

TESIS DEFENDIDA POR
Ananda Aracely Navarro Barrera
Y APROBADA POR EL SIGUIENTE COMITÉ

Dr. Jorge Abelardo Cáceres Martínez
Director del Comité

Dr. Josué Álvarez Borrego
Miembro del Comité

Dra. Carmen G. Paniagua Chávez
Miembro del Comité

Dra. Rebeca Vásquez Yeomans
Miembro del Comité

Dra. Beatriz Cordero Esquivel
*Coordinador del programa de
posgrado en Ciencias en Acuicultura*

Dr. David Hilario Covarrubias
Rosales
Director de Estudios de Posgrado

15 de septiembre de 2011.

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y DE EDUCACIÓN SUPERIOR
DE ENSENADA**



**PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS
EN ACUICULTURA**

**Distribución, prevalencia e intensidad de *Perkinsus marinus*, parásito del
ostión de placer *Crassostrea corteziensis*, en el estado de Nayarit, México.**

TESIS

que para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
MAESTRO EN CIENCIAS

Presenta:

ANANDA ARACELY NAVARRO BARRERA

Ensenada, Baja California, México, septiembre de 2011.

RESUMEN de la tesis de **Ananda Aracely Navarro Barrera**, presentada como requisito parcial para la obtención del grado de MAESTRO EN CIENCIAS en Acuicultura. Ensenada, Baja California. Septiembre, 2011.

Distribución, prevalencia e intensidad de *Perkinsus marinus*, parásito del ostión de placer *Crassostrea corteziensis*, en el estado de Nayarit, México.

Resumen aprobado por:

Dr. Jorge Abelardo Cáceres Martínez

RESUMEN

El parásito *Perkinsus marinus* (Protozoa) fue recientemente detectado en el ostión de placer, *Crassostrea corteziensis*, durante un monitoreo sanitario en dos lagunas costeras del estado de Nayarit, México. Con el objetivo de determinar la distribución, prevalencia e intensidad de *P. marinus* en *C. corteziensis* del estado de Nayarit, comparar si la infección es similar a la descrita en el ostión del Este, *Crassostrea virginica* y comparar la efectividad de las técnicas de diagnóstico, se tomaron muestras en 6 localidades de 5 lagunas costeras, en comunidades naturales y de cultivo del ostión de placer. Se recolectaron 120 ostiones por localidad los cuales fueron trasladados al laboratorio para ser analizados en fresco. Se obtuvieron fracciones de tejido de branquia, manto y recto para su cultivo en el medio de fluido de Tioglicolato (FTM); adicionalmente, se tomó una muestra de los mismos tejidos que se fijaron en etanol para el análisis por medio de ADN con el uso de iniciadores específicos para la identificación del parásito. También se realizaron cortes de cada ostión para el diagnóstico por medio de histología convencional. Los resultados mostraron que *P. marinus* está presente en todas las lagunas estudiadas del estado de Nayarit. La prevalencia del parásito fue de 4.16% a 69.16%, mientras que su intensidad fue de ligera a severa. Los valores más altos de prevalencia e intensidad se registraron en las poblaciones de cultivo y fueron de 50 y 69.16%. La infección en *C. corteziensis* fue similar a la descrita en el ostión *C. virginica*. Para un diagnóstico correcto de *P. marinus* es necesario tener un resultado positivo en al menos dos técnicas o la visualización del parásito por medio de la técnica histológica en un área conocida de su distribución. En caso de un resultado positivo por PCR y negativo por las otras dos técnicas, el análisis debe ser repetido. La técnica más efectiva para el diagnóstico de *P. marinus* fue la histología con un 90.10% de efectividad. Se recomienda tomar medidas de bioseguridad para evitar la dispersión del parásito en la región.

Palabras clave: *Crassostrea corteziensis*, *Perkinsus marinus*, Dermo, ostión, parásito, enfermedades, moluscos, diagnóstico.

ABSTRACT of the thesis presented by **Ananda Aracely Navarro Barrera** as a partial requirement to obtain the MASTER OF SCIENCE degree in ACUACULTURE. Ensenada, Baja California, Mexico. September, 2011.

Distribution, prevalence and intensity of the parasite *Perkinsus marinus* from the pleasure oyster *Crassostrea corteziensis* in Nayarit, México.

The parasite *Perkinsus marinus* was recently detected in the pleasure Oyster, during a sanitary monitoring in two coastal lagoons of the state of Nayarit, México. To determine the distribution of *P. marinus* in the State of Nayarit and compare if infections follows a similar pattern to those described for eastern oyster *Crassostrea virginica* and to compare effectiveness of diagnostic techniques a sampling was carried out in natural and culture areas in 6 localities from 5 coastal lagoons. A sample of 120 oysters was taken per sampling site. The oysters were analyzed in fresh for external appearance and a fraction of rectum; gills and mantle were used for thioglycollate assay (FTM). Similar sample was fixed in ethanol for PCR analysis and the remained tissue was used for conventional histology. Results showed that *P. marinus* is present in all Nayarit' studied coastal lagoons. The prevalence of this parasite was from 4.16% to 69.16% while its intensity ranged from light to severe. Greatest prevalence and intensity values were recorded in cultured populations comparing to natural ones, and were 50 and 69.16%. The course of infection followed a similar sequence to those described to the eastern oyster, *Crassostrea virginica*. A correct diagnosis for *P. marinus* implicates at least two techniques or histology in parasite distribution area. In case of a positive PCR and negative by the other two techniques, the analysis must be repeated. The most effective technique for the diagnosis of *P. marinus* was histology with a 90.10% effective. It is recommended biosecurity measures to prevent the spread of the parasite in the region.

Keywords: *Crassostrea corteziensis*, *Perkinsus marinus*, Dermo, oyster, parasite, diseases, mollusc, diagnosis.

Dedicatorias

A Dios, por todo lo que me ha dado.

A mi padre Vicente Navarro Sánchez[†], de él aprendí a luchar por lo que se quiere alcanzar.

A mi madre Araceli Barrera Castro, agradezco su gran paciencia y amoroso apoyo y sus enseñanzas a mi vida.

A mi hermana María Fernanda, por su inmenso amor y consejos que me han ayudado a ser una mejor persona.

A mi hermano Vicente, por hacer mi vida más divertida y darle un toque especial a nuestro hogar.

A mi familia por su apoyo incondicional.

Agradecimientos

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

Al CICESE por brindarme el apoyo para realizar mis estudios.

Al instituto de Sanidad Acuícola A. C., por el apoyo otorgado para la realización de esta tesis.

A mi comité por su asesoría, disposición y aportación a esta tesis.

Dr. Jorge Cáceres Martínez

Dra. Rebeca Vásquez Yeomans

Dra. Carmen G. Paniagua Chávez

Dr. Josué Álvarez Borrego.

Al Dr. Jorge Cáceres Martínez por permitirme ser parte de su equipo de trabajo y por toda su valiosa ayuda en estos dos años y medio de mi vida.

A la Dra. Rebeca Vásquez Yeomans por todo su apoyo, asesoría, paciencia y aportación en esta etapa tan importante para mí.

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

Al Instituto Nacional de Pesca por contribuir a financiar este proyecto.

Al Comité Estatal de Sanidad Acuícola del Estado de Nayarit (CESANAY), en especial a la Oceanóloga Gloria Padilla Lardizábal.

A todo el Departamento de Acuicultura del CICESE, en especial a la Dra. Beatriz Cordero Esquivel por sus consejos y atenciones durante estos dos años y al Dr. Miguel Ángel del Río Portilla por su apoyo como jefe del Departamento de Acuicultura.

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 su apoyo técnico en el laboratorio y asesoría.

A la M. en C. Gissel Tinoco Orta, técnico del laboratorio de Germoplasma del CICESE, por sus consejos, su apoyo técnico y orientación.

A la Dra. Gretel Mendoza Almanza y a la M. en C. Carmen Elvira Vargas Peralta técnico del laboratorio de Genética del Departamento de Acuicultura del CICESE por su colaboración en la lectura de geles de PCR.

A las Dras. Marysabel Báez y María del Refugio González por su apoyo y asesoría estadística.

Al personal secretarial del CICESE, Srita. Bibiana Medina, Sra. Cecilia Loera y Sra. Varuni Arredondo.

A la M. en C. Rocío Parra Laca por su paciencia y por compartir tanto conmigo durante mis estudios.

A Carlos Cáceres Figueroa por su apoyo con mis muestras en el laboratorio.

A la Biol. Uvinaí Salgado Ramos por su amistad y su hermosa presencia en mi vida.

A la Biol. Mar. Eréndira Canales por su valiosa amistad, consejos y asesoría estadística. Al M. en C. César Guerrero por su valiosa aportación a mi trabajo.

A mis compañeros de generación, Lilian, Ceres, Claudia, Sergio, Fernando, Tzitziki y en especial a la pandilla patológica, mis chavos Jenniffer, Yosef y Tere por el tiempo que pasamos juntos.

A todas las personas que me han brindado su compañía y amistad a lo largo de la vida y de este periodo, pues con ustedes, he compartido comentarios, opiniones, desacuerdos, lágrimas, alegrías, fracasos y éxitos, aprendiendo algo en cada día compartido.

CONTENIDO

| | Página |
|---|---------------|
| Resumen español. | i |
| Resumen inglés. | ii |
| Dedicatorias. | iii |
| Agradecimientos. | iv |
| Contenido. | vi |
| Lista de Figuras. | viii |
| Lista de Tablas. | xi |
| | |
| CAPÍTULO I. Introducción. | 1 |
| | |
| I.1 Producción de ostión en México. | 1 |
| I.2 Cultivo de <i>Crassostrea corteziensis</i> en Nayarit. | 1 |
| I.3 Características de <i>Crassostrea Corteziensis</i> . | 3 |
| I.4 Descubrimiento de <i>Perkinsus marinus</i> y su introducción al Pacífico mexicano. | 6 |
| I.5 Características de <i>Perkinsus marinus</i> . | 9 |
| 1.5.1 Taxonomía. | 9 |
| 1.5.2 Ciclo de vida. | 11 |
| 1.6 Técnicas de Diagnóstico para <i>Perkinsus marinus</i> . | 13 |
| 1.6.1 Métodos de detección directa. | 13 |
| 1.6.2 Métodos de aislamiento e identificación. | 14 |
| | |
| CAPÍTULO II. Justificación, hipótesis y objetivos. | 16 |
| | |
| II.1 Justificación. | 16 |
| II.2 Hipótesis. | 17 |
| II.3 Objetivo general. | 17 |
| II.4 Objetivos particulares. | 17 |
| | |
| CAPÍTULO III. Materiales y métodos. | 18 |
| | |
| III.1 Zonas de cultivo. | 18 |
| III.2 Descripción de los muestreos. | 19 |
| III.3 Análisis en fresco. | 20 |
| III.4 Cultivo en Medio de Tioglicolato (FTM). | 21 |
| III.5 Diagnóstico por Histología. | 24 |
| III.6 Extracción de ADN de los tejidos de branquia, recto y manto. | 26 |
| III.7 Diagnóstico por PCR. | 27 |
| III.8 Análisis estadístico. | 29 |

CONTENIDO (continuación)

| | Página |
|---|---------------|
| CAPÍTULO IV. Resultados. | 30 |
| IV.1 Distribución y prevalencia de <i>Perkinsus marinus</i> . | 30 |
| IV.2 Intensidad de <i>Perkinsus marinus</i> . | 35 |
| IV.3 Detección de <i>Perkinsus marinus</i> por amplificación de la secuencia ITS. | 40 |
| IV.4 Análisis de la secuencia ITS de <i>Perkinsus marinus</i> . | 40 |
| CAPÍTULO V. Discusión, Conclusiones y Recomendaciones. | 42 |
| V.1 Discusión. | 42 |
| V.2 Conclusiones. | 49 |
| V.3 Recomendaciones. | 50 |
| CAPÍTULO VI. Bibliografía. | 51 |
| Apéndices. | 58 |

LISTA DE FIGURAS

| <i>Figura</i> | | Página |
|---------------|---|---------------|
| 1 | Cultivo en balsa de <i>Crassostrea corteziensis</i> , en Boca de Camichín, Nayarit (Comité Estatal de Sanidad Acuícola de Nayarit, 2009). | 2 |
| 2 | Cultivo empilotados de <i>Crassostrea corteziensis</i> , en Nayarit (Comité Estatal de Sanidad Acuícola de Nayarit, 2009). | 3 |
| 3 | Anatomía general interna de los ostiones (<i>C. virginica</i>) (Tomado y modificado de Galtsoff, 1964). | 5 |
| 4 | Ciclo de vida de los ostiones. 1) adultos macho y hembra, 2) ovocito libre, 3) espermatozoide, 4) huevo fertilizado, 5) desarrollo larval, 6) larva véliger temprana, 7) larva véliger tardía, 8) larva pedivéliger, 9) semilla (Goldsborough y Meritt, 2001). | 6 |
| 5 | Ciclo de vida de <i>Perkinsus marinus</i> en el interior del ostión del Este, <i>Crassostrea virginica</i> . Trofozoito inmaduro (1), trofozoito desarrollando su vacuola (3), trofozoito maduro (4), trofozoito en palintomia (división interna) (5, 6 y 7) (Tomado de Cáceres Martínez, 2002). | 12 |
| 6 | Ciclo de vida de <i>Perkinsus marinus</i> en vida libre. Trofozoito libre (1), trofozoito sin vacuoplasto (2), trofozoito con el tubo de descarga (3), trofozoito en palintomia (esporulación) (4-6), esporas libres (7) (Tomado de Cáceres Martínez, 2002). | 13 |
| 7 | Imagen en donde se muestran los puntos de muestreo de <i>Crassostrea corteziensis</i> incluyendo poblaciones silvestres (S) y de cultivo (C) en el Estado de Nayarit. | 19 |
| 8 | Escala relativa de Mackin (Ray, 1945). Detección de <i>Perkinsus marinus</i> en el FTM. (A) Nivel 1, no hay células de <i>P. marinus</i> , (B) Nivel 2, de 1 a 10 células, (C) Nivel 3, de 11 a 30 células, (D) Nivel 4, 31 a 100 células, (E) Nivel 5, más de 101 células. Muestras de ostiones del estado de Sinaloa, México. | 22 |

LISTA DE FIGURAS (continuación)

| <i>Figura</i> | | Página |
|---------------|--|---------------|
| 9 | Corte transversal del cuerpo blando del ostión para el diagnóstico por histología, indicado en las líneas paralelas (Tomada de Howard y Smith, 1983). | 24 |
| 10 | Corte transversal del ostión donde se muestran sus órganos internos (Tomada de Howard y Smith, 1983). | 25 |
| 11 | Mapa de Distribución de <i>Perkinsus marinus</i> en el Estado de Nayarit. Mostrando la prevalencia del parásito y su intensidad promedio por histología, en cada localidad estudiada. S, población silvestre; C, población de cultivo; P, Prevalencia; I, Intensidad media \pm desviación estándar. | 31 |
| 12 | Prevalencia e Intensidad de <i>Perkinsus marinus</i> en el ostión de Placer, <i>Crassostrea corteziensis</i> , en el Estado de Nayarit. | 34 |
| 13 | <i>Crassostrea corteziensis</i> infectado por <i>Perkinsus marinus</i> (A) Vista general del tejido conectivo que rodea la glándula digestiva mostrando infiltración hemocitaria generalizada (Ih). (B) Mayor aumento del tejido mostrando hemocitos infiltrados (Hi) por el parásito, en una infección severa. Tinción Hematoxilina-Eosina/Floxina. | 36 |
| 14 | <i>Crassostrea corteziensis</i> infectado por <i>Perkinsus marinus</i> (A) Vista general del epitelio del intestino (Ei). (B) Mayor aumento del tejido mostrando una infección severa donde se observan numerosos trofozoitos en diferentes estadios (dt). Tinción Hematoxilina-Eosina/Floxina. | 37 |
| 15 | <i>Crassostrea corteziensis</i> infectado con <i>Perkinsus marinus</i> . (A) Epitelio del estómago (Ee) invadido por el parásito mostrando una infección severa. (B) Tomonte (T) de <i>P. marinus</i> en el epitelio del divertículo digestivo. (C) Tomonte (T) en el tejido conectivo de la gónada. (D) Tomontes (T) mostrando diferentes estadios de trofozoitos en el tejido conectivo de la branquia. Tinción Hematoxilina-Eosina/Floxina. | 38 |

LISTA DE FIGURAS (continuación)

| <i>Figura</i> | | Página |
|---------------|---|---------------|
| 16 | Diferentes estadios de <i>Perkinsus marinus</i> en tejido conectivo y epitelio del intestino de <i>Crassostrea corteziensis</i> . (A) Tomonte conteniendo trofozoitos maduros (tm) con su vacuola, mostrando su forma típica de anillo. (B) Tomonte que contiene 8 trofozoitos de <i>P. marinus</i> . (C) Trofozoitos en palintomia (tp), división interior. (D) Trofozoito con su núcleo (N) y su vacuoplasto (Vp). Tinción Hematoxilina-Eosina/Floxina. | 39 |
| 17 | Detección de <i>Perkinsus marinus</i> en <i>Crassostrea corteziensis</i> por PCR con el uso de iniciadores para la región ITS. M) Marcador de peso molecular de 0.1 a 1 Kb (GeneChoice); 1) Control positivo (ADN genómico de <i>P. marinus</i> ; 2) Control negativo (agua estéril); 3-7) Muestra positiva de <i>P. marinus</i> . | 40 |

LISTA DE TABLAS

| Tabla | | Página |
|-------|--|--------|
| I | Especies de <i>Perkinsus</i> , sus hospederos y su distribución (Tomado y modificado de Villalba, 2008). | 10 |
| II | Escala de Mackin (Ray, 1954). | 22 |
| III | Componentes y concentraciones finales para la detección de <i>Perkinsus marinus</i> por PCR. | 27 |
| IV | Condiciones de amplificación para la detección de <i>Perkinsus marinus</i> por PCR. | 28 |
| V | Combinaciones de resultados obtenidos por las tres técnicas de diagnóstico utilizadas y su resultado definitivo. La última columna muestra el porcentaje de resultados positivos. n=720 ostiones analizados. | 32 |
| VI | Prueba Q de Cochran para las técnicas de diagnóstico de <i>Perkinsus marinus</i> . | 32 |
| VII | Secuencia ITS obtenida de <i>Perkinsus marinus</i> . | 41 |
| VIII | Resultado positivo (1) y negativo (0) dados por las técnicas de diagnóstico para la detección de <i>Perkinsus marinus</i> . | 64 |

Capítulo I

I. INTRODUCCIÓN

I.1 Producción de ostión en México

El cultivo de moluscos bivalvos, como el del ostión, es una actividad de relativo bajo costo de operación y de fácil desarrollo en esteros y costas. Para llevar a cabo la ostricultura no se requiere de infraestructura especializada o alimentación balanceada, debido a que los organismos filtran el alimento del ambiente. De igual manera, la producción es considerada de bajo impacto para el ambiente, además de que su alto valor nutritivo hace al ostión de gran valor para el consumo humano (CONAPESCA 2008).

La participación de la ostricultura con respecto a la pesquería nacional de ostión en el 2009 fue del 92.25%, con 38,974 toneladas de peso vivo. En el golfo de México se cultiva el ostión del Este, *Crassostrea virginica*, principalmente en los estados de Campeche, Tabasco, Tamaulipas y Veracruz. La producción en peso vivo es de 36,396 toneladas. En el Pacífico Mexicano se cultivan el ostión japonés, *Crassostrea gigas*, y el ostión de placer, *Crassostrea corteziensis* en los estados de Baja California, Baja California Sur, Sonora, Sinaloa y Nayarit. La producción de las dos especies es de aproximadamente 2, 578 toneladas de peso vivo (CONAPESCA, 2009).

I.2 Cultivo de *Crassostrea corteziensis* en Nayarit

Por su importancia económica, *C. corteziensis*, no solo soporta una pesquería regional, sino que también, como se mencionó anteriormente, se cultiva

comercialmente en el Estado de Nayarit, aunque también se han desarrollado cultivos experimentales de esta especie en los estados de Baja California Sur y Sinaloa (Chávez-Villalba *et al.*, 2005)

De los cinco municipios con litoral que tiene el Estado de Nayarit, es en Santiago Ixcuintla y San Blas donde actualmente se cultiva el ostión de placer. Dentro del municipio de Santiago Ixcuintla se localiza el Estero de Boca de Camichín. En esta zona operan tres cooperativas: Ostricamichín, Conchero de los Campos y José María Morelos. En el Estero de Pozo Chino, que también pertenece al mismo municipio, opera la cooperativa Ostioneros del Mar de Villa de Juárez.

El cultivo se realiza de manera artesanal por medio de dos técnicas: uso de balsas flotantes y empilotados fijos al fondo (Figuras 1 y 2). Los meses de captura de semilla son entre Mayo y Agosto y los de cosecha comienzan a finales de Marzo y principios de Abril (CESANAY, 2009).



Figura 1. Cultivo en balsa de *Crassostrea corteziensis*, en Boca de Camichín, Nayarit (Comité Estatal de Sanidad Acuícola de Nayarit, 2009).



Figura 2. Cultivo empilotados de *Crassostrea corteziensis*, en Nayarit (Comité Estatal de Sanidad Acuícola de Nayarit, 2009).

La producción de *C. corteziensis* se presenta como una buena alternativa de cultivo por ser una especie endémica, lo cual supone una adaptación a las condiciones naturales de nuestro país. Si bien el futuro del desarrollo de esta actividad puede ser promisorio, la presencia de parásitos y enfermedades pueden limitarlo. Estudios recientes de la carga parasitaria de *C. corteziensis* en dos lagunas costeras de Nayarit, revelaron la presencia de un protozoario parásito, *Perkinsus marinus* hasta ahora desconocido en el Pacífico de Norteamérica (Cáceres-Martínez *et al.*, 2008).

I.3 Características de *Crassostrea corteziensis*

El ostión de placer *C. corteziensis*, es un molusco bivalvo que pertenece a la Familia Ostreidae, del Orden Ostreoida, Subclase Pteriomorphia, Clase Bivalvia, dentro del Filum Mollusca. Se puede encontrar adherido a las raíces del mangle *Rhizophora mangle* o en el sustrato fangoso-arenoso de lagunas costeras. Su

distribución natural comprende desde el Golfo de California hasta Perú (Stuardo y Martínez, 1975).

Los órganos internos del ostión están cubiertos por el manto el cual está compuesto por tejido conectivo, vasos sanguíneos, fibras musculares y nervios. El manto se encuentra unido a las valvas, y es el responsable de la formación de la concha y del ligamento que mantiene unidas a las valvas. El músculo abductor se encuentra unido a ambas valvas y actúa en contra de la presión ejercida por el ligamento (Eble y Scro, 1996).

El sistema digestivo está formado por boca, esófago, estómago, glándula digestiva, intestino, recto y ano. Las branquias se extienden desde la boca hasta la proximidad del ano y tienen doble función, al encargarse de la alimentación y del intercambio gaseoso en el proceso de respiración (Eble y Scro, 1996). El sistema circulatorio de los ostiones es abierto y está constituido por la hemolinfa, la cual es bombeada por el corazón. Los hemocitos, que son las células circundantes en la hemolinfa, tienen la función de ser los mecanismos de defensa celular. La anatomía interna de los ostiones se muestra en la figura 3.

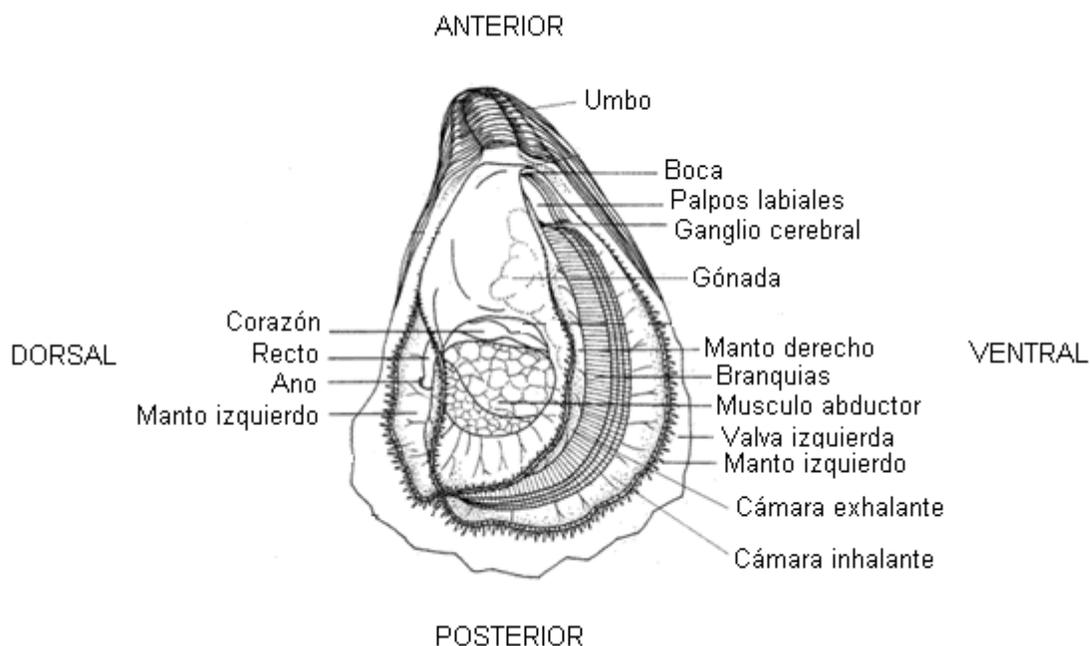


Figura 3. Anatomía general interna de los ostiones (*C. virginica*). Tomado y modificado de Galtsoff, 1964.

Los ostiones por lo general tienen sexos separados y son considerados como hermafroditas protándricos. Los ostiones son machos funcionales durante su primer desove, mientras que la mitad de ellos permanecen como machos para su segundo desove (Barnes, 1986). Los organismos adultos desovan en el agua de mar, por lo que presentan fecundación externa. Posteriormente, el huevo fecundado comienza a dividirse para formar el primer estadio larval. La larva trocófora es ciliada de vida libre. Después se desarrolla la larva llamada véliger, que posee una concha y posteriormente, la larva pedivéliger, la cual se fija al sustrato dando lugar al estadio de semilla. La semilla crece hasta desarrollarse en un ostión juvenil y finalmente en un organismo adulto (Figura 4) (Kennedy, 1996).

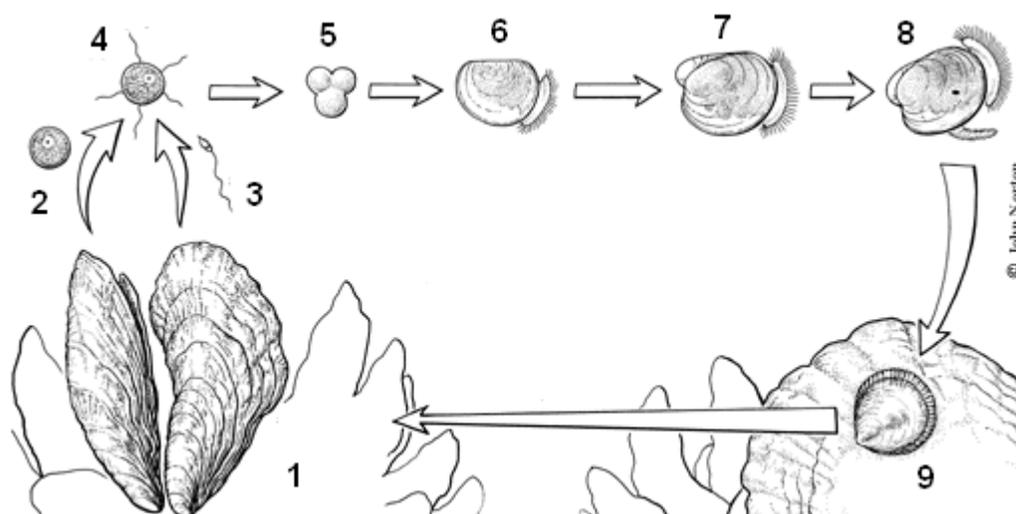


Figura 4. Ciclo de vida de los ostiones. 1) adultos macho y hembra, 2) ovocito libre, 3) espermatozoide, 4) huevo fertilizado, 5) desarrollo larval, 6) larva véliger temprana, 7) larva véliger tardía, 8) larva pedivéliger, 9) semilla. Tomado de Goldsborough y Meritt, 2001.

I.4 Descubrimiento de *Perkinsus marinus* y su introducción al Pacífico mexicano

De acuerdo con Ray (1996), a principios de los años 40, los productores de ostión del Este *C. virginica*, empezaron a detectar mortalidades inusuales en sus cultivos localizados al oeste del delta del Río Mississippi en Luisiana E.U.A. Las mortalidades que se registraron en algunas áreas, fueron entre el 75 y el 100% en ostiones de talla comercial, durante los meses de verano y principios de otoño. Los productores de ostión relacionaron las mortalidades con las descargas de aguas residuales y contaminantes al río por parte de compañías petroleras y una compañía productora de fertilizante. Para 1946, el problema se llevó a la Corte y se interpuso una demanda cercana a los 40 millones de dólares por parte de los productores en contra de dichas compañías. Como consecuencia de la demanda, los involucrados se organizaron en cuatro grupos de investigación donde se integraron expertos científicos para tratar de determinar la posible causa de las

mortalidades de los ostiones. Los grupos de investigación fueron los siguientes: Texas A&M Research Foundation (TAMRF) de la Universidad de Texas A&M, integrado por Sewell H. Hopkins, John G. Mackin y Winston Menzel; Gulf Oil Corporation, conformado por Albert W. Colliere, Wayne Magnitzky, Joe O. Bell y Sammy M Ray. Louisiana Wildlife and Fisheries Commission constituido por H. Malcome Owen, Robert M. Ingle, Fred Brigance, Lester W. Walters y William Tolbert y finalmente la Compañía Freeport Sulphur Company dirigido por el Dr. A. E. Hopkins.

En 1950, Mackin *et al*, describieron por primera vez a un organismo esférico desconocido que estaba presente en ostiones moribundos y ausente en ostiones saludables. Es así que se consideró, al organismo como el agente causal de las mortalidades de *C. virginica*, nombrándolo *Dermocystidium marinum* o “Dermo” (Mackin *et al.*, 1950; Ray, 1996). Un año más tarde de la descripción de *D. marinum*, se descubrió el medio de cultivo llamado “Medio de Cultivo en Fluido de Tioglicolato de Ray”, el cual permitió aplicar el postulado de Koch y demostrar que el parásito era el agente causal de las mortalidades de ostión en Luisiana, E.U.A (Ray, 1952).

D. marinum fue inicialmente considerado como un hongo, por su aparente similitud con algunos hongos parásitos de peces (Mackin *et al.*, 1950), pero análisis morfológicos y estructurales posteriores permitieron clasificarlo como un protozoario con el nombre de *Perkinsus marinus* (Perkins, 1976).

A partir del descubrimiento del parásito, en Luisiana (EUA), se han destinado importantes financiamientos económicos para continuar con la investigación, reducir el impacto de la enfermedad y evitar la dispersión en zonas libres de *Perkinsus* sp., como la inversión por más de 6 millones de dólares que se llevó a cabo, en 1996, por el National Oyster Disease Research Program de la National Oceanic and Atmospheric Administration (NOAA). Aunado a esto, diversos

proyectos de investigación han sido financiados para la investigación de *P. marinus*, sin contar las enormes pérdidas que han sufrido los productores que han tenido la mala fortuna de enfrentarse con la presencia de la enfermedad en sus cultivos (Ray, 1996).

En México, el primer registro de la presencia de *P. marinus* en *C. virginica* fue en 1994, en las costas del Golfo de México, en el estado de Tabasco (Burreson *et al.*, 1994) y es en 2006, que mediante un monitoreo sanitario en dos lagunas costeras del Estado de Nayarit, se tiene el primer registro de *P. marinus* para el Pacífico mexicano y detectado en una nueva especie, *C. corteziensis* (Cáceres-Martínez *et al.*, 2008). Un año más tarde, se detectó en el mismo hospedero en la Bahía San Jorge en el Estado de Sonora (ISA Instituto de Sanidad Acuícola A. C., 2009).

La presencia de *P. marinus* en el Pacífico Mexicano es el resultado de una transfaunación debido al movimiento de *C. virginica* del Golfo de México (Parra-Laca, 2010). Esto se apoya con los registros de dos introducciones de organismos de la costa Este de áreas endémicas de *P. marinus*, a la costa Oeste del territorio mexicano. Una de ellas fue alrededor de los años 80's, con la comercialización de ejemplares de *C. virginica* provenientes de la Laguna de Tamiahua en el Estado de Veracruz hacia Boca de Camichín en el Estado de Nayarit. Los ostiones se distribuyeron en locales comerciales a pie de playa y se mantuvieron dentro del agua para su mantenimiento. Por otro lado, los organismos muertos, así como los desechos de aquellos que se consumieron por los habitantes de esa área, se depusieron en la zona costera. Se sugiere que estas prácticas dispersaron al parásito que infectó a hospederos susceptibles. Este tipo de movilizaciones son comunes entre comerciantes y aparentemente han ocurrido a lo largo del tiempo (Cáceres-Martínez *et al.*, 2008; Padilla-Lardizábal com. per).

El segundo registro fue en el año 2005, con la introducción de un lote de *C. virginica* de las costas de Luisiana hacia la Bahía de San Jorge en Sonora. En

este caso, productores de Luisiana, con el fin de evitar la pérdida total de su producción, enviaron a Sonora reservas de ejemplares de ostiones que habían sobrevivido al huracán Katrina (Ramírez-Castillo com. per). Al tiempo, el parásito fue detectado en *C. corteziensis* de la zona. Por esta razón es fundamental el saber si *P. marinus* está establecido en todas las lagunas costeras del Estado de Nayarit y en los estados vecinos.

1.5 Características de *Perkinsus marinus*

1.5.1 Taxonomía

Perkinsus marinus pertenece al Orden Perkinsida, Clase Perkinsea, del Filum Apicomplexa (Perkins, 1976; Levine, 1978). Esta clasificación fue dada debido al resultado de observaciones ultraestructurales de *Perkinsus*, en las cuales se encontró la presencia de un complejo apical, una membrana subpelicular y la formación de microsporas y zoosporas, características similares que presenta el grupo de los Apicomplexa, aunque difiere del mismo porque las zoosporas de *Perkinsus* mostraron un flagelo y una vacuola anterior, característica que no se presenta en los Apicomplexa (Levine, 1978).

Mediante estudios de biología molecular con base en la subunidad pequeña de ARN ribosomal (SSUrRNA) se sugirió que el género *Perkinsus* está filogenéticamente más cercano al Filum Dinoflagellata que al Filum Apicomplexa (Googin y Barker, 1993).

Estudios adicionales de secuenciación de los genes de actina y tubulina apoyaron la inclusión de *Perkinsus* dentro del filum de los Dinoflagelados (Siddall *et al.*, 1997; Reece *et al.*, 1997). Actualmente, la taxonomía del género *Perkinsus* no es muy clara y da pie a considerables debates (Villalba, 2008). Dentro del género *Perkinsus* se han descrito nueve especies diferentes, de las cuales sólo seis son

consideradas especies válidas en la actualidad (Tabla I). *P. marinus* es la primera especie descrita (Ray, 1996).

Tabla I. Especies de *Perkinsus*, sus hospederos y su distribución (Tomado y modificado de Villalba, 2008).

| Espece de <i>Perkinsus</i> | Hospedero natural | Especies susceptibles | Distribución |
|--|--------------------------------|--|--|
| <i>Perkinsus marinus</i> | <i>Crassostrea virginica</i> | <i>Crassostrea gigas</i> , <i>C. ariakensis</i> <i>C. rhizophorae</i> , <i>C. corteziensis</i> | EUA, Hawaii, México, Cuba, Puerto Rico, Venezuela y Brasil. |
| <i>Perkinsus olsenii</i> (<i>P. atlanticus</i>) | <i>Haliotis ruber</i> | Almejas: <i>Ruditapes decussatus</i> , <i>R. philippinarum</i> , <i>Anadara trapezia</i> , <i>Austrovenus stutchburyi</i> , <i>Pitar rostrata</i> , <i>Protothaca jedgeensis</i> ; Ostiones: <i>C. ariakensis</i> , <i>C. hongkongensis</i> ; Ostras perleras: <i>Pinctada margaritifera</i> , <i>P. martensii</i> . Abulones: <i>Haliotis laevigata</i> , <i>H. scalaris</i> , <i>H. cyclobates</i> . | Australia, Nueva Zelanda, Korea, Japón, China, Portugal, España, Italia y Uruguay. |
| <i>Perkinsus chesapeaki</i> (<i>P. andrewsi</i>) | <i>Mya arenaria</i> | <i>Macoma baltica</i> , <i>M. mitchelli</i> , <i>Mercenaria mercenaria</i> , <i>Tagelus plebeius</i> , <i>Crassostrea virginica</i> . | Estados Unidos |
| <i>Perkinsus mediterraneus</i> | <i>Ostrea edulis</i> | | España |
| <i>Perkinsus qugwadi</i> | <i>Patinopecten yessoensis</i> | | Canadá |
| <i>Perkinsus honshuensis</i> | <i>Ruditapes philippinarum</i> | | Japón |

1.5.2. Ciclo de vida

La transmisión de *Perkinsus sp* ocurre directamente, sin hospederos intermediarios (Ray, 1954; Auzoux-Bordenave *et al.*, 1995; Chu, 1996; Blackbourn *et al.*, 1998). El ciclo de desarrollo de *P. marinus* dentro del hospedero se muestra en la figura 5, este inicia con la presencia de un trofozoito inmaduro de forma esférica, que al madurar aumenta su tamaño y desarrolla una vacuola excéntrica que da como resultado una forma de anillo. Dentro de la vacuola se puede observar un organelo libre llamado vacuoplasto. El trofozoito maduro inicia la fase de multiplicación por divisiones binarias sucesivas (ciclo de cariocinesis seguido de citocinesis), mediante la cual se obtienen de 8 a 16 células hijas. Cada célula hija es llamada trofozoito inmaduro y permanecen juntos rodeados por una pared dentro de la estructura llamada tomonte. Posteriormente, la pared del tomonte se rompe para liberar a los trofozoitos que se desarrollan hasta convertirse en trofozoitos maduros (Goggin y Lester, 1995; Blackbourn *et al.*, 1998). Estas células pueden ser liberadas del hospedero a través de las heces (Bushek *et al.*, 2002) o durante la muerte del animal (Ragone-Calvo *et al.*, 2003) e infectar a otro ostión.

En su forma libre, el trofozoito aumenta de tamaño, pierde el vacuoplasto y desarrolla una pared gruesa que se conoce como Hipnospora. Esta etapa del ciclo de vida se ha observado *in Vitro* cuando se incubaron tejidos infectados de los hospederos en el Medio de Tioglicolato (Ray, 1952). En agua de mar, la hipnospora empieza a dividirse por ciclos de cariocinesis y citocinesis, aunque también puede mantenerse inactiva por largos periodos de tiempo pero con la capacidad de zoosporular (Casas *et al.* 2002). La hipnospora desarrolla un poro con un tubo de descarga, mientras se produce la palintomia para formar numerosas zoosporas. Se ha estimado que se producen alrededor de 1000 a 2000 por cada hipnospora (Perkins, 1976). Las zoosporas son liberadas al ambiente cuando el poro de descarga se abre (Figura 6). Las zoosporas son uninucleadas, con diversas vacuolas en el citoplasma y son móviles, debido a la presencia de

dos flagelos laterales (Perkins y Menzel, 1966; Azevedo, 1989; Casas *et al.*, 2002). Las zoosporas pueden infectar a nuevos ostiones, encontrándose en el tejido branquial, manto o tejido intestinal. Presumiblemente las zoosporas pierden sus flagelos y complejo apical, convirtiéndose en trofozoitos inmaduros una vez que entran al hospedero (Cáceres-Martínez, 2002).

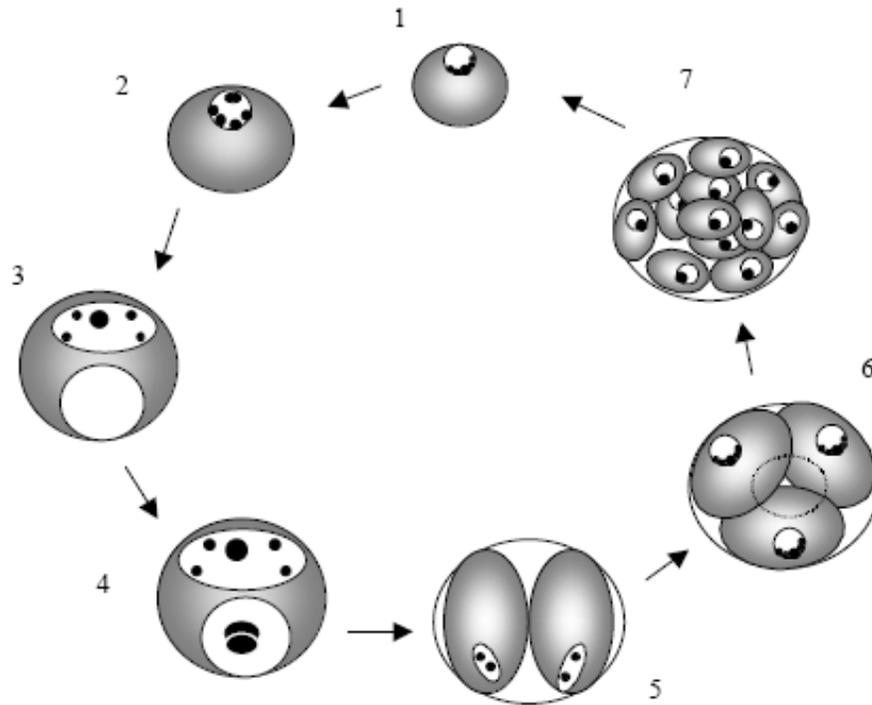


Figura 5. Ciclo de vida de *Perkinsus marinus* en el interior del ostión del Este, *Crassostrea virginica*. Trofozoito inmaduro (1 y 2), trofozoito desarrollando su vacuola (3), trofozoito maduro (4), trofozoito en palintomía (división interna) (5, 6 y 7) (Tomado de Cáceres Martínez, 2002).

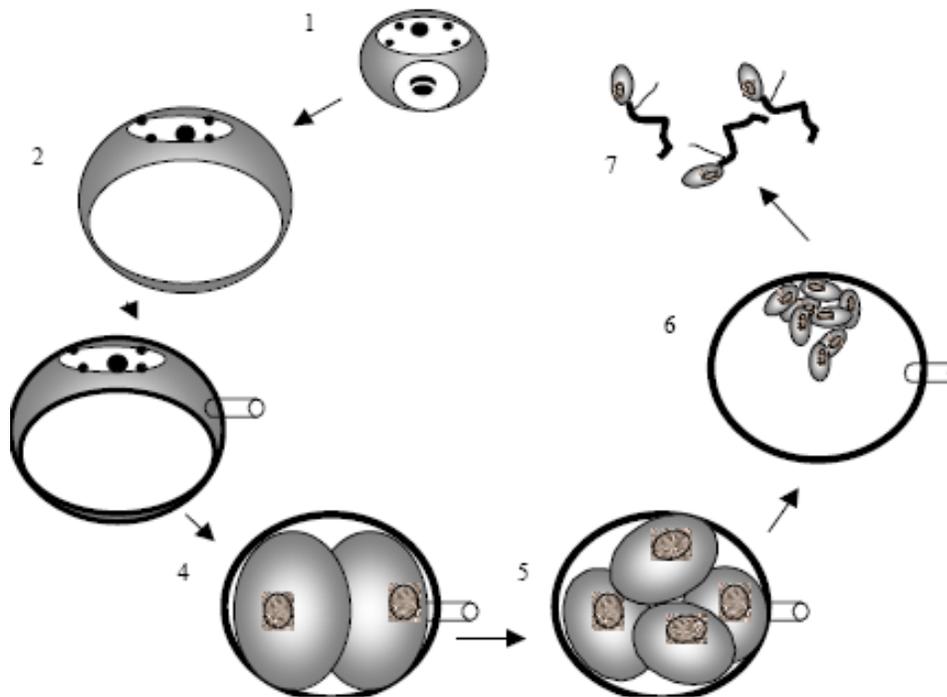


Figura 6. Ciclo de vida de *Perkinsus marinus* en vida libre. Trofozoito libre (1), trofozoito sin vacuoplasto (2), trofozoito con el tubo de descarga (3), trofozoito en palintomía (esporulación) (4-6), esporas libres (7) (Tomado de Cáceres Martínez, 2002).

I.6. Técnicas de diagnóstico para *Perkinsus marinus*

Las técnicas de diagnóstico para *P. marinus* se basan en la detección directa e identificación del agente.

I.6.1 Métodos de detección directa

Cultivo en medio de Tioglicolato

El cultivo en medio de Tioglicolato (FTM por sus siglas en inglés Fluid Thioglycollate Medium) consiste en colocar una fracción de tejido de recto, manto y branquia de ostiones en el medio de tioglicolato e incubar en la oscuridad durante 7 días. Posteriormente se observa al microscopio teñido con una solución

de yodo. El indicador de la infección es la presencia de esferas de color azul oscuro o negras, que corresponden a las hipnosporas del parásito con un tamaño de entre 20 a 70 μm (OIE, 2009). Esta técnica es muy sensible pero su especificidad es baja ya que no distingue especies de *Perkinsus*.

Histología

A nivel histológico, se observan en el tejido conectivo trofozoitos inmaduros y maduros, que frecuentemente son fagocitados por los hemocitos del hospedador. Esta técnica confirma la presencia del parásito en áreas de distribución conocida de *P. marinus*. Sin embargo, en áreas donde se encuentran más de una especie de *Perkinsus* o la especie no ha sido determinada, es necesario confirmar la especie con la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) especie-específica. La sensibilidad de la técnica histológica es buena en infecciones moderadas o severas, pero baja en infecciones ligeras (OIE, 2009).

1.6.2 Métodos de identificación del agente

Técnicas moleculares.

En los últimos años y como una alternativa al cultivo en medio de Tioglicolato, se han desarrollado técnicas de diagnóstico molecular e inmunológico, que son más específicas al género *Perkinsus* y que permiten la identificación a nivel de especie (Villalba *et al.*, 2004). También se han desarrollado secuencias de iniciadores para la detección de *P. marinus* mediante la amplificación de segmentos de ADN, como el espaciador transcrito interno (ITS por sus siglas en inglés, Internal Transcriber Spacer) y los espaciadores no transcritos (NTS por sus siglas en inglés Non Transcriber Spacer) de la especie mediante PCR.

Los ITS son partes de ARN no funcional que se encuentran situados entre el ARN ribosomal funcional (ARNr). En el genoma de los eucariontes los genes de ARNr

se encuentran repetidos en tándem. La unidad de transcripción contiene los genes que codifican para 18S, 5.8S y 28S, espaciadores transcritos internos (ITS) y espaciadores no transcritos (NTS) que flanquean la estructura (Parra-Laca, 2010).

Para la identificación del género *Perkinsus* se utilizan iniciadores que amplifican la región ITS que da un producto de 703 pares de bases (Casas *et al.*, 2002). Para la identificación de la especie *P. marinus* se amplifica la región NTS de 307 pares de bases (Robledo *et al.*, 1998) y la región ITS de 509 pares de bases (Audemard *et al.*, 2004).

Capítulo II

II. JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

II.1 Justificación

Como se ha mencionado antes, debido al reciente descubrimiento de *P. marinus* en *C. corteziensis* en las lagunas costeras de Nayarit (Cáceres-Martínez *et al.*, 2008), es indispensable determinar la distribución del parásito a partir de las localidades en donde se ha encontrado, hacia el resto de las lagunas costeras del Estado. Igualmente, debido a la peligrosidad potencial de *P. marinus* para la producción y biodiversidad de la zona, es necesario identificar las áreas afectadas por este parásito en todo el estado de Nayarit, así como determinar la prevalencia e intensidad de la infección.

El cultivo de *C. corteziensis* se presenta como una opción de desarrollo para las comunidades pesqueras de la región de la costa del Pacífico, por lo tanto, la salud del animal es fundamental. Por otro lado, sabemos que ninguna técnica de diagnóstico es 100% confiable, por lo que es necesario valorar la precisión del diagnóstico de *P. marinus* en la zona utilizando tres técnicas de diagnóstico.

II.2 Hipótesis

- *Perkinsus marinus* está distribuido en todas las lagunas costeras del estado de Nayarit y su prevalencia e intensidad en poblaciones naturales y de cultivo es la misma.
- El desarrollo de la enfermedad a nivel histológico es igual al descrito para el ostión del Este, *Crassostrea virginica*.
- Las técnicas de diagnóstico estudiadas son igualmente efectivas para la detección de *Perkinsus marinus*.

II.3 Objetivo general

- Definir la distribución de *Perkinsus marinus*, parásito del ostión de placer *Crassostrea corteziensis*, en el estado de Nayarit y determinar la prevalencia e intensidad de la infección mediante diferentes técnicas de diagnóstico.

II.4 Objetivos particulares

- Determinar las zonas afectadas por *Perkinsus marinus* en el Estado de Nayarit, en poblaciones de cultivo y silvestres.
- Determinar la prevalencia e intensidad de *P. marinus* en *C. corteziensis* en las localidades estudiadas.
- Describir el proceso de infección a nivel histológico.
- Comparar los métodos de diagnóstico utilizando el cultivo en medio de tioglicolato, histología y técnica molecular para los muestreos realizados en la zona.

Capítulo III

III.MATERIALES Y MÉTODOS

III.1 Área de estudio

Nayarit es un estado costero que tiene 289 kilómetros de litoral en el Océano Pacífico y que es atravesado por diez ríos. Su zona estuarina, de casi 220 kilómetros cuadrados, está ubicada principalmente al noroeste del estado, cuyo aprovechamiento es en pesca artesanal incluyendo la recolecta de ostiones. Para este estudio se consideraron seis localidades de muestreo pertenecientes a cinco lagunas costeras. En dos localidades se encuentran ubicados cultivos de ostión, Boca de Camichín y Pozo Chino. En las lagunas El Roblito, Palmar de Cuautla, Boca de Camichín y El Rey, se encuentran poblaciones naturales de ostión (Figura 7).

La localidad El Roblito se localiza en el municipio de Tecuala, su clima prevaeciente es cálido subhúmedo con lluvias en verano. El régimen de lluvias es de julio a septiembre, los meses calurosos de junio a agosto y con vientos de norte a sur. La precipitación pluvial media anual es de 1,200 milímetros y la temperatura es de 22 °C, variando entre los 26°C y 18°C. Las localidades de Palmar de Cuautla, Boca de Camichín y Pozo Chino se localizan en el municipio de Santiago Ixcuintla, su clima es cálido seco, con régimen de lluvias entre junio y octubre y de mayor intensidad en julio y agosto. Los meses más calurosos son de mayo a octubre; la dirección de los vientos es de noroeste a suroeste con vientos moderados. La precipitación pluvial varía de 1,595.1 mm a 1,266.1 mm. Se incrementa a medida que aumenta la altitud. La temperatura media anual es de 26.5°C. La localidad de Pozo El Rey se localiza en el municipio de San Blas, cuyo clima es cálido-húmedo con régimen de lluvias de junio a octubre que reporta una

precipitación promedio anual de 1,316.3 mm. La temperatura promedio anual es de 25.6°C y la dirección de los vientos es moderada del sureste al noroeste.

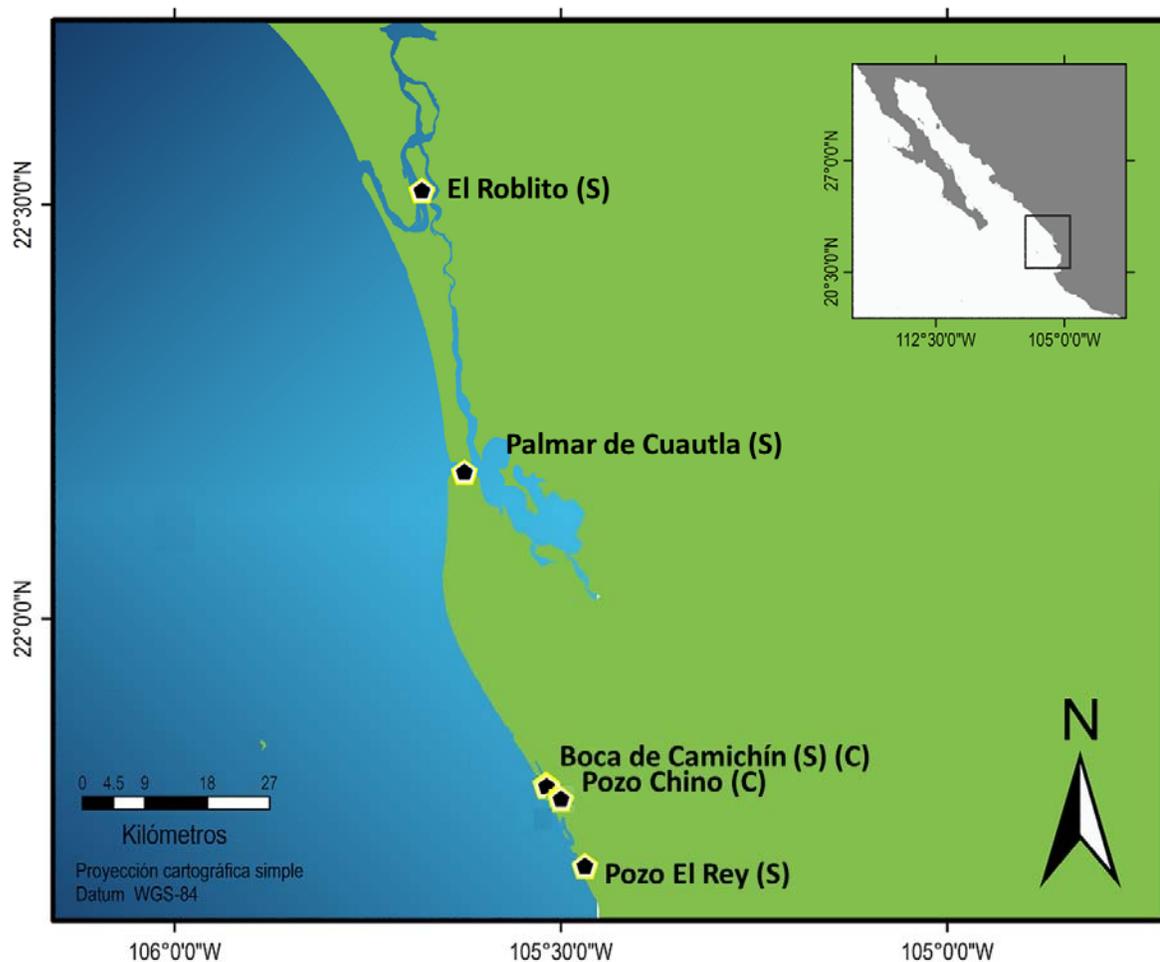


Figura 7. Imagen en donde se muestran los puntos de muestreo de *Crassostrea corteziensis* incluyendo poblaciones silvestres (S) y de cultivo (C) en el Estado de Nayarit.

III.2 Descripción de los muestreos

Las localidades de muestreo se seleccionaron a partir de los mapas de distribución natural del ostión de Placer, de las zonas de cultivo y partiendo de los puntos de registro original del parásito. Los muestreos se llevaron a cabo durante

el mes de noviembre del 2008, recolectando ejemplares de *C. corteziensis* de talla comercial de entre 2.0 y 10.6 cm, con un promedio de 6.5 ± 1.6 cm. Esto es debido a que sabemos que es más probable encontrar la infección por *P. marinus* en ejemplares adultos, dado que el parásito ha tenido la oportunidad de establecerse (Andrews, 1996).

El transporte y envío de muestras se realizaron de acuerdo al protocolo establecido por el Laboratorio de Biología y Patología de Organismos Acuáticos del Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE) y del Instituto de Sanidad Acuícola, A. C. (ISA) (APÉNDICE I). El tamaño de muestra fue de 120 ostiones por cada localidad, para una prevalencia esperada del 2% de acuerdo con la Organización Mundial de Sanidad Animal, (OIE, 2006). De cada localidad se anotaron los datos de fecha, hora de recolecta, número de organismos y observaciones; además de los correspondientes a los parámetros fisicoquímicos, como son temperatura ($^{\circ}\text{C}$) y salinidad (ppm). La temperatura promedio fue de $28.5 \pm 0.8^{\circ}\text{C}$ y la salinidad de 30.6 ± 5.1 ppm.

III.3 Análisis en fresco

Las muestras fueron trasladadas al laboratorio del CESANAY (Comité Estatal de Sanidad Acuícola de Nayarit). Una vez en el laboratorio los ostiones se lavaron para eliminar a los organismos epibiontes asociados y se midieron con una cinta métrica para registrar la talla. El diagnóstico se llevó a cabo por la técnica de cultivo en Medio de Tioglicolato (FTM), Histología y PCR de acuerdo a los protocolos ya establecidos y descritos a continuación.

La Prevalencia del parásito, se define 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:

$$PE (\%) = \{OI/OE\} \times 100$$

La intensidad determina 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.

III.4 Cultivo en Medio de Tioglicolato (FTM)

Se preparó medio de cultivo FTM de acuerdo al protocolo establecido por Ray (1966) y modificado por Fisher y Oliver (1996) (APÉNDICE II). De cada ostión se tomaron, con unas tijeras, muestra de los tejidos blanco (recto, manto y branquia) los cuales se colocaron en un tubo de 1.5 ml con 1 ml de medio FTM. A fin de evitar la contaminación cruzada, entre cada uno de los organismos las tijeras se lavaron con agua destilada estéril. Los tubos se incubaron en oscuridad a temperatura ambiente por 7 días.

Una vez cumplido el tiempo de incubación se removieron del tubo, pequeñas secciones de tejido, mismas que se colocaron sobre un portaobjetos, para posteriormente cortarlas finamente con una navaja estéril y agregando de una a tres gotas de Lugol. Por último, se colocó un cubreobjetos y se esperó un tiempo aproximado de 15 minutos para observar la preparación en el microscopio.

La intensidad en el FTM se determinó utilizando la escala relativa de Mackin (Tabla II y Figura 8), (Ray, 1954).

Tabla II. Escala de Mackin (Ray, 1954).

| Nivel | No. de células de <i>P. marinus</i> |
|--------------|--|
| 1 | 0, No infectado. |
| 2 | 1 a 10 células |
| 3 | 11 a 30 células |
| 4 | 31 a 100 células |
| 5 | Más de 101 células |

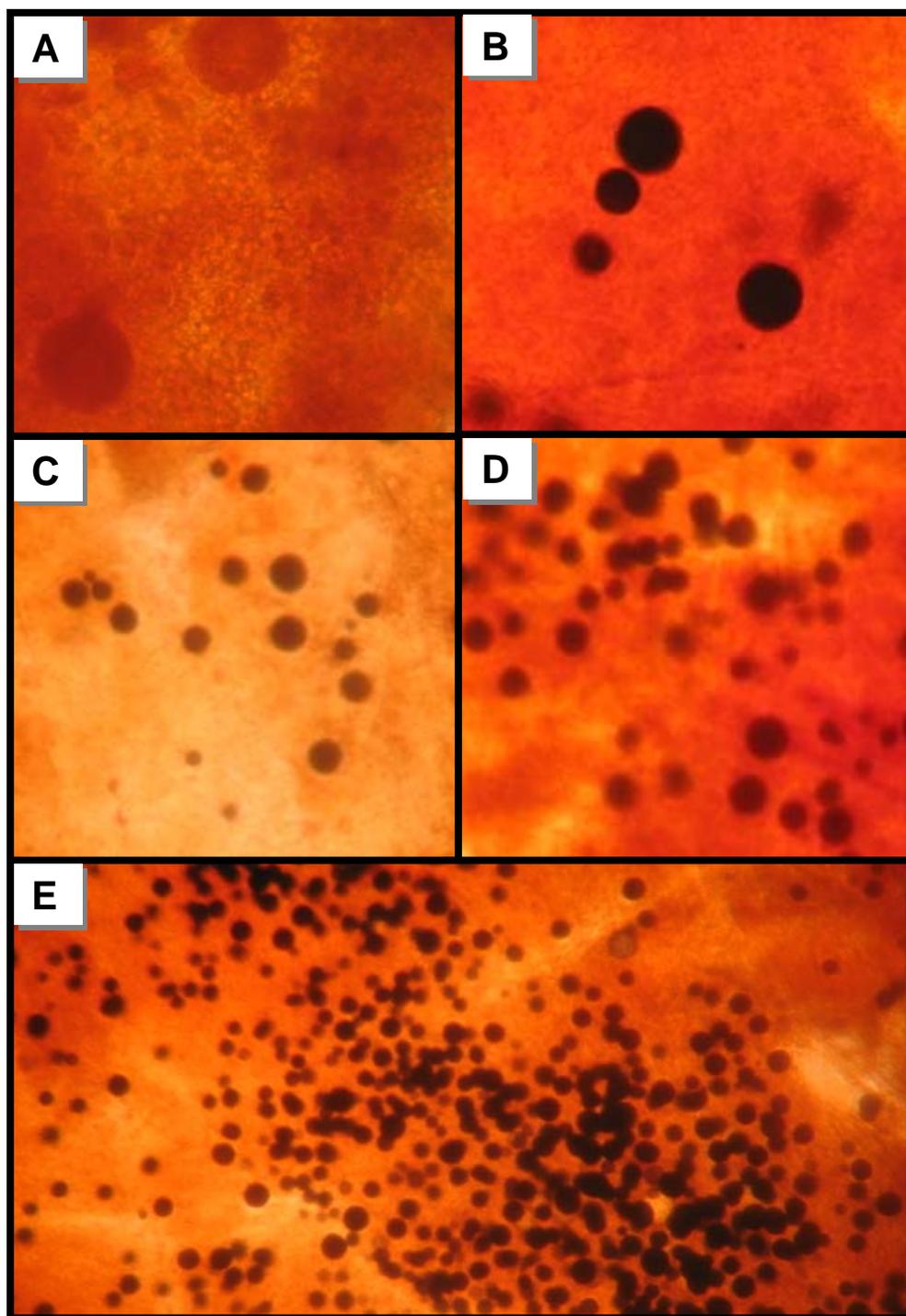


Figura 8. Escala relativa de Mackin (Ray, 1945). Detección de *Perkinsus marinus* en el FTM. (A) Nivel 1, no hay células de *P. marinus*, (B) Nivel 2, de 1 a 10 células, (C) Nivel 3, de 11 a 30 células, (D) Nivel 4, 31 a 100 células, (E) Nivel 5, más de 101 células. Muestras de ostiones del estado de Sinaloa, México.

III.5. Diagnóstico por Histología

Para el diagnóstico por histología fue necesario remover cada ostión de su concha y realizar un corte transversal del cuerpo blando del ostión de aproximadamente 5 mm (Figura 9). El corte incluyó el manto, glándula digestiva, riñones, gónada y branquias (Figura 10).

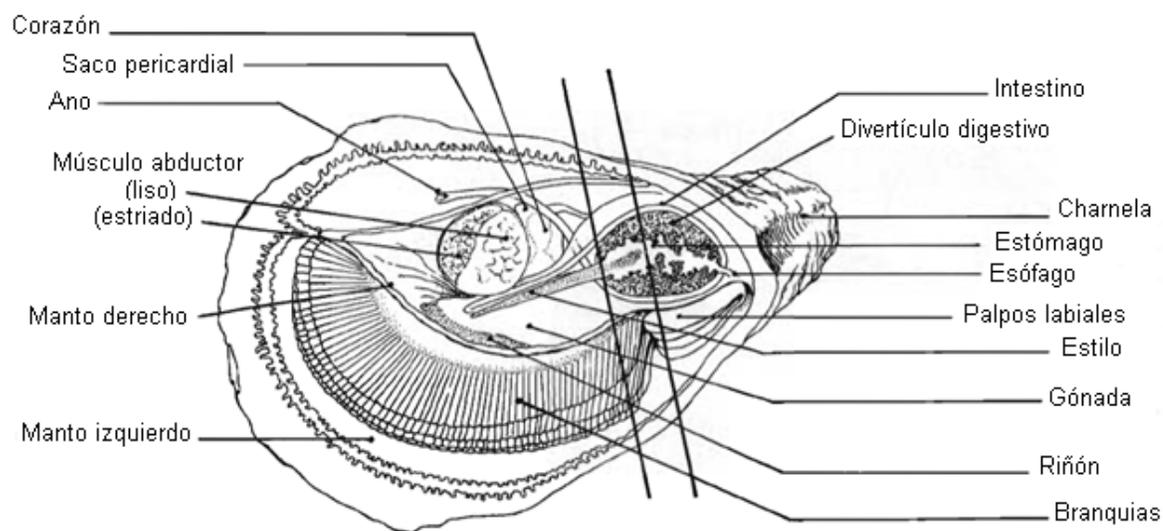


Figura 9. Corte transversal del cuerpo blando del ostión para el diagnóstico por histología, indicado en las líneas paralelas (Tomada de Howard y Smith, 1983).

Cada corte se colocó individualmente en un casete histológico y se fijó con solución Davidson, en una relación de volumen de 1:5 (APÉNDICE III). La fijación fue por 24 horas (Shaw y Battle, 1957). Posteriormente los tejidos se deshidrataron en un procesador automático de tejidos (APÉNDICE IV), con cambios graduales de etanol (70 % hasta alcohol absoluto) y se incluyeron en parafina utilizando un incluidor de parafina.

Los cortes histológicos se hicieron en un microtomo a 5 micras de espesor y se colocaron en un portaobjetos. Las laminillas se tiñeron con la técnica de Hematoxilina-Eosina/Floxina (Shaw y Battle, 1957; Howard *et al.*, 2004)

(APÉNDICE V) 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 10x hasta 100x.

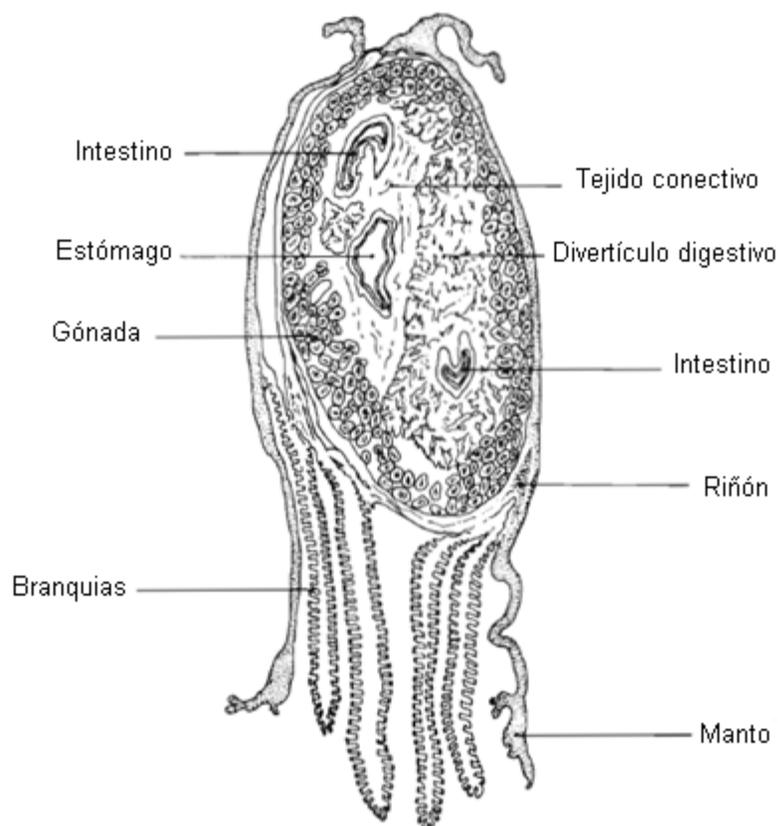


Figura 10. Corte transversal del ostión donde se muestran sus órganos internos. (Tomada de Howard y Smith, 1983).

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

- (1) Infección ligera**, cuando el parásito está presente sólo en el epitelio de algunas áreas del intestino y no se observa infiltración hemocitaria;

- (2) Infección moderada**, cuando el parásito se encuentra en el epitelio de algunas áreas del intestino y en el tejido conectivo y se observa infiltración hemocitaria;
- (3) Infección severa**, cuando se observa una infiltración de hemocitos generalizada y el parásito invade el intestino y el tejido conectivo que rodea la glándula digestiva, gónada, manto y branquias.

III.6 Extracción de ADN de los tejidos de branquia, recto y manto

Se utilizaron muestras de branquia, recto y manto de cada ostión previamente preservadas en etanol al 96 % y colocados en un tubo de microcentrifuga estéril de 1.6 ml. Los tejidos se retiraron del tubo con pinzas estériles y se colocaron en un nuevo tubo de microcentrifuga de 1.6 ml con agua destilada estéril, para lavarlos y eliminar el etanol. Posteriormente, los tejidos se colocaron en un nuevo tubo estéril y se adicionaron 500 μ l de amortiguador Tris-EDTA pH 8.0 estéril, 100 μ g de proteinasa K (10 mg/mL) y 100 μ l de SDS 10 % (duodecil sulfato de sodio) y se dejaron incubar toda la noche a 56 °C.

Después de ese tiempo se agregaron 500 μ l del reactivo comercial DNAzol® (Research Molecular Center) siguiendo el protocolo del fabricante. El tubo se dejó incubando 3 horas a 56 °C, agitando cada 30 minutos en un vórtex. Después de ese tiempo, se centrifugó 6 min a 12,000 rpm a temperatura ambiente en una microcentrifuga, para precipitar el tejido degradado. Se transfirieron 800 μ l del sobrenadante a un tubo estéril y se agregaron 200 μ l de cloroformo 99 %, se mezcló por 20 segundos y se centrifugó por 6 min a 12,000 rpm. Se transfirieron, cuidadosamente, 600 μ l del sobrenadante a otro tubo estéril y se agregaron 800 μ l de isopropanol 99.9 % (-20 °C) 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 μ l 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 56 °C para eliminar los restos de etanol, por un tiempo no mayor a 30 minutos. Posteriormente, el ADN se resuspendió en 300 μ l de amortiguador Tris-EDTA pH 8.0 estéril.

III.7. Diagnóstico por PCR

Se utilizaron los iniciadores PerkITS85 5'-CCG-CTT-TGT-TTG-GA/CTC-CC-3' y antisentido PerkITS750 5'-ACA-TCA-GGC-CTTCTA-ATG-ATG-3' que amplifican la región espaciadora transcrita interna del rRNA (internal transcribed spacer, ITS) del genoma de *Perkinsus* ssp., obteniendo un producto de 703 bp (Casas *et al.*, 2002). La mezcla de PCR se preparó siguiendo el protocolo que se describe en la Tabla III.

Tabla III. Componentes y concentraciones finales para la detección de *Perkinsus marinus* por PCR.

| Componente | Cantidad (μ L) | Concentración final |
|------------------------------------|---------------------|---|
| Amortiguador 10X para <i>Taq</i> | 2.5 | 1X (Tris-HCl 10 mm pH 8.5, KCl 50 mm, MgCl ₂ 1.5 mm) |
| dNTP's 10 mm | 0.5 | 200 μ m |
| Iniciador PerkITS85 10 μ m | 0.625 | 1 μ m |
| Iniciador PerkITS750 10 μ m | 0.625 | 1 μ m |
| <i>Taq</i> polimerasa 5 U/ μ l | 0.125 | 1.5 Unidades por reacción |
| Agua grado biología molecular | 19.625 | - |
| ADN genómico total | 1 | Variable |

Estos iniciadores se utilizan para detectar a cualquier especie conocida, y posiblemente desconocida, del género *Perkinsus* excepto *P. qugwadi*. La secuenciación de ADN de la región ITS se llevó a cabo para identificar a *P. marinus*. En todas las reacciones realizadas se incluyó, como control positivo, ADN genómico de *C. corteziensis* infectado por *Perkinsus marinus*. Como control negativo se utilizó agua estéril. Las condiciones de amplificación se describen en la Tabla IV.

Tabla IV. Condiciones de amplificación para la detección de *Perkinsus marinus* por PCR.

| Paso | Temperatura | Tiempo | Evento |
|------|-----------------------|--------|----------------------------|
| 1 | 95°C | 4 min. | Desnaturalización inicial |
| 2 | 95°C | 1 min. | Desnaturalización |
| 3 | 53°C | 1 min. | Hibridación de iniciadores |
| 4 | 65°C | 3 min. | Extensión |
| 5 | 40 Ciclos (2, 3, y 4) | - | - |
| 6 | 65°C | 5 min. | Extensión final |

Los productos de PCR (10 ul) se detectaron por medio de la técnica de electroforesis en gel de agarosa al 1.5 %. Se aplicó una carga de 100 voltios por 1 hora y el gel fue teñido con una solución de bromuro de etidio (1 ug/ml). Se utilizó como referencia un marcador de peso molecular de 0.1 a 2 Kpb (Invitrogen) a una concentración de 1 ug/ul.

Por cada una de las localidades, los productos de PCR amplificados se enviaron para su secuenciación en la Universidad Estatal de San Diego, USA (SDSU, CSUPERB MicroChemical Core Facility). Las secuencias obtenidas se editaron manualmente para obtener la mayor similitud utilizando el software FINCH TV. Las secuencias se compararon por medio del BLAST (por sus siglas en inglés Basic Local Alignment Search Tool) con la base de datos del GenBank (banco de genes) para determinar su similitud.

III.8 Análisis estadístico.

Se determinó el porcentaje de efectividad de las técnicas de diagnóstico tomando en cuenta el porcentaje de ostiones infectados, con respecto al total de 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 (APÉNDICE VI).

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.

G_j = número total de casos positivos por cada técnica (j).

L_i = número total de casos positivos de todas las técnicas (i).

N = número de muestras.

Capítulo IV

I. RESULTADOS

IV.1 Distribución y prevalencia de *Perkinsus marinus*

Perkinsus marinus se detectó en las seis localidades estudiadas del estado de Nayarit (Figura 11). Se distribuye tanto en poblaciones silvestres y de cultivo, y su prevalencia fue mayor en las poblaciones de cultivo. La prevalencia del parásito en la localidad de El Roblito fue de 15 % con una intensidad media de 1.33 ± 0.48 . La localidad de Palmar de Cuautla presentó una prevalencia del 4.16 % y una intensidad media del 1.80 ± 1.09 . Las localidades de Boca de Camichín, silvestre y de cultivo, presentaron 40 % y 50 % de prevalencia, su intensidad media fue de 1.55 ± 0.70 y 1.55 ± 0.69 respectivamente. *P. marinus* se detectó en un 69.16 % en la localidad de Pozo Chino, con una intensidad media del 1.80 ± 0.72 . Y para la localidad de Pozo el Rey se obtuvo una prevalencia de 4.16 % y una intensidad media de 1.40 ± 0.54 .

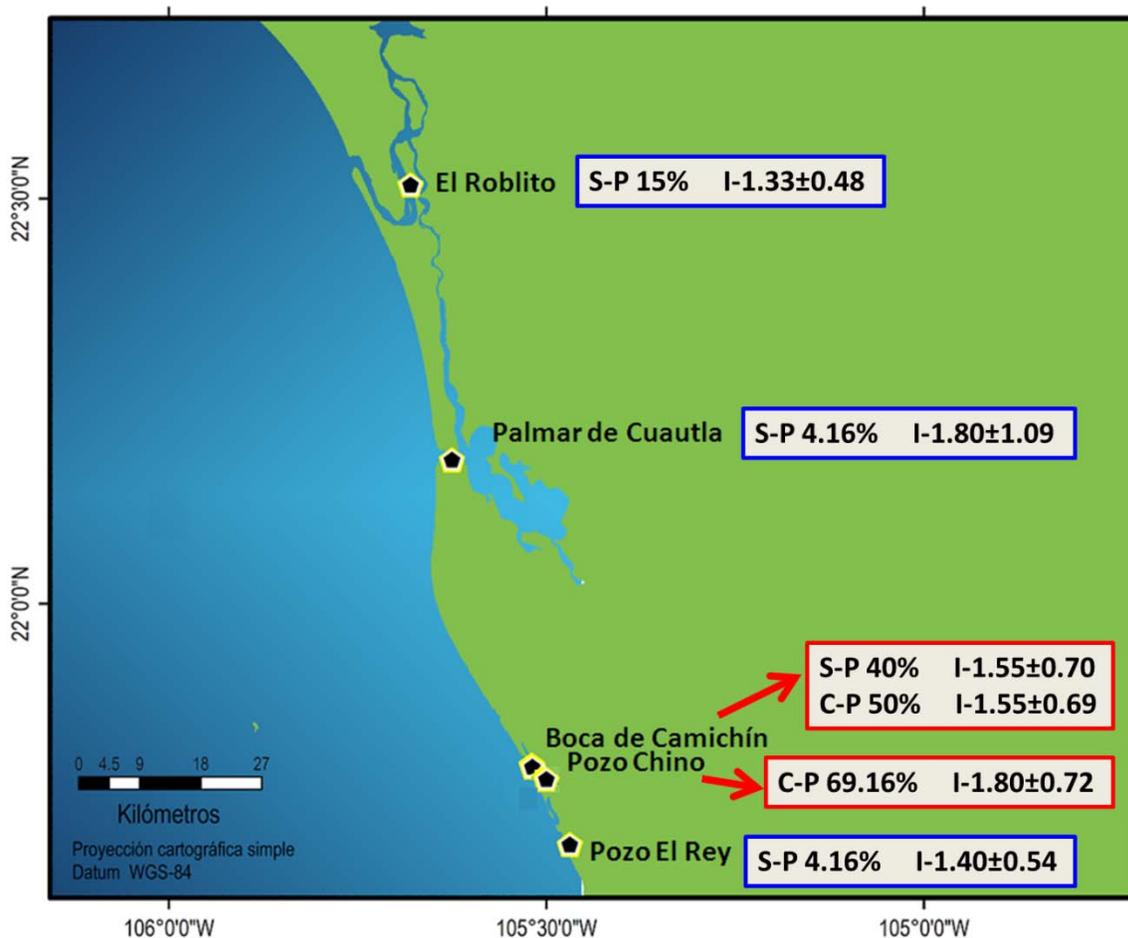


Figura 11. Mapa de Distribución de *Perkinsus marinus* en el Estado de Nayarit. Mostrando la prevalencia del parásito y su intensidad promedio por histología, en cada localidad estudiada. S, población silvestre; C, población de cultivo; P, Prevalencia; I, Intensidad media \pm desviación estándar.

Se compararon las tres técnicas de diagnóstico utilizadas (cultivo en FTM, Histología y PCR) y sólo se tomaron como positivo los casos en los cuales se tenían dos resultados positivos, sin importar la técnica, y en los casos en los que en histología se mostró la presencia del parásito (Tabla V).

Tabla V. Combinaciones de resultados obtenidos por las tres técnicas de diagnóstico utilizadas y su resultado definitivo. La última columna muestra el porcentaje de resultados positivos. n=720 ostiones analizados.

| Casos | FTM | Histología | PCR | Resultado | % (n=720) |
|--------|-----|------------|-----|-----------|-----------|
| Caso 1 | + | + | + | + | 12.08 |
| Caso 2 | - | + | + | + | 12.36 |
| Caso 3 | + | - | + | + | 2.36 |
| Caso 4 | + | + | - | + | 0.97 |
| Caso 5 | + | - | - | - | 5.83 |
| Caso 6 | - | + | - | + | 2.63 |
| Caso 7 | - | - | + | - | 4.72* |
| Caso 8 | - | - | - | - | 59.02 |
| | | | | TOTAL | 100.00 |

* repetir el análisis.

Se examinaron un total de 720 ostiones; de estos, 224 resultaron infectados por *P. marinus*, lo cual correspondió al 31.12%. De los infectados, 202 fueron positivos para la técnica histológica y su intensidad se muestra en la Figura 12. Del porcentaje total de ostiones infectados (31.12%), el 15.41% se logró determinar con el FTM., el 28.04% por histología y el 26.80% por la técnica de PCR. La prueba Q de Cochran mostró que entre las tres técnicas de diagnóstico para *P. marinus* hay diferencia altamente significativa ($Q = 40.87500^{***}$, $P < 0.001$) (Tabla VI).

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

| Número de casos: 720, Q = 40.87500, gl = 2, P >0.001 | | | |
|--|----------|----------|----------|
| Técnica | Suma | % de 0 | % de 1 |
| Tioglicolato | 153.0000 | 78.75000 | 21.25000 |
| Histología | 202.0000 | 71.94444 | 28.05556 |
| PCR | 227.0000 | 68.47222 | 31.52778 |

gl = grados de libertad.

Se determinó el porcentaje de efectividad de las técnicas de diagnóstico tomando en cuenta que, del 100% de las muestra analizadas, el 31.12% fue positivo a *P. marinus*. La efectividad se calculó tomando los valores porcentuales totales de cada técnica y determinando su valor con respecto al resultado final (31.12%). El cultivo en FTM mostró tener un porcentaje de efectividad del 49.51%, esta técnica presentó la efectividad más baja. La técnica histológica presentó un porcentaje de efectividad del 90.10%, siendo la técnica que mostró la efectividad más alta. La efectividad de la técnica de PCR fue de 86.17%.

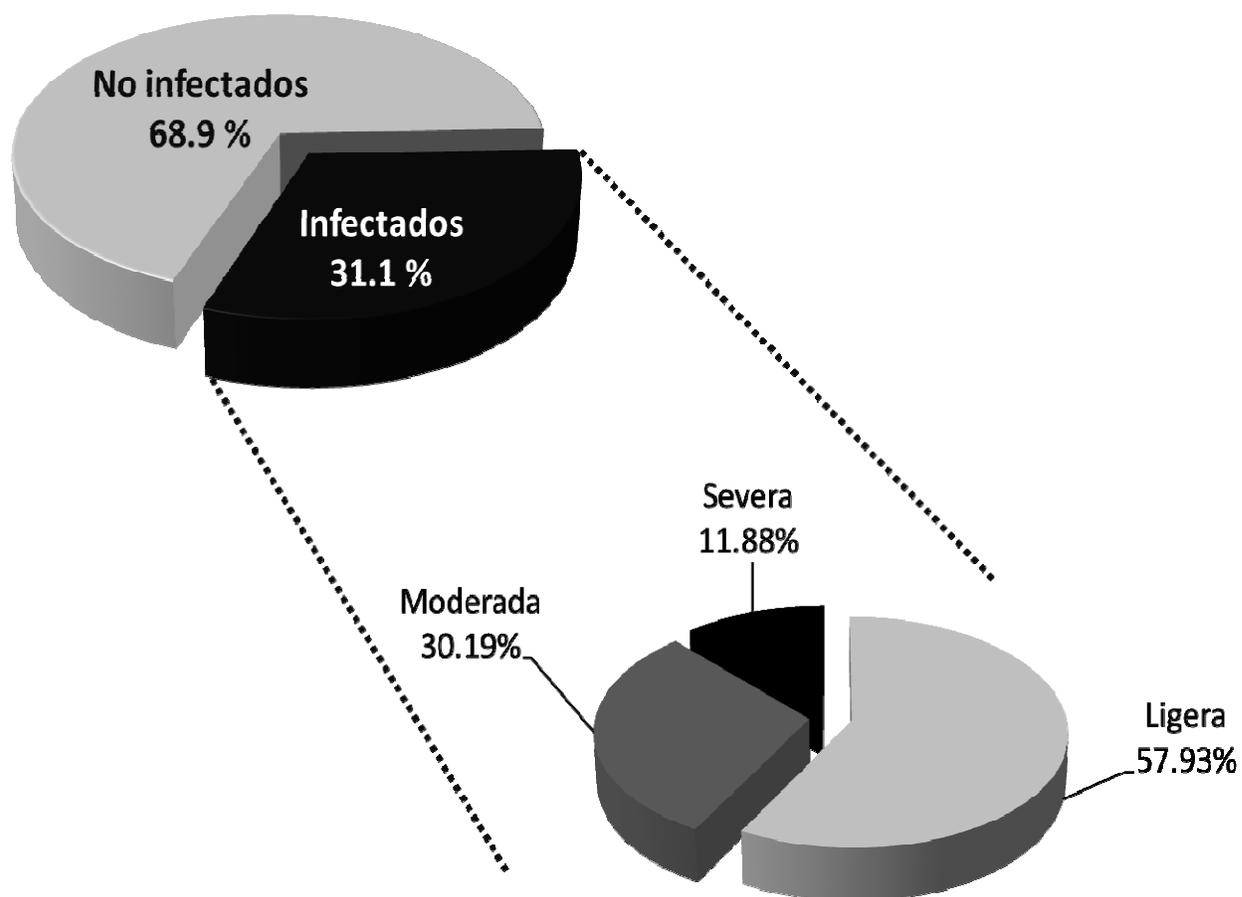


Figura 12. Prevalencia e intensidad de *Perkinsus marinus* en el ostión de placer, *Crassostrea corteziensis*, en el Estado de Nayarit.

IV.2 Intensidad de *Perkinsus marinus*

No se encontró relación entre las dos escalas de intensidad consideradas en el estudio. En casos donde se tuvo una intensidad de cinco en FTM la intensidad en histología fue de uno o el resultado fue negativo. Por otro lado, también se encontraron casos de infecciones severas en histología, con una invasión y destrucción del tejido del ostión por parte de *P. marinus* y el resultado en FTM fue negativo. Por lo anterior con la técnica histológica se determinó la intensidad de la infección, ya que es en esta donde se puede observar al parásito y el daño causado a los tejidos.

La intensidad media de *P. marinus* fue de ligera a severa, con valores de 1.33 ± 0.48 a 1.80 ± 1.09 . La infección en *C. corteziensis* fue similar a la descrita en el ostión *C. virginica*. En infecciones ligeras, se observó la presencia de trofozoitos y tomontes en el epitelio del intestino del ostión. En infecciones severas se observó una infiltración de hemocitos, fagocitosis y diferentes etapas del parásito disgregadas en el tejido conectivo que rodea al epitelio de la glándula digestiva y en el manto (Figura 13 A). Además se observaron parásitos dentro de los hemocitos del hospedero (Figura 13 B). Se observaron en los epitelios del estómago y del intestino diferentes etapas de *P. marinus* (Figura 14 A). Los tomontes encontrados contenían de dos a 26 células (Figuras 14 B y 15 A). Se observaron formas del parásito en túbulos digestivos (Figura 15 B). Se detectó destrucción del tejido en los filamentos branquiales y en los folículos reproductivos de la gónada (Figuras 15 C y D). Imágenes de diferentes estadios del parásito se muestran en la figura 16 y en particular se pueden observar trofozoitos en palintomia en la figura 16 C. Los trofozoitos inmaduros midieron alrededor de dos a tres μm y los trofozoitos maduros de tres a 10 μm de diámetro. Estos últimos, presentaron una vacuola en su interior con la forma típica anillada.

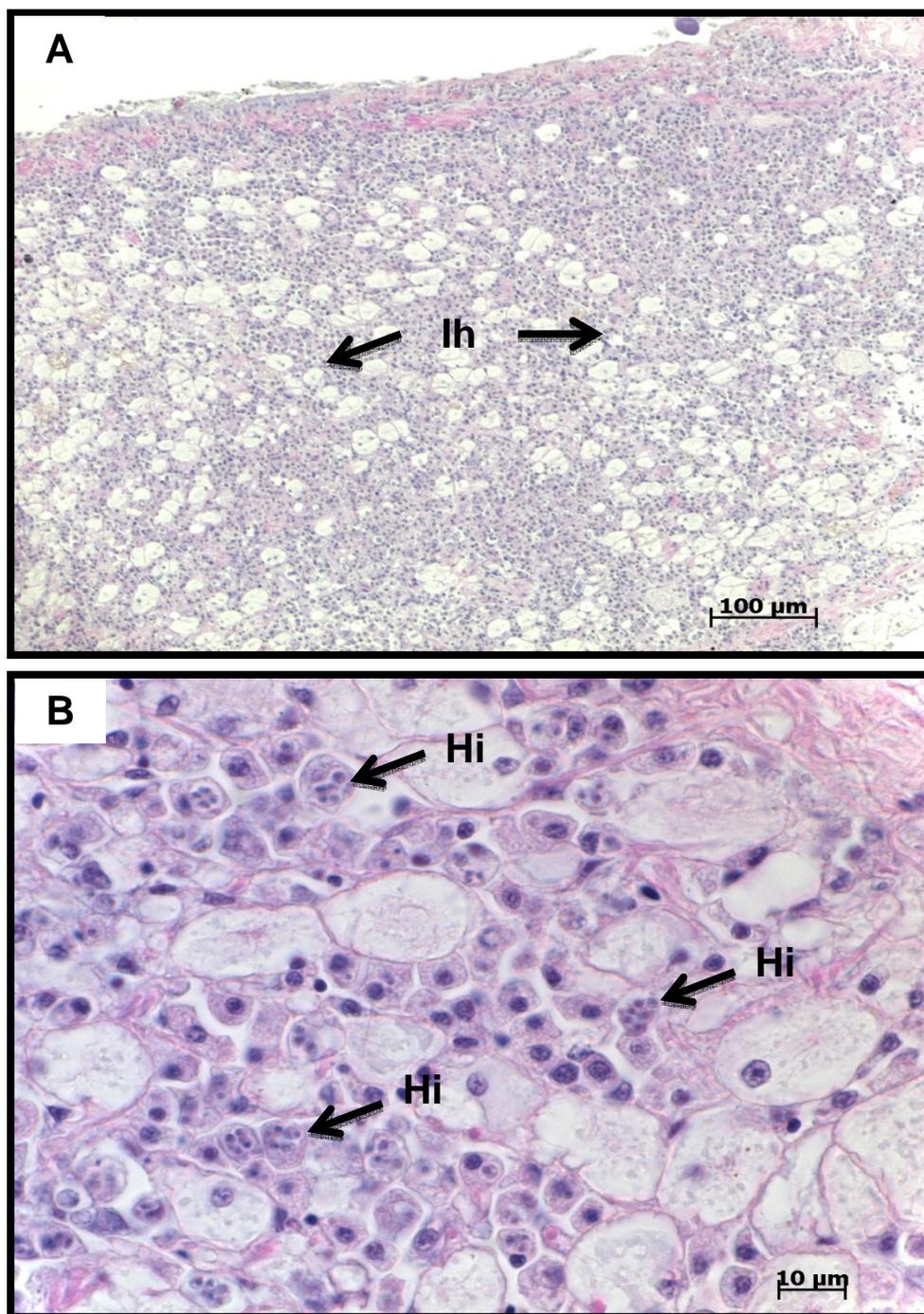


Figura 13. *Crassostrea corteziensis* infectado por *Perkinsus marinus* (A) Vista general del tejido conectivo que rodea la glándula digestiva mostrando infiltración hemocitaria generalizada (Ih). (B) Mayor aumento del tejido mostrando hemocitos infiltrados (Hi) por el parásito, en una infección severa. Tinción Hematoxilina-Eosina/Floxina.

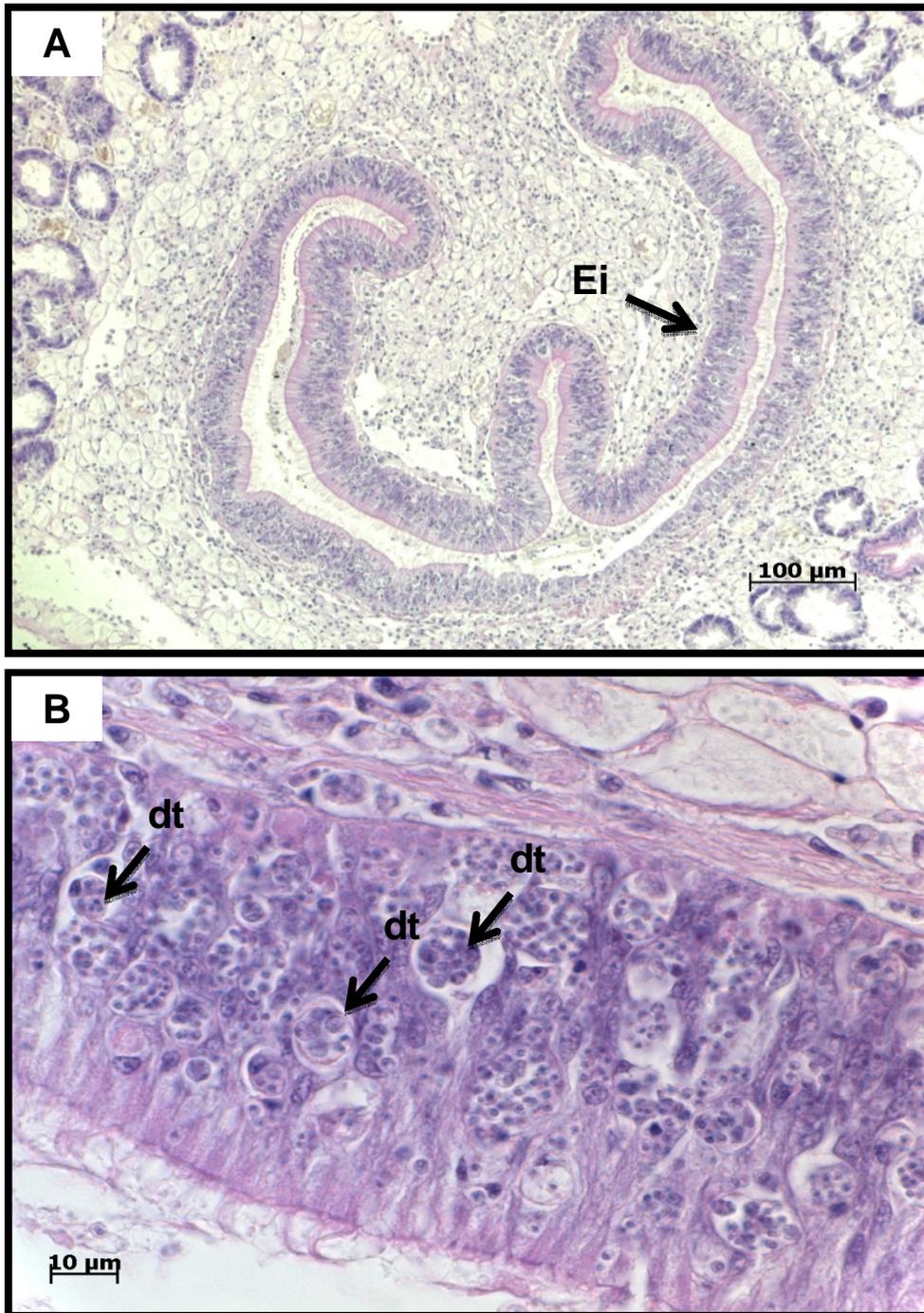


Figura 14. *Crassostrea corteziensis* infectado por *Perkinsus marinus* (A) Vista general del epitelio del intestino (Ei). (B) Mayor aumento del tejido mostrando una infección severa donde se observan numerosos trofozoitos en diferentes estadios (dt). Tinción Hematoxilina-Eosina/Floxina.

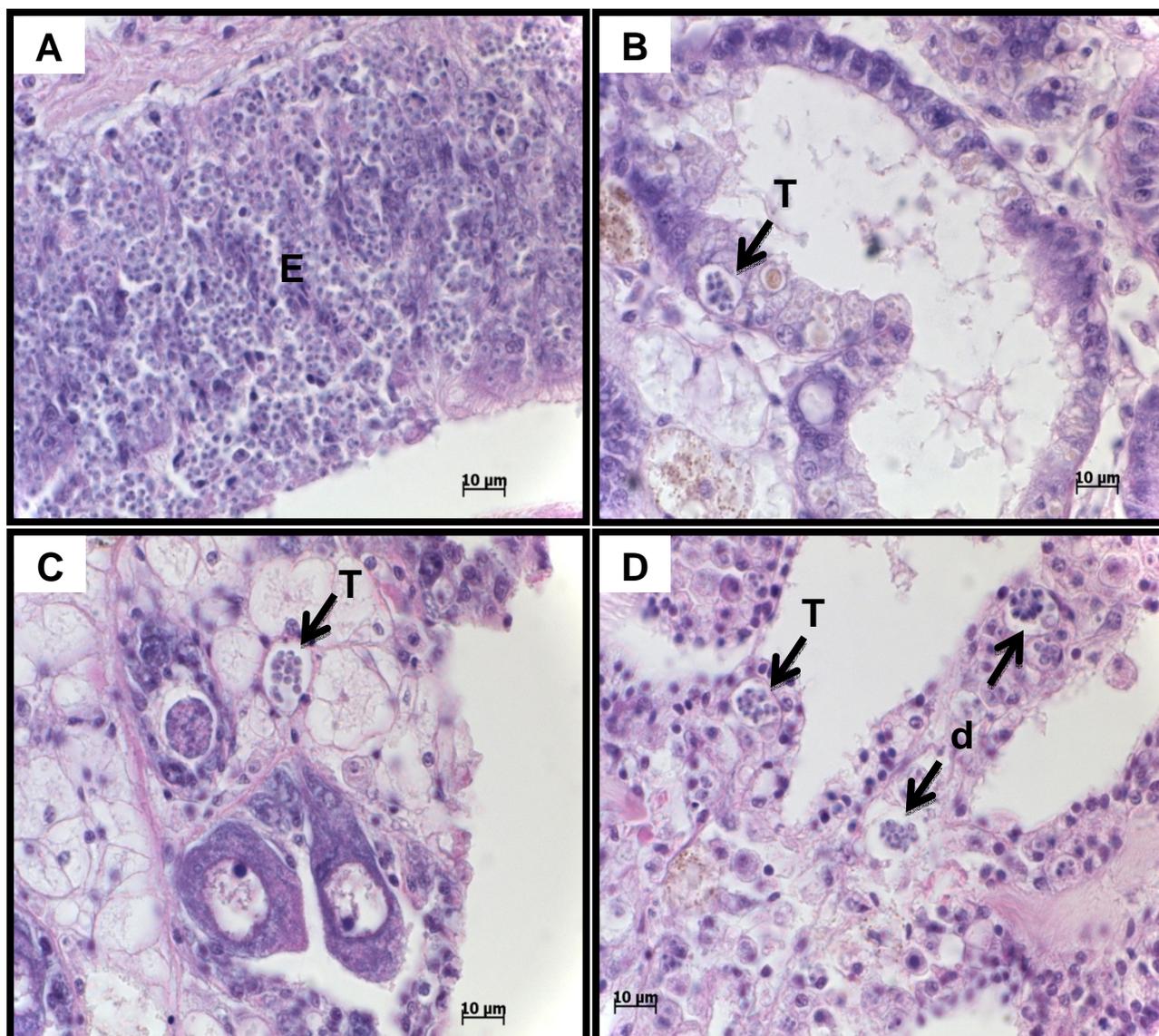


Figura 15. *Crassostrea corteziensis* infectado con *Perkinsus marinus*. (A) Epitelio del estómago (Ee) invadido por el parásito mostrando una infección severa. (B) Tomonte (T) de *P. marinus* en el epitelio del divertículo digestivo. (C) Tomonte (T) en el tejido conectivo de la gónada. (D) Tomontes (T) mostrando diferentes estadios de trofozoitos en el tejido conectivo de la branquia. Tinción Hematoxilina-Eosina/Floxina.

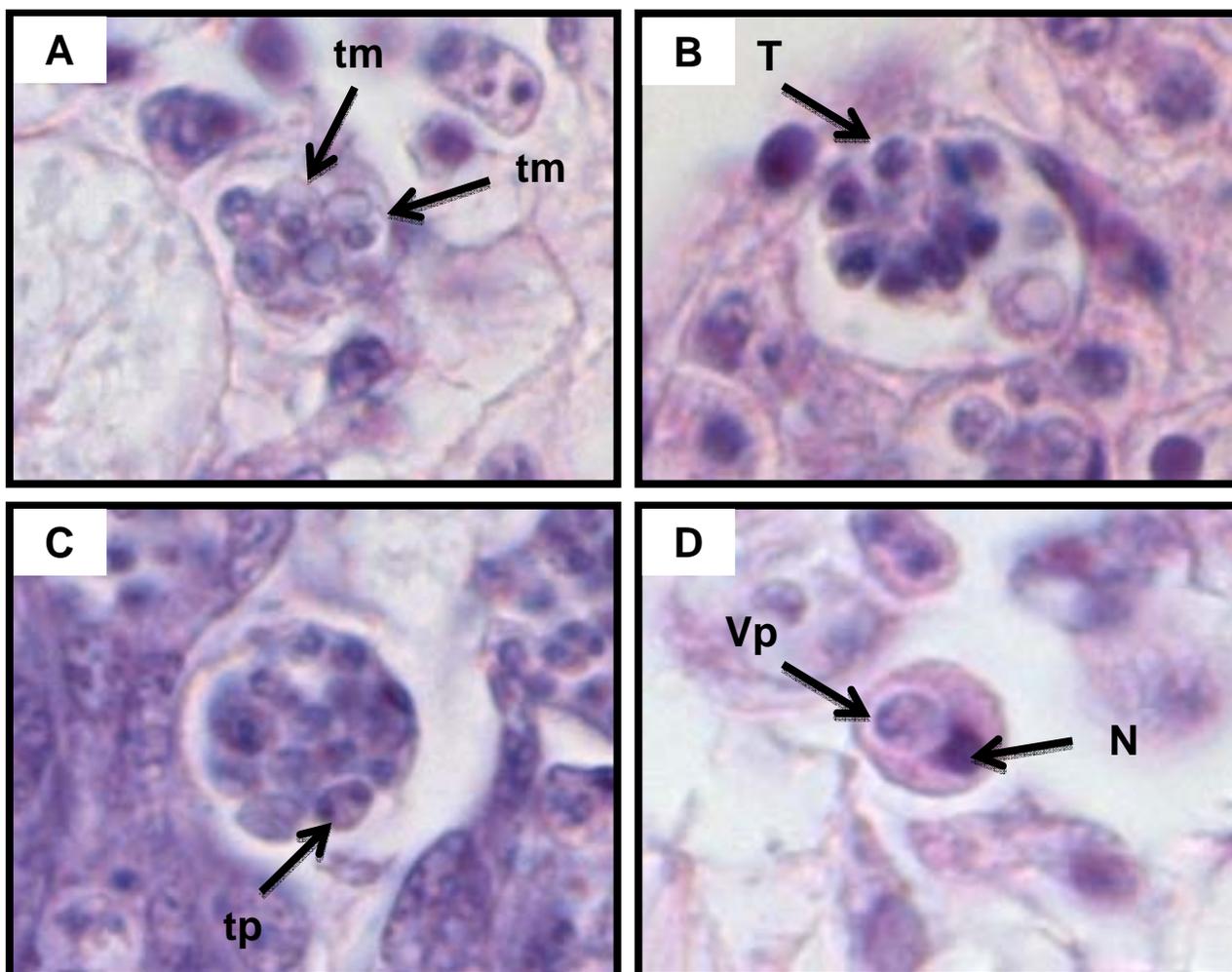


Figura 16. Diferentes estadios de *Perkinsus marinus* en tejido conectivo y epitelio del intestino de *Crassostrea corteziensis*. (A) Tomonte conteniendo trofozoitos maduros (tm) con su vacuola, mostrando su forma típica de anillo. (B) Tomonte que contiene ocho trofozoitos de *P. marinus*. (C) Trofozoitos en palintomia (tp), división interior. (D) Trofozoito con su núcleo (N) y su vacuoplasto (Vp). Tinción Hematoxilina-Eosina/Floxina.

IV.3 Detección de *Perkinsus marinus* por amplificación de la secuencia ITS

Se llevó a cabo la amplificación de la región ITS de *P. marinus* en *Crassostrea corteziensis*. Se obtuvo un tamaño de fragmento aproximado al esperado de 703 pb (Figura 17).

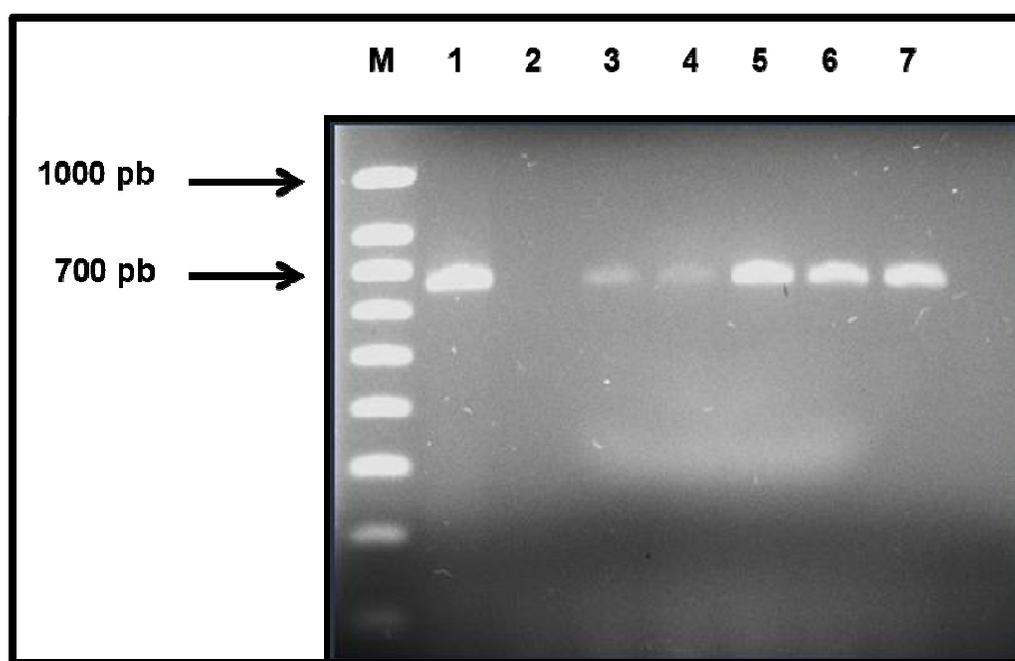


Figura 17. Detección de *Perkinsus marinus* en *Crassostrea corteziensis* por PCR con el uso de iniciadores para la región ITS. M) Marcador de peso molecular de 0.1 a 1 Kb (GeneChoice); 1) Control positivo (ADN genómico de *P. marinus*; 2) Control negativo (agua estéril); 3-7) Muestra positiva de *P. marinus*.

IV.4 Análisis de la secuencia ITS de *Perkinsus marinus*

Con los resultados de la secuenciación y su análisis con el programa FINCH TV se obtuvo una secuencia consenso del ITS de *P. marinus* de 652 pares de bases (Tabla VII).

Tabla VII. Secuencia ITS obtenida de *Perkinsus marinus*.

| | | | | |
|-----|------------|-------------|------------|-------------|
| 1 | CAAACCTACT | GGCTGAGGAG | TAGATTAATT | CCTATGAACC |
| 41 | TCTTGTA | GTCATAGTAT | CCAAATCCAA | TTTGGATT |
| 81 | TGGTATTTCA | AAACGAAAATT | CCAAACTCTC | AACGATGGAT |
| 121 | GCCTCGGCTC | GAGAATCGAT | GAAGGACGCA | GCGAAGTGCG |
| 161 | ATAAGCACTG | CGATTTGCAG | AATTCCGTGA | ACCAGTAGAA |
| 201 | ATCTCAACGC | ATACTGCACA | AAGGGGATCT | TTCTCTTTG |
| 241 | TACATACATA | TCAGTGTCGC | TCTTCTTCCC | GATACAAACA |
| 281 | TTTTGTTGTT | AACGCAACTC | AATGCTTTGT | ATCCCGCTTG |
| 321 | AACTAACTCT | TCGGAGGTGG | TTGTTATGT | GCGCTTGTTGA |
| 361 | AGGCAGGCGT | ATTAATTTGC | AAGGCTATAA | TCTCGTATTG |
| 401 | TAGCCCTCC | GAAAGGAGGC | TTGCGCCTGT | GAGTATCTCT |
| 441 | AGAGGTACTC | GCAAACCTCGA | CTGTGTTGTG | GTGATATCAC |
| 481 | GTGTTCCCTG | ATCACGCGAT | TCTTCTCTTC | AACGCATTAC |
| 521 | GTCAAATCTA | TTGATAAATG | CAGAGAAGTG | TTTGAATCAC |
| 561 | GCGTTCAGTC | TGGTCGCGAG | ATTATTATAT | ATCATAACAC |
| 601 | GCTTGTCGGT | TTGCACCATG | GCAATATGTC | ATCATTAGAA |
| 641 | AGGCCTGATG | TA | | |

Posteriormente, se realizó una comparación con las secuencias encontradas en el GenBank, donde se observó que las muestras de *P. marinus* de Nayarit tienen un porcentaje de identidad del 99% con la secuencia ITS depositada en el GenBank con número de acceso AY295199.1. El porcentaje de cobertura fue de 96%. Esta secuencia es la descrita por Brown *et al.* (2004) y corresponde a *P. marinus* proveniente de los Estados de Massachusetts, New Jersey, Virginia, South Carolina y Louisiana, E.U.A.

Capítulo V

IV. DISCUSIÓN, CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

V.1 Discusión

P. marinus se distribuye tanto en poblaciones naturales y de cultivo en el Estado de Nayarit, lo que indica que el parásito está bien establecido en las lagunas estudiadas. Si partimos de las evidencias sobre su introducción hacia los años 80s, podemos observar que el parásito se ha dispersado en el estado. Como sabemos, *P. marinus* puede ser transmitido de manera horizontal a través de heces y ostiones infectados muertos que quedan en el ambiente; también que tiene una fase de zoospora que pasa a formar parte del zooplancton, con lo cual su distribución puede ser muy eficiente a través de las corrientes costeras. Sería recomendable estudiar la dinámica costera en la zona con relación a la distribución que ahora conocemos del parásito. En términos ambientales su distribución estaría limitada al ambiente favorable al parásito. En este sentido, estudios realizados en la costa Este de E.U.A. han mostrado que, a partir de su descubrimiento, *P. marinus* se ha establecido ampliamente en la zona, teniendo como limitante las condiciones de baja salinidad.

En la parte inferior de la Bahía de Chesapeake E.U.A., *P. marinus* se ha establecido firmemente, incluyendo todos los ríos del estado de Virginia. Las partes superiores de los ríos principales se encontraban libres de la enfermedad debido a la gran cantidad de agua que cae durante el invierno y la primavera, lo cual reduce las condiciones de salinidad que favorecen a *P. marinus*. Pasa lo contrario con los ríos más pequeños, que presentan salinidades que favorecen al patógeno. Sin embargo, actualmente el parásito se encuentra expandido también en la parte norte de la Bahía, aunque en esas condiciones su proliferación

disminuye (Burreson y Ragone-Calvo, 1996). La temperatura del agua es otro de los factores ambientales más importantes que determinan la prevalencia y la intensidad de *P. marinus*. En algunos estudios de campo se ha establecido una correlación significativa entre la temperatura y los niveles de parasitismo (Dawson, 1955). Chu y Greene (1989) realizaron estudios de laboratorio *in vitro* que demostraron que *P. marinus* es más prolífero a temperaturas por encima de los 20°C, lo cual corresponde con lo que se ha observado en campo.

La presencia de *P. marinus* en la Bahía de Chesapeake es cambiante y se ve favorecida en años de sequía y poca lluvia y no favorecida en años de abundante precipitación, lo cual indica la importancia de la salinidad para el mantenimiento de la infección (Andrews 1980). Durante la década de los 80's se presentaron tres episodios de sequía, en invierno-primavera (1981, 1985 y 1986) en la Bahía de Chesapeake, seguidas por veranos secos y cálidos que provocaron mortalidades excepcionalmente altas, las cuales se atribuyeron principalmente a *P. marinus*. En los siguientes años también secos (1985-1987) ocurrieron elevadas pérdidas de ostión del Este en Virginia, atribuidas también a *P. marinus*, dando como resultado que pocos ostiones sobrevivieron para la cosecha (Andrews y Ray, 1988). En Virginia, *P. marinus* comienza su ciclo anual cuando pasa el invierno, en esta etapa es difícil detectarlo por la técnica de cultivo en FTM. El parásito comienza a multiplicarse activamente en el mes de Junio, cuando la temperatura es superior a los 20°C. *P. marinus* se multiplica más rápido a temperaturas entre 25 y 30 °C, que persisten 3 meses o más durante el verano de Virginia y mucho más tiempo en el Golfo de México. Las muestras analizadas para este trabajo se obtuvieron en el mes de Noviembre de 2008, donde se tuvo una temperatura promedio de 28.3 ± 0.8 °C, si bien no es la temperatura más alta del año, si sobrepasa los 20 °C. Tomando en cuenta que en la mayoría de los meses del año en esta región se presenta una temperatura promedio mayor o igual a los 20 °C, sería interesante analizar el comportamiento de *P. marinus* en meses de verano en el Estado de Nayarit.

Los datos puntuales de salinidad y temperatura que se obtuvieron en el presente estudio, no nos permiten hacer una comparación directa con lo ocurrido en E.U.A. Sin embargo, los resultados obtenidos, ponen en evidencia la urgente necesidad de realizar estudios estacionales e interanuales que permitan observar el patrón de la enfermedad en Nayarit y si concuerda con lo observado en la costa Este de E.U.A.

La mayor prevalencia e intensidad de *Perkinsus marinus* en las poblaciones de cultivo, respecto a las naturales, puede estar relacionado con las altas densidades y el manejo en estas condiciones, ya que altas densidades y el manejo de los ostiones pueden favorecer el estrés del hospedero, haciéndolo más susceptible al parásito. El parásito es excretado del hospedero por medio de las heces y este encuentra un nuevo hospedero al cual entra por medio de filtración, debido a sus hábitos alimenticios.

De igual forma, resulta interesante evaluar el ciclo anual de la enfermedad en condiciones de cultivo. En el cultivo de ostión en Nayarit, el período de engorda ocurre aproximadamente desde Agosto, que es cuando se captura la semilla, hasta finales de Marzo o principios de abril. Las prevalencia aquí mostradas son del mes de Noviembre y nuestros resultados muestran que a esta temperatura *P. marinus* es capaz de provocar prevalencias mayores al 50% en estas poblaciones.

Para poder conocer el ciclo anual de *P. marinus* en *C. corteziensis* es necesario monitorear las poblaciones de cultivo mes con mes y analizar los factores ambientales de temperatura y salinidad y compararlos con la prevalencia e intensidad encontrada de *P. marinus*. En las poblaciones de cultivo se podría muestrear durante todo el año al ostión y con esta información realizar un modelo de proceso de la enfermedad y la verificación de las respuestas del modelo con estudios de campo y de laboratorio.

Un resultado muy interesante de este estudio tiene que ver, justamente, con el proceso de cultivo. Se sabe que en la costa Este de E.U.A, la engorda del ostión del Este dura unos 24 meses, es decir, que se cosecha durante el verano del segundo año, es en esta época del año cuando la infección por *P. marinus* alcanza sus máximos niveles y el riesgo de ocurrencia de altas mortalidades es inminente (Burreson y Ragone-Calvo, 1996). Para el caso de Nayarit, el ostión de placer se engorda alrededor de 10 meses y se comercializa localmente. Su demanda es muy alta, por esto el ostión se vende pequeño, se cosecha antes del segundo verano y al parecer esto ha ayudado a contener a *P. marinus* y así evitar mortalidades. Es decir que, curiosamente, la enorme demanda del mercado y aceptación de producto de pequeño tamaño, podría estar ayudado sin proponérselo, a cierto control de la Perkinsosis en la zona estudiada. Desde luego, esta observación debe ser corroborada por un estudio bianual.

Dada la creciente demanda y producción comercial del ostión en Nayarit y en los estados vecinos, así como el fomento de su cultivo, han ocurrido y siguen ocurriendo movimientos de lotes dentro y fuera del Estado, promoviendo así la dispersión del patógeno en los estados vecinos de Sinaloa y Sonora. Existen varias evidencias del movimiento de lotes de *C. corteziensis* en la región, entre ellos tenemos la transferencia de ostiones adultos de *C. corteziensis* de Bahía de Ceuta, Sinaloa, para la producción de semilla en el laboratorio del CIBNOR, La Paz B.C.S. (Chávez-Villalba *et al.*, 2005), después la semilla se trasladó al CIBNOR en Guaymas, Sonora, para realizar un cultivo experimental. También se han trasladado ostiones adultos de la zona de cultivo de Boca de Camichín, Nayarit, a la ciudad de La Paz, B.C.S. (Hurtado, *et al.*, 2009a; Hurtado, *et al.*, 2009b), y de Bahía de Ceuta, Sinaloa, al CIBNOR en La Paz, B.C.S. (Arcos *et al.*, 2009). Por tales motivos, existe la necesidad de conocer si *P. marinus* está presente y de qué forma en los estados vecinos a Nayarit y en la región. Lo cual se está haciendo para el estado de Sinaloa (Pineda-García *et al.*, 2011). También

es necesario llevar a cabo de manera experimental ensayos de infección y evaluar los efectos de los factores físico-químicos sobre la patogénesis.

La identificación de la especie de *P. marinus*, se realizó mediante el análisis de la secuencia ITS obtenida, sin embargo, se recomienda la amplificación de la secuencia NTS especie-específico y la comparación de la misma con la presentada por Cáceres-Martínez *et al.*, en el año 2008, obtenida de zonas de cultivo de Nayarit. Por el momento, el análisis de la secuencia obtenida nos indica una similitud con *P. marinus* de los Estados de Massachusetts, New Jersey, Virginia, South Carolina y Luisiana E.U.A., lo que soporta aún más el hecho del arribo de *P. marinus* a partir de la Costa Este de E.U.A. y Golfo de México.

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 prueba Q de Cochran mostró la diferencia significativa entre las técnicas, con un valor de $P < 0.001$. La técnica histológica ha permitido observar el daño y alteraciones causadas por *P. marinus* al hospedero. Esta técnica es la única que nos permite visualizar al parásito dentro del ostión y también, cuantificar las alteraciones causadas, con lo cual se recomienda como técnica de base.

La Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE, 2009) hace una valoración, algo confusa, acerca del uso de técnicas de diagnóstico de *P. marinus*, según su finalidad. Se menciona que para términos de diagnóstico, el cultivo en FTM y la histología tienen ciertas limitantes, ya que el primero no es específico y el segundo es un método costoso y no muy preciso. Con respecto a la técnica de PCR, ésta sólo se recomienda como prueba final una vez que el parásito haya sido observado por medio de cultivo en FTM o por histología. Como podemos ver, la recomendación de OIE no es muy clara.

Sin embargo, el hecho de que no se considere muy recomendable la utilización de la técnica histológica por cuestiones de utilidad y disponibilidad no la hacen poco efectiva. Por el contrario, es una herramienta que nos permite hacer observaciones del estado general de salud del hospedero y también el efecto causado por *P. marinus*. Además de observar al parásito en sus diferentes estadios de su ciclo de vida, la histología nos permite cuantificar el daño causado al ostión por este parásito y relacionar dicho daño con las posibles mortalidades de ostiones infectados. La tinción rutinaria de Hematoxilina-Eosina/Floxina es adecuada para realizar estas observaciones, porque las células de *P. marinus* son de tinción basófila, lo cual favorece su observación. Al observar tejidos invadidos por *P. marinus*, tales como el epitelio del intestino y el tejido conectivo, apreciar la necrosis causada y la respuesta de los mecanismos de defensa del ostión, podemos considerar a esta técnica como válida para describir la prevalencia e intensidad de *P. marinus* en este estudio.

Es necesario considerar igualmente valiosa la herramienta molecular de PCR, debido a que, junto con la secuenciación de los fragmentos obtenidos, corrobora de manera específica la especie de *Perkinsus* sp. que se encuentra en las muestras analizadas. Esta técnica es la más sensible y específica de todas las utilizadas en este trabajo. Puede ser muy útil en programas de vigilancia, pero no es posible determinar la intensidad de la infección, a menos que se utilizara una PCR en tiempo real que permitiera la cuantificación de ADN del parásito en la muestra o una técnica de PCR cuantitativo. En ambos casos, aún quedaría por hacer la validación correspondiente utilizando como referencia la intensidad de la infección mediante la técnica histológica. Tampoco es posible corroborar casos positivos o negativos a menos que se cuente con el apoyo de las otras técnicas utilizadas en este estudio.

El cultivo en FTM es una técnica con relativamente buena sensibilidad, sin embargo su baja especificidad no la hacen recomendable, ya que se han

observado preparaciones de falsos positivos de *Perkinsus* sp., las cuales pudieran contener algunas especies de dinoflagelados u artefactos que se tiñen con lugol de manera similar a las hipnosporas de *Perkinsus* sp. Esta técnica se recomienda sólo en combinación con la técnica histológica y/o PCR. Además, en el caso de la detección en una nueva localidad o en otro hospedero, sería necesaria la confirmación de la especie de *Perkinsus* por medio de la secuenciación. Por otro lado, para medir la intensidad de la infección no es recomendable utilizarla, debido a que los resultados aquí mostrados no coinciden con la intensidad observada por histología. El uso de controles positivos en las técnicas donde se observa al parásito es de suma importancia para reducir resultados falsos y ayuda al observador a familiarizarse con la morfología y tamaño de *Perkinsus* sp., lo cual facilita su correcta detección.

Por todo lo anterior, para determinar un resultado positivo, se deben tener al menos evidencia de la presencia de *P. marinus* en dos técnicas, en donde por lo menos, una sea posible la visualización del parásito: ya sea cultivo en FTM e histología, o FTM y PCR, o histología y PCR. También se consideró un resultado positivo si el parásito fue visualizado por medio de la técnica histológica, ya que su observación en el tejido no deja ningún lugar a dudas. Por el contrario, un resultado positivo únicamente a partir de PCR y negativo por las técnicas de FTM e histología, debe ser repetido o respaldado por otra técnica, esto es especialmente importante en zonas donde, previamente, no se conoce registros del parásito.

La técnica histológica resultó ser la más efectiva en este estudio con un 90.10% de efectividad. La efectividad del cultivo en FTM fue de 49.51%, siendo la más baja de los tres diagnósticos. Por lo tanto, es necesario cuestionar si realmente el cultivo en FTM está proporcionando resultados confiables para la detección de *P. marinus*. Esta técnica está formalmente recomendada por la OIE, mientras que la técnica histológica no lo está debido a su costo. Sin embargo, es de suma

importancia mejorar los criterios de recomendación que realiza la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE), aunque el costo de alguna técnica parezca caro, ya que el beneficio es mucho mayor. Se debe considerar si se está cumpliendo con las necesidades de un diagnóstico y descripción correcta de este parásito, ya que esto nos ayudaría a un mejor control de la dispersión de este parásito.

V.2 Conclusiones

1. El parásito *Perkinsus marinus* se encuentra bien establecido en todas las lagunas costeras estudiadas del estado de Nayarit, en el ostión de placer *Crassostrea corteziensis*.
2. La prevalencia e intensidad de *P. marinus* fue mayor en las poblaciones de cultivo que en las naturales.
3. El curso de la infección causado por *P. marinus* en *C. corteziensis* es similar al descrito para el ostión del Este, *C. virginica*.
4. Para un diagnóstico correcto de *P. marinus* es necesario tener un resultado positivo en al menos dos técnicas o la visualización del parásito por medio de la técnica histológica en un área conocida de su distribución.
5. La técnica histológica es la recomendable para definir la intensidad de la infección.
6. Es necesario establecer medidas de bioseguridad para evitar la dispersión del parásito.

V.3 Recomendaciones

- Una vez definida la distribución de *Perkinsus marinus* en el Estado de Nayarit es indispensable recomendar la implementación de medidas sanitarias a los lotes de organismos que se transfieren del Golfo de México al Pacífico o entre localidades, así como entre los estados de Nayarit, Colima, Jalisco, Sinaloa, Sonora y hacia la península de Baja California.
- De igual manera se recomienda no trasladar ostiones de zonas conocidas de distribución del parásito *P. marinus* a zonas donde no se ha registrado la presencia del parásito.
- También se recomienda realizar un tratamiento efectivo a los desechos de los ostiones, tales como las conchas y carne, que disminuya el riesgo de dispersión de *P. marinus*.
- En las localidades de cultivo donde las prevalencias fueron las más altas 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 deben ir respaldados por un certificado sanitario que indique la presencia o ausencia de *P. marinus* y el estado sanitario general de los organismos.

Capítulo VI

V. BIBLIOGRAFÍA

- Audemard, C., K.S. Reece y E.M. Burreson. 2004. Real-time PCR for the detection and quantification of the protistan parasite *Perkinsus marinus* in environmental waters. *Applied and Environmental Microbiology*. 70: 6611-6618 p.
- Andrews, J.D. 1980. *Perkinsus marinus* (= *Dermocystidium marinum*, "Dermo") in Virginia, 1950-1980. Virginia Institute of Marine Science Data Report 16, Gloucester Point.
- Andrews, J.D. y S.M. Ray. 1988. Management strategies to control the disease caused by *Perkinsus marinus*. Special Publication. American Fisheries Society. 18:257-264 p.
- Andrews, J.D. 1996. History of *Perkinsus marinus*, a pathogen of oysters in Chesapeake Bay 1950-1984. *Journal of Shellfish Research*. 15 (1): 13-16 p.
- Arcos, F.G., A.M. Ibarra, M.C. Rodríguez-Jaramillo, E.A. García-Latorre y C. Vazquez-Boucard. 2009. Quantification of vitellin/vitellogenin-like proteins in the oyster *Crassostrea corteziensis* (Hertlein 1951) as a tool to predict the degree of gonad maturity. *Aquaculture Research*. 40: 644-655 p.
- Auzoux-Bordenave, S., A.M. Vigario, F. Ruano, I. Domart Coulon, D. Doumenc. 1995. *In vitro* sporulation of the clam pathogen *Perkinsus atlanticus* (Apicomplexa, Perkinsea) under various environmental conditions. *Journal of Shellfish Research*. 14: 469-475 p.
- Azevedo, C. 1989. Fine structure of *Perkinsus atlanticus* n. sp. (Apicomplexa, Perkinsea) parasite of clams, *Ruditapes decussatus*, from Portugal. *Journal of Parasitology*. 75: 627-635 p.

- Barnes Robert D. Zoología de los Invertebrados. 1986. México. Cuarta Edición. Interamericana. 1157 pp.
- Blackbourn, J., S.M. Bower y G.R. Meyer. 1998. *Perkinsus qugwadi* sp.nov. (incertae sedis), a pathogenic protozoan parasite of Japanese scallops, *Patinopecten yessoensis*, cultured in British Columbia, Canada. Canadian Journal of Zoology. 76: 942-953 p.
- Brown, G.D., K.L. Hudson y K.S. Reece. 2004. Multiple polymorphic sites at the ITS and ATAN loci in cultured isolates of *Perkinsus marinus*. Journal of Eukaryotic Microbiology. 51 (3): 312-320 p.
- Burreson, E.M., R.S. Álvarez, V. Vidal y M.L. Aguirre. 1994. *Perkinsus marinus* (Apicomplexa) as a potential source of Oyster *Crassostrea virginica* mortality in coastal lagoons of Tabasco, México. Diseases of Aquatic Organisms. 20: 77 – 82 p.
- Burreson, E.M. y L.M. Ragone Calvo. 1996. Epizootiology of *Perkinsus marinus* disease of oysters in Chesapeake Bay, with emphasis on data since 1985. Journal of Shellfish Research. 15: 17–34 p.
- Bushek, D., S.E. Ford y M.M. Chintala. 2002. Comparison of *in vitro*-cultured and wild-type *Perkinsus marinus*. III. Fecal elimination and its role in transmission. Diseases of Aquatic Organisms. 51: 217-225 p.
- Cáceres-Martínez, J. 2002. Algunas enfermedades de moluscos: Enfermedad de Dermo o Perkinsosis. Boletín del programa Nacional de Sanidad Acuicola y la Red de Diagnóstico. 5. 2 (18): 2-6 p.
- Cáceres-Martínez, J., R. Vásquez Yeomans, G. Padilla Lardizábal y M.A. Del Río Portilla. 2008. *Perkinsus marinus* in pleasure oyster *Crassostrea corteziensis* from Nayarit, Pacific coast of México. Journal of Invertebrate Pathology. 99: 66–73 p.
- Cáceres-Martínez, J., R. Vásquez Yeomans y G. Padilla Lardizábal. 2010. Parasites of the pleasure Oyster *Crassostrea corteziensis* cultured in Nayarit, Mexico. Journal of Aquatic Animal Health. 22: 141-151 p.

- Casas, S.M., A. Villalba y K.S. Reece. 2002. Study of perkinsosis in the carpet shell clam *Tapes decussatus* in Galicia (NW Spain). I. Identification of the etiological agent and *in vitro* modulation of zoosporulation by temperature and salinity. *Diseases of Aquatic Organisms*. 50: 51-65 p.
- CESANAY, 2009. Comité de Sanidad Acuícola del Estado de Nayarit. Consultado en: Junio 2010 www.cesanay.com.
- Chávez-Villalba, J., M. López-Tapia, J. Mazón-Suástegui y M. Robles-Mungaray. 2005. Growth of the oyster *Crassostrea corteziensis* (Hertlein, 1951) in Sonora, México. *Aquaculture Research* 36: 1337-1344 p.
- Chu, F.L. y K.H. Greene. 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.
- 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.
- Comisión Nacional de Acuicultura y pesca CONAPESCA. 2008. Programa maestro nacional de ostión. Consultado en: Julio de 2009 <http://www.conapesca.sagarpa.gob.mx>
- Comisión Nacional de Acuicultura y pesca CONAPESCA. 2009. Anuario estadístico de pesca y acuicultura 2009.
- Dawson, C.E. 1955. Observations on the intensity of *Dermocystidium marinum* infection in oysters from Apalachicola Bay, Florida. *Texas Journal of Science*. 7:47-56 p.
- Eble, A.F. y R. Scro. 1996. Chapter 2 General Anatomy. En: Kennedy, V.S., R.I. Newell y A.F. Eble. *The Eastern Oyster, Crassostrea virginica*. Maryland Sea Grant College, Maryland. 19-73 p.

- Fisher W.S. y L.M. Oliver. 1996. A whole-oyster procedure for diagnosis of *Perkinsus marinus* disease using Ray's fluid Thioglycollate culture medium. *Journal of shellfish Research*. 15 (1): 109-117 p.
- Galtsoff, P.S. 1964. The american oyster *Crassostrea virginica* Gmelin. *Fishery bulletin of the Fish and Wildlife Service*. Fish. Volume 64. 480 pp.
- Goggin, C.L. y S.C. Barker. 1993. Phylogenetic position of the genus *Perkinsus* (Protista, Apicomplexa) based on small subunit ribosomal RNA. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 65: 179-182 p.
- Goggin, C.L. y R.J.G. Lester. 1995. *Perkinsus*, a protistan parasite of abalone in Australia: a review. *Aust. Journal of Marine and Freshwater Research*. 46: 639-646 p.
- Goldsborough, W. y D. Meritt. 2001. Oyster Gardening for Restoration and Education. Maryland Sea Grant College Program for the Oyster Alliance Publication Number UM-SG-SGEP-99-05 1-12 p.
- Howard, D. W., y C.S Smith. 1983. Histological Techniques for marine bivalve mollusks. NOAA Technical Memorandum NMFS-F/NEC-25. Massachusetts. 97 pp.
- Howard, D.W., E.J. Lewis, J. Keller y C.S. Smith. 2004. Histological Techniques for marine bivalve mollusk and crustaceans. NOAA Technical Memorandum NOS NCCOS 5. Segunda edición. Oxford. 218 pp.
- Hurtado, M.A., J.L. Ramírez, C. Rodríguez-Jaramillo, D. Tovar, A.M. Ibarra, P. Soudant y E. Palacios. 2009a. Comparison of continuous and batch feeding systems on maturation, biochemical composition and immune variables of the oyster *Crassostrea corteziensis* (Hertlein 1951). *Aquaculture Research*. 40: 464-472 p.
- Hurtado, M.A., M. Reza, A.M. Ibarra, M. Wille, P. Sorgeloos, P. Soudant y E. Palacios. 2009b. Arachidonic acid (20:4n-6) effect on reproduction, immunology, and prostaglandin E2 levels in *Crassostrea corteziensis* (Hertlein, 1951). *Aquaculture*. 294: 300-305 p.

- ISA. Instituto de Sanidad Acuícola, A. C. 2009. Diagnóstico histopatológico de 10 ejemplares de ostión de Placer, *Crassostrea corteziensis*, pertenecientes al Comité de Sanidad Acuícola del Estado de Sonora, A. C. Hermosillo, Son., México. Julio 2009.
- Kennedy, V. 1996. Chapter 10 Biology of Larvae and Spat. En: Kennedy, V.S., R.I. Newell y A.F. Eble. The Eastern Oyster, *Crassostrea virginica*. Maryland Sea Grant College, Maryland. 371-421 p.
- Levine, N.D. 1978. *Perkinsus* gen. n. and other new taxa in the protozoan phylum Apicomplexa. Journal of Parasitology. 64: 549 p.
- Mackin, J. G., M. Owen y A. Collier. 1950. Preliminary note on the occurrence of a new Protistan parasite, *Dermocystidium marinum* n. sp. in *Crassostrea virginica* (Gmelin). Science. 111 (2883): 328 – 329 p.
- OIE. Organización Mundial de Sanidad Animal. 2009. Infection with *Perkinsus marinus*. Manual of Diagnostic Test for Aquatic Animals. Chapter 2.4.5. 342-253 p.
- OIE. Organización Mundial de Sanidad Animal. 2006. Enfermedades de los moluscos: información general. Manual de pruebas de diagnóstico para los animales. Capítulo 1.2. 297-309 p.
- 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. y R.W. Menzel. 1966. Morphological and cultural studies of a motile stage in the life cycle of *Dermocystidium marinum*. Proceedings of the National Shellfisheries Association. 56: 23-30 p.
- Perkins, F.O. 1976. Zoospores of the oyster pathogen, *Dermocystidium marinum*. I. Fine structure of the conoid and other sporozoan-like organelles. Journal of Parasitology 62:959-974 p.

- Pineda-García, T. de J., J. Cáceres Martínez, R. Vásquez Yeomans y L. Montoya Rodríguez. 2011. Distribution, prevalence and intensity of *Perkinsus marinus* in *Crassostrea corteziensis* Sinaloa, Northwest Mexico. Abstracts 44^a Reunión Anual de la Western Society of Malacologists y la XII Reunión Bienal Nacional de Malacología y Conquiología, de la Sociedad Mexicana de Malacológica A.C. 45 p.
- Ragone-Calvo, L.M., C.F. Dungan, B.S. Roberson y E.M. Burreson. 2003. Systematic evaluation of factors controlling *Perkinsus marinus* transmission dynamics in lower Chesapeake Bay. *Diseases of Aquatic Organisms*. 56: 75-86 p.
- Ray, S.M. 1952. A culture technique for the diagnosis of infection with *Dermocystidium marinum* Mackin, Owell and Collier in oysters. *Science*. 116: 360-361 p.
- Ray, S.M. 1954. Biological studies of *Dermocystidium marinum*, a fungous parasite of oysters. A thesis for the degree of Doctor. Rice Institute. Houston, Texas. United States of America. 119 pp.
- Ray, S.M. 1966. A review of the culture method for detecting *Dermocystidium marinum*, with suggested modifications and precautions. *Proceedings of the National Shellfisheries Association*. 54: 55-69 p.
- Ray, S.M. 1996. Historical perspective in *Perkinsus marinus* disease of oysters in the Gulf of Mexico. *Journal of Shellfish Research*. 15 (1): 9 – 11 p.
- Reece, K.S., M. Siddall, E. Burreson y J.E. Graves. 1997. Phylogenetic analysis of *Perkinsus* based on actin gene sequences. *Journal of Parasitology*. 83: 417-423 p.
- Shaw, B. L. y H.I. Battle. 1957. The gross and microscopic anatomy of the digestive tract of the oyster *Crassostrea virginica* (Gmelin). *Canadian Journal of Zoology*. 35: 325-347 p.

- Siddall, M.E., K.S. Reece, J.E. Graves y E.M. Bureson. 1997. "Total evidence" refutes the inclusion of *Perkinsus* species in the phylum Apicomplexa. *Parasitology*. 115: 165-176 p.
- Siegel, S. 1979. Estadística no paramétrica aplicada a las ciencias de la conducta. Editorial Trillas. Quinta reimpression. México D.F. 346 pp.
- Stuardo, J., A. Martínez. 1975. Relaciones entre algunos factores ecológicos y la biología, de poblaciones de *Crassostrea corteziensis* Hertlein, 1951, de San Blas, Nayarit, México. *Anales del Centro de Ciencias del Mar y Limnología UNAM*. 2: 89-130 p.
- Villalba, A., K.S. Reece, O. Camino, S.M. Casas y A. Figueras. 2004. Perkinsosis in molluscs: A review. *Aquatic Living Resources*. 17:411-432 p.
- 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.

APÉNDICE I. Protocolo para envío y recepción de muestras

Moluscos bivalvos vivos

Estos deben ser colocados en una hielera de poliestireno que en el fondo contengan bolsas de Blue Ice. Sobre el Blue Ice se coloca un separador de poliestireno (de esta manera se evita que el molusco esté en contacto directo con la bolsa). Cada organismo se coloca en una bolsa de plástico individual y el conjunto dentro de otra bolsa de plástico (grande y gruesa).

Se tapa la hielera con cinta adhesiva y se envía al laboratorio con sus correspondientes antecedentes sanitarios, es decir, la información concerniente a la localidad, observaciones de las condiciones ambientales (temperatura, salinidad, marea, eventos particulares tales como lluvias, descargas, etc.).

Es importante que no pase de 24 horas el envío de los organismos vivos hasta el laboratorio.

Antecedentes para el servicio de diagnóstico.

Es necesario incluir la siguiente información:

- a) Nombre de la Granja, Laboratorio o Empresa
- b) Localidad
- c) Fecha
- d) Descripción del evento sanitario (en caso de que aplique)
- e) Condiciones de cultivo: Sistema de cultivo, parámetros fisicoquímicos (salinidad, temperatura, OD, nutrientes o cualquier dato referente al ambiente de cultivo en particular).
- f) Características de los organismos: Edad, estadio de desarrollo, talla, peso, coloración, etc.

APÉNDICE II. Preparación del Medio de Tioglicolato, FTM

Se coloca en un matraz agua y se calienta hasta calentar el punto de ebullición. Posteriormente se agrega medio de Tioglicolato y Cloruro de Sodio (NaCl) hasta que ambos se disuelvan completamente. El matraz se remueve del calor para agregar cloranfenicol (antibiótico). Se vacía el medio de cultivo en tubos eppendorf y se esteriliza en autoclave (15 min, 15-17 lb de presión). Se guardan los tubos a temperatura ambiente y en un cuarto oscuro. Finalmente se agrega 1 gota de NISTATÍN (antimicótico) inmediatamente antes de usar el medio de cultivo. Sin agitar los tubos.

Reactivos:

Medio de cultivo en Tioglicolato

| | |
|-----------------------|----------|
| Medio de Tioglicolato | 14.6 g. |
| Cloruro de Sodio NaCl | 10.0 g. |
| Agua destilada | 485.0 ml |

Mycostatin suspensión (nystatin)

| | |
|----------------|------------------|
| Mycostatin | 500,000 unidades |
| Agua destilada | 125 ml |

Agitar bien y mantener en refrigeración.

APÉNDICE III. Preparación de la solución fijadora Davidson

Para preparar 1 litro de solución:

| | |
|----------------------|--------|
| Glicerina | 100 ml |
| Formaldehído 37% | 200 ml |
| Etanol 96% | 300 ml |
| Agua de mar filtrada | 300 ml |
| Ácido Acético | 100 ml |

Agitar antes de usarse.

APÉNDICE IV. Técnica de deshidratación

| | |
|-----------------------|---------|
| 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 |
| Parafina I | 2 horas |
| Parafina II | 2 horas |

Total 23 horas
Incluir en parafina.

APÉNDICE V. Técnica de Tinción de Hematoxilina-Eosina/Floxina

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 | 5 min. * |
| Xileno III | 5 min. * |
| Etanol 100% - I | 5 min. |
| Etanol 100% - II | 5 min. |
| Etanol 96% | 5 min. |
| Etanol 10% | 5 min. |
| Agua destilada | |

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

Tinción Hematoxilina-Eosina/Floxina.

Desparafinar las muestras hasta hidratar en agua.

| | |
|-----------------------------|---------|
| Hematoxilina | 30 min. |
| Agua corriente | Lavar. |
| Etanol ácido | 5 seg. |
| Carbonato de litio | 2 min. |
| Agua destilada | 5 seg. |
| Etanol 96% | 3 min. |
| Eosina/Floxina | 1 min. |
| Etanol 96% - I | 2 min. |
| Etanol 96% - II | 2 min. |
| Etanol 100% - I | 3 min. |
| Etanol 100% - II | 3 min. |
| Xileno I | 5 min. |
| Xileno II | 5 min. |
| Xileno III | 5 min. |
| Montar en resina sintética. | |

APÉNDICE VI. Prueba Q de Cochran

Se utilizó la prueba Q de Cochran porque los datos son para más de dos grupos relacionados ($k = 3$) y son dicotomizados como “positivo” y “negativo” a *P. marinus*.

H_0 : No hay diferencia significativa entre las tres técnicas de diagnóstico para *Perkinsus marinus*.

H_1 : Hay diferencia significativa entre las tres técnicas de diagnóstico para *Perkinsus marinus*.

Los datos del estudio están en la tabla VIII. También aparecen en la tabla los valores de L_i (el número total de número total de casos positivos de todas las técnicas) y los valores de L_i^2 . Por ejemplo en el primer conjunto igualado, todas las técnicas de diagnóstico mostraron un resultado negativo. Así, $L_1 = 0 + 0 + 0 = 0$ y $L_1^2 = 0^2 = 0$.

Los puntajes se colocaron en $k = 3$ columnas y $N = 720$ hileras. Se observó que $G_1 = 153 =$ número total de resultados positivos a la técnica de FTM. $G_2 = 202 =$ número total de resultados positivos a la técnica histológica. Y $G_3 = 227 =$ número total de resultados positivos a la técnica de PCR. El número total de resultados positivos para las tres técnicas = $\sum G_i = 153 + 202 + 227 = 582$ (la suma total de los casos positivos de las técnicas, $\sum L_i$. El cuadrado de la suma de los casos positivos de las técnicas es $\sum L_i^2 = 1330$.

Tabla VIII. Resultado positivo (1) y negativo (0) dados por las técnicas de diagnóstico para la detección de *Perkinsus marinus*.

| Muestra | FTM | Histología | PCR | L_i | L_i^2 |
|------------|-------------|-------------|-------------|------------------|---------------------|
| Ostión 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Ostión 2 | 1 | 1 | 1 | 3 | 9 |
| Ostión 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Ostión 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Ostión 5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Ostión 6 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Ostión 7 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Ostión 8 | 1 | 1 | 1 | 3 | 9 |
| Ostión 9 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Ostión 10 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Ostión 11 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Ostión 12 | 1 | 1 | 1 | 3 | 9 |
| Ostión 13 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Ostión 14 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Ostión 15 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Ostión 16 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Ostión 17 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Ostión 18 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Ostión 19 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Ostión 20 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| ... | | | | | |
| Ostión 720 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | $G_1 = 153$ | $G_2 = 202$ | $G_3 = 227$ | $\sum L_i = 582$ | $\sum L_i^2 = 1330$ |

Poniendo estos valores en la fórmula tenemos:

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

$$= \frac{(3 - 1) \{ 3 [(153)^2 + (202)^2 + (227)^2] - (582)^2 \}}{(3) (582) - 1330}$$
$$= 40.875$$

La referencia a la tabla de valores críticos de chi cuadrada de Fisher y Yates revela que $Q = 40.875$ tiene una probabilidad de ocurrencia conforme a H_0 de $P < 0.001$, cuando $gl = k - 1 = 3 - 1 = 2$. Así, el valor de Q está en la región de rechazo y por lo tanto se tomó la decisión de rechazar la H_0 y aceptar la H_1 .

APENDICE VII Participación en congresos y otras actividades de difusión derivados del trabajo de tesis

Navarro-Barrera A., Padilla-Lardizábal G., Vásquez-Yeomans R. y Cáceres-Martínez J. 2010. Distribution of *Perkinsus marinus* in natural and culture populations of *Crassostrea corteziensis* in Nayarit, México during winter. World Aquaculture Society International Congress San Diego California.

Navarro-Barrera A., Cáceres-Martínez J., Vásquez-Yeomans R. y Padilla-Lardizábal G. 2011. Distribution of *Perkinsus marinus* and histopathological alterations in natural and cultured populations of *Crassostrea corteziensis* in Nayarit, México. 44^a Reunión Anual de la Western Society of Malacologists y la XII Reunión Bienal Nacional de Malacología y Conquiología, de la Sociedad Mexicana de Malacológica A.C., La Paz B.C.S.

Entrevista de radio en el programa "En la Frontera del Conocimiento" (ELFC) del Sistema Universitario de Radio (SUR) de la Universidad Autónoma de Baja California (UABC), el mes de enero de 2011, a través del 95.5 FM en la ciudad de Ensenada B.C.