numerosas esporas con dos flagelos llamadas zoosporas (B7). Durante este proceso, el núcleo y las células individuales crecen de tal forma, que se puede percibir el nucléolo, seguido de la disolución del tapón del túbulo con la consecuente liberación de las zoosporas. Estas zoosporas, que tienen movimiento libre, pueden infectar a nuevos ostiones en el medio natural. Una vez en el tejido, las zoosporas pierden sus flagelos y complejo apical, convirtiéndose en trofozoitos inmaduros.

Por otro lado, se ha observado que las hipnosporas pueden salir al medio por diapédesis (fenómeno en el cual las bacterias y otros tipos de células de organismos uni o multicelulares dirigen sus movimientos de acuerdo a ciertas sustancias químicas en su medio ambiente) al morir el organismo infectado o por la materia fecal, y otros hospederos pueden adquirirlas por medio de la ingesta durante el proceso normal de alimentación del molusco, donde los trofozoitos son fagocitados por los hemocitos presentes en el canal de alimentación y otros tejidos (Cáceres-Martínez, 2002; Robledo *et al*., 2008; Villalba, 2008).

II.1.4 Hospederos

La Perkinsiosis afecta a una amplia variedad de moluscos (Tabla 1) en los cinco continentes y ha causado consecuencias graves en muchas áreas (Villalba *et al.*, 2004).

Tabla 1. Especies de *Perkinsus* y sus principales hospederos.

Spp. Perkinsus	**Hospedero**	**Otros Hospederos**
P. marinus	*Crassostrea virginica*	*Crassostrea rhizophorae* *Crassotrea corteziensis* *Crassotrea gigas* (infección en laboratorio)
P. olseni / P. atlanticus	*Haliotis rubra*	*Anadara trapezia* *Austrovenus stutchburyi* *Chamus pacificus* *Haliotis laevigata* *Tapes decusatus* *Tapes philippinarum*
P. qugwadi	*Patinopecten yessoensis*	
P. chesapeaki *P. andrewsi*	*Mya arenaria*	*Crassotrea virginica* *Mya arenaria* *Macoma balthica* *Mercenaria mercenaria* *Tagelus plebeius* *Tridacna máxima* *Tridacna croecea*
P. mediterraneus	*Ostrea edullis*	

Fuente: Tomado y modificado de Villalba *et al.,* (2004).

II.1.5 Métodos de diagnóstico

El método diagnóstico más utilizado para la detección de *Perkinsus* consiste en la incubación de tejidos en FTM y posterior análisis microscópico para la detección de hipnosporas. La técnica fue desarrollada en 1950, cuando se pensaba que se trataba de un hongo y se pretendía establecer el cultivo *in vitro* del agente patógeno (Ray, 1966) por tal motivo se creía que se trataba de un parásito obligado. Después de la incubación por una semana en FTM, el tejido es teñido con solución de lugol para facilitar la visualización del parásito en forma de esferas conocidas como hipnosporas, las cuales se tiñen de color negro y se observan a través de un microscopio óptico de luz.

Esta técnica aparentemente es efectiva en discernir entre infecciones ligeras y fuertes, pero no diferencia especies. El FTM permite el cultivo *in vitro* de *Perkinsus* (excepto de *P. qugwadi*), la incubación necesaria para este cultivo es de una semana, ya que este periodo permite el crecimiento de las células. Una de las desventajas con la que cuenta esta técnica son los posibles falsos positivos, debido a que en muchos de los casos los dinoflagelados y artefactos se tiñen de color negro los cuales pueden ser confundidos con células de *Perkinsus sp*. debido que al teñirse toman forma y color similar al parásito (Navarro-Barrera, 2011).

Otras de las técnicas tradicionales para la detección *P. marinus* es la histología la cual permite observar la presencia de estadios de desarrollo del parásito.

Además de estas técnicas se utilizan los métodos moleculares como son la Reacción en Cadena Polimerasa (PCR por sus siglas en inglés Polymerase Chain Reaction) esta técnica se considera confirmativa para la presencia de *P. marinus.* Para ello se han diseñado algunos pares de primers de secuencias específicas para el género de *Perkinsus*, que permite la amplificación de segmentos como el espaciador trascrito interno (ITS por sus siglas en inglés Internal Transcribed Spacer) y los espaciadores no transcritos de secuencias específicas de la especie *P. marinus* (NTS por sus siglas en inglés Non Transcribed Spacers).

II.1.6 Distribución geográfica

El parásito *P. marinus* se ha detectado en toda la costa Este de Estados Unidos, desde Massachussets hasta Florida, a todo lo largo del Golfo de México en Estados Unidos, en lagunas costeras de Tabasco, Tamiahua y Tampico en el Golfo de México (Cáceres-Martínez, 2002). Por su parte Cáceres-Martínez *et al.,* (2008) ha documentado la presencia en lagunas costeras del estado de Nayarit y en Bahía de San Jorge, Sonora.

II.2 Herpesvirus del ostión OsHV-1

La primera descripción de una partícula viral tipo Herpes en moluscos bivalvos fue reportada por Farley *et al*., (1972) en el ostión americano *C. virginica*. En el año de 1991, se presentaron altas tasas de mortalidades en larvas de un laboratorio de Francia

(Nicolas *et al.*, 1992) y en Nueva Zelanda (Hine *et al*., 1992) las cuales fueron asociadas a un Herpesvirus. Posteriormente, una infección asociada a Herpesvirus fue notificada en semillas y larvas en la ostra plana *Ostrea edulis*, en Francia (Comps y Cochennec, 1993; Renault *et al*., 2001 b). La replicación del virus tipo Herpes también fue descrita en adultos de *O. angansi* en Australia (Hine y Thorne, 1997), en larvas de *Tiostrea chilensis* en Nueva Zelanda (Hine *et al*., 1998), en larvas de *Ruditapes philippinarum* y en larvas de *Pecten maximus* en Francia (Renault y Lipart 1998; Arzul *et al*., 2001b. Renault *et al.*, 2001a y b; Arzul *et al*., 2002).

Los daños asociados a este virus en larvas de *C. gigas*, en ocasiones se pueden observar en el tejido conectivo (Hine *et al*., 1992, Renault *et al*., 2000a y b). En juveniles de *C. gigas* infectadas por Herpesvirus se ha reportado degeneración en los hemocitos caracterizado por picnosis nuclear y fragmentación (Friedman *et al.*, 2005). Este virus puede estar presente en ostiones asintomáticos, y es capaz de persistir en el hospedero después de una infección sin inducir a la enfermedad o mortalidad, debido a la capacidad/habilidad de latencia que tienen todos los miembros de la familia Herpesviridae (Arzul *et al.*, 2002).

Los primeros estudios sobre Herpesvirus OsHV-1 en México fueron realizados por Cáceres-Martínez y Vásquez- Yeomans (2003), debido a que se presentaron altas tasas de mortalidades en las áreas de cultivo de *C. gigas* de Bahía Falsa Baja California. Durante 1997 y 1998 realizaron muestreos en la Bahía las observaciones clínicas encontradas fueron erosiones branquiales. Mediante el análisis histopatológico se detectó infiltración hemocitaria en los tejidos y en algunos casos la presencia de células gigantes polimórficas con signos asociados a la enfermedad causada por un Iridovirus de ADN (Gill Necrosis Virus Infection). Posteriormente el 2004 mediante análisis de microscopia electrónica se demostró que el virus asociado a las erosiones branquiales en *C. gigas* es un virus similar a los de la Familia Herpesviridae y no a la familia Iridoviridae *(*Vásquez-Yeomans *et al.*, 2004).

Durante el 2005 se presentaron mortalidades de semilla de ostiones de *C. gigas*, cultivado en el sistema lagunario “Bahía de Altata-Ensenada del Pabellón”, en el

Municipio de Navolato, Sinaloa. Vásquez (2006) analizó semillas de *C. gigas* de esta zona mediante la técnica de PCR la cual fue positiva por PCR al Herpesvirus.

Posteriormente Vásquez-Yeomans *et al.*, (2010) determinaron que las erosiones branquiales en *C. gigas* están relacionadas con el Herpesvirus, para el análisis utilizaron la técnica histopatológica e hibridación *in situ* (ISH), de las muestras analizadas con erosiones branquiales el 100 % resultaron positivas para el Herpesvirus OsHV-1.

En la actualidad este virus es identificado como Herpesvirus OsHV-1 por técnicas moleculares, se sabe que el Herpesvirus OsHV-1 se encuentra distribuido en el Noroeste de México (Cáceres-Martínez *et al.*, 2010).

Durante el 2008 al 2009, se confirmaron episodios de mortalidades recurrentes asociados a este virus en larvas, semillas y juveniles de esta zona (Cáceres-Martínez *et a.*, 2010; Chávez-Romero *et al*., 2011).

El Herpesvirus del ostión OsHV-1 no ha sido reconocido por la OIE; sin embargo su inclusión en la lista está en discusión y además merece una atención al menos a nivel nacional por las evidencias sobre su efecto en el cultivo de ostión en diferentes partes del mundo (Vásquez-Yeomans *et al.*, 2004; Vásquez-Yeomans y Cáceres-Martínez, 2004; Chávez-Romero *et al.*, 2011).

II.2.1 Características de Herpesvirus OsHV-1

El virus morfológicamente similar a los de la familia Herpesviridae de forma icoisaédrica (Fig. 2) se ha detectado en varias especies de moluscos bivalvos alrededor del mundo (Renault, 1998).

La patología puede estar relacionada con el mal manejo de los juveniles, tales como las altas temperaturas y el hacinamiento, siendo más frecuentes durante los meses de verano. En ostiones adultos y semillas infectadas por el Herpesvirus OsHV-1 se pueden presentar palidez en la glándula digestiva. Las larvas dejan de alimentarse, disminuyen la natación y presentan lesiones en el velo. Por lo general, la mortalidad se produce seis

días después del desove y puede alcanzar hasta el 100% de mortalidad acumulada entre el octavo y doceavo día, principalmente en verano.

En larvas de *C. gigas* y *Ostrea edullis* (Renault *et al.*, 1994a, 1994b), la enfermedad se propaga rápidamente con mortalidad acumulada cercana al 100% en pocos días.

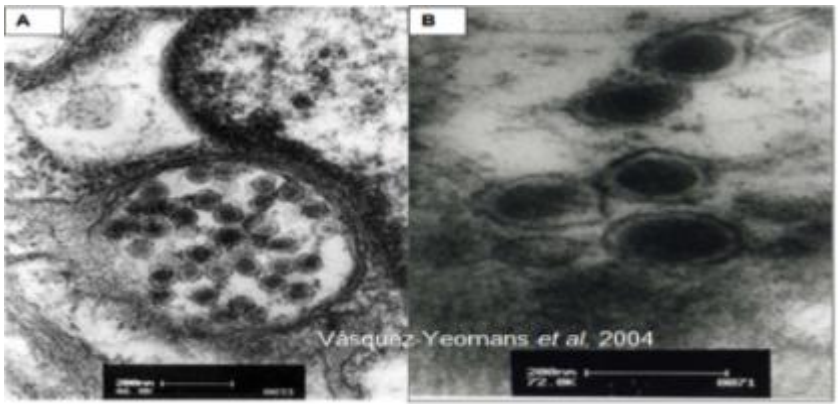

Fig. 2. Tejido branquial de ostión infectado por Herpesvirus OsHV-1. A) Célula branquial del ostión infectada por Herpesvirus OsHV-1. B) Partículas virales donde se observan las cápsides en forma pentagonal del Herpesvirus OsHV-1.

II.2.2 Ciclo de replicación

Los estudios *in vitro* sobre replicación viral o infección en cultivos celulares no han sido posibles debido a que aún no se dispone de líneas celulares de moluscos. Se han intentado ensayos de infección con partículas virales de OsHV-1 en líneas celulares de peces pero no se han observado efectos citopáticos (Chávez-Romero, 2011). En ensayos preliminares en células embrionarias de ostión se ha mostrado la presencia de ADN viral mediante PCR e ISH en los cultivos infectados (Renault y Novoa, 2004).

II.2.3 Hospederos

Existe una amplia variedad de especies de moluscos bivalvos que actúan como hospederos para el herpesvirus como se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2. Especies de hospederos de Herpesvirus OsHV-1 en diferentes moluscos bivalvos.

Especie de hospedero	**Referencia**
Crassostrea gigas (Ostión japonés)	Hine *et al*., 1992, Vásquez-Yeomans *et al*., 2004
Ostrea edulis (Ostra Europea)	Nicolas *et al.*, 1992
O. angansi (Ostra plana)	Hine y Thorne 1997
Tiostrea chilensis (Ostra chilena)	Hine *et al.*, 1998
Ruditapes philippinarum (Almeja manila)	Renault *et al*., 2001ª
R. decussatus (Almeja)	Renault y Arzul 2001
C. angulata (Ostión portugués)	Arzul *et al*., 2001ª
C. rivularis (Ostión)	Arzul *et al.*, 2001ª
Pecten maximus (Vieiras francesas)	Arzul *et al.*, 2001b
Nodipecten subnodosus (Almeja mano de león)	Cáceres-Martínez *et al.*, 2010

II.2.4 Métodos de diagnóstico

La técnica para la detección de Herpesvirus OsHV-1 es la técnica de PCR, para la cual se han diseñado diversos pares de primers basados en secuencias de diferentes regiones del genoma de este virus, como son la región A que codifica para proteínas, región B que codifica un inhibidor de apoptosis, región C que codifica para dos proteínas desconocidas y se encuentra presente dos veces en el genoma (Davidson *et al*., 2005) y la región Gp que codifica una glicoproteína (Arzul *et al*., 2001b y c). En este caso la técnica histológica es limitada aunque, Friedman *et al*., (2005), Vásquez-Yeomans *et al.*, (2010) y otros autores muestran alteraciones histológicas asociadas al OsHV-1, sin embargo estás no son evidentes en todos los casos (Vásquez-Yeomans *et al.*, 2010).

II.2.5 Distribución geográfica

El Herpesvirus OsHV-1 se detectó en la Bahía Tomales, California (Friedman *et al.*, 2005) y se distribuye en las costas de Maine en Nueva York, Estados Unidos. Al igual que en Nueva Zelanda (Hine *et al.*, 1992), en Francia, Reino Unido, Tasmania y el oeste de Australia (Fisheries and Oceans Canada, 2010). En México se ha detectado en las costas del Noroeste Pacífico de Baja California (Vásquez-Yeomans *et al.*, 2004).

CAPÍTULO III. Justificación, Hipótesis y Objetivos.

III.1 Justificación

Se sabe que las poblaciones de bancos naturales de *C. corteziensis* están disminuyendo y/o desapareciendo (Chávez-Villalba *et al.*, 2005), al mismo tiempo las poblaciones de cultivo de *C. gigas* se han visto afectadas por episodios de mortalidades inusuales. Sabemos que algunas de estas mortalidades de *C. gigas* están asociadas con la presencia de OsHV-1 (Vásquez-Yeomans *et al.*, 2004; Vásquez-Yeomans y Cáceres-Martínez, 2004; Vásquez-Yeomans, 2006) y también sabemos que *P. marinus* afecta a *C. corteziensis* del estado de Nayarit y que posiblemente afecte a *C. gigas* del estado de Sonora (Cáceres-Martínez *et al*., 2007; Cáceres- Martínez *et al.*, 2008).

Ante esta problemática se tiene la necesidad de realizar un estudio detallado en el estado de Sinaloa para de determinar la posible presencia, distribución, prevalencia e intensidad de los agentes antes mencionados y sentar las bases para el establecimiento de medidas de bioseguridad que ayuden a evitar la dispersión de dichos patógenos.

Además se tiene la necesidad de incrementar la capacidad del país que permita atender la demanda de servicios de diagnóstico adecuado de *P. marinus* y Herpesvirus OsHV-1.

Un estudio de esta naturaleza contribuirá a mejorar el conocimiento sobre el estatus sanitario de estos moluscos de interés comercial en el estado de Sinaloa.

III.2 Hipótesis

-Si el parásito *P. marinus* se ha detectado en el ostión de placer en los estados de Sonora y Nayarit, entonces *C. corteziensis*, en el estado de Sinaloa está infectada por *Perkinsus marinus*.

-Debido al traslado de semilla de ostión, así como de adultos entre los estados de Sonora, Sinaloa y Nayarit, el ostión japonés *C. gigas* se encuentra infectado por el virus OsHV-1 en Sinaloa.

-Las técnicas de diagnóstico por cultivo en fluido de Tioglicolato, histología y PCR para *P. marinus* son igualmente efectivas.

III.3 Objetivo general

Determinar la posible presencia, distribución, prevalencia e intensidad de *P. marinus* y del Herpesvirus OsHV-1 en *C. corteziensis y C. gigas*, recolectados en nueve localidades de seis lagunas costeras del estado de Sinaloa.

III .4 *Objetivos particulares*

1) Determinar la posible presencia e intensidad de la infección causada por *Perkinsus marinus* y el OsHV-1 en *C. corteziensis* y *C. gigas*.

2) Elaborar un mapa con la distribución y prevalencia de *Perkinsus marinus* y del Herpesvirus OsHV-1 en *C. corteziensis* y *C. gigas* en nueve localidades de seis lagunas costeras del estado de Sinaloa.

3) Comparar y analizar las técnicas para la detección de *Perkinsus marinus.*

CAPÍTULO IV. Materiales y métodos

IV.1 Área de Estudio

Se realizó un muestreo puntual en bancos naturales y áreas de cultivo de ostión (*C. corteziensis* y *C. gigas*) en seis lagunas costeras del estado de Sinaloa (Fig. 3). Para la elección de las lagunas se tomó en cuenta la extensión del estado y diversidad de sus cuerpos lagunares, las lagunas muestreadas son representativas de las tres zonas establecidas para vigilancia sanitaria por parte del Comité de Sanidad Acuícola de Sinaloa (CESASIN) en Norte, Centro y Sur.

El muestreo se llevó a cabo durante los meses de Octubre y Noviembre del 2010. La recolecta de los organismos se hizo directamente del arte de cultivo, o en el caso de los organismos silvestres los ostiones se tomaron de los bancos manualmente.

Se recolectaron entre 30 y 120 organismos de las tallas disponibles. La salinidad y temperatura se registraron usando un salinómetro y termómetro de campo. Los ostiones se transportaron al laboratorio del Instituto de Sanidad Acuícola en Ensenada, B.C. (ISA) en una hielera de poliestireno con bolsas refrigerantes. Cada muestra se colocó en una bolsa de plástico y se registró la fecha, número de organismos y localidad de recolecta.

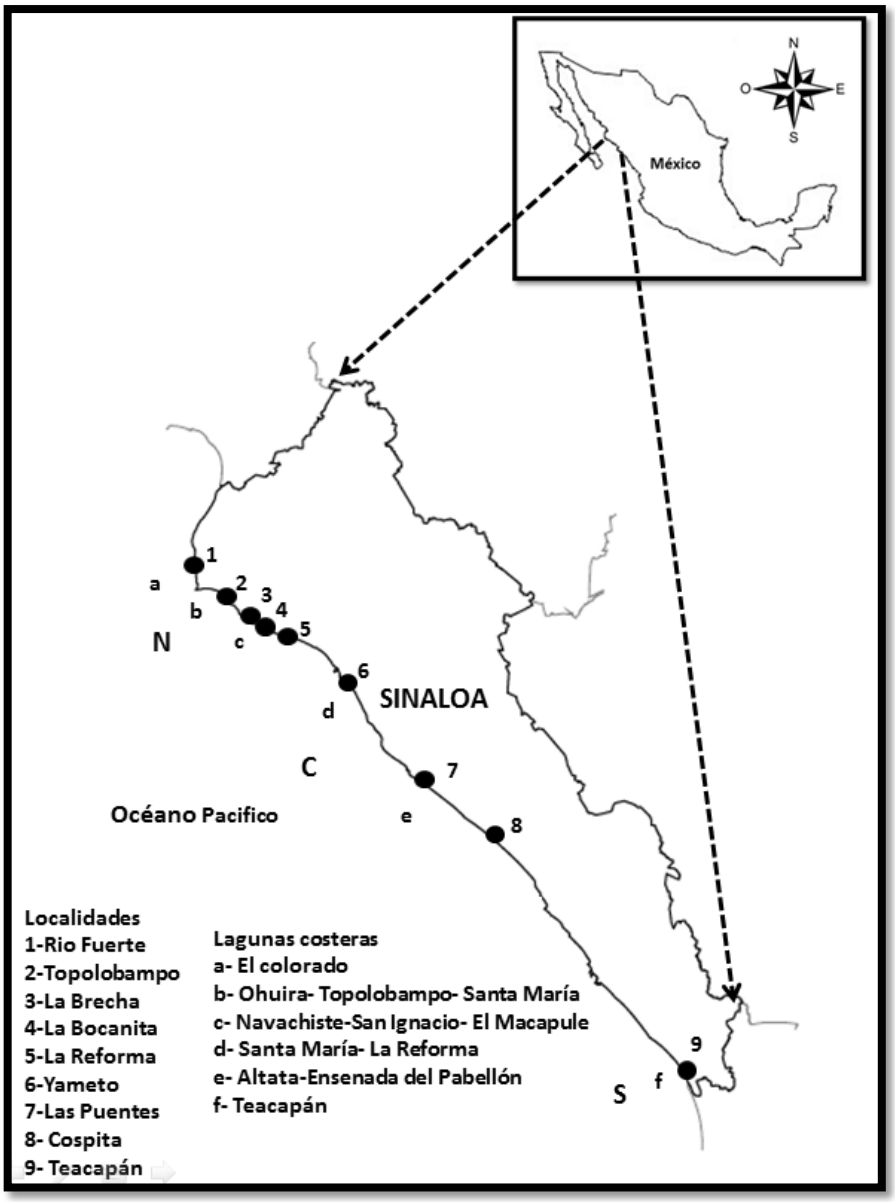

Fig. 3. Ubicación de las lagunas costeras y las zonas de muestreo en el estado de Sinaloa.

IV.2 Técnicas de diagnóstico

IV.2.1 Análisis clínico

Los ostiones vivos se lavaron para eliminar las incrustaciones y organismos asociados. Posteriormente, se midieron con una cinta métrica para registrar la talla y se utilizó una balanza para determinar su peso. Subsecuentemente se abrieron para la observación

macroscópica del cuerpo blando, incluyendo las branquias. Se examinó la apariencia de los tejidos en fresco, considerando su estructura, coloración, consistencia y olor.

Se registró el grado de erosión de las branquias con la escala propuesta por Comps (1988) y modificada por Cáceres-Martínez y Vásquez-Yeomans (2003):

Branquia normal (BrN), branquia completa con margen dorsal apical continuo sin mostrar deformación; branquia ligeramente erosionada (BrLE), inflamación branquial media con ligeras erosiones en el margen dorsal apical de la branquia; branquia erosionada (BrE), severa inflamación branquial con hendiduras profundas en el margen de la branquia, además de tejido necrosado (Fig.4). Se estimó la prevalencia (P) como el porcentaje de los ejemplares afectados en la muestra y la intensidad (I) como el grado de erosión estimado según la escala antes descrita.

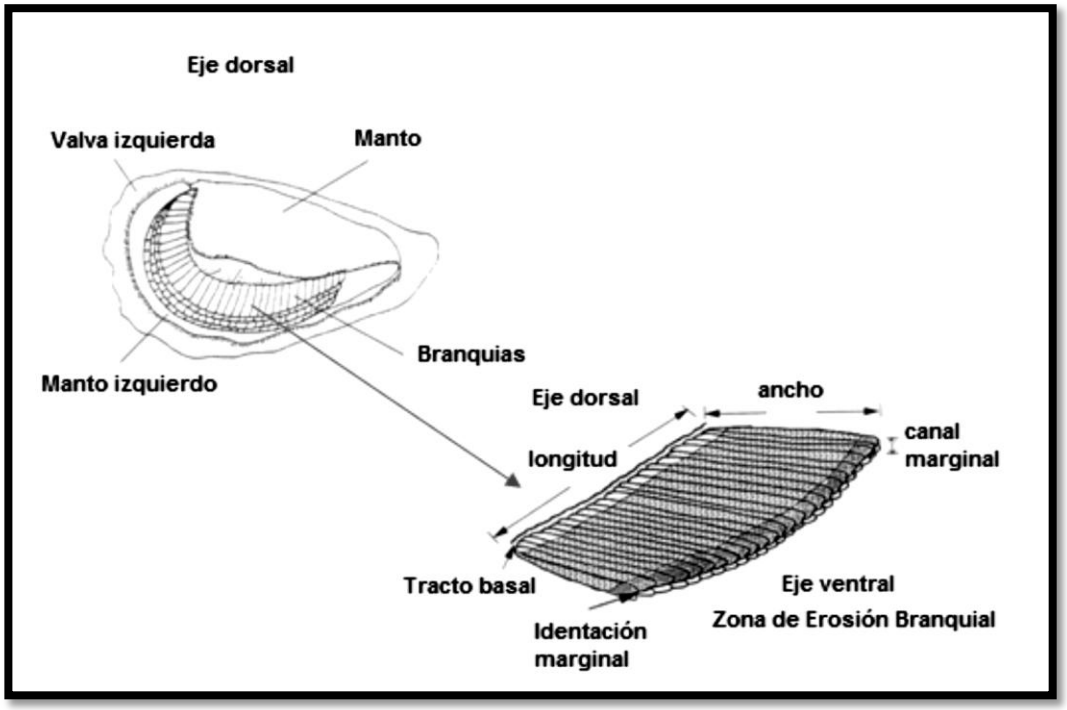

Fig. 4. Anatomía del ostión *Crassostrea gigas*, sin la valva derecha, mostrando los ejes dorsal y ventral, manto izquierdo y manto derecho recogido para mostrar las branquias. También se muestra una de las lamelas de una demibranquia para ubicar la zona de la erosión branquial en el eje ventral (modificado de Brun *et al*., 1999).

Una vez que se examinaron se tomó tejido del recto, branquia y manto, los cuales fueron puestos en FTM para el cultivo de *P. marinus*. Además se tomó un pequeña parte de tejidos de branquia y manto para su posterior análisis mediante la técnica de amplificación por PCR.

La prevalencia del parásito, se definió como el número de ostiones infectados (OI) entre el número de ostiones examinados (OE) expresado en porcentaje (Cáceres-Martínez *et al*. 2010) y se determinó utilizando la siguiente fórmula:

$$PE\ (\%) = [OI/OE]\ X\ 100$$

La intensidad indica el grado de infección en el hospedero causada por *P. marinus*. Esta se determinó dependiendo de la técnica de diagnóstico. Se calculó la intensidad media sumando los valores categóricos de los ostiones infectados por localidad y se obtuvo el promedio para expresarla en valor numérico.

IV.2.2. Incubación en FTM

Para la detección de *Perkinsus* sp.se realizó la técnica FTM utilizada rutinariamente en moluscos. Esta técnica permite la observación de hipnosporas, un estadio de resistencia del protozoo. A un tubo Eppendorf estéril con 0.9 ml de medio de Tioglicolato, se adicionó 0.1 ml de micostatin y se colocaron tejidos de recto, branquia y manto. El medio de cultivo se incubó a temperatura ambiente durante ocho días. Transcurrido este tiempo se colocó el tejido en un portaobjetos, se maceró y se tiñó con una gota de Lugol, colocándose un cubreobjetos para su observación al microscopio (OIE, 2009).

El grado de intensidad de la infección (Fig. 5), se determinó de acuerdo a la escala propuesta por Mackin, 1954, considerando el número de células de *Perkinsus* por campo en el microscópio.

1-No infectado, no hay células.

2-De 1 a 10 células.

3-De 11 a 30 células.

4-De 31 a 100 células.

5-Más de 101 células.

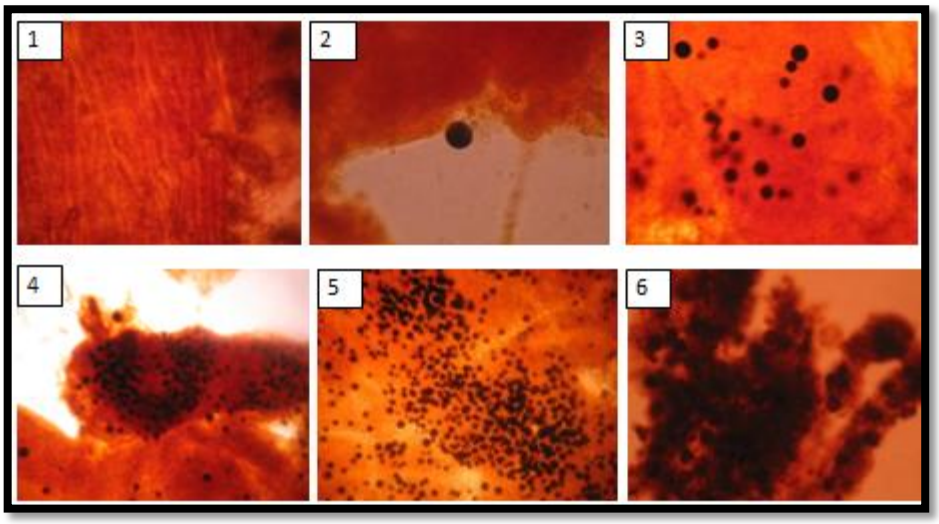

Fig. 5. Grados de intensidad de infección por *Perkinsus* en FTM. (A) Grado 1 (B) Grado 2 (C) Grado 3 (D) Grado 4 (E) Grado 5, (F) Falso positivo.

IV.2.3 Análisis Histopatológico

Para el diagnóstico por histología fue necesario remover cada ostión de su concha y realizar un corte transversal del cuerpo blando de aproximadamente 5 mm. El corte incluyó manto, glándula digestiva, riñones, gónada y branquias (Fig. 6).

Cada corte se colocó en un casete histológico y se fijó en solución Davidson en una relación de volumen de 1:5 (ANEXO 2). La fijación se hizo por 24 horas (Shaw y Battle, 1957).

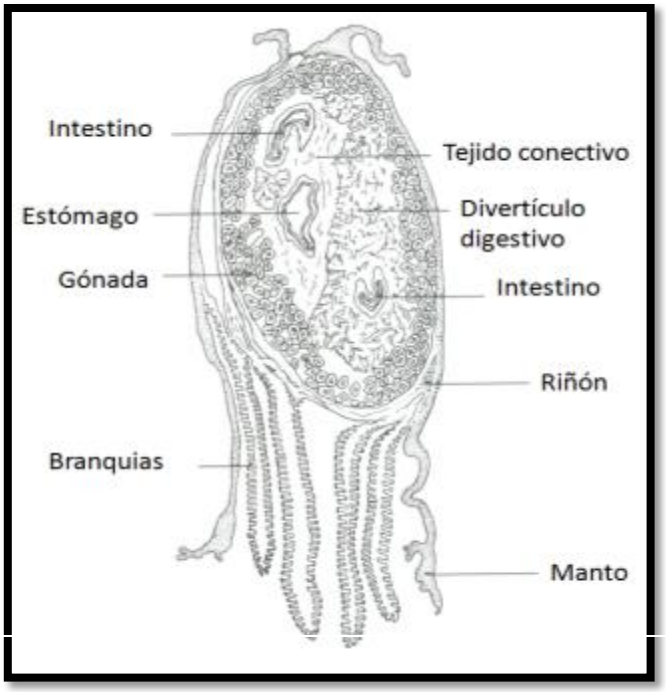

Fig. 6. Corte transversal del ostión donde se muestran los órganos internos.

La deshidratación se llevó a cabo en un procesador automático de tejidos (ANEXO 3), con cambios graduales de alcohol. Para la inclusión en parafina se utilizó un incluidor Leica EG 1160.

Los cortes histológicos se hicieron en un micrótomo a 5 micrómetros de grosor y se colocaron en un portaobjetos, que se tiñeron con la técnica de hematoxilina-eosina-floxina (Shaw y Battle, 1957) (ANEXO 4) y se montaron con resina.

Las laminillas histológicas se revisaron bajo un microscopio compuesto, para determinar la presencia y la intensidad de *P. marinus* en cada ostión. La revisión de las muestras se llevó a cabo con aumentos progresivos de 100 hasta 1000x.

IV.2.4 Evaluación y determinación de la infección

Para determinar la intensidad mediante la técnica histológica, se utilizó la siguiente escala (Cáceres-Martínez *et al*., 2010):

Infección ligera: cuando las etapas del parásito sólo se producen en el epitelio de algunas zonas del intestino y no hay infiltración de hemocitos ni destrucción de tejido; **Infección moderada:** cuando las etapas de los parásitos se producen en el epitelio de algunas zonas del intestino y en el tejido conectivo con infiltración focal de hemocitos; **Infección severa:** cuando la infiltración de hemocitos es generalizada y las etapas de desarrollo del parasito invade el intestino, tejido conectivo que rodea la glándula digestiva, gónadas, manto y las branquias.

Para cada localidad se obtuvo una prevalencia e intensidad a partir de cada una de las técnicas utilizadas. Debido a la variabilidad que se observó en los resultados y para un mejor diagnóstico se propuso una prevalencia final, la cual se obtuvo tomando como resultado positivo aquella muestra que diera positivo con dos técnicas sin importar la técnica, en los casos donde la histología mostró la presencia del parásito y también en los casos donde sólo se detectó por medio de PCR (Tabla 3).

Tabla 3. Combinaciones posibles de las tres técnicas y su resultado propuesto para la prevalencia final.

Casos	Tioglicolato	Histología	PCR	Resultado
1	+	+	+	+
2	+	+	-	+
3	-	+	+	+
4	+	-	+	+
5	+	-	-	-
6	-	-	+	+
7	-	+	-	+
8	-	-	-	-

IV.3 Extracción de ADN a partir de tejido branquial y manto

Se utilizaron muestras de tejido branquial y manto recolectadas de *C. corteziensis* y *C. gigas*. El tejido se colocó en un tubo de microcentrífuga estéril de 1.6 mL y se adicionaron 500 µL de amortiguador Tris EDTA pH 8.0 estéril, 100 µg de proteinasa K (BIOLINE) (10 mg/mL) y 10 µL de SDS 10 % (duodecil sulfato de sodio) y se incubó toda la noche a 56ºC.

Después de ese tiempo, se agregaron 500 µL del reactivo comercial DNAzol® siguiendo el protocolo del fabricante (Research Molecular Center). El tubo se dejó incubando tres horas a 56ºC agitando cada 30 minutos en un vórtex. Posteriormente, se centrifugó a 12,600 rpm por 6 min en una microcentrífuga (Eppendorf 5317C), para precipitar el tejido degradado.

Se transfirieron 800 µL del sobrenadante a un tubo estéril y se agregaron 200 µL de cloroformo 99 %, el cual se mezcló por 20 segundos y se centrifugó a 12, 600 rpm por 6 min. Posteriormente, se transfirieron 600 µL del sobrenadante a otro tubo estéril y se agregaron 800 µL de isopropanol 99.9 % (-20ºC) que se mezcló por inversión y se dejó en el congelador toda la noche para precipitar el ADN.

Una vez transcurrido el tiempo se centrifugó por 10 min a 14,000 rpm. El sobrenadante se eliminó por decantación y el ADN precipitado se lavó con 750 µL de etanol al 70 %. Después se centrifugó por 10 min a 14,000 rpm y nuevamente el sobrenadante se eliminó por decantación. El ADN precipitado se secó en una estufa a 56ºC para eliminar

los restos de etanol, por un tiempo no mayor a 30 minutos. Finalmente, el ADN se resuspendió en 300 µL de amortiguador Tris- EDTA pH 8.0 estéril.

IV.4 Preparación de la Reacción de PCR

IV.4.1 Preparación de la Reacción de PCR para *P. marinus* y OsHV-1.

Para la detección de *P. marinus* se utilizaron los oligonucleótidos NTS-1 F (CAC TTG TAT TGT GAA GCA CCC) y NTS-2 R (TTG GTG ACA TCT CCA AAT GAC) (Marsh *et al.*, 1995; Robledo *et al*., 1998, 1999), los cuales amplifican un fragmento de 307pb.

Para la reacción de PCR de OsHV-1 se utilizaron los oligonucleótidos C2 (5'-CTC-TTT-ACC-ATG-AAG-ATA-CCC-ACC-3') y C6 (5'-GTG-CAC-GGC-TTA-CCA-TTT-TT-3') (Arzul *et al.*, 2001C), los cuales amplifican un fragmento de 710 pb. Las mezclas de PCR se prepararon siguiendo los protocolos que se describen en las Tablas 4 y 5.

Tabla 4. Componentes y concentraciones finales para la detección de *P. marinus* por PCR.

Componente	Cantidad (µL)	Concentración final
Amortiguador 10X para *Taq*	2.5	1X (Tris-HCl 10 mm pH 8.5,KCl 50mm, MgCl2 1.5 mm)
dNTP´s 10 mm	0.5	200 µm
Inciador Perk NTS-1 10µ	1	1 µm
Inciador Perk NTS-2 10µ	1	1 µm
Taq polimerasa 5 U/µl	0.3	3 unidades por reaccion
Agua grado biología molecular	18.7	-
ADN genómico total	1	Variable

Tabla 5. Componentes y concentraciones finales para la detección de OsHV-1 por PCR.

Componente	Cantidad (µL)	Concentración final
Amortiguador 10X para *Taq*	1.25	1X (Tris-HCl 10 mm pH 8.5,KCl 50mm, MgCl2 1.5 mm)
dNTP´s 10 mm	0.25	200 µm
Mg Cl2 (50 mm)	0.25	
C2	0.5	1 µm
C6	0.5	1 µm
Taq polimerasa 5 U/µl	1.125	1.5 unidades por reaccion
Agua grado biología molecular	8.625	-
ADN genómico total	1	Variable

En todas las reacciones se incluyó un control positivo de ADN genómico de tejido de ostión infectado por *P. marinus* y ADN genómico de tejido de ostión infectado por OsHV-1, y un control negativo que consiste en agua estéril. La reacción de PCR se realizó en un termociclador Apollo (marca Continental Lab Products). Las condiciones de amplificación se describen en las Tablas 6 y 7.

Tabla 6.Condiciones de amplificación para la detección de *P. marinus* por PCR.

Paso	Temperatura	Tiempo	Evento
1	91°C	3 min.	Desnaturalización inicial
2	91°C	1 min.	Desnaturalización
3	58°C	1 min. 1 seg.	Hibridación de iniciadores
4	72°C	1 min. 2 seg.	Extensión
5	35 Ciclos (2, 3 y 4)	-	-
6	72°C	10 min.	Extensión final

Tabla 7. Componentes de amplificación para la detección de OsHV-1 por PCR.

Paso	Temperatura	Tiempo	Evento
1	94°C	2 min.	Desnaturalización inicial
2	94°C	1 min.	Desnaturalización
3	55°C	1 min.	Hibridación de iniciadores
4	72°C	1 min.	Extensión
5	35 Ciclos (2, 3 y 4)	-	-
6	72°C	5 min.	Extensión final

Los productos de PCR (10 µL) se detectaron por medio de la técnica de electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1.5 %. Se aplicó una carga de 100 voltios por 60 min y el gel se tiñó con una solución de bromuro de etidio (1 µg/ml). Se utilizó el marcador de peso molecular DNA Ladder II (Gene Choise) de 100 a 1,000 pb a una concentración de 1 µg/ µL.

IV.5 Análisis estadístico

Se compararon los datos de las tallas de los organismos entre localidades mediante un análisis de varianza de una vía. Además se realizó una regresión lineal para determinar la posible asociación de la talla con la presencia de *P. marinus* (SigmaPlot 11.0, Statistica).

Se determinó el porcentaje de efectividad de las técnicas de diagnóstico tomando en cuenta el porcentaje de ostiones infectados, con respecto al total de las muestras analizadas y el porcentaje aportado por cada técnica.

Debido a la naturaleza de los datos, se utilizó la prueba no paramétrica Q de Cochran para determinar la diferencia entre las técnicas. Esta prueba se utiliza para más de dos muestras relacionadas y proporciona un método para examinar si tres o más conjuntos igualados de frecuencias o porciones, difieren significativamente entre sí. Esta prueba es particularmente adecuada cuando los datos están en una escala nominal o se ha dicotomizado la información ordinal (Siegel, 1979). En este caso, se le asignó el valor numérico de 0 y 1 a la ausencia y presencia de *P. marinus* respectivamente, para cada técnica utilizada. La prueba estadística se aplicó con el programa estadístico Statistica 7.0.

El estadístico de prueba es:

$$Q = \frac{(k-1)\left[k\sum_{j=1}^{k} G_j^2 - \left(\sum_{j=1}^{k} G_j\right)^2\right]}{k\sum_{i=1}^{N} L_i - \sum_{i=1}^{N} L_i^2}$$

Dónde:

Q = estadístico chi cuadrada de la prueba Q de Cochran.
k = número de técnicas.
Gj = número total de casos positivos por cada técnica (j).
Li = número total de casos positivos de todas las técnicas (i).
N = número de muestras.

CAPÍTULO V. RESULTADOS

V.1 Parámetros Físico-Químicos

La temperatura y salinidad promedio en los sitios muestreados fue de 28.14± 1°C y 32.63± 4.0 UPS, respectivamente.

V.2 Análisis en fresco

La talla media de todos los organismos muestreados fue de 7.46±2.24.

En general, para las nueve localidades estudiadas se encontraron erosiones branquiales en ostiones de todas las tallas, mismas que fueron similares en todos los sitios de muestreo (P <0.05). Las prevalencias más altas se obtuvieron en la localidad de La Reforma con una prevalencia del 100% en *C. corteziensis* y la más baja en la localidad de Yameto con una prevalencia del 66.66% en *C. gigas* (Fig. 7).

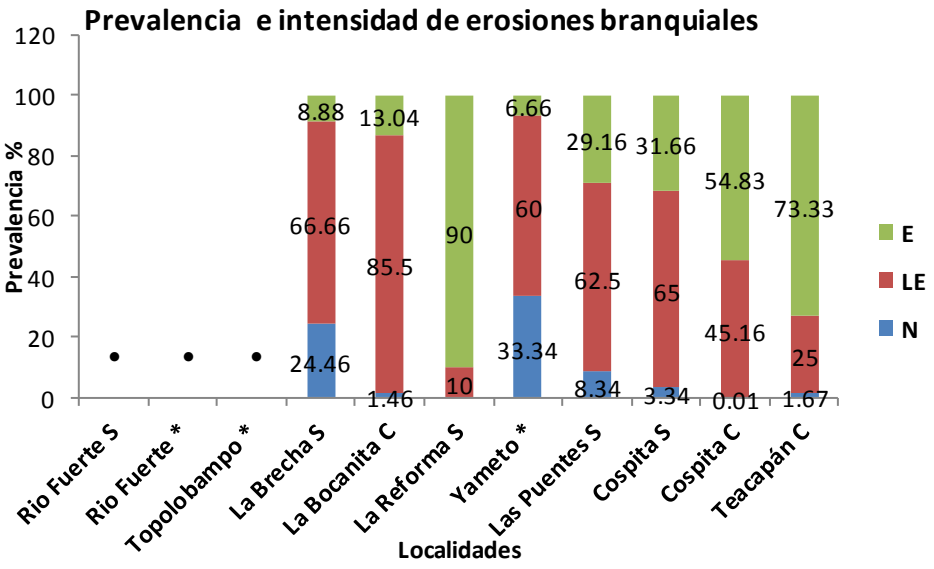

Fig.7. Prevalencia e intensidad de las erosiones branquiales observadas durante el análisis macroscópico en *C. corteziensis* de poblaciones silvestres y cultivadas del estado de Sinaloa (Octubre-Noviembre del 2010).S=silvestre, C= cultivo.*=*C.gigas*. Intensidad: E=Erosionada, LE=Ligeramente Erosionada y N =branquias Normales. • Sin analizar.

En el 3.67% de los organismos analizados se observó el manto retraído, ostiones flacos, una coloración amarillenta y obscura en branquias (Fig. 8).

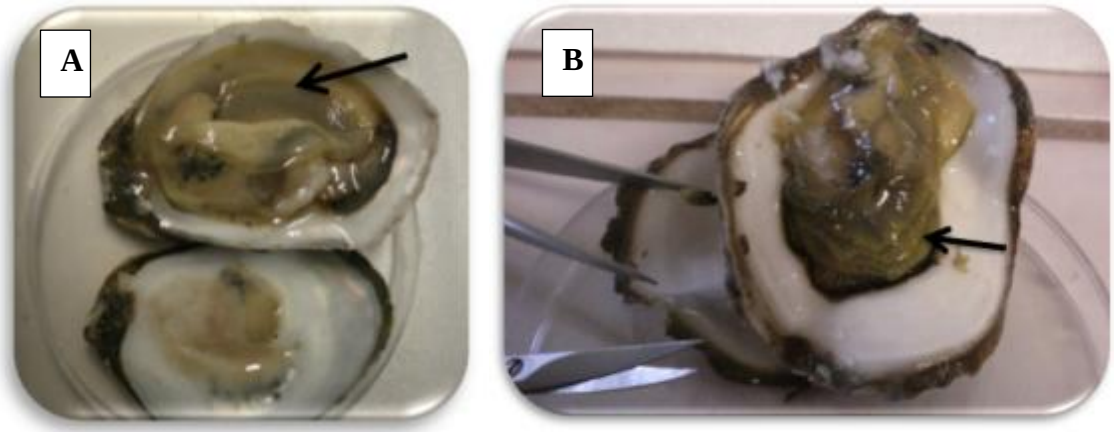

Fig.8. Análisis clínico de las muestras de ostión placer *Crassostrea corteziensis* con el cuerpo blando expuesto para la toma de muestras. Las flechas indican, erosión del tejido branquial (A) y pigmentación amarilla (B).

V.3 Incubación e intensidad de *P. marinus* en FTM

Los resultados de la incubación en FTM, se muestran en la Tabla 5. Únicamente se obtuvieron resultados positivos en *C. corteziensis*. Se observaron las células esféricas de color azul-marino características de las hipnosporas de *Perkinsus* sp. con un diámetro aproximado que va de 10 hasta 95 µm en los tejidos analizados (Fig.9).

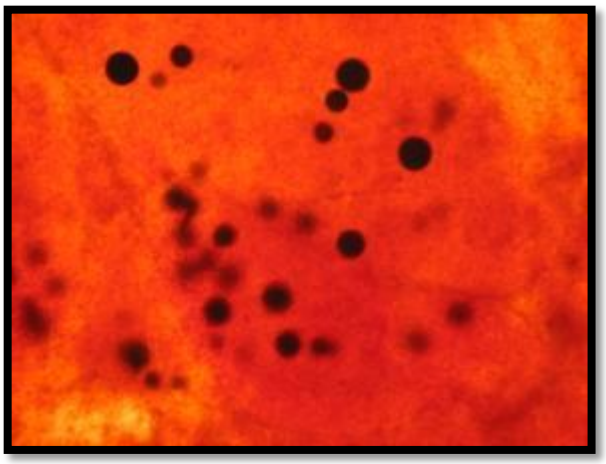

Fig.9. Preparación de tejido de manto infectado, cultivado en FTM donde se muestran las hipnosporas características de *Perkinsus sp*. después de ocho días de incubación.

En las muestras de las localidades de Río Fuerte y Topolobampo no se detectó la presencia de *Perkinsus* sp. La prevalencia más baja observada con esta técnica fue en la localidad de La Bocanita con un valor de 14.44%, y una intensidad promedio de 3.18. En la localidad de Las Puentes se detectó la prevalencia más alta con valor de 78.33% e intensidad promedio de 3.98 (Tabla 9).

Tabla 8. Prevalencias e intensidad de *Perkinsus sp*. en FTM

Localidad	Especies	Cultivo/silvestre	Prevalencia %	Intensidad promedio
1-Río Fuerte, Ahome	*C. corteziensis*	Silvestre	0	-
1-Río Fuerte, Ahome	*C. gigas*	Cultivo	0	-
2-Topolobampo	*C. gigas*	Cultivo	0	-
3-La Brecha,Guasave	*C. corteziensis*	Silvestre	30	3.48
4-La Bocanita, Guasave	*C. corteziensis*	Cultivo	14.44	3.18
5-La Reforma,Angostura	*C. corteziensis*	Silvestre	50	4.07
6-Yameto	*C. gigas*	Cultivo	0	-
7-Las Puentes	*C. corteziensis*	Silvestre	78.33	3.98
8-Cospita	*C. corteziensis*	Cultivo	35.48	3.73
8-Cospita	*C. corteziensis*	Silvestre	76.66	4.24
9-Teacapán	*C. corteziensis*	Cultivo	56.66	4.38

V.4 Análisis Histopatológico

Las intensidades de infección por *P.marinus*, fueron de ligeras (1) a severas (3). En infecciones ligeras se observó la presencia de trofozoitos y tomontes en el epitelio del intestino del ostión (Fig.10D). En infecciones severas se encontró infiltración de hemocitos y tomontes del parásito en branquias (Fig.10B). En el epitelio columnar ciliar del estómago se observaron trofozoitos fagocitados (Fig.11A), tomontes con trofozitos en palintomia (Fig.11B), trofozoitos inmaduros y trofozoitos maduros (Fig. 11C y D). También se observó deformación y destrucción del estómago donde se encontraron diferentes estadios del parásito (Fig.12). En tejido de manto se encontró infiltración hemocitaria y necrosis (Fig.13), también el parásito se observó en gónada de hembras (Fig.14 A y B) y machos (Fig.14 C y D).

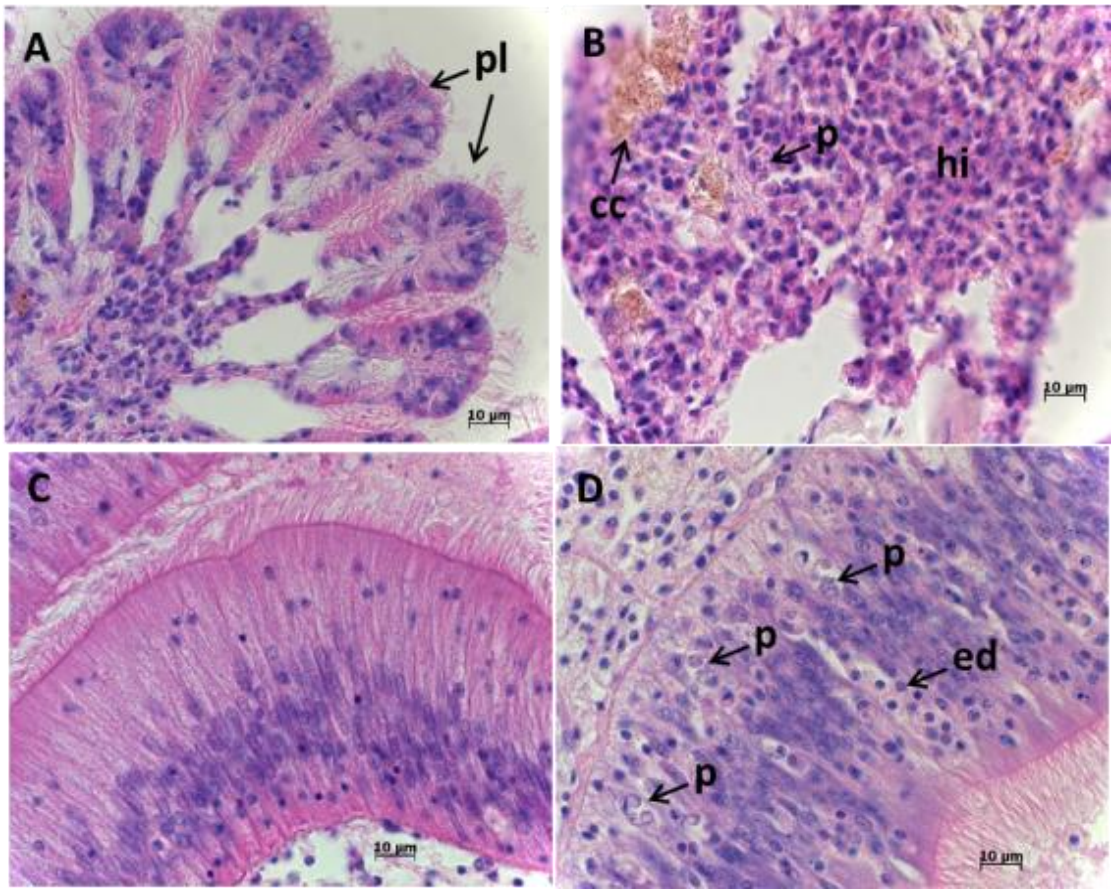

Fig. 10. Comparación de tejidos de *Crassostrea corteziensis* sanos e infectados por *Perkinsus marinus*. A. Branquia sana en donde se aprecia la arquitectura normal de las plicas (pl) y los cilios de las células apicales. B. Branquia infectada en donde se aprecia el parásito (p), células cafés (cc), destrucción de la arquitectura del tejido e infiltración hemocitaria (hi). C. Tejido epitelial ciliar que recubre el estómago de *C. corteziensis* sano, nótense los cilios apicales y la distribución uniforme de las células epiteliales columnares. D. Epitelio del estómago del hospedero infectado con el parásito, se observa un desarreglo de la arquitectura normal del epitelio, diferentes estadios del parásito (p) y hemocitos en diapédesis (ed). Tinción Hematoxilina-eosina/floxina.

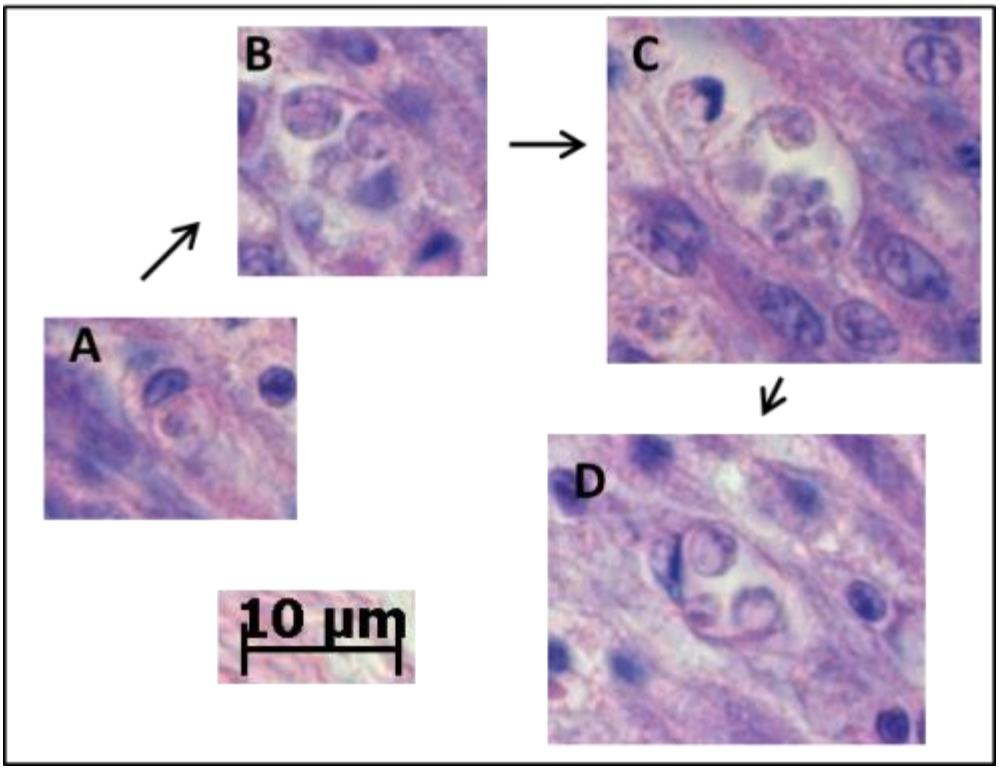

Fig. 11. Epitelio columnar ciliar del estómago de *Crassostrea corteziensis* infectado por *Perkinsus marinus*. En A se muestra un fagocito con un trofozoito en su interior. En B se encuentra el parásito en palintomía. C Fase de tomonte y en D se muestran los trofozoitos maduros característicos de *Perkinsus* sp. Tinción Hematoxilina-eosina/floxina.

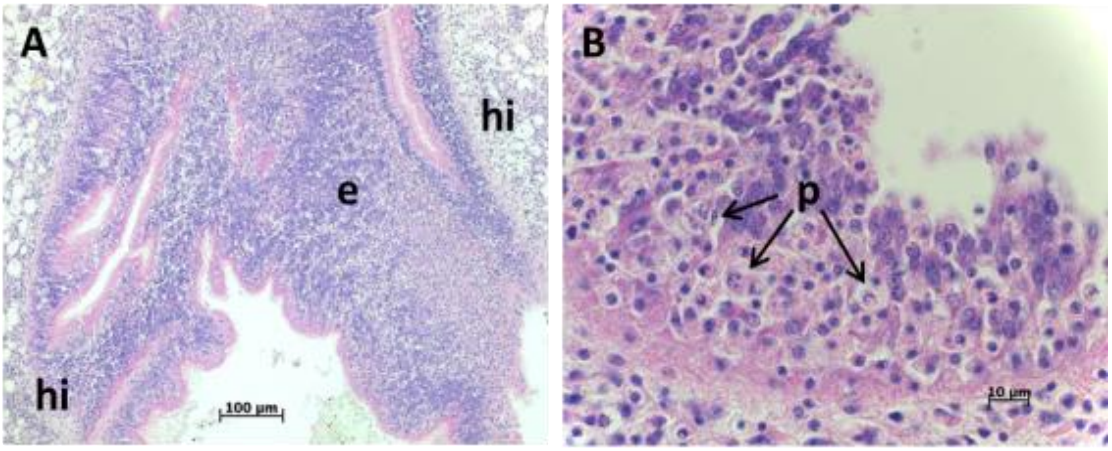

Fig. 12. Epitelio columnar ciliar del estómago de *Crassostrea corteziensis* en donde se aprecia una infección severa por *Perkinsus marinus*. En A se presenta una vista general del epitelio deformado (e) con infiltración hemocitaria (hi) que abarca al tejido conectivo contiguo. En B se aprecia un acercamiento del epitelio con diferentes estadios de desarrollo del parásito (p) y destrucción de células columnares. Tinción Hematoxilina-eosina/floxina.

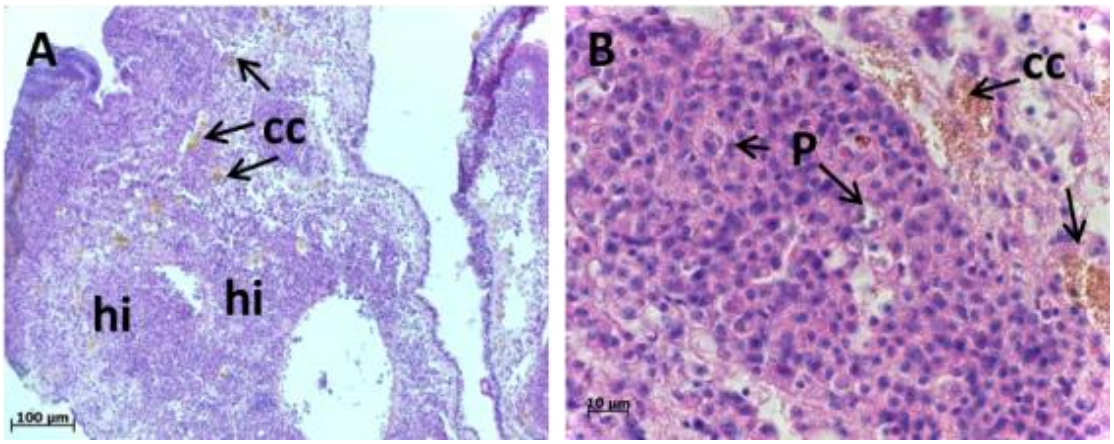

Fig. 13. Tejido del manto de *Crassostrea corteziensis* en donde se observa una infección severa por *Perkinsus marinus*. En A se presenta una vista general del manto con infiltración hemocitaria y necrosis (hi), así como células café (cc). En B se aprecia un acercamiento del tejido infectado con diferentes estadios de desarrollo del parásito (p) y destrucción de arquitectura normal del tejido así como células café. Tinción Hematoxilina-eosina/floxina.

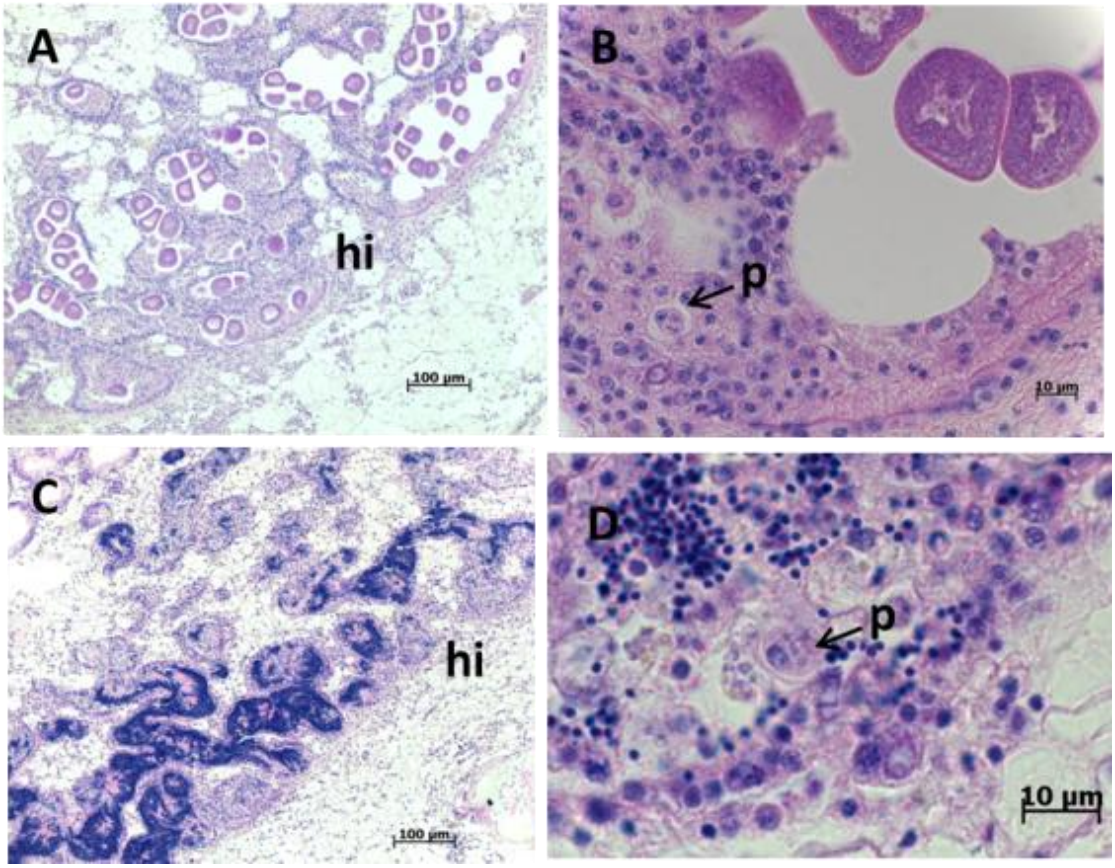

Fig. 14. Tejido gonádico de *Crassostrea corteziensis* en donde se aprecia una infección severa por *Perkinsus marinus*. En A se presenta una vista general de la gónada de una hembra con infiltración hemocitaria (hi). En B se aprecia un acercamiento del tejido infectado con el parásito (p) y destrucción de arquitectura normal del folículo. En C, se muestra una vista panorámica del tejido gonádico de un macho

con una infección severa por *P. marinus* en donde es evidente la infiltración hemocitaria. En D se muestra un acercamiento del tejido infectado con el parásito (p). Tinción Hematoxilina-eosina/floxina.

V 4.1 Intensidad de *Perkinsus marinus*

La intensidad promedio de *Perkinsus marinus* fue de 1.31 (Tabla 10). La intensidad más baja se detectó en organismos silvestres colectados en La Bocanita y la más alta en organismos de cultivo de Cospita.

Tabla 9. Intensidad de la infección en la técnica histológica.

Localidad	Especies	Cultivo/silvestre	Intensidad promedio
1-Rio Fuerte, Ahome	*C. corteziensis*	Silvestre	-
1-Rio Fuerte, Ahome	*C. gigas*	Cultivo	-
2-Topolobampo	*C. gigas*	Cultivo	-
3-La Brecha,Guasave	*C. corteziensis*	Silvestre	1.17
4-La Bocanita, Guasave	*C. corteziensis*	Cultivo	1
5-La Reforma,Angostura	*C. corteziensis*	Silvestre	1.25
6-Yameto	*C. gigas*	Cultivo	-
7-Las Puentes	*C. corteziensis*	Silvestre	1.24
8-Cospita	*C. corteziensis*	Cultivo	2
8-Cospita	*C. corteziensis*	Silvestre	1.09
9-Teacapan	*C. corteziensis*	Cultivo	1.43
Promedio total 1.31			

V.5 Detección de *P. marinus* por medio de PCR.

El análisis por PCR mostró la presencia de *P. marinus* en *C. corteziensis* más no en *C. gigas* (Tabla 11), (Fig.15).

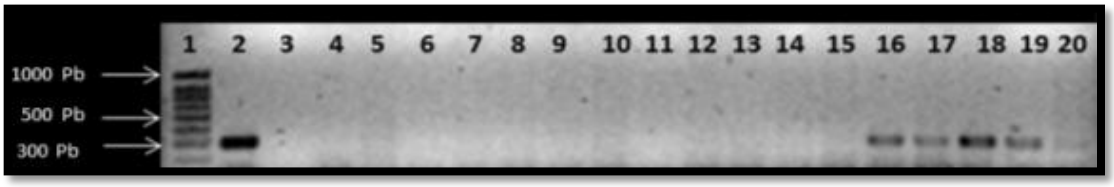

Fig.15. Detección de *P. marinus* por medio de PCR en *Crassostrea corteziensis* del estado de Sinaloa. Carril 1) Marcador de peso molecular de 0.1 a 1 Kpb (Gene Choice); 2) Control positivo *P. marinus*, 1 ng por reacción; 3) Control negativo; 4-15) muestras negativas de tejido fresco de branquia y manto; 16-20) muestras positivas de tejido fresco de branquia y manto.

Tabla 10. Localidades y especies analizadas para la detección de *Perkinsus marinus*.

Localidad	Especies	Cultivo/silvestre	N	Prevalencia %
1-Rio Fuerte, Ahome	*C. gigas*	Cultivo	50	ND
1-Rio Fuerte, Ahome	*C. corteziensis*	Silvestre	79	5.06
2-Topolobampo	*C. gigas*	Cultivo	30	ND
3- La Brecha	*C. corteziensis*	Silvestre	70	11.42
4-La Bocanita	*C. corteziensis*	Cultivo	90	1.11
5-La Reforma	*C. corteziensis*	Silvestre	60	25
6-Yameto	*C.gigas*	Cultivo	30	ND
7- Las Puentes	*C. corteziensis*	Silvestre	120	60.83
8-Cospita	*C.corteziensis*	Cultivo	31	19.25
8-Cospita	*C.corteziesis*	Silvestre	60	15
9- Teacapán	*C. corteziensis*	Cultivo	60	5

N. = Número de organismos analizados. ND=No detectado.

V.6 Detección de OsHV-1 por medio PCR.

Los primers utilizados para la detección de OsHV-1 mostraron su eficacia al producir resultados positivos con el material de referencia (ADN Genómico proveniente de ostiones infectados) utilizado.

No se encontró evidencia de la presencia de Herpesvirus OsHV-1 durante el análisis de las muestras procesadas de *C. gigas* y *C. corteziensis.* La Figura 16 presenta un ejemplo de los resultados obtenidos y la Tabla 11 la relación de las muestras.

Fig.16. Gel de agarosa al 1.5% para el análisis de productos de PCR en la detección del Herpesvirus del Ostión (OsHV-1) en dos especies de ostión colectadas en el estado de Sinaloa. Carril 1) Marcador de peso molecular de 0.1 a 1 Kpb (Gene Choice); 2) Control positivo (ADN genómico viral, 1 ng por reacción; 3) Control negativo; 4-15) Muestra negativas de tejido fresco de branquia y manto.

Tabla 11. Localidades y especies analizadas para la detección de OsHV-1.

Localidad	Especies	Cultivo/silvestre	N	Prevalencia
1-Rio Fuerte, Ahome	*C. gigas*	Cultivo	50	ND
1-Rio Fuerte, Ahome	*C. corteziensis*	Silvestre	79	ND
2-Topolobampo	*C. gigas*	Cultivo	30	ND
3- Yameto	*C. gigas*	Cultivo	30	ND
3- Las Puentes	*C. corteziensis*	Silvestre	120	ND
4- Teacapán	*C. corteziensis*	Cultivo	60	ND

N. = Número de organismos analizados. ND =No detectado.

V.7 Distribución, prevalencia e intensidad de *Perkinsus marinus.*

Perkinsus marinus fue detectado en siete de las nueve localidades estudiadas en el estado de Sinaloa (FIg.17). La prevalencia final se determinó mediante el análisis de los resultados obtenidos con las tres técnicas utilizadas, considerando como positivas aquellas en las que coincidieron dos de tres técnicas (FTM / Histología / PCR), también se tomaron como positivas los casos donde sólo la técnica de histología se observó el parásito y en los casos donde se tuvieron resultados positivos sólo por PCR.

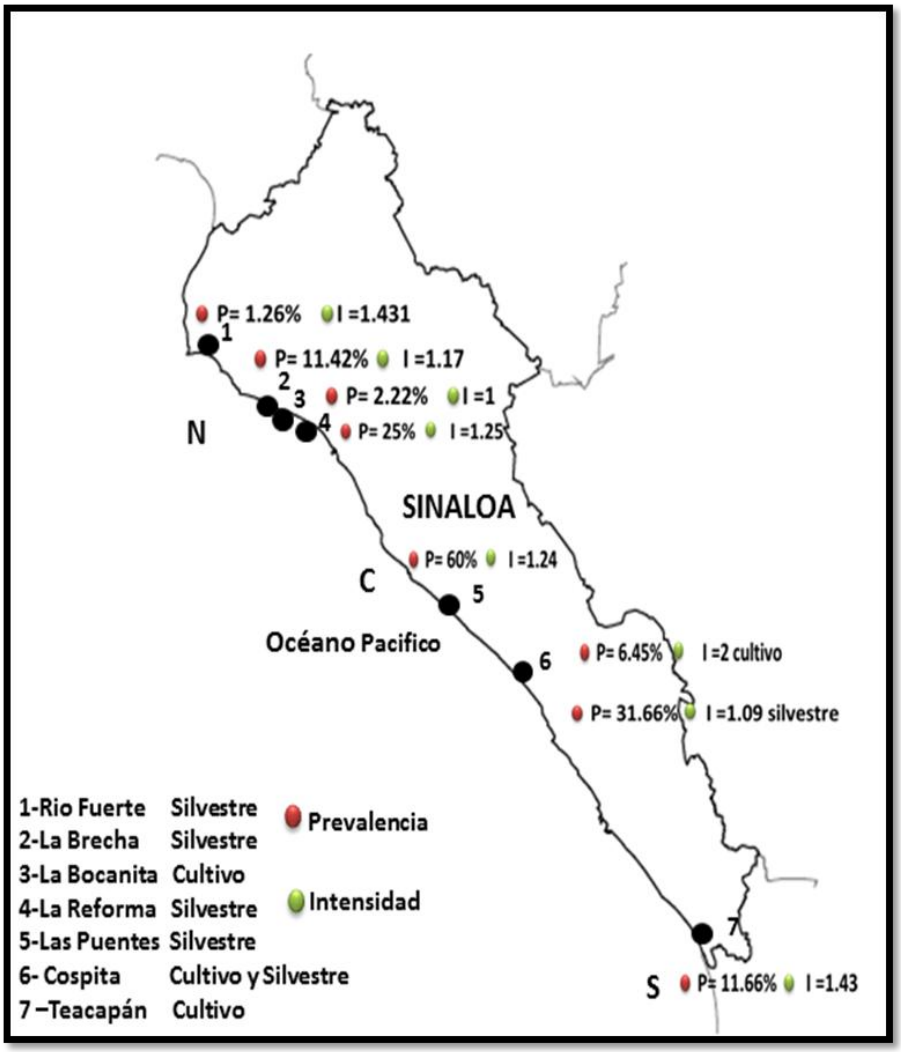

Fig. 17. Distribución, prevalencia e intensidad de *Perkinsus marinus* en *Crassotrea corteziensis* en Sinaloa. S: ostiones silvestres, C: ostiones de cultivo.

V.8 Comparación de las tres técnicas utilizadas para la detección de *P. marinus*

Se compararon las tres técnicas de diagnóstico utilizadas (FTM/ Histología / PCR) y como se mencionó anteriormente, sólo se tomaron como positivos los casos en los cuales se tenían dos resultados positivos sin importar la técnica, en los casos donde sólo la PCR fue positiva y en los que en histología, se mostró la presencia del parásito. Las muestras que resultaron positivas únicamente por la técnica de FTM, se consideraron negativas, las combinaciones obtenidas se muestran en la Tabla 12.

Tabla 12. Combinaciones de resultados obtenidos del análisis de las muestras procesadas con tres técnicas diferentes, donde se muestra el resultado definitivo (RD) y el porcentaje obtenido con cada una de las combinaciones encontradas.

Casos	Tioglicolato	Histología	PCR	RD	No total	% (n=682)
1	+	+	+	+	72	10.56
2	+	+	-	+	27	3.96
3	-	+	+	+	9	1.32
4	+	-	+	+	18	2.64
5	+	-	-	-	123	18.04*
6	-	-	+	+	8	1.17*
7	-	+	-	+	6	0.88
8	-	-	-	-	419	61.44
					Total	100.0

* Se recomienda repetir el análisis

El 20.67% del total de las muestras fue positivo a *P. marinus* (Fig.18). De éstas, el 83.69% fueron determinados por tioglicolato, 71.63% por histología y 84.40% por la técnica de PCR. Los porcentajes correspondientes fueron considerados como efectividad de la técnica (sensibilidad y especificidad). La prueba Q de Cochran mostró que entre las tres técnicas de diagnóstico para *P. marinus* hay diferencias altamente significativas (Q = 182.9796, P > 0.001) (Tabla 13). Sin embargo, al eliminar los falsos positivos de FTM y compararlos con los de PCR, no se encontraron diferencias significativas (Q =0.0285714***, P < 0.865772) entre estas dos técnicas (Tabla 14).

Tabla 13. Prueba Q de Cochran para las técnicas de diagnóstico de *Perkinsus marinus*.

Número de casos: 682, Q = 182.9796, gl = 2 P > 0.001			
Técnica	Suma	% de 0	% de 1
Tioglicolato	243.0000	64.3950	35.63050
Histología	101.0000	85.19062	14.80938
PCR	119.0000	82.55132	17.44868

gl = grados de libertad.

Tabla 14. Prueba Q de Cochran para las técnicas de diagnóstico de *Perkinsus marinus* Tioglicolato y PCR.

Número de casos: 141, Q = 0.0285714, gl = 1 P < 0.865772			
Técnica	Suma	% de 0	% de 1
Tioglicolato	120.0000	14.89362	85.10638
PCR	119.0000	15.60284	84.39714

gl = grados de libertad

El FTM mostró tener un porcentaje de efectividad del 83.93. La técnica histológica presentó un porcentaje de efectividad del 71.84, siendo la técnica que mostró la efectividad más baja. La técnica PCR mostró un porcentaje efectividad del 84.65 siendo la técnica más efectiva.

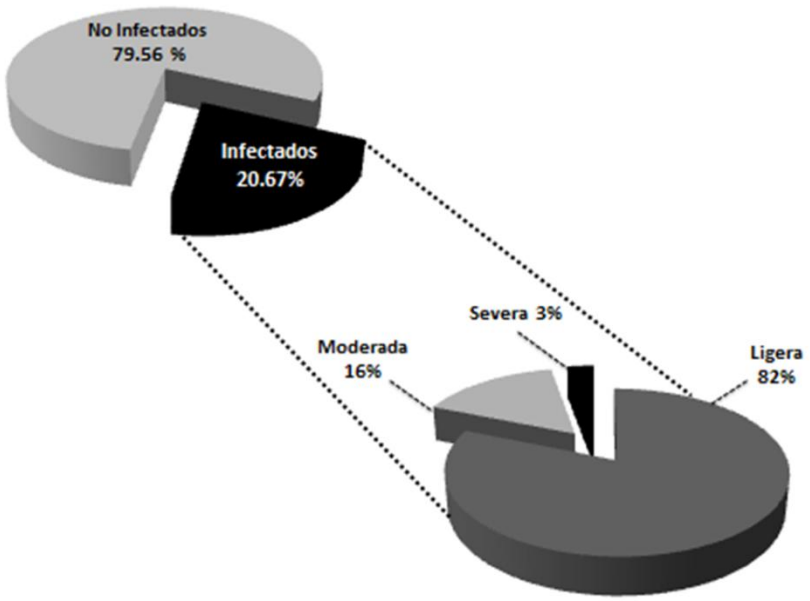

Fig. 18. Prevalencia e intensidad de *Perkinsus marinus* en el ostión de placer, *Crassostrea corteziensis*, en el estado de Sinaloa.

En la Fig. 19 se muestran los valores de prevalencia con respecto a temperatura y salinidad tomados en las zonas de muestreo, no existiendo una correlación de las prevalencias encontradas con respecto a estas variables (r = 0.0073, P = 0.05) (Fig. 20).

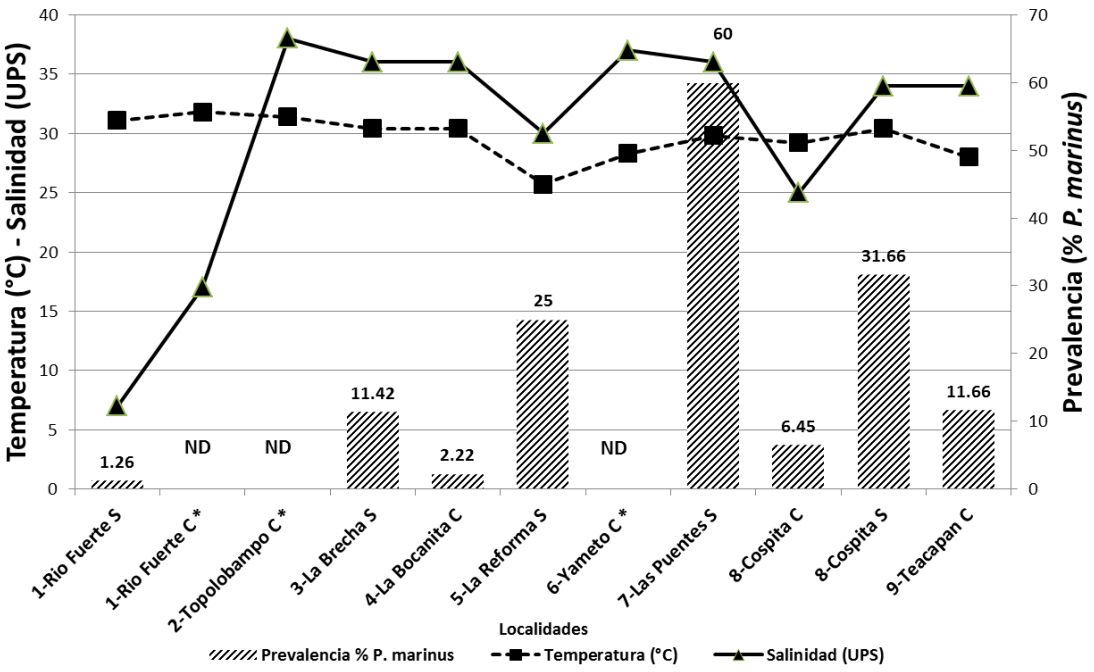

Fig. 19. Prevalencia de *Perkinsus marinus* en *Crassostrea corteziensis* S: silvestre, C: de cultivo *y Crassostrea gigas** con relación a los parámetros de temperatura y salinidad de las nueve localidades estudiadas del estado de Sinaloa. ND: No detectado.

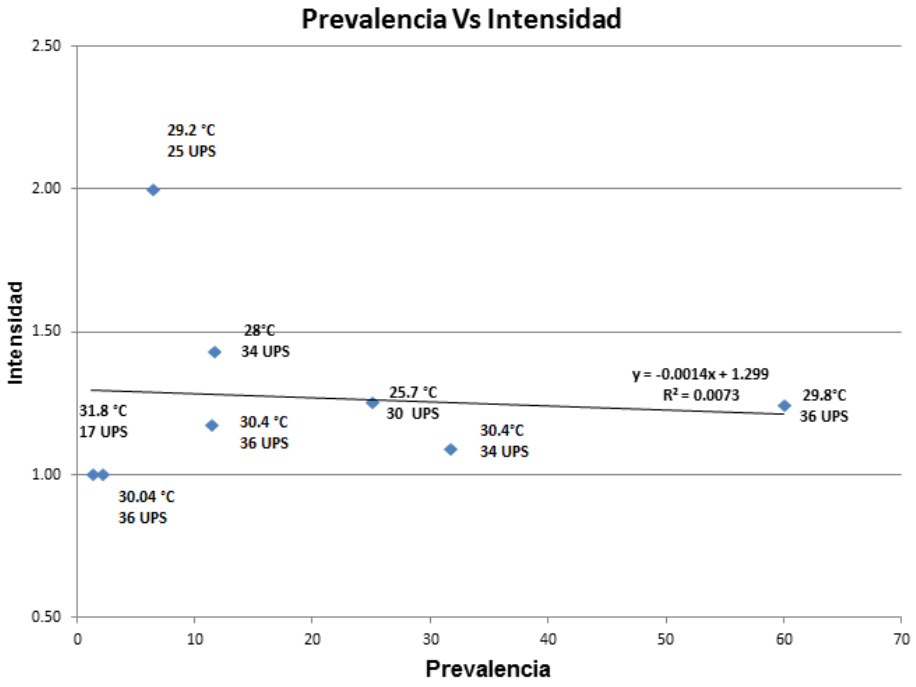

Fig. 20. Correlación entre prevalencia en intensidad de *P. marinus* con respecto a la temperatura °C y salinidad UPS.

Las tallas de *C. corteziensis* y *C. gigas* presentaron diferencias significativas, en la Tabla 16 se muestran las localidades en las que se encontró diferencias significativas (P = 0.05). Con respecto a la talla e intensidad de *P. marius* no se encontró una asociación de la intensidad con respecto a la talla de *C. corteziensis* (P =< 0.001).

Tabla 15. Comparación de tallas de *C. corteziensis* y *C. gigas*

Localidad	***C. corteziensis***	**Talla media**	**Localidad**	***C. gigas***	**Talla media**
Rio Fuerte	silvestre	6.5 bcd	Rio Fuerte	cultivo	9.5 a
La Brecha	silvestre	6.15 f			
La Bocanita	cultivo	5 cde	Topolobampo	cultivo	9.5 a
La Reforma	silvestre	5 f			
Las Puentes	silvestre	7.15 ab	Yameto	cultivo	5 b
Cospita	cultivo	7.7 a			
Cospita	silvestre	6.5 de			
Teacapán	cultivo	7 bc			

Letras iguales no hay diferencias significativas

CAPÍTULO.VI. DISCUSIONES

VI.1 *Perkinsus marinus*

El haber detectado a *P. marinus* en la mayor parte de las localidades estudiadas nos indica que el parásito está bien establecido en la zona. La mayor prevalencia encontrada fue en poblaciones silvestres (Las Puentes), misma que puede estar relacionada con el tiempo de exposición al parásito a la que está sujeta una población natural, mientras que, una población en cultivo solamente permanecerá en el ambiente en un período de aproximadamente 10 meses. Es decir, que si sabemos que el parásito se transmite horizontalmente, las probabilidades de infección aumentan mientras más tiempo de contacto entre ostiones infectados y no infectados exista. Sin embargo, este es un aspecto que debe dilucidarse a través de un muestreo más amplio.

Por otro lado, la intensidad fue ligeramente mayor en poblaciones de cultivo, probablemente asociadas con el estrés derivado de las operaciones propias del cultivo. En nuestro estudio no se encontró una asociación entre la talla y la presencia de *P. marinus*. En cualquier caso, hay que subrayar que este trabajo representa la línea base para estudios más detallados (fluctuaciones mensuales) y a través de períodos de tiempo, por lo menos bianuales, para que se obtenga información sobre la dinámica de la infección.

Tomando en cuenta las temperaturas puntuales registradas en este estudio, es difícil predecir las prevalencias esperadas de *P. marinus* en diferentes épocas del año, tal como se ha observado en *C. virginica* de la costa Este de Estados Unidos (Oliver *et al.* 1998), y en algunas regiones dentro del Golfo de México (Quick y Mackin 1971). En dichos casos se han detectado incrementos en la prevalencia durante los meses cálidos del año y una disminución en el invierno. Los factores físico químicos tienen gran influencia sobre la distribución del patógeno y está ampliamente reportado el efecto que tiene la salinidad y la temperatura sobre las infecciones con *P. marinus* así como de casos de mortalidades asociadas.

Las temperaturas registradas en éste estudio sobrepasan los 20 °C lo que, teóricamente, favorecería la proliferación del parásito. Lo anterior ha sido reportado por Chu y Green

(1989) quienes observaron que *P. marinus* mantenido en condiciones *in vitro*, proliferó a intervalos que van de 25-30 °C y su crecimiento se inhibió entre los 12-15 °C.

De acuerdo con la literatura (Burreson *et al*. 1994a) la salinidad ha sido considerada como el primer factor ambiental que controla la abundancia y distribución de *P. marinus*. Existen estudios que han documentado bajas prevalencias e intensidades del parásito en ostiones colectados a salinidades menores a 12 UPS comparados con ostiones colectados en altas salinidades (Mackin, 1956; Andrews, 1988 y Powell *et al*., 1992). La salinidad más baja registrada en este estudio fue de 7 UPS en donde se encontraron las prevalencia e intensidades más bajas y mientras que las mayores prevalencias se encontraron en salinidades de 34 a 36 UPS. Chu y Greene, (1989) mencionan que puede presentarse una disminución o inhibición en el crecimiento de *P. marinus* a salinidades por debajo de 10 UPS, lo que ayudaría a explicar los resultados de prevalencia obtenidos en el presente estudio y que también coinciden con los reportados para la bahía Chesapeake en 1985-1988 (Andrews, 1988; Burreson y Andrews, 1988) donde la sequía favoreció a la abundancia y distribución de *P. marinus.*

La ausencia de *P. marinus* en *C. gigas* es congruente con lo reportado en la literatura respecto a que *C. gigas* es más resistente a la infección que *C. corteziensis* y *C. virginica*. El reporte de *P. marinus* asociado con mortalidades de *C. gigas* cultivado en Sonora (Enríquez-Espinoza *et al.*, 2010), sugiere la realización de un estudio sistemático en diferentes épocas del año considerando un número representativo de localidades y de organismos de esta especie para confirmar la presencia o ausencia de *P. marinus* en *C. gigas*. En el presente trabajo se analizaron muestras de 30 a 50 ejemplares de *C. gigas* procedentes de tres localidades de tres lagunas costeras del norte y centro de Sinaloa y por los resultados obtenidos con relación a la distribución se tendría una probabilidad alta de detectar al parásito en caso de estar presente en *C. gigas.* En el trabajo realizado por Enríquez-Espinoza *et al.*, (2010) se reporta la presencia de *P. marinus* en un muestreo de tres localidades con un tamaño de muestra de 10 organismos realizado en Septiembre del 2006. Teóricamente es posible que *P. marinus* pueda detectarse en *C. gigas* en la región, pero poco probable que se presenten altas mortalidades debido al parásito.

Con relación a las erosiones branquiales encontradas en *C. corteziensis* y *C. gigas* mediante el análisis clínico es importante señalar, que estas erosiones no han sido asociadas a *P. marinus*. Macías-Montes de Oca (1998) reporta lesiones branquiales similares y adicionalmente, inflamación, necrosis branquial y en algunos casos células con núcleos picnóticos en organismos de *C. gigas* afectados por mortalidades en Bahía San Quintín, y en otras localidades de los estados de Sonora y Baja California Sur, estas alteraciones fueron asociadas a la "Enfermedad de la Necrosis Branquial por Virus" (GNV). Durante el año 2004 también se encontraron estas lesiones y por medio de microscopía electrónica de transmisión, se observó la presencia de bacterias asociadas al tejido infectado y también la presencia de un virus tipo Herpes dentro de las células del tejido branquial inflamado (Vásquez-Yeomans *et al*., 2004a). Sin embargo cabe señalar que en nuestro estudio no se detectaron estos virus (GNV por histología).

VI.2 Herpesvirus OsHV-1

El OsHV-1 se ha encontrado en larvas, semillas y juveniles de bivalvos (Farley *et al*., 1972; Friedman *et al*., 2005; Nicolas *et al.*, 1992 y Renault *et al*., 1994). Arzul *et al*. (2002) mencionan que el tejido conectivo de manto y branquia son los principales órganos para la detección de herpesvirus, sin embargo, en el análisis de las muestras no se detectó al Herpesvirus OsHV-1 por PCR en juveniles ni en adultos en *C. gigas* y *C. corteziensis* en el estado de Sinaloa durante los meses de Octubre y Noviembre del 2010, a pesar de que si se observaron branquias erosionadas, lo que nos puede indicar que el virus no estuvo presente en las muestras estudiadas, posiblemente porque las tallas más susceptibles (larvas, semillas y juveniles) no estuvieron disponibles durante el estudio, o por que el virus no sé encuentra en las zonas estudiadas. Sin embargo, también es posible que la infección sea mínima y que de acuerdo a las condiciones de la PCR no se haya obtenido suficiente ADN viral para poder ser detectado, o que durante el proceso de extracción de ADN genómico éste haya sido degradado. Por otro lado, estos resultados sugieren que las erosiones branquiales no necesariamente están asociadas con la presencia del OsHV-1.

La patogenicidad del virus ha sido demostrado experimentalmente en larvas axénicas de *C. gigas* (Le Deuff *et al.*, 1994; Le Deuff *et al.* 1996), sin embargo los adultos parecen ser menos sensibles a la infección causada por Hepervirus OsHV-1 en comparación con larvas, semillas y juveniles (Renault y Novoa, 2004). Esto ha sido demostrado por Arzul *et al*., (2002), quienes detectaron al OsHV-1 en ostiones asintomáticos. En cuanto a *C. corteziensis* no se tiene documentada la presencia del Herpesvirus OsHV-1 lo cual coincide con los resultados del presente estudio.

VI.3 Comparación de técnicas

Con respecto a las técnicas de diagnóstico utilizadas en este trabajo se determinó que para la detección confiable de *P. marinus* es recomendable el uso de dos técnicas, debido al porcentaje de error que de manera individual tiene cada una de ellas.

La Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE, 2009) menciona que para fines de diagnóstico de *P. marinus*, el FTM e histología tienen algunas limitantes, ya que el primero no es específico, el segundo es un método costoso y poco preciso y que la PCR, sólo se recomienda como prueba confirmativa una vez que el parásito haya sido observado por FTM o por histología. Tales recomendaciones por la OIE son poco claras.

En este estudio, nuestros datos indican que definitivamente para una evaluación de la presencia e intensidad de la infección, la técnica histológica es la más recomendable, ya que nos permite observar los daños y alteraciones en el tejido; su costo y realización son asequibles en función de la problemática sanitaria que representa la Perkiniosis. Sin embargo, el procedimiento histológico debe realizarse con todo cuidado para que la calidad de las preparaciones permita una observación correcta.

La técnica de PCR resultó ser la más sensible y específica de todas. Con esta técnica se obtuvo la efectividad más alta de un 84.65% esto se debe a que la técnica tiene la capacidad de detectar, teóricamente, una célula de *P. marinus* en 30 mg de tejido de ostión (OIE, 2009), pero no es posible determinar la intensidad de la infección, a menos de que se utilizará una PCR en tiempo real que permita cuantificar el ADN del parásito

en la muestra o una técnica de PCR cuantitativo En ambos casos, es necesario hacer la validación correspondiente utilizando como referencia la intensidad mediante la técnica histológica. Tampoco es posible corroborar casos positivos o negativos a menos de que se cuente con el apoyo de las otras técnicas utilizadas en el estudio o a menos de que se cuente con primers con controles internos no competitivos. Por todo lo anterior esta técnica es recomendada en estudios de presencia/ausencia del parásito en zonas de distribución conocida del mismo.

Por otro lado, la secuenciación de los fragmentos de ADN obtenidos por PCR de muestras positivas, nos permite determinar con toda precisión la identidad del parásito.

La hibridación *in situ* basada en la complementariedad de bases de los ácidos nucleicos es una de las técnicas que puede proporcionar un resultado confirmativo, la cual nos pudiera proporcionar la intensidad de la infección ya que permite localizar la zona donde está presente el parásito.

La técnica del FTM, aunque fácil de utilizar presenta el mayor riesgo de obtención de falsos positivos, por lo que esta debería considerarse sólo como última opción en zonas de distribución del parásito. El FTM establecido como el método estándar para la vigilancia ya que proporciona una alta sensibilidad, sin embargo esta técnica por si sola se considera poco recomendable por su poca especificidad, debido a que se han observado preparaciones con falsos positivos, que pudieran contener algunas especies de dinoflagelados que se tiñen con lugol de forma similar a las hipnosporas de *Perkinsus* sp. En este estudio esta técnica se recomienda en combinación con una confirmativa a nivel de especie. Con respecto a la intensidad estimada con esta técnica no se recomienda utilizarla, ya que los resultados en este estudio no coinciden con las intensidades observadas en el análisis histológico.

En general, importancia contar con controles positivos, independientemente de la técnica utilizada, ya que esto nos ayuda a disminuir la obtención de falsos resultados.

Es de suma importancia mejorar los criterios de recomendación que realiza la Organización Mundial de la Salud Animal (OIE), aunque el costo de alguna técnica parezca caro, ya que el beneficio es mucho mayor. Se debe tomar en cuenta si se cumple con las necesidades de un diagnóstico y descripción correcta para la detección de este parásito, ya que esto ayudaría a mejorar el control de la dispersión de este parásito.

VI.4 Conclusiones

- *Perkinsus marinus* está presente en lagunas del estado de Sinaloa.
- La prevalencia de *P. marinus* fue ligeramente mayor en las poblaciones silvestres de *C. corteziensis* que en poblaciones de cultivo.
- La intensidad de *P. marinus* fue ligeramente mayor en las poblaciones de cultivo de *C. corteziensis* que en poblaciones silvestres.
- No se detectó *P. marinus* en *C. gigas*.
- Las alteraciones histológicas y los estadíos de desarrollo de *P. marinus* en ostiones infectados es similar a la descrita para *C. virginica* en la costa Este de Estados Unidos y para *C. corteziensis* del estado de Nayarit.
- Para un diagnóstico completo de *P.marinus* es necesario emplear al menos tres tecnicas, de las cuales dos técnicas presenten resultados positivos.
- Para determinar la intensidad de la infección por *P. marinus* se recomienda la técnica de histología.
- Los resultados obtenidos con la técnica de PCR indican que el Herpesvirus OsHV-1 no fue detectado ni en *C. gigas* ni en *C. corteziensis*, en las localidades analizadas del estado de Sinaloa en los meses de Octubre y Noviembre del 2010.

VI1.5 Recomendaciones

- Una vez definida la distribución de *P. marinus* en el estado de Sinaloa es indispensable recomendar la implementación de medidas sanitarias para evitar que se transfieren del Golfo de México al Pacífico, así como entre los estados de Nayarit, Colima, Jalisco, Sinaloa y hacia la península de Baja California.

- Se recomienda realizar un tratamiento efectivo a los desechos de ostiones, tales como las conchas y carne, que disminuya el riesgo de dispersión de *P. marinus*.

- No se recomienda instalar zonas de cultivo para la especie de *C. corteziensis* en los sitios donde las prevalencias de las poblaciones silvestres fueron las más altas.

- Para evitar que las prevalencias e intensidades incrementen en las localidades de cultivo se recomienda disminuir la densidad de siembra y aplicar buenas prácticas de manejo.

- Ya sea por motivos de producción, investigación o fomento, todos los posibles movimientos deber ser respaldados por un certificado sanitario que indique la presencia o ausencia de *P. marinus* y Herpesvirus OsHV-1 y el estado sanitario general de los organismos.

- Para incrementar la capacidad de detección de los patógenos *P. marinus* y Herpesvirus OsHV-1 en el país y en particular la región noroeste de México es necesario generar un programa que incluya una evaluación científica, estandarización y validación de métodos, capacitación técnica con protocolos estrictos, desarrollo de protocolos de PCR que incluyan controles internos no competitivos.

CAPÍTULO VII. BIBLIOGRAFIA

Aguirre-Macedo, M.L., R.A. Sima-Álvarez, M.K. Román-Magaña, J.I. Güemez-Ricalde. 2007. Parasite Survey of the Eastern Oyster *Crassostrea virginica* in Coastal Lagoons of the Southern Gulf of Mexico. J. Aquatic Animal Health 19: 270-279 p.

Andrews, J.D., 1988. Epizootiology of the disease caused by the oyster pathogen *Perkinsus marinus* and its effects on the oyster industry. Am, Fish. Sot. Spec. PubI.18, 47-63.

Andrews, J.D., 1996. History of *Perkinsus marinus*, a pathogen of oysters in Chesapeake Bay 1950-1984. J. Shellfish Research. 15: 13-16 p.

Arzul, I., Renault, T., Thébault, A., Gérard, A. 2002. Detection of oyster herpesvirus DNA and proteins in asymptomatic *Crassostrea gigas* adults. Virus Research 84: 151–160.

Arzul, I., T. Renault., Lipart, C. 2001 a. Experimental herpes-like viral infections in marine bivalves: demonstration of interspecies transmission. Diseases Aquatic Organisms, 46: 1-6.

Arzul, I., Renault, T., Lipart, C., Davison, A.J. 2001c. Evidence for inter species transmission of oyster herpesvirus in marines bivalves. J. Gen. Virol., 82: 865-870.

Barber, B.J., 1996. Gametogenesis of eastern oyster, *Crassostrea virginica* (Gmelin,1971), and Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) in disease-endemic lower Chesapeake Bay. Journal of Shellfish Research 15:285-290.

Barber, B.J., Mann, R.1994. Growth and mortality of eastern oyster, *Crassostrea virginica* (Gmelin, 1791), and *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) under challenge from the parasite, *Perkinsus marinus*. Journal of Shellfish Research 13:109-114.

Barbosa-Solomieu, V., Degremont , L., Vázquez-Juárez, R., Ascencio-Valle, F., Boudry, P. Renault, T. 2005. Ostreid Herpesvirus 1 (OsHV-1) detection among three successive generations of Pacific oysters (*Crassostrea gigas*). Virus Research, 107(1): 47–56.

Barja, J. L. 2010. Virus en y de moluscos. En: *Foro Rec. Mar. Ac. Rías Gal*.
Rey-Méndez M., Fernández Casal J., Lodeiros C., Guerra A. (eds.) 12: 185-197 p.

Berthelin, C., Kallnar , K., Malhieu, M. 2000. Storage metabolism in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) in relation to summer mortalities and reproductive cycle (West Coast of France). Comp. Biochem. Physiol. B 125,359-369.

Bower, S.M. 2001. Synopsis of infectious diseases and parasites of commercially exploited shellfish: Assorted viruses detected in oysters and of unknown significance.http://www.pac.dfo-mpo.gc.ca/science/species-especes/shellfish coquillages/diseases-maladies/pages/assortvirusoy-eng.htm, (consultado en enero de 2011).

Brun, N.T., Boghen, A.D., Allard, J. 1999. Attraction of *Urastoma cyprinae* (Turbellaria: Urastomidae) to the eastern oyster *Crassostrea virginica*. Diseases Aquatic Organisms 37: 139- 144 p.

Burreson, E.M. 1993. Status of the major oyster diseases in Virginia-1992.A summary of the annual monitoring program.Mar.Res.Rept.93-5.Virginia Institute of Marine Science,Gloucester Pt.VA.

Burreson, E.M., Andrews, J.D.,1988. Unusual intensification of Chesapeake Bay oyster diseases during recent drought conditions. In: Proc Oceans779-802 pp.

Burreson, E.M., Sima-Alvarez, R., Vidal-Martínez, V.M., Aguirre-Macedo, M.L. 1994b. *Perkinsus marinus* (Aplicomplexa) as a potential source of oyster *Crassostrea virginica* mortality in coastal lagoons of Tabasco, México. Diseases of Aquatic Organisms 20:77-82.

Burreson, E.M., Ragone-Calvo, L.M., La Peyre, J.,Counts, F., Paynter, Jr. K. 1994a. Acute osmotic tolerance of cultured cell of the oyster pathogen *Perkinsus marinus* (Aplicompexa:Perkinsida).Comparative Biochemistry and Physiology.109A:575-582.

Cáceres-Martínez, J. A., Vásquez-Yeomans, R,. Del Río-Portilla, M. A. 2010. Mortality episodes of *Crassostrea gigas* cultured in northwest México associated to oyster herpesvirus. En Aquaculture 2010 Del 01 al 05 de marzo. San Diego, California, Estados Unidos. World Aquaculture Society.

Cáceres-Martínez, J. A., Vásquez-Yeomans, R. y García-Ortega, A. 2004. Episodios de mortalidad del ostión japonés *Crassostrea gigas* en Baja California y su relación con bacterias. Programa Nacional de Sanidad Acuícola y la Red de Diagnóstico. II (26): 1-3 p.

Cáceres-Martínez, J.A., Vásquez-Yeomans, R. 2003. Presence of giant polymorphic cells in *Crassostrea gigas* cultured in Bahia Falsa, Baja California NW México. J Shellfish Res 22:711–714.

Cáceres-Martínez, J.A., y Vásquez-Yeomans, R. 2010b.Herpesvirus del ostión (OsHV-1) en México. Primera reunión del Grupo de moluscos de la Red de Información e Investigación de los Laboratorios de Sanidad de Organismos Acuáticos. Departamento de Acuicultura, CICESE, Ensenada, Baja California, México, Enero 28 y 29,2010.

Cáceres-Martínez, J.A., Vásquez-Yeomans, R., Padilla-Lardizábal, G., Del Río-Portilla, M.A. 2008. *Perkinsus marinus* in pleasure oyster *Crassostrea corteziensis* from Nayarit, Pacific coast of México. Journal Invertebrate Pathology 99:66-73 p.

Cáceres-Martínez, J., Vásquez-Yeomans, R., Padilla Lardizábal, G. 2010. Parasites of the pleasure Oyster *Crassostrea corteziensis* cultured in Nayarit, Mexico. Journal of Aquatic Animal Health. 22: 141-151 p.

Cáceres-Martínez, J.A. 2002. Algunas Enfermedades Infecciosas en Moluscos. Boletín del Programa Nacional de Sanidad Acuícola y la Red de Diagnóstico. Año 5, Volumen 2, Número 18.

Cáceres-Martínez, J.A. 1997. Mussel fishery and culture in Baja California, México: History, present status, and future. En: Clyde l. Mackenzie, Victor G. Burrell, Aaron Rosenfield, Willis L. Hobart., Editores, "The History, Present Condition and Future of the Molluscan Fisheries of North and Central America and Europe. NOAA Technical Report NMFS 128 ". National Oceanic and Atmospheric Administration. 41-55 p.

Cáceres-Martínez, J.A. y Vásquez-Yeomans, R. 2008. La patología en moluscos bivalvos: principales problemas y desafíos para la producción de bivalvos en América Latina. En: A. Lovatelli, A. Farías e I. Uriarte (eds). Estado actual del cultivo y manejo de moluscos bivalvos y su proyección futura: factores que afectan su sustentabilidad en América Latina. Taller Técnico Regional de la FAO. 20-24 de agosto de 2007, Puerto Montt, Chile. FAO Actas de Pesca y Acuicultura. Roma, FAO. 12: 327-337 pp.

Cáceres-Martinez, J.A., Vásquez-Yeomans, R., y Padilla Lardizabal, G. 2007. *Perkinsus marinus* agente causal de la enfermedad de "Dermo" encontrado en el ostión de placer *Crassostrea corteziensis* del Pacífico mexicano. Boletín del Programa Nacional de Sanidad Acuícola y la Red de Diagnóstico. IV(40): 14-16 p.

Cáceres-Martínez, J.A., Vásquez-Yeomans, R. 2010. Presence of epibionts and herpesvirus in the lion-paw scallop Nodipecten subnodosus. En *Aquaculture 2010* Del 01 al 05 de marzo. San Diego, California, Estados Unidos. World Aquaculture Society.

Calvo, G.W., Luckenbach, M., Allen, Jr. S.K., Burreson, E.M., 1999. A comparative field study of *Crassotrea gigas* (Thunberg 1793) and *Crassostrea virginica* (Gmelin 1791) in relation to salinity in Virginia. J. Shellfish Res. 18, 465-473.

Calvo, G.W., Luckenbach M., Allen Jr. S.K., Burreson, E.M., 2001. A comparative field study of *Crassotrea ariakensis* (Fujita 1913) and *Crassostrea virginica* (Gmelin 1791) in relation to salinity in Virginia. J. Shellfish Research 20, 221-229.

Casas, S.M., Villalba, A., Reece, K.S. 2002. Study of perkinsosis in the carpet shell clam *Tapes decussatus* in Galicia (NW Spain). Identification of the etiological agent 28 and *in vitro* modulation of zoosporulation by temperature and salinity. Diseases of Aquatic Organisms. 50: 51-65 p.

Castillo-Durán, A, Chávez-Villalba, J., Arreola-Lizárraga, A., Barraza-Guardado, R. 2010. Crecimiento comparativo, condición y supervivencia de juveniles de los ostiones *Crassostrea gigas* y *Crassostrea corteziensis* cultivados en verano e invierno.Cienc.Mar.36:29-39.

Chávez-Romero, Y. A., Cáceres-Martínez, J.A., Vásquez-Yeomans, R.,. García-Ortega, A. M. (2011) Genetic characterization of ostreid herpesvirus associated with mortalities of pacific oyster *Crassostrea gigas* in northwestern México. En *2011 International*

Malacology Reunion Del 27 al 30 de junio. La Paz, Baja California Sur, México. Western Society of Malacologists.

Chávez-Villalva, J., Lopez-Tapia, M., Mazón-Suástegui, y Robles-Mungaray. 2005. Growth of the oyster *Crassostrea corteziensis* (Hertlein, 1951) in Sonora, México. Aquaculture Research 36:1337-1344 p.

Chomczynski, P., Mackey, K., Drews, R., Wilfinger, W., 1997. DNAzol_: a reagent for the rapid isolation of genomic DNA. BioTechniques 22, 550–553.

Chu, F.L.E. 1996. Laboratory investigations of susceptibility, infectivity and transmission of *Perkinsus marinus* in oysters. Journal of Shellfish Research. 15: 57-66 p.

Chu, F.L., Greene ,K.H. 1989. Effect of temperature and salinity on the *in vitro* culture of the oyster pathogen *Perkinsus marinus* (Apicomplexa: Perkinsea). Journal of Invertebrate Pathology. 53: 260-268 p.

Comps, M. 1988. Epizootic diseases of oysters associated with viral infections. In: Fisher WS (ed) Disease processes in marine bivalve molluscs. Spec Publ Am Fish Soc 18, Bethesda, MD, p 23–37.

Comps , M., Cochennec, N. 1993. A herpes-like virus from the European oyster *Ostrea edulis L.* J. Invertebrate Patholology 62: 201-203 p.

Comisión Nacional de Acuacultura y pesca CONAPESCA. 2010. Anuario estadístico de pesca y acuacultura 2010.

Enríquez-Espinoza, T.L., Grijalva-Chon, J.M., Castro-Longoria, R., Ramos-Paredes, J. 2010. *Perkinsus marinus* in *Crassostrea gigas* in the Gul of California. Diseases of Aquatic Organisms 89:269-273.

Ewart, J., Ford, S.E., 1993. History and impact of MSX and Dermo diseases on oyster stocks in the Northeast region. Northeast Regional Aquaculture Center fact sheet no. 200.

Farley, C.A., Banfield, W.G., Kasnic, J.R.G., Foster,W.S. 1972. Oyster herpes-type virus. Science, Wash. DC 178: 759-760.

Farley, C.A., 1976, *Ultrastructural observations on epizootic neoplasia and lytic virus infection in bivalve mollusks*. Prog. Exp. Tumor Res. 20: 283-294.

Farley, C.A., 1978. *Viruses and virus-like lesions in marine molluscs.* Mar. Fish. Rev. 40: 18-20.

Fernandez-Robledo, J.A., Lin-Zhuoer, Vasta-Gerardo, R. 2008.Transfeccion of the protozoan parasiste *Perkinsus marinus*. Molecular and Biochemical Parasitology 157:44-53.

Friedman, C.S., Estes, R.M., Stokes, N.A., Burge, C.A., Hargove, J.S., Barber, B.J., Elston, R.A., Burreson, E.M., Reece, K.S., 2005. Herpes virus in juvenile Pacific oysters *Crassostrea gigas* from Tomales Bay, California, coincides with summer mortality episodes. Diseases of Aquatic Organisms 63 (1): 33–41.

Góngora-Gómez, A., Hernández-Sepúlveda, J., Diarte-Plata, G., Zaraín-Herzberg, M. 2010.Panorama actual de la Ostricultura en Sinaloa. Primera reunión del Grupo de moluscos de la Red de Información e Investigación de los Laboratorios de Sanidad de Organismos Acuáticos. Departamento de Acuicultura, CICESE, Ensenada, Baja California, México, Enero 28 y 29,2010.

Hine, P.M., Wesney, B., Hay, B.E. 1992. Herpesvirus associated with mortalities among hatchery-reared larval Pacific oysters, *Crassostrea gigas*. Diseases of Aquatic Organisms12: 135-142.

Hine, P.M., and Thorne, T., 1997. Replication of herpes-like viruses in hemocytes of adult flat oysters *Ostrea angasi*: an ultrastructural study. Diseases of Aquatic Organism 29:189–196.

Hine, P.M., Wesney, B., Besant, P. 1998. Replication of herpes-like viruses in larvae of the flat oyster *Tiostrea chilensis* at ambient temperatures. Diseases of Aquatic Organism 32: 161-171.

Davison, J., Trus, B., Cheng, N.C., Steven, A., Watson, M., Cunningham, C., Le Deuff, R., Renault ,T. 2005.A novel class of herpesvirus with bivalve hosts. Journal of General Virology .86, 41–53.

Le Deuff, R.M., Renault ,T., Gerard, A.1996. Effects of the temperature on herpes-like virus detection among hatchery-reared larval Pacific oyster *Crassostrea gigas*. Diseases of Aquatic Organism. 24: 149-157 p.

Le Deuff, R.M., Nicolas, J.L., Renault, T., Cochennec, N.1994. Experimental transmisión of herpes-like virus to axenic larvae of Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.14: 69-72.

Mackin, J.G. 1956. *Dermocystidium marinun* and salinity.Proc. natn. Shellfish.Assoc. 46: 116-128.

Mackin, J.C., 1953. Incidence of infection of oyster by Dermocystidium in the Barataria area of Louisiana. Convention addresses, Natl Shellfish Ass 1951:22-35.

Maeda-Martínez, A.N. 2008. Estado actual del cultivo de bivalvos en México. En A. Lovatelli, A. Farías e I. Uriarte (eds). Estado actual del cultivo y manejo de moluscos bivalvos y su proyección futura: factores que afectan su sustentabilidad en América Latina.Taller Técnico Regional de la FAO. 20–24 de agosto de 2007, Puerto Montt, Chile. FAO Actas de Pesca y Acuicultura. No. 12. Roma, FAO. pp. 91–100.

Marsh, A.G., Gauthier, J.D., Vasta, G.R. 1995. A semiquantitative PCR assay for assessing *Perkinsus marinus* infections in the eastern oyster, *Crassostrea virginica*. J. Parasitology. 81: 577-583 p.

Meyers, J.A., Burreson, E.M., Barber, B.J., Mann, R.1991. Susceptibility of diploid and tripoid paficific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) and eastern oyster, *Crassostrea virginica* (Gmelin, 1791), to *Perkinsus marinus.* Journal of shellfish Research.10: 433-437.

Meyers, T.R. 1979. A reo-like virus isolated from juvenile American oysters *(Crassostrea virginica)*. J. Gen.Virol. 46: 203-212.

Navarro-Barrera, A.A., Cáceres-Martínez, J.A., Vásquez-Yeomans, R. y Padilla-Lardizabal, G. 2011. Distribution of *Perkinsus marinus* an histopatological alterations in natural and cultured populations of *Crassostrea corteziensis* in Nayarit, México. En *2011 International Malacology Reunion* Del 27 al 30 de junio. La Paz, Baja California Sur, México. Western Society of Malacologists.Navarro-Barrera Ananda Aracely. 2011. Distribución, prevalencia e intensidad de *Perkinsus marinus*, parásito del ostión de placer *Crassostrea corteziensis*, en el estado de Nayarit, México. Tesis Maestría en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California. México.66 pp.

Nicolas, J.L., Comps, M., Cochennec, N. 1992. Herpes-like virus infecting Pacific oyster larvae, *C. gigas.* Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol. 12: 11-13.

O'Farrell, C., La Peyre ,J.F, Paynter, K.T., Burreson, E.M. 2000. Osmotic tolerance and volume regulation in *in vitro* cultures of the oyster pathogen *Perkinsus marinus*. J. Shellfish Res. 19: 139-145 p.

Oliver, L.M., Fisher, W.S., Ford, S.E., Ragone-Calvo, L.M., Burreson, E.M., Sutto, E.B., Gandy, J.1998. *Perkinsus marinus* tissue distribution and seasonal variation in oysters *Crassostrea virginica* from Florida, Virginia and New York. Diseases of Aquatic Organisms 34:51-61.

Oprandy, J.J., Chang, P.M., Pronovost, A.D., Cooper, K.R., Brown, R.S., Yates, V.J. 1981. Isolation of viral agent causing hemopoietic neoplasia in the soft shell clam, *Mya arenaria.* J. Invertebrate Pathology. 38: 45-51.

Parra-Laca, Rocío. 2010. *Urastoma* sp. y *Perkinsus marinus* en los ostiones de importancia acuícola *Crassostrea virginica* y *Crassostrea corteziensis*, ¿Coevolución o transfaunación?. Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. Ensenada, Baja California. México. 82 pp.

Perkins, F.O. 1968. Fine structure of zoospores from *Labyrinthomyxa* sp. parasitizing the clam *Macoma baltica*. Chesapeake Sci. 9: 198-208 p.

Perkins, F.O. 1996. The Structure of *Perkinsus marinus* (Mackin, Owen and Collier, 1950) Levine, 1978 with Comments on Taxonomy and Phylogeny of *Perkinsus* spp. J. Shellfish Res. 15(1): 67-87 p.

Powell, E.N., Gautier, J.D., Wilson, E.A., Nelson, A., Fay, R.R., Brooks, J.M. 1992 Oyster disease and climate change. Are yearly changes in *Perkinsus marinus* parasitism in oysters (*Crassostrea virginica*) controlled by cycles in the Gulf of Mexico? Marine Ecology.13, 243-270.

Quick, J. A., Mackin, J. G. 1971. Oyster parasitism by *Labryrinthomyxa marina* in Florida . Florida Dept Nat Resources, Mar. Res. Lab. Prof. Pap. Ser. 13:1-55.

Ray, S.M.1966. A review of the culture method for detecting *Dermocystidium marinum*, with suggested modifications and precautions. Proc. Natl. Shellfisheries Assoc. 54, 55–69.

Rasmussen, L.P.D., 1986. Virus-associated granulocytomas in the marine mussel, *Mytilus edulis,* from three sites in Denmark. J. Invertebrate Pathology 48: 117-123.

Reece, K.S., D. Bushek, K.L. Hudson., Graves, J.E. 2001. Geographic distribution of *Perkinsus marinus* genetic strains along the Atlantic and Gulf coasts of the USA. Mar. Biol. 139: 1047-55 p.

Renault, T., Le Deuff, R.M., Lipart, C., Delsert, C., 2000a. Developement of a PCR procedure for the detection of a herpes-like virus infecting oysters in France. J. Virology Methods 88: 41–50.

Renault T., Le Deuff L.M., Chollet, B., Cochennec, N., Gérard, A. 2000b. Concomitant herpes-like virus infections in hatchery-reared larvae and nursery-cultured spat *Crassostrea gigas* and *Ostrea edulis.* Diseases of Aquatic Organism 42:173–183.

Renault, T., Cochennec, N., Le Deuff, R.M., Chollet, B. 1994a. Herpes- like virus infecting Japanese oyster (*Crassostrea gigas*) spat. Bull Eur Assoc Fish Pathol 14:64–66.

Renault, T, Le Deuff, L.M., Cochennec, N., Maffart, P. 1994b. Herpesviruses associated with mortalities among Pacific oyster, *C. gigas* in France comparative study. Rev Med Vet 145:735–742.

Renault, T, Lipart, C., Arzul, I. 2001a. A herpes-like virus infects a non-ostreid bivalve species: virus replication in *Ruditapes philippinarum* larvae. Diseases of Aquatic Organism 45:1–7.

Renault, T., Lipart, C. 1998, Diagnosis of herpes-like virus infections in oysters using molecular techniques. EAS Spec. Publ. 26: 235-236.

Renault, T., Novoa, B. 2004.Viruses infecting bivalve molluscs. Aquatic Living Resource. 17, 397-409.

Robledo, J.A., Marsh, A.G., Wright, A.C., Vasta, G.R. 1999. Nucleotide sequence variability in the nontranscribed spacer of the rRNA locus in the oyster parasite *Perkinsus marinus*. J. Parasitology 85 (4), 650–656.

Robledo, J.A., Gauthier, J.D., Coss, C.A., Wright, A.C., Vasta, G.R. 1998. Species specificity and sensitivity of a PCR-based assay for *Perkinsus marinus* in the eastern oyster, *Crassostrea virginica*: a comparison with the fluid thioglycolate assay. J. Parasitology 84: 1237-1244 p.

Ropert, M., Mazurié, J., Bedier, E., Le Coz, F., Solecchnik, P. 2008. Evaluation of the summer mortality risk factors in shellfish farming ecosystems. In: Samain, J.F., McCombie, H. (Eds), Summer mortality of Pacific oyster *Crassostrea gigas*-The Morest Proyect. Quae Editions, Versailles, France, pp.1-61.

Shaw, B.L, Battle, H.I. 1957. The gross and microscopic anatomy of the digestive tract of the oyster *Crassostrea virginica* (Gmelin).Can.J.Zool.35:325-347.

Siegel, S. 1979. Estadística no paramétrica aplicada a las ciencias de la conducta. Editorial Trillas. Quinta reimpresión. México D.F. 346 pp.

Soletchnik, P., Faury, N., Razet, D., Goulletquer, P. 1998. Hidrobiology of the Marennes-Oleron Bay. Seasonal indices and analysis of trends from 1978 to 1995. Hydrobiologia. 386:131-146.

Soniat, T.M. 1985. Chances in levels of infections of oysters by *Perkinsus marinus*, with special reference to the interactions of temperature and salinity on parasitism. Northeast Gulf Sci 7(2):171-174.

Vásquez –Yeomans R., García-Ortega M., Cáceres-Martínez J. 2010. Gill erosion and herpesvirus in *Crassostrea gigas* cultured in Baja California, Mexico. Diseases of Aquatic organisms. Vol. 89: 137–144.

Vásquez–Yeomans, R. 2006. Agentes patógenos asociados a las mortalidades del ostión japonés *Crassostrea gigas* cultivados en el noroeste de México. Tesis Doctoral, Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada.

Vásquez-Yeomans, R., Cáceres-Martínez, J.A., Figueras-Huerta, A. 2004b. Herpes-like virus associated with eroded gills of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* adults in México. J Shellfish Research 23:417–419.

Vásquez-Yeomans, R. y Cáceres-Martínez, J.A. 2004. Infecciones virales en moluscos. Programa Nacional de Sanidad Acuícola y la Red de Diagnóstico. I (25): 6-9 p.

Vásquez-Yeomans, R., Cáceres-Martínez, J.A. y. García-Ortega ,A. M. 2004.Herpevirus y mortalidades del ostión *Crassostrea gigas* en el Noroeste de México. Programa Nacional de Sanidad Acuícola y la Red de Diagnóstico. I (25): 10-11 p.

Villalba, A., Reece, K.S., Camino-Ordaz, M., Casas, S.M., Figueras, A. 2004. Perkinsosis in molluscs: A review. Aquatic Living Resources 17:411-432.

Villalba, A. (Ed). 2008. Workshop for the analysis of the impact of Perkinsosis to the European Shellfish Industry. Centro de Investigacións Mariñas, Conselleria de Pesca e Asuntos Marítimos da Xunta de Galicia, Vilanova de Arousa, Spain. Centro Tecnológico del Mar-Fundación CETMAR, Vigo, Spain. 164 pp.

ANEXO I.

Abreviaturas y siglas	
ADN	Ácido desoxiribonucléico
CESASIN	Comité Estatal de Sanidad Acuícola de Sinaloa
dNTP'	s 2´-deoxinucleosido 5´-trifosfato
ITS	Internal transcribed Spacer
Kb	Kilo bases
mg	microgramos
mg	miligramos
MgCl2	Cloruro de magnesio
min	minutos
µL	microlitro
mL	mililitro
mM	milimoles
NTS	Espaciadores no transcritos (Non transcribed Spacer)
º C	Grados centígrados
pb	pares de bases
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa (Polymerase Chain Reaction)
Pfc	Peso fresco de la carne
ppm	partes por millón
Pv	Peso de la valva
RFTM	Medio de cultivo liquido de tioglicolato
rpm	revoluciones por minuto
SDS	Dodecil Sulfato de Sodio
seg	segundo
Taq	Thermophilus aquaticus
TBE	Tris/Borate/EDTA

ANEXO II. Preparación de la solución fijadora Davidson.

- Solución Fijadora Davidson (para preparar 1 litro)
- Glicerina 100 ml
- Formaldehído 37% 200 ml
- Etanol 96% 300 ml
- Agua de mar filtrada 300 ml
- Ácido Acético 100 ml

El tiempo de fijación es de 24 a 48 horas (en una relación de 1:5). Después de transcurrido ese tiempo, y en caso de que no se continúe inmediatamente con la deshidratación, la muestra deberá colocarse en la solución Davidson conservante (solución que no contiene ácido acético) hasta su procesamiento.

ANEXO III. Técnica de deshidratación e inclusión en parafina.

- Técnica de Inclusión en Parafina
- Etanol 70% 1 hora
- Etanol 96% - I 2 horas
- Etanol 96% - II 2 horas
- Etanol 100% - I 2 horas
- Etanol 100% - II 2 horas
- Etanol 100% - Benceno 3 horas
- Benceno I 2 horas
- Benceno II 2 horas
- Benceno – Parafina 3 horas
- Parafina I 2 horas
- Parafina II 2 horas
- Total 23 horas
- Incluir en Parafina.

ANEXO IV. Técnica de Tinción de Hematoxilina-Eosina.

La técnica de tinción de Hematoxilina-Eosina es probablemente la tinción histológica más utilizada. Esta técnica permite demostrar claramente un enorme número de diferentes estructuras tisulares.

Esencialmente la hematoxilina tiñe al núcleo de la célula de un color azul a negro, con un buen detalle intranuclear; por otro lado, la eosina tiñe al citoplasma celular y a la mayoría de las fibras del tejido conectivo en variadas intensidades de rosa, naranja y rojo.

Desparafinación e Hidratación.

- Xileno I 10 min. *
- Xileno II 10 min. *
- Etanol 100% - I 1 min.
- Etanol 100% - II 1 min.
- Etanol 95% 1 min.
- Etanol 50% 1 min.
- Etanol 10% 1 min.
- Agua destilada

* El Xileno se debe de mantener a una temperatura entre 30ºC a 35ºC.

Tinción Hematoxilina-Eosina.

- Desparafinar las muestras hasta hidratar en agua.
- Hematoxilina 8 min.
- Enjuagar con agua corriente
- Etanol ácido 1 min.
- Enjuagar con agua corriente
- Agua destilada
- Carbonato de litio 2 min.
- Enjuagar con agua corriente
- Agua destilada
- Etanol 95% 1 min.
- Eosina 1 min.
- Etanol 95% - I min.
- Etanol 95% - II 1 min.
- Etanol 100% - I 1 min.
- Etanol 100% - II 1 min.
- Etanol 100% -
- Xileno I 5 min.
- Xileno II 5 min.

Los tiempos pueden variar dependiendo de la especie.

- Montar en resina sintética

ANEXO V

Soluciones

Extracción de ADN

- **Proteinasa K**

A 100 mg de liofilizado (48.40 u/mg) se le agregan 10ml de agua grado biología molecular estéril.

- **Etanol 70 %**

Para 50 mL mezclar 35 mL de etanol absoluto con 15 mL de agua.

Reacción de PCR

- **Iniciadores para *Perkinsus. marinus* y *Herpesvirus OsHV-1*.**

Se prepara una solución stock a una concentración de 100 μM, a partir de ésta, se elabora la solución de trabajo tomando 10 μl de iniciador más 90 μL de H2O grado biología molecular obteniendo una concentración de trabajo de 10 μM. Se usan 0.5 μl de la solución de trabajo para 25 μl de reacción de PCR.

- **Mezcla de dNTP´s**

Se colocan 10 μL de dATP 10 mM, dGTP 10 mM, dCTP 10 mM y dTTP 10 mM más 60 μL de H2O grado biología molecular.

Electroforesis

- **TBE IX**

Para una solución con volumen final de 500 mL, se agregan 450 mL de agua destilada más 50 mL de buffer TBE 10X.

- **Gel agarosa 1.5 %**

Para preparar un gel de agarosa al 1.5 % se pesan 0.75 g de agarosa y se afora con amortiguador TBE 1X, a un volumen final de 50 mL. La agarosa se disuelve por calentamiento.

ANEXO VI

Participación en congresos derivados del trabajo de tesis

Pineda-García T., Cáceres-Martínez J., Vázquez-Yeomans R. y Montoya-Rodríguez L.2011.Distribution, prevalence and intensity of *Perkinsus marinus* in *Crassotrea corteziensis* Sinaloa, Northwest Mexico. 44ª Reunión Annual de la Western Society of Malacologists y la XII Reunión Bienal Nacional de Malacología y Conquiologia, de la Sociedad Mexicana de Malacología A.C., La Paz B.C.S.