

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y DE EDUCACIÓN SUPERIOR  
DE ENSENADA, BAJA CALIFORNIA**



---

**Programa de Posgrado en Ciencias  
en Acuicultura**

---

Cultivo *in vitro* de *Perkinsus marinus* y desarrollo de la infección en el ostión de plumer  
*Crassostrea corteziensis*, bases para el establecimiento de medidas de bioseguridad

Tesis

que para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de  
Maestro en Ciencias

Presenta:

David Eduardo Guzmán Lerma

Ensenada, Baja California, México  
2014

Resumen de la tesis de David Eduardo Guzmán Lerma, presentada como requisito parcial para la obtención del grado Maestro en Ciencias en Acuicultura.

Cultivo *in vitro* de *Perkinsus marinus* y desarrollo de la infección en el ostión de placer *Crassostrea corteziensis*, bases para el establecimiento de medidas de bioseguridad.

Resumen aprobado por:

---

Dr. Jorge Abelardo Cáceres Martínez  
Director de Tesis

Resumen

Entre las principales enfermedades que afectan la producción ostrícola a nivel mundial se encuentra la Perkinsiosis o enfermedad de Dermo causada por un grupo de protistas del Phylum Apicomplexa. Por su impacto económico, esta enfermedad ha sido listada por la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE). Hacia finales del año 2006 se confirmó la presencia de *Perkinsus marinus* en el ostión de placer *Crassostrea corteziensis* del Estado de Nayarit y posteriormente en los estados de Sinaloa y Sonora. Estos hallazgos constituyen una ampliación en el rango de distribución de *P. marinus* y también añaden otra especie de ostión susceptible a este parásito. Evidencias histopatológicas muestran diferentes grados de desarrollo de la enfermedad. Ante este escenario, es fundamental determinar la susceptibilidad de *C. corteziensis* a *P. marinus* a nivel de laboratorio. Para tal efecto, fue necesario aislar al parásito, establecer su cultivo *in vitro* y realizar infecciones experimentales. El aislamiento del parásito se realizó mediante incubación en fluido de tioglicolato de tejido infectado y posterior separación de hiposporas mediante filtración. Los estadios obtenidos se cultivaron en medio 1:2 DME: Ham's F12, incubándose durante 14 días. Se realizó un bioensayo de infección en *C. corteziensis*, empleándose distintas dosis de infección. El bioensayo tuvo una duración de 65 días. Los resultados mostraron, que *C. corteziensis* es infectado a dosis de 3,000 y 6,000 células por ostión mientras que dosis de 1,500 células por ostión no lograron inducir la infección. En los ostiones infectados no hubo evidencias histológicas que indicaran desarrollo de la enfermedad ni se registró mortalidad asociada con la infección. Estos resultados demuestran cierta resistencia a la enfermedad si los comparamos con lo reportado en la literatura para inducir y desarrollar la enfermedad en el ostión americano *Crassostrea virginica*. Por otro lado, un bioensayo de infección con *C. gigas* corroboró que esta especie posee una resistencia innata a la infección por *P. marinus*. Es necesario optimizar el cultivo *in vitro* del parásito y determinar la dosis letal media. Los resultados obtenidos constituyen el primer estudio de aislamiento e infectología con *P. marinus* en nuestro país. Medidas generales de bioseguridad tendientes a utilizar bajas densidades de cultivo, manejo adecuado de desechos durante la cosecha, manejo de restos durante episodios de mortalidad y un seguimiento epidemiológico sugerirían un buen control de la perkinsiosis dada su aparente menor susceptibilidad de *C. corteziensis* respecto al ostión americano.

Palabras clave: ***Perkinsus marinus*, cultivo *in vitro*, Medio de cultivo, *Crassostrea corteziensis*, *Crassostrea gigas*, Susceptibilidad.**

Abstract of the thesis presented by David Eduardo Guzmán Lerma as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Acuaculture.

*In vitro* culture of *Perkinsus marinus* and development of infection in pleasure oyster *Crassostrea corteziensis* bases for establishing biosecurity measures.

Abstract approved by:

---

Dr. Jorge Abelardo Cáceres Martínez  
Director de Tesis

Among the major diseases affecting oyster production worldwide is the Perkinsiosis or Dermo disease caused by a group of protists the phylum Apicomplexa. Due to the economic impact of this disease, has been listed by the World Organization for Animal Health (OIE). At the end of 2006 the presence of *Perkinsus marinus* was confirmed in the pleasure oyster *Crassostrea corteziensis* in Nayarit and later in Sinaloa and Sonora. These findings extended the distributional range of *P. marinus* and also added another oyster species susceptible to this parasite. Histopathological evidences show different degrees of disease development. Given this scenario, it is essential determining the susceptibility of *C. corteziensis* to *P. marinus* in laboratory conditions. For this purpose, was necessary to isolate the parasite, establish their culture *in vitro* and perform experimental infections. The isolation of the parasite was performed by incubation in Ray's Fluid Thioglycollate medium of infected tissue and further separation of hipnospores by filtration. Stages obtained were cultured in 1:2 DME: Ham F12 incubated for 14 days. Further, an infection bioassay was performed in *C. corteziensis*, using different doses of infection. The bioassay lasted 65 days. The results showed that *C. corteziensis* is infected at doses of 3,000 and 6,000 cells per oyster while doses of 1,500 cells per oyster failed to induce infection. Infected oysters did not show histological evidence indicating the development of disease neither mortality associated to the infection. These results show some resistance to infection and disease development when are compared with those reported in the literature relative to infection induction and the development of the disease in American oyster *Crassostrea virginica*. Moreover, infection bioassay of *C. gigas* confirmed that this species has innate resistance to the infection by *P. marinus*. It is necessary to optimize the *in vitro* culture in order to determine the median lethal dose of the parasite. The results constitute the first study of isolation and infectology with *P. marinus* in Mexico. General biosecurity measures aimed at low culture densities, proper waste management during harvesting, handling remains during episodes of mortality and epidemiological monitoring suggest a good control of the perkinsiosis given the apparent lower susceptibility of *C. corteziensis* compared to American oyster.

**Keywords:** *Perkinsus marinus*, *in vitro* culture, Culture medium, *Crassostrea corteziensis*, *Crassostrea gigas*, Susceptibility.

## Dedicatoria

### A todos ustedes

Esta tesis representa para mí un fruto de mi formación tanto profesional como personal, logrado a partir de un proceso que inicio el primer día de clases en la escuela, cuando poco sabía lo que era una letra o un número y me sitúa ahora en este peldaño, gracias a mis maestros. Mis valores y principios fueron labrados por mis padres Eduardo y Ana Aurora a quienes amo profundamente y doy gracias por la vida que me brindaron, su participación es y será siempre parte fundamental de todos mis logros. Irey, hermanos, Lupita, abuelos, tíos, mi familia, a ustedes por sus consejos y apoyo. Amigos, vivimos juntos una misma época, una forma similar de pensar, algo que nos hace afines y que permite queramos ayudarnos, a ustedes por compartir esas alegrías y sufrimientos. Por su compañía y amor, a mi prometida Fabiola quien ha complementado mi vida, apoyándome firmemente, disfrutando logros y superando fracasos como un mismo ser, por lo que esta meta también es por ti y para ti. A mi hijo Jesus David por ser ese niño alegre, inteligente y noble de corazón, tú me inspiras y enorgulleces por lo que esto también es por ti. Finalmente a Dios por su bendición a quien le pido cuide a todos ustedes, mis seres queridos.

## Agradecimientos

A mi director de tesis de tesis Dr. Jorge Cáceres Martínez por su paciencia, enseñanza y orientación en este proceso de superación profesional.

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE) por abrir esta brecha de formación científica y fomentar la superación profesional.

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

A la Dra. Rebeca Vásquez Yeomans por la asesoría, capacitación y supervisión en el procesamiento de mis muestras.

A la Dra. Beatriz Cordero Esquivel por su apoyo, consejo y facilitarme en todo momento material de su laboratorio.

Al Dr. Miguel Ángel del Río Portilla por su enseñanza y consejo siempre tan acertado.

A la Dra. Bertha Eugenia Lavaniegos Espejo por su participación en este proyecto de tesis.

A la M. en C. Yanet Guerrero Rentería, por el apoyo técnico y asesoría en las técnicas de incubación por tioglicolato e histología, así como por su ayuda en la búsqueda y obtención de equipo e información.

A la M. en C. Ananda Aracely Navarro por la ayuda y disposición que siempre brindo en el procesamiento de mis muestras, así como por el asesoramiento en el aprendizaje de las distintas técnicas de diagnóstico.

A la Dra. Mónica Hernández Rodríguez por su enseñanza, ayuda y consejo en esta travesía por CICESE.

Al Dr. Manuel Alberto Segovia Quintero por su asesoramiento, consejo y apoyo en CICESE.

A la Dra. Marysabel Báez Hidalgo por su asesoramiento en conocimientos estadísticos, así como por su ayuda y consejo.

Al Dr. Eugenio Días Iglesias por su consejo y ayuda.

A mis compañeros y amigos de generación, georgio, luisillo, ojitos locos, robertino, mano ruiba, lalo, gilberto, mónica, aracelo y omarus por su consejo, ayuda y compañía, hicieron de esta experiencia algo grato y digno de recordar, les deseo lo mejor.

A Erika, Chuy, Alex, Isa, Sara, Carlos, Nancy por su amistad, consejo y apoyo, a pesar de las distancias y tiempos, los estimo y recuerdo con cariño, considerándolos mis amigos por siempre, los quiero.

A mis tíos, primos y abuelos por apoyarme y alentarme a seguir adelante, en especial a Lupita por ser como mi segunda madre.

A mis hermanos Ana Irey, Iris y Alonso por su consejo, apoyo y cariño a lo largo de mi vida.

A Don Gustavo Salcedo por sus consejos, que junto con Lourdes Moran dieron vida a la mujer que ahora me acompaña e inspira.

A Fabiola Salcedo Moran por siempre ayudarme, por estar a mi lado y acompañarme, buenas o malas, salimos adelante juntos. Por tu cariño y amor siempre estaré agradecido. Te amo.

A mi hijo Jesús David, únicamente tu existencia es digna de agradecerse. Nunca olvides que te amo.

Especialmente a mis padres, no hace falta decir el por qué, solo diré que si volviera a nacer, desearía el que ustedes volvieran a ser mis padres.

A Dios por la vida.

## CONTENIDO

	Página
Resumen español	ii
Resumen inglés	iii
Dedicatorias	iv
Agradecimientos	v
Lista de Figuras	ix
Lista de Tablas	xi
Capítulo 1. Introducción	
1.1 Género <i>Perkinsus</i>	1
1.2 Descubrimiento de <i>P. marinus</i>	2
1.3 Taxonomía y ciclo de vida	3
1.4 Transmisión	5
1.5 Infección	6
1.6 Interacción parásito hospedero: progresión de la infección y respuesta inmune	8
1.7 Cultivo <i>in vitro</i> de <i>Perkinsus marinus</i>	9
1.8 Medios de cultivo para la proliferación de <i>Perkinsus marinus in vitro</i>	10
1.9 Medidas de control y estrategia de manejo empleados para mitigar los brotes de <i>P. marinus</i>	11
1.10 <i>Perkinsus marinus</i> en México	12
1.11 Panorama actual	13
Capítulo 2. Justificación, hipótesis y objetivos	
2.1 Justificación	15
2.2 Hipótesis	16
2.3 Objetivo general	16
2.4 Objetivos particulares	16

	Página
Capítulo 3. Materiales y métodos	
3.1 Características generales del área donde se obtuvieron los ostiones parasitados por <i>Perkinsus marinus</i>	17
3.2 Muestreo de <i>Perkinsus marinus</i>	17
3.3 Incubación de tejido en Fluido de Tioglicolato (FT)	18
3.4 Preparación del medio de cultivo DME:Ham F12 (1:2)	19
3.5 Cultivo <i>in vitro</i> de <i>Perkinsus marinus</i>	20
3.6 Bioensayo de infección en <i>Crassostrea corteziensis</i>	22
3.7 Bioensayo de infección en <i>Crassostrea gigas</i>	24
3.8 Pruebas de diagnóstico empleadas	
3.8.1 Diagnóstico mediante el uso de fluido de tioglicolato	25
3.8.2 Diagnóstico por Histología	26
3.9 Confirmación molecular de <i>Perkinsus marinus</i>	
3.9.1 Extracción de ADN	27
3.9.2 Preparación de la PCR	28
3.10 Determinación de la infección	28
3.11 Análisis estadístico	29
Capítulo 4. Resultados	
4.1 Cultivo <i>in vitro</i> de <i>Perkinsus marinus</i>	30
4.2 Bioensayo de infección de <i>Crassostrea corteziensis</i>	32
4.3 Bioensayo de infección de <i>Crassostrea gigas</i>	38
Capítulo 5. Discusión, Conclusiones y Recomendaciones	
5.1 Discusión	40
5.2 Conclusiones	45
5.3 Recomendaciones	46
Referencias bibliográficas	47
Apéndices	55

## Lista de figuras

Figura		Página
1	Distribución de algunas especies del género <i>Perkinsus</i> alrededor del mundo.	1
2	Ciclo de vida vegetativo de <i>P. marinus</i> .	4
3	Ciclo de vida libre de <i>P. marinus</i> .	5
4	Toma de muestra de tejido blanco del ostión (recto, branquia y glándula digestiva). (2) Introducción del tejido blanco en tubos Eppendorf que contienen fluido de tioglicolato y antimicótico nystatin. (3) Incubación de las muestras a temperatura ambiente y en oscuridad.	18
5	Hipnosporas incubadas en fluido de tioglicolato vista a 10 X en microscopio.	19
6	Esquematización del cultivo <i>in vitro</i> de <i>P. marinus</i> .	22
7	(A) Muesca realizada en la zona adyacente al músculo aductor del ostión. (B) Inyección de 150 $\mu$ L en el músculo aductor del ostión. Todos los ostiones inoculados mediante este procedimiento cerraron su muesca después de 4~5 días.	23
8	Figura 8. Vista general del laboratorio donde se llevo a cabo los bioensayos de infección. En total se dispusieron de 12 acuarios, con 10 ostiones por acuario. El experimento tuvo una duración de 65 días.	24
9	Figura 9. (A) Hifas y esporangios que se desarrollaron durante el proceso de optimización de la técnica de cultivo. (B) Hipnospora rodeada por bacterias. (C) Hipnospora en división. (D) Hipnospora con células hijas.	30
10	(A) Hipnospora con la pared celular rota en donde se aprecia la liberación del contenido al exterior. La ruptura de la pared fue debida a la manipulación de la muestra. (B) Al paso de 1 a 2 días en las células liberadas se aprecia un núcleo en su interior.	31
Figura		Página

- 11 (A) y (B) Tejido de *C. gigas* incubado en fluido de tioglicolato, donde se observa una presunta hipnospora, después de 95 días de haberse efectuado las inoculaciones. 32
- 12 (A) Corte histológico de *C. gigas* donde se observa el epitelio columnar ciliar sano y sin presencia de *P. marinus*, después de 95 días de la inoculación. (B) Detección de *P. marinus* por medio de PCR. Marcador molecular (MM), control positivo (CP) y ninguna muestra (1-5) se evidencia a la par del CP, lo que indica ausencia de *P. marinus*. 33
- 13 Porcentaje de infección por grupos de ostiones en los tres muestreos (20, 44 y 65 días), donde C es el grupo control, D1 el grupo inoculado con 1,500 cél./ostión, D2 el grupo inoculado con 3,000 cél./ostión y D3 el grupo inoculado con 6,000 cél./ostión. En la figura se indica la media (punto blanco) y el error típico (intervalo superior). 34
- 14 Imágenes de ostiones que resultaron positivos a la prueba del FT. 35
- 15 Detección molecular de *P. marinus* por PCR con el uso de iniciadores para la región ITS. 36
- 16 (A) y (B) Epitelio columnar ciliar del ostión sin presencia de *P. marinus*. 36
- 17 Intensidad de infección por grupos a través de los tres muestreos (20, 44 y 65 días), donde C es el grupo control, D1 el grupo inoculado con 1,500 cél./ostión, D2 el grupo inoculado con 3,000 cél./ostión y D3 el grupo inoculado con 6,000 cél./ostión. 37
- 18 Mortalidad promedio por grupos a través de los 20, 44 y 65 días, donde C es el grupo control, D1 el grupo inoculado con 1,500 cél./ostión, D2 el grupo inoculado con 3,000 cél./ostión y D3 el grupo inoculado con 6,000 cél./ostión. 38
- 19 Mortalidad acumulada por grupos. Aparentemente los grupos dosis 1, 2 y 3 manifestaron la misma mortalidad, mientras que el grupo control difiere relativamente en comparación. 39

## Lista de tablas

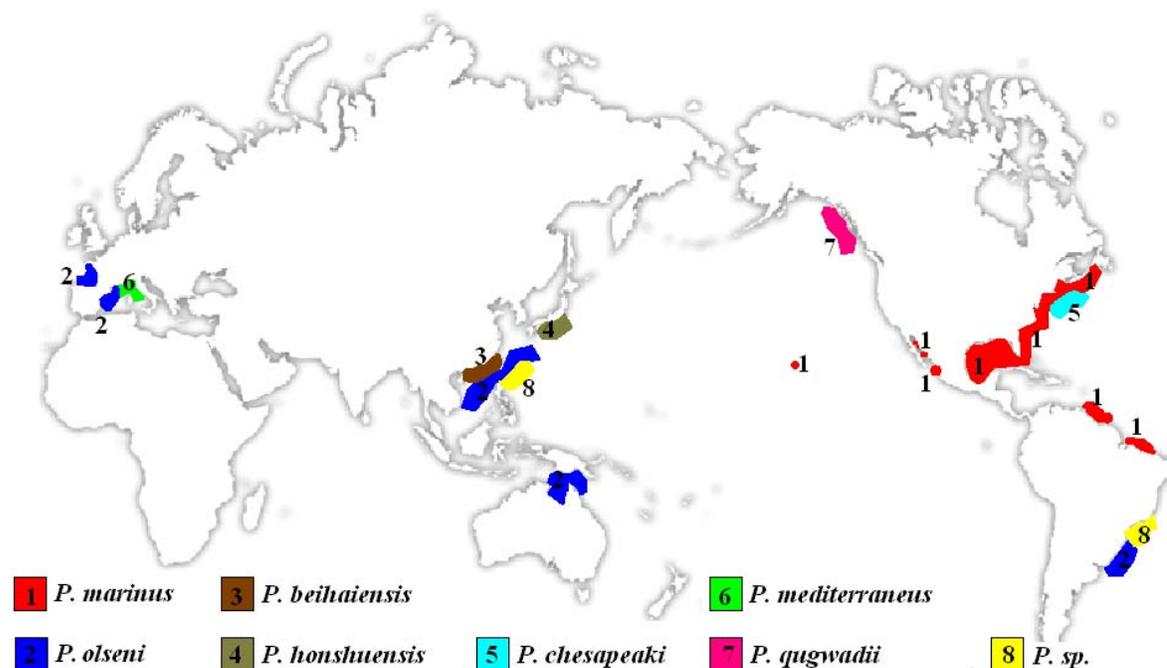
Tabla		Página
1	Comparativo entre estudios de infección realizados con <i>P. marinus</i> .	8
2	Medios y suplementos usados para la propagación <i>in vitro</i> de <i>P. marinus</i> .	10
3	Constituyentes del medio de cultivo DME:Ham F12 (1:2).	20
4	Escala de intensidad de <i>P. marinus</i> por incubación de tejido en fluido de tioglicolato (Modificado de Navarro-Barrera, 2011, p. 22-23).	25

## Capítulo 1

### 1. Introducción

#### 1.1 Género *Perkinsus*

El género *Perkinsus* está conformado por protistas endoparásitos del *Phylum Apicomplexa*. Se han descrito 9 especies, que se distribuyen en casi todos los continentes (Figura 1). Entre ellas se encuentran *Perkinsus beihaiensis*, *P. chesapeaki*, *P. honshuensis*, *P. mediterraneus*, *P. qugwadii*, *P. olseni* y *P. marinus* siendo las dos últimas las de mayor impacto en la producción de moluscos y se encuentran distribuidas ampliamente (Villalba, 2008).



**Figura 1. Distribución de algunas especies del género *Perkinsus* alrededor del mundo. Modificado de Report, Petty D. (2011) y recuperado de: <http://www.thefishsite.com/articles/1054/perkinsus-infections-of-bivalve-molluscs>.**

Este grupo de protistas parasitan y afectan a diversas especies de moluscos, principalmente bivalvos. Los registros muestran que *Perkinsus* spp. son capaces de parasitar a mejillones, almejas y ostiones, que son de importancia comercial en la pesquería y cultivo (Villalba *et al.* 2004), además también han demostrado tener un impacto serio en comunidades de

bivalvos silvestres, por lo que su detección en nuevas localidades y especies debe ser valorada (Burreson, 1991; Encomio *et al.* 2005; Gullian-Klanian *et al.* 2008)

## **1.2 Descubrimiento de *Perkinsus marinus***

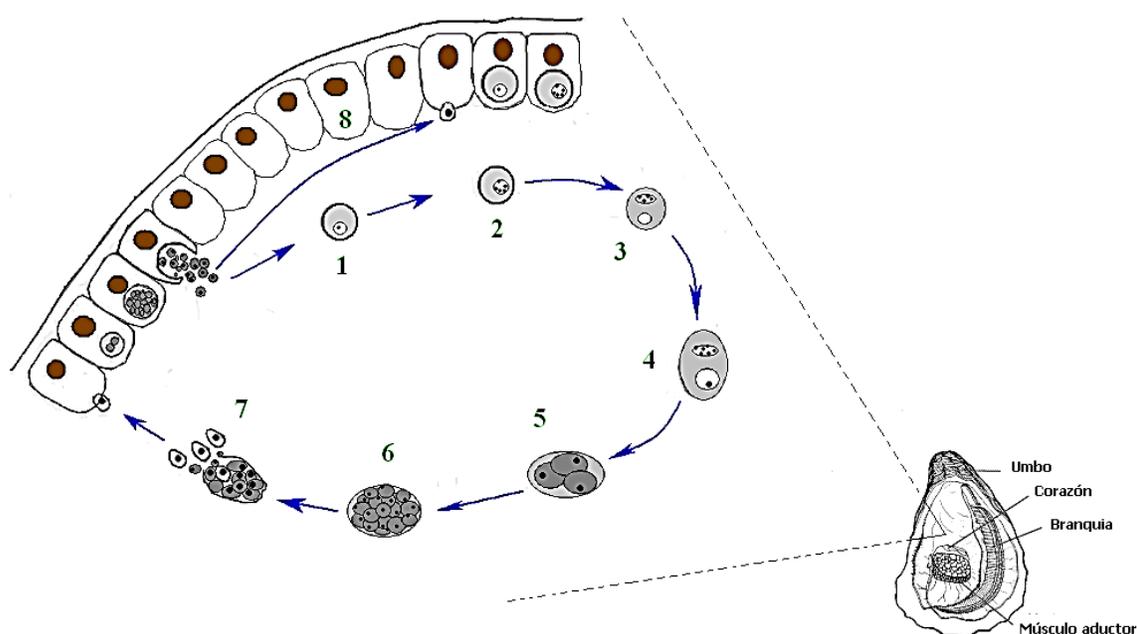
El estudio de *P. marinus* se inició a raíz de eventos inusuales de mortalidad del ostión americano *Crassostrea virginica*, a principios de los años 40 en la zona oeste del delta del Río Mississippi en Luisiana E.U.A., cuando los productores de ostión vieron afectada su economía. Las mortalidades que se registraron fueron del 75 al 100 % en ostiones de talla comercial, causando pérdidas de millones de dólares (Ray, 1996). Ante esta situación, los productores buscaron la causa del problema, sospechando que lo sucedido era debido a las descargas de aguas residuales y contaminantes por parte de compañías petroleras y agrícolas. Para 1946, el problema se llevó a la Corte y se interpuso una demanda de 40 millones de dólares por parte de los productores en contra de dichas compañías. Como consecuencia de la demanda, los involucrados, organizaron cuatro grupos de investigación conformados por expertos científicos para determinar las posibles causas de la alta mortalidad (Ray, 1996).

En 1950, Mackin y colaboradores descubren por primera vez a un organismo unicelular esférico en ostiones moribundos y ausente en ostiones saludables, por esta razón, tal organismo fue considerado como el principal sospechoso de la alta mortalidad de *C. virginica*. Fue nombrado *Dermocystidium marinum* y comúnmente se le conoció como Dermo (Mackin *et al.* 1950; Ray, 1996). Para 1951, se utiliza el Medio de Cultivo en Fluido de Tioglicolato de Ray (RFTM) mismo que permitió el cultivo del parásito y aplicar los postulados de Koch, demostrando que efectivamente dicho organismo era el agente causal de los episodios de mortalidad en Luisiana, E.U.A. (Ray, 1952). *D. marinum* fue inicialmente considerado un hongo, pero el análisis morfológico y estructural permitió clasificarlo como un protozoario, renombrándolo como *Perkinsus marinus* en 1978 (Levine, 1978).

### 1.3 Taxonomía y ciclo de vida

Actualmente, existe controversia con respecto a la taxonomía del género *Perkinsus*, sin embargo, la caracterización aceptada para *P. marinus* lo clasifica como un protista intracelular del Orden Perkinsida, Clase Perkinsea, del Phylum Apicomplexa (Levine, 1978). Esta clasificación fue dada debido al resultado de observaciones ultraestructurales, en las cuales se encontró la presencia de un complejo apical, una membrana subpelicular y la formación de microsporas y zoosporas, características del Phylum Apicomplexa. Adicionalmente se observaron algunas particularidades, ya que las zoosporas poseen flagelos y una vacuola anterior (Perkins, 1976; Levine, 1978). Las investigaciones sobre su filogenia a nivel molecular lo asocian con los Dinoflagelados, lo que ha llevado a considerar que la línea taxonómica de *P. marinus* reconstruye la evolución temprana de los dinoflagelados y los integrantes del Phylum Apicomplexa (Leander y Keeling, 2004).

*Perkinsus marinus* se multiplica dentro del hospedero en una fase vegetativa (Figura 2), que inicia con un trofozoito inmaduro de forma esférica. Al madurar aumenta de tamaño y desarrolla una vacuola excéntrica con forma de anillo, que contiene un organelo libre llamado vacuoplasto. El trofozoito maduro (10 a 20  $\mu\text{m}$ ) inicia la fase de multiplicación por fisión múltiple (esquizogonia), mediante la cual se obtienen de 8 a 32 células hijas (Soniati, 1996). Cada célula hija es llamada trofozoito inmaduro (3 a 7  $\mu\text{m}$ ), los cuales permanecen juntos rodeados por una pared y la estructura que se forma en conjunto es denominada tomonte y mide entre 10 a 40  $\mu\text{m}$  (Goggin y Lester, 1995). Posteriormente, la pared del tomonte se rompe y libera a los trofozoitos inmaduros los cuales iniciarán un nuevo ciclo. La rapidez con que *P. marinus* se desarrolla dentro de su hospedero dependerá de la susceptibilidad del mismo, las condiciones ambientales y la variedad del parásito (Chu, 1996). Los trofozoitos pueden ser liberados del hospedero a través de las heces o al morir el animal, lo cual puede causar la infección de otros ostiones al entrar en contacto con estos (Bushek *et al.* 2002).

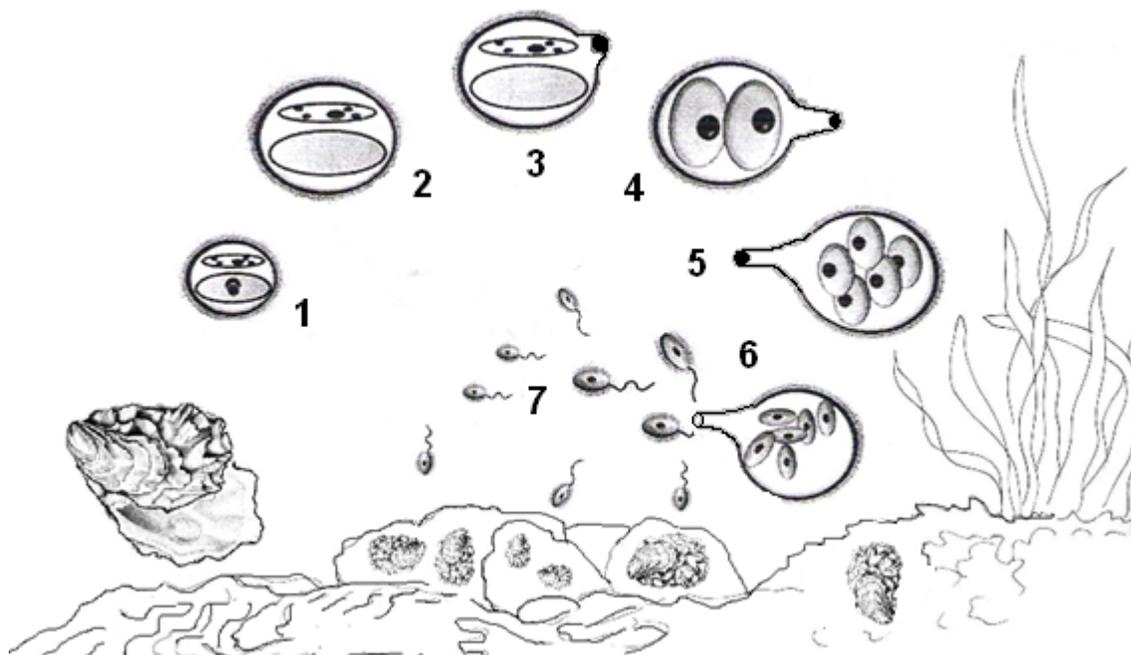


**Figura 2. Ciclo de vida vegetativo de *P. marinus*. Vista transversal de tejido mostrando células de un ostión donde se lleva a cabo el desarrollo del parásito; (1-2) trofozoito inmaduro, (3) trofozoito en desarrollo de vacuola, (4) trofozoito maduro, (5) trofozoito en fisión múltiple, (6) tomonte, (7) rompimiento de la pared del tomonte y liberación de trofozoitos inmaduros, (8) células de ostión. Modificado de Navarro-Barrera (2011, p. 12) y Wiser M. F. (2012), recuperado de <http://www.tulane.edu/~wiser/protozoology/notes/api.html>.**

Otra fase en el desarrollo de *P. marinus* es la de vida libre, ya que tiene la capacidad de sobrevivir fuera de su hospedero en un estado de resistencia denominado hipnospora. La hipnospora se forma a partir de que el trofozoito aumenta de tamaño, pierde el vacuoplasto y desarrolla una pared gruesa alcanzando un tamaño de entre 40 y 150  $\mu\text{m}$ . Este desarrollo se ha observado *in vitro*, cuando se incubaron tejidos infectados de los hospederos en 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 con la capacidad de esporular (Casas *et al.* 2002). La hipnospora desarrolla un poro con un tubo de descarga, mientras se produce la división o palintomia para formar numerosas zoosporas, las cuales son uninucleadas, con diversas vacuolas en el citoplasma y móviles, debido a la presencia de dos flagelos laterales (Perkins y Menzel, 1966; Casas *et al.* 2002). Se ha estimado que se producen alrededor de 1000 a 2000 zoosporas por cada

hipnospora, siendo liberadas al ambiente cuando el poro de descarga se abre (Perkins, 1976)(Figura 3).

Las zoosporas pueden infectar a nuevos ostiones, encontrándose en los tejidos de branquia, manto o intestino. Presumiblemente las zoosporas pierden sus flagelos y complejo apical, convirtiéndose en trofozoitos inmaduros una vez que entran al hospedero (Perkins, 1996).



**Figura 3. Ciclo de vida libre de *P. marinus*. (1 - 2) Aumento notable de tamaño del trofozoito maduro y pérdida del vacuoplasto, (3) desarrollo de tubo de descarga y poro, (4 - 6) formación de numerosas zoosporas biflageladas por palintomía, (7) liberación de zoosporas móviles. Modificado de Navarro-Barrera (2011, p. 13).**

#### 1.4 Transmisión

La transmisión de *P. marinus* ocurre directamente sin la necesidad de organismos intermediarios (Ray, 1954; Chu, 1996). La proximidad de los ostiones infectados con los no infectados juega un importante papel en la diseminación de la enfermedad (Andrews y Ray, 1988a). Por esta razón, el potencial de una epizootia está estrechamente relacionado con la distancia de las diferentes poblaciones a la fuente de infección, patrón de corrientes, mareas, batimetría, etc. También la dispersión del patógeno se puede dar por la acción de

los animales carroñeros que consumen a los ostiones moribundos (Andrews y Ray, 1988a) desconociéndose qué tanto pueden transportar al parásito a través del océano. Como ejemplo tenemos a los peces *Gobiosoma bosci*, *Chasmodes bosquianus* y *Opsanus tau*, en los cuales el parásito sobrevive dentro del tracto digestivo. Los cangrejos *Neopanope texana* y *Rithropanopeus harrisi* que lo pueden mantener en la superficie de su exoesqueleto (Hoese, 1962), y el ectoparásito *Boonea impressa* que lo succiona de los fluidos de ostiones infectados, pudiéndolo propagar cuando este se alimenta de ostiones sanos (White *et al.* 1987).

### **1.5 Infección**

Se ha documentado ampliamente que la progresión de la infección por *P. marinus* a través de los tejidos del ostión americano (*C. virginica*), provoca lesiones que pueden conducirlo a su muerte, con consecuencias ecológicas y socioeconómicas graves cuando esto deriva en mortalidades masivas. Sin embargo, los efectos subletales también pueden tener implicaciones ecológicas y económicas importantes. Por ejemplo, la infección por *P. marinus* en *C. virginica* provoca un crecimiento lento y puede dar lugar a una mala condición en individuos de talla comercial. Consecuentemente, puede haber deficiencia en las reservas de energía que inhiben la gametogénesis y provocan efectos negativos en la fecundidad del ostión, dando como resultado una menor repoblación por progenie. En términos generales, la infección provoca debilitamiento del ostión, de manera que este es más susceptible a depredación o a morir por condiciones ambientales adversas (Villalba *et al.* 2004).

Después de observaciones histológicas hechas por Mackin (1951), se pensó que el primer portal de entrada de *P. marinus* en los ostiones era el epitelio del intestino. Sin embargo, en estudios de laboratorio se ha comprobado que la inyección de células infectantes en la cavidad del manto del ostión y en el músculo aductor, es mucho más efectiva en inducir la infección que la filtración por las branquias, la cual es la vía de entrada hacia el intestino (Perkins, 1994; Chu, 1996). Esto condujo a la realización de mayores estudios que

demonstraron que las branquias, palpos labiales y manto, entre otros, eran tejidos igualmente susceptibles que el epitelio del intestino (Chintala *et al.* 2002).

Por otra parte, la liberación de células viables de *P. marinus* por las heces está documentada (Bushek *et al.* 1997). En eventos epizooticos la concentración de células del parásito en las heces puede ser relativamente pequeña, comparada con el gran número de parásitos liberados desde los cuerpos de ostiones que murieron a causa de la infección (Bushek *et al.* 2002).

Estudios de correlación entre diferentes niveles de infección y tiempo de mortalidad con respecto a la dosis mínima infectante de *P. marinus*, han establecido que la tasa de mortalidad está positivamente relacionada con el número de células infectantes inoculadas al ostión (Mackin, 1962; La Peyre *et al.* 1993; Volety y Chu, 1994). Se ha comprobado que se requieren de 10 a 100 células en *C. virginica* para causar infección de manera experimental (Valioliis, 1973; Chu, 1996) y de 500 a 10,000 para conseguir mortalidad en 105 días post-inoculación (Mackin, 1962; Bushek *et al.* 1997).

Otros estudios han revelado que tanto la temperatura como la salinidad son los principales factores ambientales relacionados con la infección y propagación de la enfermedad. A temperaturas superiores a los 20 °C, el parásito se multiplica y se disemina (Fisher *et al.* 1992; Chu y La Peyre, 1993; Cook *et al.* 1998; Ford y Chintala, 2006), mientras que a temperaturas por debajo de 15 °C el desarrollo del mismo no es tan favorable (Ford, 1996). La prevalencia y la intensidad también se incrementan con la salinidad, presentándose mortalidades a salinidades superiores a 12 ó 15 ups. La infectividad se mantiene baja en salinidades por debajo de 9 ups. Sin embargo, el parásito en condiciones no favorables de temperatura o salinidad puede persistir viable durante varios años, esperando que las condiciones cambien para poder desarrollarse (Soniati, 1996).

Los estudios que se han realizado para determinar la infectividad de los estadios de *P. marinus* en condiciones de laboratorio, demuestran que éstos tienen diferentes potenciales de infección, destacando el trofozoito maduro y la hipospora. En el caso del trofozoito su infectividad se ha asociado a una rápida multiplicación en el hospedero, desarrollándose bien en un rango de temperatura de 21 a 27 °C (Volety y Chu, 1994; Chu, 1996). Por otra parte, aunque la zoospora biflagelada puede nadar y tiene un complejo apical

presumiblemente para penetrar en el hospedero (Perkins, 1988), su infectividad y patogenicidad aún no se han evaluado (Chu, 1996). En la Tabla 1 se aprecia de mejor manera las similitudes y diferencias entre los distintos estudios de infección con *P. marinus*.

Tabla 1. Comparativo entre estudios de infección realizados con *P. marinus*.

<b>Autores</b>	<b>Dosis</b>	<b>Pureza</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Intensidad</b>	<b>Huésped</b>
Volety y Chu, (1994)	10,000 cél./ost.	Semipurif.	75 días	infección (L-M)	<i>C. virginica</i>
Volety y Chu, (1994)	10,000 cél./ost.	Semipurif.	75 días	infección (L)	<i>C. virginica</i>
Mackin, (1962)	100 - 500 cél./ost.	Semipurif.	41 días	infección (S)	<i>C. virginica</i>
Valiulis, (1973)	10 cél./ost.	Semipurif.	105 días	infección (L)	<i>C. virginica</i>
Chu, (1996)	10 - 100 cél./ost.	Semipurif.	84 días	infección (L)	<i>C. virginica</i>
Chu, (1996)	10 - 100 cél./ost.	Semipurif.	84 días	infección (L)	<i>C. virginica</i>
Bushek, (1994)	10,000 cél./ost.	Purificado	50 días	infección (L)	<i>C. virginica</i>
La Peyre <i>et al.</i> (1993)	1,000,000 cél./ost	Purificado	56 días	infección (L)	<i>C. virginica</i>
Chintala <i>et al.</i> (2002)	1,000,000 cél./ost	Purificado	84 días	infección (L-M)	<i>C. virginica</i>
Chintala <i>et al.</i> (2002)	1,000,000 cél./ost	Semipurif.	84 días	infección (S)	<i>C. virginica</i>
Gauthier y Vasta, (1993)	200,000 cél./ost	Purificado	35 días	infección (S)	<i>C. virginica</i>
Meyers <i>et al.</i> (1991)	tejido infectado	semipurifi.	45 días	infección (L-M)	<i>C. virginica</i>
Meyers <i>et al.</i> (1991)	tejido infectado	Semipurif.	45 días	no infección	<i>C. gigas</i>
Meyers <i>et al.</i> (1991)	tejido infectado	Semipurif.	83 días	infección (L)	<i>C. gigas</i>
Baber y Mann, (1994)	ostiones infec.	Semipurif.	60 días	infección (S)	<i>C. virginica</i>
Baber y Mann, (1994)	ostiones infec.	Semipurif.	60 días	infección (S)	<i>C. gigas</i>

\*Infección (L: Ligera, M: Media, S: Severa)

### 1.6 Interacción parásito hospedero: progresión de la infección y respuesta inmune

Las especies de *Perkinsus* deben superar barreras tanto físicas como químicas que el hospedero posee para protección de sus tejidos (Chintala *et al.* 2002). Aunque no está bien comprendido cómo es que las células de *P. marinus* evaden los primeros mecanismos de defensa del ostión, una vez establecido en éste, el parásito empieza a multiplicarse y colonizar nuevos órganos (Villalba *et al.* 2004). En *C. virginica*, la infección provoca infiltración hemocitaria en el tejido donde el parásito se encuentra presente y los hemocitos fagocitan activamente las células invasoras. Sin embargo, estas últimas no son destruidas, sino por el contrario, se multiplicarán dentro del hemocito hasta causar su ruptura. Una

infección severa está caracterizada por una infiltración hemocitaria masiva en los epitelios del intestino, tejido conectivo, manto y branquia, con células del parásito tanto dentro de los hemocitos como fuera de éstos de forma libre, lo que finalmente conlleva a la destrucción y pérdida de la estructura normal del tejido así como a la disfunción de órganos (Mackin, 1951; La Peyre *et al.* 1995).

En otros estudios se ha encontrado que en el suero algunas lisozimas inhiben el desarrollo de *P. marinus* en el cultivo *in vitro*, lo cual se observó al añadir plasma de mejillón al medio de cultivo. Anderson y Beaven (2001) proponen que la falta de estas lisozimas en *C. virginica* es la causa de la alta patogenicidad que posee *P. marinus* para esta especie de ostión.

Otro factor que hace susceptible a *C. virginica* de *P. marinus* es la baja especificidad de las proteasas inhibitoras. Estas enzimas constituyen un componente fundamental del sistema de defensa humoral del ostión, protegiendo sus células la entrada de parásitos. *C. gigas* es una especie de ostión mucho menos susceptible a *P. marinus* ya que posee proteasas inhibitoras con una alta especificidad (Faisal *et al.* 1999; Romestand *et al.* 2002).

### **1.7 Cultivo *in vitro* de *P. marinus***

El cultivo de *P. marinus* en fluido de tioglicolato permitió grandes avances en el conocimiento del parásito (Prokop, 1950; Ray, 1952; Ray, 1954; Mackin, 1962; Perkins, 1966). Sin embargo, no fue sino hasta principios de los años 1990s, que se logró el cultivo puro de *P. marinus*. La Peyre *et al.* (1993) mostraron por primera vez que *P. marinus* podía propagarse continuamente *in vitro* a partir del corazón de ostiones infectados, los cuales una vez removidos eran depositado en un medio especial que simulaba el plasma del ostión. Siguiendo estos estudios y utilizando medios comerciales modificados, Kleinschuster y Swink (1993) aislaron y propagaron a *P. marinus* a partir de la masa visceral de los ostiones. Gauthier y Vasta (1993) iniciaron los cultivos a partir de hemocitos de ostiones infectados.

El desarrollo del cultivo *in vitro* de *P. marinus* ha permitido investigar de una mejor manera su biología, la dinámica de la enfermedad y los procesos y mecanismos

involucrados, de tal manera que hoy día se tiene un mejor entendimiento sobre el parásito gracias a esta técnica (La Peyre, 1996).

### 1.8 Medios de cultivo para la proliferación de *Perkinsus marinus* *in vitro*

Existen alrededor de seis tipos de medios de cultivo, con sus variantes cada uno de ellos (Tabla 2).

Tabla 2. Medios y suplementos usados para la propagación *in vitro* de *P. marinus*.

Medio	Suplemento	Amortiguador	Antibiótico
JL-ODRP-1	-	25 mM HEPES 43 mM NaHCO <sub>3</sub>	5 µg/ml Cloramfenicol
1:1 DME:Ham F-12	10 % FBS, 5 % plasma de ostión.	100 mM HEPES 7 mM NaHCO <sub>3</sub>	100 U/ml Penicilina G 100 U/ml estreptomycin
1:2 DME:Ham F-12	1.7 mg de fetuina.	100 mM HEPES 7 mM NaHCO <sub>3</sub>	100 U/ml Penicilina G 100 U/ml estreptomycin
L-15 (Leibovitz)	10 % FBS, 20 % plasma de ostión, 0.5 taurina mg/ml, 5 mg/ml glucosa, 5 mg/ml galactosa, 5 mg/ml trehalosa, 1 g/l de extracto de levadura, 3 g/l lactoalbúmina hidrolizada, 10 ml/l (100 X) MEM solución vitamínica, 1 ml/l mezcla lipídica.	-	100 U/ml Penicilina G 100 U/ml estreptomycin
NCTC-135	10 % FBS, 0.4 mg/ml de extracto de levadura, 2 mM L-glutamina, 1 % (v,v) mezcla lipídica, 1 % (v,v) carbohidratos JL-ODRP-1.	25 mM HEPES 4 mM NaHCO <sub>3</sub>	100 U/ml Penicilina G 100 U/ml estreptomycin
RPMI-1640	-	-	-

La disponibilidad de los constituyentes del medio de cultivo, las condiciones experimentales que se desean establecer, los métodos preliminares de aislamiento del parásito, entre otros aspectos, determinan en gran medida el medio a utilizar (La Peyre, 1996).

### **1.9 Medidas de control y estrategia de manejo empleados para mitigar los brotes de *Perkinsus marinus***

Se han empleado diferentes estrategias de manejo para mitigar los efectos que causa *P. marinus* en la industria ostrícola de *C. virginica* en la costa Este de Estados Unidos. Dichas estrategias han mostrado diferentes grados de efectividad (Soniati, 1996; Krantz y Jordan, 1996). La forma en cómo se mejoran las condiciones de cultivo para prevenir los brotes de *P. marinus* en las granjas ostrícolas es mediante el monitoreo, control de la temperatura y la salinidad. Las artes de cultivo son situadas en lagunas costeras, esteros y deltas de ríos en donde hay disminución de salinidad debido a las aportaciones de agua dulce proveniente del continente. Por otra parte, se ha establecido que ciertas épocas del año son más propicias para cosechar debido a las variaciones de temperatura, es decir, si se cosecha poco antes de que empiecen los meses cálidos, hay menor probabilidad de que ocurran mortalidades importantes, ya que no se propician las condiciones de alta densidad de ostiones, con altas temperaturas y altas tasas de evaporación que conllevan a elevada salinidad (Hofmann *et al.* 1995; Soniat y Kortright, 1998; Ragone-Calvo *et al.* 2000).

Otra estrategia de manejo es la selección de ostiones con cierta resistencia natural al parásito, al realizar múltiples selecciones de estos individuos y al ser reproducidos entre sí se crean nuevas líneas genéticas que resisten el desarrollo de la enfermedad y brindan mejores resultados en términos de producción (Andrews y Ray, 1988b; Krantz y Jordan 1996). Sin embargo, este tipo de estrategias no garantizan siempre buenos resultados, ya que en términos genéticos se reduce la variabilidad y por lo tanto se reduce la probabilidad de que la especie sea más apta para sobrellevar otras adversidades que no tienen mucho que ver con el parásito. Tal es el ejemplo de lo sucedido con el programa de mejoramiento para el ostión americano, el cual buscaba seleccionar a aquellos individuos resistentes a *Haplosporidium nelsoni*, lo cual se logró, pero desafortunadamente tales individuos eran mayormente susceptibles a *P. marinus* e igualmente los cultivos decayeron drásticamente (Burreson, 1991).

La producción de organismos triploides y tetraploides han dado también resultados favorables y la ingeniería genética propone manipular los genes inmunorelacionados con la

enfermedad entre distintas especies de ostiones para crear híbridos o transgénicos que controlen o eliminen al parásito (Barber y Mann, 1991; Meyers *et al.* 1991). Una opción más drástica que se realiza en Bahía Chesapeake, EE.UU., es la introducción de especies alóctonas del género *Crassostrea*, que han demostrado ser menos susceptibles al parásito y por ende se convirtieron en candidatos potenciales para restaurar los cultivos en esta región (Calvo *et al.* 1999; Calvo *et al.* 2001). Finalmente la quimioterapia es una alternativa que brinda resultados favorables al eliminar las células invasoras de *P. marinus*, sin embargo su aplicación es compleja, el costo es elevado y no compatible con la mayoría de los sistemas de producción de este recurso (Calvo y Burrenson, 1994; Krantz 1994; Dungan y Hamilton, 1995).

### **1.10 *Perkinsus marinus* en México**

De acuerdo con Cáceres-Martínez y Vásquez-Yeomans (2013), el primer registro de *P. marinus* en *C. virginica* en costas Mexicanas data de 1961 y fue documentado por Mackin (1961), quien menciona que de siete ostiones recolectados (cerca de Tampico en Enero de 1950), cinco de ellos estaban infectados, alertando que la enfermedad podría extenderse más allá de Tampico. No es sino hasta 1992 cuando se registran mortalidades de ostiones que fueron inicialmente atribuidas por productores y pescadores a la contaminación derivada de la refinación del petróleo en las lagunas del Carmen, Machona y Mecocacán en Tabasco, llevándose a cabo un estudio sobre la posible presencia de *P. marinus* y su papel en dichas mortalidades (Burrenson *et al.* 1994). No obstante, no se encontró una relación directa entre la presencia de *P. marinus* y las mortalidades inusuales en el Golfo de México (Aguirre-Macedo *et al.* 2007). Posteriormente, a finales de los 1990s, *P. marinus* se reportó en los estados de Campeche y Veracruz (Aguirre-Macedo *et al.* 2007).

El primer registro de *P. marinus* en el Pacífico de México ocurrió en las lagunas costeras de Boca de Camichín y Pozo Chino en el estado de Nayarit. Este registro deriva de un seguimiento sanitario en poblaciones de cultivo del ostión de placer a inicios del 2006 a 2007 (Cáceres-Martínez y Vásquez-Yeomans, 2006-2012, Cáceres-Martínez *et al.* 2007 y

2008). Un año más tarde, se detectó en el mismo hospedero en Bahía San Jorge en el Estado de Sonora (Cáceres-Martínez y Vásquez-Yeomans, 2008).

Ante este escenario, Parra-Laca (2010) concluyó mediante una revisión paleontológica y un análisis genético, que la presencia de *P. marinus* en el Pacífico Mexicano fue el resultado de una transfaunación y no de coevolución, por traslado de ostión americano del Golfo de México hacia zonas costeras del Pacífico Mexicano.

Navarro-Barrera (2011) determinó la distribución, prevalencia e intensidad del parásito en cinco lagunas costeras del estado de Nayarit, en comunidades naturales y de cultivo del ostión de placer (*C. corteziensis*), concluyendo que *P. marinus* se encontraba establecido en todas las lagunas costeras estudiadas. Con una prevalencia de hasta un 69 % e intensidad de ligera a severa.

Pineda-García (2011) realizó un estudio con objeto de determinar la posible presencia de *P. marinus* en seis lagunas costeras del estado de Sinaloa, encontrando al parásito en siete de nueve puntos estudiados. La prevalencia varió de 5 a 61 % en poblaciones silvestres y de 1 a 19 % en poblaciones de cultivo.

Cáceres-Martínez *et al.* (2012) encontraron infección por *P. marinus* en el ostión de mangle *Saccostrea palmula* después de haber monitoreado cuatro lagunas costeras del estado de Sinaloa. El parásito fue detectado en todas las lagunas estudiadas, con prevalencia de 6 a 20 % e intensidad de ligera a moderada.

### **1.11 Panorama actual**

Por su impacto ecológico y en la producción ostrícola, la Perkinsiosis ha sido listada por la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) como de declaración obligatoria (OIE 2012) por lo que se recomienda establecer medidas de bioseguridad para evitar su dispersión (Ford y Tripp, 1996). La presencia de *P. marinus* en el Pacífico Mexicano es un hecho que no debe tomarse a la ligera y que requiere valorar qué medidas de bioseguridad pueden establecerse en la zona.

Investigaciones genéticas sobre *P. marinus* muestran la existencia de variedades o subtipos, entre ellas se han clasificado las tipo I y II cuya patogenicidad para el ostión Americano es

diferente (Robledo *et al.* 1999). Por otro lado se sabe que otras especies del género *Crassostrea* parecen ser más resistentes a la enfermedad, como es el caso del ostión del Pacífico *Crassostrea gigas* y el ostión Suminoe *Crassostrea ariakensis* (Calvo *et al.* 1999; Calvo *et al.* 2001). En el caso de *C. corteziensis*, existen múltiples interrogantes que impiden establecer cuál es el impacto que en realidad puede tener el parásito por sí solo en la sobrevivencia de esta especie y en consecuencia, es difícil establecer cuáles son las medidas de bioseguridad que más se ajustan a la problemática.

Tomando en cuenta los estudios sobre *P. marinus* infectando a *C. virginica* es probable que *P. marinus* afecte la supervivencia y el desarrollo del cultivo de *C. corteziensis* de igual manera y para validar esta hipótesis será imprescindible aislar y cultivar *in vitro* al parásito y realizar bioensayos de infección a partir del parásito purificado para concluir si es capaz de causar la muerte del hospedero por sí solo. A partir de los resultados obtenidos, se podrá sugerir, con una base científica, qué medidas de bioseguridad podrían regular de mejor forma la introducción, establecimiento y diseminación de *P. marinus* en el Pacífico Mexicano.

## Capítulo 2

---

### 2. Justificación, hipótesis y objetivos

#### 2.1 Justificación

La presencia de *P. marinus* en el pacífico Mexicano está asociado con falta de información y malas prácticas de manejo por parte de comercializadores y productores de ostión, quienes transfirieron a *C. virginica* del Golfo de México al Pacífico (Parra-Laca, 2010). Las consecuencias de la transfaunación del parásito se manifiesta en la infección del ostión de placer *C. corteziensis*, quien habita naturalmente en estas aguas y resultó susceptible a *P. marinus*. Aunque el impacto de *P. marinus* en el cultivo de *C. corteziensis* no ha sido evaluado, hay evidencia histológica donde se observa el desarrollo de la infección. Por tales sucesos y evidencias, es fundamental realizar el cultivo *in vitro* y bioensayo de infección de *P. marinus* en *C. corteziensis* para concluir si éste comprometerá la supervivencia y desarrollo del cultivo de igual manera como lo ocurrido con *C. virginica*. Los resultados de este estudio en complemento con otros ya realizados permitirá establecer las medidas de bioseguridad que más se ajusten a la problemática que se tiene sobre la introducción, establecimiento y diseminación de *P. marinus* en el Pacífico Mexicano.

## 2.2 Hipótesis

La infección por *Perkinsus marinus* en el ostión de placer *Crassostrea corteziensis* se comporta de igual manera que en el ostión americano *Crassostrea virginica*.

## 2.3 Objetivo general.

- Determinar la susceptibilidad del ostión de placer *Crassostrea corteziensis* al parásito *P. marinus* detectado en las costas de Nayarit en condiciones de laboratorio.

## 2.4 Objetivos particulares.

- Aislar, purificar y cultivar *in vitro* a *Perkinsus marinus* encontrado en *Crassostrea corteziensis* del Estado de Nayarit.
- Realizar un bioensayo de infección a partir del cultivo *in vitro* de *P. marinus* en *C. corteziensis* en contraste con *C. gigas*.
- Contribuir a las bases científicas para sugerir medidas de bioseguridad pertinentes.

## Capítulo 3

---

### 3. Materiales y métodos

#### 3.1 Características generales del área donde se obtuvieron los ostiones parasitados por *Perkinsus marinus*

Las localidades consideradas para este estudio, se eligieron con base en datos de prevalencia e intensidad previamente obtenidos sobre *P. marinus* en *C. corteziensis* (Cáceres-Martínez *et al.*, 2008; Navarro-Barrera, 2011). Boca de Camichín y Pozo Chino se localizan en el municipio de Santiago Ixcuintla, Nayarit, México. El clima de la región es cálido seco, con una temperatura media anual de 26.5 °C, siendo los meses más calurosos los de Mayo y Octubre. El régimen de lluvias se presenta de Junio a Octubre, siendo de mayor intensidad en Julio y Agosto. La precipitación pluvial va de 1266.1 mm a 1595.1 mm; los vientos son moderados y de dirección Noroeste a Suroeste predominantemente (Navarro-Barrera, 2011).

#### 3.2 Muestreo de *Perkinsus marinus*

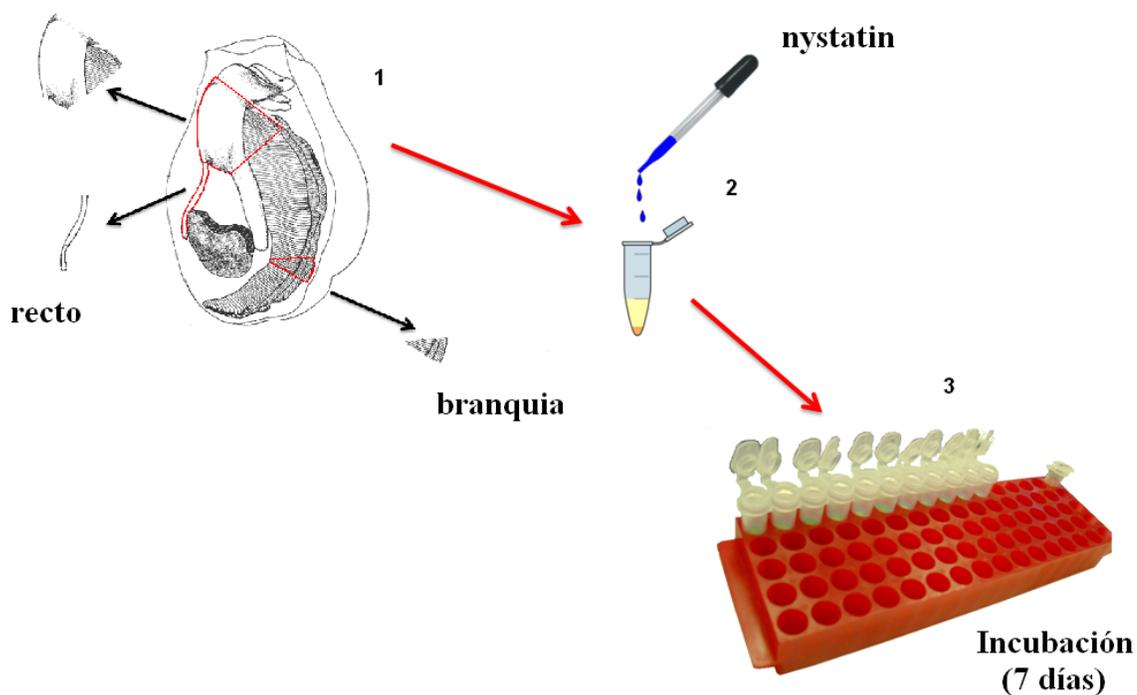
Considerando las recomendaciones de tamaño de muestra de la OIE (OIE 2012), se recolectaron 120 ejemplares adultos de *C. corteziensis*, eligiendo organismos de talla comercial de  $10.6 \pm 1.6$  cm debido a que es más probable encontrar infección por *P. marinus* en organismos de estas tallas (Andrews, 1996). La recolecta de dichos organismos se llevó cabo a finales del año 2012 (para bioensayos con *C. gigas*) y principios del 2013 (para bioensayos con *C. corteziensis*).

El transporte y envío de muestras se realizó 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 Acuicola, A. C. (ISA), (Apéndice 1).

### 3.3 Incubación de tejido en Fluido de Tioglicolato (FT)

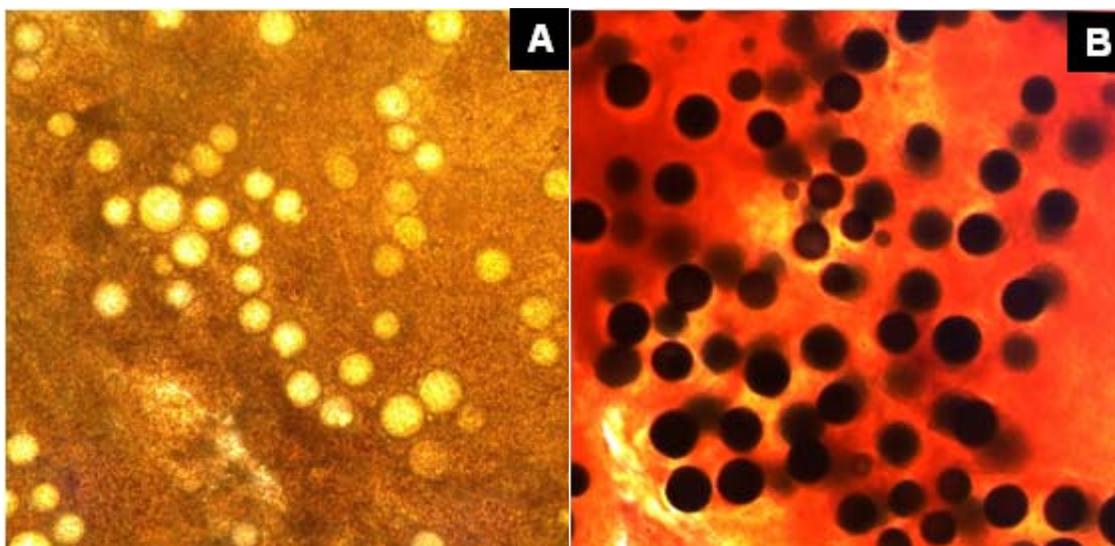
El medio de fluido de tioglicolato se preparó de acuerdo al protocolo establecido por Ray (1966) y modificado por Fisher y Oliver (1996) (Apéndice 2). El procedimiento de toma de muestra de tejido para la incubación se realizó cortando con tijeras una fracción de 0.5 a 1 g de los tejidos del recto, branquia y glándula digestiva de cada ostión. Posteriormente el tejido fue colocado en tubos Eppendorf de 1.5 ml los cuales contenían 1 ml del medio de tioglicolato y 100  $\mu$ l de antimicótico (Nystatin). Los tubos se incubaron durante 7 días, en oscuridad a temperatura ambiente ( $23\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ )(Figura 4).

#### glándula digestiva



**Figura 4. (1) Toma de muestra de tejido blanco del ostión (recto, branquia y glándula digestiva). (2) Introducción del tejido blanco en tubos Eppendorf que contienen fluido de tioglicolato y antimicótico nystatin. (3) Incubación de las muestras a temperatura ambiente y en oscuridad.**

En el FT las células de *P. marinus* cambian de estado, de trofozoito a hipnospóra. Esto facilita la detección del parásito, ya que éste aumenta considerablemente de tamaño (5 a 40  $\mu\text{m}$  o más) y mediante el uso de solución de Lugol se facilita aún más la detección, ya que las células transparentes adquieren una coloración azul-negro (Figura 5).



**Figura 5. Hipnosporas incubadas en fluido de tioglicolato vistas a 10 X en microscopio. (A) Tejido de glándula digestiva del ostión, infectado con hipnosporas sin tinción. (B) Tejido de recto del ostión con hipnosporas teñidas con Lugol.**

### **3.4 Preparación del medio DME:Ham F12 (1:2)**

El medio de cultivo celular denominado DME:Ham F12 (1:2) es un medio comercial el cual debe ser suplementado con suero fetal de bovino (FBS). Muchos de los constituyentes de este medio son hoy día utilizados para el cultivo de células de vertebrados. Las ventajas que este medio ofrece sobre otros, son la disponibilidad de sus constituyentes en el mercado, su fácil preparación, no requiere de  $\text{CO}_2$  y su eficiencia ya ha sido comprobada para desarrollar *in vitro* a *P. marinus* (La Peyre, 1996) (Tabla 4).

Tabla 4. Constituyentes del medio de cultivo DME:Ham F12 (1:2).

<b>Nombre</b>	<b>Abreviación</b>	<b>Proveedor</b>	<b>No. Catalogo</b>
Dulbecco' Modified Eagle's medium	DME	SIGMA	D5030
Ham F12 nutrients mixture	Ham F12	SIGMA	51651C
HEPES (FW:238.3)	HEPES	SIGMA	H3375
Bicarbonato de sodio (FW:84.01)	NaHCO <sub>3</sub>	SIGMA	S5761
Penicilina G (1670 U/mg)	Pen G	SIGMA	PENNA
Estreptomicina de sulfato (761 U/mg)		SIGMA	S6501
Hidróxido de sodio	NaOH	SIGMA	72068
Ácido clorhídrico	HCL	SIGMA	H9892
Suero Fetal de Bovino	FBS	GIBCO	F2442
Agua doblemente destilada	ddH <sub>2</sub> O	SIGMA	W3500
Sal oceánica		SIGMA	S9883

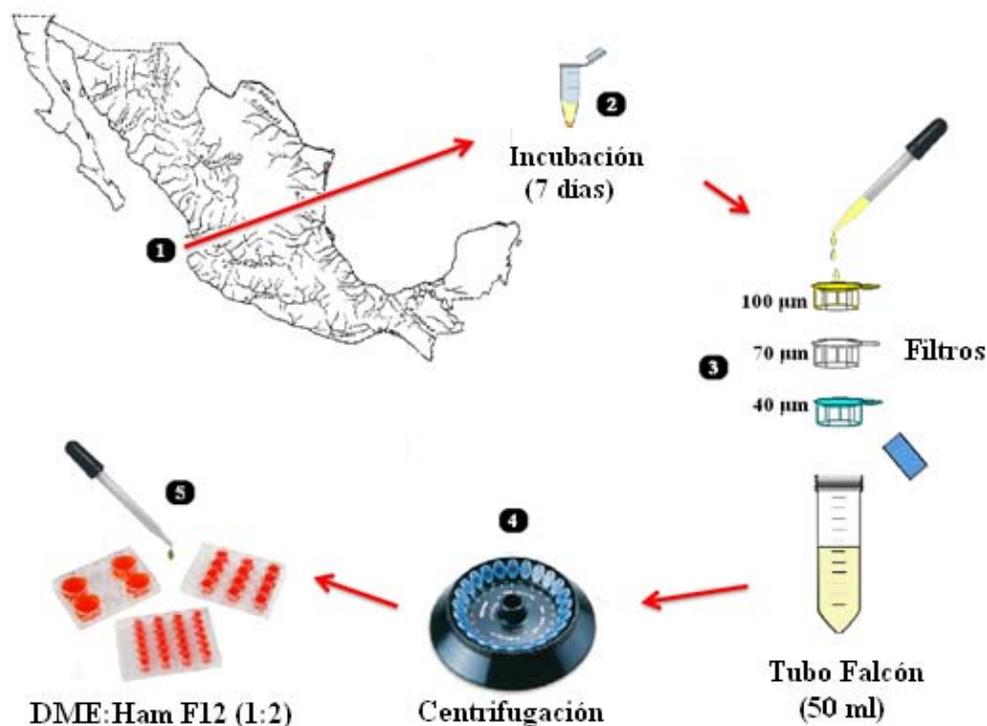
Para la preparación de 1 L se requirió lo siguiente:

En 1 litro de agua doblemente destilada se adicionaron 15 g de sal oceánica, 5 g de DME, 10 g de Ham F12, 12 g de HEPES, 0.3 g de NaHCO<sub>3</sub>, 0.6 g de Penicilina G, 0.13 g de Estreptomicina, 100 ml de Suero Fetal de Bovino y se ajustó el pH a 6.6 (con 1N de NaOH o HCL). La mezcla se hizo pasar por filtros estériles de luz de malla de 0.22 µm y se almacenó a 4 °C hasta su uso. Todo el proceso de preparación se realizó dentro de una campana (cabina) de flujo laminar.

### **3.5 Cultivo *in vitro* de *Perkinsus marinus***

El cultivo *in vitro* se inició a partir de muestras de tejido de ostión infectado (glándula digestiva). El tejido incubado, conteniendo las hipnosporas, fue macerado delicadamente hasta obtener un extracto líquido, el cual se hizo pasar, posteriormente, a través de una serie de filtros de distintos tamaños de malla progresivamente más pequeña (100, 70 y 40 µm), logrando retener en el filtro de 40 µm la mayor parte de las células del parásito. Una vez

realizada la separación de las hipnosporas, éstas se enjuagaron con agua de mar estéril (50 ml por 1 ml de FT) para reducir la presencia de residuos y bacterias. Este procedimiento fue realizado de acuerdo a lo descrito por La Peyre *et al.* (1993). Considerando el protocolo descrito por Gauthier y Vasta (1995), las hipnosporas semipurificadas se inocularon en el medio de cultivo DME:Ham F12 (1:2). Antes de la inoculación, el medio de cultivo DME:Ham F12 se distribuyó en placas de 24 pocillos (1 ml por pocillo)(Figura 6).



**Figura 6. Esquematación del cultivo *in vitro* de *P. marinus*. (1) La obtención de *P. marinus* se logró a partir de ostiones provenientes del Estado de Nayarit. (2) Incubación de tejido (glándula digestiva) en FT. (3) Separación de hipnosporas por filtración. (4) Concentración de hipnosporas por centrifugación (pellet de células). (5) Inoculación de hipnosporas en medio DME:Ham F12.**

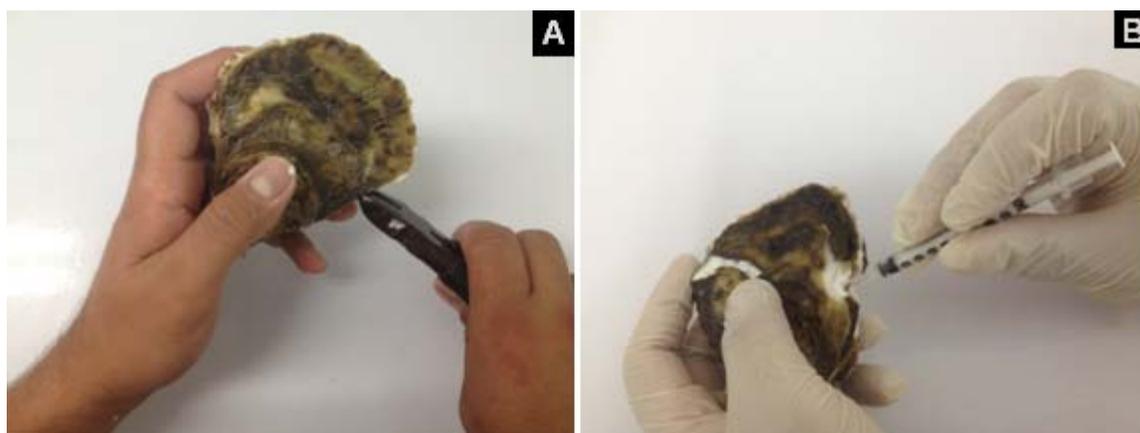
Este proceso se realizó en una campana de flujo laminar para reducir el riesgo de contaminación externa.

De los cultivos purificados se obtuvieron los inóculos correspondientes para el bioensayo de infección de *C. corteziensis*. Mediante el uso de un hematocitómetro se midieron y ajustaron tres dosis de inoculación de células de *P. marinus*: 1,500, 3,000 y 6,000 cél./ostión.

### 3.6 Bioensayo de infección en *Crassostrea corteziensis*

Para este bioensayo se recolectaron y seleccionaron 120 ostiones adultos de la especie *C. corteziensis* ( $10.5 \pm 1$  cm, longitud de concha), provenientes de la localidad Estero El Elote (Desembocadura Río Mayo), municipio Huatabampo, Sonora, donde no se ha reportado a *P. marinus*. Adicionalmente se tomó una sub-muestra de 30 ejemplares para confirmar la ausencia del parásito mediante FT, PCR e histología. En función de los resultados de estos 30 ostiones, el resto del lote (120 ostiones) se consideró como libre de *P. marinus*.

Los 120 ostiones se dividieron en cuatro grupos de 30 ejemplares y a su vez cada grupo de 30 en subgrupos de 10, los cuales funcionaron como réplicas. Tres de los cuatro grupos fueron inoculados con las dosis generadas a partir del cultivo *in vitro* (1,500, 3,000 y 6,000 cél./ostión, 30 ostiones por dosis). El cuarto grupo con sus réplicas se emplearon como control, los cuales se le inocularon con agua de mar estéril. La inoculación de los ostiones se llevó a cabo mediante la inyección directa en el músculo aductor del ostión, para esto se realizó una pequeña muesca en la concha adyacente al músculo, permitiendo así el acceso a éste. El volumen inoculado fue de 150  $\mu$ L (Figura 7).



**Figura 7. (A) Muesca realizada en la zona adyacente al músculo aductor del ostión. (B) Inyección de 150  $\mu$ L en el músculo aductor del ostión. Todos los ostiones inoculados mediante este procedimiento cerraron su muesca después de 4~5 días.**

Los ostiones dispuestos en réplicas, se mantuvieron en acuarios de 35 L, en un volumen de 15 litros de agua de mar, aireación constante, recambios de agua del 100 % cada tercer día

y alimentación (*ad libitum*) a base de pasta comercial de microalgas (Instant Algae – Shellfish Diet 1800) (Figura 8). Las condiciones de salinidad y temperatura fueron de 33 ups ( $\pm 1$ ) y 23°C ( $\pm 1$ ) a lo largo del experimento.

A partir del momento de la inoculación, se sacrificaron ostiones a los 20, 44 y 65 días para su revisión, empleándose las técnicas de FT, histología y PCR. Los organismos que murieron durante este bioensayo se procesaron y analizaron de igual manera que los sacrificados.



**Figura 8.** Vista general del laboratorio donde se llevó a cabo los bioensayos de infección. En total se dispusieron de 12 acuarios, con 10 ostiones por acuario. El experimento tuvo una duración de 65 días.

### 3.7 Bioensayo de infección en *Crassostrea gigas*

El bioensayo de infección de *C. gigas* con *P. marinus* fue un estudio preliminar que se realizó con el propósito de probar la ya conocida resistencia de esta especie al parásito y para probar también la metodología que se emplearía en el bioensayo principal con *C. corteziensis*. Dicho estudio se llevó a cabo en el laboratorio de patología del Departamento de Acuicultura en CICESE. 60 ostiones ( $11 \pm 3$  cm, longitud de concha) fueron obtenidos de una empresa acuícola la cual mantiene sus cultivos de ostión en la Bahía de Todos Santos, Ensenada, B.C., zona libre del parásito.

Las hiposporas se separaron del tejido del ostión mediante filtración y centrifugación, sin llevar a cabo la propagación *in vitro* (a diferencia que con el bioensayo con *C. corteziensis*), debido a que aún no se disponía del medio DME:Ham F12 (1:2).

Se formaron tres grupos de ostiones. Al primer grupo se le inoculó con una dosis de 400 hiposporas por ostión, inyectadas en el músculo aductor. El segundo grupo fue empleado como un primer control (C1), al cual se le inyectó con agua de mar estéril y el tercer grupo de ostiones fue empleado como segundo control (C2) al cual no se le realizó muesca ni inyección.

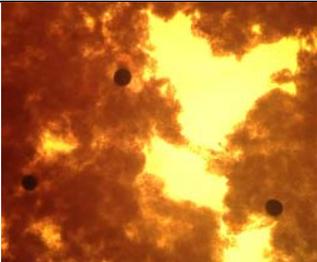
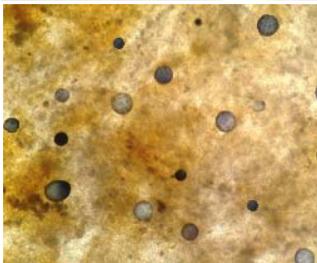
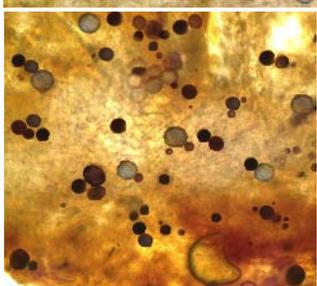
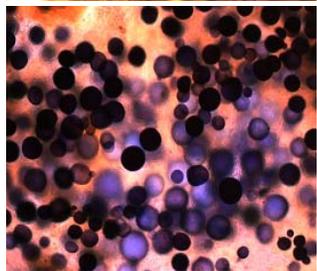
Los ostiones se mantuvieron en acuarios de 35 L, con 10 ostiones por acuario en un volumen de 15 litros, y aireación constante. El agua fue cambiada cada tercer día. Los ostiones se alimentaron con pasta de microalga (*Isochrysis* 1800), se mantuvieron a temperatura ambiente ( $23 \pm 3^\circ\text{C}$ ) y salinidad de  $33 \pm 1$  ups. Se sacrificaron ostiones a los 15, 68 y 95 días posteriores al inicio del experimento. Se emplearon las técnicas de PCR, FT y cortes histológicos para seguir el proceso de infección y los animales que murieron durante el experimento se procesaron y analizaron de igual manera que los sacrificados.

### 3.8 Pruebas de diagnóstico empleadas

#### 3.8.1 Diagnóstico mediante el uso de fluido de tioglicolato

El FT es una técnica que es empleada como una prueba de diagnóstico considerando la escala relativa de Mackin (1962)(Tabla 3).

Tabla 3. Escala de intensidad de *P. marinus* por incubación de tejido en fluido de tioglicolato (Modificado de Navarro-Barrera, 2011, p. 22-23).

Intensidad	No. de células de <i>P. marinus</i>	Visualización
1	1 a 10	
2	11 a 30	
3	31 a 100	
4	101 en adelante	

Dicha escala permite estimar la intensidad de acuerdo al número de inclusiones (hipnosporas) en el tejido. En el presente estudio dicha escala fue modificada por cuestiones prácticas, cambiando de 5 categorías a 4, ya que una de estas categorías consideraba la usencia de células como un nivel de intensidad y fue descartada.

### **3.8.2 Diagnóstico por Histología**

Para el análisis histológico se removió cada ostión de su concha y se realizó un corte transversal del cuerpo blando de aproximadamente 5 mm. El corte incluyó manto, glándula digestiva, riñones, gónada y branquias.

Cada corte se colocó individualmente en un casete histológico y se fijó con solución Davidson por 24 horas, en una relación de volumen de 1:5 (Apéndice 3) (Shaw y Battle, 1957). Posteriormente los tejidos se deshidrataron en un procesador automático de tejidos (Apéndice 4), con cambios graduales de etanol (70 % hasta alcohol absoluto) y se incluyeron en parafina utilizando un incluidor.

Los cortes histológicos se realizaron con un micrótomo, obteniendo cortes de 5 micras de espesor para posteriormente colocarlos en un portaobjetos. Las laminillas se tiñeron con Hematoxilina-Eosina/Floxina (Shaw y Battle, 1957) y se montaron con resina (Apéndice 5). Las laminillas histológicas se revisaron bajo un microscopio compuesto, para determinar la presencia e intensidad de *P. marinus* en cada ostión del bioensayo.

Para determinar la intensidad de la infección se utilizó la siguiente escala propuesta por Cáceres-Martínez y colaboradores, 2008:

1. Infección ligera: el parásito está presente sólo en el epitelio de algunas áreas del intestino y no se observa infiltración hemocitaria.
2. Infección moderada: el parásito se encuentra en el epitelio de algunas áreas del intestino, en el tejido conectivo y se observa infiltración hemocitaria.
3. Infección severa: hay una infiltración de hemocitos generalizada, el parásito invade el intestino, tejido conectivo, manto y branquias.

### 3.9 Confirmación molecular de *Perkinsus marinus*

#### 3.9.1 Extracción de ADN

Con el propósito de confirmar la presencia de *P. marinus* mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se realizó extracción de ADN de la siguiente manera:

Se extrajo un aproximado de 0.3 a 1 mg de tejido de branquia y recto por separado por cada ostión. Las muestras se colocaron en tubos Eppendorf de 1.5 ml (individual) y fueron preservadas a - 20 °C. Posteriormente, a dichas muestras se les adicionaron 500 µl de TE estéril, 100 µl de SDS 10 % (duodecil sulfato de sodio), 10 µl de proteinasa K (10 mg/ml) y se les dejó incubar durante un periodo de 12 horas a 56 °C.

Después de incubar se agregaron 500 µl del reactivo comercial DNazol® (Research Molecular Center) siguiendo el protocolo del fabricante. El tubo se dejó incubando 1 hora a 56 °C, agitando cada 15 minutos en vórtex. Transcurrido el tiempo de incubación se centrifugó la muestra 6 minutos a 12,600 rpm a temperatura ambiente en una microcentrífuga, con el fin de precipitar el tejido degradado. Se transfirieron 800 µl del sobrenadante a un tubo estéril, se agregaron 200 µl de cloroformo (99 %), se mezcló por 20 segundos y se centrifugó nuevamente 6 minutos a 12,600 rpm. Se transfirió cuidadosamente 600 µl del sobrenadante a otro tubo estéril, agregándose 800 µl de isopropanol 99.9 % (- 20 °C) que se mezcló por inversión y se dejó en refrigeración aproximadamente 12 horas para precipitar el ADN.

Una vez transcurrido el tiempo de precipitación del ADN, se centrifugó por 10 minutos a 14,000 rpm. El sobrenadante se eliminó por decantación y el ADN precipitado se lavó con 750 µl de etanol al 70 %. Nuevamente se centrifugó por 10 minutos a 14,000 rpm eliminándose el sobrenadante por decantación. El ADN precipitado se secó en una estufa a 56 °C para eliminar restos de etanol, por un tiempo no mayor a 30 minutos. Finalmente el ADN se resuspendió en 100 µl TE estéril.

### 3.9.2 Preparación de la PCR

La prueba de PCR se realizó a partir iniciadores de las regiones ITS del genoma de *Perkinsus marinus*: los oligonucleótidos PerkITS-85 (5'-CCG CTT TGT TTG GAT CCC-3') y PerkITS-750 (5'-ACA TCA GCC CTT CTA ATG ATG-3') que amplifican un fragmento de 703 pb (Casas *et al.*, 2002). Los componentes y volúmenes empleados para la reacción de PCR fueron los siguientes: 2.5 µL de amortiguador 10 X para *Taq*, 0.5 µL de dNTP's 10 mM, 0.625 µL de iniciador PerkITS85 10 µM, 0.625 µL de iniciador PerkITS750 10 µM, 0.125 de *Taq* polimerasa 5 U/ µL, 19.625 de agua grado biología molecular y 1 µL de ADN genómico total para dar paso a un volumen final de 25 µL. Esta mezcla se realizó para cada muestra de ADN de tejido blanco de ostión.

Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 94 °C por 4 minutos; 40 ciclos de 94 °C por 1 min., 55 °C por 1 min. y 72 °C por 1 min.; extensión final de 72 °C por 10 min (Audemard *et al.*, 2004).

En todas las corridas realizadas se incluyó un control positivo de ADN genómico de ostión infectado con *P. marinus* y un control negativo donde el ADN fue sustituido por agua grado biología molecular.

Los productos de PCR se detectaron por medio de la técnica de Electroforesis en el gel de agarosa al 1.2 %. Se aplicó una carga de 100 volts durante 1 hora y el gel fue teñido con una solución de Bromuro de Etidio (1 µg/ml). Como referencia se utilizó el marcador de peso molecular de 0.1 a 1 Kb (GeneChoice) a una concentración de 0.5 µg/ml.

### 3.10 Determinación de la infección

Se consideraron infectados a aquellos organismos que fueron positivos por cultivo en FT y por análisis de PCR. La intensidad de la infección se consideró a partir de la escala modificada de Makin y por el análisis de los tejidos a nivel histológico.

### **3.12 Análisis estadístico**

Se utilizó estadística descriptiva para la evaluación de los datos de infección, intensidad y mortalidad.

No se realizó prueba de comparación de medias debido a que los datos obtenidos no muestran diferencias considerables de acuerdo a las medidas de tendencia central obtenidas.

Para el manejo de todos los datos se utilizó hojas de cálculo de Excel y un software estadístico (STATISTICA versión 7.0, Stat Soft. Inc., 2007).

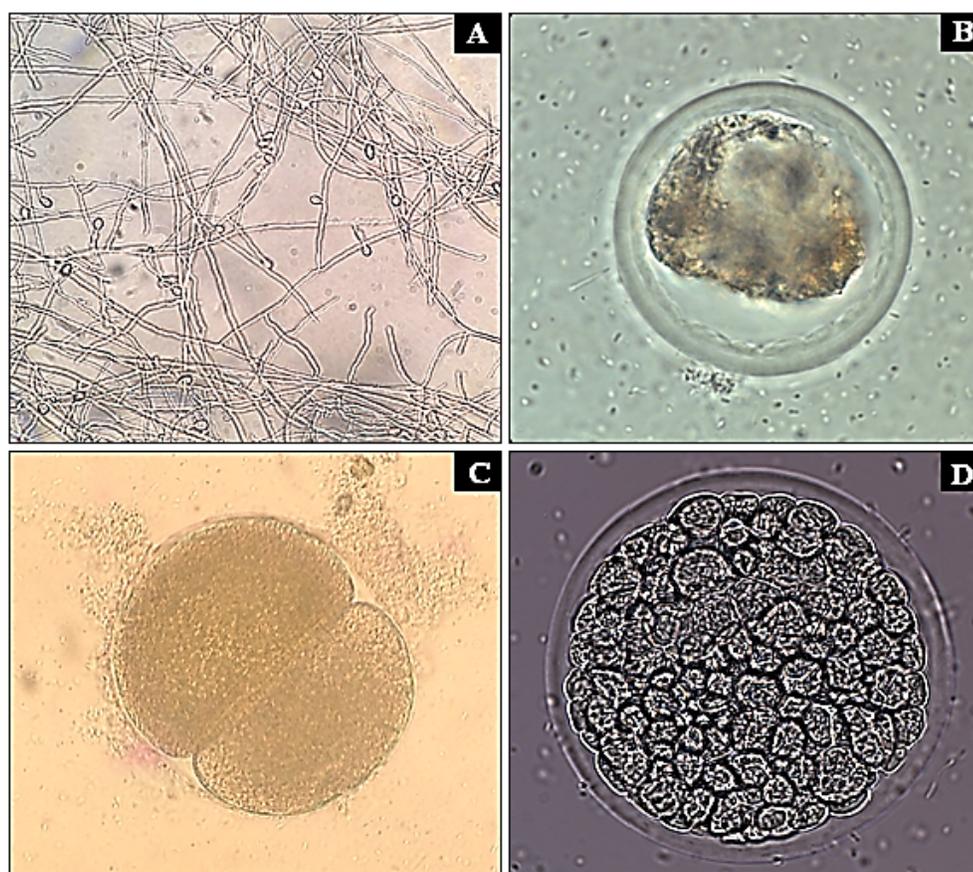
## Capítulo 4

---

### 4. Resultados

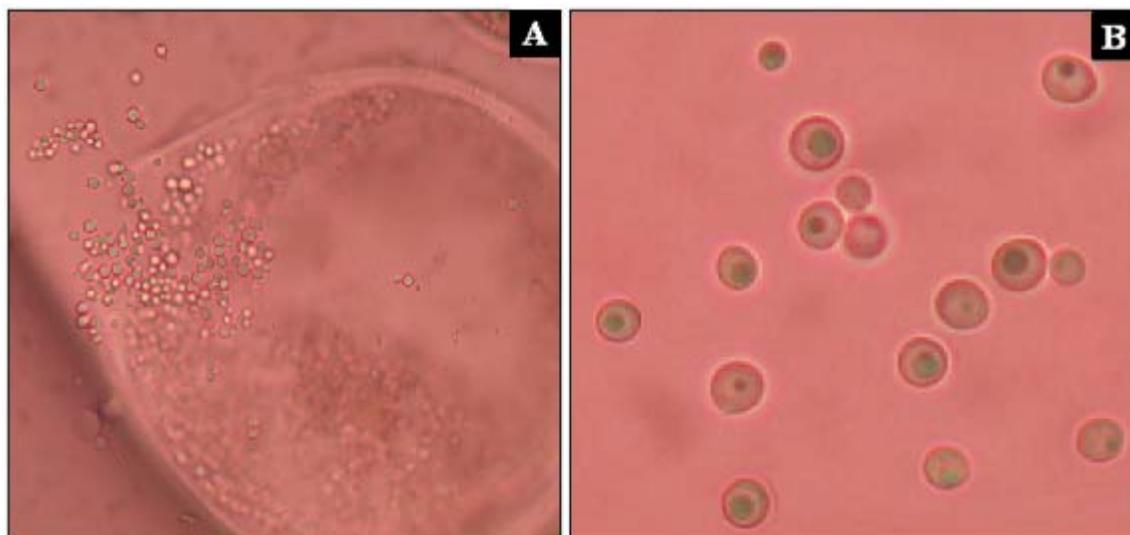
#### 4.1 Cultivo *in vitro* de *Perkinsus marinus*

Después de varios intentos se consiguió el cultivo purificado de *P. marinus*. Como era previsible, en los primeros ensayos la contaminación por hongos y bacterias fue frecuente debido al perfeccionamiento de la técnica (Figura 9).



**Figura 9.** (A) Hifas y esporangios que se desarrollaron durante el proceso de optimización de la técnica de cultivo. (B) Hipnospora rodeada por bacterias. (C) Hipnospora en división. (D) Hipnospora con células hijas.

Durante el proceso de cultivo no hubo desarrollo del túbulo de descarga. Sin embargo, se observó la liberación del contenido por la ruptura accidental de algunas hipnosporas. (Figura 10).



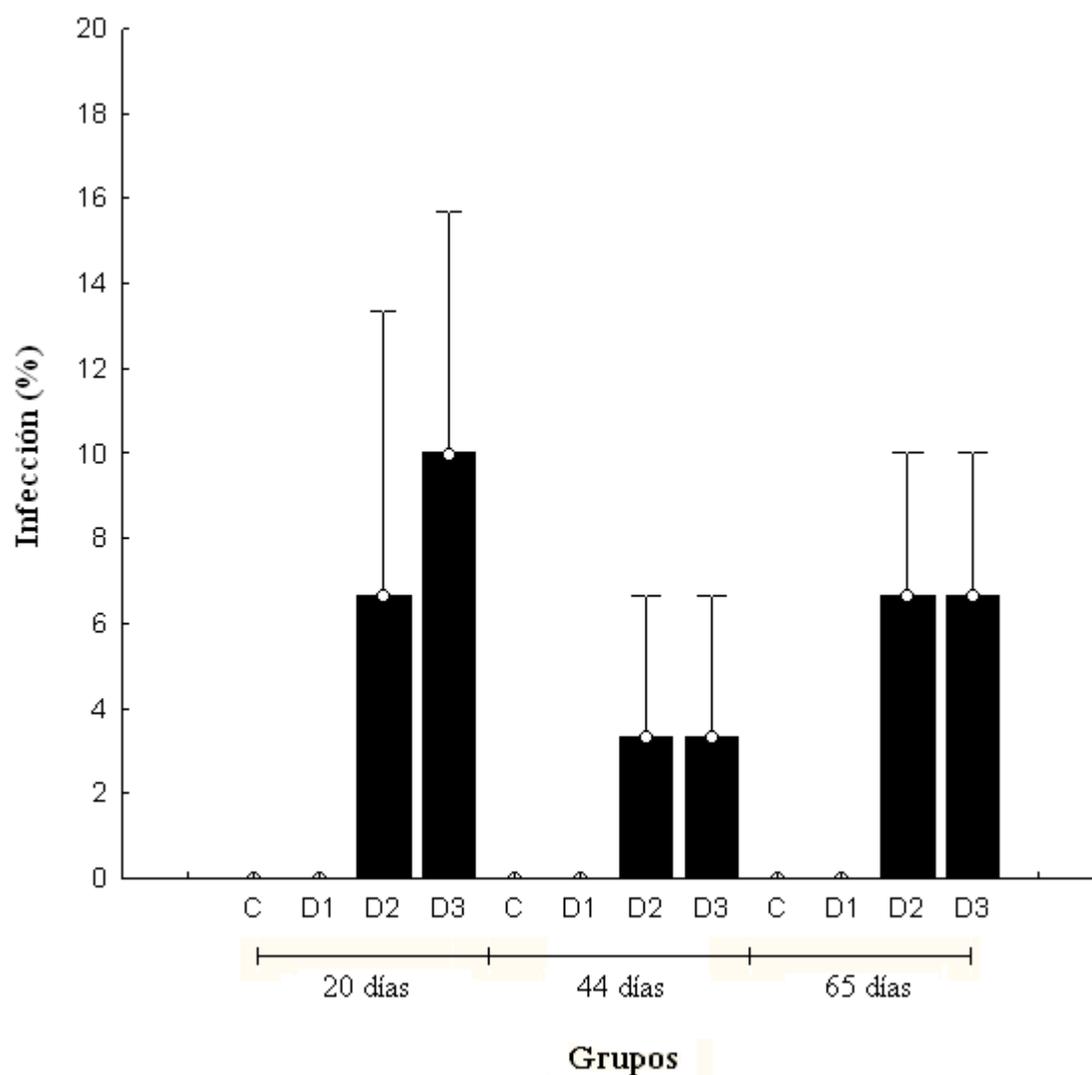
**Figura 10. (A) Hipnospora con la pared celular rota en donde se aprecia la liberación del contenido al exterior. La ruptura de la pared fue debida a la manipulación de la muestra. (B) Al paso de 1 a 2 días en las células liberadas se aprecia un núcleo en su interior.**

En varios casos, el uso de Penicilina y Estreptomina, no garantizó la eliminación de las bacterias, no obstante, con la correcta dosificación de estos antibióticos, más tarde se consiguió la eliminación de tales microorganismos. Con respecto a la contaminación por hongos, estos fueron controlados o eliminados mediante el uso de Nystatin.

Después de dos semanas de cultivo de *P. marinus* en el medio DME:Ham F12, se obtuvo la cantidad de células necesarias para inocular a *C. corteziensis* con dosis de 1,500, 3,000 y 6,000 células por ostión.

#### 4.2 Bioensayo de infección en *Crassostrea corteziensis*

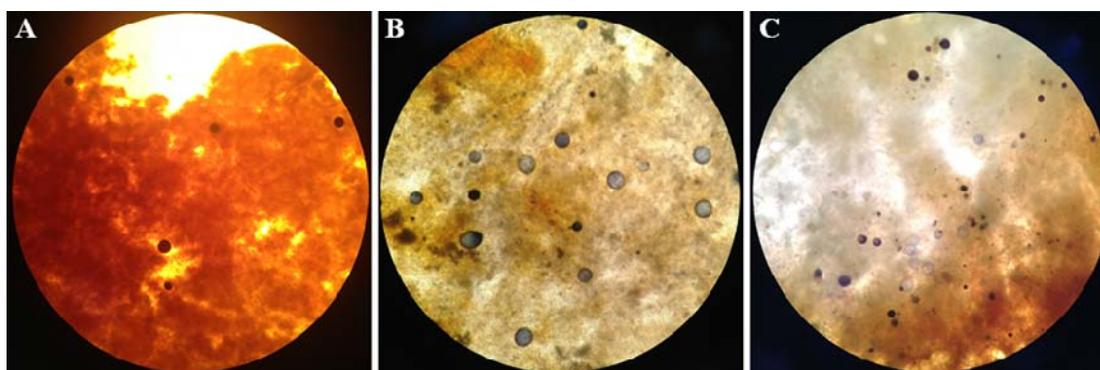
La infección por *P.marinus* durante la duración del bioensayo se muestra en la Figura 13. No ocurrieron infecciones ni en el lote control ni en los ostiones inoculados con 1500 cél./ostión.



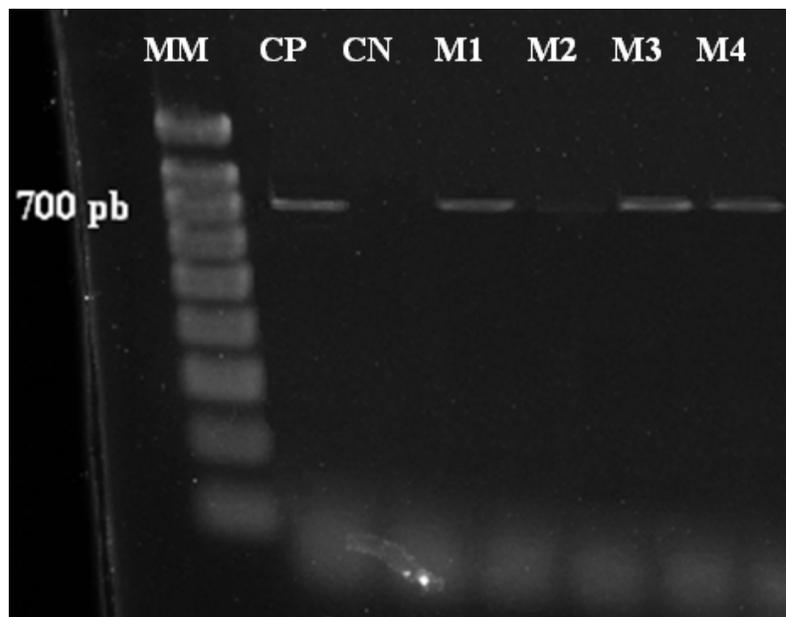
**Figura 13. Porcentaje de infección por grupos de ostiones en los tres muestreos (20, 44 y 65 días), donde C es el grupo control, D1 el grupo inoculado con 1,500 cél./ostión, D2 el grupo inoculado con 3,000 cél./ostión y D3 el grupo inoculado con 6,000 cél./ostión. En la figura se indica la media y el error estándar de la media.**

Se detectaron ostiones infectados a partir del día 20 y hasta el final del estudio a dosis de 3,000 y 6,000 cél./ostión. Las diferencias en el número de ostiones infectados a estas dosis no fueron notorias. El error estándar de la media de los datos obtenidos fue grande. No se observó un aumento en el número de ostiones infectados al final del estudio.

La detección de infecciones fue a partir de FT (Figura 14), algunos de los casos fueron confirmados mediante PCR (Figura 15). Sin embargo, problemas en la estandarización de la técnica no permitieron la confirmación en todos los casos.

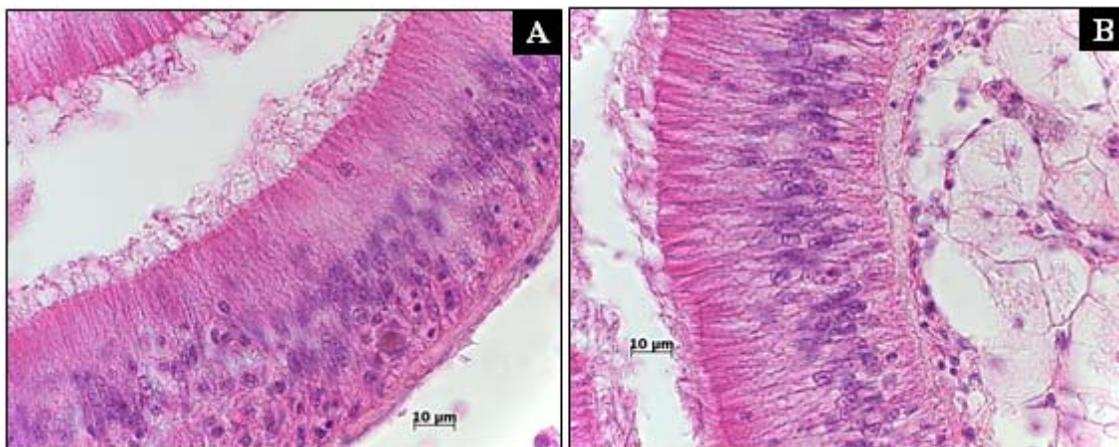


**Figura 14.** Imágenes de ostiones que resultaron positivos a la prueba del FT. En dichas imágenes se muestra el tejido de recto incubado en tioglicolato con la presencia de hipnosporas con diferentes niveles de infección de acuerdo a la escala relativa de Mackin (modificada): (A) intensidad 1, (B) intensidad 2 y (C) intensidad 3. No se detectaron intensidades 4 durante este bioensayo.



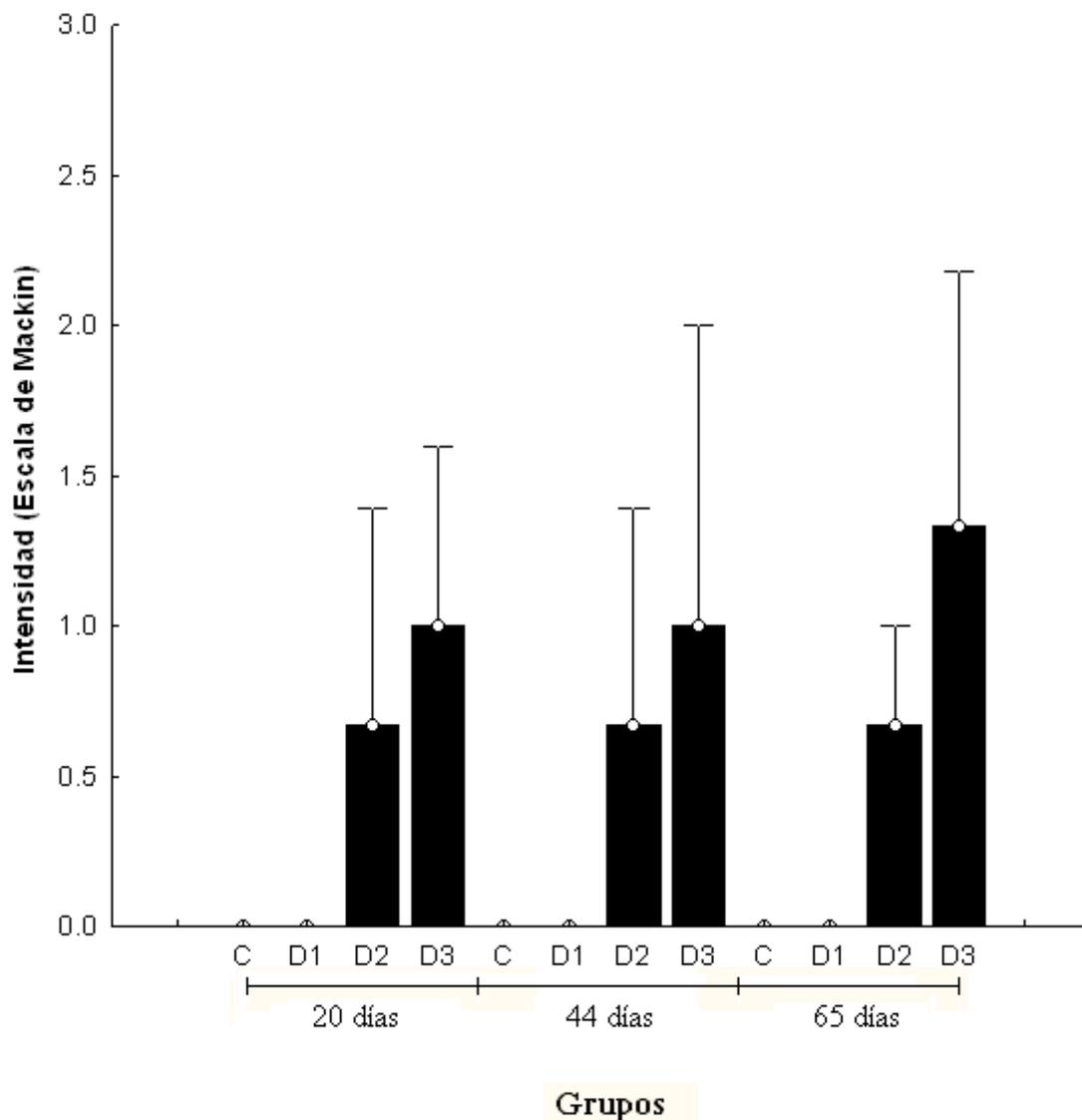
**Figura 15.** Detección genética de *P. marinus* por PCR con el uso de iniciadores para la región ITS. Esta prueba fue realizada a partir de muestras de FT que resultaron positivas a *P. marinus* a los 65 días post-inoculación. En la imagen se observa el gel de agarosa (1.2 %), donde MM es el marcador molecular, CP control positivo, CN control negativo y muestras (M1 a M4); se pueden identificar tres productos de PCR (M1,M3 y M4) que indican 3 resultados positivos a *P. marinus*.

El análisis histológico no evidenció ni el establecimiento del parásito ni desarrollo de la infección (Figura 16).



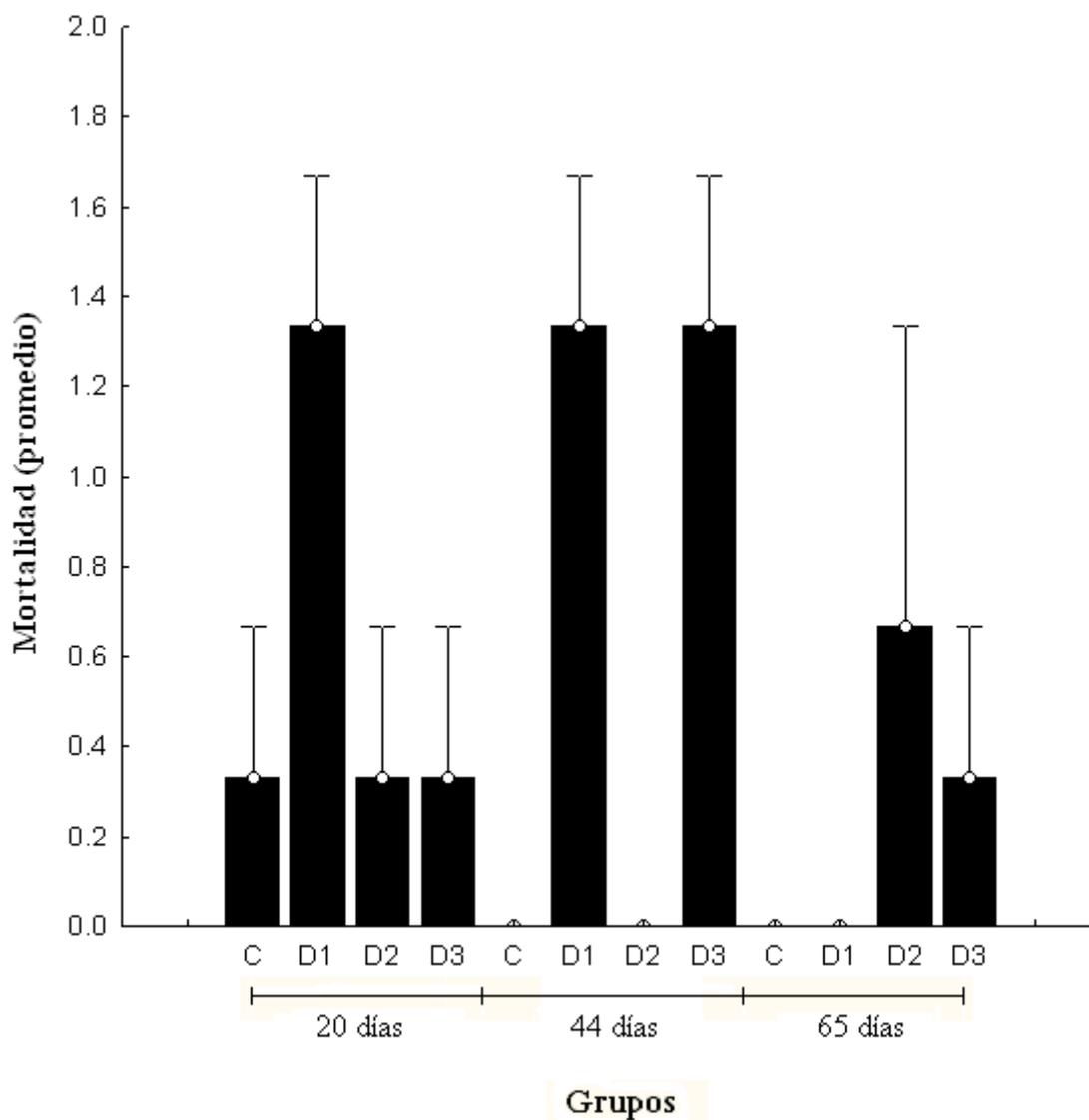
**Figura 16.** (A) y (B) Epitelio columnar ciliar del ostión sin presencia de *P. marinus*. No se encontraron alteraciones en el tejido que indicaran progresión de la infección y desarrollo de la enfermedad (infiltración hemocitaria, células cafés, desarreglos estructurales).

En la Figura 17 se muestra la intensidad de la infección a partir de FT utilizando la escala modificada de Mackin. La intensidad de infección aparentemente fue mayor a dosis de 6,000 cél./osti3n, que a la dosis de 3,000 cél./osti3n. El error est3ndar de la media de los datos obtenidos fue grande. No se observ3 un claro aumento en la intensidad de la infecci3n hacia el final del estudio.



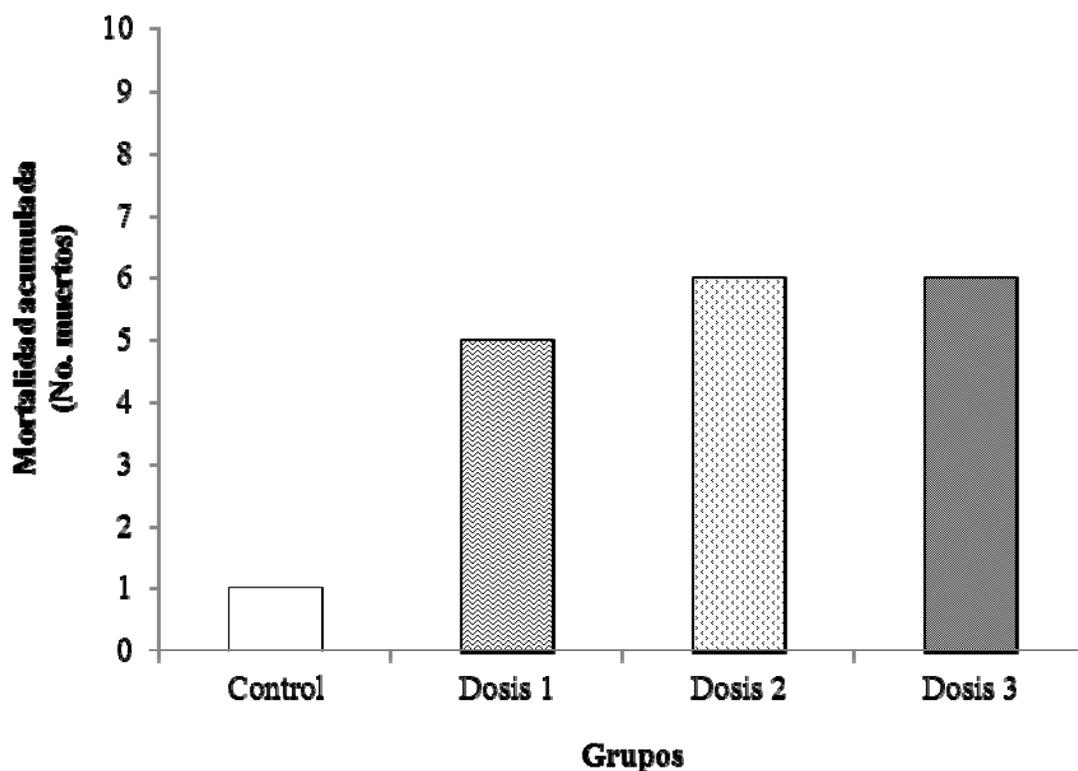
**Figura 17.- Intensidad de infecci3n por grupos a trav3s de los tres muestreos (20, 44 y 65 d3as), donde C es el grupo control, D1 el grupo inoculado con 1,500 c3l./osti3n, D2 el grupo inoculado con 3,000 c3l./osti3n y D3 el grupo inoculado con 6,000 c3l./osti3n. En la figura se indica la media y el error est3ndar de la media.**

En la Figura 18 se presenta la mortalidad ocurrida durante el bioensayo, en donde se observa una disminución de los eventos de mortalidad al final del experimento. En el grupo control se observó la mortalidad más baja.



**Figura 18.** Mortalidad promedio por grupos a través de los 20, 44 y 65 días, donde C es el grupo control, D1 el grupo inoculado con 1,500 cél./osti3n, D2 el grupo inoculado con 3,000 cél./osti3n y D3 el grupo inoculado con 6,000 cél./osti3n. En la figura se indica la media y el error est3ndar de la media.

La mortalidad acumulada con las diferentes dosis aplicadas muestra de mejor manera las similitudes y diferencias entre los grupos (Figura 19).



**Figura 19. Mortalidad acumulada por grupos. Los grupos dosis 1, 2 y 3 manifestaron una mortalidad similar (5 a 6 muertes por grupo), mientras que el grupo control manifestó la mortalidad mas baja con solo una muerte.**

Es importante mencionar que ninguno de los ostiones que murieron resultó positivo a *P. marinus*.

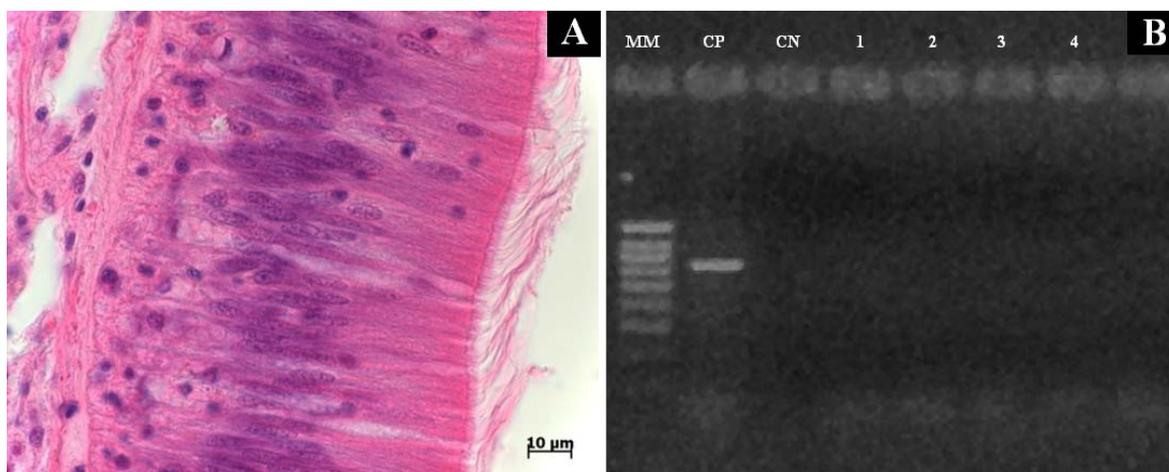
### 4.3 Bioensayo de infección en *Crassostrea gigas*

Tanto los análisis por PCR como los histológicos demostraron que *P. marinus* no se estableció en el hospedero. Solamente uno de los ejemplares inoculados mostró, después de 95 días, una aparente hipnospora en el FT (Figura 11).



**Figura 11. (A) y (B) Tejido de *C. gigas* incubado en fluido de tioglicolato, donde se observa una presunta hipnospora, después de 95 días de haberse efectuado las inoculaciones.**

Sin embargo, los resultados por PCR e histología para este mismo ejemplar fueron negativos al parásito (Figura 12), por lo cual, este resultado debe tomarse con reserva.



**Figura 12. (A) Corte histológico de *C. gigas* donde se observa el epitelio columnar ciliar sano y sin presencia de *P. marinus*, después de 95 días de la inoculación. (B) Detección de *P. marinus* por medio de PCR. Marcador molecular (MM), control positivo (CP) y ninguna muestra (1-5) se evidencia a la par del CP, lo que indica ausencia de *P. marinus*.**

La mortalidad en el transcurso de los 95 días fue del 13.3 % considerando un total de 60 individuos, de los cuales el 5 % corresponde al grupo inyectado con *P. marinus*, 5 % al grupo inyectado con agua de mar estéril y 3.3 % al grupo al que no se le realizó inyección. El análisis de los ostiones que murieron durante el bioensayo fueron analizados mediante las técnicas anteriormente mencionadas y no se detectó a *P. marinus*.

## Capítulo 5

---

### 5. Discusión, Conclusiones y Recomendaciones

#### 5.1 Discusión

Uno de los retos más importantes para lograr un cultivo *in vitro* de cualquier microorganismo es evitar la contaminación por hongos y bacterias. Durante el presente trabajo, este aspecto fue especialmente difícil de controlar. En este sentido se debe establecer la dosis y frecuencia adecuada del suministro de antibióticos y antimicóticos (posología) para mantener los cultivos viables y esto no depende únicamente de las recomendaciones encontradas en la literatura, sino también de las condiciones particulares de las instalaciones en donde se realiza el cultivo y de la experiencia y habilidad de quién lo lleva a cabo. Afortunadamente, se logró obtener el cultivo *in vitro* esperado y a partir de la densidad de cultivo obtenida, se pudieron establecer las dosis experimentales dentro de un rango que permitió su comparación con resultados obtenidos por otros autores en este tipo de bioensayos.

Las infecciones experimentales se han hecho a partir de extractos semipurificados de tejido infectado por *P. marinus* incubado en FT (Mackin, 1962; Valiulis, 1973; Chu *et al.* 1993; Volety y Chu, 1994; Chinthala *et al.* 2002; Chu, 1996) y a través del cultivo *in vitro* a partir de purificados de tejido infectado por *P. marinus* incubado en FT (La Peyre *et al.* 1993; Gauthier y Vasta, 1993; Kleinschuster y Swink, 1993; Bushek, 1994; Perkins, 1994; Chinthala *et al.* 2002; Dungan y Hamilton, 1995). Se ha visto que las infecciones a partir de semipurificados, requieren de menores dosis que de los purificados para lograr una infección y el desarrollo de la enfermedad. Por ejemplo, Valiulis (1973) consiguió infectar a *C. virginica* mediante la inyección en la cavidad del manto a partir de una dosis de 10 células semipurificadas por ostión en un periodo de prueba de 105 días. Por otra parte, Chu (1996) menciona que la dosis mínima requerida para iniciar la infección por *P. marinus* en *C. virginica* es de 10 a 100 células semipurificadas por ostión en 84 días, a 25°C, sin eventos de mortalidad. Chintala *et al.* (2002) compararon la infectividad de *P. marinus*

purificado contra la infectividad de *P. marinus* semipurificado. Después de inocular con 1,000,000 de células por ostión, encontraron que después de 84 días el 75 % de los ostiones inoculados con *P. marinus* semipurificado murió, mientras que solo el 7.5 % de los ostiones que habían sido inoculados con *P. marinus* purificado habían muerto. Ante estos resultados se concluyó que *P. marinus* recién aislado de huéspedes infectados era más virulento que *P. marinus* cultivado *in vitro*. En contraste con estos resultados Gauthier y Vasta (1993) obtuvieron una infección severa en tan solo 28 días, después de haberse efectuado dos inoculaciones quincenales a partir de cultivos *in vitro* de 200,000 células por ostión, para el día 56 ya todos los ostiones habían muerto. La Peyre *et al.* (1993) inoculó también con 1,000,000 células propagadas *in vitro* por ostión, mediante la inyección en la cavidad del manto y al paso de 56 días ellos obtuvieron 100 % de prevalencia pero una infección ligera. Bushek *et al.* (1994) realizaron un estudio donde inocularon diferentes concentraciones de células cultivadas *in vitro*, al mismo tiempo que compararon tres métodos distintos de inoculación (filtración, inyección en la cavidad del manto e inyección en el músculo aductor). Dichos autores encontraron que, con una cantidad de 10,000 células por ostión se obtenía una infección ligera y que tanto la inyección en la cavidad del manto como en el músculo aductor poseían la misma eficacia mientras que la infección por filtración no fue efectiva. En el presente estudio, ocurrieron infecciones en las dosis de 3,000 y 6,000 células por ostión, es decir, menores que las dosis empleadas por Chintala *et al.* (2002); Gauthier y Vasta (1993); La Peyre *et al.* (1993); Bushek *et al.* (1994), lo que indica que *C. corteziensis* puede infectarse a esos niveles de dosificación, mientras que la infección no ocurre a concentraciones de 1,500 células por ostión, Esto sugiere que los mecanismos de defensa de *C. corteziensis* pueden ser efectivos en impedir la infección a dichas concentraciones, a pesar de haber sido inoculados por inyección. Por otro lado, se ha visto que en los estudios de infección de *C. virginica*, la prevalencia e intensidad de la infección siempre se incrementa a través del tiempo, independientemente de la dosis aplicada (Valiulis, 1973; Chu *et al.* 1993; La Peyre *et al.* 1993; Bushek *et al.* 1994; Perkins, 1994; Volety y Chu, 1994; Chinthala *et al.* 2002; Chu, 1996; La Peyre, 1996), situación que no coincide totalmente con lo observado para *C. corteziensis*, ya que no hubo evidencias de desarrollo de la infección (aumento en prevalencia y/o intensidad) después de 65 días

desde el inicio del experimento. Aunque sí se detectó un aumento en la intensidad de infección en la dosis más elevada. Todo esto sugiere que los mecanismos de defensa de *C. corteziensis* contra *P. marinus* son más eficientes que los de *C. virginica*. Desde luego, es fundamental tomar en consideración el papel de condiciones experimentales de los estudios de infectología en *C. virginica* respecto al presente estudio para contextualizar esta sugerencia.

El hecho de que solamente en el 12 % de los ostiones inoculados se detectó a *P. marinus* también refuerza la posible menor susceptibilidad de esta especie respecto a *C. virginica* y muestra que existe una variación importante entre los ostiones del bioensayo con respecto a la infección, misma que puede ser debida a la resistencia individual de los ostiones estudiados. Desde luego, la variabilidad detectada también puede estar relacionada con el tamaño de muestra.

Las posibles diferencias en susceptibilidad también pueden ser atribuidas a una patogenicidad diferencial de cepas o variedades de *P. marinus*. Se sabe que hay variedades más patógenas que otras, Fernández-Robledo *et al.* (1999) diferenciaron la variedad de *P. marinus* tipo I y tipo II, siendo la variedad Tipo I la más virulenta y la dominante en la costa Este de E.U.A. mientras que la variedad Tipo II es la dominante en ostiones de lagunas costeras Mexicanas del Golfo de México, siendo a su vez la encontrada en las costas de Nayarit y Sinaloa (Parra-Laca, 2010, Pineda-García, 2011) y la utilizada en este estudio.

Con respecto al bioensayo realizado con el ostión japonés *C. gigas*, tal como ha sido demostrado por Meyers *et al.* (1991), Oliver *et al.* (1999), Romestand *et al.* (2002), Goedken *et al.* (2005), se corrobora que éste sí posee mayor resistencia a *P. marinus*. Sólo en uno de los ostiones inoculados se detectó a una presunta hipnospora en el FT, pero tanto el análisis por PCR como histológico resultaron negativos para dicho ejemplar. Esto a pesar de que se empleó una dosis de inóculo semipurificado de 400 células por ostión, siendo que solo se requieren 100 células de semipurificado para lograr infección en *C. virginica* y que dosis de 500 células por ostión son suficiente para causarle mortalidad después de 41 días (Mackin, 1962). En el presente estudio no hubo mortalidad asociada a la infección. La

mortalidad observada parece estar más relacionada con el manejo y el estrés por la manipulación en laboratorio que por el efecto del parásito.

Es importante destacar que si bien se demostró la infección por *P. marinus* en *C. corteziensis* por medio de la incubación en FT y su confirmación, en algunos casos, por análisis de PCR, no se observaron estadios de desarrollo del parásito en los tejidos. Esta observación coincide con lo encontrado por La Peyre (1996) y Moss (2006) quienes no encuentran alteraciones histológicas en *C. virginica* con infecciones de ligeras a moderadas determinadas previamente por incubación en FT e indican que estos niveles de infección son difícilmente detectables por histología. Curiosamente, la comparación entre la utilidad diagnóstica de análisis en fresco, FT, PCR e histología en un trabajo de campo realizado por Navarro-Barrera (2010), demostró que la mejor técnica para detectar una infección por *P. marinus* y el desarrollo de la enfermedad es la histológica. Estos resultados contradictorios pueden estar relacionados con el propio desarrollo de la infección. Al inducir una infección en laboratorio, en caso de lograrse (establecimiento del parásito dentro del hospedero), se desencadenarán los mecanismos de defensa del hospedero (fagocitosis, encapsulación, factores humorales) en contra del parásito, mismo que puede empezar a proliferar, pero aún no se desencadenan las alteraciones a nivel tisular y por lo tanto podemos tener valores relativamente altos por FT que no necesariamente indiquen, aún, alteraciones tisulares visibles. Por otro lado, durante el monitoreo de poblaciones en su medio ambiente, las muestras que uno obtiene podrán mostrar un estado de desarrollo de la infección en particular pero no sabemos desde cuando se viene llevando a cabo, en cuyo caso, la interpretación de resultados de una técnica de diagnóstico en particular, deberán ser evaluados cuidadosamente. Esto también conduce a reflexionar y entender que no por la detección del parásito en el ostión existe un desarrollo de la enfermedad y que las tres técnicas empleadas en este estudio son complementarias entre sí, de tal manera que sin una de ellas el diagnóstico de infección puede ser mal interpretado.

A partir de los resultados obtenidos en el presente estudio se puede suponer que aplicando algunas de las estrategias de manejo que se emplean en el cultivo de *C. virginica* para minimizar el impacto de *P. marinus* en la costa Este de E.U.A., podríamos controlar el impacto de *P. marinus* en el cultivo de *C. corteziensis*.

La manera en cómo este estudio nos brinda bases en el establecimiento de medidas de bioseguridad es que ahora sabemos que el ostión de placer *C. corteziensis* posee una resistencia natural a *P. marinus* a dosis bajas de infección intramuscular de 1,500 células por ostión. Si aprovechamos este conocimiento, podemos crear estrategias de manejo que reduzcan las posibilidades de contagio entre ostiones, como por ejemplo, reducir la densidad de cultivo en zonas donde el parásito sea detectado, llevar a cabo limpiezas periódicas del cultivo, cosechar a un tiempo no mayor a dos años de vida de los ostiones y evitar desechar con mayor razón conchas, vísceras o cadáveres de ostiones en los cuerpos de agua como esteros de cultivo o en la línea de costa, dándole un tratamiento adecuado (depósitos subterráneos, aplicar cal, cloro o altas temperaturas). Es indispensable vincular al sector productivo con el sector de investigación, con el fin de capacitar e informar a productores y comerciantes sobre lo último en ciencia y tecnología que ayuda al mejoramiento de sus cultivos, de manera que una realidad como lo es la presencia de *Perkinsus marinus* en el Pacífico Mexicano sea de conocimiento general para todos ellos, así como todas las repercusiones que esto conlleva.

## 5.2 Conclusiones

- *Crassostrea corteziensis* puede ser infectado a partir de inóculos de 3,000 células por ostión.
- No se observaron diferencias en el porcentaje de ostiones infectados con dosis de 3,000 y 6,000 células por ostión.
- Hay un aumento en la intensidad de infección a dosis de 6,000 células por ostión respecto a 3, 000 células por ostión.
- *Crassostrea corteziensis* no se infectó con inóculos de 1,500 células por ostión.
- No hubo mortalidad asociada con la infección.
- En ostiones infectados no se apreció el desarrollo de la enfermedad a nivel histológico.
- La susceptibilidad del ostión de placer *Crassostrea corteziensis* a *Perkinsus marinus* parece ser menor que la descrita para el ostión americano *Crassostrea virginica*.
- La susceptibilidad del ostión de placer *Crassostrea corteziensis* a *Perkinsus marinus* parece ser mayor que la descrita para el ostión japonés *Crassostrea gigas*.
- Dada la aparente menor susceptibilidad de *C. corteziensis* a *P. marinus*, las medida convencionales de bioseguridad consideradas para *C. virginica*, podrían ser muy efectivas. Sin embargo, se requiere su valoración a nivel experimental.

### 5.3 Recomendaciones

Se recomienda la continuidad de este estudio para establecer la dosis letal media de *P. marinus* en *C. corteziensis*.

Para continuar con este tipo de estudios, es necesario optimizar el cultivo *in vitro* de *P. marinus*, por lo que se recomienda establecer la dosis y frecuencia adecuada del suministro de antibióticos y antimicóticos (posología) y no depender únicamente de las recomendaciones en la literatura.

También es conveniente profundizar sobre las causas que provocaron una variación importante entre los ostiones del bioensayo con respecto a la infección, por ejemplo el cálculo del inóculo, condiciones del inóculo, cantidad y calidad del inóculo.

Con el propósito de evaluar la infección de *Crassostrea corteziensis* por *Perkinsus marinus*, se recomienda emplear varias técnicas de diagnóstico.

## Referencias bibliográficas

- Aguirre-Macedo L.M., R.A. Sima-Álvarez, K.M. Roman-Magaña y J.I. Güemez-Ricalde, 2007. Parasite survey of the eastern oyster *Crassostrea virginica* in coastal lagoons of the southern Gulf of Mexico. *Journal of Aquatic Animal Health*. 19: 270-279 p.
- Anderson R.S. y Beaven, A. 2001. A comparative study of anti-*Perkinsus marinus* activity in bivalve sera. *J. Shellfish Res.* 20: 1011–1017 p.
- Andrews J.D. y Ray S.M. 1988a. Epizootiology of the disease caused by the oyster pathogen *Perkinsus marinus* and its effects on the oyster industry. *Amer. Fish Soc. Spec. Publ.* 18: 47-63 p.
- Andrews J. D. y S. M. Ray, 1988b. Management strategies to control the disease caused by *Perkinsus marinus*. *Amer. Fish. Soc. Spec. Publ.* 18:257–264 p.
- Andrews J.D., 1996. History of *Perkinsus marinus*, a pathogen of oyster in Chesapeake Bay 1950-1984. *J. Shellfish Res.* 15 (1): 13-16 p.
- Barber B.J. y Mann R. 1991. Sterile triploid *Crassostrea virginica* (Gmelin 1791) grow faster than diploids but are equally susceptible to *Perkinsus marinus*. *J. Shellfish Res.* 10: 445-450 p.
- Burreson E. M. 1991. Effects of *Perkinsus marinus* infection in the eastern oyster, *Crassostrea virginica*. I. Susceptibility of native and MSX- resistant stocks. *J. Shellfish Res.* 10: 417–423 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. *J. Shellfish Res.* 15: 17–34 p.
- Bushek D., Ford S.E. y Allen S.K. Jr., 1994. Evaluation of methods using Ray's fluid thioglycollate medium for diagnosis of *Perkinsus marinus* infection in the eastern oyster, *Crassostrea virginica*. *Annu. Rev. Fish. Dis.* 4: 201–217 p.

- Bushek D., Allen S.K., Alcox K.A., Gustafson R., Ford S.E., 1997. Response of *Crassostrea virginica* to in vitro cultured *Perkinsus marinus*: preliminary comparison of three inoculation methods. J. Shellfish Res. 16: 479-485 p.
- Bushek D., S.E. Ford and M.M. Chintala, 2002. Comparison of *in vitro*-culture and wild type *Perkinsus marinus*. III. Fecal elimination and its role in transmission. Diseases of Aquatic Organisms. 51: 217-225 p.
- Cáceres-Martínez J., R. Vasquez-Yeomans, G. Padilla-Lardizabal and M. del Río-Portilla, 2008. *Perkinsus marinus* in pleasure oyster *Crassostrea corteziensis* from Nayarit, Pacific coast of Mexico. Journal of Invertebrate Pathology. 99(1): 68-73 p.
- Cáceres-Martínez J., R. Vásquez-Yeomans y G. Padilla-Lardizabal. 2010. Parasites of the pleasure oyster *Crassostrea corteziensis* cultured in Nayarit, Mexico. Journal of Aquatic Animal Health. 22: 141-151 p.
- Cáceres-Martínez J., M. García-Ortega, R. Vásquez-Yeomans, T. Pineda-García, Stokes N. A., Carnegie R.B., 2012. Natural and cultured populations of the mangrove oyster *Saccostrea palmula* from Sinaloa, Mexico, infected by *Perkinsus marinus*. Journal of Invertebrate Pathology. 110: 321-325 p.
- Cáceres-Martínez J. y R. Vasquez-Yeomans, 2013. Enfermedades, parásitos y episodios de mortalidad de ostiones de importancia comercial en México y sus implicaciones para la producción. Ciencia Pesquera. 21: 3- 46 p.
- Casas S.M., Villalba, A. y Reece, K.S. 2002. Study of the perkinsosis of 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.
- Calvo G.W.y Burreson E.M. 1994. *In vitro* and *in vivo* effects of eight chemotherapeutants on the oyster parasite *Perkinsus marinus* (Mackin, Owen, and Collier). J. Shellfish Res. 13: 101-107 p.
- Calvo G. W., M. W. Luckenbach, S. K. Allen Jr y E. M. Burreson. 1999. Comparative field study of *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) and *Crassostrea virginica* (Gmelin 1791) in relation to salinity in Virginia. J. Shellfish Res. 18: 465-473 p.

- Calvo G. W., M. W. Luckenbach, S. K. Allen Jr y E. M. Burreson. 2001. A comparative field study of *Crassostrea ariakensis* (Fujita 1913) and *Crassostrea virginica* (Gmelin 1791) in relation to salinity in Virginia. *J. Shellfish Res.* 20: 221-229 p.
- Chintala M.M., Bushek D.y Ford S.E. 2002. Comparison of *in vitro* cultured and wild-type *Perkinsus marinus*. II. Dosing methods and host response. *Diseases of Acuatic Organisms.* 51: 203-216 p.
- Chu F. E. y J. F. La Peyre. 1993. *Perkinsus marinus* susceptibility and defense-related activities in eastern oysters, *Crassostrea virginica*: temperature effects. *Diseases of Acuatic Organisms.* 16: 223–234 p.
- Chu F. E., La Peyre J. F. y Burreson C.S. 1993. *Perkinsus marinus* infection and potential defense-related activities in eastern oysters, *Crassostrea virginica*: salinity effects. *Journal of Invertebrate Pathology.* 62: 226–232 p.
- Chu F. E. 1996. Laboratory investigations of susceptibility, infectivity and transmission of *Perkinsus marinus* in oyster. *J. Shellfish Res.* 15: 57-66 p.
- Cook T., Folli, M., Klinck, J., Ford, S.y Miller, J. 1998. The relationship between increasing sea-surface temperature and the Northward spread of *Perkinsus marinus* (Dermo) disease epizootics in oysters. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 46:: 587–597 p.
- Dungan C.F.y Hamilton R.M. 1995. Use of the tetrazolium-based cell proliferation assay to measure effects of *in vitro* conditions on *Perkinsus marinus* (Apicomplexan) proliferation. *J. Eukaryot. Microbiol.* 42: 379-388 p.
- Encomio V. G., S. M. Stickler, S. K. Allen y F.L. Chu. 2005. Performance of “natural dermo-resistant” oyster stocks – survival, disease, growth, condition and energy reserves. *J. Shellfish Res.* 24: 143–155 p.
- Faisal M., Oliver J.L.y Kaattari S.L. 1999. Potential role of protease-antiprotease interactions in *Perkinsus marinus* infection in *Crassostrea* spp. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* 19: 269-276 p.
- Fisher W. S., J. D. Gauthier y J. T. Winstead. 1992. Infection intensity of *Perkinsus marinus* disease in *Crassostrea virginica* Gmelin, 1791 from the Gulf of Mexico maintained under different laboratory conditions. *J. Shellfish Res.* 11: 363–369 p.

- Fisher W.S. y Oliver, L.M. 1996. A whole-oyster procedure for diagnosis of *Perkinsus marinus* disease using Ray's fluid thioglycollate culture medium. *J. Shellfish Res.* 15: 109–117 p.
- Ford S. E. 1996. Range extension by the oyster parasite *Perkinsus marinus* into the north eastern United States: Response to climate change? *J. Shellfish Res.* 15: 45–56 p.
- Ford S.E. y M. R. Tripp., 1996. Diseases and Defense Mechanisms. In: Kennedy, V.S., R.I.E. Newell, A.F. Eble (eds.) *The Eastern oyster Crassostrea virginica*. Maryland Sea Grant College, College Park, Maryland. 16: 581-660 p.
- Ford S.E. y Chintala M.M. 2006. Northward expansion of a marine parasite: Testing the role of temperature adaptation. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology.* 339: 226–235 p.
- Goedken M., Morsey B., Sunila I., De Guise S., 2005. Immunomodulation of *Crassostrea gigas* and *Crassostrea virginica* cellular defense mechanisms by *Perkinsus marinus*. *J. Shellfish Res.* 24(2): 487-496 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.
- Gullian-Klanian M., J. A. Herrera-Silveira, R. Rodríguez-Canul y L. Aguirre-Macedo, 2008. Factors associated with the prevalence of *Perkinsus marinus* in *Crassostrea virginica* from the southern Gulf of Mexico. *Diseases of Aquatic Organisms.* 79: 237-247 p.
- Guthier J. R. & G. R. Vasta, 1993. Continuous *in vitro* culture of the eastern oyster parasite *Perkinsus marinus*. *Journal of Invertebrate Pathology.* 62: 321-323 p.
- Hoese H. D., 1962. Studies on oyster scavengers and their relation to the fungus *Dermocystidium marinum*. *Proc. Natl. Shellfish. Assn.* 53: 161–174 p.
- Hofmann E.E., Powell E.N., Klinck J.M. y Saunders G. 1995. Modelling diseased oyster populations. I. Modelling *Perkinsus marinus* infections in oysters. *J. Shellfish Res.* 14: 121-151 p.
- Kleinschuster S.J. y Swink S.L. 1993. A simple method for the *in vitro* culture of *Perkinsus marinus*. *Nautilus.* 107: 76-78 p.

- Krantz G.E., 1994. Chemical inhibition of *Perkinsus marinus* in two *in vitro* culture systems. J. Shellfish Res. 13: 131-136 p.
- Krantz G.E. y Jordan S.J. 1996. Management alternatives for protecting *Crassostrea virginica* fisheries in *Perkinsus marinus* enzootic and epizootic areas. J. Shellfish Res. 15: 167-176 p.
- La Peyre. J. F., Faisal, M. y Burreson, E.M. 1993. *In vitro* propagation of the protozoan *Perkinsus marinus*, a pathogen of the eastern oyster, *Crassostrea virginica*. J. Eukaryot Microbiol. 40: 304-310 p.
- La Peyre J.F., Chu F.E. y Meyers J.M. 1995. Hemocytic and humoral activities of eastern and Pacific oysters following challenge by the protozoan *Perkinsus marinus*. Fish Shellfish Immunol. 5: 179-190 p.
- La Peyre, J., 1996. Propagation and *in vitro* studies of *Perkinsus marinus*. J. Shellfish Res. 15: 89-101 p.
- Leander, B.S. y Keeling, P.J. 2004. Early evolutionary history of dinoflagellates and apicomplexans (Alveolata) as inferred from hsp90 and actin phylogenies. J. Phycol. 40(2): 341-350 p.
- Levine N.D. 1978. *Perkinsus* gen and other new taxa in the protozoan Phylum Apicomplexa. Journal of Parasitology. 64:549 p.
- Mackin J.G., Owen y A. Collier. 1950. Preliminary note on the occurrence of a new Protistan parasite, *Dermocystidium marinum*, in *Crassostrea virginica* (Gmelin). Science. 111 ( 2883): 328-329 p.
- Mackin J.G. 1951. Histopathology of infection of *Crassostrea virginica* (Gmelin) by Bull.Mar. Sci. Gulf Carib. 1: 72-87 p.
- Mackin J.G. 1962. Oyster disease caused by *Dermocystidium marinum* and other microorganisms in Louisiana. Publ. Inst. Mar. Sci. Univ. Texas. 7: 132-229 p.
- Meyers J.A., Burreson E.M., Barber B.J. y Mann R. 1991. Susceptibility of diploid and triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg 1793) and eastern oysters, *Crassostrea virginica* (Gmelin 1791), to *Perkinsus marinus*. J. Shellfish Res. 10: 433-437 p.

- Moss J. A., E. M. Burreson y K. S. Reece, 2006. Advanced *Perkinsus marinus* infections in *Crassostrea ariakensis* maintained under laboratory conditions. *J. Shellfish Res.* 25: 65–72 p.
- Navarro-Barrera A.A., G. Padilla-Lardizabal, R Vásquez-Yeomans y Cáceres-Martínez J. 2010. Distribution of *Perkinsus marinus* in natural and culture populations of *Crassostrea corteziensis* in Nayarit, Mexico during winter. Abstract World Aquaculture Society Congress (San Diego California, Marzo). 726 p.
- Navarro-Barrera A., 2011. Distribución, prevalencia e intensidad de *Perkinsus marinus*, parásito del ostión de placer *Crassostrea corteziensis*, en el estado de Nayarit, México. Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. Ensenada, Baja California, México. 66 p.
- Oliver, J. L., T. D. Lewis, M. Faisal & S. L. Kaattari. 1999. Analysis of the effects of *Perkinsus marinus* proteases on plasma proteins of the Eastern oyster (*Crassostrea virginica*) and the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *J. Invertebr. Pathol.* 74:173–183.
- Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE), 2012. Manual de pruebas de diagnóstico para los animales acuáticos. Recuperado 14 Agosto de 2013 de: [http://www.oie.int/esp/normes/fmanual/e\\_summry.htm](http://www.oie.int/esp/normes/fmanual/e_summry.htm).
- Parra-Laca R, 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 p.
- Perkins F.O. y Menzel R.W. 1966. Morphological and cultural studies of a motile stage in the life cycle of *Dermocystidium marinum*. *Proc. Natl. Shellfish Assn.* 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.
- Perkins F.O. 1988. Structure of protistan parasites found in bivalve molluscs. *Am. Fish Soc. Spec. Publ.* 18: 93-111 p.
- Perkins F.O. 1994. Life cycle studies of *Perkinsus marinus*-host specificity. Final Report, NOAA NMFS, Oyster Disease Research Program, Contribution No. NA26FL0380-01.

- Perkins F. O. 1996. The structure of *Perkinsus marinus* (Mackin, Owen and Collier, 1950) Levine, 1978 with comments on taxonomy and phylogeny of *Perkinsus* spp. J. Shellfish Res. 15: 67–87 p.
- Pineda-García T. J., 2011. Distribución y prevalencia de *Perkinsus marinus* y Herpes- virus OsHV-1 en *Crassostrea corteziensis* y *Crassostrea gigas* en el estado de Sinaloa. Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Mazatlán, Sinaloa, México. 63 p.
- Prokop J. F. 1950. Infection and culture procedures employed in the study of *Dermocystidium marinum*. Texas A&M Research Foundation.
- Ragone-Calvo L.M., Wetzel R.L. y Burreson E.M. 2000. Development and verification of a model for the population dynamics of the protistan parasite, *Perkinsus marinus*, within its host, the eastern oyster, *Crassostrea virginica*, in Chesapeake Bay. J. Shellfish Res. 20: 231-241 p.
- Ray S.M. 1952. A culture technique for the diagnosis of infection with *Dermocystidium marinum* Mackin, Owell and Collier in oyster. Science. 116: 360-361 p.
- Ray S.M. 1954. Biological studies of *Dermocystidium marinum*, a fungous parasite of oyster. A thesis for the degree of Doctor. Rice Institute. Houston, Texas. United States of America. 119 p.
- Ray S.M. 1966.. A review of the culture method for detecting *Dermocystidium marinum*, with suggested modifications and precautions. Proc. Natl. Shellf. Assn. 54: 55-69 p.
- Ray S.M. 1996. Historical perspective in *Perkinsus marinus* disease of oyster of Gulf of Mexico. J. Shellfish Res. 15 (1): 9-11 p.
- Report, Petty D. 2011. University of Florida IFAS: Recuperado 25 Septiembre de 2012 de: [http:// www. thefishsite. com / articles/ 1054/ perkinsus-infections -of-bivalve-molluscs](http://www.thefishsite.com/articles/1054/perkinsus-infections-of-bivalve-molluscs)
- Robledo J.A., Marsh, A.G., Wright, A.C. y Vasta, G.R. 1999. Nucleotide sequence variability in the nontranscribed spacer of the rRNA locus in the oyster parasite *Perkinsus marinus*. Journal of Parasitology. 85 (4): 650–656 p.

- Romestand B., Corbier F. y Roch P. 2002. Protease inhibitors and haemagglutinins associated with resistance to the protozoan parasite, *Perkinsus marinus*, in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Journal of Parasitology*. 125: 323-329 p.
- Shaw B.L. y Battle, I.H. 1957. The gross microscopic anatomy of the digestive tract of the oyster *Crassostrea virginica* (Gmelin). *Can. J. Zool.* 35: 325–346 p.
- Soniat L.M., 1996. Epizootiology of *Perkinsus marinus* diseases of eastern oysters in the Gulf of Mexico. *J. Shellfish Res.* 15: 35-44 p.
- Soniat T.M. y Kortright E.V. 1998. Estimating time to critical levels of *Perkinsus marinus* in eastern oysters, *Crassostrea virginica*. *J. Shellfish Res.* 17: 1071-1080 p.
- Valiulis G. A., 1973. Comparison of the resistance of *Labrithomyxa marina* with resistance to *Minchinia nelson* in *Crassostrea virginica*. Ph.D. dissertation, Rutgers University, New Brunswick, New Jersey. 181 p.
- Villalba A., Reece, K.S., Camino, M.C., Casas, S.M. y Figueras, A. 2004. Perkinsosis in molluscs: a review. *Aquat. Living Resour.* 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.
- Volety A.K. y Chu F.E., 1994. Comparison of infectivity and pathogenicity of two life stages, meront (trophozoite) and prezoosporangio stages of the oyster pathogen *Perkinsus marinus* in eastern oyster, *Crassostrea virginica* (Gmelin 1791). *J. Shellfish Res.* 13: 521-527 p.
- White M.E., Powell E.N., Ray S.M. y Wilson E.A. 1987. Host to host transmission of *Perkinsus marinus* in oyster (*Crassostrea virginica*) populations by the ectoparasitic snail *Boonea impressa* (Pyramidellidae). *J. Shellfish Res.* 6: 1-5 p.
- Wiser M. F., 2012. Recuperado 15 Octubre de 2012 de: <http://www.tulane.edu/~wiser/protozoology/notes/api.html>.

## **Apéndice 1. 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 2. Preparación del medio de tioglicolato, FT

Se vierte agua en un matraz y se calienta hasta el punto de ebullición. Posteriormente se agrega medio de Tioglicolato y Cloruro de Sodio (NaCl) hasta que ambos se disuelvan completamente. El matraz se retira 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 1	4.6 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 3. Preparación de la solución fijadora Davidson

Para preparar 1 litro de solución añadiendo los siguientes compuestos:

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 4. 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 5. 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 I	15 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.