

**Centro de Investigación Científica y de
Educación Superior de Ensenada**



**Agentes Patogenos Asociados a las Mortalidades del Ostion
Japones, *Crassostrea gigas*, Cultivado en el Noroeste de Mexico**

TESIS

DOCTORADO EN CIENCIAS

REBECA VASQUEZ YEOMANS

ENSENADA BAJA CFA, MEXICO JULIO DE 2006

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



**PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS
CON ORIENTACIÓN EN ACUICULTURA**

**AGENTES PATÓGENOS ASOCIADOS A LAS MORTALIDADES DEL OSTIÓN
JAPONÉS, *CRASSOSTREA GIGAS*, CULTIVADO EN EL NOROESTE DE MÉXICO**

TESIS

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

Presenta:

REBECA VÁSQUEZ YEOMANS

Ensenada, Baja California, México, 4 de julio del 2006.

TESIS DEFENDIDA POR
REBECA VÁSQUEZ YEOMANS
Y APROBADA POR EL SIGUIENTE COMITÉ



Dr. Jorge Abelardo Cáceres Martínez
Director del Comité



Dr. Luis Fernando Bückle Ramirez
Miembro del Comité



Dra. Beatriz Cordero Esquivel
Miembro del Comité



Dr. Francisco Correa Sandoval
Miembro del Comité



Dr. Benjamín Barón Sevilla
Miembro del Comité



Dr. Alexei Fedorovich Licea Navarro
*Coordinador del programa de
posgrado en Ciencias con
orientación en Acuicultura*



Dr. Raúl Ramón Castro Escamilla
Director de Estudios de Posgrado

4 de julio de 2006

Resumen de la tesis de **REBECA VÁSQUEZ YEOMANS**, presentada como requisito parcial para la obtención del grado de **DOCTOR EN CIENCIAS** con orientación en **ACUICULTURA**. Ensenada, Baja California, México. Julio de 2006.

Agentes patógenos asociados a las mortalidades del ostión Japonés, *Crassostrea gigas*, cultivado en el Noroeste de México.

Aprobado por:



Dr. Jorge Abelardo Cáceres Martínez
Director de Tesis

La ostricultura en el Noroeste de México se desarrolló exitosamente, a partir de la introducción del ostión Japonés *Crassostrea gigas*, a la Bahía de San Quintín, Baja California en 1973. Para 1980 el cultivo ya se había extendido a los estados de Sonora, Baja California Sur, Sinaloa y Nayarit. La producción alcanzó su máximo nivel (3,282 Tm) en 1995. Lamentablemente, en 1997 hubo mortalidades masivas que afectaron entre el 60% y el 90% de los ostiones en toda la región. La producción disminuyó a 735 Tm en 1999. Desde entonces, las mortalidades han seguido ocurriendo sin que se haya determinado la causa de las mismas. Ante tal situación, el objetivo de ésta tesis fue conocer los agentes patógenos asociados a las mortalidades del ostión *C. gigas*, cultivado en el Noroeste de México. Para tal efecto, se realizaron recolectas de ostiones en diferentes estadios de desarrollo en los estados de Baja California, Sonora y Sinaloa a partir del 2000 durante episodios de mortalidades. Para la recolecta, se contó con ayuda de productores y del Comité de Sanidad Acuícola del Estado de Sonora. Se realizaron análisis en fresco del cuerpo blando de los ostiones, así como análisis bacteriológicos, histopatológicos, ultraestructurales por microscopía electrónica de transmisión (MET) y para la identificación de parásitos por medio de ácidos nucleicos (Reacción en Cadena la Polimerasa o PCR). Los resultados mostraron la presencia de diversos parásitos y alteraciones histológicas que fueron clasificadas de acuerdo con su patogenicidad. Se encontraron metazoarios con prevalencias promedio del 20% en tejido conectivo, glándula digestiva y folículos reproductivos. También se encontraron metacercarias y cercarias de trematodos en diferentes tejidos del hospedero sin evidencias patológicas de importancia y con prevalencias del 10%. En cuanto a protistas, se encontraron ciliados parecidos a *Ancistrocoma* spp. en la glándula digestiva sin evidencia de alteraciones histopatológicas relevantes y con prevalencias muy bajas (10%). También se encontraron *Trichodina* spp. que fueron aún más escasas. Hacia finales del estudio se encontró un protozoario en fase de esporulación parecido a *Marteilia* spp. (agente causal de la Marteiliosis, enfermedad letal en *Ostrea edulis* y *Saccostrea glomerata*). Sin embargo, su morfología a nivel histológico y su identificación molecular (PCR) no dieron resultados concluyentes. Por lo que se denominó Protozoario Esporulado X (PEX) en tanto se define su identidad y su potencial patogénico. Se aislaron bacterias del género *Aeromonas* no reconocidas como patógenas

para *C. gigas*, además de una colonia no identificada de lento crecimiento. Los análisis en fresco e histopatológicos revelaron la presencia de erosiones branquiales de leves a severas en ostiones juveniles y adultos con prevalencias cercanas al 100% en toda la zona de estudio. Las alteraciones a nivel histopatológico, tales como, infiltración hemocitaria, picnosis y zonas necróticas sugieren una posible relación con las mortalidades observadas. El análisis por MET del tejido branquial erosionado, demostró la presencia de virus identificados como Herpesvirus. El análisis por PCR de tejidos erosionados y normales en semilla y juveniles resultó positivo al Herpesvirus del ostión (OsHV). El Herpesvirus del ostión es un agente patógeno de *C. gigas* y de otros bivalvos que causa mortalidades importantes en semilla y juveniles y está considerado por la legislación sanitaria nacional como sujeto a certificación. Si bien su asociación con las erosiones branquiales no es clara, su presencia y patogenicidad lo asocian con episodios de mortalidad de *C. gigas*, al menos en semilla y juveniles y requiere de control sanitario. El agente patógeno o condiciones ambientales asociadas a las erosiones branquiales descritas aún deben ser determinados. Se confirmó la presencia de lesiones histológicas asociadas a virus de la hipertrofia gametocítica viral, agente patógeno no considerado como causante de mortalidades masivas, lo que coincidió con su escasa prevalencia en este estudio. La carga parasitaria encontrada, amplía los registros conocidos de parásitos del ostión Japonés en México y presenta a otro que podría ser una variedad o una forma atípica de *Marteilia* sp o aún otra especie denominada PEX, en tanto se define o corrobora su identidad. También es posible asociar al herpesvirus y las erosiones branquiales con las mortalidades masivas ocurridas en el Noroeste de México y contribuir al entendimiento de estos episodios de mortalidad desde el punto de vista parasitológico. Finalmente se hacen algunas sugerencias sanitarias a los productores y autoridades sanitarias. Indudablemente la posible sinergia entre la carga parasitaria y las condiciones ambientales debe ser motivo de estudios posteriores.

Palabras Claves: *Crassostrea gigas*, mortalidad, patógenos, herpesvirus del ostión, carga parasitaria.

Abstract of the thesis by **REBECA VÁSQUEZ YEOMANS**, presented as a partial requirement for obtaining the degree of **DOCTOR IN SCIENCE** with orientation in **AQUACULTURE**. Ensenada, Baja California, Mexico. July 2006.

Pathogen agents related to mortalities of the Japanese oyster, *Crassostrea gigas*, cultured in Northwest Mexico.

Approved by:



Dr. Jorge Abelardo Cáceres Martínez
Thesis Director

Key Words: *Crassostrea gigas*, mortality, pathogens, oyster herpesvirus, parasitic load.

Oyster farming in Northwest, México, was successfully developed before the introduction of the Japanese oyster *Crassostrea gigas* in Bahía San Quintín Baja California in 1973. In the 80's the culture of Japanese oysters was spread in the states of Baja California, Sonora, Sinaloa and Nayarit, his maximum production (3,282 metric tons) were reached in 1995. Unfortunately, in 1997, mass mortalities occurred affecting between 60% and 90% of the production. For 1999, the production decreased to 735 metric tons. These mortalities had continued up to date without knowing the causal factors. Then, the objective of this thesis was to determine the pathogen agents associate to the mortalities found in the Northwest of Mexico. Then, since 2000, different developmental stages of oysters were collected during the mortality period from the states of Baja California, Sonora and Sinaloa. This task was supported by the producers and Comité de Sanidad Acuícola from Sonora. After collection, gross examination of fresh flesh was carried out. Different analysis such as bacteriological and histopathological analysis was performed. Beside gross examination, a fine examination using transmittance electron microscopy (TEM) was performed. Specific molecular analyses using the polymerase chain reaction (PCR) were performed to detect the pathogens. The results showed presence of different parasites and histological abnormalities, which were classified according to their pathogenic effect. Metazoaries, supposedly copepods and acarus, (20% average prevalence) were found causing moderated lesions in connective tissue, digestive tract and reproductive follicles. Also, it was found metacercaries and cercaries of trematodes (punctual prevalence of 10%) in different tissues of the host without evidence of important pathological abnormalities. Protists (ciliates *Ancistrocoma*-like) were found in the digestive tract without relevant evidences of histopathological alterations and with low prevalence (10%). The *Trichodinas* spp. were the lest. At the end of this study, it was found a protozoan in apparent phase of sporulation similar to *Marteilia* sp. This organism is the causal agent of the Marteiliosis, which is the disease that causes mortalities on *Ostrea edulis* y *Saccostrea glomerata*. However, its

morphological and molecular identification as *Marteilia* sp were not conclusive. Thus, this parasite was called Sporulated Protozoary X (PEX) until its identification and pathogenicity be determined. Bacteria from genus *Aeromonas* were isolated. These bacteria are not recognized as pathogens for *C. gigas*. A non-identified colony containing bacteria of slow growth was also isolated. The gross examination and histopathological analyses showed the presence of gill erosions from slight to severe in juveniles and adults with a prevalence near to 100% in all the study area. The histopathological alterations such as hemocitary infiltration, picnosis, and necrotic zones indicated a possible relationship with the mortalities observed. The analyses of eroded gill tissue by TEM showed presence of Herpesvirus. This virus was corroborated by PCR. Samples from normal or eroded tissue belonging to seed and juvenile oysters were positive for oyster Herpesvirus (OsHV). This virus is and pathogen agent of *C. gigas* and other bivalves, which cause important mortalities in seed and juveniles and it is considered by the national sanitary legislation as an organism subject to certification. Although its association to gill erosions is not clear, its presence and recognized pathogenicity can be associated to mortalities of seed and juveniles of *C. gigas*. Thus, a sanitary control is required. The pathogen agent or environmental conditions associated to the gill erosions described above need to be determined. Lesions associated to the virus causing the gametocytic hypertrophy were corroborated by histological examination. This virus is not considered the pathogen agent causing the massive mortalities, which agree with its scarce and low prevalence. The results about the parasite load increased the known register of parasites of the Japanese oyster in México and included an atypical description of *Marteilia* sp. or a different parasite (PEX). This study allows us to associate OsHV-1, and gill erosions with mass mortalities occurring in Northwest of México. Also, this study contributes to understand the oyster mortalities since the point of view of the parasitological. Finally, this study gives sanitary suggestions, which can contribute to the enhancement of the oyster industry in México. Future studies should address the possible synergy between the parasite load and the environmental conditions

IN MEMORIAM

GILBERTO VÁSQUEZ MARTÍNEZ

1926 - 1992

Para encontrar dos piedras peregrinas
con que formar tus ojos ideales,
Dios buscó en los prodigios minerales
las lágrimas más puras y divinas.

Repasó las madréporas marinas,
el lujo de las plumas orientales,
el hervir de las luces siderales,
las grutas de facetas diamantinas.

Y no hallando materia luminosa
adecuada a tu faz maravillosa
por elocuente, y expresiva, y rara,

mordió sus labios, de coraje rojos;
¡Y después, Dios mismo se arrancó los ojos
y con amor los estampó en tu cara!

DEDICATORIA

A MI PADRE †,
PORQUE DE ÉL APRENDÍ A
LUCHAR POR LO QUE SE QUIERE ALCANZAR

A MI MADRE,
PORQUE DE TI APRENDÍ A QUE
SIEMPRE HAY QUE ESPERAR
CONTRA TODA ESPERANZA

A CLAUDIA,
POR SU FIRMEZA DE CARACTER
QUE ME PERMITIÓ CONTINUAR
CON MIS SUEÑOS

A MI FAMILIA,
POR SU APOYO INCONDICIONAL,
LES DEBO LO QUE SOY

AGRADECIMIENTOS

Una de las más hermosas cualidades que hay que cultivar en el Ser Humano es el Saber Agradecer. El agradecimiento nos hace grandes, nos hace fuertes, nos hace sabios.

Y es en este momento que agradezco, infinitamente, a todas las personas que a través del camino recorrido en estos años de mi vida académica, siempre estuvieron a mi lado, apoyándome, aconsejándome y aceptándome.

Al CONACYT por el apoyo económico con mi beca doctoral.

A mi Director de Tesis, Dr. Jorge Cáceres Martínez, por haberme puesto en la situación de tomar una decisión que cambiaría el rumbo de mi vida y de la cual, no me arrepiento. Por ser un entusiasta de su trabajo, por su dedicación, por su empeño, por su capacidad académica y por su capacidad de crear. Mi más sincero respeto y admiración.

Al Comité de Tesis, Dr. Luis Fernando Bückle Ramirez, Dr. Francisco Correa Sandoval, Dr. Benjamín Barón Sevilla y Dra. Beatriz Cordero Esquivel, por su paciencia y sus sugerencias para mejorar esta tesis. En especial al Dr. Bückle Ramirez, por tener esa personalidad que impone y que en su momento la hizo sentir. También un agradecimiento al Dr. Barón Sevilla, por exigir más de mí y a la Dra. Cordero Esquivel, Betty, por ser una amiga incondicional, muchas gracias.

Parte de mi tesis se la debo al M. en C. Adrián Mauricio García Ortega, porque a pesar de su escaso tiempo siempre estuvo ayudándome; Mau, el título es compartido.

A los ostricultores de Bahía San Quintín, B. C., por su constante lucha por seguir en la actividad acuícola, a pesar de los tiempos difíciles, por su apoyo e interés en este proyecto.

En especial a Ana Salazar, Juan Guerrero y Juan Cota, por la confianza depositada y al Ocean. Héctor González Alcalá, por ser un promotor incansable de la actividad ostrícola.

Al Comité de Sanidad Acuícola del Estado de Sonora, A. C. (COSAES), principalmente al Ing. Benítez García, por los muestreos de ostión durante el 2005 que forman parte sustancial de los resultados de esta tesis.

A mi familia: Lourdes, Eloy, Carolina, Mónica, Claudia, Jorge, Jorge Isaac, Laura Adriana, Rubén, Diana, Rubén Gilberto, Diana Sofía, Candelaria, Jorge Adrián, Héctor y Héctor Horacio, porque a pesar de la distancia, de las diferencias y de las decisiones, nunca dejaron de apoyarme, en todo y por todo.

Al Instituto de Sanidad Acuícola, A. C., al cual pertenezco y en donde parte de mi tesis la logré concretar. También a mis compañeros de trabajo, Srita Bibiana Medina, M. en C. Raquel Hernández, Dr. Sergio Curiel, M. en C. José Ángel Olivas, Dr. Miguel Angel del Río y Dr. Jorge Cáceres, por todos los logros que hemos obtenido y los que faltan.

A las familias: Pérez Vélez, Vélez Andrade, Castro Carballo, Guzmán de la Campa y Cáceres Figueroa, porque han estado conmigo a pesar de mí. En especial a Laura Verónica Vélez, Daniela Pérez y Germán Pérez[†], porque me han permitido formar parte de sus vidas y de sus recuerdos. También mi agradecimiento a Sarita de la Campa Jerez, por su compañía y apoyo.

A mis amigochas: Bertha Trujillo, Hortensia García, Isabel Santana, Socorro Rodríguez y Lillian Lizaola, porque a través del tiempo los lazos de amistad siguen inquebrantables.

A las Dras. Carmen Paniagua Chávez y Beatriz Cordero Esquivel, porque son un ejemplo de vida.

Al personal secretarial del CICESE, Srita. Bibiana Medina, Sra. Cecilia Loera, Sra. María Elena Corona, Sra. Alejandra Cervantes y Sra. Graciela Ramírez, por su amistad.

A los compañeros y ex-compañeros del Laboratorio de Biología y Patología de Organismos Acuáticos del Departamento de Acuicultura del CICESE, Yanet Guerrero, José Angel Olivas, Sergio Curiel, Carmen Álvarez y Gissel Tinoco, por su apoyo.

A mis compañeros de generación de Maestría y Doctorado, Gisela Escalante, Alejandro Campa, Eréndira Hurtado y Cecilia, por el tiempo que pasamos juntos en esas largas noches de estudio y trabajo.

A Sara Teruí, Esther Saucedo, Rafaela Paredes, Gabriel Jiménez y Rubén Martínez, por el compañerismo que siempre tuvimos durante nuestra formación profesional y que hasta ahora no se ha perdido. Especialmente al Gabrielucho, porque me ha visto en los peores momentos de mi vida y siempre me ha escuchado.

Al personal de la Biblioteca del CICESE, especialmente a Guadalupe Morales, Cecilia González, Elizabeth Avilés, Varuni Arredondo, Edith Fernández y Amelia Chávez, por la disposición, el trato amable y el apoyo en las búsquedas bibliográficas.

A Dolores Sarracino, porque siempre he recibido de su parte palabras de aliento.

Al Dr. David Pulido, por ayudarme a vivir libre.

Al CICESE, porque con orgullo forma parte de mí.

A todas aquellas personas que por razones de espacio no me es posible mencionar pero que de alguna u otra forma estuvieron al pendiente de la culminación de este trabajo y de esta etapa importante de mi vida Muchas Gracias!

CONTENIDO

	Página
I. INTRODUCCIÓN.....	1
I.1. <i>Crassostrea gigas</i>	1
I.2. Historia del cultivo del ostión Japonés.....	4
I.3. Mortalidades masivas y enfermedades.....	6
I.4. Mortalidades inusuales de <i>Crassostrea gigas</i> en el Noroeste de México..	9
II. OBJETIVOS.....	11
II.1. Objetivo general.....	11
II.1.1. <i>Objetivos particulares</i>	11
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	12
III.1. Áreas de estudio.....	12
III.1.1. <i>Baja California</i>	12
III.1.2. <i>Sonora</i>	13
III.1.3. <i>Laguna de la Palmita, Sinaloa</i>	14
III.2. Recolección de muestras.....	16
III.3. Técnicas de diagnóstico.....	20
III.3.1. <i>Análisis clínicos</i>	20
III.3.2. <i>Análisis histopatológico</i>	22
III.3.3. <i>Análisis por microscopía electrónica de transmisión</i>	23
III.3.4. <i>Análisis bacteriológico</i>	24
III.3.5. <i>Detección del Herpesvirus por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)</i>	25
III.3.5.1. <i>Extracción y purificación de ADN genómico a partir de tejido branquial</i>	26
III.3.5.2. <i>Preparación de la reacción de PCR</i>	27
III.3.6. <i>Detección del Protozooario esporulado X (PEX) por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)</i>	29
III.3.6.1. <i>Extracción y purificación de ADN genómico a partir de tejido de glándula digestiva, branquia y semi-purificados</i>	29
III.3.6.2. <i>Preparación de la reacción de PCR</i>	29
III.3.7. <i>Análisis estadístico</i>	30
IV. RESULTADOS.....	32
IV. 1. <i>Análisis clínicos</i>	32
IV.1.1. <i>Baja California</i>	32
IV.1.2. <i>Sonora</i>	34
IV.1.3. <i>Sinaloa</i>	37
IV. 2. <i>Análisis histopatológicos</i>	38
IV. 3. <i>Análisis histológicos de otras lesiones en las branquias</i>	41

CONTENIDO (continuación)

	Página
IV. 4. Carga parasitaria.....	42
IV.4.1. <i>Hipetrofia gametocítica viral (HGV)</i>	42
IV.4.2. <i>Protozoos</i>	43
IV.4.3. <i>Metazoos</i>	45
IV.4.4. <i>Trematodos</i>	47
IV. 5. Análisis bacteriológico.....	49
IV. 6. Microscopía electrónica de transmisión.....	49
IV. 7. Detección del herpesvirus por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	51
IV. 8. Detección del Protozoario esporulado X (PEX) por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	53
V. DISCUSIÓN.....	54
VI. CONCLUSIONES.....	67
VII. LITERATURA CITADA.....	68
APENDICES	81

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Ostión japonés, <i>Crassostrea gigas</i> cultivado en Bahía Falsa, B. C., México, donde se observa la variabilidad morfológica de esta especie.....	2
2	Ciclo de vida del ostión <i>Crassostrea gigas</i>	3
3	Ubicación de las zonas de muestreo en Bahía San Quintín y Laguna Manuela en Baja California.....	13
4	Mapa de localización de las zonas de muestreo en el Estado de Sonora.....	15
5	Mapa de localización de la Bahía de Altata en el Estado de Sinaloa.....	15
6	A) Lamelas branquiales de <i>Cassostrea gigas</i> sano, la coloración y apariencia del animal denotan su condición saludable y el borde ventral de las lamelas es uniforme o normal (BrN). B) Lamelas Branquiales erosionadas (BrE) en un ejemplar afectado, la consistencia de las demibranquias es flácida. C) Acercamiento de lamelas branquiales erosionadas mostrando las hendiduras o borde aserrado en la indentación marginal.....	21
7	Esquema del ostión <i>Cassostrea gigas</i> , después de quitar la valva derecha, mostrando los ejes dorsal y ventral, manto izquierdo y manto derecho recogido para mostrar las branquias. También se muestra una de las lamelas de una demibranquia para ubicar la zona de la erosión branquial en el eje ventral (modificado de Brun <i>et al.</i> , 1999)	22
8	Corte transversal del ostión donde se muestran sus órganos internos.....	23
9	Figura 10. Sensibilidad de la técnica de PCR para la detección del OsHV. Carriles 1 y 10 Marcador de peso molecular de 0.1 a 2 Kpb (Invitrogen); 2) Control positivo (ADN genómico viral, X ng por reacción); 3) Control negativo (agua grado biología molecular estéril); 4) Muestra positiva de semilla de <i>C. gigas</i> (1,264 ng de ADN genómico total); 5) 126.4 ng 6) 12.64 ng 7) 1.26 ng 8) 12.6 pg 9) 1.26 pg.	28

LISTA DE FIGURAS (continuación)

Figura		Página
10	Prevalencia e Intensidad de las erosiones branquiales por intervalo de tallas (cm) en los ostiones de A) Baja California y B) Sonora	33
11	Prevalencia e Intensidad de las erosiones branquiales en los ostiones revisados durante el período estudiado en el estado de Sonora. Con las flechas se indican episodios de mortalidad.....	34
12	Prevalencia e Intensidad de las erosiones branquiales en la Zona Norte del estado de Sonora, durante el período de estudio.....	35
13	Prevalencia e Intensidad de las erosiones branquiales en la Zona Sur del estado de Sonora, durante el período de estudio.....	36
14	Prevalencia e Intensidad de las erosiones branquiales en la Zona Centro del estado de Sonora, durante el período de estudio.....	37
15	A) Comparación histológica de lamelas branquiales de <i>Crassostrea gigas</i> sano (A, C, E) y afectado por erosión branquial ligera (BrLE) (B, D, E). A) Vista general de 8 filamentos (f) con cámaras de agua amplias (Ca) y terminaciones normales (identación marginal) que macroscópicamente corresponden a un borde dorsal uniforme. B) Vista general de 9 filamentos, se aprecia la torción de los mismos hacia el centro y el acortamiento en los filamentos centrales (3, 4, 5), se muestra una infiltración de hemocitos (Ih). Estos cambios corresponden macroscópicamente a un borde ligeramente erosionado. En C y D con mayor aumento, en C se aprecian los filamentos delgados, una acumulación ligera de hemocitos y las cámaras de agua (Ca) amplias. En D, hay un acortamiento y engrosamiento de las terminales del filamento 4, en el 3 hay una acumulación y fusión de las terminales así como infiltración de hemocitos (Ih) que es más aguda en 2 y en 1 se ha perdido la estructura de la zona apical del filamento y hay necrosis. E) se observan las terminales de los filamentos (Tf) normales con mucositos (Mc) y estructura normal. F) ya hay fusión y engrosamiento de las terminales de los filamentos, característicos de una erosión ligera (BrLE). Tinción HE.	39

LISTA DE FIGURAS (continuación)

Figura		Página
16	Lamelas dorsales branquiales erosionadas de <i>Crassostrea gigas</i> . A) Vista panorámica en donde se han fusionado los filamentos (F) 1, 2, 3 y 4, las terminales de los filamentos 5, 6 y 7 están en proceso de degeneración. En B se observa la infiltración de hemocitos (Ih) y destrucción de la estructura normal del borde branquial (Necrosis). La imagen en C muestra la infiltración de hemocitos (inflamación) y la obstrucción del seno hemolinfático de los filamentos (Sh), así como picnosis nuclear (P) y figuras mitóticas. En D se aprecia el borde del filamento totalmente inflamado y degenerado con abundantes vacuolas (V). Cortes a 5 µm. Tinción HE.....	40
17	Corte transversal de un filamento erosionado en donde se aprecian las plicas normales (Pn) y plicas fusionadas (Pf) en la zona apical donde también hay una fuerte infiltración de hemocitos y deformación del tejido, las juntas interlaminares (Ji) están deformadas. Los tubos de agua (Ta) en la zona afectada han desaparecido o se han reducido, mientras que en la zona normal los tubos de agua son amplios y normales (Tan) y las juntas interlaminares se ven normales (Ji). Corte a 5 µm. Tinción HE.....	41
18	Bacterias en <i>Crassostrea gigas</i> . A) Foco de un desarrollo de bacterias en el seno de la hemolinfa (Sh) del filamento de la plica (P) en la demibranchia (vista transversal). B) Ampliación del foco de desarrollo de bacterias donde se aprecia la destrucción del tejido (Dt) pero no se aprecia reacción del hospedero. C) Acercamiento de bacterias con reacción de tinción granulosa (B). No se aprecia erosión branquial. Corte a 5 µm. Tinción HE.....	42

LISTA DE FIGURAS (continuación)

Figura		Página
19	<p>Tejido gonadal de <i>Crassostrea gigas</i> adulto infectado con HGV. A) Imagen panorámica de la gónada de una hembra madura en donde se aprecia un ovocito hipertrofiado (Oi) y una reacción hemocitaria a su alrededor, el resto de los ovocitos maduros se observan en buen estado. B) Acercamiento del ovocito hipertrofiado y rodeado por hemocitos (He), en el ovocito se aprecia acumulación de cromatina (Cr), presumiblemente asociada a la presencia del papilomavirus C) Imagen panorámica de la gónada de un macho en proceso de reabsorción, en donde se aprecia un espermatozoido hipertrofiado (Ei). D) Acercamiento del espermatozoido hipertrofiado en donde también se aprecia una reacción hemocitaria. Las espermátidas (E) en el folículo están proceso de reabsorción. Corte a 5µm. Tinción HE.....</p>	43
20	<p>A) Imagen panorámica de un filamento branquial de <i>Crassostrea gigas</i> en donde se aprecian tricodinas (T) dentro de los tubos de agua. B) Tricodinas adheridas a células epiteliales del manto. Cortes a 5µm. Tinción HE.....</p>	44
21	<p>Ciliados tipo <i>Ancistrocoma</i> en el tubo digestivo de <i>Crassostrea gigas</i>. A) ciliado en el lumen del divertículo digestivo. B) ciliado entre las células epiteliales del epitelio columnar de un divertículo digestivo en donde se aprecia la compresión de las células adyacentes. Corte a 5µm. Tinción HE.....</p>	44
22	<p>A) Protozooario esporulado X (PEX) en intestino de <i>Crassostrea gigas</i> adulto en donde se aprecia entre las células epiteliales columnares ciliadas una estructura ovoide con unas 30 microcélulas o esporas, que podrían representar una forma atípica de <i>Marteilia</i> sp. B) Ducto digestivo donde se aprecian cuatro estructuras tipo esporonte parecidas a <i>Marteilia</i> sp. entre las células epiteliales columnares. Corte a 5µm. Tinción HE.....</p>	45

LISTA DE FIGURAS (continuación)

Figura		Página
23	Diferentes metazoos en <i>Crassostrea gigas</i> . A) Copépodo insertado en tejido branquial, en donde ha provocado una ruptura y una severa infiltración hemocitaria. B) Crustáceo dentro de un folículo reproductivo. El folículo esta distendido y hay una reacción hemocitaria a su alrededor. El crustáceo está degradándose. C) Vista panorámica de un presunto ácaro (a) en tejido branquial en donde se observa una fuerte reacción hemocitaria y destrucción del tejido. D) Detalle de los restos del presunto ácaro, en proceso de degradación por los hemocitos que lo encapsulan. Corte a 5µm. Tinción HE.....	47
24	A) Estadio larval de un trematodo en el lumen del estómago de <i>Crassostrea gigas</i> . B) Acercamiento de la imagen anterior en donde se aprecia las ventosas características (v). C) Quiste de metacercaria de trematodo en tejido conectivo de la base de la branquia. D) Detalle del quiste en donde se aprecia la pared del mismo con las ventosas características (v), no se aprecia reacción de los mecanismos de defensa del hospedero. E) Quiste de trematodo en el borde de un seno linfático, tampoco se aprecia reacción hemocitaria. Cortes a 5µm. Tinción HE.....	48
25	A) Partículas virales en una extensión del núcleo (Nu) o en una vacuola (V) de la célula infectada en el ápice del tejido branquial erosionado de <i>Crassostrea gigas</i> . B) Acercamiento de las partículas virales en donde se aprecia la nucleocápside (NC) y el núcleo (N), el arreglo de los capsómeros es hexagonal-pleomórfico. Esta morfología es característica de Herpes virus. Escala 200 nm.....	51

LISTA DE FIGURAS (continuación)

Figura		Página
26	Detección del Herpesvirus del Ostión (OsHV-1) por medio de PCR en <i>Crassostrea gigas</i> de los estados de Baja California, Sonora y Sinaloa. Carril 1) Marcador de peso molecular de 0.1 a 2 Kpb (Invitrogen); 2) Control positivo (ADN genómico viral, 1 ng por reacción; 3) Control negativo (agua grado biología molecular estéril); 4) Muestra positiva de ostión juvenil de Bahía San Quintín, B. C. (2002); 5) Muestra positiva de ostión juvenil de Bahía Kino, Son. (2005); 6) Muestra positiva de ostión juvenil de Estero La Cina, Son. (2005); 7) Muestra positiva de semilla de ostión del Estero La Palmita, Sin. (2005); 8) Muestra positiva de semilla de ostión de Bahía San Quintín, B. C. (2005).....	52
27	Modelo del ingreso del herpesvirus a una zona de cultivo y sus posibles resultados.....	65

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
I	Principales mortalidades masivas de ostión (<i>Crassostrea</i> spp. y <i>Ostrea</i> spp.) registradas a nivel mundial, distribución geográfica y posible causa.....	7
II	Resumen de las localidades de muestreo en el período 2000-2005, indicando la técnica de diagnóstico empleada.....	17
III	Condiciones de semi-purificación del Protozoario Esporulado X (PEX).....	30
IV	Carga parasitaria del ostión Japonés <i>Crassostrea gigas</i> cultivado en las diferentes localidades estudiadas. Se indica el tejido afectado y la severidad del daño	46
V	Caracterización fisiológica de las colonias bacterianas (a y b) identificadas como <i>Aeromonas</i> spp. de acuerdo al kit de identificación rápida API20NE.....	50

I. INTRODUCCIÓN

Según las estadísticas de la FAO (2004), continúa creciendo la contribución de la acuicultura al suministro mundial de pescado, crustáceos y moluscos, ya que aumentó del 3.9 por ciento de la producción total en peso en 1970 al 29.9 por ciento en 2002. Este crecimiento se ha reflejado en la generación de alimentos de alto valor nutritivo, empleos, insumos para la industria alimentaria, divisas y ha promovido la protección y conservación de especies en peligro de extinción (Funge-Smith y Phillips, 2001 y Swick y Cremer, 2001). Además, sigue siendo más rápido que el logrado en cualquier otro sector de producción de alimentos de origen animal, de acuerdo a la FAO (2004), donde mencionan que a nivel mundial, la tasa media de crecimiento de este sector ha sido del 8.9 por ciento al año desde 1970, mientras que, durante el mismo período, la pesca de captura ha crecido solamente a razón del 1.2 por ciento y los sistemas de producción de carne de cría en tierra, un 2.8 por ciento. De los grupos de especies que se cultivan, los peces contribuyen con el 56.96%, seguido de los moluscos con el 22.93%.

Con relación a los moluscos, la producción mundial alcanzó un máximo de casi 12 millones de toneladas métricas en 2002, y se ha mantenido estable. De esta producción la aportación más significativa está dada por el ostión del Pacífico *Crassostrea gigas* (4.2 millones de toneladas) (De Silva, 2001; Pedini y Shehadeh, 1997 y FAO, 2004).

A continuación se mencionarán las generalidades de esta especie con relación a su distribución geográfica, biología y una breve descripción de la historia de su cultivo.

I.1. *Crassostrea gigas*

El ostión del Pacífico es originario de Asia y se distribuye desde la Isla de Sakhalin (Karafuto) hacia el sur de Japón, Corea, China y el suroeste de Asia. Pertenece al Phylum Mollusca, Clase Pelecypoda, Orden Pseudolamellibranchia y Familia Ostreidae. Es un organismo filtroalimentador y morfológicamente tiene valvas desiguales, unidas por una charnela, de forma extremadamente variable (Fig. 1), dependiendo entre otros factores, del

sustrato donde se desarrolla; la concha es de coloración blanca con manchas color púrpura y los adultos miden desde 8 hasta 30 cm de longitud. Habita en aguas someras y protegidas, sobre fondos rocosos o lodosos.

Generalmente se considera como hermafrodita protándrico, esto es, cambia de sexo. Los juveniles son machos funcionales durante su primer desove, mientras que la mitad de ellos permanecen como machos para su segundo desove. Los adultos funcionan como machos y hembras por separado en cualquier estación reproductiva, pero puede presentarse un cambio de sexo de macho a hembra en un cierto punto de su vida. La madurez sexual se alcanza durante el primer año y tienen fecundación externa. La gametogénesis inicia en invierno y la mayor proporción de ostiones maduros se alcanza en mayo y junio. El desove ocurre durante todo ese período pero los principales se presentan en mayo y junio, cuando la temperatura del agua tiene entre 19.5 °C y 24 °C (Pauley *et al.*, 1988), continuando hasta noviembre. El período de reposo se tiene desde octubre hasta noviembre (Cáceres-Martínez *et al.* 2003a).

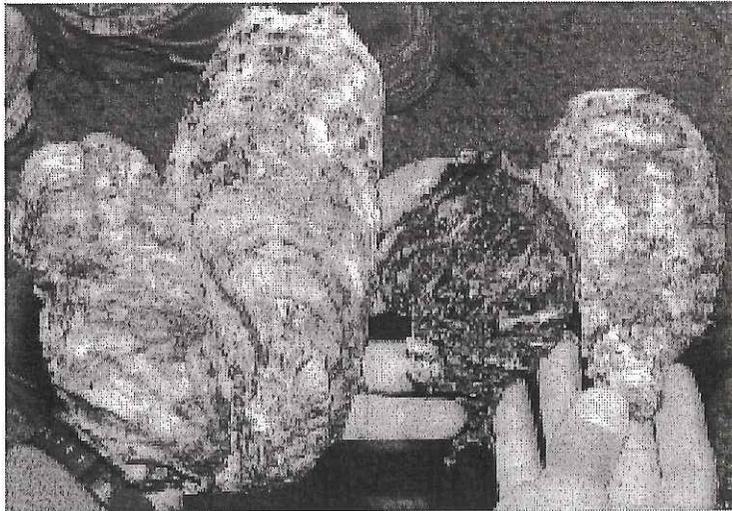
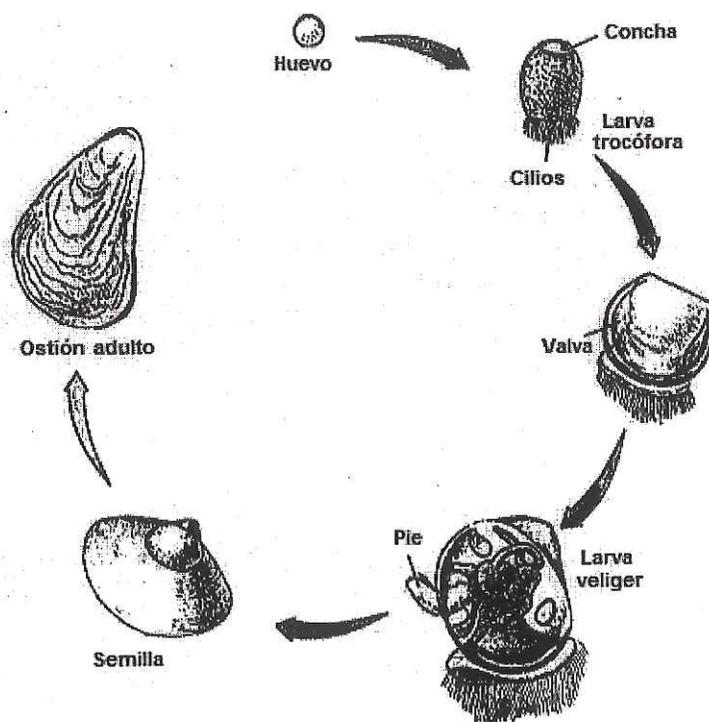


Figura 1. Ostión japonés, *Crassostrea gigas* cultivado en Bahía Falsa, B. C., México, donde se observa la variabilidad morfológica de esta especie.

El ostión del Pacífico desova anualmente cuando la temperatura del agua es de aproximadamente 19.5 °C y su desove es sincrónico. Los ostiones son altamente prolíficos,

una hembra en promedio puede producir de 50 a 100 millones de óvulos en un solo desove. Los cigotos son esféricos y miden de 45 a 62 μm de diámetro. Si las condiciones ambientales son favorables, en 48 horas se forma la larva veliger, la cual es planctónica y permanece aproximadamente tres semanas en esa fase si la temperatura está a 20°C o más (Imai, 1982). Cuando la larva alcanza una longitud aproximada de 0.30 mm se asienta a un sustrato. En este punto, el ostión ya no es planctónico y se le denomina como “semilla” o juvenil (Fig. 2). Otros factores críticos para el asentamiento, aparte de la temperatura, incluyen un sustrato adecuado, suficiente luz y un sustrato con superficies irregulares.



Hickman, 1998.

Figura 2. Ciclo de vida del Ostión *Crassostrea gigas*.

La metamorfosis de larva a juvenil está acompañada de una serie de cambios morfológicos marcados, como la desaparición del velo y el pie, así como del músculo abductor anterior y

el desarrollo de un juego de branquias. Después del asentamiento, el ostión juvenil es un organismo sésil que crece hasta su talla adulta y muere en el área de asentamiento, incapaz de moverse de ese lugar.

I.2. Historia del cultivo del ostión Japonés.

El cultivo de ostión es una práctica antigua que se remonta hasta el Imperio Romano en el Siglo I d.C. (Pillay, 1997). A principios del Siglo XVII los japoneses utilizaban rocas y ramas que permitían la adherencia de los ostiones y posteriormente los trasladaban a aguas seleccionadas para su engorda. A finales de ese mismo siglo, se desarrolló en Hiroshima, Japón, el cultivo del ostión utilizando una técnica conocida como “hibitate”, que consistió en emplear estacas de bambú ancladas verticalmente en el fondo del mar para la fijación de las larvas; de esta manera se tenía una mayor superficie de adhesión y los ostiones ya fijados se protegían de los depredadores bentónicos.

Esta técnica se utilizó por más de 300 años, manteniendo una producción estable de ostiones (Bardach *et al.*, 1986 e Imai, 1982). Sin embargo, el desarrollo más importante del cultivo ha ocurrido en los últimos 70 años, a partir de la introducción de la técnica de cultivos suspendidos, que permitieron elevar la producción y mejorar la utilización y manejo de las áreas de engorda (Imai, 1982). Gradualmente, este nuevo sistema de cultivo se empezó a implementar en varias partes de Japón y contribuyó al progreso de esta industria. Por otro lado, la presión en las pesquerías de la ostra olímpica (*Ostreola conchaphila*) en Estados Unidos y de la ostra plana (*Ostrea edulis*) en Europa, facilitaron la introducción del ostión japonés, *Crassostrea gigas*, a esas regiones del mundo.

En 1919, ostiones producidos en la Prefectura Miyagi en Japón fueron introducidos a la Bahía Samish en Estados Unidos. Aunque los ostiones adultos murieron, la semilla que venía adherida a la concha de los mismos sobrevivió y en 1921, después de un seguimiento riguroso del cultivo y de subsecuentes siembras, se estableció uno de los primeros cultivos de ostión en América (Lindsay y Simons, 1997). Posteriormente, en 1928, se importó semilla de ostión de Japón que se introdujo en la Bahía Tomales y de ahí hasta la Bahía de

San Francisco, ambas en California, EUA. La compra de semilla a Japón fue formalizada en 1939, hasta que cesó debido a la II Guerra Mundial, para luego reactivarse en los años 50 (Shaw, 1997).

Si bien en Europa se tiene una tradición de siglos en el cultivo de ostión, sustentada principalmente por la ostra plana, nativa del área, y en menor escala por el ostión portugués *Crassostrea angulata*; la explotación indiscriminada de los bancos naturales y la presencia de epizootias (Bonamiasis y la enfermedad del virus de la necrosis branquial), dieron como consecuencia la introducción de *Crassostrea gigas* a fin de reactivar la industria ostrícola (Dijkema, 1997; Edwards, 1997; Gouilletquer y Heral, 1997; Kristensen, 1997; Seaman y Ruth, 1997 y Strand y Vølstad, 1997).

En México, *Crassostrea gigas* se introdujo en 1973, en la Bahía de San Quintín, Baja California a una escala piloto, como resultado del plan de creación de los distritos de Acuacultura promovidos por la Dirección de Acuacultura del Departamento de Pesca. Entre 1972-1975 se llevaron a cabo diversos estudios encaminados a promover el cultivo a nivel comercial. Estudios hidrológicos (Chávez de Nishikawa y Alvarez, 1974), fisicoquímicos (Alvarez-Borrego y Alvarez-Borrego, 1982 y Alvarez-Borrego *et al.*, 1975) y de productividad primaria (Lara-Lara y Alvarez-Borrego, 1975), así como las investigaciones sobre la producción de larvas de ostión en condiciones de laboratorio (Islas *et al.*, 1978) y la rentabilidad del cultivo mediante la utilización de canastas y balsas (Islas y Ferrer, 1980), demostraron el potencial acuícola de la Bahía y permitieron consolidar el cultivo de ostión. Posteriormente, en 1976 se llevaron a cabo los primeros cultivos experimentales en la Bahía de La Paz, Baja California Sur y para principios de 1980, el cultivo de ostión se amplió de manera importante en el noroeste del país, abarcando los estados de Sonora y Nayarit (Mazón-Suástegui, 1996).

Actualmente, para el primer trimestre del 2005 la producción de ostión en el litoral del pacífico fue de 1,007 T, lo que representa una derrama económica de \$3,450,000.00 dólares (CONAPESCA, 2005). El cultivo del ostión Japonés tiene una larga historia que, a través de diferentes épocas, ha aportado importantes beneficios socio-económicos en los

países donde se ha introducido. Sin embargo, una de las limitantes para continuar su desarrollo es la presencia de mortalidades masivas algunas de las cuales se han asociado a enfermedades.

I.3. Mortalidades masivas y enfermedades

Desde el siglo antepasado, tanto en las poblaciones naturales de ostión, como en las cultivadas, se han producido una serie de mortalidades inusuales y recurrentes que han provocado reducciones significativas en la producción de Japón, Europa y Norte América. En algunas áreas, las mortalidades alcanzaron al 95% de la población (Sinderman, 1990).

Aunque las mortalidades se dan de manera natural, las prácticas de cultivo incrementan la posibilidad de ocurrencia, ya que se agrupan poblaciones densas en áreas pequeñas; se transfieren lotes de ostiones libremente, sin certificación sanitaria, permitiendo la introducción de patógenos; se modifican las áreas de producción y se cultivan en zonas costeras aledañas a campos agrícolas donde los fertilizantes y pesticidas eventualmente llegan al mar (Lauckner, 1983).

Se presume que algunas de las principales mortalidades de *Crassostrea gigas* y otros ostreidos registradas desde el siglo pasado las han causado agentes infecciosos como los virus, bacterias, hongos, protozoos y metazoos (Tabla I); sin embargo, la causa de estas mortalidades permanece como de origen desconocido.

Como se mencionó, muchos países han desarrollado su ostricultura con la introducción de *Crassostrea gigas*, ya sea sustituyendo a sus especies nativas o porque se carece de las técnicas de producción de estas especies. Estas actividades han traído consigo la transferencia de patógenos, que aunada a la presencia de los patógenos locales, al inadecuado manejo en las granjas de cultivo, a los factores ambientales y a una mala calidad de agua, causan los brotes de enfermedades.

Tabla I. Principales mortalidades masivas de ostión (*Crassostrea* spp. y *Ostrea* spp.) registradas a nivel mundial, distribución geográfica y posible causa.

Año	Especie	Área geográfica	Causa de la mortalidad
1900-1957	<i>Crassostrea virginica</i>	Canadá (golfo de St. Lawrence)	Enfermedad de la Bahía de Malpeque, desconocida
1915	<i>Crassostrea gigas</i>	Japón (Bahía Kanasawa)	Desconocida
1919-1923	<i>Ostrea edulis</i>	Europa	Desconocida
1927-1937	<i>C. gigas</i>	Japón (Península de Miura)	Desconocida
1930	<i>O. edulis</i> , <i>C. angulata</i>	Europa	Enfermedad de la concha, <i>Ostracoblabe implexa</i>
1940-presente	<i>C. virginica</i>	Estados Unidos (Golfo de México)	Apicomplexa <i>Perkinsus marinus</i>
1945-1955	<i>C. gigas</i>	Japón (Bahía de Hiroshima)	Desconocida (probablemente por causa de infección bacteriana)
1957-presente	<i>C. virginica</i>	Estados Unidos (costa del Atlántico)	Haplosporidio <i>Haplosporidium nelsoni</i> , <i>H. costale</i>
1961	<i>C. gigas</i>	Japón (Bahía Matsushima)	Desconocida (probablemente factores ambientales y fisiológicos)
1963-1969	<i>C. gigas</i>	Estados Unidos (Costa del Pacífico)	Desconocida (probablemente infección bacteriana)
1967-1977	<i>C. angulata</i> , <i>C. gigas</i> (posteriormente)	Francia	Enfermedad de las branquias, iridovirus
1968-Presente	<i>Saccostrea glomerata</i>	Australia	Paramyxia <i>Marteilia sydneyi</i>
1968-presente	<i>O. edulis</i>	Europa	Paramyxia <i>Marteilia refringens</i>
1970-1973	<i>C. gigas</i>	Francia	Infección Hemocítica Viral, iridovirus
1979-presente	<i>O. edulis</i>	Europa	Ascetospora <i>Bonamia ostreae</i>
1993	<i>C. gigas</i>	Estados Unidos	Desconocida

Las enfermedades ocasionan pérdidas significativas en la producción acuícola, lo que limita su desarrollo socioeconómico. Ejemplo de ello lo tenemos en el cultivo del ostión americano (*Crassostrea virginica*), que en Louisiana (EUA) se colapsó en 1940 a causa de una enfermedad letal conocida como “Enfermedad del Dermo” ocasionada por *Perkinsus marinus*, cuyas pérdidas en la producción fueron cercanas al 90%.

La Organización Mundial de Salud Animal (antes conocida como Oficina Internacional de Epizootias, OIE), organismo intergubernamental creado en 1924 para garantizar la sanidad animal en el ámbito mundial, considera cinco enfermedades en el ostión (*Ostrea* spp., *Crassostrea* spp. y *Saccostrea glomerata*) sujetas a declaración obligatoria, debido a su importancia socioeconómica o de salud pública y que tienen repercusiones en el comercio internacional de animales acuáticos. Estas enfermedades son: Bonamiosis (*Bonamia ostreae*, *Bonamia exitiosa*), Haplosporidiosis (*Haplosporidium nelsoni*), Marteiliosis (*Marteilia refringens*), Microcitosis (*Mikrocytos mackini*) y Perkinsosis (*Perkinsus marinus*, *P. olseni*)

No hay que obviar el hecho de que, en muchas ocasiones, las enfermedades que no se informan a la OIE tienen un mayor impacto negativo en la producción acuícola (OIE, 2005 y Subashinge *et al.*, 2001). Como ejemplo se tienen las mortalidades masivas que se presentaron entre 1996 y 1997 en los cultivos de la ostra perlera (*Pinctada fucata martensii*) en Japón, a causa de un agente viral aún no descrito (Miyasaki *et al.*, 1999).

En nuestro país, la normatividad sanitaria para el caso del ostión, se basa principalmente en la reglamentación decretada a nivel mundial. En este sentido, las normas NOM-010-PESC-1993 y NOM-011-PESC-1994 establecen los requisitos sanitarios, aplicación de cuarentenas y prevención de enfermedades para la importación de organismos acuáticos vivos destinados para la acuicultura.

Para los efectos de las normas antes mencionadas, se definen como “Enfermedades Certificables” aquellas de alto riesgo, contenidas en las regulaciones internacionales que se mencionaron antes, principalmente las que no tienen tratamiento actual conocido o que son

de muy difícil control y que incluyen: Enfermedad del velo del ostión (EVO), enfermedad viral del tipo Herpes y enfermedad viral de las branquias causada por Iridovirus.

La normatividad internacional y nacional mencionadas regulan la importación y exportación de organismos acuáticos con la finalidad de evitar el riesgo de propagación de parásitos y enfermedades.

I.4. Mortalidades inusuales de *Crassostrea gigas* en el Noroeste de México

Durante 1997 se presentaron mortalidades inusuales en los cultivos del ostión japonés *Crassostrea gigas* de la zona central de la costa del estado de Sonora. Posteriormente se presentaron en Baja California Sur y finalmente en Baja California. En los tres estados se alcanzaron porcentajes del 95% del total de la producción. En 1998, las mortalidades se repitieron, afectando a ostiones de todas las tallas y desde entonces, han sido recurrentes año con año, aunque no tan elevadas (Héctor González, com. pers.). Para octubre del 2004, en el estado de Sonora se volvieron a presentar mortalidades en los cultivos de ostión, con la misma intensidad que en 1997, lo que puso nuevamente en alerta al sector ostrícola de toda la región noroeste.

En su inicio, debido al impacto de estas mortalidades en los cultivos, se realizaron tres reuniones de trabajo entre productores, autoridades acuícolas y académicos para tratar de determinar las causas y la forma de controlarlas. Las reuniones se realizaron en Sonora, Baja California y Baja California Sur. Como resultado de estas reuniones se sugirieron como posibles causas: a) altas temperaturas y condiciones ambientales inusuales producidas por el fenómeno de “El Niño” en 1997 y 1998; b) toxinas en el ambiente producidas por microalgas; c) contaminación; d) disponibilidad y calidad del alimento, y e) patógenos o alguna acción conjunta de uno o más de estos factores (Cáceres *et al.*, 2000).

Los análisis que se han llevado a cabo hasta el momento, no han podido asociar estas mortalidades con ninguna enfermedad conocida y sólo se mencionan, algunas alteraciones en los tejidos, posiblemente relacionadas con condiciones de estrés (Foro Regional, 2000).

La presente tesis realizada en el Laboratorio de Biología y Patología de Moluscos del Departamento de Acuicultura del C.I.C.E.S.E. está encaminada a buscar los agentes patógenos del ostión *Crassostrea gigas* en la región Noroeste de México y su posible asociación con las mortalidades ocurridas.

II. OBJETIVOS

II.1. Objetivo general

Identificar los agentes patógenos que se encuentran en el ostión japonés, *Crassostrea gigas*, cultivado en el Noroeste de México y su posible asociación con los eventos de mortalidad.

II.1.1. Objetivos particulares

- 1) Determinar la carga parasitaria del ostión Japonés en la Bahía de San Quintín y otras localidades del Noroeste de México durante los eventos de mortalidad.
- 2) Determinar los daños histológicos asociados con la presencia de los patógenos encontrados durante los eventos de mortalidad a que se refiere el primer objetivo.
- 3) Asociar los agentes patógenos encontrados con los eventos de mortalidad.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

III.1. Áreas de estudio

III.1.1. Baja California

La Bahía de San Quintín y Laguna Manuela, se consideraron las dos zonas más importantes del cultivo de ostión, por la cantidad de empresas establecidas y por su volumen de producción.

La Bahía de San Quintín es una laguna costera localizada en la costa del Pacífico de Baja California, entre los 30° 24' y los 30° 30' de latitud N y los 115° 57' a 116° 01' de longitud W (Fig. 3) (Lara-Lara *et al.*, 1975). Está formada por dos brazos: Bahía San Quintín con orientación hacia el este, con una longitud aproximada de 11 km y una profundidad de 13 metros en el canal principal, y Bahía Falsa, al oeste, con una longitud de 7 km y una profundidad máxima, en el canal principal, de 7 metros; es en este brazo donde se localizan los cultivos comerciales del ostión japonés (Lara-Lara *et al.*, 1975). El efecto de la marea y la circulación inducida por el viento son los dos factores principales que controlan la hidrodinámica de la Bahía de San Quintín (Lara-Lara *et al.*, 1975). La temperatura del agua fluctúa entre los 18 y 20°C, para el verano, y de 12 a 15°C en invierno (Álvarez-Borrego y Álvarez-Borrego, 1982). En la Bahía se han establecido 21 empresas y su producción es la más importante del Estado (Héctor González, com. pers.).

Laguna Manuela se encuentra entre las coordenadas 28° 12' y 28° 17' de latitud Norte y 114° 06' y 114° 07' de longitud W, con una extensión aproximada de 600 ha (Fig. 3). Con un clima muy seco, la temperatura media anual superior a los 22°C, siendo 18°C la del mes más frío. Se caracteriza por presentar dos estaciones de lluvia, separadas por una corta temporada seca en el verano y otra larga en la mitad fría del año (noviembre a abril) (Contreras, 1985). En esta laguna se encuentran dos empresas que se han establecido ahí entre otras cosas, por las condiciones prístinas de sus aguas.

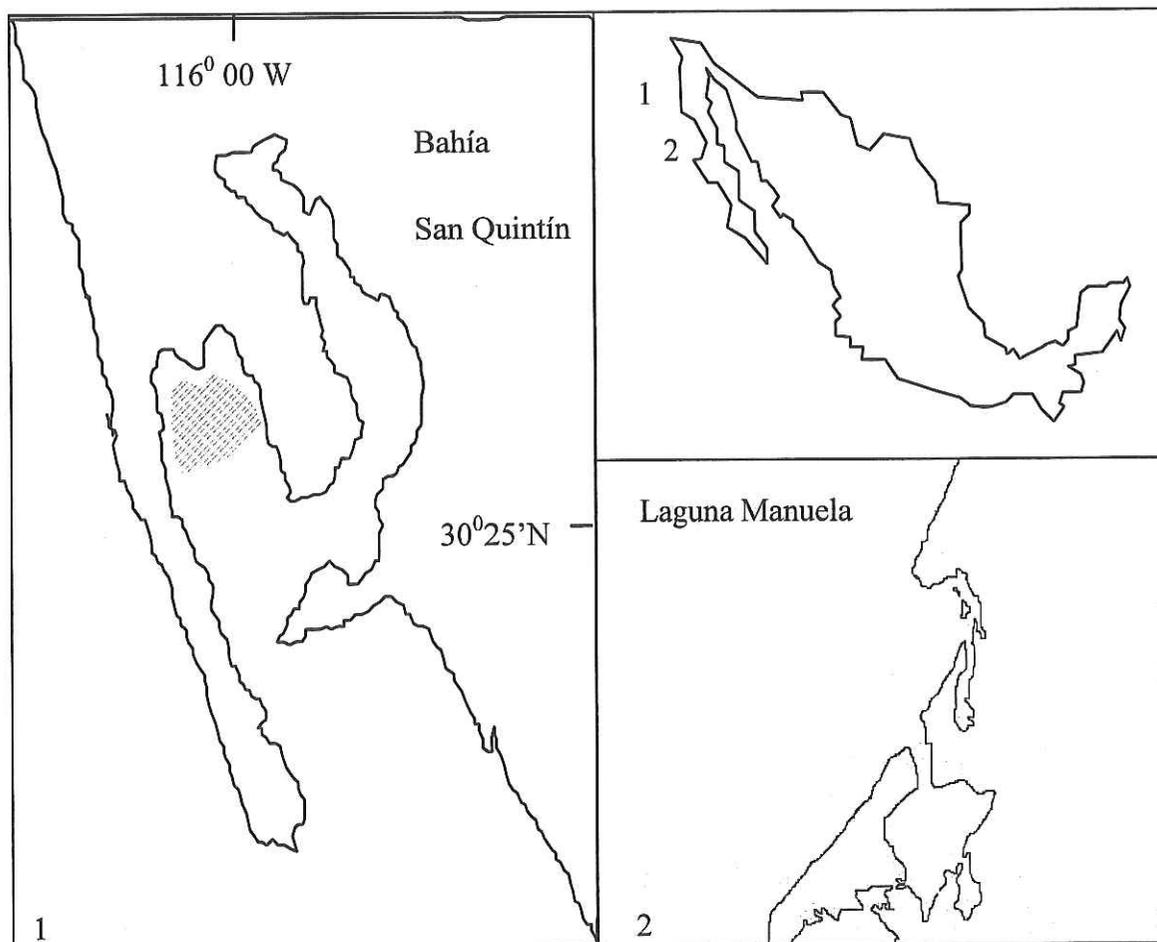


Figura. 3. Ubicación de las zonas de muestreo en Bahía San Quintín y Laguna Manuela en Baja California.

III.1.2. Sonora

Este estado ha sido uno de los más afectados por las mortalidades del ostión y se sitúa entre los $32^{\circ} 29'$ y $26^{\circ} 14'$ en su latitud Norte y entre los $108^{\circ} 26'$ y $105^{\circ} 02'$ en su latitud Oeste. Limita al Norte con Estados Unidos de Norteamérica, al Sur con el Estado de Sinaloa, al Este con Chihuahua y al Oeste con el Golfo de California y Baja California (Contreras, 1985).

Debido a la extensión del Estado y diversidad de cuerpos lagunares, se consideraron tres zonas para este estudio, de acuerdo con la división que estableció el Comité de Sanidad Acuícola del Estado de Sonora (COESAES), para atender a los productores en materia sanitaria (Fig. 4):

Zona Norte (ZN), que comprende a los municipios de Puerto Peñasco y Caborca, que abarca un área de marismas hipersalinas, ya que no tiene un aporte de agua dulce. Las temperaturas en invierno son de 5 °C en invierno y en verano de 37 °C.

Zona Centro (ZC), comprende el municipio de Hermosillo, se caracteriza por ser una zona costera de sedimento arenoso y lodo. Las temperaturas fluctúan entre 19 °C en invierno y 39 °C en verano.

Zona Sur (ZS), con los municipios de San Ignacio Río Muerto y Huatabampo, donde se localiza el Estero de Agiabampo, laguna litoral con un cuerpo principal central que se comunica con el Golfo de California a través de una boca y dos barras arenosas. En términos generales es una laguna somera, aunque en algunas zonas del canal principal alcanza profundidades de hasta 13 m. La temperatura anual es de 30°C, con la máxima de 35°C durante el verano y la mínima de 10 °C en el invierno

III.1.3 Laguna de la Palmita, Sinaloa

Se consideró la Laguna de la Palmita en el Estado de Sinaloa, en donde el cultivo de ostión es relativamente más reciente y donde también se han registrado mortalidades. La laguna se localiza entre los 25° 02' de latitud S y los 107° 37' y los 108° 04' de longitud W, pertenece al sistema lagunario "Bahía de Altata Ensenada de Pabellones", en el Municipio de Navolato, Sinaloa (Fig. 5). La laguna tiene una profundidad promedio de 2.5 m durante la marea baja y una salinidad que fluctúa de 28 a 36 ‰, con intervalos de temperatura de 18 a 25 °C (Contreras, 1985).

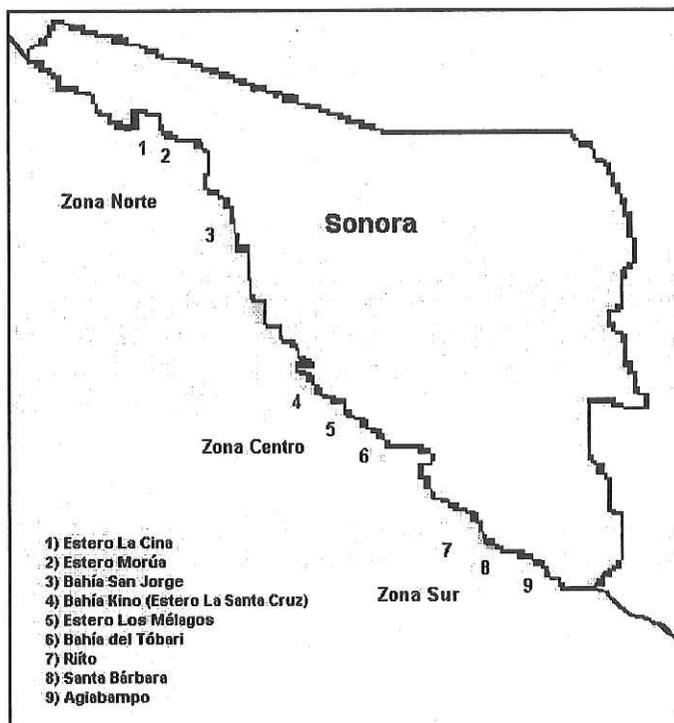


Figura 4. Mapa de localización de las zonas de muestreo en el Estado de Sonora.



Figura 5. Mapa de localización de la Bahía de Altata en el Estado de Sinaloa.

III.2. Recolección de muestras

Durante este estudio se revisaron un total de 3028 ostiones. La recolección de organismos, en las diferentes zonas estudiadas (Tabla II) se llevó a cabo durante los episodios de mortalidad por el personal del COSAES y los productores, de acuerdo a las instrucciones de recolecta (Apéndice I).

Tabla II. Resumen de las localidades de muestreo en el periodo 2000-2005, indicando la técnica de diagnóstico empleada.

Año	Mes/Día	Área de recolecta	Estado	Técnica de diagnóstico
2000	Jun. 9	Bahía San Quintín (Bahía Falsa)	Baja California	Análisis histopatológico
	Jun. 13			Análisis clínico Análisis histopatológico
	Jun. 20			Análisis clínico Análisis histopatológico
	Nov. 2			Análisis clínico Análisis por microscopía electrónica de transmisión
	Nov. 11			Análisis clínico Análisis histopatológico Análisis por microscopía electrónica de transmisión
2001	Ago. 7	Bahía San Quintín (Bahía Falsa)	Baja California	Análisis clínico Análisis histopatológico
2002	Jul. 25	Bahía San Quintín (Bahía Falsa) *		Análisis clínico Análisis bacteriológico* Análisis por PCR
	Ago. 1	Laguna Manuela		Análisis clínico Análisis histopatológico
	Ago. 29	Bahía San Jorge	Sonora	Análisis clínico Análisis histopatológico
2003	Jun. 7	Bahía San Quintín (Bahía Falsa)	Baja California	Análisis clínico Análisis histopatológico Análisis por PCR

* Evento de mortalidad del 90% de ostión juvenil. Por análisis previo de posible intervención de bacterias en esta localidad, se realizó un estudio bacteriológico.

Tabla II. Resumen de las localidades de muestreo en el periodo 2000-2005, indicando la técnica de diagnóstico empleada (cont.).

Año	Mes/Día	Área de recolecta	Estado	Técnica de diagnóstico
2003	Jun. 7	Laguna Manuela	Baja California	Análisis clínico Análisis histopatológico Análisis por PCR
	Jul. 22	Bahía San Quintín (Bahía Falsa)		Análisis clínico Análisis histopatológico Análisis por PCR
	Jul. 25	Laguna Manuela		Análisis clínico Análisis histopatológico Análisis por PCR
	Ago. 28	Laguna Manuela		Análisis clínico Análisis histopatológico Análisis por PCR
	Ago. 29	Bahía San Quintín (Bahía Falsa)		Análisis clínico Análisis histopatológico Análisis por PCR
	Nov. 19	Laguna Manuela		Análisis clínico Análisis histopatológico Análisis por PCR
	Nov. 20	Bahía San Quintín (Bahía Falsa)		Análisis clínico Análisis histopatológico Análisis por PCR
	Nov. 17	Estero La Santa Cruz	Sonora	Análisis histopatológico
	Nov. 29	Bahía San Jorge, Estero La Cina, Estero Morúa		Análisis histopatológico
	Dic. 17	Bahía San Jorge, Estero La Cina, Estero Morúa, Estero la Santa Cruz.		Análisis histopatológico

Tabla II. Resumen de las localidades de muestreo en el periodo 2000-2005, indicando la técnica de diagnóstico empleada (cont.).

Año	Mes/Día	Área de recolecta	Estado	Técnica de diagnóstico
2004	Dic. 17	Estero Los Mélagos, Bahía del Tóbari, Bahía de Agiabampo	Sonora	Análisis Histopatológico
2005		Bahía San Quintín (Bahía Falsa), B. C.	Baja California	Análisis clínico Análisis Histopatológico Análisis por PCR
		Laguna Manuela	Baja California	Análisis clínico Análisis Histopatológico Análisis por PCR
		Bahía San Jorge, Estero La Cina, Estero Morúa, Estero La Santa Cruz, Estero Los Mélagos, Bahía del Tóbari, Bahía de Agiabampo, Santa Bárbara, El Riíto	Sonora	Análisis clínico Análisis Histopatológico Análisis por PCR
		Laguna de La Palmita.	Sinaloa	Análisis clínico Análisis Histopatológico Análisis por PCR

En general para cada localidad se obtuvieron aproximadamente 10 organismos de talla comercial y dependiendo del sistema de cultivo empleado en la zona, la recolecta se hizo directamente en la sarta, en el costal o en la canasta. Dependiendo del estadio de vida afectado por la mortalidad, se recolectaron organismos desde larvas, juveniles y adultos (Fig. 2).

Los organismos recolectados en Bahía Falsa, B. C., se enviaron al Laboratorio de Biología y Patología de Organismos Acuáticos del Departamento de Acuicultura del CICESE para su análisis. En el caso del Estado de Sonora, la recolección se hizo en colaboración con el COSAES y las muestras se enviaron al Laboratorio de Patología del Instituto de Sanidad Acuícola, A. C. y para el caso del Estado de Sinaloa, el ostricultor contactó al Laboratorio de Patología del Instituto de Sanidad Acuícola, A. C.

Para el análisis de la “semilla”, se obtuvieron muestras de dos laboratorios de producción de moluscos ubicados en Baja California y Sonora. El primero, corresponde a la empresa MaxMar Mariscos, S. A. de C. V., localizada en Ensenada, B. C., y el segundo, al Instituto de Acuicultura del Estado de Sonora, en Bahía de Kino, Sonora.

III.3. Técnicas de diagnóstico

III.3.1. Análisis clínicos

Una vez en el laboratorio, los ostiones vivos se lavaron para eliminar los organismos asociados, se midieron con una cinta métrica para registrar la talla y se abrieron para la revisión macroscópica del cuerpo blando, incluyendo las branquias. Se hicieron observaciones de la apariencia de los tejidos en fresco, considerando su estructura, coloración, consistencia y olor. Se anotó el grado de deterioro de las branquias de acuerdo con la escala propuesta por Comps (1988) y modificada por Cáceres-Martínez y Vásquez-Yeomans (2003): branquia normal (BrN), branquia completa con margen dorsal apical continuo sin mostrar deformación; branquia ligeramente erosionada (BrLE), inflamación branquial media con ligeras erosiones en el margen dorsal apical de la branquia y; branquia

erosionada o BrE, severa inflamación branquial con hendiduras profundas en el margen de la branquia, además de tejido necrosado (Figs. 6 y 7). Se estimó la prevalencia (P) como el porcentaje de los ejemplares afectados en la muestra y la intensidad (I) como el grado de erosión estimado según la escala antes descrita.

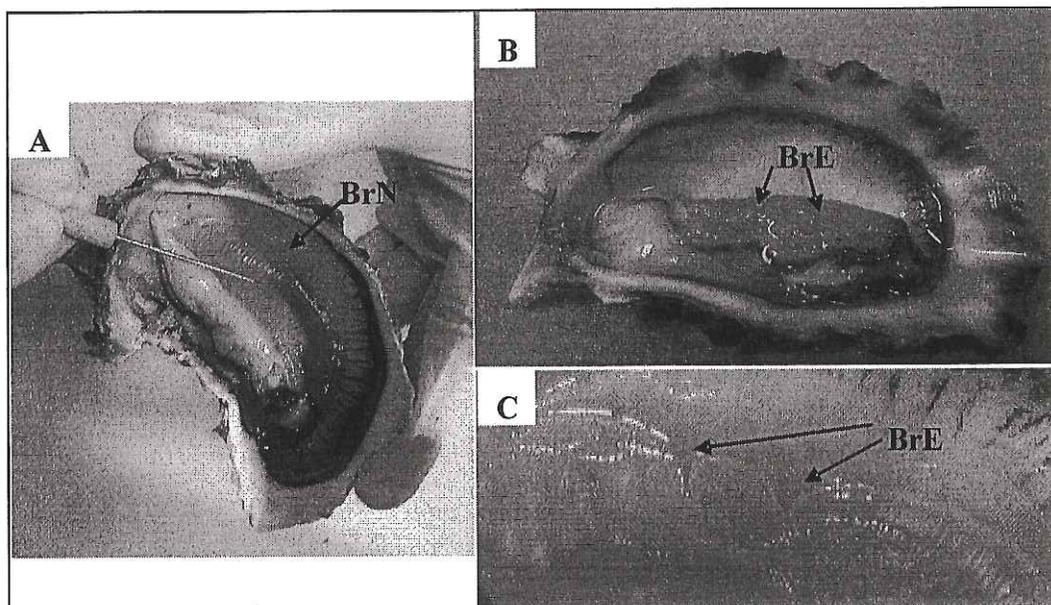


Figura. 6. A) Lamelas branquiales de *Crassostrea gigas* sano, la coloración y apariencia del animal denotan su condición saludable y el borde ventral de las lamelas es uniforme o normal (BrN). B) Lamelas branquiales erosionadas (BrE) en un ejemplar afectado, la consistencia de las demibranquias es flácida. C) Acercamiento de lamelas branquiales erosionadas mostrando las hendiduras o borde aserrado en la indentación marginal.

Las semillas provenientes de los laboratorios de producción fueron analizadas bajo el microscopio estereoscópico. Se revisó la movilidad, estructura del cilio y velo.

Las secciones del tejido branquial con erosiones se almacenaron a -20°C o se preservaron en etanol al 96%, para su análisis con técnicas moleculares. En algunos casos, se realizaron frotis de tejido branquial y de glándula digestiva que se observaron al microscopio óptico para la búsqueda de parásitos y su posible aislamiento.

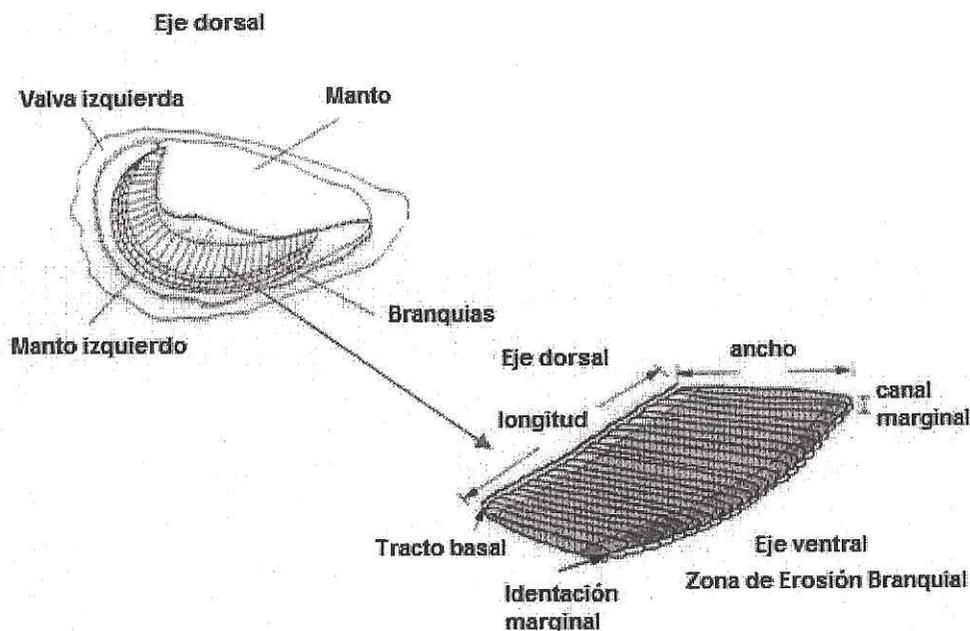


Figura 7. Esquema del ostión *Crassostrea gigas*, después de quitar la valva derecha, mostrando los ejes dorsal y ventral, manto izquierdo y manto derecho recogido para mostrar las branquias. También se muestra una de las lamelas de una demibranchia para ubicar la zona de la erosión branquial en el eje ventral (modificado de Brun *et al.*, 1999).

III.3.2. Análisis histopatológico

Después del análisis clínico, cada ostión se fijó individualmente con líquido Davidson, en una relación de volumen de 1:5 (ver apéndice II). La fijación fue por 24 horas (Shaw y Battle, 1957), para posteriormente cortar una sección transversal del cuerpo blando de aproximadamente 5 mm. El corte incluyó el manto, glándula digestiva, riñones, gónada y branquias (Fig. 8).

Los tejidos se colocaron en un casete histológico y se depositaron en un frasco de 1 litro con una solución Davidson conservante, mientras se iniciaba con la deshidratación e inclusión en parafina (ver apéndice III). Para la deshidratación, los casetes con los tejidos se colocaron en un procesador automático de tejidos, con cambios graduales de etanol (70% hasta alcohol absoluto) y se incluyeron en parafina utilizando un incluidor.

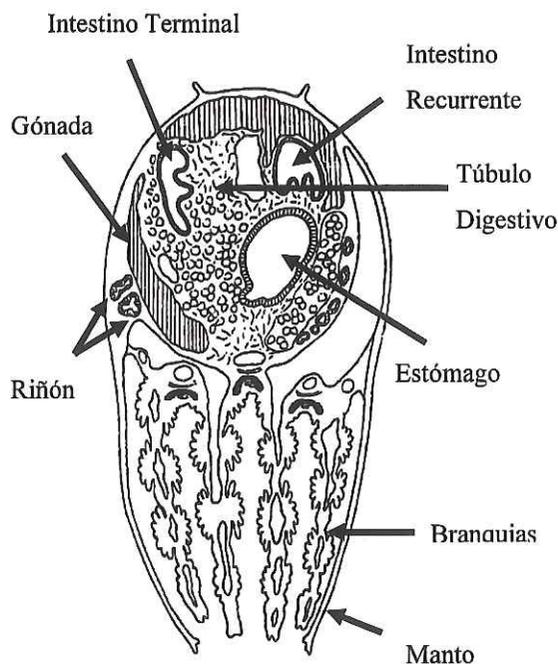


Figura 8. Corte transversal del ostión donde se muestran sus órganos internos.

Los cortes histológicos se hicieron en un microtomo (marca American Optical) a 5 micrómetros de espesor y se colocaron en portaobjetos, que se tiñeron con la técnica de hematoxilina-eosina-floxina (Shaw y Battle, 1957) (ver apéndice IV).

Las laminillas histológicas se revisaron bajo un microscopio óptico (marca Carl Zeiss), para la búsqueda de parásitos, células polimórficas y cuerpos de inclusión, así como los daños asociados por la presencia de dichos parásitos. La revisión de las muestras se hizo con los objetivos de 20x, 40x y 100x, de forma sistemática realizando un barrido en forma de zigzag longitudinal a la posición del corte.

III.3.3. Análisis por Microscopía Electrónica de Transmisión

De las muestras seleccionadas a partir de los análisis clínicos llevados a cabo en el 2000, en la localidad de Bahía San Quintín (Bahía Falsa, B. C.), se obtuvieron pequeñas secciones

del tejido branquial, de aproximadamente 1 mm³, que abarcaron secciones de la branquia erosionada. El tejido se colocó en tubos para microcentrífuga de 1.6 ml y se fijaron inmediatamente en glutaraldehído al 2.5%, preparado en cacodilato de sodio 0.2 M (solución amortiguadora, pH 7.2) por un tiempo de 3 horas a 4°C.

Después de la fijación, los tejidos se lavaron con 1.5 ml de la solución amortiguadora de cacodilato de sodio 0.2 M (pH 7.2), por 10 a 12 horas, manteniendo la temperatura a 4°C; y posteriormente se procedió a la postfijación con tetraóxido de osmio al 2% en cacodilato de sodio 0.2 M, de 2 a 3 horas a la misma temperatura.

Los tejidos se deshidrataron en etanol, con cambios graduales del 70% hasta el 100% y óxido de propileno y se incluyeron en resina Epon. Los cortes, de 90 nm, se tiñeron con acetato de uranilo al 5% por 30 minutos y se observaron en un microscopio electrónico de transmisión a 75 kV. La deshidratación, los cortes en ultramicrotomo y la observación al microscopio, se llevaron a cabo por el personal técnico del Instituto de Investigaciones Marinas en Vigo, España.

III.3.4. Análisis bacteriológico

Los análisis histológicos preliminares y los de Microscopía Electrónica de Transmisión (MET) de tejido branquial erosionado, mostraron ocasionalmente la presencia de bacterias, por tal motivo se hizo un estudio dirigido a identificar las bacterias asociadas a las erosiones branquiales, durante un episodio de mortalidad, mismo que ocurrió en julio de 2002, en la localidad de Bahía Falsa, B. C. Se recolectaron 70 ostiones juveniles, con una talla promedio de 4.5 cm, de los cuales, se eligieron 10 para el análisis, por estar vivos y presentar las erosiones branquiales.

Una vez en el laboratorio, los ostiones se lavaron para eliminar los organismos asociados, se midieron con una cinta métrica para registrar la talla y se lavaron nuevamente con agua de mar estéril. Bajo condiciones asépticas se abrieron y se obtuvieron 5 gramos de tejido de las branquias erosionadas.

El tejido se homogeneizó, agregando 1 ml de agua de mar estéril, en un mortero de porcelana estéril. Se colocó 1 ml del homogeneizado en un tubo de ensaye con 9 ml de agua de mar filtrada y esterilizada en autoclave (dilución 1:10) y de ahí se hicieron subsecuentes diluciones (1:100, 1:1000 y 1:10000). Se sembraron 10 μ L de la última dilución en placas con medio de cultivo Zobell (Gibco) y se incubaron a 26 °C por 48 horas.

Las colonias bacterianas que se desarrollaron en esta primera inoculación se aislaron por el método de estría en diferentes placas con medio Tiosulfato-Citrato-Bilis-Sacarosa (TCBS) y Agar Marino; el aislamiento se continuó hasta obtener un solo tipo de colonia, basándose en una revisión macroscópica que incluyó la morfología colonial, coloración, tipo de crecimiento y la consistencia de la colonia (Bergey's Manual, 1993).

La caracterización fenotípica se realizó con pruebas convencionales (morfología colonial, tinción de Gram y movilidad, crecimiento en medio selectivo, sensibilidad al agente vibriostático 0/129 y crecimiento a las salinidades 3‰ y 6‰) y para la caracterización bioquímica con las pruebas de citocromo oxidasa y catalasa, fermentación de la glucosa y el sistema de identificación rápida API20NE (BioMérieux) siguiendo las instrucciones del fabricante, modificando la solución de dilución con agua de mar estéril.

Una vez que las bacterias se aislaron e identificaron se preservaron a -20°C siguiendo la metodología propuesta por Sambrook y Russell (2001).

III.3.5. Detección del Herpesvirus por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

En un segundo análisis más detallado del tejido branquial, utilizando MET, se observó la presencia de un virus tipo Herpes en los ostiones revisados para el análisis bacteriológico (Vásquez-Yeomans *et al.*, 2004a). A partir de este resultado se procedió con la detección del virus a nivel molecular.

III.3.5.1. Extracción y purificación de ADN genómico a partir de tejido branquial.

Se utilizaron las muestras de tejido branquial recolectadas del 2000 al 2004 y que fueron previamente preservadas a -20°C o en etanol al 96%; para el 2005 el tejido branquial estuvo fresco. En todos los casos se pesaron exactamente 100 mg de tejido en una balanza analítica (marca Oahus Adventure con resolución de ± 1 mg).

El tejido se homogeneizó manualmente en un tubo de microcentrífuga estéril de 1.6 mL utilizando un pistilo estéril. Posteriormente se agregaron 500 μL de amortiguador Tris-EDTA pH 8.0 estéril, 100 μg de proteinasa K (10 mg/mL) y se incubó 30 minutos a 37°C . Después de ese tiempo, se agregó 500 μL del reactivo comercial DNazol® siguiendo el protocolo del fabricante (Research Molecular Center), con la modificación de Chomczynski *et al.* (1997) donde se agregaron 240 μg de ribonucleasa pancreática A (60 mg/mL). El tubo se dejó incubando 10 minutos a 37°C . Después de ese tiempo se centrifugó 10 min a 14,000 rpm a temperatura ambiente en una microcentrífuga (Eppendorf 5317C), para precipitar el tejido degradado.

Se transfirieron 800 μL del sobrenadante a un tubo estéril y se agregaron 400 μL de cloroformo 99%, se mezcló por 20 segundos y se centrifugó por 10 min a 14,000 rpm. Se transfirieron, cuidadosamente, 600 μL del sobrenadante a otro tubo estéril y se agregó 800 μL de isopropanol 99.9% (-20°C) que se mezcló por inversión y se dejó 12 horas en el congelador para precipitar el ADN. Una vez transcurrido el tiempo se centrifugó por 10 min a 14,000 rpm.

El sobrenadante se eliminó por decantación y el ADN precipitado se lavó dos veces con 500 μL de etanol al 70%. Después se centrifugó por 10 min a 14,000 rpm y de nueva cuenta el sobrenadante se eliminó por decantación. El ADN precipitado se secó en una estufa a 37°C para eliminar restos de etanol, por un tiempo no mayor a 20 minutos. Posteriormente, el ADN se resuspendió en 100 μL de amortiguador Tris-EDTA pH 8.0 estéril.

El ADN genómico se detectó por medio de la técnica de electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1.0%. Se mezclaron 5 μL del ADN resuspendido con 1 μL de colorantes de carga 5X (xilencianol y azul de bromofenol en Ficoll). Como referencia se utilizó un marcador de peso molecular de 0.1 a 2 Kpb (Invitrogen) a una concentración de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

A la cámara de electroforesis se le agregó suficiente amortiguador TBE 1X para cubrir el gel y se aplicaron 100 voltios por espacio de una hora. Una vez realizada la electroforesis, se tiñó el gel utilizando una solución de bromuro de etidio (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) por un tiempo de 5 minutos. Después de ese tiempo, se enjuagó el gel con agua destilada y se detectó bajo iluminación ultravioleta (Bromuro de etidio: $\lambda_{\text{excitación}} = 302 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{emisión}} = 590 \text{ nm}$).

La concentración de ADN se determinó utilizando un espectrofotómetro UV a 260 nm. Cada dilución se realizó por duplicado, se tomó 1 μL de ADN más 49 μl de agua grado biología molecular. El rendimiento del método fue de 5 - 25 ng de ADN genómico total por cada mg de tejido branquial ($A_{260/280} \sim 1.86 - 2.03$).

III.3.5.2. Preparación de la Reacción de PCR.

Se utilizaron los oligonucleótidos C2 (5'-CTC-TTT-ACC-ATG-AAG-ATA-CCC-ACC-3') y C6 (5'-GTG-CAC-GGC-TTA-CCA-TTT-TT-3'), los cuales amplifican un fragmento de 730 pb. Ambos oligonucleótidos hibridan en una región del genoma que codifica para dos proteínas de función desconocida. Las mezclas de PCR fueron de 25 μL utilizando todos los componentes de Hoffman-La Roche. Las concentraciones de los componentes fueron las siguientes: dNTP 50 μM , 100 ng de cada primer, MgCl_2 2.5 mM y 2.5 U de *Taq* DNA polimerasa (Renault *et al.*, 2000). La reacción de PCR se realizó en un termociclador Apollo (marca Continental Lab Products).

Las condiciones de amplificación están descritas en el artículo de Renault *et al.* (2000) con una modificación en la temperatura de alineamiento, y resumiendo fueron las siguientes: Desnaturalización inicial a 94 °C por 2 minutos; 35 ciclos de 94 °C por 1 min., 55 °C por 1 min. y 72 °C por 1 min.; extensión final de 72°C por 5 min.

En todas las reacciones realizadas se incluyó un control positivo (ADN genómico del OsHV-1, extraído de partículas virales procedentes de larvas de *C. gigas* y donado por Dr. T. Renault del IFREMER) y un control negativo consistente en agua estéril.

Los productos de PCR se detectaron por medio de la técnica de electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1.0%. Se aplicó una carga de 100 voltios por 1 h y el gel fue teñido con una solución de bromuro de etidio (1 $\mu\text{g/ml}$). Como referencia se utilizó el marcador de peso molecular de 0.1 a 2 Kpb (Invitrogen) a un concentración de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

Previo a la detección del Herpesvirus, se realizó la estandarización del método de PCR utilizando como control positivo ADN genómico viral (OsHV-1) y se determinó en muestras de *Crassostrea gigas* que resultaron positivas al OsHV-1. La concentración mínima requerida para obtener un producto de PCR detectable por electroforesis fue de 12.6 $\text{pg}/\mu\text{L}$ (Fig. 9).

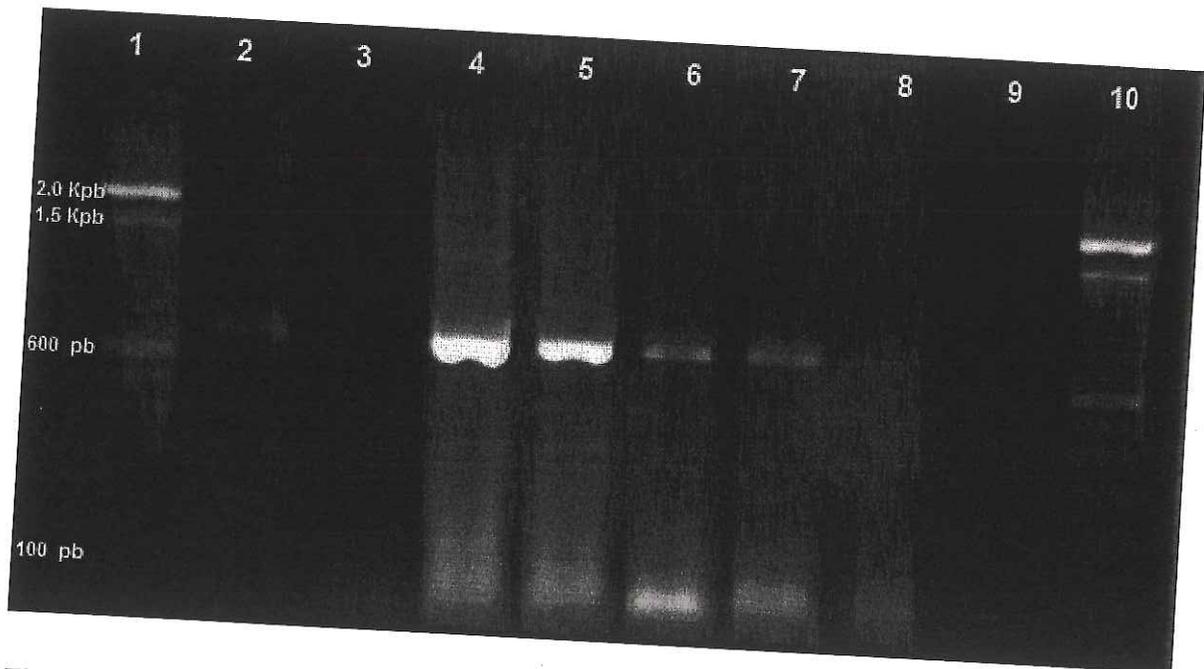


Figura 9. Sensibilidad de la técnica de PCR para la detección del OsHV. Carriles 1 y 10 Marcador de peso molecular de 0.1 a 2 Kpb (Invitrogen); 2) Control positivo (ADN genómico viral, X ng por reacción); 3) Control negativo (agua grado biología molecular estéril); 4) Muestra positiva de semilla de *C. gigas* (1,264 ng de ADN genómico total); 5) 126.4 ng 6) 12.64 ng 7) 1.26 ng 8) 12.6 pg 9) 1.26 pg.

III.3.6. Detección del Protozooario Esporulado X (PEX) por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Durante los últimos muestreos del 2004, se empezaron a detectar por histología algunos protozoarios en la glándula digestiva y en las branquias que por sus características morfológicas, presentaban cierta similitud con *Marteilia* spp., pero también ciertas diferencias (liberación de esporas o microcélulas), se denominó Protozooario Esporulado X o PEX en tanto se confirmaba su identidad por análisis de ácidos nucleicos por medio de la técnica de PCR y usando los iniciadores recomendados por la OIE.

III.3.6.1. Extracción y Purificación de ADN genómico a partir de tejido de glándula digestiva, branquia y extractos semi-purificados.

La extracción de ADN se hizo a partir de un frotis en fresco de tejido branquial y de la glándula digestiva. El procedimiento de extracción es el mismo que se describió para el tejido branquial, aunque antes de precipitar el ADN con Isopropanol se agregó 1 uL de glicógeno (1 uL por cada mL de fase acuosa) con la finalidad de obtener la mayor cantidad posible de ADN. Por otro lado, los semipurificados se consiguieron a partir de diferentes técnicas, mismas que se mencionan en la Tabla III.

La concentración de ADN genómico total para la glándula digestiva y del PEX semi-purificado se determinó utilizando un espectrofotómetro UV a 260 nm. Cada dilución se realizó por duplicado, se tomó 1 μ L de ADN más 49 μ L de agua grado biología molecular. Para glándula digestiva, el rendimiento del método fue de 30 a 50 ng de ADN genómico total por cada mg de tejido ($A_{260/280} \sim 1.89 - 2.04$). Para el semi-purificado del PEX el rendimiento fue de 4.0 a 1.5 ng de ADN genómico total por cada mg de PEX ($A_{260/280} \sim 1.69 - 2.38$).

III.3.6.2. Preparación de la Reacción de PCR.

Se utilizaron los oligonucleótidos ITS1-4 (5'-CCG-CAC-ACG-TTC-TTC-ACT-CC-3') e ITS1-5 (5'-CTC-GCG-AGT-TTC-GAC-AGA-CG-3'), los cuales amplifican un fragmento

de 411 pb. Las reacciones para PCR fueron de 25 μ L utilizando todos los componentes de Hoffman-La Roche. Las concentraciones de los componentes fueron las siguientes: dNTP 50 μ M, 100 ng de cada primer, $MgCl_2$ 2.0 mM y 1 U de *Taq* DNA polimerasa (Le Roux *et al.*, 1999). La reacción de PCR se realizó en el termociclador Apollo (marca Continental Lab Products).

Tabla III. Condiciones de semi-purificación del Protozoario Esporulado X (PEX).

Tejido	Método	Tiempo
Branquia	Centrifugado a 8,000 rpm.	3 minutos
Glándula digestiva	Centrifugado a 8,000 rpm.	3 minutos
Branquia	Filtrado a 25 μ m. Centrifugado a 5,000 rpm.	3 minutos
Glándula digestiva	Filtrado a 25 μ m. Centrifugado a 5,000 rpm.	3 minutos
Branquia	Macerado en mortero. Centrifugado a 5,000 rpm.	3 minutos
Glándula digestiva	Macerado en mortero. Centrifugado a 5,000 rpm.	3 minutos
Branquia	Tejido sin macerar. Centrifugado a 5,000 rpm.	3 minutos
Branquia	Macerado en mortero y observado bajo el microscopio de epifluorescencia.	
Branquia	Tejido retenido en el filtro de 25 μ m.	
Glándula digestiva	Tejido retenido en el filtro de 25 μ m.	

Las condiciones de amplificación están descritas en el artículo de Le Roux *et al.* (1999) y resumiendo fueron las siguientes: Desnaturalización inicial a 94 °C por 5 minutos; 30 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.

En todas las reacciones realizadas se incluyó un control positivo (ADN genómico de mejillón *Mytilus galloprovincialis* extraído del tejido de glándula digestiva infectado con *Marteilia refringens* y donado por el Dr. Antonio Figueras del IIM de España) y un control negativo consistente en agua estéril.

Los productos de PCR se detectaron por medio de la técnica de electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1.0%. Se aplicó una carga de 100 voltios por 1 h y el gel fue teñido con una solución de bromuro de etidio (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Como referencia se utilizó el marcador de peso molecular de 0.1 a 2 Kpb (Invitrogen) a una concentración de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

III.3.7. Análisis estadístico.

En los casos en que fue posible, por la naturaleza de los datos, se hizo una comparación estadística, se realizaron análisis no paramétricos de Kruskal-Wallis y Dunckan (Zar, 1984).

IV. RESULTADOS

IV.1. Análisis clínicos

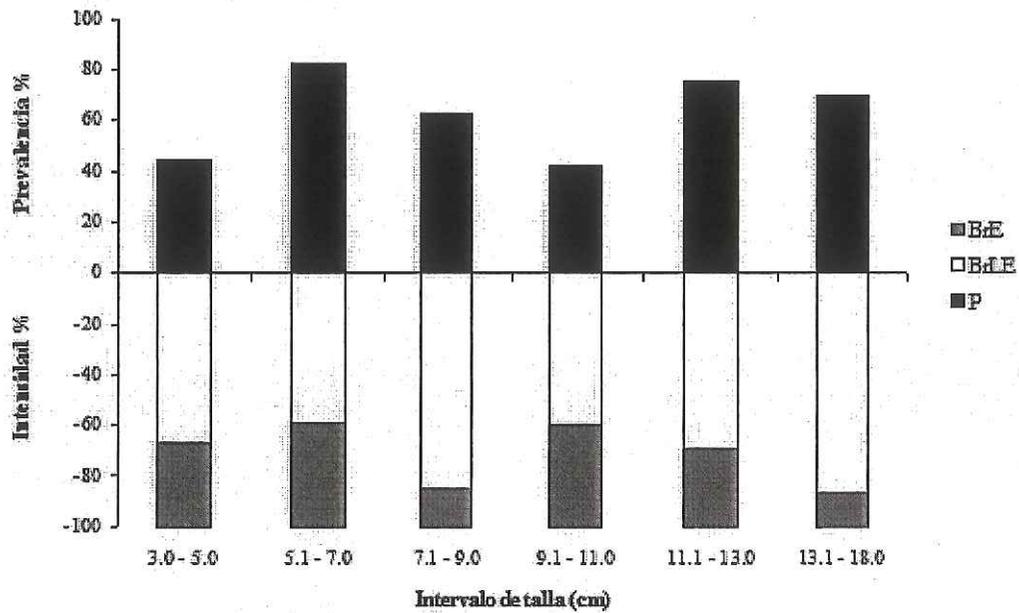
Las tallas de los organismos revisados se agruparon por rangos. En Baja California, las tallas fueron de 3.3 cm hasta 17.5 cm, en Sonora las tallas fueron de 3.0 a 13.7 cm, mientras que en Sinaloa el intervalo fue de 4.6 cm a 11.8 cm. Con relación a los laboratorios de producción de semilla de ostión, las tallas fueron de 250 micrómetros a 6 mm (larvas y semilla) para Baja California y de 0.5 cm a 3.0 cm (semilla) en Sonora.

En general, para las tres áreas estudiadas (Baja California, Sonora y Sinaloa), las erosiones branquiales (Figs. 6 y 7) se encontraron en ostiones de todas las tallas en el intervalo de 5.1 a 7.0 cm se localizaron las prevalencias más altas (83% en Baja California y 100% en Sonora). También, en los ostiones de esa talla se tienen los porcentajes más elevados de branquias erosionadas (BrE), 42% y 70% para Baja California y Sonora, respectivamente (Figs. 10A y 10B). La semilla proveniente de los laboratorios de producción no mostró anomalías aparentes.

IV.1.1. Baja California.

El 34% de los ostiones revisados mostraron branquias ligeramente erosionadas (BrLE), caracterizadas por un tenue engrosamiento en la zona apical. En el mes de agosto de 2002, en la localidad de Laguna Manuela, todos los ostiones analizados tenían las branquias normales, con sus márgenes continuos y sin deformaciones. Por otro lado, en la localidad de Bahía San Quintí, para ese mismo año (julio), se detectó el mayor grado de erosión branquial. No se observaron pústulas, ampollas u otras deformidades diferentes a las erosiones.

A)

Baja California

B)

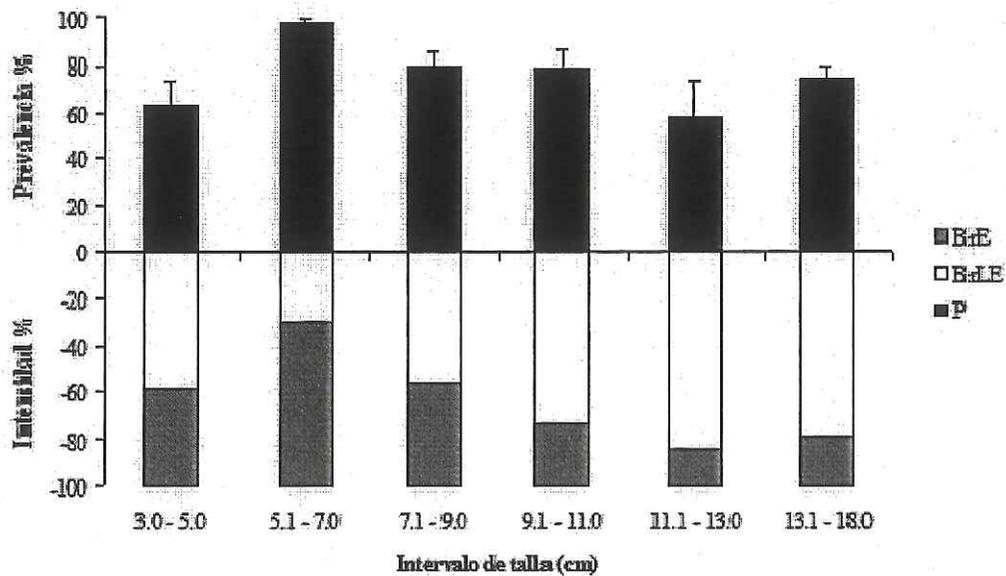
Sonora

Figura. 10. Prevalencia e Intensidad de las erosiones branquiales por intervalo de tallas (cm) en los ostiones de A) Baja California y B) Sonora.

IV.1.2. Sonora.

Durante el período estudiado, las erosiones branquiales se encontraron en el 81% de los ostiones revisados, con prevalencias desde 40 hasta el 100% y con diferencias significativas en los meses (Kruskal-Wallis $H=56.7$, 10 g.l. $P= <0.001$). En enero y febrero aumenta la prevalencia, disminuye en marzo y se incrementa nuevamente en abril, donde permanece más o menos estable a partir del mes de mayo, alcanzando su máximo en agosto (Fig. 11).

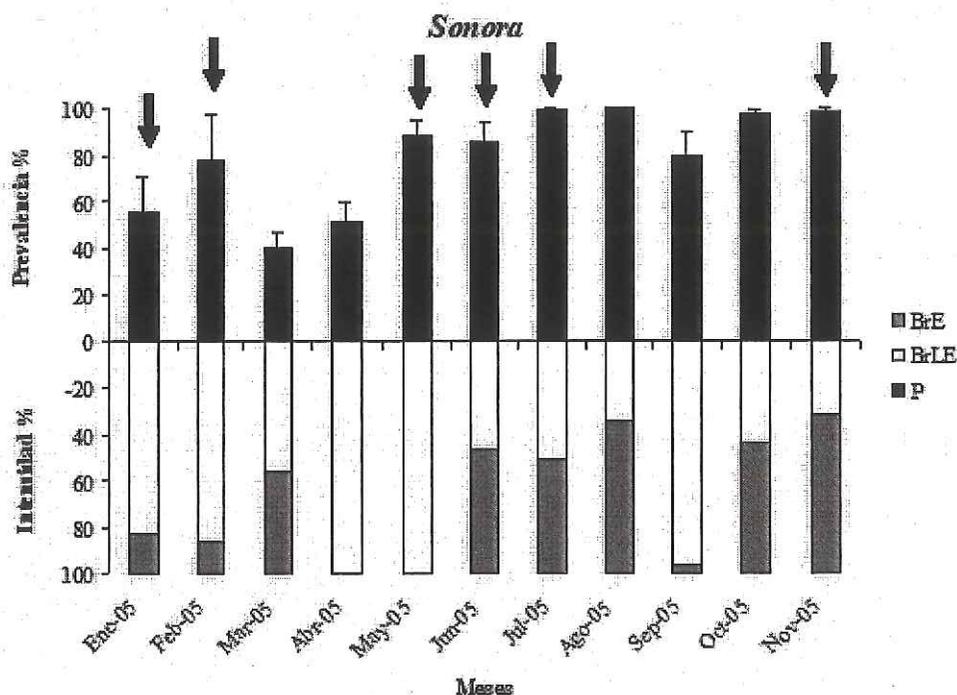


Figura. 11. Prevalencia e Intensidad de las erosiones branquiales en los ostiones revisados durante el período estudiado en el estado de Sonora. Con las flechas se indican episodios de mortalidad.

Con respecto a la intensidad, el porcentaje de ostiones con branquias ligeramente erosionadas (BrLE) alcanzaron su máximo (100%) en los meses de abril y mayo, disminuyendo de junio hasta agosto, con un mínimo en el mes de noviembre (33%). Lo

contrario ocurrió con los ostiones con branquias erosionadas (BrE), éstos no se observaron en los meses de abril y mayo, alcanzando sus valores más altos de intensidad en noviembre. En general, con prevalencias superiores al 80%, los ostiones mostraron erosiones severas en las branquias (BrE) y coincidieron con la estación de verano-otoño (Fig. 11).

De las diferentes zonas del estado en la zona norte se presentan las prevalencias más altas y constantes, entre el 98% y el 100% desde junio hasta noviembre (Fig. 12) y de igual manera, es en esta zona donde los organismos presentaron el mayor daño en las branquias, con erosiones muy profundas, engrosadas en el borde apical y con tejido necrosado (Fig. 6 y 7). En algunos casos, las lamelas branquiales tenían una coloración negruzca en su parte distal, con una consistencia flácida, por lo que se rasgaron fácilmente.

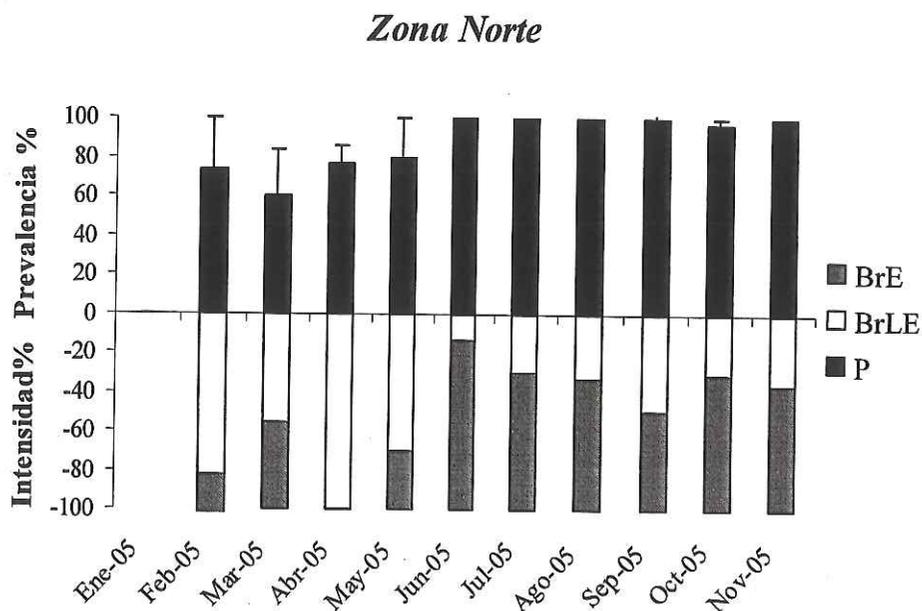


Figura 12. Prevalencia e Intensidad de las erosiones branquiales en la Zona Norte del estado de Sonora, durante el período de estudio.

En la zona sur del Estado se encontraron los ostiones menos afectados por daños en las branquias, con aproximadamente el 70% del total de organismos con erosiones ligeras. Sin

embargo, estas erosiones fueron constantes con prevalencias del 90 al 100%, desde mayo a noviembre (Fig. 13).

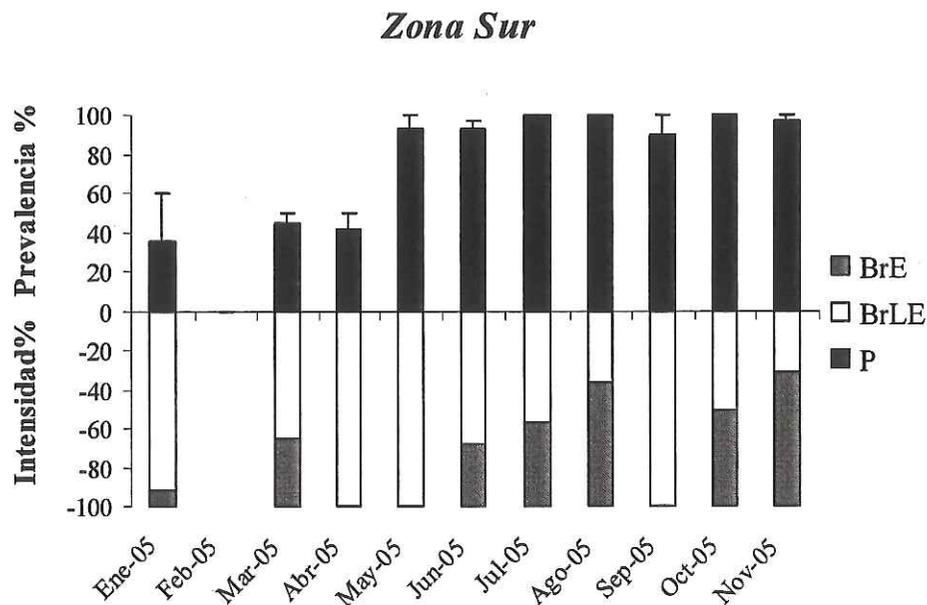


Figura 13. Prevalencia e Intensidad de las erosiones branquiales en la Zona Sur del estado de Sonora, durante el período de estudio.

Por otro lado, la zona centro mostró las mínimas prevalencias en marzo y abril con 10% y 32%, respectivamente (Fig. 14), pero con mayor grado de erosión branquial que en la zona sur. En este caso, la mayoría de los organismos mostraron inflamación branquial Ligera (BrLE) y no se observaron pústulas, ampollas u otras deformidades diferentes a las erosiones.

Si bien las gráficas 12 a la 14 muestran la tendencia descrita anteriormente, el análisis estadístico no paramétrico de Kruskal Wallis mostró que las diferencias entre zonas no son significativas ($H=1.04$, 2 g.l., $P=0.59$).

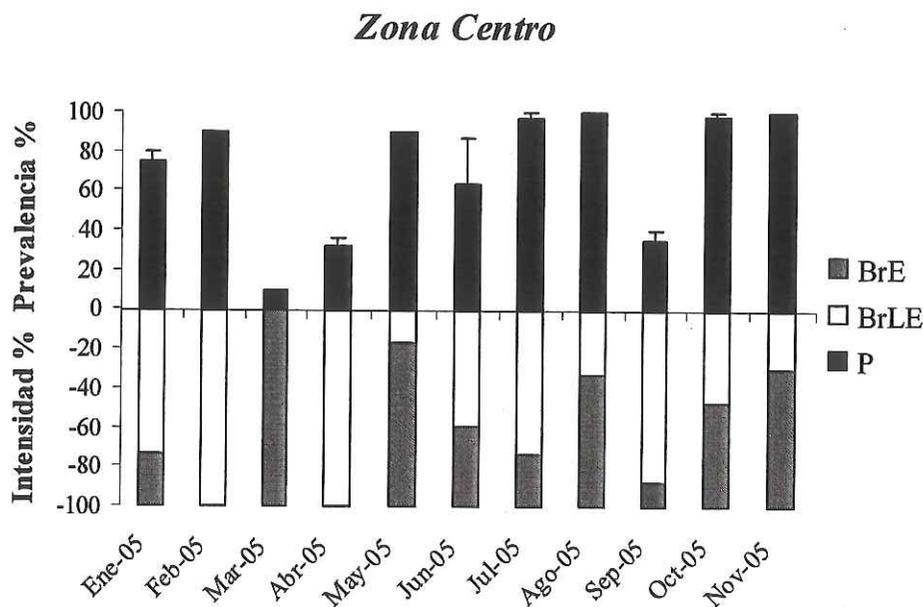


Figura 14. Prevalencia e Intensidad de las erosiones branquiales en la Zona Centro del estado de Sonora, durante el periodo de estudio.

IV.1.3. Sinaloa.

Para el área de cultivo de la Laguna de la Palmita, todos los ostiones revisados, tanto adultos (talla promedio de 11.3 cm) como juveniles (talla promedio de 4.5 cm), tenían erosiones branquiales con una prevalencia del 53 al 60%. En los ostiones adultos el 100% de intensidad correspondió a branquias ligeramente erosionadas (BrLE), mientras que en los juveniles, se encontró un 67% de intensidad en branquias ligeramente erosionadas (BrLE) y un 13% de intensidad de branquias erosionadas (BrE).

En la zona del Conchalito, se tuvo una prevalencia del 74% de ostiones con branquias erosionadas, de éstos el 88% tuvieron branquias ligeramente erosionadas (BrLE) y el 13% restante branquias erosionadas (BrE).

IV.2. Análisis histopatológico

En un ostión sano la indentación marginal y el canal marginal son uniformes y se corresponden con la figura 6a del análisis en fresco. A su vez, a nivel histológico, la estructura de los filamentos es uniforme con terminales alargadas, también uniformes, que forman la indentación marginal; se observa abundante secreción de mucus (mucopolisacáridos) por los mucositos (Mc) en el epitelio apical y las cámaras de agua (Ca) son amplias (Fig. 15A). En el tejido de una demibranchia ligeramente erosionada (BrLE) se observa un acortamiento de los filamentos centrales y una torsión hacia el centro del resto de los filamentos que macroscópicamente corresponde a una hendidura de la erosión (Fig. 6). También se aprecia una fusión de las terminales del filamento y una acumulación de hemocitos en los filamentos erosionados donde se hace evidente una inflamación, perdiéndose la arquitectura normal del tejido y además destrucción celular (necrosis) (Fig. 15D).

Con un mayor aumento, en un ostión sano (Fig. 15C), se observan las terminales del filamento alargadas, separadas entre sí y uniformes, hay una cantidad normal de hemocitos y las cámaras de agua son amplias. Contrario a esto, en un ostión con demibranchias ligeramente erosionadas (BrLE) (Fig. 15D), se observa acortamiento de las terminales apicales del filamento, fusión de las mismas y disminución o pérdida de las cámaras de agua. A mayor aumento, es evidente la fusión de las terminales de los filamentos (Fig. 15F), inflamación del epitelio por la acumulación de hemocitos, con la consiguiente pérdida de la estructura original (Fig. 15E), que en un ostión sano, se caracteriza por poseer un epitelio apical delgado con células mucosas y cilios en buen estado.

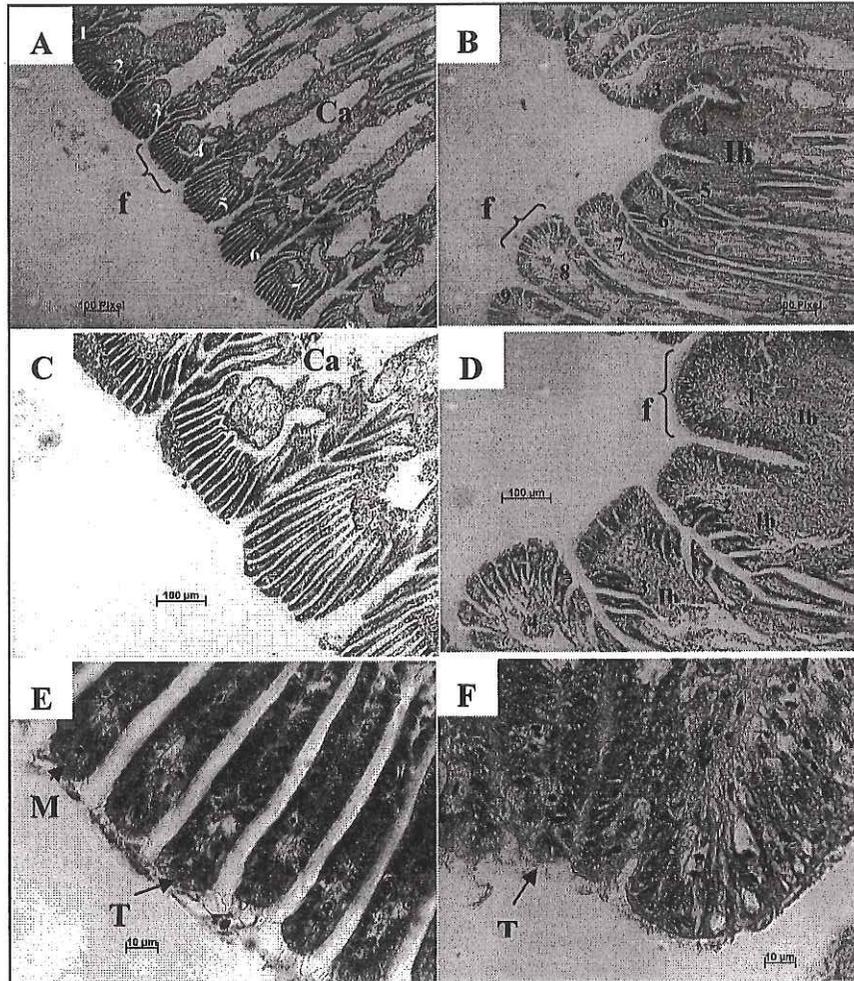


Figura 15. A) Comparación histológica de lamelas branquiales de *Crassostrea gigas* sano (A, C, E) y afectado por erosión branquial ligera (BrLE) (B, D, E). A) Vista general de 8 filamentos (f) con cámaras de agua amplias (Ca) y terminaciones normales (identación marginal) que macroscópicamente corresponden a un borde dorsal uniforme. B) Vista general de 9 filamentos, se aprecia la torción de los mismos hacia el centro y el acortamiento en los filamentos centrales (3, 4, 5), se muestra una infiltración de hemocitos (Ih). Estos cambios corresponden macroscópicamente a un borde ligeramente erosionado. En C y D con mayor aumento, en C se aprecian los filamentos delgados, una acumulación ligera de hemocitos y las cámaras de agua (Ca) amplias. En D, hay un acortamiento y engrosamiento de las terminales del filamento 4, en el 3 hay una acumulación y fusión de las terminales así como infiltración de hemocitos (Ih) que es más aguda en 2 y en 1 se ha perdido la estructura de la zona apical del filamento y hay necrosis. E) se observan las terminales de los filamentos (Tf) normales con mucositos (Mc) y estructura normal. F) ya hay fusión y engrosamiento de las terminales de los filamentos, característicos de una erosión ligera (BrLE). Cortes a 5 μ m. Tinción HE.

En un ejemplar con branquias erosionadas, los cambios son más conspicuos, se observa una inflamación severa y la destrucción del tejido (necrosis), los filamentos se fusionan por completo y se van acortando por la pérdida de tejido. Hay vacuolarización y se observan abundantes células con núcleos picnóticos (Figs. 16A-D).

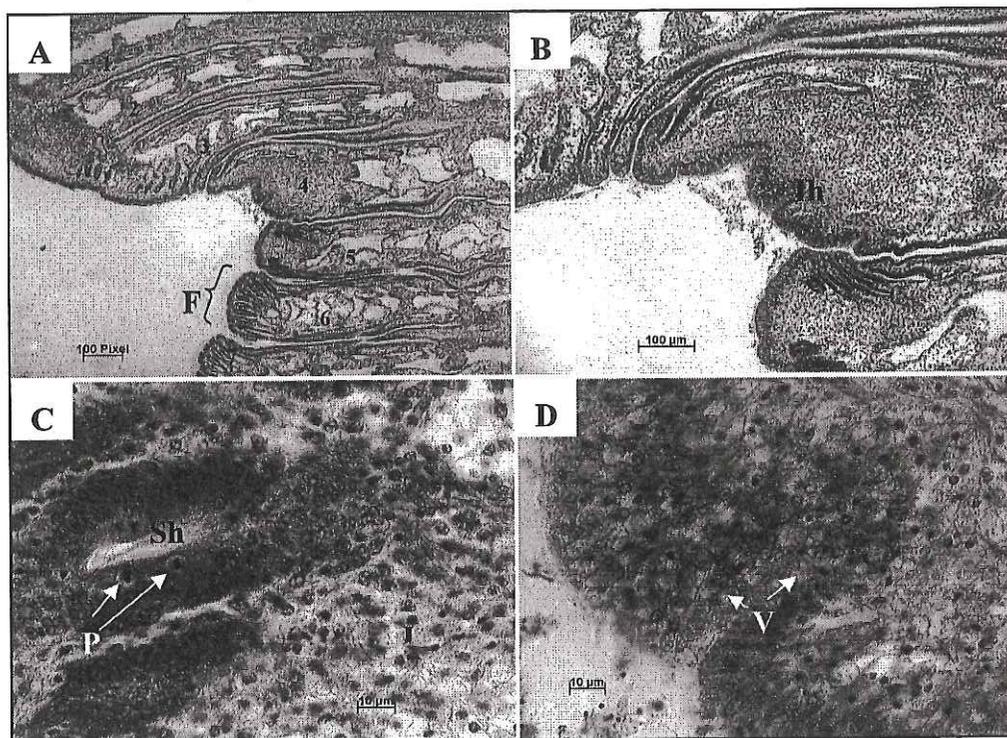


Figura. 16. Lamelas dorsales branquiales erosionadas de *Crassostrea gigas*. A) Vista panorámica en donde se han fusionado los filamentos (F) 1, 2, 3 y 4, las terminales de los filamentos 5, 6 y 7 están en proceso de degeneración. En B se observa la infiltración de hemocitos (Ih) y destrucción de la estructura normal del borde branquial (Necrosis). La imagen en C muestra la infiltración de hemocitos (inflamación) y la obstrucción del seno hemolinfático de los filamentos (Sh), así como picnosis nuclear (P) y figuras mitóticas. En D se aprecia el borde del filamento totalmente inflamado y degenerado con abundantes vacuolas (V). Cortes a 5 µm. Tinción HE.

En un corte transversal de una demibranchia erosionada se observa la fusión de las plicas, la pérdida de las cámaras de agua (Ca) y tubos de agua (Ta) y la pérdida de la estructura del tejido (Fig. 17).

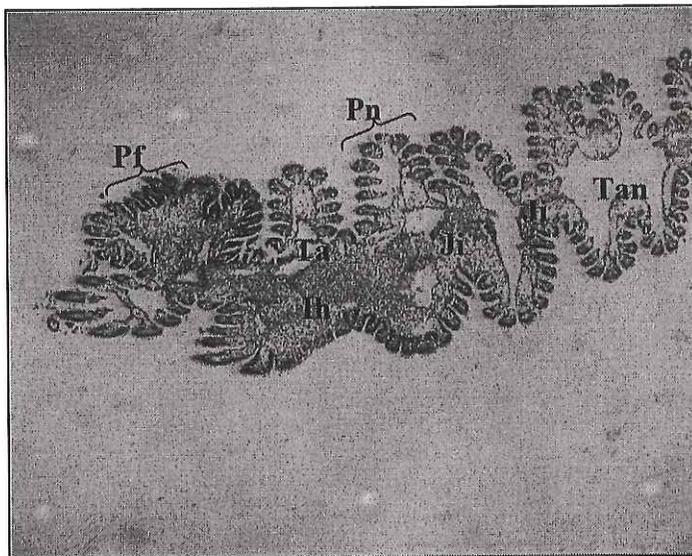


Figura 17. Corte transversal de un filamento erosionado en donde se aprecian las plicas normales (Pn) y plicas fusionadas (Pf) en la zona apical donde también hay una fuerte infiltración de hemocitos y deformación del tejido, las juntas interlaminares (Ji) están deformadas. Los tubos de agua (Ta) en la zona afectada han desaparecido o se han reducido, Mientras que en la zona normal, los tubos de agua son amplios y normales (Tan) y las juntas interlaminares se ven normales (Ji). Corte a 5 μ m. Tinción HE.

IV.3. Análisis histológico de otras lesiones en las branquias.

En un organismo se observaron focos de desarrollo bacteriano en el seno de la hemolinfa del filamento de la plica (Fig. 18). El desarrollo bacteriano fue importante pero no se observó activación de los mecanismos de defensa del ostión (infiltración hemocitaria). Tampoco se observaron erosiones externas de la plica o el filamento aunque las paredes del seno de hemolinfa se ven destruidas.

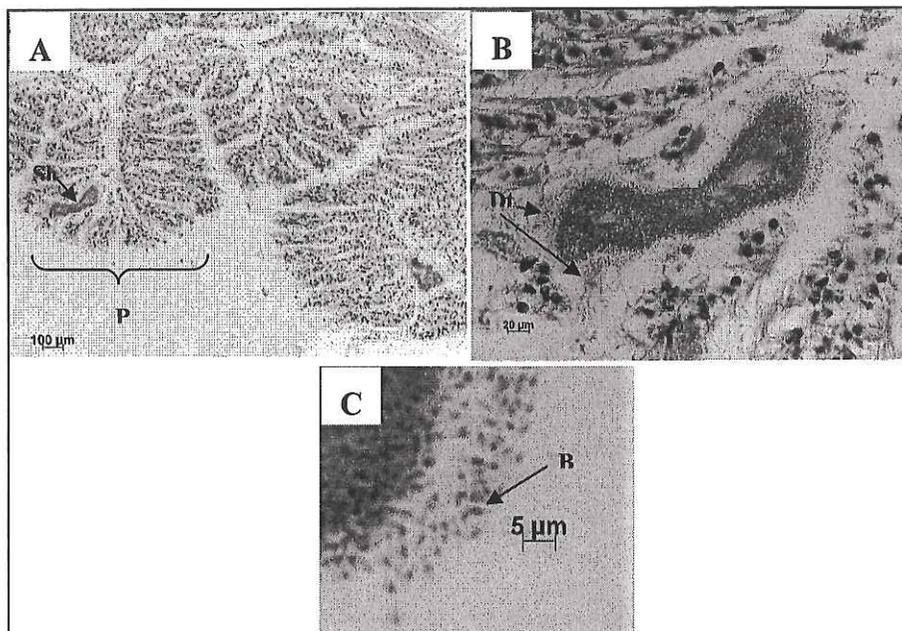


Figura 18. Bacterias en *Crassostrea gigas*. A) Foco de un desarrollo de bacterias en el seno de la hemolinfa (Sh) del filamento de la plica (P) en la demibranchia (vista transversal). B) Ampliación del foco de desarrollo de bacterias donde se aprecia la destrucción del tejido (Dt) pero no se aprecia reacción del hospedero. C) Acercamiento de bacterias con reacción de tinción granulosa (B). No se aprecia erosión branquial. Corte a 5 µm. Tinción HE.

IV.4. Carga parasitaria.

IV.4.1 Hipertrofia gametocítica viral.

El análisis del tejido gonadal permitió detectar características celulares que indican hipertrofia gametocítica, es decir, células reproductivas hipertrofiadas asociadas a una reacción hemocitaria por parte del hospedero (Fig. 19 A-D).

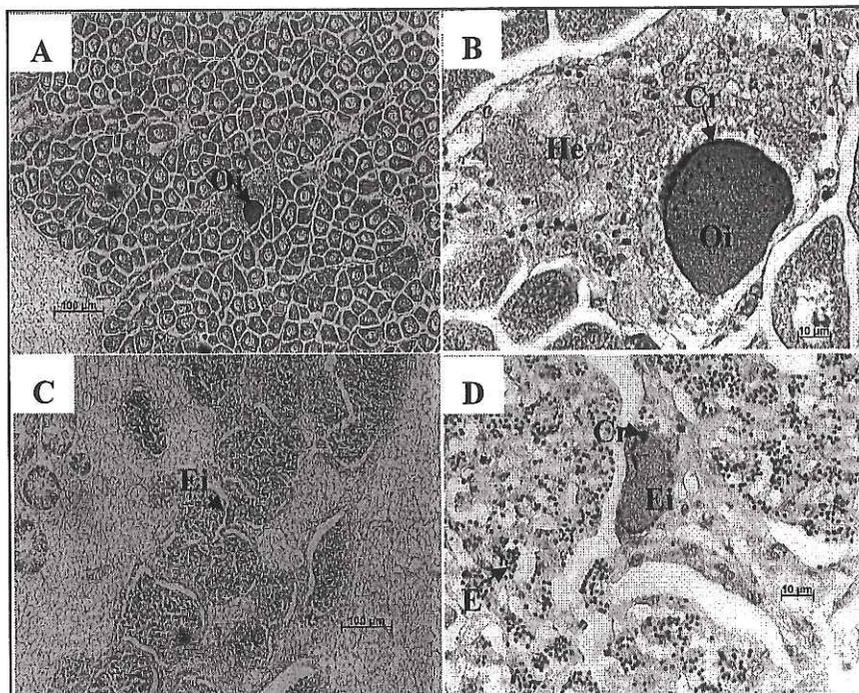


Figura 19. Tejido gonadal de *Crassostrea gigas* adulto infectado con HGVP. A) Imagen panorámica de la gónada de una hembra madura en donde se aprecia un ovocito hipertrofiado (Oi) y una reacción hemocitaria a su alrededor, el resto de los ovocitos maduros se observan en buen estado. B) Acercamiento del ovocito hipertrofiado y rodeado por hemocitos (He), en el ovocito se aprecia acumulación de cromatina (Cr), presumiblemente asociada a la presencia del papilomavirus C) Imagen panorámica de la gónada de un macho en proceso de reabsorción, en donde se aprecia un espermatocito hipertrofiado (Ei). D) Acercamiento del espermatocito hipertrofiado en donde también se aprecia una reacción hemocitaria. Las espermátidas (E) en el folículo están proceso de reabsorción. Corte a 5 μ m. Tinción HE.

IV4.2. Protozoos.

Se encontraron tricodinas en los canales de agua de las branquias, en el epitelio marginal y en el epitelio del manto, sin evidencias de alteraciones en los tejidos (Fig. 20 A-B). También se encontraron ciliados tipo *Ancistrocoma* en el lumen de los divertículos digestivos y entre las células epiteliales columnares ciliadas, comprimiéndolas hacia los lados, no se observó reacción hemocitaria por parte del hospedero (Fig. 21 A-B). A partir de noviembre de 2004 se detectó un protozoario parecido a *Marteilia* sp., en una fase de esporulación. Este protozoario libera microcélulas o esporas individuales en el lumen del

estómago e intestino; se aloja principalmente en las células epiteliales de la glándula digestiva, en donde se asocia con secreciones de mucopolisacáridos e hiperplasia del tejido. En las branquias y el manto, se observaron células con abundantes secreciones de mucopolisacáridos así como formas esporuladas del parásito. Sin embargo, como se verá más adelante, la identificación con pruebas de ADN no ha sido concluyente y hace falta secuenciar su ADN para corroborar su identidad; adicionalmente, la presencia de microcélulas también lo diferencian de *Marteilia* sp. o representan una forma atípica de este parásito (Fig. 22).

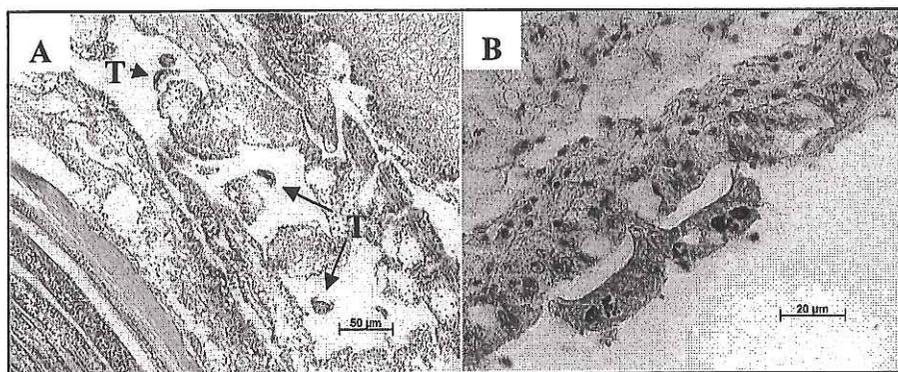


Figura 20. A) Imagen panorámica de un filamento branquial de *Crassostrea gigas* en donde se aprecian tricodinas (T) dentro de los tubos de agua. B) Tricodinas adheridas a células epiteliales del manto. Cortes a 5µm. Tinción HE.

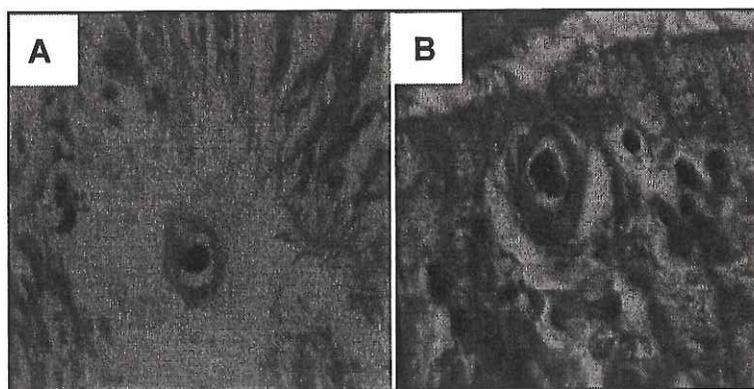


Figura 21. Ciliados tipo *Ancistrocoma* en el tubo digestivo de *Crassostrea gigas*. A) ciliado en el lumen del divertículo digestivo. B) ciliado entre las células epiteliales del epitelio columnar de un divertículo digestivo en donde se aprecia la compresión de las células adyacentes. Corte a 5µm. Tinción HE.

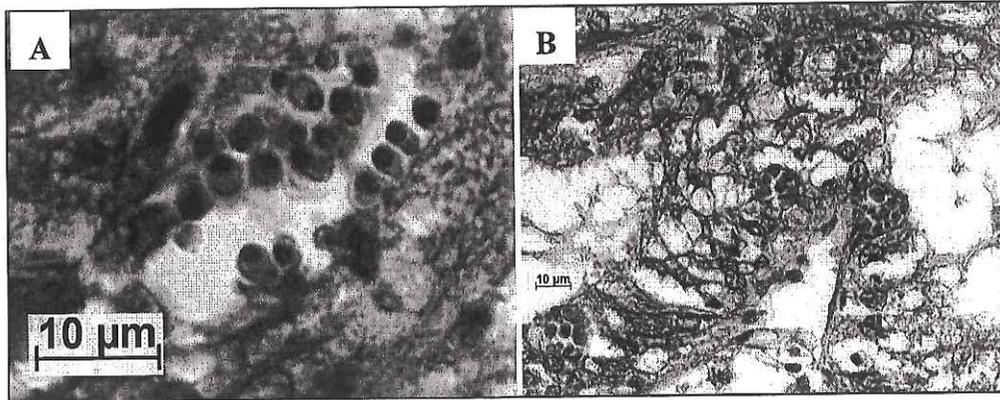


Figura 22. A) Protozoario esporulado X (PEX) en intestino de *Crassostrea gigas* adulto en donde se aprecia entre las células epiteliales columnares ciliadas una estructura ovoide con unas 30 microcélulas o esporas, que podrían representar una forma atípica de *Marteilia* sp. B) Ducto digestivo donde se aprecian cuatro estructuras tipo esporonte parecidas a *Marteilia* sp. entre las células epiteliales columnares. Corte a 5µm. Tinción HE.

IV.4.3. Metazoos.

Se encontraron diversos metazoos encapsulados en el tejido conectivo del ostión Japonés (Tabla IV y Fig. 23), el grado de destrucción de estos organismos por los fagocitos del hospedero impidieron su identificación. Sólo se observaron restos de estructuras quitinosas propias de los crustáceos, presumiblemente copépodos y ácaros. En algunos casos, la presencia del metazoo resultó en una inflamación severa y en la destrucción del tejido (Fig. 23C). En otros, los metazoos se introdujeron en el tracto digestivo o en los folículos reproductivos, obstruyendo dichos tejidos (Fig. 23B).

Tabla IV. Carga parasitaria del ostión Japonés *Crassostrea gigas* cultivado en las diferentes localidades estudiadas. Se indica el tejido afectado y la severidad del daño.

Año	Origen	Parásito	Tejido afectado	Daño
Feb-2005	Baja California	Trematodos	Manto.	Moderado
		Tricodinas	Branquias.	Nulo
Mar-2005	Sonora	Metazoo	Intestino, glándula digestiva	Moderado
	Baja California	Trematodos	Manto.	Moderado
		Tricodinas	Branquia	Nulo
Abr-2005	Sonora	Metazoos	Glándula digestiva, intestino	Moderado
		Trematodo	Intestino	Moderado
	Sonora	Metazoo	Glándula digestiva	Moderado
May-2005	Sonora	Ancistrocoma	Glándula digestiva	Nulo
		Metazoo	Intestino	Moderado
		Gusano helminto	Estómago	Moderado
Jun-2005	Sonora	Metazoo	Glándula digestiva, intestino	Moderado
Ago-2005	Sonora	Metazoo	Glándula digestiva, intestino	Moderado
		Tricodinas	Branquia	Nulo
		Ancistrocoma	Glándula digestiva	Nulo
Nov-2005	Sonora	Metazoo	Glándula digestiva, intestino	Moderado

IV.4.4. Trematodos

Se detectaron gusanos helmintos de la Clase Trematoda, principalmente como metacercarias enquistadas (Fig. 24 A-D) con las ventosas características que los distinguen de la planarias. No se observó una reacción hemocitaria en torno a los quistes aunque estos pudiesen estar inmersos en el tejido conectivo aledaño a las branquias o a la glándula digestiva. Tampoco se observó una respuesta de los mecanismos de defensa del hospedero en los casos en que los quistes estuvieron obstruyendo un seno linfático (Fig. 24 B). En un caso se observó una metacercaria libre en el lumen del intestino de un ostión, sin que ésta estuviese adherida al epitelio o se apreciara otro tipo de reacción o daño (Fig. 24 E).

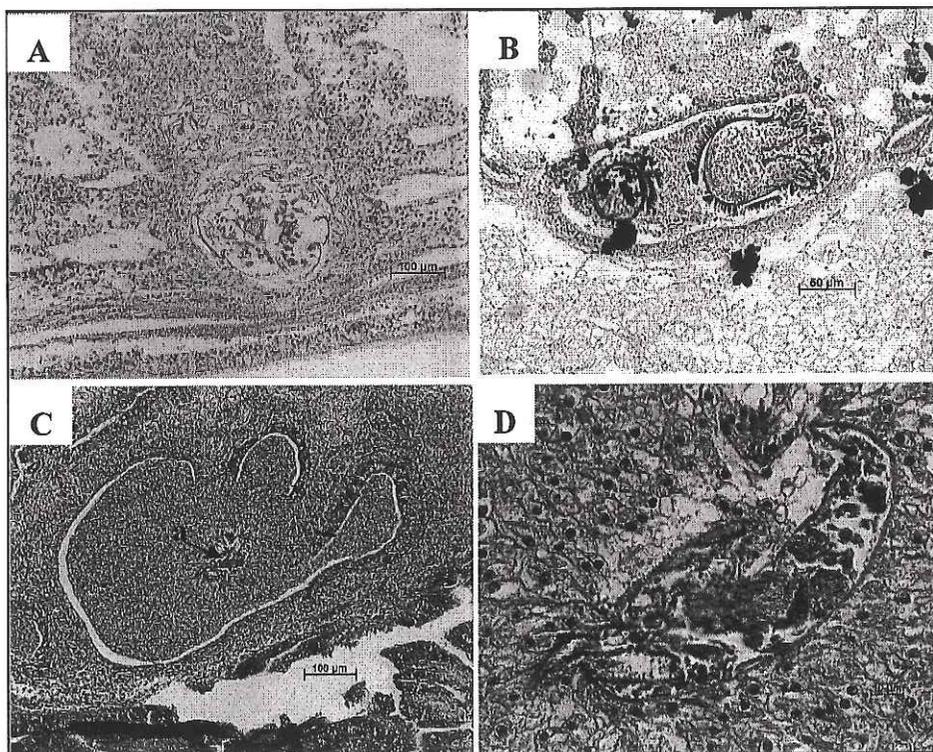


Figura 23. Diferentes metazoos en *Crassostrea gigas*. A) Copépodo insertado en tejido branquial, en donde ha provocado una ruptura y una severa infiltración hemocitaria. B) Crustáceo dentro de un folículo reproductivo. El folículo está distendido y hay una reacción hemocitaria a su alrededor. El crustáceo está degradándose. C) Vista panorámica de un presunto ácaro (a) en tejido branquial en donde se observa una fuerte reacción hemocitaria y destrucción del tejido. D) Detalle de los restos del presunto ácaro, en proceso de degradación por los hemocitos que lo encapsulan. Corte a 5 μ m. Tinción HE.

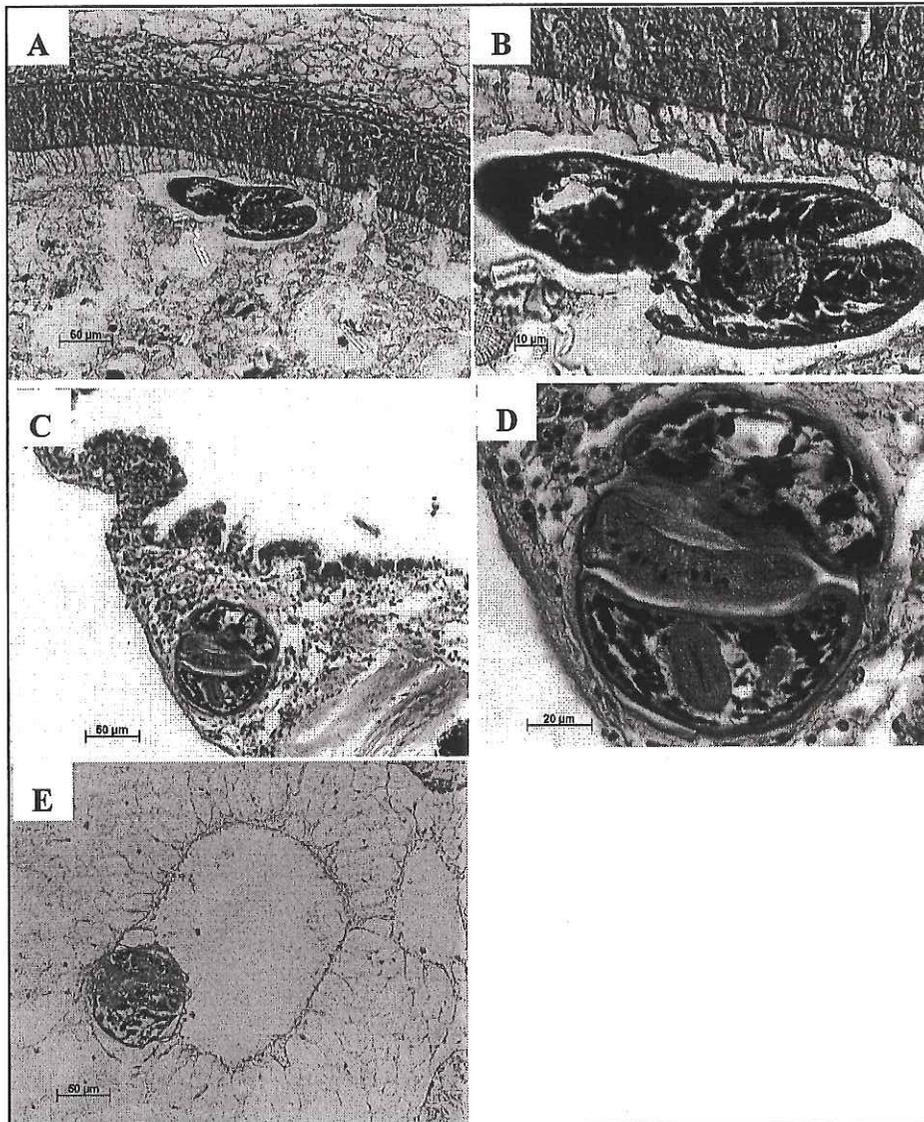


Figura 24. A) Estadio larval de un trematodo en el lumen del estómago de *Crassostrea gigas*. B) Acercamiento de la imagen anterior en donde se aprecia las ventosas características (v). C) Quiste de metacercaria de trematodo en tejido conectivo de la base de la branquia. D) Detalle del quiste en donde se aprecia la pared del mismo con las ventosas características (v), no se aprecia reacción de los mecanismos de defensa del hospedero. E) Quiste de trematodo en el borde de un seno linfático, tampoco se aprecia reacción hemocitaria. Cortes a 5µm. Tinción HE.

IV.5. Análisis bacteriológico

Del aislamiento de bacterias realizado en los ostiones estudiados, durante el episodio de mortalidad que se presentó en julio de 2002 en Bahía San Quintín, se obtuvieron tres colonias. Las tres colonias mostraron forma de bacilo corto con extremos curvos, con un tamaño aproximado de 2µm y fueron Gram negativas. Todas las colonias fueron positivas a la prueba de la citocromo oxidasa, no así para la catalasa, donde las colonias (a) y (b) fueron positivas y la (c), negativa.

Utilizando el Kit de identificación rápida API20NE, dos de las colonias fueron identificadas como *Aeromonas* spp. La tercera colonia no se pudo caracterizar por no contar con el suficiente inóculo para las pruebas. Los resultados de la caracterización fisiológica, para las colonias (a) y (b) se resumen en la Tabla V.

Las colonias identificadas como *Aeromonas* spp. crecieron en medio TCBS, resultaron positivas para la producción de ácido a partir de la utilización de la sacarosa. Por otro lado, no fueron sensibles al agente vibriostático 0/129, presentaron movilidad y además crecieron en medios preparados con NaCl al 3 y 6% (Vásquez-Yeomans *et al.* 2004b, Apéndice V).

IV.6. Microscopía electrónica de transmisión

El resultado del análisis de microscopía electrónica de transmisión de tejido branquial erosionado de ostiones adultos recolectados en Bahía Falsa, Baja California en el 2000, confirmó la presencia de un virus (Fig. 25).

Tabla V. Caracterización fisiológica de las colonias bacterianas (a y b) identificadas como *Aeromonas* spp. de acuerdo al kit de identificación rápida API20NE.

Prueba	Resultado
Utilización de:	
Citrato	Negativo
Glucosa	Positivo
Manitol	Positivo
Sorbitol	Negativo
Ramnosa	Negativo
Sacarosa	Positivo
Melibiosa	Positivo
Arnigdalina	Positivo
Arabinosa	Negativo
Enzimas:	
Hidrolisina ONPG	
Arginina dihidrolasa	Positivo
Lisina descarboxilasa	Negativo
Ornitina descarboxilasa	Negativo
Ureasa	Negativo
Triptófano desaminasa	Negativo
Gelatinasa	Positivo
Movilidad	Positivo
Producción de:	
H ₂ S	Negativo
Indol	Positivo
Acetoína (Voges Proskauer)	Negativo
Oxidación de la glucosa	Positivo
Fermentación de la glucosa	Positivo

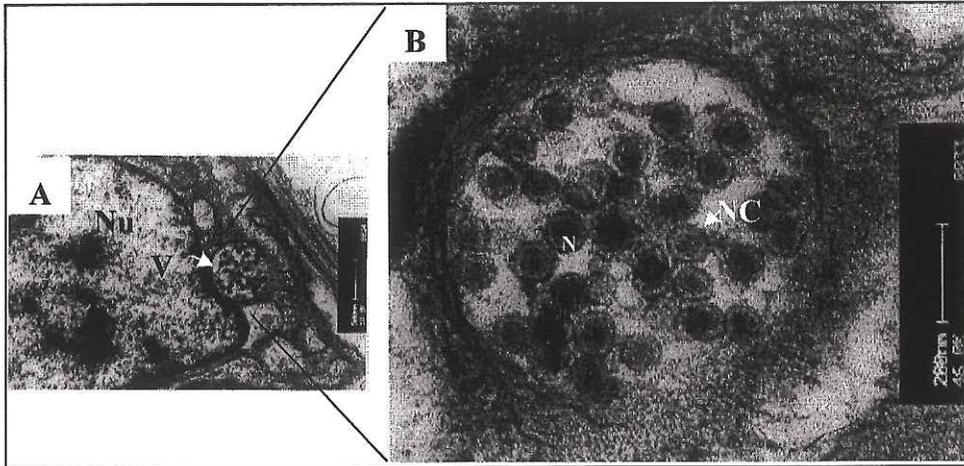


Figura 25. A) Partículas virales en una extensión del núcleo (Nu) o en una vacuola (V) de la célula infectada en el ápice del tejido branquial erosionado de *Crassostrea gigas*. B) Acercamiento de las partículas virales en donde se aprecia la nucleocápside (NC) y el núcleo (N), el arreglo de los capsómeros es hexagonal-pleomórfico. Esta morfología es característica de Herpes virus. Escala 200 nm.

Las partículas virales tienen un diámetro aproximado de 60 a 100 nm. La Nucleocápside está rodeada por una cubierta de material globular, que está distribuido asimétricamente. La envoltura que rodea a las nucleocápsides fue impermeable a la tinción. Frecuentemente se encontraron partículas virales incompletas, que corresponde a las cápsides sin envoltura, algunas tuvieron un tamaño variable y una pared muy delgada. El núcleo de los viriones es ahuecado y fibroso envolviendo a la molécula de ADN de doble cadena. No se encontraron partículas virales en los núcleos de la célula, ni viriones en el citoplasma.

La anterior descripción confirma la presencia de herpesvirus en los ostiones cultivados en Baja California (Vásquez-Yeomans *et al.*, 2004a; Apéndice VI).

IV.7. Detección del herpesvirus por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Se detectó al herpesvirus con la técnica de PCR en tejido de branquias almacenadas en congelación (-20°C) del muestreo de julio del 2002, se detectó al herpesvirus con la técnica

de PCR en la Bahía de San Quintín (Tabla II). Este muestreo coincidió con un episodio de mortalidad de ostiones de talla juvenil.

En las muestras de branquias almacenadas en etanol al 96% no se pudo obtener ADN, principalmente por encontrarse degradado.

Para el año 2005, se detectó de nuevo al herpesvirus en ostiones juveniles del Estero La Cina y Bahía Kino en Sonora, en la semilla de ostión de la Laguna de la Palmita en Sinaloa y en la semilla de Bahía San Quintín en Baja California (Fig. 26).

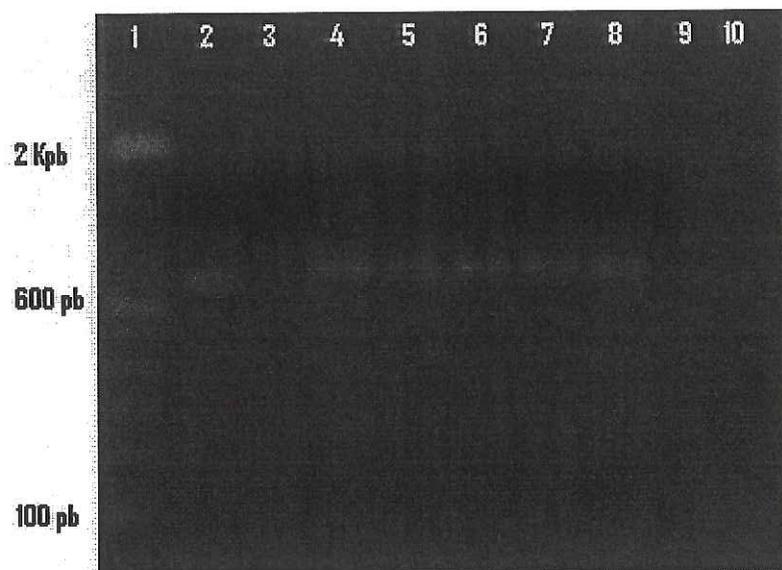


Figura 26. Detección del Herpesvirus del Ostión (OsHV-1) por medio de PCR en *Crassostrea gigas* de los estados de Baja California, Sonora y Sinaloa. Carril 1) Marcador de peso molecular de 0.1 a 2 Kpb (Invitrogen); 2) Control positivo (ADN genómico viral, 1 ng por reacción); 3) Control negativo (agua grado biología molecular estéril); 4) Muestra positiva de ostión juvenil de Bahía San Quintín, B. C. (2002); 5) Muestra positiva de ostión juvenil de Bahía Kino, Son. (2005); 6) Muestra positiva de ostión juvenil de Estero La Cina, Son. (2005); 7) Muestra positiva de semilla de ostión del Estero La Palmita, Sin. (2005); 8) Muestra positiva de semilla de ostión de Bahía San Quintín, B. C. (2005).

Este virus corresponde al mismo que se encontró en los cultivos de semilla y juveniles de ostión en Francia desde 1992 y que se denominó Herpesvirus-1 del ostión (OsHV-1).

Como se mencionó en la metodología, la sensibilidad de esta técnica mostró que la concentración mínima de ADN genómico para obtener un producto de PCR detectable por electroforesis fue de 12.6 pg/ μ L.

IV.8. Detección del Protozooario esporulado X (PEX) por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

Dado el parecido del PEX con el protozooario *Marteilia* sp. se probó la técnica de PCR, utilizando los iniciadores ITS1-4 e ITS1-5 (Le Roux *et al.*, 2001) diseñados para éste último y que son referidos por la Organización Mundial de Salud Animal (OIE).

Con estos iniciadores no se detectó la presencia de este protozooario en muestras de ADN purificado de glándula digestiva de ostión.

V. DISCUSIÓN

Con el presente estudio se tiene una evaluación general de la carga parasitaria del ostión Japonés cultivado en el Noroeste de México durante la ocurrencia de episodios de mortalidades masivas. Las características de los parásitos encontrados y su interacción conocida con el hospedero han permitido hacer una valoración de la posible asociación de los mismos con estos episodios. En este sentido, se discute la relación que existe entre cada grupo de parásitos encontrados y la alteración histopatológica relacionada y su posible participación como agentes causales de mortalidades. De esta forma, se les puede catalogar por su patogenicidad potencial (capacidad para inducir mortalidades en su hospedero).

Los protistas ciliados parecidos a *Ancistrocoma*, son comunes en los moluscos bivalvos como *Crassostrea gigas*, *Crassostrea angulata* y *Mytilus* spp. Estos ciliados también se conocen como ciliados del tracto digestivo de los ostiones. La especie más común es *Stegotricha enterikos*, aunque hay diferentes especies, la mayoría no identificadas. Pueden ser encontrados en ostiones del género *Crassostrea* y *Ostrea* y se han encontrado en ambas costas de Norteamérica. Viven en el lumen de la glándula digestiva incluyendo túbulos y ductos (Cheng, 1967, Bower *et al.*, 1994 y Cáceres-Martínez y Vasquez-Yeomans, 2001). Pauley *et al.* (1967) describieron cierta respuesta de los mecanismos de defensa del hospedero y sugieren que en infecciones intensas pueden afectar al hospedero bajo condiciones ambientales adversas. Sin embargo, no se han descrito patologías específicas asociadas a su presencia, tal como ocurrió en este estudio (Fig. 20) y no se han asociado a eventos de mortalidades masivas, además tampoco son consideradas por la OIE como infecciones meritorias de certificación (OIE, 2005).

Con relación al PEX y su parecido con *Marteilia* spp. es importante señalar que dentro de los protistas existen diferentes grupos de importancia crucial para los moluscos, entre ellos Paramyxia (Anderson y Lester, 1992) al que pertenece el género *Marteilia*. Este género, contiene a *Marteilia refringens* y *Marteilia sydney*, que se han considerado responsables de los mayores episodios de mortalidades masivas de *Ostrea edulis* en Europa y de *Saccostrea glomerata* en Australia, por lo que han incluido por la Organización Mundial

de Salud Animal (OIE) como agentes causales de enfermedades de notificación obligatoria (OIE, 2005). El ostión del Pacífico *Crassostrea gigas* se ha considerado como una especie más resistente a la Marteiliosis y por lo que se han seleccionado para reemplazar a *O. edulis* en las zonas afectadas por la mortalidad en Francia. El no tener resultados concluyentes del análisis por PCR para *Marteilia* spp. y de la carencia de la secuenciación correspondiente, nos hacen sospechar, basado en la revisión histopatológica, que se trata de una variedad aún no descrita o una forma atípica de *Marteilia* spp. El haberlo encontrado persistentemente y asociado a daños titulares, obligan a identificarlo y estudiarlo detalladamente para definir su potencial patogénico. De hecho, al no conocer sus estadios de desarrollo, para una cuantificación relativa que hubiera permitido evaluar su prevalencia e intensidad, se decidió establecer su presencia o ausencia. Las muestras histológicas permitirán su análisis detallado posteriormente.

Las tricodinas (*Trichodina* spp.) se han registrado en Europa, Estados Unidos y en general en la cuenca del Pacífico. Estos ciliados se adhieren al manto, palpos labiales o branquias. La mayoría de estas infestaciones son inocuas a baja intensidad, sin embargo, infestaciones severas de tricodinas en el ostión Portugués *Crassostrea angulata*, en Francia, se asociaron con erosiones de los filamentos branquiales. Posteriormente, en Francia, se concluyó que las tricodinas fueron invasores secundarios en ostiones infectados por el iridovirus, agente causal de la necrosis branquial en el ostión Portugués (Besse, 1968; Comps, 1988 y Bower *et al.*, 1994). Adicionalmente, Cáceres-Martínez y Vásquez-Yeomans (2003) encontraron una asociación similar entre la presencia de branquias erosionadas y la prevalencia e intensidad de Tricodinas en *C. gigas* cultivado en Bahía Falsa, Baja California. En este estudio no se encontró esta asociación, ya que las tricodinas sólo se observaron en una sola ocasión (Tabla IV) y a pesar de que las erosiones branquiales fueron persistentes y con intensidades importantes durante el mismo, tampoco hubo evidencias de un iridovirus.

La presencia de metazoos que obstruyeron el tracto digestivo o los folículos reproductivos en *Crassostrea* spp. y otras especies de moluscos bivalvos, así como el hecho de que algunos pueden perforar los tejidos internos del hospedero, induciendo procesos de encapsulación ha sido bien documentado (Cáceres-Martínez *et al.*, 1996; Cáceres-Martínez

y Vásquez-Yeomans, 1997; Cáceres-Martínez y Vásquez-Yeomans, 1999; Cáceres-Martínez *et al.*, 2000; Cole y Savage, 1951; Dinamani y Gordon, 1974; Dare, 1981 y Do y Kajihara, 1986;). Entre estos metazoos encontramos copépodos tales como *Mytilicola intestinalis*, *M. orientalis*, *Pseudomyicola spinosus*, *Modiolicola gracilis*, ácaros como *Hyadesia* sp. y *Copidognathus*. La asociación de la presencia de este tipo de organismos con los daños en sus hospederos y su relación con episodios de mortalidades masivas han sido inciertos y más bien se han asociado con una disminución en el índice de condición, un crecimiento pobre y la interrupción del proceso reproductivo, pero sólo en casos muy puntuales y no exentos de controversia, se han asociado con ciertas mortalidades; por ejemplo, en 1995 se asoció una mortalidad masiva de almejas areneras a la presencia de un copépodo Mycolioideo, sin que esto haya sido demostrado (Ho, 1995). En este trabajo, la ocurrencia de metazoos en el ostión Japonés fue muy baja y si bien el daño en el tejido a nivel individual puede parecer intenso (Figura 23), su escasa presencia y los estudios sobre su dudoso papel como agentes causales de mortalidades, hacen que estos hallazgos difícilmente se puedan considerar relevantes en las mortalidades del ostión Japonés ocurridas en el Noroeste de México. La OIE no considera a este tipo de organismos como importantes en el contexto de la certificación sanitaria (OIE, 2005).

Con respecto a los trematodos, es importante señalar que la presencia de metacercarias en los moluscos bivalvos, es relativamente común; entre ellos encontramos miembros de las familias Bucephalidae, Sanguinicolidae, Monorchiiidae, Psilostomatidae entre otras y tienen efectos patológicos en sus hospederos (Lauckner, 1983 y Bower *et al.*, 1994). Su distribución es cosmopolita aunque a nivel de especies probablemente tienen una distribución definida. Su efecto en los hospederos está determinado por la especie de trematodo, de hecho, en éste estudio no se encontraron evidencias de activación de los mecanismos de defensa de *Crassostrea gigas* y su ocurrencia, fue muy puntual. Sin embargo, hay que destacar que los trematodos como *Proctoeces maculatus* pueden producir lo que se conoce como castración por trematodos en los mejillones del género *Mytilus* (Feng, 1988 y Bower *et al.*, 1994). En *Crassostrea gigas* se ha encontrado a *Gymnophalloides tokiensis* en Japón, con prevalencias de casi el 100% e intensidades

promedio de hasta 400 metacercarias por ostión, que causan una condición desmejorada y debilitan al hospedero (Lauckner, 1983). En términos sanitarios, siempre es más conveniente no contar con este tipo de parásitos evitando la introducción de especies a cultivar sin certificar, aunque, como en el caso anterior, la OIE tampoco considera a este tipo de parásitos como un riesgo importante y en este estudio no hay evidencias de que este tipo de parásitos tenga relación directa con las mortalidades de la zona. Curiosamente estos parásitos pueden inducir la formación de perlas en *Mytilus californianus* (Cáceres-Martínez y Vásquez-Yeomans, 1999).

La hipertrofia gametocítica viral, también conocida como ovocistis es causada por un virus tipo papillomavirus de la familia de los Papovaviridae. Se han encontrado en *Crassostrea virginica*, *Saccostrea commercialis*, *C. rhizophorae*, *Ostrea lurida* y su presencia en *C. gigas* no estaba aún confirmada (Farley 1978, 1985). En el 2001 se registró por primera vez en Francia (García *et al.*, 2006). En este estudio se confirmó la presencia de esta infección a nivel histopatológico. El impacto que hasta ahora se ha registrado en el hospedero es que causa hipertrofia de gametos individuales y del epitelio germinal, la respuesta del hospedero no es muy severa, los registros de su prevalencia han sido bajos y no se ha asociado con eventos de mortalidad importantes (Bower *et al.*, 1994). Esta información coincide con los resultados obtenidos en este estudio. Sin embargo, estudios reciente sobre esta infección especulan sobre un posible potencial patogénico no considerado antes (García *et al.*, 2006). Esta infección se ha registrado en la costa Atlántica de Canadá, en las costas Este y Oeste de EUA, en Francia, Corea y Japón (Bower *et al.*, 1994) y ahora en el Noroeste de México.

Como se mencionó anteriormente, las erosiones branquiales encontradas en *Crassostrea angulata* cultivado en Francia en los años 60's, se asociaron con la presencia de un iridovirus (Comps y Duthoit, 1976). En el verano de 1967, se presentaron mortalidades inusuales en las poblaciones del ostión portugués *Crassostrea angulata* de la costa atlántica de Francia. Estudios posteriores revelaron la existencia de lesiones en las branquias y algunas veces en los palpos labiales. La aparición sucesiva de este fenómeno se denominó, convenientemente, la "enfermedad de las branquias" (Marteil, 1969). En abril y mayo de

1969, Alderman y Gras (1969) registraron elevadas mortalidades en el ostión *C. angulata*, importada de Portugal a Bretaña. Los síntomas que mostraron los ostiones coincidieron con los encontrados en 1967: una alteración progresiva del contorno de la branquia, donde se observó una hendidura, además de la presencia de una o más manchas amarillas; posteriormente la lesión afectó a varias lamelas branquiales, destruyéndolas. Comps (1970) realizó uno de los estudios más completos para conocer la evolución y la sintomatología de la “enfermedad de las branquias” observó la presencia de organismos polimórficos, representados en forma de grandes células frecuentemente asociadas con pequeñas células muy cromófilas. Pero fue hasta 1976 cuando Comps y colaboradores, observaron en cortes histológicos la presencia de un virus a nivel del tejido conjuntivo de la glándula digestiva de *C. angulata*. Las células tenían una apariencia globosa con inclusiones muy densas en el citoplasma y con finas granulaciones en la periferia. Las imágenes de la microscopía electrónica mostraron una zona con partículas virales en la periferia, de forma hexagonal y con un diámetro de 450 nm en promedio. Por las características morfológicas mostradas y en particular, por su modo de desarrollo, lo relacionaron íntimamente con el grupo de los iridovirus.

Estos resultados indicaron que las células gigantes polimórficas eran células infectadas por este virus. A partir de entonces esta enfermedad se conoce como “Enfermedad de Necrosis Branquial por Virus” o “GNV”. Posteriormente se encontró una sintomatología similar en *C. gigas*, aunque a esta especie se consideró más resistente a la presencia de este virus (Comps y Duthoit, 1976; Comps y Bonami, 1977). En México, a partir de la información de la GNV y de estudios previos en la Bahía de San Quintín, Baja California iniciados en 1997 (Macías-Montes de Oca, 1998) con muestreos dirigidos a conocer la carga parasitaria del ostión japonés cultivado en esa zona y que permitió continuar con estas investigaciones, enfocándolas al estudio de las características clínicas en los ostiones afectados por las mortalidades tanto en Bahía San Quintín, como en otras localidades de los estados de Sonora y Baja California Sur.

Nuevamente se encontraron las lesiones branquiales similares a las descritas para la GNV y adicionalmente se observó la inflamación, necrosis branquial en algunos casos y células

con núcleos picnóticos. También se observaron procesos de cicatrización en las zonas apicales de las branquias afectadas. Su observación por microscopía electrónica de transmisión mostró la presencia de bacterias asociadas al tejido infectado y un análisis detallado de las imágenes demostró también la presencia de un virus tipo herpes dentro de las células del tejido branquial inflamado (Vásquez-Yeomans *et al.*, 2004a).

Con relación a las bacterias encontradas hay que mencionar que a través de los años 60 y hasta la actualidad, en los cultivos de ostión Japonés en diferentes partes del mundo, se han presentado mortalidades masivas durante los meses de verano, cuando la temperatura del agua excede los 20 °C (Friedman *et al.*, 1991). La mayoría de los estudios enfocados a determinar la causa de estas mortalidades refieren a las bacterias como los posibles agentes causales. Entre las principales enfermedades ocasionadas por bacterias en *Crassostrea gigas* destacan la vibriosis (*Vibrio splendidus*, *Vibrio* spp.), nocardiosis (*Nocardia* sp., bacteria actinomiceta) y la enfermedad del ligamento de la charnela en juveniles de ostión (bacteria parecida a *Cytophaga*) (Friedman *et al.*, 1991; Bower *et al.*, 1994; Lacoste *et al.*, 2001a). Los resultados que se esperaban de los aislamientos bacterianos y la posterior identificación de las cepas bacterianas encontradas en el presente estudio, eran la presencia de algún tipo de bacteria patógena. Sin embargo, aunque los análisis cualitativos de la flora bacteriana en ostión han confirmado la presencia de bacterias del género *Aeromonas* (Sugumar *et al.*, 1998), las especies de este género no se han documentado como patógenas para moluscos (McGladdery, 1999). Sin embargo, si hay registros de una elevada patogenicidad de algunas de estas bacterias (*Aeromonas salmonicida* y *Aeromonas hydrophyla*) en peces, ranas, tortugas y otros reptiles (Hubbard, 1981 y Austin, 1989). Por otro lado, el lento crecimiento de la tercera colonia bacteriana impidió su identificación por la dificultad para obtener inóculos suficientes para las pruebas bioquímicas. Es importante señalar que un método alternativo para la identificación de bacterias, es el análisis molecular (Houpikian y Raoult, 2002), lo que llevaría a conocer los antecedentes patogénicos correspondientes. Sin embargo, en los muestreos subsecuentes no se detectaron las bacterias asociadas a las lesiones de las branquias. Estos resultados apoyan la hipótesis de que las partículas virales observadas (Vásquez-Yeomans *et al.*, 2004a)

estuvieron relacionadas con las mortalidades o que de alguna manera, actúan de manera sinérgica con otros parásitos y/o el ambiente.

En este sentido, es fundamental considerar las características más sobresalientes de este virus, resumiendo lo que hasta este momento se conoce sobre él y que coincide con los resultados de este trabajo.

El herpesvirus del ostión (OsHV-1) es un virus de ADN, de morfología icosaédrica y envuelto. Las partículas virales pueden encontrarse en el núcleo y citoplasma de las células infectadas. Las partículas nucleares tienen forma circular o poligonal con un diámetro de 70 nm. Las partículas citoplásmicas, de forma irregular, miden 90 nm y tienen una envoltura formada de una membrana trilaminar (Nicolas *et al.*, 1992). Esta descripción coincide con los resultados que se obtuvieron con los análisis de microscopía electrónica de las lesiones branquiales del 2000, donde las partículas virales presentan la morfología icosaédrica característica de este grupo de virus (Cheng *et al.*, 2002 y Vásquez-Yeomans y Cáceres-Martínez 2004a), aunque no se apreció la envoltura trilaminar.

La virogénesis se ha documentado en las larvas de *Crassostrea gigas* (Hine *et al.*, 1992) mientras que la patogénesis de este virus se demostró por transmisión experimental de la enfermedad a larvas axénicas de *Crassostrea gigas* (Le Deuff *et al.*, 1994).

Debido a que la infección se presenta en los estadios larvales tempranos, se sugiere que la génesis de la enfermedad puede involucrar una transmisión vertical de los progenitores (Hine *et al.* 1992); sin embargo, la infección también puede ser horizontal, como lo demostró Le Deuff *et al.* (1994).

Buchanan y Richard (1982) concluyeron que los herpesvirus son capaces de permanecer en estado latente en el hospedero durante toda su vida y pueden reactivarse muchos años después de la infección primaria; además, pueden causar enfermedad bajo condiciones de cultivo y por el estrés inducido por altas temperaturas. Lo anterior concuerda con lo mencionado por Le Deuff *et al.* (1996), quienes demostraron los efectos de la temperatura sobre la expresión del herpesvirus en juveniles de *C. gigas*. Los resultados obtenidos en este estudio para las zonas de Sonora y Baja California, donde se presentaron episodios de

mortalidad importantes en los meses donde aumenta la temperatura (verano – otoño), podrían atribuirse a la interacción del virus y la temperatura sobre el hospedero.

Se han registrado infecciones por virus tipo herpes en los géneros *Ostrea*, *Crassostrea* y *Tiostrea* (Hine *et al.*, 1998). Le Deuff y Renault (1999) y Le Deuff *et al.*, (2000) mencionaron que las infecciones por herpesvirus en los bivalvos son ubicuas y están asociadas con niveles de mortalidad elevados. Además, Renault *et al.* (2001) encontraron herpesvirus en las larvas de la almeja *Ruditapes philippinarum*. Estudios posteriores demostraron la transmisión viral interespecífica, donde un herpesvirus que infecta a *R. philippinarum* se puede transmitir a *C. gigas*, y un herpesvirus que infecta a *C. gigas* se puede transmitir a larvas de *Crassostrea angulata*, *Crassostrea rivularis* y *Ostrea edulis*. No se sabe si esta transmisión se presenta en poblaciones silvestres o sólo en criaderos. La detección del virus tipo herpes en varias especies de bivalvos, acentúa el riesgo que representa el cultivar varias especies de bivalvos en una misma granja o transferirlos de una localidad a otra (Arzul *et al.*, 2001a, b, c).

Los herpesvirus se han encontrado en las larvas, semillas y juveniles de bivalvos (Farley *et al.*, 1972, Friedman *et al.* 2005; Nicolas *et al.*, 1992 y Renault *et al.*, 1994), en este estudio también se detectó al OsHV por PCR en el estadio juvenil pero no en los adultos. En este sentido, puede ser que la infección sea mínima y que de acuerdo a las condiciones de la PCR no se obtenga el suficiente ADN viral para poder ser detectado, o que durante el proceso de extracción y purificación del ADN genómico éste haya sido descartado (Saunders y Parkes, 1998).

Por otro lado, el herpesvirus también se ha encontrado en ejemplares adultos aparentemente sanos (Arzul *et al.*, 2002), y si bien no se han descrito síntomas macroscópicos claros asociados a su presencia, el presente estudio documenta el primer registro de su detección en tejido branquial erosionado de organismos adultos (Vásquez-Yeomans y Cáceres-Martínez 2004a).

El hecho de encontrar al OsHV en los ostiones adultos, enfatiza la importancia de conocer el origen de los progenitores, particularmente en caso que la transmisión del virus sea

vertical, como se asume por los estudios de Hine *et al.* (1992). Todos estos resultados sugieren que después de la infección primaria, el virus es capaz de permanecer latente en su hospedero sin inducir la enfermedad o mortalidad. Esta capacidad de persistir es común en todos los miembros de la familia Herpesviridae.

A pesar de que la detección de este herpesvirus es efectiva con el análisis de microscopía electrónica, es una técnica costosa que no permite hacer un seguimiento rutinario de los cultivos. A fin de subsanar este costo, se han desarrollado pruebas moleculares que permiten diagnosticar gran cantidad de muestras, con resultados confiables, en un menor tiempo y con mayor sensibilidad. Estas técnicas, principalmente la de PCR y de acuerdo con los registros de Renault *et al.* (2000), se han detectado cantidades muy pequeñas de ADN viral (1 fg en 0.5 mg de tejido del hospedero). Por otro lado, Friedman *et al.* (2005) mencionan que para este tipo de análisis son convenientes cantidades de ADN molde de 50 a 500 ng, ya que con cantidades mayores se inhibe la reacción de la PCR. En este estudio se utilizó ADN genómico (purificado de branquias) en concentraciones de 12.5 pg hasta 1200 ng, sin que se presentara una inhibición de la reacción, lo que indica que el método utilizado para purificar y extraer ADN de tejido blanco, permite obtener ADN de buena calidad (Saunders y Parkes, 1998) o que la infección sea tan severa que haya suficiente cantidad de ADN viral.

Como se mencionó, el herpesvirus se expresa en el hospedero bajo condiciones de estrés, especialmente debido a condiciones ambientales adversas, asociadas con la temperatura (Hine y Thorne, 1997; Hine *et al.*, 1998 y Renault *et al.*, 1994) y que están asociadas a episodios de mortalidad. Estas condiciones térmicas adversas son propicias para la acción negativa del herpesvirus y son más extremas en las lagunas y bahías del estado de Sonora, respecto a Baja California, Sinaloa y Baja California Sur (ver descripción de la zona de estudio), donde las mortalidades han sido relativamente menores. En Sonora, las temperaturas en las zonas de cultivos son altas, principalmente en la parte norte y centro del estado, donde se detectó al herpesvirus. Lo mismo ocurrió en Bahía San Quintín en Baja California, si bien la temperatura no es tan extrema, la detección del herpesvirus se hizo posterior a un episodio de mortalidad en la semilla y donde el ostricultor relacionó la

mortalidad con un aumento de temperatura. Es posible que en el estado de Sinaloa, la expresión del herpesvirus se hubiera desencadenado debido a los cambios bruscos de salinidad, como consecuencia de las lluvias torrenciales reportadas por el productor, lo que presumiblemente estresó a los ostiones y posteriormente se iniciaron los eventos de mortalidad.

Se ha tratado de asociar al herpesvirus con los daños observados a nivel histológico, en este sentido la presencia de cuerpos de inclusión intranucleares (Cowdry tipo A) son característicos de muchas infecciones por herpesvirus, las cuales se han encontrado en larvas y en juveniles de ostión (Hine *et al.*, 1992 y Renault *et al.*, 1994). En este estudio no se observaron estos cuerpos de inclusión y en su lugar, el análisis histopatológico reveló la presencia de núcleos picnóticos, inflamación del tejido branquial e infiltración hemocitaria, que podrían ser el resultado de una infección por herpesvirus que no fuera productiva (Friedman *et al.*, 2005).

Un nuevo estudio asoció los núcleos picnóticos encontrados en las lesiones branquiales con el proceso de apoptosis (Mirella da Silva *et al.*, 2006), además se observó una fuerte infiltración hemocitaria que esos autores no consideran normal. El proceso de apoptosis, o muerte celular programada, es un proceso fisiológico normal para reemplazar a las células (White 1996). Sunila y LaBanca (2003) encontraron un gran número de hemocitos apoptóticos en el tejido conectivo de glándula digestiva y en el epitelio del intestino de ostiones sanos y sugieren que es parte del proceso de renovación de los hemocitos. La presencia de estos núcleos picnóticos y la infiltración hemocítica, concuerda con nuestros resultados, aunque no podemos asegurar la presencia de cuerpos apoptóticos.

No hay que olvidar que uno de los mecanismos de defensa que tiene los ostiones ante las infecciones de los herpesvirus y de otros virus es el proceso de la apoptosis (Friedman *et al.*, 2005 y Olicard *et al.*, 2005a). Por otro lado, se han encontrado sustancias anti-virales en la hemolinfa de ostiones adultos de *Crassostrea gigas*, lo que implica que los ostiones adultos son más resistentes a las infecciones, que las larvas y juveniles y que estas sustancias contribuyen a la sobrevivencia de los adultos cuando están expuestos al herpesvirus (Olicard *et al.*, 2005a, b).

Los resultados más relevantes de esta tesis y que merecen mayor atención son la presencia del herpesvirus, las erosiones branquiales y el protozooario esporulado parecido a *Marteilia* sp. Evidentemente, la sinergia que puede haber con la carga parasitaria considerada de bajo riesgo, no debe ser menospreciada y requiere de más estudios. En este mismo sentido, es recomendable iniciar urgentemente estudios ambientales en la zona relacionados con la carga parasitaria y las alteraciones descritas en este trabajo.

Tomando como base lo anterior a continuación se presenta un modelo conceptual de la entrada del herpesvirus a una zona de cultivo y los posibles resultados de su ingreso (Fig. 27). En este sentido se puede suponer que si los reproductores son portadores del herpesvirus (aparentemente sanos), por medio de una transmisión vertical (verdadera o falsa) ese virus pasa a la larva, lo que a su vez la hace portadora, pudiendo llegar hasta su fase adulta. Ahora bien, en el momento que se presenta un desequilibrio ambiental, principalmente por la temperatura (que también puede deberse a una baja disponibilidad de alimento, contaminación, salinidad o a la misma densidad de cultivo) el ostión se estresa y aumenta su susceptibilidad, que puede verse acentuada por una baja variabilidad genética, como lo demuestra Correa *et al.* (2003) para la Bahía de San Quintín en Baja California. Este estrés permite que el virus se reactive y entre a su fase de replicación y como consecuencia se presenten mortalidades.

Ahora bien, también se puede suponer que la larva obtenida de los reproductores no contenga al virus, sin embargo, si el virus se encuentra en el ambiente y durante el ciclo de producción, se presentara un desequilibrio ambiental como el mencionado anteriormente, el virus se puede transmitir horizontalmente. Hasta el momento, no se sabe si el virus puede permanecer en el ambiente sin un hospedero.

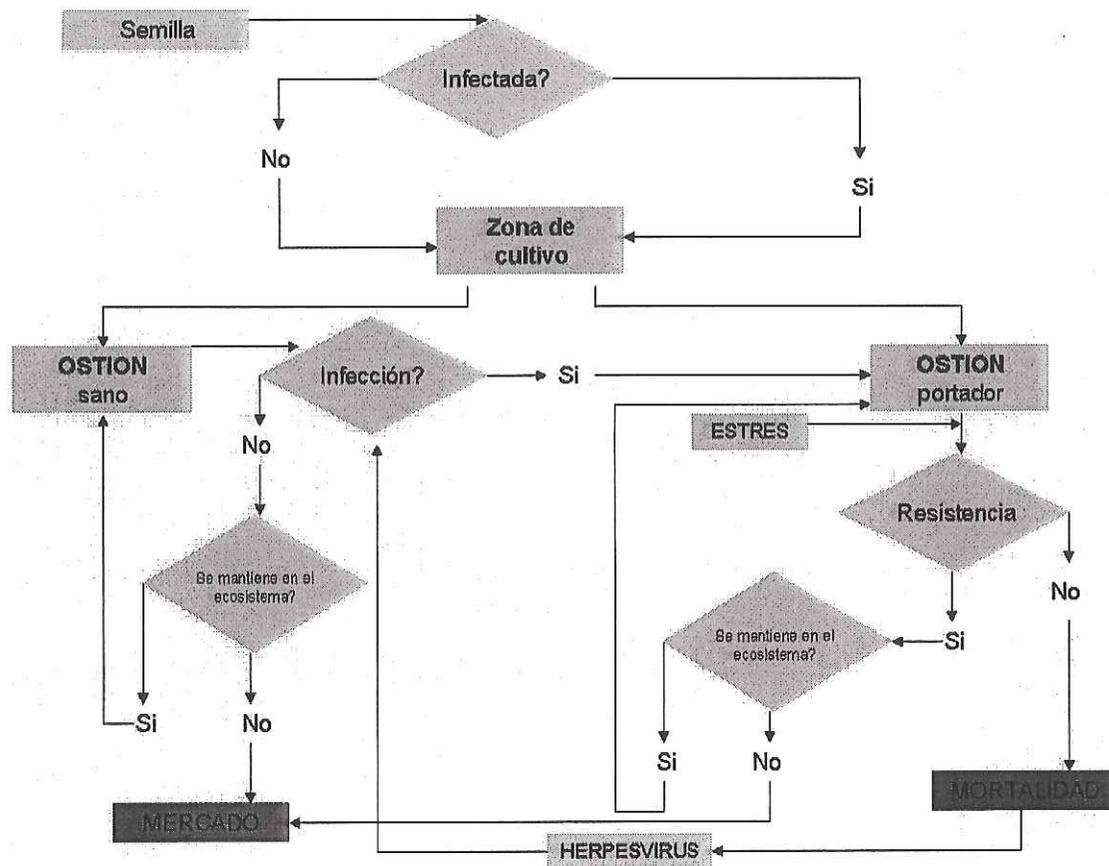


Figura 27. Modelo del ingreso del herpesvirus a una zona de cultivo y sus posibles resultados.

Aún y cuando no se ha detectado la presencia del herpesvirus ampliamente en la zona, su sola presencia y el hecho confirmado de que ha sido letal para la semilla y los juveniles de *C. gigas* en otras partes del mundo y que es considerado por la normatividad nacional como sujeto a certificación, se recomienda establecer las medidas que se sugieren a continuación:

- 1) Solicitar un certificado sanitario a los laboratorios donde se adquiera la semilla de ostión. Lo mismo debe solicitarse si se piensa adquirir juveniles o adultos. El certificado debe estar respaldado por las autoridades sanitarias del país donde se adquieran los ostiones.
- 2) No realizar transferencias de lotes de ostión en cualquiera de sus fases de desarrollo entre localidades diferentes sin tener un estudio sanitario donde se demuestre su

calidad sanitaria y se identifique el riesgo de traslado de alguna enfermedad no registrada en la localidad receptora.

- 3) Capacitar al personal de la granja de cultivo respecto a las “medidas sanitarias obligadas” para proteger la producción. Por ejemplo, el mantenimiento de instalaciones limpias, implementos de cultivo desinfectados, uso de maniluvios y pediluvios, filtración y desinfección del suministro de agua, depósito adecuado de desechos (conchas, restos orgánicos), supervisión sanitaria, etc., de esta manera el embate por infecciones virales se reduce considerablemente.
- 4) Promover el establecimiento de un laboratorio de producción de semilla de ostión y otros moluscos, certificados desde el punto de vista sanitario.
- 5) Vigilar la calidad genética de los ostiones que se pretende adquirir, buscando una garantía respecto a una variabilidad genética adecuada.
- 6) Cosechar al ostión antes de que se presenten factores estresantes (mareas rojas, eventos de El Niño). Además, disminuir la densidad de cultivo y programar una rotación de cultivos.
- 7) Promover una relación más estrecha entre académicos y productores para que se apoyen proyectos de investigación sanitaria de forma directa. Entre estos proyectos de investigación se debe incluir la búsqueda de ejemplares resistentes a la enfermedad.

VI. CONCLUSIONES

- 1) El herpesvirus del ostión OsHV-1, agente patógeno causante de mortalidades de *Crassostrea gigas* fue detectado por Microscopía Electrónica de Transmisión y por la Reacción en Cadena de la Polimerasa en el Noroeste de México.
- 2) Este hallazgo constituye el primer registro del OsHV-1 en México.
- 3) Se deben tomar medidas sanitarias para controlar la dispersión del OsHV-1 en México, dado su carácter patogénico, además de ser considerado agente causal de enfermedad certificable por la NOM-010.
- 4) El agente etiológico de las erosiones branquiales de *C. gigas* detectadas en este trabajo aún debe ser confirmado.
- 5) Las bacterias estudiadas no estuvieron asociadas con los eventos de mortalidad en la zona.
- 6) El Protozooario Esporulado X, por su parecido con *Marteilia* sp., debe ser considerado con mucha atención en los estudios subsecuentes sobre este tema.
- 7) Se confirma la presencia de la Hipertrofia Gametocítica Viral por análisis histopatológico en *C. gigas* cultivado en el Noroeste de México.
- 8) El resto de los parásitos encontrados en este trabajo, por el limitado potencial patológico no se pueden asociar directamente con los eventos de mortalidad en la zona, aunque debe considerarse la posible sinergia entre ellos y el ambiente.

VII. LITERATURA CITADA

- Alderman, D.J. y P. Gras. 1969. "Gill disease" of Portuguese oysters. *Nature*, 224: 616-617.
- Alvarez-Borrego, S. y J. Alvarez-Borrego. 1982. Temporal and spatial variability of temperature in two coastal lagoons. *CalCOFI Reports*, 23: 188-197.
- Álvarez-Borrego, S., Ballesteros-Grijalva, G. y A. Chee-Barragán. 1975. Estudio de algunas variables fisicoquímicas superficiales en Bahía San Quintín, en verano, otoño e invierno. *Ciencias Marinas*, 2 (2): 1-9.
- Anderson, T.J. y R.J.G. Lester. 1992. Sporulation of *Marteilioides branchialis* N. sp. (Paramyxea) in the sydney rock oyster *Saccostrea commercialis*: an electron microscope study. *J. Protozool.*, 39 (4): 502-508.
- Arzul, I., Nicolas, J.L., Davison, A.J. y T. Renault. 2001a. French Scallops: A new host for ostreid herpesvirus-1. *Virology*, 290: 342-349.
- Arzul, I., Renault, T., Lipart, C. y A.J. Davison. 2001b. Evidence for interspecies transmission of oyster herpesvirus in marine bivalves. *Journal of General Virology*, 82: 865-870.
- Arzul, I., Renault, T. y C. Lipart. 2001c. Experimental herpes-like viral infections in marine bivalves: demonstration of interspecies transmission. *Diseases of Aquatic Organisms*, 46: 1-6.
- Arzul, I., Renault, T., Thebault, A. y A. Gerard. 2002. Detection of oyster herpesvirus DNA and proteins in asymptomatic *Crassostrea gigas* adults. *Virus Research*, 84: 151-160.
- Austin, B. y D.A. Austin (eds.). 1989. *Methods for the microbiological examination of fish and shellfish*. Chichester, Ellis Horwood, 319p.

- Bardach, J.E., Ryther, J.H. y W.O. McLarney. 1986. Acuicultura: crianza y cultivo de organismos marinos y de agua dulce. Editorial AGT Editor, S. A. 739pp.
- Bergey, D.H., Holt, J.G., Krieg, N.R. y H.A. Sneath (eds.). 1994. Bergey's Manual of determinative bacteriology. Lippincott Williams & Wilkins. 787 p.
- Besse, P. 1968. Résultats de quelques observations sur une affection branchiale des huîtres (*Crassostrea angulata* Lmk). Bulletin Académie Vétérinaire de France, 41: 87-91.
- Bower, S.M., McGladdery, S.E. e I.M. Price. 1994. Synopsis of infectious diseases and parasites of commercially exploited shellfish. Annual Review of Fish Diseases, 4: 1-199.
- Brun, N., Boghen, A.D. y J. Allard. 1999. Distribution of the turbellarian *Urastoma cyprinae* of the gills of the eastern oyster *Crassostrea virginica*. Journal of Shellfish Research, 18 (1): 175-179.
- Buchanan, J.S. y R.H. Richards. 1982. Herpes-type virus diseases of marine organisms. Proceedings of the Royal Society of Edinburgh, 81B: 151-168.
- Cáceres-Martínez, J., Vásquez-Yeomans, R. y E. Suárez-Morales. 1996. Two parasitic copepods, *Pseudomyicola spinosus* and *Modiolicola gracilis* associated with edible mussels, *Mytilus galloprovincialis* and *Mytilus californianus* from Baja California NW México. Journal of Shellfish Research, 15 (3): 45-49.
- Cáceres-Martínez, J. y R. Vásquez-Yeomans. 1997. Presence and histopathological effects of the copepod *Pseudomyicola spinosus* in *Mytilus galloprovincialis* and *Mytilus californianus*. Journal of Invertebrate Pathology, 70 (2): 150-155.
- Cáceres-Martínez, J. y R. Vásquez-Yeomans. 1999. Metazoan parasites and pearls in coexisting mussel species: *Mytilus californianus*, *Mytilus galloprovincialis* and *Septifer bifurcatus*, from an exposed rocky shore in Baja California, NW México. The Veliger, 42 (1): 10-16.

- Cáceres-Martínez, J., Vásquez-Yeomans, R., Guerrero-Rentería, Y., Curiel-Ramírez, G.S., Olivas-Valdéz, J.A. y G. Rivas. 2000. The marine mites *Hyadesia* sp. and *Copidognathus* sp. associated to the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 76 (3): 216-221.
- Cáceres-Martínez, J y R. Vásquez-Yeomans. 2001. Manual de Enfermedades de Moluscos. Boletín del Programa Nacional de Sanidad Acuícola y la Red de Diagnóstico, UAM – SAGARPA, Año 4, 4 (16): 10 pp.
- Cáceres-Martínez, J. y R. Vásquez-Yeomans. 2003. Presence of giant polymorphic cells in *Crassostrea gigas* cultured in Bahía Falsa, Baja California NW México. *Journal of Shellfish Research*, 22 (3): 711-714.
- Cáceres-Martínez, J. 2000. Resultados de los análisis patológicos efectuados a ostiones del pacífico relacionados con mortalidades masivas. Foro Regional Sobre la Problemática del Cultivo de Moluscos Bivalvos en el Noroeste de México. Veintiuno de enero del 2000. Hermosillo, Sonora, México.
- Chávez de Nishikawa, A.G. y S. Alvarez Borrego. 1974. Hidrología de la Bahía de San Quintín, Baja California en invierno y primavera. *Ciencias Marinas*, 1 (2): 31-62.
- Cheng, T.C. 1967. Marine molluscs as hosts for symbioses with a review of known parasites of commercially important species. *Advances in Marine Biology*, 5: 1-424.
- Cheng, N., Trus, B.L., Belnap, D.M. Newcomb, W.W., Brown, J.C. y A.C. Steven. 2002. Handedness of the herpes simplex virus capsid and procapsid. *Journal of Virology*, 76: 7855-7859.
- Chomczynski P., Mackey K., Drews R. y W. Wilfinger. 1997. DNAzol®: A reagent for the rapid isolation of genomic DNA. *BioTechniques*, 22: 550-553.

- Cole, H.A. y R.E. Savage. 1951. The effect of the parasitic copepod, *Mytilicola intestinalis* (Steuer) upon the condition of mussels. *Parasitology*, 41: 156-161.
- Comps, M. 1970. La maladie des branchies chez les huîtres du genre *Crassostrea*, caractéristiques et évolutions des altérations, processus de cicatrisation. *Revue des Travaux de l'Institut des Pêches Maritimes*, 34 (1): 23-44.
- Comps, M. 1988. Epizootic diseases of oysters associated with viral infections. *En: Disease processes in marine bivalve molluscs*. W.S. Fisher (Ed.) American Fisheries Society, Special publication 18. Bethesda, Maryland. Pp. 23-37.
- Comps, M. y J.L. Duthoit. 1976. Infection virale associée à la "maladie des branchies" de l'huître portugaise *Crassostrea angulata* Lmk. *Comptes Rendus Hebdomadaire des Séances de l'Académie des Sciences, Série D, Sciences Naturelles*, 283: 1595-1596.
- Comps, M. y J.R. Bonami. 1977. Infection virale associée à des mortalités chez l'huître *Crassostrea gigas* Th. *Comptes Rendus Hebdomadaire des Séances de l'Académie des Sciences, Série D, Sciences Naturelles*, 285: 1139-1140.
- Contreras, F. 1985. Las lagunas costeras mexicanas. Centro de Ecodesarrollo. Secretaría de Pesca. 253 p.
- Correa, F., Collins, E., Ocegüera, A., Cordero, B. y D. Domínguez. 2004. Variación alozímica del ostión Japonés *Crassostrea gigas* en Bahía San Quintín, Baja California, México. *Ciencias Marinas*, 30 (11): 89-97.
- Dare, P.J. 1981. The susceptibility of seed oysters of *Ostrea edulis* L. and *Crassostrea gigas* Thunberg to natural infestation by the copepod *Mytilicola intestinalis* Steuer. *Aquaculture*, 26: 201-211.
- Davison, A.J., Trus, B.L., Cheng, N., Steven, A.C., Watson, M.S., Cunningham, C., Le Deuff, R-M. y T. Renault. 2005. A novel class of herpesvirus with bivalve hosts. *Journal of General Virology*, 86: 41-53.

- De Silva, S.S. 2001. A global perspective of aquaculture in the new millennium. *En: NACA/FAO, 2001. Aquaculture in the Third Millennium. R.P. Subasinghe, P. Bueno, M.J. Phillips, C. Hough, S.E. McGladdery y J.E. Arthur (eds.) Technical Proceedings of the Conference on Aquaculture in the Third Millennium, Bangkok, Thailand. 20-25 February 2000. NACA, Bangkok and FAO, Rome. 471pp.*
- Dijkema, R. 1997. Molluscan fisheries and culture in the Netherlands. *En: The history, present condition, and future of the molluscan fisheries of North and Central America and Europe, Volume 3, Europe. C.L. MacKenzie, Jr., V.G. Burrell, Jr., A. Rosenfield y W.L. Hobart (eds.). U. S. Dep. Commer., NOAA Tech. Rep., 129, 240p.*
- Dinamini, P. y D.B. Gordon. 1974. On the habits and nature of association of the copepod *Pseudomyicola spinosus* with the rock oyster *Crassostrea glomerata* in New Zealand. *Journal of Invertebrate Pathology, 24: 305-310.*
- Do, T.T. y T. Kajihara. 1986. Studies on parasitic copepod fauna and biology of *Pseudomyicola spinosus*, associated with blue mussel, *Mytilus edulis galloprovincialis* in Japan. *Bull. Ocean Res. Inst. Univ. Tokyo, 23: 1-63.*
- Edwards, E. 1997. Molluscan fisheries in Britain. *En: The history, present condition, and future of the molluscan fisheries of North and Central America and Europe, Volume 3, Europe. C.L. MacKenzie, Jr., V.G. Burrell, Jr., A. Rosenfield y W.L. Hobart (eds.). U. S. Dep. Commer., NOAA Tech. Rep., 129, 240p.*
- FAO. 2004. Committee on Fisheries Sub-Committee on Aquaculture First Session Beijing, China, 18-22 April 2002.
- Farley, C.A. 1976. Ultrastructural observations on epizootic neoplasia and lytic virus infection in bivalve mollusks. *Progress in Experimental Tumor Research, 20: 283-294.*

- Farley, C.A. 1978. Viruses and virus-like lesions in marine molluscs. *Marine Fisheries Review*, 40: 18-20.
- Farley, C.A. 1985. Viral gametocytic hypertrophy in oysters. *En: Identification Leaflets for Diseases and Parasite of Fish and Shellfish*, No. 25. C.J. Sindermann (ed.). ICES, Copenhagen. 5 pp.
- Farley, C.A., Banfield, W.G., Kasnic, G. y W. Forster. 1972. Oyster herpes-type virus. *Science (Washington, D.C.)*, 178: 759-760.
- Feng, S.L. 1988. Host response to *Proctoeces maculatus* infection in the blue mussel, *Mytilus edulis* L. *Journal of Shellfish Research*, 7: 118.
- Foro Regional Sobre la Problemática del Cultivo de Moluscos Bivalvos en el Noroeste de México. Veintiuno de enero del 2000. Hermosillo, Sonora, México.
- Friedman, C.S. y R.P. Hedrick. 1991. Pacific oyster nocardiosis: isolation of the bacterium and induction of laboratory infections. *Journal of Invertebrate Pathology*, 57: 109-120.
- Friedman, C.S., Estes, R.M., Stokes, N.A., Burge, C.A., Hargove, J.S., Barber, B.J., Elston, R.A., Burreson, E.M. y K.S. Reece. 2005. Herpes virus in juvenile Pacific oysters *Crassostrea gigas* from Tomales Bay, California, coincides with summer mortality episodes. *Diseases of Aquatic Organisms*, 63: 33-41.
- Funge-Smith, S. y M.J. Phillips. 2001. Aquaculture systems and species. *En: NACA/FAO, 2001. Aquaculture in the Third Millennium*. R.P. Subasinghe, P. Bueno, M.J. Phillips, C. Hough, S.E. McGladdery y J.E. Arthur (eds.) Technical Proceedings of the Conference on Aquaculture in the Third Millennium, Bangkok, Thailand. 20-25 February 2000. NACA, Bangkok and FAO, Rome. 471p.
- García, C., Robert, M., Arzul, I., Chollet, B., Joly, J-P., Miossec, L., Comtet, T. y F. Berthe. 2006. Viral gametocytic hypertrophy of *Crassostrea gigas* in France: from

- occasional records to disease emergence? *Diseases of Aquatic Organisms*, 70: 193-199.
- Gouilletquer, P. y M. Heral. 1997. Marine molluscan production trends in France: From fisheries to aquaculture. *En: The history, present condition, and future of the molluscan fisheries of North and Central America and Europe, Volume 3, Europe*. C.L. MacKenzie, Jr., V.G. Burrell, Jr., A. Rosenfield y W.L. Hobart (eds.). U. S. Dep. Commer., NOAA Tech. Rep., 129, 240p.
- Hine, P.M., Wesney, B. y B.E. Hay. 1992. Herpesviruses associated with mortalities among hatchery-reared larval Pacific oysters *Crassostrea gigas*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 12: 135-142.
- Hine, P.M. y T. Thorne. 1997. Replication of herpes-like viruses in haemocytes of adult flat oysters *Ostrea angasi*: an ultrastructural study. *Diseases of Aquatic Organisms*, 29: 189-196.
- Hine, P.M., Wesney, B. y P. Besant. 1998. Replication of a herpes-like virus in larvae of the flat oyster *Tiostrea chilensis* at ambient temperatures. *Diseases of Aquatic Organisms*, 32: 161-171.
- Ho, J.S. 1995. Mycolid copepods and mass mortality of culture hard clams (*Merethrix*). Sixth International Workshop of the Tropical Marine Mollusc Programme, June 12-20, 1995. Annamalai University, Parangipettai, India (abstract).
- Houpikian, P. y D. Raoult. 2002. Traditional and Molecular Techniques for the Study of Emerging Bacterial Diseases: One Laboratory's Perspective. *Emerging Infectious Diseases*, 8 (2): 121-131.
- Hubbard, G.B. 1981. *Aeromonas hydrophila* infection in *Xenopus laevis* water borne bacillus. *Laboratory Animal Science*, 31 (3): 297-300.
- Imai, T. 1982. Aquaculture in shallow seas. Editorial A. A. Balkema/Rotterdam. 615 pp.

- Islas-Olivares, R. y S. Ferrer. 1980. Rentabilidad del cultivo en suspensión de ostión Japonés en las costas de Baja California. *Revista Desarrollo Pesquero*, 4: 19-22.
- Islas-Olivares, R., Gendrop-Funes, V. y M. Miranda-Aguilar. 1978. Infraestructura básica para la obtención de larvas (semilla) de ostión Japonés (*Crassostrea gigas*) y ostión Europeo (*Ostrea edulis*) en Baja California. *Ciencias Marinas*, 5 (2): 73-86.
- Kristensen, P.S. 1997. Oyster and mussel fisheries in Denmark. *En: The history, present condition, and future of the molluscan fisheries of North and Central America and Europe*, Volume 3, Europe. C.L. MacKenzie, Jr., V.G. Burrell, Jr., A. Rosenfield y W.L. Hobart (eds.). U. S. Dep. Commer., NOAA Tech. Rep., 129, 240p.
- Lacoste, A., Jalabert, F., Malham, S. K., Cueff, A., Gélébart, F., Cordevant, C., Lange, M. y S.A. Poulet. 2001a. A *Vibrio splendidus* strain associated with summer mortality of juvenile oysters *Crassostrea gigas* in the Bay of Morlaix (North Brittany, France). *Diseases of Aquatic Organisms*, 46: 139-145.
- Lara-Lara, J.R. 1975. Ciclo anual de clorofila y producción orgánica primaria en Bahía San Quintín, B. C. Tesis Escuela Superior de Ciencias Marinas. 60 pp
- Lara-Lara, J.R. y S. Alvarez-Borrego. 1975. Ciclo anual de clorofilas y producción orgánica primaria en Bahía San Quintín, Baja California. *Ciencias Marinas*, 2 (1): 71-77.
- Lauckner, G. 1983. Diseases of Mollusca: Bivalvia. *En: Diseases of Marine Animals*. Vol. II Introduction to Scaphopoda. Kinne, O. (Ed.). Biologische Anstalt Helgoland. Hamburg, 467-1038.
- Le Deuff, R.M y T. Renault. 1999. Purification and partial genome characterization of a herpes-like virus infecting the Japanese oyster, *Crassostrea gigas*. *Journal of General Virology*, 89 (5): 1317-1322.

- Le Deuff, R.M., Nicolas, J.L., Renault, T. y N. Cochenec. 1994. Experimental transmission of a Herpes-like virus to axenic larvae of Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. Bulletin of the European Association of Fish Pathologists, 14: 69-72.
- Le Deuff, R.M., Renault, T. y A. Gérard. 1996. Effects of temperature on herpes-like virus detection among hatchery-reared larval Pacific oyster *Crassostrea gigas*. Diseases of Aquatic Organisms, 24: 149-157.
- Lindsay, C.E. y D. Simons. 1997. The fisheries for Olympia oysters, *Ostreola conchaphila*; Pacific oysters, *Crassostrea gigas*; and Pacific razor clams, *Siliqua patula*, in the State of Washington. *En*: The history, present condition, and future of the molluscan fisheries of North and Central America and Europe, Volume 3, Europe. C.L. MacKenzie, Jr., V.G. Burrell, Jr., A. Rosenfield y W.L. Hobart (eds.). U. S. Dep. Commer., NOAA Tech. Rep., 129, 240p.
- Macías Monte de Oca, P.A. 1998. Parásitos del ostión Japonés, *Crassostrea gigas* cultivado en Bahía Falsa, Baja California: Presencia, histopatología y control. Tesis de Maestría. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. 92 p.
- Marteil, L. 1969. Données générales sur la maladie des branchies. Revue des Travaux de l'Institut des Pêches Maritimes, 33 (2): 145-150.
- Mazón-Suástegui, J.M. 1996. Cultivo de Ostión Japonés. p. 625-650. *En*: Estudio del potencial pesquero y acuícola de Baja California Sur. Valdéz-Casas, M. y G. Ponce-Díaz (eds).
- McGladdery, S.E. 1999. Shellfish diseases (viral, bacterial and fungal). *En*: Fish Diseases and Disorders, Volume 3: Viral, Bacterial and Fungal Infections. P.T.K. Woo y D.W. Bruno (eds.). CAB International.

- Mirella da Silva, P., Villalba, A. e I. Sunila. 2006. Branchial lesions associated with abundant apoptotic cells in oysters *Ostrea edulis* of Galicia (NW Spain). *Diseases of Aquatic Organisms*, 70: 129-137.
- Miyasaki, T., Goto, K., Kobayashi, T., Kageyama, T. y M. Miyata. 1999. Mass mortalities associated with a virus disease in Japanese pearl oysters *Pinctada furbcata martensii*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 37: 1-12.
- Nicolas, J.L., Comps, M. y N. Cochenec. 1992. Herpes-like virus infecting Pacific oyster larvae *Crassostrea gigas*. *Bull. Eur. Ass Fish Pathol.*, 12 (1): 11-13.
- OIE. 2005. Código Sanitario Internacional para los Animales Acuáticos. Internet: http://www.oie.int/esp/normes/fcode/E_SUMMRY.HTM.
- Olicard, C., Didier, Y., Marty, C., Bourgougnon, N. y T. Renault. 2005. In vitro research of anti-HSV-1 activity in different extracts from Pacific oysters *Crassostrea gigas*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 67: 141-147.
- Olicard, C., Renault, T., Torhy, C., Benmansour, A. y N. Bourgougnon. 2005. Putative antiviral activity in hemolymph from adult Pacific oysters, *Crassostrea gigas*. *Antiviral Research*, 66: 147-152.
- Pauley, G.B., Chew, K.K. y A.K. Sparks. 1967. Experimental infection of oysters (*Crassostrea gigas*) with thigmotrichid ciliates. *Journal of Invertebrate Pathology*, 9: 230-234.
- Pauley, G.B., van Der Raay, B. y D. Troutt. 1988. Species profiles: life histories and environmental requirements of coastal fishes and invertebrates (Pacific Northwest)—Pacific oyster. U. S. Fish Wildl. Serv. Biol. Rep., 82(11.85). U. S. Army Corps of Engineers, TR EL-82.4. 28pp.
- Pedini, M. y Z. H. Shehadeh. 1997. Global outlook. FAO Fisheries Circular No. 886.

- Pillay, T.V.R. 1997. *Acuicultura: principios y prácticas*. Editorial Limusa. 699pp.
- Renault, T., Cochenec, N., Le Deuff, R.M. y B. Chollet. 1994. Herpes-like virus infecting Japanese oyster (*Crassostrea gigas*) spat. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, 14 (2): 64-66.
- Renault, T., Le Deuff, R-M., Lipart, C. y C. Delsert. 2000. Development of a PCR procedure for the detection of a herpes-like virus infecting oysters in France. *Journal of Virological Methods*, 88: 41-50.
- Renault, T., Lipart, C. e I. Arzul. 2001. A herpes-like virus infecting *Crassostrea gigas* and *Ruditapes philippinarum* larvae in France. *Journal of Fish Diseases*, 24: 369-376.
- Sambrook, J. y D.W. Russell. 2001. *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 3rd edition. 999 p.
- Saunders, G.C. y H.C. Parkes (eds.). 1999. *Analytical molecular biology*. Royal Society of Chemistry. 200 p.
- Seaman, M.N.L. y M. Ruth. 1997. The molluscan fisheries of Germany. *En: The history, present condition, and future of the molluscan fisheries of North and Central America and Europe, Volume 3, Europe*. C.L. MacKenzie, Jr., V.G. Burrell, Jr., A. Rosenfield y W.L. Hobart (eds.). U. S. Dep. Commer., NOAA Tech. Rep., 129, 240p.
- Shaw, W.N. 1997. The shellfish industry of California – Past, present, and future. *En: The history, present condition, and future of the molluscan fisheries of North and Central America and Europe, Volume 3, Europe*. C.L. MacKenzie, Jr., V.G. Burrell, Jr., A. Rosenfield y W.L. Hobart (eds.). U. S. Dep. Commer., NOAA Tech. Rep., 129, 240p.
- Shaw, B.L. e I.H. Battle. 1957. The gross microscopic anatomy of the digestive tract of the oyster *Crassostrea virginica* (Gmelin). *Can. J. Zool.*, 35: 325-346.

- Sinderman, C.J. 1990. Principal diseases of marine fish and shellfish. Editorial Academic Press. 516pp.
- Strand, O. y J.H. Vølstad. 1997. The molluscan fisheries and culture of Norway. *En*: The history, present condition, and future of the molluscan fisheries of North and Central America and Europe, Volume 3, Europe. C.L. MacKenzie, Jr., V.G. Burrell, Jr., A. Rosenfield y W.L. Hobart (eds.). U. S. Dep. Commer., NOAA Tech. Rep., 129, 240p.
- Subashinge, R.P., Bondad-Reantaso, M.G. y S.E. McGladdery. 2001. Aquaculture development, health and wealth. *En*: NACA/FAO, 2001. Aquaculture in the Third Millennium. R.P. Subasinghe, P. Bueno, M.J. Phillips, C. Hough, S.E. McGladdery y J.E. Arthur (eds.) Technical Proceedings of the Conference on Aquaculture in the Third Millennium, Bangkok, Thailand. 20-25 February 2000. NACA, Bangkok and FAO, Rome. 471pp.
- Sugumar, G., Nakai, T., Hirata, Y., Matsubara, D. y K. Muroga. 1998. *Vibrio splendidus* biovar II as the causative agent of bacillary necrosis of Japanese oyster, *Crassostrea gigas* larvae. *Diseases of Aquatic Organisms*, 33(2): 111-118.
- Sunila, I. y J. La Banca. 2003. Apoptosis in the pathogenesis of infectious diseases of the eastern oyster *Crassostrea virginica*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 56: 163-160.
- Swick, R.A. y M.C. Cremer. 2001. Livestock production: a model for aquaculture? Guest lecture. *En*: NACA/FAO, 2001. Aquaculture in the Third Millennium. R.P. Subasinghe, P. Bueno, M.J. Phillips, C. Hough, S.E. McGladdery y J.E. Arthur (eds.) Technical Proceedings of the Conference on Aquaculture in the Third Millennium, Bangkok, Thailand. 20-25 February 2000. NACA, Bangkok and FAO, Rome. 471pp.

- Vásquez-Yeomans, R. y J. Cáceres-Martínez. 2004a. Herpes-like virus associated with eroded gills of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* adults in México. *Journal of Shellfish Research*, 23 (1): 417-419.
- Vásquez-Yeomans, R., Cáceres-Martínez, J. y A.M. García-Ortega. 2004b. Identificación de bacterias aisladas de las branquias del ostión Japonés *Crassostrea gigas* cultivado en Bahía Falsa, B. C., México durante un episodio de mortalidad. *Anales del Instituto de Biología UNAM-Serie Zoología*, 75 (2): 237-243.
- White, E. 1996. Life, dead, and the pursuit of apoptosis. *Gene Dev.*, 10: 1-15.
- Zar, J.H. 1984. *Biostatistical analysis*. 2nd. Ed. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, NJ.

Apéndice I. Requisitos 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.

Moluscos bivalvos fijados.

En este caso es necesario que se abra al molusco y con cuidado, tratando de no dañar el tejido blando (cuerpo del ostión), se coloque en un frasco de plástico con solución fijadora Davison (anexo 1) en una relación de volumen de 1:5. La fijación del molusco debe ser individual. La concha debe ser guardada aparte en una bolsita, etiquetada de acuerdo al recipiente en donde se fijará el tejido blando correspondiente. Lo importante es evitar que queden restos de concha o arena en el tejido a fijar. Los frascos deben ser colocados dentro de una hielera de poliestireno, cerrada y sellada con cinta adhesiva. Es necesario, que como en el caso anterior, se envíe al laboratorio de análisis con los antecedentes para el servicio de diagnóstico.

Apéndice II. Preparación de la solución fijadora Davidson.

Solución Fijadora Davidson (para preparar 1 litro)

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

Es importante añadir por orden cada una de las diferentes sustancias.

Agitar antes de usarse.

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

Apéndice III. Técnica de deshidratación e inclusión en parafina.

Técnica de Inclusión en Parafina

Etanol 70%	1 hora
Etanol 96% - I	2 horas
Etanol 96% - II	2 horas
Etanol 100% - I	2 horas
Etanol 100% - II	2 horas
Etanol 100% - Benceno	3 horas
Benceno I	2 horas
Benceno II	2 horas
Benceno – Parafina	3 horas
Parafina I	2 horas
Parafina II	2 horas

Total 23 horas

Incluir en Parafina.

Apéndice IV. Técnica de Tinción de Hematoxilina-Eosina.

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

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

Desparafinación e Hidratación.

Xileno I	15 min. *
Xileno II	15 min. *
Xileno III	15 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.

Desparafinar las muestras hasta hidratar en agua.

Hematoxilina	15 min.
Etanol ácido	5 seg.
Agua Amoniacal	5 seg.
Agua corriente	7 min.

Agua destilada	3 min.
Etanol 96%	3 min.
Eosina	8 min.
Etanol 96% - I	25 seg.
Etanol 96% - II	3 min.
Etanol 100% - I	1½ min.
Etanol 100% - II	3 min.
Etanol 100% - Xileno	5 min.
Xileno I	5 min.
Xileno II	5 min.

Los tiempos pueden variar dependiendo de la especie.

Montar en resina sintética.

Apéndice V. Artículos científicos derivados de esta tesis doctoral.

Vásquez-Yeomans, R. y J. Cáceres-Martínez. 2004. Herpes-like virus associated with eroded gills of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* adults in México. *Journal of Shellfish Research*. 23 (1): 417-419.

Vásquez-Yeomans, R., Cáceres-Martínez, J. y A.M. García-Ortega. 2004. Identificación de bacterias aisladas de las branquias del ostión Japonés *Crassostrea gigas* cultivado en Bahía Falsa, B. C., México durante un episodio de mortalidad. *Anales del Instituto de Biología UNAM-Serie Zoología*, 75 (2): 237-243.

HERPES-LIKE VIRUS ASSOCIATED WITH ERODED GILLS OF THE PACIFIC OYSTER *CRASSOSTREA GIGAS* IN MEXICO

REBECA VÁSQUEZ-YEOMANS,^{1,†} JORGE CÁCERES-MARTÍNEZ,^{1,*†} AND ANTONIO FIGUERAS HUERTA²

¹Laboratorio de Biología y Patología de Organismos Acuáticos del Departamento de Acuicultura, Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Apdo. Postal 2732, C.P. 22860, Ensenada Baja California, México and ²Laboratorio Nacional de Referencia de enfermedades de Moluscos del Instituto de Investigaciones Marinas de Vigo. Eduardo Cabello #6, 36208, Vigo, España

ABSTRACT Since 1997, high mortality episodes of cultured oysters have occurred in Bahía Falsa, México. Studies on the possible association of these mortalities with pathogens have showed some similar characteristics to those found in the Portuguese oyster *Crassostrea angulata* and the Japanese oyster *Crassostrea gigas* infected by an iridoviridae-like particles in the lately 1960s. This infection was named gill necrosis virus infection (GNV). In a recent study, we could not find any virus using transmission electron microscopy (TEM) in adult oysters with clinical and histologic signs similar to those described for GNV. However, new TEM images showed the presence of viral particles in eroded gills of oysters. Morphologic characteristics, such as thin-walled icosahedric shape, the presence of capsids in an extension of the nucleus or in a vacuole and size varying from 80 to 90 nm suggest that the viruses belong to the Herpes viridae family. This virus could be involved in the mortality episodes in the Bay and it is different to those described as causal agent of GNV.

KEY WORDS: *Crassostrea gigas*, herpes-like virus, mortality, gill erosion, oyster disease

INTRODUCTION

In a recent study on the possible association of high mortality outbreaks of the Pacific oyster *C. gigas* cultured in Baja California and other states of NW Mexico with a pathogenic agent (Cáceres-Martínez & Vasquez-Yeomans 2003), we found some clinical and histopathologic evidence similar to those described for gill necrosis viral infection (GNV) recorded in the Portuguese oyster *C. angulata* and to a lesser degree in the Pacific oyster cultured in France, Great Britain, Spain, and Portugal between 1966 and 1967 (Marteil 1969, Comps 1988). Previously, we did not detect the iridovirus-like the causal agent of GNV, using transmission electron microscopy (TEM), possibly because the sample process, the status of the gill tissues of surviving oysters (wound repair), and or difficulties in finding the viral agent in fixed tissues (Cáceres-Martínez & Vasquez-Yeomans 2003). However, new TEM analyses of more samples have detected herpes-like virus particles.

MATERIALS AND METHODS

A sampling carried out in November 2000, of 10 adult oysters (Mean 89.3 ± 7.7 mm shell length), from an area of the Bahía Falsa, Baja California ($116^{\circ}00'W$, $30^{\circ}25'N$) where mortalities were common, were reviewed and those showing highly eroded gill tissues (Cáceres-Martínez & Vasquez-Yeomans 2003) were selected for TEM examination. Small pieces of tissue were cut from the eroded area of the gill and fixed in 3% glutaraldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer, pH 7.8, for 4 h at 4 °C. Fixed tissues were washed for 12 hours at 4 °C in the same buffer and cut into 1-mm³ pieces. These pieces were then postfixed in buffered 1% OsO₄ for 4 hours at 4 °C, dehydrated through a graded series of ethanols and embedded in epoxy resin. Sections (90 nm thickness) were cut and stained with 5% uranyl acetate for 30 minutes,

then observed with TEM operated at 75 kV in the Instituto de Investigaciones Marinas from Vigo, Spain.

RESULTS AND DISCUSSION

Viral particles were found in all samples ($n = 10$) of eroded gill analyzed in this study. The morphologic characteristics of the

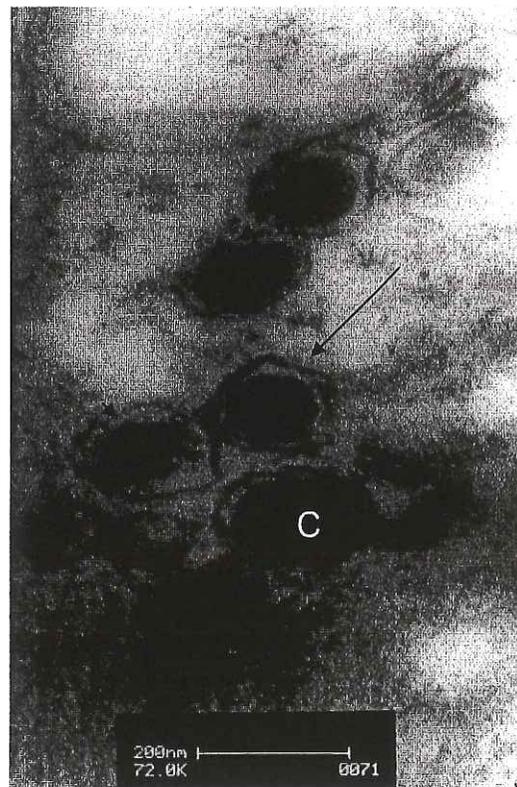


Figure 1. Viral particles showing the pentagonal shape of the capsids (large arrow), thin wall (small arrow), and core (C). Size variations are also observed.

*Corresponding author.

†Present address: Instituto de Sanidad Acuicola, A.C. Calle 9na y Gastélum No. 468 Local 14, Zona Centro. C.P. 22800, Ensenada, Baja California, México.

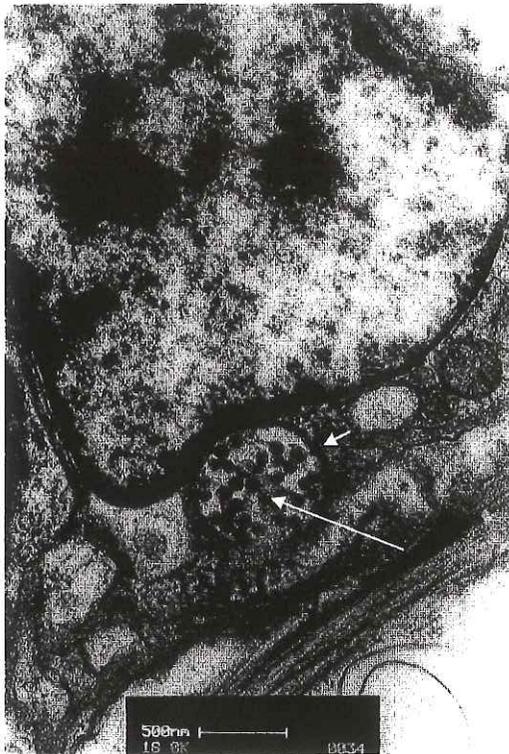


Figure 2. Viral particles (large arrow) in an extension of the nucleus or in a vacuole (small arrow) of the infected cell.

viral particles including capsid shape, presence of a thin wall, size range (Fig. 1), and presence in an extension of the nucleus or in a vacuole of the infected cell (Fig. 2) suggest that they are closely related to Herpes virus (virions enveloped, slightly pleomorphic, spherical, 120–200 nm in diameter). Surface projections of envelope distinct spikes were dispersed evenly over all the surface.

Nucleocapsid surrounded by the tegument that consists of globular material, which is frequently asymmetrically distributed and may be variable in amount. Nucleocapsids were sometimes penetrated by stain (although the intact envelope was impermeable to stain) 100–110 nm in diameter.

Nucleocapsids appeared to be angular and surface capsomer

arrangement obvious. There were 162 capsomers per nucleocapsid (capsomeres hexagonal in cross-section with a hole running half-way down the long axis). The core consisted of a fibrillar spool on which the DNA is wrapped, and the ends of the fibers are anchored to the underside of the capsid shell. Incomplete virus particles often present, are capsids lacking the envelope. Virions contain one molecule of linear double stranded DNA (van Regenmortel et al. 2000). Based on this description of the Herpes viruses, the particles shown in Figures 1 and 2 can be described as herpes-like. There were no particles in the main part of the nucleus and no virions in the cytoplasm. Some capsids were variable in size and thin-walled.

Herpes and herpes-like viruses have been recorded in turtles, carps, ictalurids, frogs, and other aquatic organisms (Buchanan & Richards 1982). In oysters there are several records of herpes or herpes-like viruses around the world (Table 1), and these virus infections in bivalves seem to be ubiquitous (Le Deuff & Renault 1999). All these herpes-like viruses have been described in larval stages and young spat with the exception of adult *Ostrea angasi* in Australia (Hine & Thorne 1997) and possibly adult *Crassostrea virginica* in Maine USA (Farley et al. 1972). However, Farley et al. did not mention the age or size of the infected oysters. Studies on the development of molecular analysis to detect the herpes-like virus in oyster larvae and juveniles have been carried out (Le Deuff & Renault 1999, Renault et al. 2000, Renault & Arzul 2001). Interspecies transmission also has been studied (Arzul et al. 2001a, Arzul et al. 2001b). More recently, Arzul et al. (2002) detected the herpes-like virus in a symptomatic *C. gigas* adult using molecular techniques, including PCR and in situ hybridization (ISH). These authors suggest that this virus may persist in its host after primary infection, and a comparison between adult oysters and infected spat indicated that the spat contain higher amounts of virus DNA. They concluded that viral replication appears less common in adults than in spat. In contrast, our results (Cáceres-Martínez & Vásquez-Yeomans 2003) and those shown in this study, suggest the connection of a herpes-like virus in gill tissue of adults *C. gigas* with clinical signs, histologic alterations, and high mortality episodes. To our knowledge, this is the first record of herpes-like viruses by TEM in adult oysters.

More research is being conducted to further characterize the virus and to determine the influence of environmental factors on the development of the disease in larvae, juveniles, and adults.

TABLE 1.
Herpes-like virus infection in oysters.

Host	Growth Stage	Tissue	Mortality	Name of the Disease	Locality	Reference
<i>Crassostrea virginica</i>	Not mentioned, possibly adult	Haemocytes		Unnamed	Maine, USA	Farley et al. 1972
<i>Crassostrea gigas</i>	Larvae	Connective and mantle epithelium		Unnamed	Northern France	Nicolas et al. 1992
<i>Crassostrea gigas</i>	Larvae	Entire larvae	60–100%	Unnamed	Auckland, New Zealand	Hine et al. 1992
<i>Ostrea edulis</i>	Young spat (5 months old)	Connective, around digestive tubules	90%	Herpes-like infection	Brittany, France	Comps & Cochenec 1993
<i>Crassostrea gigas</i>	Young spat (3–7 months old)	Connective in the gills, mantle and around digestive tubules	80–90%	Unnamed	France, Atlantic Coast	Renault et al. 1994
<i>Ostrea angasi</i>	Adults			Unnamed	Australia	Hine and Thorne 1997

Experimental infections by cohabitation and by injection of a homogenate of eroded gill tissues from symptomatic oysters are being carried out to confirm the role of these herpes virus-like particles as the cause of these mortalities.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank anonymous herpesvirus structural expert for his help in the ultrastructural identification of the virus and Dra.

Carmen Paniagua Chávez for suggestions to the manuscript and help in translation. This work was supported by Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, México throughout the project number 623106, the project from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACyT 225080-5-3933PB and Instituto de Investigaciones Marinas de Vigo, Spain. R. V.-Y. was supported by a grant of the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) from México.

LITERATURE CITED

- Arzul, I., T. M. Renault & C. Lipart. 2001a. Experimental herpes-like viral infections in marine bivalves: demonstration of interspecies transmission. *Dis. Aquat. Org.* 46:1–6.
- Arzul, I., T. M. Renault, C. Lipart & A. J. Davison. 2001b. Evidence for interspecies transmission of oyster herpesvirus in marine bivalves. *J. of Gen. Vir.* 82:865–870.
- Arzul, I., T. M. Renault, A. Thébault & A. Gérard. 2002. Detection of oyster herpesvirus DNA and proteins in asymptomatic *Crassostrea gigas* adults. *Virus Res.* 84:151–160.
- Buchanan, J. S. & R. H. Richards. 1982. Herpes-type virus diseases of marine organisms. *Proc. Royal Soc. of Edimburg.* 81:151–168.
- Cáceres-Martínez, J. & R. Vásquez-Yeomans. 2003. Presence of giant polymorphic cells in *Crassostrea gigas* cultured in Bahía Falsa, Baja California NW México. *J. Shellfish Res.* 22(3):711–714.
- Comps, M. 1988. Epizootic diseases of oysters associated with viral infections. In: W. S. Fisher, editor. Disease processes in marine bivalve molluscs. Bethesda, Maryland: American Fisheries Society, special publication 18. pp. 23–37.
- Comps, M. & N. Cochenec. 1993. A herpes-like virus from European oyster *Ostrea edulis* L. *J. of Inv. Patol.* 62:201–203.
- Farley, C. A., W. G. Banfield, G. Kasnic, Jr. & W. S. Foster. 1972. Oyster herpes-type virus. *Science* 178:759–760.
- Hine, P. M., B. Wesney & B. E. Hay. 1992. Herpesviruses associated with mortalities among hatchery-reared larval Pacific oysters *Crassostrea gigas*. *Dis. Aquat. Org.* 12:135–142.
- Hine, P. M. & T. Thorne. 1997. Replication of herpes-like viruses in haemocytes of adult flat oysters *Ostrea angasi* (Sowerby, 1871): an ultrastructural study. *Dis. Aquat. Org.* 29:189–196.
- Le Deuff, R. M. & T. Renault. 1999. Purification and partial genome characterization of a herpes-like virus infecting the Japanese oyster, *Crassostrea gigas*. *J. of Gen. Vir.* 80:1317–1322.
- Marteil, L. 1969. La maladie des branches des huîtres portugaises des côtes françaises de l'atlantique. *Rev. Trav. Inst. Pêches Marit.* 33(2):145–150.
- Nicolas, J. L., M. Comps & N. Cochenec. 1992. Herpes-like virus infecting Pacific-oyster larvae, *Crassostrea gigas*. *Bull. Eur. Ass. Fish Patol.* 12(1):11.
- Renault, T., N. Cochenec, R. M. Le Deuff & B. Chollet. 1994. Herpes-like virus infecting Japanese oyster (*Crassostrea gigas*) spat. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* 14(2):64–66.
- Renault, T., R. M. Le Deuff, C. Lipart & C. Delsert. 2000. Development of a PCR procedure for detection of a herpes-like virus infecting oysters in France. *J. Virol. Methods* 88:41–50.
- Renault, T. M. & I. Arzul. 2001. Herpes-like virus infections in hatchery-reared bivalve larvae in Europe: specific viral DNA detection by PCR. *J. Fish. Dis.* 24:161–167.
- van Regenmortel, M. H. V., C. M. Fauquet, D. H. L. Bishop, E. B. Carstens, M. K. Estes, S. M. Lemon, J. Maniloff, M. A. Mayo, D. J. McGeoch, C. R. Pringle & R. B. Wickner. 2000. Virus taxonomy: the classification and nomenclature of viruses. The seventh report of the international committee on taxonomy of viruses. San Diego: Academic Press. 1167 pp.

Bacterias aisladas de las branquias del ostión japonés *Crassostrea gigas* cultivado en Bahía Falsa, Baja California, México

REBECA VÁSQUEZ-YEOMANS*
JORGE CÁCERES-MARTÍNEZ*
ADRIÁN MAURICIO GARCÍA ORTEGA**

Resumen. El ostión japonés, *Crassostrea gigas*, se cultiva en Bahía Falsa, Baja California, desde finales de los años setenta. En la actualidad existen 21 empresas dedicadas a esta actividad. A partir de 1998 se comenzaron a registrar mortalidades inusuales del ostión, alcanzando porcentajes mayores al 80% del total de la producción. Estos episodios de mortalidad se han mantenido de forma más o menos regular y la hipótesis de un posible agente patógeno involucrado, como un virus, una bacteria o ambos, permanece vigente. En el presente trabajo se registran los resultados de un estudio de caracterización fisiológica y bioquímica de bacterias aisladas de tejido branquial de ostiones recolectados durante un episodio de mortalidad en 2001. Se aislaron tres colonias de bacterias, dos de las cuales crecieron en el medio selectivo TCBS formando colonias amarillas que se identificaron como bacterias del género *Aeromonas*. La tercera cepa aislada no se pudo cultivar ni identificar. Las especies de *Aeromonas* no se documentan como patógenas para moluscos, pero sí para peces y reptiles. Por otro lado, la identificación de la colonia de bacterias de difícil crecimiento en medios empleados en este estudio, debe realizarse mediante métodos moleculares.

Palabras clave: *Crassostrea gigas*, *Aeromonas* sp., mortalidad, cultivo.

Abstract. Since the late 70s, the Japanese oyster, *Crassostrea gigas*, has been cultured in Bahía Falsa, Baja California, Mexico. Nowadays, there are 21 culture companies involved in this activity. In 1998, unusual mortality episodes of oysters began to occur, reaching up to 80% of the production. These mortality

* Laboratorio de Biología y Patología de Organismos Acuáticos, Departamento de Acuicultura, Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. Apartado postal 2732, 2280 Ensenada, Baja California, México.

** Comité Estatal de Sanidad Vegetal de Baja California. Km. 1.5 Carretera a San Felipe, Ex-Ejido Xochimilco, 22310 Mexicali, Baja California, México.

episodes have been recurred up to date and, the hypothesis of a possible pathogen involved, such as a virus, bacteria or both, remains open. This work shows the results of a study on the physiological and biochemical characterization of isolated bacteria from gill tissue of oysters recollected during a mortality episode in 2001. Three colonies were isolated, two of them grew in TCBS selective medium, forming yellow colonies, which were identified as belonging to the genus *Aeromonas*. The third colony could not be cultured or identified. There are not records on the pathogenicity of *Aeromonas* spp. in mollusks; however, they have been reported as pathogenic for fishes and reptiles. Identification of the not cultured bacteria must be carry out by molecular methods.

Key words: *Crassostrea gigas*, *Aeromonas* sp., mortality, culture

Introducción

El ostión japonés *Crassostrea gigas* es ampliamente cultivado alrededor del mundo. Esta especie ha sido introducida de su región de origen en Japón, a países como Australia, Francia, Holanda, España, Portugal, Tailandia, Estados Unidos y Reino Unido (Bardach *et al.* 1982; Edwards 1997). En 1973, *C. gigas* se introdujo en varias lagunas costeras de los estados de Sonora, Baja California Sur y Baja California, incluyendo Bahía Falsa, Baja California, México. En la actualidad, el cultivo de ostión en Baja California y en otros estados del noroeste de nuestro país está bien establecido, la producción anual es de unas 1 622 toneladas métricas anuales con un valor de 2.4 millones de dólares estadounidenses, y aproximadamente 1800 empleos sostienen esta actividad (Anuario Estadístico de Pesca, 2001) A partir de 1997, se comenzaron a detectar alarmantes episodios de mortalidad masiva de ostión, incluyendo semilla, juveniles y adultos en los estados de Sonora y Baja California Sur. En abril de 1998, ocurrieron episodios similares de mortalidad en Bahía Falsa, Baja California. La alarma del sector se hizo patente y se realizaron tres reuniones de trabajo entre productores, autoridades acuícolas y académicos para tratar de determinar las causas de estas mortalidades y la forma de controlarlas. Las reuniones se realizaron en Sonora, Baja California y Baja California Sur, se determinó que entre las posibles causas asociadas con esas mortalidades estaban agentes patógenos (Cáceres-Martínez 2000).

En estudios histopatológicos llevados a cabo entre 1996 y 1998 en las zonas de cultivo del ostión japonés en Bahía Falsa, B. C., se encontraron en las branquias células polimórficas gigantes (Cáceres-Martínez 2000), mismas que están asociadas a la presencia de un iridovirus conocido como GNV (Gill Necrosis Virus o Virus de la Necrosis Branquial) (Comps 1988). Posteriores análisis histopatológicos de las branquias del ostión, iniciados en el verano de 2000, mostraron la sintomatología causada por el GNV, pero sin observar la presencia de células polimórficas asociadas al virus. Adicionalmente, análisis clínicos llevados a cabo en laboratorio y campo

mostraron en las branquias síntomas externos parecidos a los causados por el GNV (Cáceres-Martínez & Vásquez-Yeomans 2003); sin embargo, el estudio de estos tejidos usando microscopía electrónica no demostró la presencia del iridovirus GNV, pero sí presencia de bacterias tipo bacilos y de virus parecidos al herpes (Vásquez-Yeomans *et al.* 2004).

Estos resultados sugieren que tanto el virus parecido a herpes como las bacterias tipo bacilos que se encontraron, o ambos, podrían tener relación con los episodios de mortalidad observados. Por tal motivo, el objetivo del presente estudio fue aislar e identificar bacterias de tejido branquial del ostión japonés, *C. gigas*, recolectados durante un episodio de mortalidad en la Bahía Falsa, B. C.

Materiales y métodos

Bahía Falsa está formada por un brazo de la bahía de San Quintín localizada en la costa del Pacífico de Baja California, entre $30^{\circ} 24' N$ a $30^{\circ} 30' N$ y $115^{\circ} 57' O$ a $116^{\circ} 01' O$ (Fig. 1) (Lara-Lara & Álvarez-Borrego 1975). La bahía tiene una longitud de 7 km y una profundidad máxima, en el canal principal, de 7 m; en toda la bahía se localizan los cultivos comerciales del ostión japonés

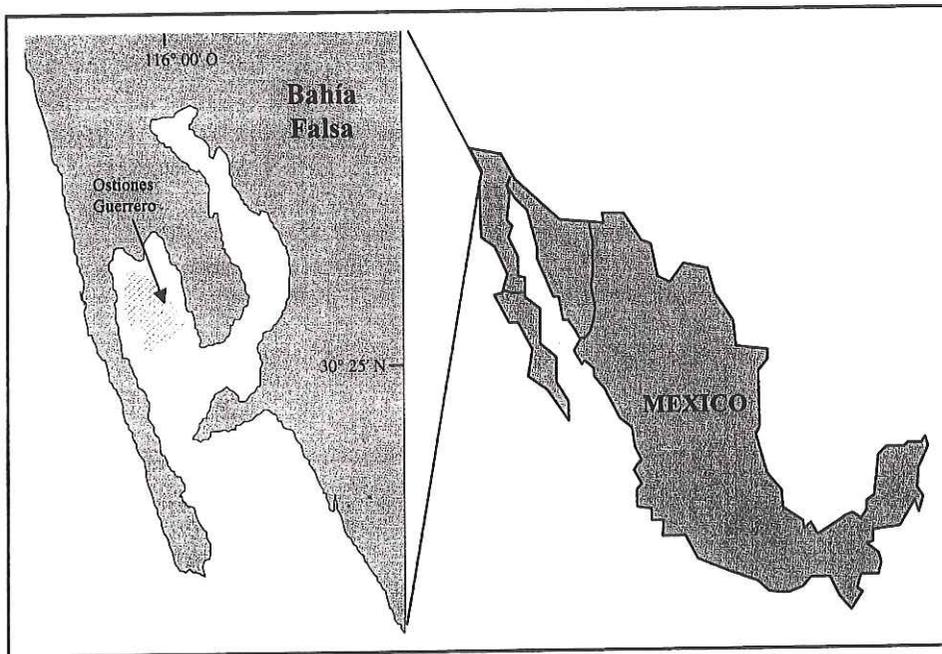


Fig. 1. Mapa de la Bahía Falsa en donde se señala el punto de recolección de ostión. La zona sombreada corresponde a la zona de cultivo.

(Álvarez-Borrego *et al.* 1975). De una muestra de 70 ostiones adultos (longitud promedio de 89.3 ± 7.7 mm) que se recolectaron en el área de cultivo, conocida como Ostiones Guerrero de Bahía Falsa (Fig. 1), para su análisis en el Laboratorio de Biología y Patología de Organismos Acuáticos del C.I.C.E.S.E. durante un episodio de mortalidad, sólo 10 llegaron vivos.

De estos ostiones, y bajo condiciones asépticas, se obtuvieron 5 g de tejido branquial, el cual se homogeneizó con un mortero de porcelana previamente esterilizado. El homogeneizado se colocó en un tubo de ensayo con 9 ml de agua de mar filtrada y esterilizada en autoclave y se hicieron subsecuentes diluciones (10^{-1} a 10^{-4}). Se sembraron $10 \mu\text{l}$ de la dilución 10^{-4} en placas con medio de cultivo Zobell (Gibco). Éstas se incubaron a 26°C por 24 horas. Las colonias dominantes se aislaron, una parte en medio TCBS y otras en medio agar marino.

La caracterización fenotípica se realizó por pruebas fisiológicas estándar (tinción de Gram, reacción de la oxidasa, morfología y movilidad, crecimiento en TCBS, fermentación de la glucosa, sensibilidad al agente vibriostático 0/129 y crecimiento a las salinidades 3% y 6%) y pruebas bioquímicas utilizando el API 20E (BioMérieux) siguiendo las instrucciones del fabricante, modificando la solución de dilución con agua de mar estéril. Las bacterias aisladas e identificadas se preservaron a -70°C .

Resultados

Se obtuvieron tres colonias de los aislamientos realizados de las branquias de los ostiones estudiados. Los resultados de la caracterización fisiológica y bioquímica de las bacterias aisladas se resumen en el Cuadro 1. Dos de las cepas crecieron en el medio selectivo TCBS formando colonias amarillas y se identificaron como bacterias del género *Aeromonas*. La tercera cepa aislada no se pudo identificar debido a su crecimiento muy lento, que no permitió obtener suficiente inóculo para su caracterización bioquímica con las pruebas del API 20E.

Discusión

Durante los años sesenta y hasta la actualidad, en los cultivos de ostión japonés en diferentes partes del mundo, se han presentado mortalidades masivas durante los meses de verano, cuando la temperatura del agua excede los 20°C (Friedman *et al.* 1991). La mayoría de los estudios enfocados a determinar la causa de estas mortalidades refieren a las bacterias como los posibles agentes causales. Entre las principales enfermedades ocasionadas por bacterias en *Crassostrea gigas* destacan la vibriosis (*Vibrio splendidus*, *Vibrio* spp.); nocardiosis (*Nocardia* sp., bacteria actinomiceta) y la enfermedad del ligamento de la charnela en juveniles de ostión

Cuadro 1. Caracterización fenotípica de las bacterias del género *Aeromonas*

<i>Prueba</i>	<i>Resultado</i>
Gram	-
Movilidad	+
Crecimiento en TCBS	+
Sensibilidad 0/129	-
Crecimiento NaCl 3%	+
Crecimiento NaCl 6%	+
Utilización de:	
Citrato	-
Glucosa	+
Manitol	+
Sorbitol	-
Ramnosa	-
Sacarosa	+
Melibiosa	+
Arnygdalina	+
Arabinosa	-
Enzimas:	
Hidrolisina ONPG	
Arginina dihidrolasa	+
Lisina descarboxilasa	-
Omitina descarboxilasa	-
Ureasa	-
Triptófano desaminasa	-
Gelatinasa	+
Citocromo oxidasa	+
Producción de:	
H ₂ S	-
Indol	+
Acetoína (Voges-Proskauer)	-
Oxidación de la glucosa	+
Fermentación de la glucosa	+

(bacteria parecida a *Cytophaga*) (Friedman *et al.* 1991, Bower *et al.* 1994; Lacoste *et al.* 2001).

Los resultados que se esperaban de los aislamientos y posterior identificación de las cepas bacterianas encontradas en el presente estudio, eran la presencia de algún tipo de bacteria patógena como las ya mencionadas. Sin embargo, las colonias que se encontraron fueron del género *Aeromonas* y, aunque análisis cualitativos de la flora bacteriana en ostión han confirmado la presencia de bacterias del género *Aeromonas* (Sugumar *et al.* 1998), este género no se documenta como patógeno para moluscos (McGladdery 1999). Sin embargo, sí hay registros de una elevada

patogenicidad de algunas de estas bacterias como *A. salmonicida* y *A. hydrophila* en peces, ranas, tortugas y otros reptiles (Hubbard 1981, Austin 1988).

Por otro lado, el lento crecimiento de la tercera colonia bacteriana, y por tanto la dificultad para obtener inóculos suficientes para las pruebas bioquímicas impidió su identificación y la posibilidad de determinar su posible patogenicidad. Es importante señalar que un método alternativo para identificación de bacterias en estos casos es a través de análisis molecular (Houpikian & Raoult 2002), lo que nos llevaría a conocer si ese tipo de bacterias pudieran ser identificadas como posibles patógenas. Si se descartan las bacterias encontradas como posibles agentes causales directos de las mortalidades en la bahía es probable que las partículas virales parecidas a herpes (Vásquez-Yeomans *et al.* 2004) sí lo sean, o que de alguna manera actúen de manera sinérgica con las bacterias. En cualquier caso, son necesarios mayores estudios a partir de la información aquí encontrada que permitan dilucidar el papel de estas bacterias y virus en las branquias del ostión japonés de la zona de estudio.

Agradecimientos. Los autores agradecen la ayuda del oceanólogo Héctor González por proporcionarnos los organismos para este estudio. A la doctora Roxana Rico por sus sugerencias para el análisis bacteriológico. Este trabajo fue apoyado por el Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, México a través del proyecto 623106 y por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

Literatura citada

- ÁLVAREZ-BORREGO, S., G. BALLESTEROS-GRIJALVA & A. CHEE-BARRAGÁN. 1975. Estudio de algunas variables fisicoquímicas superficiales en Bahía San Quintín, en verano, otoño e invierno. *Ciencias Marinas* 2 (2): 1-9.
- ANUARIO ESTADÍSTICO DE PESCA. 2001. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, México, D. F.
- BOWER, S. M., S. E. MCGLADDERY & I. M. PRICE. 1994. Synopsis of infectious diseases and parasites of commercially exploited shellfish. *Annual Review of Fish Diseases* 4: 1199.
- CÁCERES-MARTÍNEZ, J. 2000. Resultados de los análisis patológicos efectuados a ostiones del Pacífico relacionados con mortalidades masivas. *Foro Regional sobre la Problemática del Cultivo de Moluscos Bivalvos en el Noroeste de México*, 21 de enero, 2000. Hermosillo, Sonora.
- CÁCERES-MARTÍNEZ, J. & R. VÁSQUEZ-YEOMANS. 2003. Presence of giant polymorphic cells in *Crassostrea gigas* cultured in Bahía Falsa, Baja California NW Mexico. *Journal of Shellfish Research* 22 (3): 711-714.
- COMPS, M. 1988. Epizootic diseases of oysters associated with viral infections. In: W. S. Fisher (ed.) *Disease processes in marine bivalve molluscs*. American Fisheries Society, Bethesda, Maryland, Special publication 18, pp. 23-37.
- FELDHUSEN, F. 2000. The role of seafood in bacterial foodborne diseases. *Microbes and Infection* 2: 1651-1660.

- FRIEDMAN, C. S., J. H. BEATTIE, R. A. ELSTON & R. P. HEDRICK. 1991. Investigation of the relationship between the presence of a gram-positive bacterial infection and summer mortality of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* Thunberg. *Aquaculture* 94: 1-15.
- HOUPIKIAN, P. & D. RAOULT. 2002. Traditional and molecular techniques for the study of emerging bacterial diseases: one laboratory's perspective. *Emerging Infectious Diseases* 8 (2): 121-131.
- HUBBARD, G. B. 1981. *Aeromonas hydrophila* infection in *Xenopus laevis* water borne bacillus. *Laboratory Animal Science* 31 (3): 297-300.
- JANDA, J. M. 1991. Recent advances in the study of the taxonomy, pathogenicity, and infectious syndromes associated with the genus *Aeromonas*. *Clinical Microbiology Review* 4: 3 97-4 10.
- LACOSTE, A., F. JALABERT, S. K. MALHAM, A. CUEFF & S. A. POULET. 2001. Stress and stress-induced neuroendocrine changes increase the susceptibility of juvenile oyster (*Crassostrea gigas*) to *Vibrio splendidus*. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 2304-2309.
- LARA-LARA, R. & S. ÁLVAREZ-BORREGO. 1975. Ciclo anual de clorofilas y producción orgánica primaria en Bahía San Quintín, Baja California. *Ciencias Marinas* 2 (1): 71-77.
- McGladdery, S. E. 1999. Shellfish diseases (viral, bacterial and fungal). In: P. T. K. Woo & D. W. Bruno (eds.). *Fish diseases and disorders, vol. 3: Viral, bacterial and fungal infections*. CAB International, London.
- SUGUMAR, G., T. NAKAI, Y. HIRATA, D. MATSUBARA & K. MUROGA. 1998. *Vibrio splendidus* biovar II as the causative agent of bacillary necrosis of Japanese oyster, *Crassostrea gigas* larvae. *Disease of Aquatic Organisms* 33 (2): 111-118.
- VÁSQUEZ-YEOMANS, R. & J. CÁCERES-MARTÍNEZ. 2004. Herpes-like virus associated with eroded gills of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* adults in Mexico. *Journal of Shellfish Research* 23 (1).

Recibido: 24.II.2004

Aceptado: 6.V.2004

Apéndice VI. Artículos de divulgación derivados del presente trabajo de tesis.

Cáceres-Martínez, J. y R. Vásquez-Yeomans. 2003. Erosión branquial en el ostión Japonés *Crassostrea gigas* y su relación con episodios de mortalidad masiva en el NW de México. Boletín del Programa Nacional de Sanidad Acuícola y la Red de Diagnóstico, UAM – SAGARPA, Año 6, 1 (21): 15-18.

Vásquez-Yeomans, R. y J. Cáceres-Martínez. 2004. Infecciones virales en moluscos. Boletín del Programa Nacional de Sanidad Acuícola y la Red de Diagnóstico, UAM – SAGARPA. Año 7, 1 (25): 6-9.

Vásquez-Yeomans, R. y J. Cáceres-Martínez. 2004. Herpesvirus y mortalidades del ostión *Crassostrea gigas*, en el Noroeste de México. Boletín del Programa Nacional de Sanidad Acuícola y la Red de Diagnóstico, UAM – SAGARPA. Año 7, 1 (25): 10-11.

Cáceres-Martínez, J., Vásquez-Yeomans, R. y A.M. García-Ortega. 2004. Episodios de Mortalidad del ostión Japonés *Crassostrea gigas* en Baja California y su relación con bacterias. Boletín del Programa Nacional de Sanidad Acuícola y la Red de Diagnóstico, UAM – SAGARPA, Año 7, 2 (26): 1-3.

EROSIÓN BRANQUIAL EN EL OSTIÓN JAPONÉS *CRASSOSTREA GIGAS* Y SU RELACIÓN CON EPISODIOS DE MORTALIDAD MASIVA EN EL NW DE MÉXICO

Dr. Jorge Cáceres Martínez y Rebeca Vásquez Yeomans
Centro de Investigación Científica y Educación
Superior de Ensenada

El Cultivo del Ostión Japonés en el Noroeste de México

El ostión japonés *Crassostrea gigas* es ampliamente cultivado alrededor del mundo. Esta especie ha sido introducida de su región de origen en Japón, a países como Australia, Francia, Holanda, España, Portugal, Tailandia, Estados Unidos y Reino Unido.

En México, *Crassostrea gigas* se introdujo en 1973, en la Bahía de San Quintín, Baja California a una escala piloto, como resultado del plan de creación de los distritos de Acuicultura promovidos por la Dirección de Acuicultura del Departamento de Pesca (Figura 1). Posteriormente, en 1976 se llevaron a cabo los primeros cultivos experimentales en Baja California Sur en la Bahía de La Paz y para principios de 1980, el cultivo de ostión se amplió de manera importante en el noroeste del país, abarcando los estados de Sonora y Nayarit.

En la actualidad, el cultivo de ostión en Baja California y en otros estados del Noroeste de nuestro país está bien establecido, la producción anual es de unas 1,622 toneladas métricas anuales con un valor de 2.4 millones de dólares americanos, aproximadamente 1,800 empleos sostiene esta actividad.

A pesar de que se llegó a producir semilla de ostión en la Bahía Falsa en los años 80 y se produce actualmente en Sonora, la dependencia de semilla proveniente de Estados Unidos, es continua.

Las expectativas de crecimiento de esta actividad, aunque promisorias, se han visto afectadas por la desorganización del sector, el cierre de las exportaciones del producto a Estados Unidos debido a múltiples problemas de carácter administrativo, comercial, de certificación sanitaria, etc. y por la aparición de mortalidades masivas del ostión en la región.

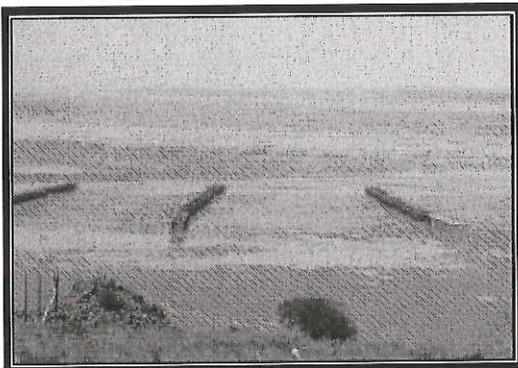


Figura 1. Cultivo de ostión japonés *Crassostrea gigas* en Bahía Falsa, B. C., México

Mortalidades Masivas de Ostión Japonés en el Noroeste de México

A partir de 1997, se comenzaron a detectar alarmantes episodios de mortalidad masiva de ostión, incluyendo semilla, juveniles y adultos en los estados de Sonora y Baja California Sur. Para Abril de 1998, episodios similares de mortalidad ocurrieron en la Bahía Falsa, Baja California. La alarma del sector se hizo patente y se realizaron tres reuniones de trabajo entre productores, autoridades acuícolas y académicos para tratar de determinar las causas de estas mortalidades y la forma de controlarlas.

Las reuniones se realizaron en Sonora (Foro Regional sobre la Problemática del Cultivo de Moluscos Bivalvos en el Noroeste de México, 2000), Baja California (Primera Reunión del Comité Regional del Programa de Moluscos Bivalvos en la Región Pacífico Norte, 2000) y Baja California Sur (Tercera Reunión Regional sobre la Problemática del Cultivo de Moluscos Bivalvos en el Noroeste de México, 2000), donde se determinó que entre las posibles causas asociadas con esas mortalidades estaban:

1. Aumento de temperaturas y condiciones ambientales propiciadas por el fenómeno de "El Niño" en 1997 y 1998.
2. Presencia de toxinas en el ambiente producidas por microalgas u otros organismos marinos.
3. Contaminación.
4. Cantidad y calidad de alimento disponible (fitoplancton).
5. Patógenos, o la sinergia producida por la interacción de dos o más de los factores antes mencionados. Aunque no ha sido posible lograr un financiamiento para un estudio integral en la zona, diversos laboratorios han realizado estudios sobre genética, capacidad de carga de la zona de cultivo, fitoplancton, etc.

Actualmente, se continúan reportando episodios de mortalidades inusuales en la región pero su duración y extensión han sido de menor escala.

Primeros estudios sobre el posible papel de un agente patógeno como causante de las mortalidades de ostión en la zona

Aquí presentamos los resultados de 6 años de trabajo enfocados a determinar el posible papel de un agente patógeno como causante de dichas mortalidades. Este estudio se realizó en varios puntos de la Bahía Falsa, Baja California, México de julio de 1997 a la fecha. Adicionalmente se analizaron muestras de ostiones provenientes de Baja California Sur y Sonora. Los primeros estudios histopatológicos mostraron una inflamación del tejido branquial (Figura 2) cuya prevalencia e intensidad fueron en aumento del inicio hacia finales de la primera fase del estudio en 1998, justo tres meses después de que los primeros episodios de mortalidad masiva se registraron en la Bahía Falsa.

En dos casos se detectó la presencia de células gigantes polimórficas conteniendo gránulos basófilos, núcleos hipertróficos y hemocitos diseminados alrededor de la lesión (Fig. 3). Simultáneamente, se observó la presencia de un protozooario del género *Trichodina* sp. (tricodinas) alrededor de las branquias y la cavidad del manto (Fig. 4), su abundancia fue en aumento del inicio al final de la primera etapa del estudio coincidiendo con el incremento en la inflamación del tejido branquial. Estos resultados, que se presentaron en las reuniones de trabajo para determinar las causas de los episodios de mortalidad que se han men-

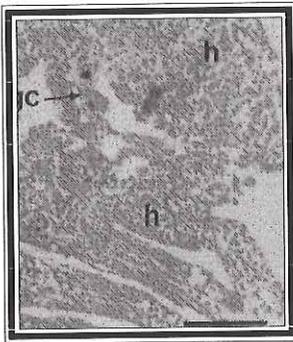


Figura 2. Inflamación de los filamentos branquiales en *Crassostrea gigas*, con la presencia de hemocitos (h) y algunas células gigantes polimórficas (gc)

2000), en foros nacionales e internacionales (Cáceres-Martínez y Vázquez-Yeomans, 2002; Cáceres-Martínez et al., 2002) y en revistas científicas (Cáceres-Martínez y Vázquez-Yeomans, 2003) mostraron tener cierta similitud con aquellos obtenidos cuando se estudiaron las mortalidades masivas del ostión Portugués *Crassostrea angulata* ocurridas en Europa en los años 60 cuando se determinó, indirectamente, que fueron provocadas por un virus, y a esta enfermedad se le denominó "Maladie des Branchies" (Marteil, 1969) o "Gill Necrosis Virus" como posteriormente se le identificó (Comps, 1988).

El Origen de la Necrosis Branquial por Virus (GNV)

En noviembre de 1966, se observaron los primeros síntomas de esta enfermedad en una población del ostión portugués *Crassostrea angulata* de La Tremblade, Francia (Marteil, 1969), para 1967 la epizootia se había extendido en la zona ostrícola de toda Francia. Posteriormente, se detectó en Gran Bretaña, España y Portugal y entre el 70 y 80% de los ostiones de áreas afectadas, mostraban necrosis en las branquias y en los palpos labiales (Marteil, 1969; Comps, 1988). Los estudios de ejemplares moribundos mostraron a nivel clínico las erosiones en las branquias, acompañadas en los casos más severos, de perforaciones y pústulas amarillentas e identaciones en forma de "V" en el borde superior de las branquias y, en otros casos, la casi total desaparición de la misma.

A nivel histopatológico, se encontraron inflamaciones y necrosis branquial, presencia de células polimórficas gigantes y tricodinas; de hecho se llegó a pensar que las tricodinas pudiesen ser la causa de las mortalidades detectadas en el ostión portugués.

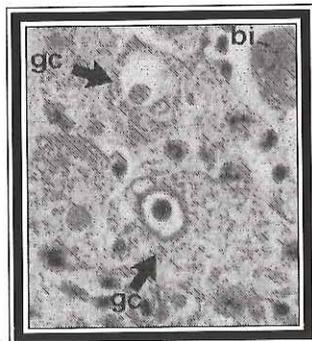


Figura 3. Células gigantes polimórficas (gc) e inclusiones basófilas (bi) en el tejido branquial de *Crassostrea gigas*

También se pensó que las células polimórficas pudiesen ser un protozoario parásito; sin embargo, estudios posteriores descartaron a las tricodinas como agente causal de



Figura 4. Tricodinas en tejido branquial de *Crassostrea gigas*

las mortalidades y se determinó mediante estudios de ultraestructura celular que las células polimórficas en las branquias del ostión, eran células infectadas por un virus. Los investigadores denominaron a esta enfermedad como "maladie des branchies" o "gill necrosis viral infection (GNV infection)", que en nuestro idioma sería necrosis branquial causada por infección viral. El nombre proviene justamente, de la necrosis branquial característica y de la presencia del virus.

También se demostró que las tricodinas eran invasores secundarios del tejido infectado. Se encontró que esta enfermedad también podía afectar al ostión Japonés *Crassostrea gigas* cultivado en la región de Marennes-Oléron, Francia; sin embargo, en esta especie no se apreciaron ni las perforaciones en branquias y palpos ni las manchas amarillentas (Marteil, 1969; Comps, 1988), concluyéndose que su efecto no era tan devastador. Un virus similar se detectó en branquias de *Crassostrea gigas* importadas a Francia desde Japón, Corea y Canadá entre 1966 y 1969; sin embargo, no se reportó ninguna comparación con el virus causante de la GNV y desde entonces no se han reportado agentes similares en branquias del ostión Japonés adulto (McGladdery, 1999). Se cree que después de 1968, el virus de la GNV permanece en estado enzoótico en poblaciones naturales del ostión Portugués en el río Sado, Portugal y en Cádiz, España (Comps y Masso, 1978), pero el estatus actual de la enfermedad no se conoce (McGladdery, 1999). La posición taxonómica precisa del virus de la GNV es aún incierta, en su morfología general, tamaño, morfogénesis intracitoplásmica y composición de ácidos nucleicos se asemeja a un iridovirus (Comps, 1988).

Otros estudios han encontrado virus tipo herpes en estos tejidos en larvas y juveniles de *Crassostrea gigas* y en adultos de *Crassostrea virginica* en Estados Unidos y *Ostrea angasi* en Australia (Renault, 1998; Renault et al., 2001; Arzul, et al., 2002) y no se puede descartar la posibilidad que este tipo de virus pueda, entonces, estar relacionado con los daños observados. Finalmente, es importante aclarar, que el virus que se asume causante de la GNV no fue aislado y no se hicieron los bioensayos correspondientes para demostrar su patogenicidad, la conclusión para designarlo como el agente causal está basada en información indirecta obtenida de las preparaciones histológicas observadas durante las epizootias en Europa y su relación con las lesiones branquiales (Comps, 1988).

Descubrimiento de erosión branquial y virus en el ostión Japonés cultivado en el Noroeste de México

A partir de esta información sobre el origen de la GNV, se inició un estudio de las características clínicas en ostiones de las zonas afectadas por la mortalidad en la Bahía Falsa

y en otras localidades de los estados de Sonora y Baja California Sur, para ver si se encontraban lesiones similares a aquellas descritas en el ostión Portugués infectado por la GNV.

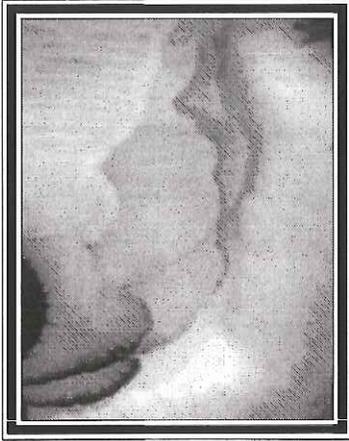


Figura 5. Erosión branquial en *Crassostrea gigas*

Las muestras obtenidas fueron de ostiones supervivientes a episodios de mortalidad y en ellos se encontraron las lesiones branquiales descritas para la GNV (Figura 5) pero no las perforaciones ni pústulas amarillentas ni casos de pérdida total de la branquia, probablemente por no tener acceso a ejemplares moribundos, o por que, como lo señaló Marteil (1969) en el ostión Japonés la sintomatología no es tan dramática.

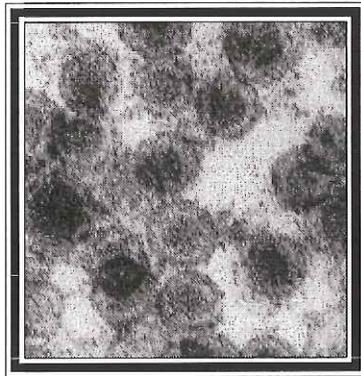


Figura 6. Virus en tejido branquial de *Crassostrea gigas*

A nivel histopatológico se continuó observando inflamación, necrosis branquial en algunos casos y células con núcleos picnóticos.

También se observaron procesos de cicatrización en las zonas apicales de las branquias afectadas donde se tomaron muestras para su observación por microscopía electrónica de transmisión, las cuales se enviaron al Laboratorio Nacional de Referencia de Enfermedades de Moluscos de España y al Laboratorio de Microscopía Electrónica de la Universidad Estatal de San Diego, California.

Los primeros resultados mostraron presencia de bacterias asociadas al tejido infectado, pero recientemente se obtuvieron las imágenes que demuestran la presencia de virus dentro de las células del tejido branquial inflamado (Fig 6) (Vásquez-Yeomans; Cáceres-Martínez, en prensa).

La erosión branquial en el ostión japonés cultivado en el Noroeste de México y los episodios de mortalidades masivas en la región

Los resultados obtenidos sugieren que la GNV o una enfermedad con características casi idénticas, afecta al ostión Japonés cultivado en México poniendo en evidencia una serie de cuestionamientos que requieren una investigación detallada y un financiamiento urgente y suficiente para este tipo de estudios. La primera pregunta se refiere a la identidad del virus (iridovirus, herpesvirus u otro), es necesario identificar con toda precisión al virus encontrado en México, para esto, además de la microscopía electrónica de transmisión y tinciones histoquímicas, es necesario el estudio de los ácidos nucleicos mediante técnicas moleculares las cuales ya se están implementando. La siguiente pregunta es, si se trata del mismo agente causal, ¿Porqué el ostión Japonés de las zonas históricamente afectadas por esta enfermedad en Europa no han sufrido mortalidades masivas en la actualidad por GNV y esta especie de ostión sí ha sido dramáticamente afectada por el virus en México? Las respuestas son diversas y se deben realizar los estudios de patogenicidad correspondientes, además, pueden estar asociadas desde la posible mutación del virus y aumento de su virulencia, el efecto diferencial de las condiciones ambientales en aguas Mexicanas respecto a las condiciones en Europa que pudieran hacer más vulnerable a esta especie, la existencia de un virus similar que causa efectos también parecidos, hasta la influencia de la escasa variabilidad genética que se ha encontrado en los ostiones cultivados en Bahía Falsa, B. C. que, potencialmente afecta negativamente a sus mecanismos de defensa. Por lo anterior es urgente ahondar en la respuesta a estos cuestionamientos.

Control de la erosión branquial asociada a virus en México

La Oficina Internacional de Epizootias no ha incluido a la GNV como enfermedad certificable; sin embargo, la legislación nacional (NOM-010-PESC 1993 y NOM-011-PESC-1993) sí la contempla, aunque no indica cómo debe detectarse y como se ha mostrado aún falta mucha información básica al respecto para implementar una regulación adecuada y con bases sólidas, en caso de que se confirmara que esta enfermedad es la que está provocando las mortalidades de ostión japonés en el Noroeste de México.

Hasta el momento la única forma de detectar al virus causante de la GNV u otro similar ha sido por un laborioso proceso de estudios clínicos, histopatológicos y de microscopía electrónica. Recientemente ya se han desarrollado sondas moleculares para detección de herpesvirus de ostión en Europa (Renault *et al.*, 2000), mismas que se están aplicando en este caso y en conjunto con el Laboratorio de Enfermedades de Moluscos de España.

En nuestra experiencia, ha sido muy costoso el llegar a detectar estas partículas virales en los tejidos dañados y aún nos enfrentamos a la necesidad de identificar con toda precisión al virus y hacer los estudios de infectología obligados para demostrar científicamente que este virus es el agente causal de las mortalidades en la zona. La literatura internacional señala que no se conocen métodos de prevención o control de esta enfermedad u otras similares y se recomienda no trasladar ostiones de áreas afectadas con la enfermedad (actual o histórica) a áreas donde la enfermedad no ha sido observada. Ante este escenario el

panorama puede ser sombrío; sin embargo, recordemos que hemos aprendido a coexistir con diferentes virus que afectan a la acuicultura, tan solo se mencionan los casos de virus en camarón y aún así la producción ha continuado.

También se debe recordar que la intensidad y extensión de estas mortalidades ha venido disminuyendo. Sin embargo, esto muestra que se debe ser muy exigentes respecto a la calidad sanitaria de nuestros cultivos y en apoyar la investigación sanitaria que nos de más y mejores elementos para la supervivencia de la acuicultura.

¿Qué hacer?

Independientemente de determinar la identidad taxonómica precisa del virus encontrado, (iridovirus, herpesvirus u otro) y de demostrar contundentemente que es el causante de las mortalidades ocurridas en la zona, se pueden tomar una serie de medidas sanitarias que ayudarán a una producción más saludable, entre otras:

- ?? De acuerdo a la Norma NOM—010—PESC— 1993, se debe exigir un certificado sanitario a los laboratorios en donde se adquiera la semilla de ostión. Lo mismo debe exigirse si se piensa adquirir juveniles o adultos, este certificado debe estar respaldado por las autoridades sanitarias del país en donde se adquieran los ostiones.
- ?? No realizar transferencias de lotes de ostión en cualquiera de sus fases de desarrollo entre localidades diferentes sin contar con un estudio sanitario de dichas zonas, en donde se muestre la calidad sanitaria de las mismas y si hay riesgo de trasladar alguna enfermedad no presente en la localidad receptora.
- ?? En conjunto con la autoridad sanitaria promover el establecimiento de laboratorios de diagnóstico sanitario que confirmen la calidad sanitaria de los lotes que se introducen al País, dotándoles del equipo necesario y capacitando al personal de acuerdo al grado de especialización que ameriten estos estudios.
- ?? Capacitar al personal de la granja de cultivo respecto a las medidas sanitarias obligadas para proteger a la producción. Por ejemplo el mantenimiento de instalaciones limpias, implementos de cultivo desinfectados, uso de maniluvios y pediluvios, filtración y desinfección del suministro de agua, depósito adecuado de desechos (conchas, restos orgánicos), supervisión sanitaria, etc, el embate de infecciones virales se reduce considerablemente.
- ?? Promover el establecimiento de laboratorios nacionales para producción de semilla de ostión y otros moluscos, certificados desde el punto de vista sanitario.
- ?? Promover una reconciliación efectiva entre productores y académicos para que los primeros, apoyen proyectos de investigación sanitaria de forma directa mediante fideicomisos o alguna estructura no burocrática. Entre estos proyectos de investigación está el buscar ejemplares resistentes a la enfermedad.
- ?? Vigilar la calidad genética de los ostiones que se pretende adquirir, buscando una garantía respecto a una variabilidad genética adecuada.

Agradecimientos

Estos resultados se han obtenido gracias al financiamiento del CONACYT, proyecto 3933 de 1997 a 1999, proyecto interno del CICESE 623106 desde 1994 a la fecha, PRONALSA 2001 y a recursos propios del Instituto de Sanidad Acuicola, A. C. de 2002 a la fecha. Agradecemos también a los ostricultores de la Bahía de San Quintín, B. C. por su invaluable ayuda en este estudio.

Literatura citada

- Arzul, I., Renaul, T., Thébault, A. and A. Gérard. 2002. Detection of oyster herpesvirus DNA and proteins in asymptomatic *Crassostrea gigas* adults. *Virus Res.*, 84: 151-160.
- Cáceres-Martínez, J. 2000. Resultados de los análisis patológicos efectuados a ostiones del Pacífico. Foro Regional sobre la Problemática en el Cultivo de Moluscos Bivalvos en el Noroeste de México. Hermosillo, Son., México. 21 de enero de 2000.
- Cáceres-Martínez, J. y R. Vázquez-Yeomans. 2002. Agentes patógenos asociados a las mortalidades del ostión japonés, *Crassostrea gigas*, cultivado en Bahía Falsa, B. C., México. Congreso Bahía San Quintín en el 2002. Ensenada, B. C., México del 17 al 19 de abril.
- Cáceres-Martínez, J. and R. Vázquez-Yeomans. 2003. Presence of giant polymorphic cells in *Crassostrea gigas* cultured in Bahía Falsa, Baja California NW México. *Journal of Shellfish Research*. En prensa.
- Comps, M. and R. M. Masso. 1978. Study with fluorescent technique of the virus infections of the Portuguese oyster *Crassostrea angulata* Lmk. In: *Proceedings of the International Colloquium on Invertebrate Pathology*, 11-17 September, 1978, Prague, Czechoslovakia. American Fisheries Society, pp. 39-40.
- Comps, M. 1988. Epizootic diseases of oysters associated with viral infections. *American Fisheries Society Special Publication*, 18: 23-37.
- Hoyos-Chairez, F. J. 2000. Descripción de las mortalidades masivas de ostión del pacífico y otros moluscos bivalvos durante 1997-1999, en Sonora. Foro Regional sobre la Problemática en el Cultivo de Moluscos Bivalvos en el Noroeste de México. Hermosillo, Son., México. 21 de enero de 2000.
- Marteil, L. 1969. Données générales sur la maladie des branchies. *Revue des Travaux de l'Institut des Pêches Maritimes*, 33 (2): 145-150.
- McGladdery, S. E. 1999. Shellfish diseases (viral, bacterial and fungal). En: *Fish Diseases and Disorders*, Volume 3: *Viral, Bacterial and Fungal Infections*. Woo, P. T. K. and D. W. Bruno (eds). CAB International.
- Renault, T., Le Deuff, R. M., Lipart, C. and C. Delsert. 2000. Development of a PCR procedure for the detection of a herpes-like virus infecting oysters in France. *Journal of Virological Methods*, 88: 41-50.
- Renault T. and I. Arzul. 2001. Herpes-like virus infections in hatchery-reared bivalve larvae in Europe: specific viral DNA detection by PCR. *Journal of Fish Diseases* 24: 161-167.
- Vázquez-Yeomans, R. and J. Cáceres-Martínez. 2003. Confirmation of viral particles associated with Gill Necrosis in cultured *Crassostrea gigas* from NW Mexico. *Journal of Shellfish Research*.



Casa abierta al tiempo
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
XOCHIMILCO

Programa Nacional de Sanidad Acuícola y la Red de Diagnóstico



MARZO 2004

Año. 7 Volumen. I Número. 25

ÍNDICE Pág

¿LOS VIBRIO SP, SON AGENTES PATÓGENOS IMPORTANTES PARA EL CULTIVO DE CAMARÓN? 1

Gabriel Aguirre Guzmán
Universidad Autónoma de Tamaulipas Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

COMO CLASIFICAR Y NOMBRAR A LOS VIRUS 3

Rebeca Vásquez Yeomans y Jorge Cáceres Martínez
Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada B. C.

INFECCIONES VIRALES EN MOLUSCOS 6

Rebeca Vásquez Yeomans y Jorge Cáceres Martínez
Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, B. C.

HERPEVIRUS Y MORTALIDADES DEL OSTIÓN *Cassostrea gigas* EN EL NOROESTE DE MÉXICO 10

Rebeca Vásquez Yeomans, Jorge Cáceres Martínez y Mauricio García Ortega.
Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. B. C.



¿LOS VIBRIO SP, SON AGENTES PATÓGENOS IMPORTANTES PARA EL CULTIVO DE CAMARÓN?

Gabriel Aguirre Guzman
Universidad Autónoma de Tamaulipas

La camaronicultura es un área que ha tenido un gran desarrollo desde finales del siglo pasado, sin embargo, los organismos bajo cultivo son susceptibles a diferentes agentes patógenos. Varios de estos agentes, han sido reportados como elementos causantes de enfermedades catastróficas para la producción de camarón y han generado un colapso para esta industria en distintos países como China, Tailandia, Indonesia, Taiwán y Ecuador.

Normalmente, cuando se habla de agentes patógenos causantes de grandes pérdidas para la industria camaronícola se refieren a virus, debido a lo espectacular del daño y al corto periodo en que se observan los efectos. Sin embargo, existe otro conjunto de patógenos que también causan importantes daños en la producción de camarón.

Diferentes especies de *Vibrio* han sido reportados a nivel mundial (Fig. 1), como los agentes causantes de serias pérdidas en la producción del camarón de granja, generando mortalidades que han llegado a ser hasta del 100%, particularmente en postlarvas y juveniles.

La camaronicultura, al igual que el resto de los sistemas acuiculturales, crea un medio ambiente artificial que favorece la selección, adaptación, y crecimiento de diversos agentes infecciosos, que

son parte de la microbiota acuática y del organismo en sí.

Este fenómeno no representa un riesgo para la salud del mismo, excepto cuando éste posee alguna deficiencia nutricional, inmunológica, o genética, y/o que esté bajo estrés ambiental.

Los vibrios son agentes patógenos oportunistas que pueden tomar ventaja de los cambios ecológicos generados durante el cultivo, constituyendo además un importante elemento de la población bacteriana del camarón y del medio ambiente que los rodea, siendo por lo tanto una fuente constante de posibles infecciones para estos organismos.

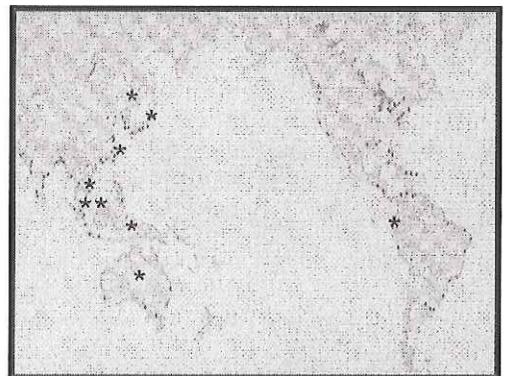


Figura 1. Países que han reportado pérdidas en su producción camaronícola (*) causada por diferentes especies de *Vibrio* sp

Las enfermedades generadas por este tipo de bacterias han sido descritas como: vibriosis, enfermedad bacterial, septicemia bacteriana de los peneidos, vibriosis de los peneidos, vibriosis luminiscente, y enfermedad de las patas rojas. Los camarones que han sido afectados por alguna especie patógena de *Vibrio* spp., muestran

Finalmente, el ADN proviral integrado es transcrito por la propia maquinaria de la célula huésped a ARN, el cual es traducido a proteínas virales o es empaquetado dentro de la cubierta proteica del virión para formar más viriones.

Clasificación de los virusoides y viroides

Los satélites (virusoides) y viroides no están oficialmente clasificados por el ICTV de la misma manera que un virus convencional. Sin embargo, los criterios que se han establecido para dividir a los satélites virales de plantas en 4 grupos son los siguientes:

- 1) **Tipo A.** Un ARN de más de 700 nt el cual codifica a una proteína estructural de la cápside formando partículas satélites específicas.
- 2) **Tipo B.** Un ARN de más de 700 nt que codifican a una proteína no estructural.
- 3) **Tipo C.** Un ARN lineal de menos de 700 nt los cuales no codifican a proteínas.
- 4) **Tipo D.** Un ARN circular de menos de 700 nt que no codifican a proteínas.

De manera similar los viroides no son reconocidos oficialmente por la ICTV, pero están agrupados con base en la secuencia conservada de nucleótidos de la región central, la cual está implicada en la replicación (ICVT, 003).

LITERATURA CITADA

- Cann, A. J. 1997. Principles of molecular virology. 2 nd ed. Academic Press. 310 p.
- Comps, M. 1988. Epizootic diseases of oysters associated with viral infections. American Fisheries Society Special Publication, 18: 23-37
- International Committee on Taxonomy of Virus. 2003.
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTV/>.
- Lwoff, A., R. W. Horne y P. Tournier. 1962. A system of viruses. Cold Spring Harb Series Quant Biol., 27: 51-55
- Voyles, B. A. 2002. The biology of viruses. 2 nd ed. McGraw-Hill Higher Education. 408 p.

INFECCIONES VIRALES EN MOLUSCOS

Rebeca Vásquez Yeomans y Jorge Cáceres Martínez
Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, B.C.

El conocimiento de las epizootias en moluscos se ha asociado, tradicionalmente, con bacterias, hongos o protozoos con un mínimo de atención a las enfermedades causadas por virus. Sin embargo, este enfoque está cambiando ya que se han encontrado diversos virus como agentes causantes de epizootias.

El estudio de los virus en moluscos inició a principio de los años 70's con dos reportes sobre los patógenos virales de los cefalópodos. Para los moluscos bivalvos cultivados comercialmente, el primer registro de la presencia de un virus fue dado por Farley *et al.* (1972) en el ostión americano *Crassostrea virginica*. En este estudio se encontraron inclusiones intranucleares comparables a las asociadas con infecciones del virus del herpes de otros animales.

Iridovirus

El primer reporte de observaciones ultraestructurales de virus asociados a mortalidades masivas en el ostión portugués, *Crassostrea angulata*, se debe a Comps *et al.*, (1976), en el se menciona la presencia de zonas con partículas virales en el citoplasma de células hipertrofiadas. Estas partículas mostraron una forma hexagonal y con un diámetro de 450 nm (nanómetros) en promedio. Las características mostradas y en particular, su modo de desarrollo, lo relacionan íntimamente con el grupo de los iridovirus.

Estos virus causaron elevadas mortalidades, tan significativas, que destruyeron casi en su totalidad los cultivos de ostión de *C. angulata* en Francia; posteriormente, esta enfermedad se encontró en España y en Portugal en *C. angulata* y *C. gigas*. Sin embargo, no se obtuvo información sobre el modo de transmisión del virus ni se indujo experimentalmente la enfermedad.

Mortalidades masivas en larvas de *Crassostrea angulata* en Francia entre 1970 y 1973 también fueron atribuidas a un Iridovirus. Esta enfermedad se denominó infección hemocítica viral o HIV. Los organismos mostraron una decoloración en la glándula digestiva, ruptura del tejido conectivo e infiltración hemocítica (Comps *et al.*, 1976).

En 1978, Leibovitz *et al.*, atribuyeron mortalidades de larvas de *C. gigas*, a un virus tipo Iridovirus. El virus afectó a larvas de 150 μ y causó lesiones en el velo

y otros epitelios ciliados por lo que se conoce como Enfermedad del velo del ostión (*Oyster Velar Virus Disease*). El virus mostró una simetría icosaédrica, con un diámetro de aproximadamente 228 nm y una cápside de 20.6 nm de grosor compuesta por una membrana bilaminar. Los cuerpos de inclusión son positivos a la tinción histoquímica de Feulgen por lo que se demuestra que son virus de ADN.

La morfogénesis de las partículas virales se inicia con la formación de cápsides alrededor del viroplasma, el cual se observa de forma irregular y termina con la formación de un denso núcleo viral. La ocurrencia estacional de la OVVD sugiere que existe un hospedero (u hospederos) secundario que funciona como reservorio y que permite reinfectar a las larvas de ostión. Una posibilidad del hospedero alternativo pudieran ser los ostiones adultos. Sin embargo, no se han encontrado evidencias de la presencia del virus en los organismos adultos. Actualmente se desconocen los factores ambientales que afectan la susceptibilidad de las larvas a esta enfermedad.

Herpesvirus

La primera descripción de una partícula viral tipo herpes en el ostión Americano, *Crassostrea virginica*, fue documentada por Farley *et al.* (1972) quienes sugirieron que la infección por herpesvirus es enzoótica (entendiéndose por ese término como la enfermedad que prevalece en una población de organismos) bajo condiciones óptimas de temperatura pero una elevada temperatura del agua parece favorecer la dispersión de la infección o activa la infección. Lo anterior concuerda con lo reportado por otros autores que ha hecho una revisión de las infecciones causadas por herpesvirus en los organismos marinos y han concluido que estos virus son capaces de estar latentes en el hospedero y permanecer así durante toda la vida del mismo y ser reactivados muchos años después de la infección primaria; además, pueden causar enfermedad bajo condiciones de cultivo y por estrés debido a altas temperaturas.

La infección causada por los virus tipo Herpes se han registrado en cinco especies distintas de ostiones, incluyendo a las larvas y juveniles del ostión japonés *Crassostrea gigas* (Figura 1) (Renault *et al.*, 2000).

Hine *et al.* (1992) describieron la morfología y virogénesis del herpesvirus asociado con mortalidades en larvas de *Crassostrea gigas*. Las larvas tuvieron crecimiento y desarrollo retardado con mortalidades entre los días 7 y 11 después del desove.

La ultraestructura mostró en el núcleo partículas vira-

les de morfología hexagonal, con un diámetro de 97 nm; los viriones encapsulados midieron aproximadamente 131 nm. La nucleocápside se forma en el núcleo y pasa a través de la membrana nuclear interna para ser envuelta en el espacio perinuclear y pierde su envoltura al pasar por la membrana externa del núcleo, hacia el citoplasma. En el citoplasma las nucleocápsides se concentran en cuerpos densos, complejo Golgi, desde donde brotan hacia las cisternas de Golgi para ser envueltos, con o sin un tegumento amorfo que probablemente deriva del mismo complejo. Los viriones envueltos en vesículas son liberados en la superficie celular. Además encontraron en el espacio extracelular nucleocápsides vacías posiblemente derivadas de la lisis de células infectadas (Fig. 1).

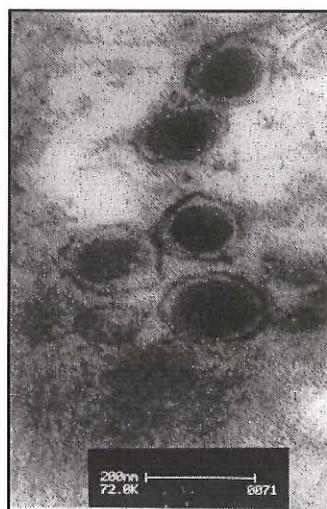


Figura 1. Partículas virales donde se observan las cápsides del herpes

El herpesvirus reportado por Hine *et al.* (1992) se asemeja a la subfamilia Betaherpesvirinae (Cytomegalovirus CMV) en el alargamiento de la célula infectada y su núcleo, la presencia de sacos intranucleares conteniendo elementos tubulares, la envoltura temporal y la desenvoltura cuando la nucleocápside pasa a través de la membrana nuclear y la asociación con cuerpos densos/Golgi en el citoplasma. Además, el anillo ovoide del material nuclear es similar al reportado para la infección de los cytomegalovirus en humanos. Por la infección natural en las larvas se sugiere que esta contaminación viral se presenta muy tempranamente y puede ser el resultado de una transmisión vertical de los progenitores. Partículas virales con morfología similar se encontraron en larvas de *Crassostrea gigas* infectadas experimentalmente.

La patogénesis de este virus se demostró por transmisión experimental de la enfermedad a larvas axénicas de *Crassostrea gigas*. Las larvas mostraron síntomas de la enfermedad a las 48 horas de haber sido inoculadas con la suspensión viral (larvas frescas y larvas a -20°C). Estudios de microscopía electrónica mostraron la presencia de partículas virales en el núcleo de las células del tejido conectivo del velo. Al tercer y cuarto día los viriones aún se mostraban en el núcleo pero también en el citoplasma mostrando un estadio tardío de la infección. En ambos casos, las partículas virales exhibieron las mismas características. La rápida transmisión de la enfermedad indica que el virus tiene un ciclo de replicación muy corto semejante a los herpesvirus de la subfamilia *Alphaherpesvirinae*. Un herpes virus también se encontró en ostiones de cinco meses de edad de *Ostrea edulis* y se sospecha que fue el responsable del 90% de la mortalidad observada en estos animales.

Las mortalidades en larvas y semillas se han reportado que se presentan en los meses con máximas temperaturas (julio y febrero, para el hemisferio norte y sur, respectivamente). Aparentemente el herpes virus es endémico de ciertas áreas de cultivo y su expresión es promovida por altas temperaturas.

Se han demostrado los efectos de la temperatura en la expresión del herpesvirus en *C. gigas*. Mortalidades de larvas a temperaturas de 25 a 26°C ocurrieron de manera repentina alcanzando el 100% a los 6 y 13 días de cultivo. Anormalidades nucleares que se observaron en las larvas cultivadas entre 22 a 23°C en microscopía óptica, donde no se observaron partículas virales en microscopía electrónica, sugieren que hay una baja producción viral, expresándose la proteína viral en asociación con una verdadera fase latente viral, o hay un estado no productivo, donde las partículas virales no se producen. En este caso se pueden plantear dos hipótesis, una de ellas se basa en que existe una verdadera fase latente del virus, donde se expresa la proteína viral. Segundo, las alteraciones nucleares pueden ser resultado de un ciclo viral abortivo, en el cual algunas fases tempranas del ciclo viral son alcanzadas, con síntesis de proteínas estructurales o funcionales y eventualmente la replicación del ADN viral, pero sin la producción de los viriones lo que trae como consecuencia que las células infectadas cambian su aspecto estructural.

Es importante señalar que los virus de la familia Herpesviridae, tienen un ciclo viral poco productivo

o abortivo y generalmente está asociado con una posterior "inactivación" del virus para entrar a un estado latente. Conociendo esto se pueden considerar a las larvas cultivadas en las temperaturas de 22 a 23°C como potencialmente peligrosas, porque aunque no hayan manifestado una enfermedad (asintomáticas), éstas funcionarían como larvas portadoras del virus. De esta manera, estos portadores pueden representar verdaderos reservorios del virus y con el tiempo transmitir a este agente.

Un diagnóstico presuntivo puede basarse en observaciones histológicas de células típicamente alargadas con cuerpos de inclusión intranucleares. La infección da como resultado un núcleo hipertrofiado de las células del tejido conectivo, células epiteliales del velo y manto. Para el diagnóstico confirmativo se utilizan observaciones de microscopía electrónica.

Se han informado de infecciones por virus tipo herpes en los géneros *Ostrea*, *Crassostrea* y *Tiostrea*. Algunos autores mencionan que las infecciones por herpes virus en bivalvos parecen ubicuas y las mismas están asociadas con niveles de mortalidad elevados (Fig. 2).

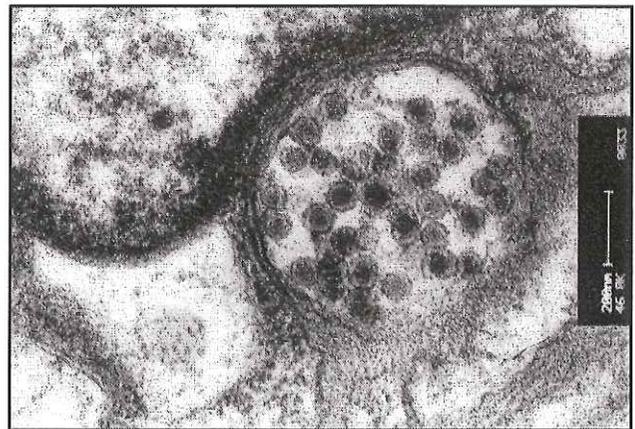


Figura 2. Vacuola que contiene a los virus y que está junto al núcleo de la célula branquial del ostión

En 2001, Renault *et al.* reportaron la presencia de herpes virus en larvas de la almeja *Ruditapes philippinarum*. De acuerdo a los análisis ultraestructurales y a los efectos citopatogénicos, este virus está relacionado con el herpesvirus que se ha encontrado en *Crassostrea gigas*. Posteriores estudios demostraron la transmisión viral interespecífica donde un herpesvirus que infecta a *R. philippinarum* puede transmitir a

C. gigas, y un herpesvirus que infecta a *C. gigas* puede transmitir el virus a larvas de *Crassostrea angulata*, *Crassostrea rivularis* y *Ostrea edulis*. No se conoce aún si esta transmisión se presenta en poblaciones silvestres o sólo en criaderos. La detección del virus tipo herpes en varias especies de bivalvos, acentúa el riesgo que representa el cultivar a varias especies en una misma granja o a la transfaunación.

Los herpesvirus se han encontrado en larvas y semillitas pero también en adultos. Lo anterior determina la importancia de conocer el origen de los progenitores, en caso de que la transmisión del virus sea vertical. Algunos autores, aplicando técnicas moleculares, han encontrado virus tipo herpes en ostiones adultos asintomáticos. Estos resultados sugieren que el virus, después de la infección primaria, es capaz de permanecer en su hospedero sin inducir la enfermedad o mortalidad. Esta capacidad de persistir es común en todos los miembros de la familia *Herpesviridae*, lo que queda por responder es si persiste bajo una fase latente o con bajos niveles de expresión de proteínas. Por nuestra parte, hemos confirmado la presencia de herpesvirus en tejido branquial del ostión japonés *Crassostrea gigas* en Baja California y actualmente están realizando estudios de infectología para determinar si dichos virus están relacionados con los episodios de mortalidad que han venido ocurriendo desde 1997 en la zona y en su caso, sobre las medidas preventivas y correctivas que pudieran aplicarse para proteger la producción ostrícola de la zona (Cáceres-Martínez y Vásquez-Yeomans 2003, Vásquez-Yeomans *et al.* 2004).

Birnavirus, papillomavirus y otros virus

Virus de la familia *Birnaviridae*, virus de ARN, han sido aislados de la glándula digestiva de *Tellina tenuis*, *Crassostrea gigas*, *Crassostrea virginica* y *Ostrea edulis* utilizando líneas celulares de peces. Infecciones experimentales de este virus en ostión, causaron extensas infiltraciones hemocíticas y necrosis en la glándula digestiva. Sin embargo, no se ha determinado con claridad la importancia de este virus.

Hipertrofia en células gonádicas se han documentado en el ostión americano *Crassostrea virginica* en Estados Unidos y Canadá. La hipertrofia se ha asociado con la presencia de un virus tipo Papillomavirus de la familia *Papovaviridae*.

Este virus tiene simetría icosaédrica y genoma de ADN. Las partículas virales sin cápside miden entre 43 a 55 nm. La replicación viral es intranuclear y

provoca una hipertrofia masiva de los gametos y del epitelio germinal. Aunque se aprecia una respuesta celular del hospedero con la agregación de hemocitos, su presencia no se ha asociado a mortalidades masivas. Infecciones similares se reportan en *Crassostrea gigas* cultivado en México.

Las enfermedades virales en moluscos comienzan a emerger, no porque no existiesen antes, sino porque los nuevos conocimientos sobre virología en invertebrados comienzan a brindar nuevas y mejores herramientas para su estudio.

Sin duda alguna, la importancia de estas enfermedades de organismos de gran valor económico, como el camarón, han impulsado su estudio en otras especies.

LITERATURA CITADA

- Cáceres-Martínez, J. y R. Vásquez-Yeomans. 2003. Presence of giant polymorphic cells in *Crassostrea gigas* cultured in Bahía Falsa, Baja California NW México. *Journal of Shellfish Research*, 22 (3): 711-714.
- Comps, M. y J. L. Duthoit. 1976. Infection virale associée à la "maladie des branchies" de l'huître portugaise *Crassostrea angulata* Lmk. *Comptes Rendus Hebdomadaire des Séances de l'Académie des Sciences, Série D, Sciences Naturelles*, 283: 1595-1596.
- Farley, C. A., Banfield, W. G., Kasnic, Jr., G. y W. S. Foster. 1972. Oyster herpes-type virus. *Science*, 178: 759-760.
- Hine, P. M., Wesley, B. y B. E. Hay. 1992. Herpesviruses associated with mortalities among hatchery-reared larval Pacific oysters *Crassostrea gigas*. *Disease of Aquatic Organisms*, 12: 135-142.
- Leibovitz, L., Elston, R. A., Lipovski, V. P. y J. Donaldson. 1978. A new disease of larval Pacific oysters. *Proceedings of the World Mariculture Society*, 9: 603-615.
- Renault, T., Le Deuff, R-M., Lipart, C. y C. Delsert. 2000. Development of a PCR procedure for the detection of a herpes-like virus infecting oysters in France. *Journal of Virological Methods*, 88: 41-50.
- Renault, T., Lipart, C. e I. Arzul. 2001. A herpes-like virus infecting *Crassostrea gigas* and *Ruditapes philippinarum* larvae in France. *Journal of Fish Diseases*, 24: 369-376.
- Vásquez-Yeomans, R., J. Cáceres-Martínez y A. Figueras. 2004. Herpes like virus associated with eroded gills of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* adults in Mexico. *Journal of shellfish Research* 23(2) 000-000.

HERPEVIRUS Y MORTALIDADES DEL OSTIÓN *Crassostrea gigas* EN EL NOROESTE DE MÉXICO

Rebeca Vásquez-Yeomans, Jorge Cáceres Martínez y Mauricio García Ortega.

Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. B. C.

Introducción

Las mortalidades del ostión japonés *Crassostrea gigas* no son nuevas, estas han estado asociadas a su cultivo desde los años 50's, cuando en Japón, EUA y Canadá se registraron episodios dramáticos de mortalidad sin que se haya podido establecer una causa directa. En la costa oeste de EUA, estas mortalidades han sido recurrentes y han variado en intensidad durante las últimas tres décadas, del 30% hasta el 90%. Inicialmente a este fenómeno se le empezó a conocer como "mortalidades de verano", ya que se presentaban más frecuentemente durante esos meses en ambos hemisferios y afectaban a organismos adultos. Se pensó entonces que podrían estar asociadas con un estrés reproductivo que terminaba por matar grandes cantidades de ostiones exhaustos por el esfuerzo. Sin embargo, los estudios no han sido concluyentes ya que en muchos casos se ha demostrado que no hay una relación entre el esfuerzo reproductivo y la mortalidad. También se ha visto que estas mortalidades dramáticas afectan ejemplares de todas las tallas y pueden ocurrir en diferentes estaciones del año. Los estudios sobre condiciones ambientales asociadas con estos episodios de mortalidad han mostrado que suelen ocurrir en ambientes en donde la temperatura rebasa los 18°C, hay escasa circulación y elevada turbidez, poca profundidad y plancton abundante.

Agentes patógenos

Los estudios sobre agentes patógenos han aportado diversos resultados: en la costa oeste de EUA se encontró que la bacteria *Nocardia crassostreae* que provoca la enfermedad conocida como Nocardiosis, era el agente causal de algunas mortalidades; sin embargo, no explicaba la ocurrencia de todas ellas. Otros estudios en Europa demostraron que la bacteria *Vibrio splendidus* estaba asociada a eventos de mortalidad en larvas y juveniles, no así en adultos. Estudios realizados en el IFREMER en Francia encontraron un Herpes virus asociado a mortalidades de larvas y semilla. En todos estos casos, si bien se ha encontrado un agente causal de mortalidades, estos no explican los eventos recurrentes de mortalidades inexplicables en diferentes partes del mundo.

Herpes virus en el Noroeste de México

El cultivo del ostión japonés en el Noroeste de México también ha sido fuertemente afectado por estas mortalidades desde 1987. Los estudios que se han llevado a cabo por parte del CICESE y el Instituto de Sanidad Acuícola en México, mostraron una serie de signos clínicos e histopatológicos en ostiones juveniles y adultos de zonas afectadas por las mortalidades, asociados con un virus y dados a conocer a partir de 1999. En el 2003 se confirmó mediante microscopía electrónica de transmisión que, efectivamente, un virus estaba asociado a tales signos patológicos. La ultraestructura del virus demostró que se trata de un Herpesvirus. Recientemente confirmamos este resultado en ostiones del Noroeste de México por la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), utilizando un control positivo proporcionado por el IFREMER. La presencia de este virus y las alteraciones histopatológicas y clínicas asociadas sugieren que puede estar jugando un papel importante en las mortalidades que se han venido observando. Para confirmar esto es necesario hacer diversas pruebas de infectología y recuperación del agente viral.

Modelo de interacción del Herpes virus con los ostiones en cultivo

Independientemente de esta confirmación, el potencial patológico del Herpes virus y su forma de actuar con el hospedero, nos obliga a tomar una serie de medidas sanitarias. Para tal efecto construimos un modelo de interacción (Fig. 1) con base en los conocimientos actuales del funcionamiento de herpesvirus:

- Existen evidencias de transmisión vertical de Herpes virus en moluscos.

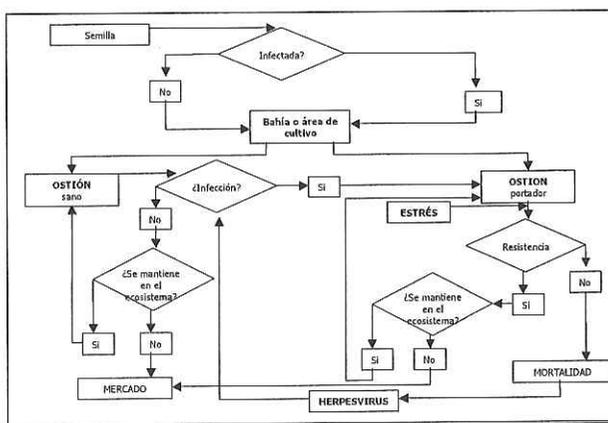


Figura 1. Modelo de posible interacción del Herpes virus en una zona de cultivo de ostión

- Se ha confirmado la transmisión horizontal de Herpes virus en moluscos.
- Se sabe que el herpesvirus puede estar en fase inactiva durante un tiempo.
- Se sabe que el Herpesvirus puede entrar en fase activa bajo condiciones de estrés del hospedero.
- Se sabe que el Herpesvirus puede permanecer en otras especies en el ambiente.

Las condiciones ambientales adversas asociadas a las mortalidades de ostión que describimos al inicio de éste artículo son propicias para la acción negativa de este virus, mismas que son más extremas en las lagunas y Bahías en el estado de Sonora respecto a Baja California y Baja California Sur, donde las mortalidades han sido relativamente menores (Fig. 2).

Medidas sanitarias para el control de Herpesvirus

Esta información nos permitió proponer las siguientes medidas sanitarias que hemos dado a conocer a productores y autoridades de la zona:

- 1) Solicitar un certificado sanitario incluyendo diagnóstico para Herpesvirus a los laboratorios donde se adquiera la semilla de ostión. Lo mismo debe solicitarse si se piensa adquirir juveniles o adultos. El certificado debe estar respaldado por las autoridades sanitarias del país donde se adquieran los ostiones.
- 2) No realizar transferencias de lotes de ostión en cualquiera de sus fases de desarrollo entre localidades diferentes, sin contar con un estudio sanitario de dichas zonas, donde se muestre la calidad sanitaria de las mismas y si hay riesgo de trasladar alguna enfermedad (Herpesvirus) no presente en la localidad receptora.
- 3) Capacitar al personal de la granja de cultivo respecto a las medidas sanitarias obligadas para proteger a la producción. Por ejemplo, el mantenimiento de instalaciones limpias, implementos de cultivo desinfectados, uso de maniluvios y pediluvios, filtración y desinfección del suministro de agua, depósito adecuado de desechos (conchas, restos orgánicos), supervisión sanitaria, etc., de esta manera el embate por infecciones virales se reduce considerablemente.

- 4) Vigilar la calidad genética de los ostiones que se pretende adquirir, buscando una garantía respecto a una variabilidad genética adecuada.
- 5) Cosechar al ostión antes de que se presenten factores de estrés (mareas rojas, eventos de "El Niño"). Además, disminuir la densidad de cultivo y programar una rotación de cultivos.
- 6) Búsqueda de ejemplares resistentes a enfermedades por Herpesvirus.
- 7) Diversificar la producción, preferentemente con especies nativas (*Chione* sp. *Crassostrea corteziensis*)

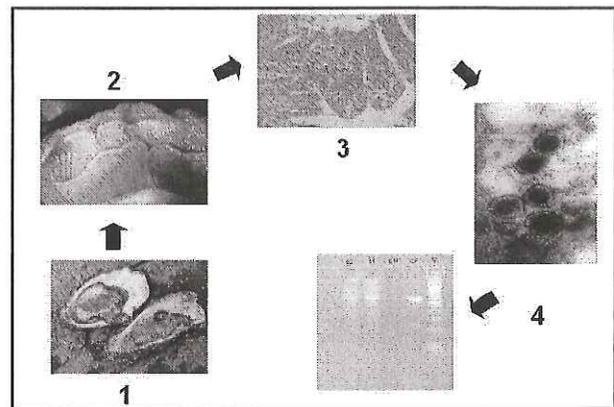


Figura 2. Esquema fotográfico que muestra los signos asociados y diagnóstico de Herpesvirus en ostión Japonés 1) apertura del ejemplar para revisión de su aspecto, coloración y apariencia general 2) búsqueda de erosiones branquiales en lamelas branquiales 3) presencia de picnosis y/o inflamación branquial y/o necrosis a nivel histológico 4) presencia de partículas virales icosaédricas en muestras observadas al Microscopio electrónico de transmisión 5) análisis de PCR positivo (aparición de bandas específicas) en presencia de marcador de peso molecular y controles positivo y negativo.

Literatura

- Arzul, I., Nicolas, J. L., Davison, A. J. y T. Renault. 2001. French Scallops: A new host for ostreid herpesvirus-1. *Viology*, 290: 342-349.
- Arzul, I., Renault, T. y C. Lipart. 2001. Experimental herpes-like viral infections in marine bivalves: demonstration of inter-species transmisión. *Diseases of Aquatic Organisms*, 46: 1-6.
- Cáceres-Martínez, J., R. Vásquez Yeomans. 2003. Presence of giant polymorphic cells in *Crassostrea gigas* cultured in Bahía Falsa, Baja California NW Mexico. *Journal of Shellfish Research*, 22 (3): 711-714.
- Renault, T., Le Deuff, R-M., Lipart, C. y C. Delsert. 2000. Development of a PCR procedure for the detection of a herpes-like virus infecting oysters in France. *Journal of Virological Methods*, 88: 41-50.



Programa Nacional de Sanidad Acuicola y la Red de Diagnóstico



Junio 2004

Año. 7 Vol. II No. 26

En este número

1 EPISODIOS DE MORTALIDAD DEL OSTIÓN JAPONÉS *Crassostrea gigas* EN BAJA CALIFORNIA Y SU RELACIÓN CON BACTERIAS

Jorge Cáceres-Martínez
Rebeca Vásquez-Yeomans,
Adrián Mauricio García Ortega
Centro de Investigación Científica y de
Educación Superior de Ensenada

4 VACUNAS CONTRA EL VIRUS DEL SÍNDROME DE LA MANCHA BLANCA (WSSV) EN CAMARÓN

Lucio Galaviz-Silva¹, Zinnia Judith Molina Garza¹, Martha Silvia Tirado Velarde¹ y Cuauhtémoc Ibarra Gámez².
¹Universidad Autónoma de Nuevo León
²Instituto Tecnológico de Sonora

6 ESTUDIO Y CARACTERIZACIÓN DE HEMOCITOS DE PENEIDOS MEDIANTE USO DE HISTOTECNIAS: CITOSPIN Y H&E

M.V.Z. Antonio Joel Ruiz Uribe
Universidad Autónoma de Tamaulipas

7 DETECCIÓN Y PREVALENCIA DE *Vibrio* spp. EN CULTIVO DE CAMARÓN *Litopenaeus vannamei* EN SONORA DURANTE EL CICLO 2003

Cuauhtémoc Ibarra G.,¹ José Reyes González G.,² Lucio Galaviz S.,² Cecilia Luna B.,¹ Zinnia Judith Molina G.² y Martha Silvia Tirado V.²
¹Instituto Tecnológico de Sonora
²Universidad Autónoma de Nuevo León

9 MICROORGANISMOS PATÓGENOS EN CAMARÓN CULTIVADO *Litopenaeus vannamei* DE GRANJAS DEL ESTADO DE SINALOA

Martha Silvia Tirado Velarde¹, Lucio Galaviz Silva¹, Zinnia Judith Molina Garza¹, José Cuauhtémoc Ibarra Gámez².
¹Universidad Autónoma de Nuevo León
²Instituto Tecnológico de Sonora

EPISODIOS DE MORTALIDAD DEL OSTIÓN JAPONÉS *Crassostrea gigas* EN BAJA CALIFORNIA Y SU RELACIÓN CON BACTERIAS

Jorge Cáceres - Martínez
Rebeca Vásquez - Yeomans
Adrián Mauricio García Ortega

Introducción

El ostión japonés *Crassostrea gigas* es ampliamente cultivado alrededor del mundo. Esta especie ha sido introducida de su región de origen en Japón, a países como Australia, Francia, Holanda, España, Portugal, Tailandia, Estados Unidos y Reino Unido. En 1973, *C. gigas* se introdujo en varias lagunas costeras de los estados de Sonora, Baja California Sur y Baja California, incluyendo a la Bahía Falsa. En la actualidad, el cultivo de ostión en Baja California y en otros estados del Noroeste de nuestro país está bien establecido, la producción anual es de unas 1,622 toneladas métricas anuales con un valor de 2.4 millones de dólares, aproximadamente 1,800 empleos sostienen esta actividad.

A partir de 1997, se comenzaron a detectar alarmantes episodios de mortalidad masiva de ostión, incluyendo semilla, juveniles y adultos en los estados de Sonora y Baja California Sur. Para Abril de 1998, episodios similares de mortalidad ocurrieron en la Bahía Falsa, Baja California. La alarma del sector se hizo patente y se realizaron tres reuniones de trabajo entre productores, autoridades acuícolas y académicos para tratar de determinar las causas de estas mortalidades y la forma de controlarlas. Las reuniones se realizaron en Sonora, Baja California y Baja California Sur, se determinó que entre las posibles causas asociadas con esas mortalidades estaban agentes patógenos.



COMITÉ EDITORIAL

MOISÉS GÓMEZ REYNA
JUAN ANTONIO PÉREZ HERNÁNDEZ
DIRECCIÓN GENERAL DE ORGANIZACIÓN Y FOMENTO
CONAPESCA - SAGARPA

MARTHA RODRÍGUEZ GUTIÉRREZ
COORDINADORA DE LA RED DE DIAGNÓSTICO

LUCIO GALAVÍZ SILVA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

En estudios histopatológicos llevados a cabo por el CICESE entre 1996 y 1998 en las zonas de cultivo del ostión japonés en Bahía Falsa, B. C., se encontraron en las branquias células polimórficas gigantes, mismas que están asociadas a la presencia de un iridovirus conocido como GNV (Gill Necrosis Virus o Virus de la Necrosis Branquial). Posteriores análisis histopatológicos de las branquias del ostión, iniciados en el verano de 2000, mostraron la sintomatología causada por el GNV, pero sin observar la presencia de células polimórficas asociadas al virus. Adicionalmente, análisis clínicos llevados a cabo en laboratorio y campo mostraron en las branquias síntomas externos parecidos a los causados por el GNV; sin embargo, el estudio de estos tejidos usando microscopía electrónica no demostró la presencia del iridovirus GNV, pero sí mostró la presencia de bacterias tipo bacilos y de virus parecidos a herpes, la presencia de estos virus tipo herpes las hemos confirmado recientemente con pruebas moleculares (PCR).

Estos resultados sugieren que tanto el virus parecido a herpes como las bacterias tipo bacilos encontradas, o ambos, podrían estar relacionados con los episodios de mortalidad observados. Por tal motivo, el objetivo del presente estudio fue aislar e identificar bacterias de tejido branquial del ostión japonés, *Crassostrea gigas*, recolectados durante un episodio de mortalidad en la Bahía Falsa, B. C.

Desarrollo del estudio

Bahía Falsa, está formada por un brazo de la Bahía de San Quintín localizada en la costa del Pacífico de Baja California, entre las latitudes de 30° 24' N a 30° 30' N y longitudes de 115° 57' W a 116° 01' W. La Bahía tiene una longitud de 7 Km y una profundidad máxima, en el canal principal, de 7 metros; en toda la Bahía se localizan los cultivos comerciales del ostión japonés. De una muestra de 70 ostiones adultos que se recolectaron en el área de cultivo conocido como Ostiones Guerrero de la Bahía Falsa, para su análisis en el Laboratorio de Biología y Patología de Organismos Acuáticos del CICESE, durante un episodio de mortalidad. De estos ostiones, y bajo condiciones asépticas, se obtuvieron muestras de tejido branquial, el cual se homogeneizó con un mortero de porcelana previamente esterilizado. El homogeneizado se colocó en un tubo de ensayo con agua de mar filtrada y esterilizada en autoclave y se hicieron subsecuentes diluciones (10^{-1} a 10^{-4}). Se sembraron 10 μ l en placas con medio de cultivo Zobell. Estas se incubaron por 24 horas. Las colonias dominantes se aislaron, una parte en medio TCBS y otras en medio Agar Marino (Fig. 1).

La caracterización fenotípica se realizó por pruebas fisiológicas estándar (tinción de Gram, reacción de la oxidasa, morfología y movilidad, crecimiento en TCBS, fermentación de la glucosa, sensibilidad al agente vibriostático 0/129 y crecimiento a las salinidades 3% y 6%) y pruebas bioquímicas utilizando el API 20E (BioMérieux). Las bacterias aisladas e identificadas se preservaron a -70° C.

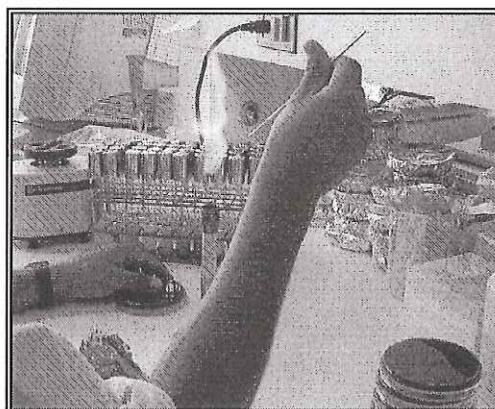


Figura 1. Obtención de la muestra y cultivo de bacterias para aislar e identificar

Resultados y Discusión

Se obtuvieron tres colonias de los aislamientos realizados de las branquias de los ostiones estudiados. Los resultados de la caracterización fisiológica y bioquímica de las bacterias aisladas se resumen en la tabla 1. Dos de las cepas crecieron en el medio selectivo TCBS formando colonias amarillas y se identificaron como bacterias del género *Aeromonas*. La tercera cepa aislada no se pudo identificar debido a su crecimiento muy lento, que no permitió obtener suficiente inóculo para su caracterización bioquímica con las pruebas del API 20E.

A través de los años 60's y hasta la actualidad, en los cultivos de ostión japonés en diferentes partes del mundo, se han presentado mortalidades masivas durante los meses de verano, cuando la temperatura del agua excede los 20° C. La mayoría de los estudios enfocados a determinar la causa de estas mortalidades refieren a las bacterias como los posibles agentes causales.

Tabla 1. Caracterización fenotípica de las bacterias del género *Aeromonas*

Prueba	Resultado
Gram	-
Movilidad	+
Crecimiento en TCBS	+
Sensibilidad 0/129	-
Crecimiento NaCl 3%	+
Crecimiento NaCl 6%	+
Utilización de	
Citrato	-
Glucosa	+
Manitol	+
Sorbitol	-
Ramnosa	-
Sacarosa	+
Melibiosa	+
Amygdalina	+
Arabinosa	-
Enzimas	
Hidrolisina ONPG	-
Arginina dihidrolasa	+
Lisina descarboxilasa	-
Ornitina descarboxilasa	-
Ureasa	-
Triptófano desaminasa	-
Gelatinasa	+
Citocromo oxidasa	+
Producción de:	
H ₂ S	-
Indol	+
Acetoína (Voges-Proskauer)	-
Oxidación de la glucosa	+
Fermentación de la glucosa	+

Entre las principales enfermedades ocasionadas por bacterias en *Crassostrea gigas* destacan la Vibriosis (*Vibrio splendidus*, *Vibrio* spp.); Nocardiosis (*Nocardia* sp., bacteria actinomiceta) y la enfermedad del ligamento de la charnela en juveniles de ostión (bacteria parecida a *Cytophaga*). Los resultados que se esperaban de los aislamientos y posterior identificación de las cepas bacterianas encontradas en el presente estudio, eran la presencia de algún tipo de bacteria patógena como las ya mencionadas. Sin embargo, las colonias que se encontraron fueron del género *Aeromonas* y aunque el análisis cualitativo de la flora bacteriana en ostión han confirmado la presencia de bacterias del género *Aeromonas*, este género no se documenta como patógeno para moluscos.

Sin embargo, si hay registros de una elevada patogenecidad de algunas de estas bacterias como *Aeromonas salmonicida* y *Aeromonas hydrophyla* en peces, ranas, tortugas y otros reptiles. Por otro lado, el lento crecimiento de la tercera colonia bacteriana, y por tanto la dificultad para obtener inóculos suficientes para las pruebas bioquímicas impidió su identificación y la posibilidad de determinar su posible patogenecidad. Es importante señalar que un método alternativo para identificación de bacterias en estos casos, es a través de análisis molecular, lo que nos llevaría a conocer si ese tipo de bacterias pudieran ser identificadas como posibles patógenos. Si se descartan a las bacterias encontradas como posibles agentes causales directos de las mortalidades en la Bahía, es muy probable que los virus tipo herpes que hemos detectado si lo sean, o que de alguna manera actúen de manera sinérgica con las bacterias. En cualquier caso, son necesarios mayores estudios a partir de la información encontrada en este estudio que permitan dilucidar el papel de estas bacterias y virus en las branquias del ostión japonés de la zona de estudio.

Agradecimientos

Los autores agradecen la ayuda del Ocean. Héctor González por proporcionarnos los organismos para este estudio. A la Dra. Roxana Rico por sus sugerencias para el análisis bacteriológico. Este trabajo fue apoyado por el Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, México a través del proyecto No. 623106, por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y por el PRONALSA.

Literatura

- Cáceres-Martínez, J. & R. Vásquez-Yeomans. 2003. Presence of giant polymorphic cells in *Crassostrea gigas* cultured in Bahía Falsa, Baja California NW México. *Journal of Shellfish Research* 22 (3): 711-714.
- Friedman, C. S., Beattie, J. H., Elston, R. A. & R. P. Hedrick. 1991. Investigation of the relationship between the presence of a gram-positive bacterial infection and summer mortality of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* Thunberg. *Aquaculture* 94: 1-15.
- Hubbard, G. B. 1981. *Aeromonas hydrophila* infection in *Xenopus laevis* water borne bacillus. *Laboratory Animal Science* 31 (3): 297-300.
- McGladdery, S. E. 1999. Shellfish diseases (viral, bacterial and fungal). In: P. T. K. Woo & D. W. Bruno (eds.). *Fish Diseases and Disorders, Volume 3: Viral, Bacterial and Fungal Infections*. CAB International.
- Sugumar, G., Nakai, T., Hirata, Y., Matsubara, D. and K. Muroga. 1998. *Vibrio splendidus* biovar II as the causative agent of bacillary necrosis of Japanese oyster, *Crassostrea gigas* larvae. *Disease of Aquatic Organisms*, 33(2): 111-118.
- Vásquez-Yeomans, R. and Cáceres-Martínez, J. 2004. Herpes-like virus associated with eroded gills of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* adults in México. *J. Shellfish Res.* 23 (1): 417-419.