

Tesis defendida por
Roberto Cruz Flores
y aprobada por el siguiente Comité

Dr. Jorge Abelardo Cáceres Martínez
Director del Comité

Dr. Miguel Ángel del Río Portilla
Miembro del Comité

Dra. Rebeca Vásquez Yeomans
Miembro del Comité

Dr. Axayácatl Rocha Olivares
Miembro del Comité

Dra. Mónica Hernández Rodríguez
Miembro del Comité

Dra. Beatriz Cordero Esquivel
Coordinador
Programa de Posgrado en Acuicultura

Dr. Jesús Favela Vara
Encargado del Despacho de la
Dirección de Estudios de Posgrado

Octubre de 2013

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



**Programa de Posgrado en Ciencias
en Acuicultura**

**Distribución, prevalencia e intensidad de *Xenohaliotis californiensis* parásito del
abulón *Haliotis fulgens* y *Haliotis corrugata*, en la península de Baja California,
México**

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

Presenta:
Roberto Cruz Flores

Ensenada, Baja California, México
2013

Resumen de la tesis de Roberto Cruz Flores, presentada como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Acuicultura

Distribución, prevalencia e intensidad de *Xenohaliotis californiensis* parásito del abulón *Haliotis fulgens* y *Haliotis corrugata*, en la península de Baja California, México.

Resumen aprobado por:

Dr. Jorge Abelardo Cáceres Martínez

Resumen

El Síndrome de deshidratación (SD) es una enfermedad letal para algunas especies del género *Haliotis* causada por *Xenohaliotis californiensis*, un procariota tipo rickettsia. Esta bacteria se ha detectado en algunas áreas de la Península de Baja California, México por histología, Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) e hibridación *in situ* en abulón negro (*H. cracherodii*), abulón azul (*H. fulgens*), abulón amarillo (*H. corrugata*) y abulón rojo (*H. rufescens*). Sin embargo, su presencia y distribución en la principal zona de captura permanecían desconocidas. Con el objetivo de determinar la distribución, prevalencia e intensidad de *X. californiensis* en el abulón azul y abulón amarillo, se tomaron muestras de abulón obtenidas de siete sociedades cooperativas que se encargan de la captura del recurso. Se realizaron dos muestreos en el 2012; el primero fue dirigido hacia abulones con signos externos de deterioro o alteraciones externas. El segundo se realizó aleatoriamente de la captura comercial. En total se obtuvieron 319 abulones (159 azules y 160 amarillos). Cada abulón se analizó visualmente para registrar su apariencia exterior, después, se fijaron en etanol muestras de branquias, post esófago y recto para análisis por biología molecular. El resto de la glándula digestiva se fijó en formalina para histología convencional. El abulón azul proveniente de la captura comercial tuvo una prevalencia promedio de 95.4% y un grado de intensidad promedio de 2.6; mientras que una prevalencia de 65.5% y un grado de intensidad promedio de 2.2 se encontraron en el abulón amarillo del mismo muestreo. La morbilidad para el abulón azul fue de 84.5%, mientras que en el abulón amarillo fue de 51.3%. Una prevalencia promedio de 85.2% y un grado de intensidad promedio de 2.4 se encontró en el abulón azul del muestreo dirigido hacia abulones con signos externos de deterioro, el abulón amarillo de este muestreo presentó una prevalencia promedio de 91.7% y un grado de intensidad promedio de 2.1. A pesar de que se encontraron organismos de ambas especies con infecciones severas por el parásito, no presentaron signos externos de deterioro; en contraste, hubo organismos con signos de deterioro externo en los cuales no se detectó el parásito. Estas observaciones pueden estar asociadas con la patogénesis de la infección y con la inespecificidad de las observaciones externas de deterioro. El tamaño de muestra y las condiciones de los tejidos también parecen influir en estos resultados. Se realizó una estimación de la efectividad de los métodos de diagnóstico (signos externos de deterioro, histología y PCR), el diagnóstico por histología presentó la efectividad más alta con el 98.4%, la PCR presentó una efectividad del 43.9% y los signos externos de deterioro

de 19.6%. Por lo que se recomienda al diagnóstico por histología como técnica base para el monitoreo de la enfermedad. Así mismo se detectó la presencia de una variante morfológica de *X. californiensis* infectado por un bacteriófago en abulones de todas las cooperativas analizadas. La variante morfológica de *X. californiensis* presentó una prevalencia promedio de 40.0% y 27.0% en el abulón azul y abulón amarillo provenientes de la captura comercial respectivamente. La identidad de *X. californiensis* se confirmó en abulón azul y abulón amarillo por medio de hibridación *in situ*. Adicionalmente se encontraron diversos parásitos y/o simbiontes en los tejidos, entre ellos destaca un protozoo tipo ameboideo que provoca lesiones en el epitelio del estómago, este parásito solo se encontró en el abulón azul de la captura comercial. Se recomienda una vigilancia sanitaria permanente de *X. californiensis* y de la carga parasitaria en general que permita contar con mayores elementos para un mejor manejo de la pesquería. Así mismo se recomienda valorar la consideración de los registros de morbilidad e intensidad de infección para generar un modelo epidemiológico y/o incorporarlos en el modelo de cálculo de cuota de captura comercial, especialmente durante el advenimiento de condiciones ambientales adversas. Es indispensable monitorear factores ambientales tales como temperatura, salinidad, acidificación y oxígeno disuelto que permitan asociarlos con brotes epidemiológicos y ocurrencia de mortalidades.

Palabras clave: *Haliotis fulgens*, *Haliotis corrugata*, *Xenohaliotis californiensis*, rickettsia, Síndrome de Deshidratación, abulón, parásitos, enfermedades, moluscos, diagnóstico.

Abstract of the thesis presented by Roberto Cruz Flores as a partial requirement to obtain the Master in Science degree in Aquaculture.

Distribution prevalence and intensity of *Xenohaliotis californiensis* parasite of abalone, *Haliotis fulgens* and *Haliotis corrugata* in the Peninsula of Baja California, Mexico.

Abstract approved by:

Dr. Jorge Abelardo Cáceres Martínez

Abstract

Withering Syndrome (WS) is a lethal disease for some species of the genus *Haliotis* caused by *Xenohaliotis californiensis*, a rickettsia-like prokaryote. This bacterium has been detected in some areas of the Peninsula of Baja California, México by histology, by Polymerase Chain Reaction (PCR), and by *in situ* hybridization in black abalone (*H. cracherodii*), blue abalone (*H. fulgens*), yellow abalone (*H. corrugata*), and red abalone (*H. rufescens*). However, the presence and distribution of the bacterium in the main capture zone was unknown. With the objective of determining the distribution, prevalence and intensity of *X. californiensis* in blue abalone and yellow abalone, tissue samples were obtained from seven cooperative societies which capture abalone. Two samples were carried out through 2012; the first sample was directed towards abalone with external signs of deterioration. The second sample was done randomly from the commercial capture. A total of 319 abalone (159 blue abalone and 160 yellow abalone) were obtained. Each abalone was visually analyzed to record its external appearance, then, samples from gills, post-esophagus and rectum were fixed in ethanol for molecular biology analysis. The rest of the digestive gland was fixed in formalin for conventional histology. Blue abalone from commercial capture had an average prevalence of 95.4% and an average degree of infection intensity of 2.6; a prevalence of 65.5% and an average degree of infection intensity of 2.2 was found in yellow abalone from the same sample. The morbidity found in blue abalone was 84.5%, while in yellow abalone the morbidity was 51.3%. A prevalence of 85.2% and an average degree of infection intensity of 2.4 were found in blue abalone with external signs of deterioration, while yellow abalone from the same sample presented an average prevalence of 91.7% and an average degree of infection intensity of 2.1. Although organisms from both species were found with severe infections from the bacterium they did not present signs of external deterioration, in contrast to organisms with very pronounced signs of deterioration but without the presence of the parasite. These observations can be associated with pathogenesis from infection and with the unspecific observations of external signs of deterioration. Sample size and tissue conditions seemed to have an influence in these results. An estimation of the effectiveness of the diagnostic methods was carried out (external signs of deterioration, histology and PCR), diagnosis by histology presented the highest effectiveness with 98.4%, PCR analysis had a 43.9% success rate, and diagnosis by external signs of deterioration had an effectiveness of 19.6%. Based on these results diagnosis by histology is recommended as a base technic for

monitoring this disease. The presence of a morphological variant of *X. californiensis* infected by a bacteriophage hyperparasite was detected in all cooperatives analyzed. This morphological variant of *X. californiensis* presented an average prevalence of 40.0% and 27.0% in blue abalone and yellow abalone from commercial capture respectively. The identity of *X. californiensis* was confirmed in blue and yellow abalone by *in situ* hybridization. Additionally various parasites/symbionts were found in different tissues, among them stands out an amoeboid-type protozoan, that causes erosion of the stomach epithelium, this parasite was only found in blue abalone from commercial capture. A permanent sanitary vigilance is recommended for *X. californiensis* and the parasitic load, which would allow having more elements for a better management of the fishery. It is recommended to evaluate and consider the records of morbidity and infection intensity in order to generate an epidemiological model and incorporate it in the commercial capture fee, especially during the advent of adverse environmental conditions. It is indispensable to monitor environmental factors such as temperature, salinity, acidification and dissolved oxygen this will allow us to associate them with epidemiologic outbreaks and mortality occurrences

Keywords: *Haliotis fulgens*, *Haliotis corrugata*, *Xenohaliotis californiensis*, rickettsia, Withering syndrome, abalone, parasite, disease, mollusk, diagnosis.

Dedicatorias

A mis padres por su amor y su apoyo incondicional, que me han alentado día a día a ser una mejor persona.

A mi hermano y mi hermana por haber estado siempre presentes y por hacer la vida tan divertida.

A mi compañera Olivia por su amor, paciencia y apoyo durante el tiempo que hemos compartido.

Agradecimientos

Agradezco al Dr. Jorge A. Cáceres Martínez por permitirme participar en este proyecto y formar parte de su equipo de trabajo.

A la Dra. Rebeca Vásquez Yeomans por todo su apoyo, asesoría y paciencia a lo largo de estos dos años.

Al Dr. Miguel Ángel del Río Portilla, por sus valiosos y acertados comentarios y apoyo durante la realización de la tesis.

Al Dr. Axayácatl Rocha Olivares por su apoyo y valiosas críticas durante el desarrollo de este proyecto.

A la Dra. Mónica Hernández Rodríguez por sus comentarios y dedicación en la revisión de tesis.

A las Sociedades Cooperativas pesqueras, La Purísima, Pescadores Nacionales de Abulón, Bahía Tortugas, Emancipación, California de San Ignacio, Leyes de Reforma, Progreso y Punta Abreojos, por proporcionar las muestras de abulón para el presente estudio.

A Pablo (Yanki) por su ayuda en el procesamiento de las muestras en Bahía Tortugas.

Al Ocean. José Guadalupe Aviles por su apoyo durante los muestreos.

AL Ocean. Domingo Cervantes por su apoyo con las muestras de La Bocana.

A la M. en C. Yanet Guerrero Rentería, técnico del laboratorio de Biología y Patología de Organismos Acuáticos del Departamento de Acuicultura del CICESE, por su apoyo y capacitación en los cortes histológicos. También por su asesoría y paciencia.

A la M. en C. Ananda Aracely Navarro por toda su ayuda, consejos y apoyo durante estos dos años.

Al M. en C. Adrian García por su ayuda y apoyo en el desarrollo de la técnica de hibridación *in situ*.

A Francisco Javier Ponce y José M. Domínguez por su ayuda en la elaboración de las figuras de la anatomía del abulón.

A todo el departamento de Acuicultura del CICESE, especialmente a la Dra. Beatriz Cordero Esquivel por su apoyo como jefa del Departamento.

A Luis Murillo y Gerardo por su destreza al volante durante las salidas de campo.

A mis compañeros y amigos de generación, George, Mae, Luis, Rigo, David, Paul, Araceli, Raquel, Miriam y Omar.

A mis compañeros y amigos de ecología marina Franchesco y Pablo por su ayuda y apoyo durante todo el proyecto del abulón.

A mis hermanos Chuy, Barba, Ceto, Víctor, y Rafa.

Al Fondo Sectorial SAGARPA-CONACYT quien financió el proyecto “Diagnóstico sobre la disminución de las poblaciones de abulón en la costa occidental de la Península de Baja California y estrategias para atenuar los impactos negativos” (# 623294), del cual deriva esta tesis.

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

Finalmente a todas las personas que de una u otra manera me han ayudado en mi formación académica y personal.

CONTENIDO

	Página
Resumen español	i
Resumen inglés	iii
Dedicatorias	v
Agradecimientos	vi
Lista de Figuras	xi
Lista de Tablas	xiii
Capítulo 1. Introducción	
1.1 La pesquería del abulón en la península de Baja California	1
1.2 Descripción e importancia del recurso	2
1.3 Disminución de la pesquería	7
1.4 Síndrome de deshidratación	8
1.5 <i>Xenohalotis californiensis</i>	9
1.6 Distribución de <i>Xenohalotis californiensis</i>	10
1.7 Detección de <i>Xenohalotis californiensis</i>	11
Capítulo 2. Justificación, hipótesis y objetivos	
2.1 Justificación	14
2.2 Hipótesis	15
2.3 Objetivo general	15
2.4 Objetivos particulares	15
Capítulo 3. Materiales y métodos	
3.1 Descripción del área de estudio.	16
3.2 Descripción del muestreo	16
3.3 Análisis en fresco y fijación de las muestras	18
3.4 Análisis histopatológico	19
3.5 Extracción de ADN de post esófago de abulón	21
3.6 Diagnóstico por PCR	21
3.7 Hibridación <i>in situ</i>	23

	Página
3.8 Análisis estadístico	24
3.9. Estimación de la morbilidad y mortalidades asociadas con <i>X. californiensis</i>	25
Capítulo 4. Resultados	
4.1 Distribución prevalencia e intensidad de <i>X. californiensis</i> en <i>H. fulgens</i> y <i>H. corrugata</i> de la captura comercial	27
4.2 Prevalencia de signos externos de deterioro (SED) en abulones de captura comercial	31
4.3 Distribución prevalencia e intensidad de <i>X. californiensis</i> en <i>H. fulgens</i> y <i>H. corrugata</i> con signos externos de deterioro (muestreo de contingencia)	32
4.4 Prevalencia de signos externos de deterioro (SED) en abulones del muestreo de contingencia	35
4.5 Alteraciones histológicas en <i>H. fulges</i> y <i>H. corrugata</i> por <i>X. californiensis</i>	36
4.6 Prevalencia e intensidad de <i>X. californiensis</i> infectado por un bacteriófago	42
4.7 Detección de <i>X. californiensis</i> por amplificación de un fragmento del gen 16s rDNA	45
4.8 Confirmación de <i>X. californiensis</i> por hibridación <i>in situ</i>	46
4.9 Validación de técnicas de detección para <i>X. californiensis</i>	47
4.10 Simbiontes de <i>H. fulgens</i> y <i>H. corrugata</i>	47
4.11 Estimación de la morbilidad y mortalidad asociadas con <i>X. californiensis</i>	54
Capítulo 5. Discusión, conclusiones y recomendaciones	
5.1 Discusión	56
5.2 Conclusiones	65
5.3 Recomendaciones.	66
Referencias bibliográficas	67

Apéndices.

Página
72

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Distribución del abulón en la península de Baja California y principales zonas de captura abulonera	3
2	Anatomía interna de <i>Haliotis</i> spp.	5
3	Concha de abulón azul <i>H. fulgens</i> (A) y amarillo <i>H. corrugata</i> (B), se muestra la cara externa e interna de cada una	6
4	Inclusiones intracelulares de <i>X. californiensis</i> en las células columnares ciliares del tracto gastrointestinal del abulón	10
5	Ubicación de las Sociedades Cooperativas que fueron muestreadas en la principal zona de captura abulonera	17
6	Cortes del cuerpo blando del abulón para el diagnóstico por histología	20
7	Mapa de distribución de <i>X. californiensis</i> en la principal zona de captura abulonera de la Península de Baja California, México en <i>H. fulgens</i> proveniente de la captura comercial	28
8	Mapa de distribución de <i>X. californiensis</i> en la principal zona de captura abulonera de la Península de Baja California, México en <i>H. corrugata</i> proveniente de la captura comercial	29
9	Proporción de abulones con signos externos de deterioro (SED) y sin ellos	31
10	Mapa de distribución de <i>X. californiensis</i> en la principal zona de captura abulonera de la Península de Baja California, México en abulón azul del muestreo de contingencia	33
11	Mapa de distribución de <i>X. californiensis</i> en la principal zona de captura abulonera de la Península de Baja California, México en abulón amarillo del muestreo de contingencia	34
12	Proporción de abulones con signos externos de deterioro (SED) y sin ellos	36

	Página
13	Epitelios gastrointestinales de <i>H. corrugata</i> 37
14	Serie de imágenes mostrando la infección de <i>X. californiensis</i> en los epitelios del tracto digestivo de <i>H. fulgens</i> y <i>H. corrugata</i> 38
15	Desprendimiento de células epiteliales infectadas 39
16	Metaplasia de los divertículos digestivos en <i>H. fulgens</i> y <i>H. corrugata</i> 40
17	<i>Xenohaliothis californiensis</i> en los divertículos digestivos 41
18	Abundantes células cafés 41
19	<i>Xenohaliothis californiensis</i> hiperparasitado por un bacteriófago 43
20	Detección de <i>X. californiensis</i> en <i>H. fulgens</i> y <i>H. corrugata</i> por PCR con el uso de primers para un fragmento del gen 16s rDNA 45
21	Detección por hibridación <i>in situ</i> 46
22	Protozoarios ciliados en los filamentos branquiales 49
23	Artrópodos entre los filamentos branquiales 49
24	Serie de imágenes que muestran protozoarios tipo <i>Ancistrocoma</i> adheridos al epitelio branquial de <i>H. fulgens</i> 50
25	Imágenes que muestran protozoarios ciliados multinucleados en la bolsa del esófago de <i>H. fulgens</i> 50
26	Serie de imágenes que muestran protozoarios tipo ameboideo adheridos al epitelio columnar ciliar del estómago de <i>H. fulgens</i> 51
27	Serie de imágenes que muestran la morfología de los protozoarios tipo ameboideo adheridos al epitelio columnar ciliar del estómago de <i>H. fulgens</i> 52
28	Serie de imágenes que muestran la infección por <i>P. haliotis</i> en <i>H. fulgens</i> y <i>H. corrugata</i> 53
29	Encapsulaciones de naturaleza desconocida 54

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1	Numero de organismos proporcionados por cooperativa mostrando la talla promedio \pm la desviación estándar	18
2	Componentes y concentraciones finales para la detección de <i>X. californiensis</i> por PCR	22
3	Condiciones de amplificación para la detección de <i>X. californiensis</i> por PCR	22
4	Proporción de <i>H. fulgens</i> y <i>H. corrugata</i> de acuerdo al grado de intensidad de <i>X. californiensis</i>	30
5	Prevalencia de IAR en los diferentes epitelios del tracto digestivo de <i>H. fulgens</i> y <i>H. corrugata</i> provenientes de la captura comercial	30
6	Proporción de abulones por cooperativa con signos externos de deterioro (SED) y sin ellos	32
7	Proporción de <i>H. fulgens</i> y <i>H. corrugata</i> de acuerdo al grado de intensidad de <i>X. californiensis</i>	35
8	Prevalencia de IAR en los diferentes epitelios del tracto digestivo de <i>H. fulgens</i> y <i>H. corrugata</i> del muestreo de contingencia	35
9	Proporción de <i>H. fulgens</i> y <i>H. corrugata</i> provenientes de la captura comercial en distintos grados de metaplasia	42
10	Análisis de correlación de Spearman entre el grado de metaplasia y la intensidad de <i>X. californiensis</i> en el abulón azul y amarillo de la captura comercial	42
11	Prevalencia de las inclusiones de <i>X. californiensis</i> infectado por un bacteriófago en las distintas localidades examinadas	44

	Página	
12	Proporción de <i>H. fulgens</i> y <i>H. corrugata</i> de acuerdo al grado de intensidad de <i>X. californiensis</i> parasitado por un bacteriófago	44
13	Prevalencia de IAR con bacteriófago en los diferentes epitelios del tracto digestivo en donde se encontraron en <i>H. fulgens</i> y <i>H. corrugata</i>	45
14	Prueba Q de Cochran para las técnicas de diagnóstico de <i>X. californiensis</i>	47

Capítulo 1

1. Introducción

1.1 La pesquería del abulón en la península de Baja California

La pesquería de abulón es una actividad de gran importancia económica para las comunidades pesqueras de la península de Baja California, México. Son siete las especies de abulón que se distribuyen a lo largo de la península, de las cuales el abulón azul (*Haliotis fulgens* Philippi, 1845), el abulón amarillo (*Haliotis corrugata* Gray, 1828), el abulón rojo (*Haliotis rufescens* Swainson, 1845), el abulón chino (*Haliotis sorenseni* Beartsch, 1940) y el abulón negro (*Haliotis cracherodii* Leach, 1814) tienen importancia comercial (Vega-Velázquez *et al.*, 1994). Actualmente, por su abundancia, solamente el abulón azul y el amarillo son de importancia para la pesquería, ya que estas dos especies representan el 95% de las capturas comerciales en Baja California y Baja California Sur (Ramade-Villanueva *et al.*, 1998). El abulón azul ocupa el primer sitio en volumen de captura, con alrededor del 80%, mientras que la captura de abulón amarillo representa cerca del 15% (SAGARPA-CONAPESCA, 2009).

En los últimos años se ha detectado una tendencia en la disminución de las capturas, al respecto se ha considerado que la pesca excesiva es una de las principales causas, aunado a deficiencias en el manejo de la pesquería y cambios ambientales a gran escala que se han asociado con el desarrollo de enfermedades (VanBlaricom *et al.*, 1993; Guzmán del Proó, 1994; Ponce *et al.*, 1998; Ramade-Villanueva *et al.*, 1998; Cáceres-Martínez, 2002). En invertebrados marinos el desarrollo de enfermedades se promueve fácilmente con cambios ambientales tales como aquellos producidos por el fenómeno de El Niño (FEN) y otras alteraciones fisicoquímicas del hábitat, como descargas de contaminantes y surgencias (Friedman *et al.*, 1997; Cáceres-Martínez, 2000).

El síndrome de deshidratación (SD) es una enfermedad causada por una procariota intracelular del orden Rickettsiales llamada *Xenohaliotis californiensis* Friedman, Andree, Beauchamp, Moore, Robbins, Shields, Hedrick, 2000, que afecta al género *Haliotis* (Friedman *et al.*, 2000).

Esta enfermedad en conjunto con el FEN causó la disminución en un 99% de las poblaciones de abulón negro en California, Estados Unidos a mediados de los años ochenta ocasionado el cierre de la pesquería comercial en este país. La presencia de inclusiones celulares asociadas a rickettsia se ha detectado en la Península de Baja California desde el 2000 por Cáceres-Martínez y cols. y su identidad fue confirmada mediante hibridación *in situ* y microscopía electrónica de transmisión (MET) (Cáceres-Martínez, 2002; Cáceres-Martínez *et al.*, 2011).

Considerando la importancia de este recurso en la península de Baja California y la presencia de *X. californiensis*, que ha causado el cierre de la pesquería de abulón en Estados Unidos, es indispensable conocer la distribución, prevalencia e intensidad de *X. californiensis* en la principal zona de captura abulonera. Esto permitirá asociar a la procariota con el desarrollo del SD y posibles episodios de mortalidad en la zona y contar con elementos científicos, para optimizar las medidas de control de esta enfermedad y dimensionar con precisión su impacto e importancia en la pesquería de abulón en México.

1.2 Descripción e importancia del recurso

Los abulones se distribuyen en zonas rocosas de regiones templadas de los océanos Pacífico, Atlántico e Índico. La mayor cantidad de especies, así como las mayores densidades, se encuentran en las costas australianas, en el archipiélago japonés y en la costa oeste de América del Norte. En el Pacífico oriental, se encuentran desde Alaska hasta el sur de la península de Baja California, México. En aguas mexicanas, los abulones se distribuyen a lo largo de la costa oeste e islas adyacentes de la península de Baja California, desde la frontera con Estados Unidos hasta la parte sur de Isla Margarita, Baja California Sur (Geiger *et al.*, 2000) (Figura 1).

Los abulones son gasterópodos marinos, que viven adheridos a las rocas del fondo marino, desde la zona intermareal hasta profundidades de 50 metros. Los abulones se adhieren a las rocas mediante un gran pie muscular que realiza también la función locomotora a través de ligeros desplazamientos a corta escala. Este músculo constituye la porción comestible. Presentan una simetría bilateral primitiva, una concha aplanada, con la región dorsal en forma de oreja, la cual puede variar desde muy arqueada, en la región posterior, a plana en la región anterior,

presentando una serie de orificios o poros respiratorios alineados lateralmente sobre la cavidad branquial (Cox, 1962).



Figura 1. Distribución del abulón en la península de Baja California y principales zonas de captura abulonera. Modificado de Google Maps Imagery 2012.

En su anatomía general, en vista dorsal (Figura 2), el abulón posee una región anterior o cefálica que tiene dos tentáculos y dos pedúnculos, cada uno con un ojo. El tracto digestivo se encuentra en el lado izquierdo del cuerpo el cual consta de una boca y rádula en la región cefálica, esófago, estómago con el hepatopáncreas en el extremo posterior, e intestino y ano ubicados en la región media izquierda del cuerpo. El aparato excretor consta de dos riñones, el derecho es más grande que el izquierdo y se ubica a la derecha del pericardio, traslapado con el hepatopáncreas; el izquierdo es reducido y se encuentra a la izquierda del pericardio. Poseen dos branquias

bipectinadas en el lado izquierdo del pie y dorsales al esófago. El sistema muscular está constituido principalmente por el pie o callo, que ocupa la mayor parte del espacio debajo de la concha; se tiene además el músculo izquierdo de la columnela, el epipodio que se extiende de la parte dorsal del pie, el músculo derecho de la columnela que va unido a la concha y los músculos que le dan sostén a las vísceras. Los abulones son organismos dioicos, la gónada está situada a lo largo del lado derecho del músculo de la columnela y presenta forma de cuerno o cono curvo. En los machos, la gónada es color crema y en las hembras verde olivo; en organismos inmaduros en ambos sexos tiene un color café oscuro (Beverlander, 1998).

Identificación taxonómica del abulón

Phylum: Mollusca

Clase: Gasterópoda

Subclase: Prosobranchia

Orden: Archeogastropoda

Suborden: Zygobranchia

Familia: Haliotidae

Género: *Haliotis*

Especie: *Haliotis corrugata* y *Haliotis fulgens*

En el abulón azul la cara externa de la concha es de forma oval o redonda, poco elevada y de color café oscuro. Presenta costillas espirales y surcos de grosor uniforme; con 5 a 7 orificios respiratorios abiertos. La cara interna es oval y su coloración varía desde el verde pálido al azul oscuro (Figura 3A). El tamaño máximo suele llegar hasta los 25 cm de longitud de concha. El abulón amarillo tiene concha más redonda que oval, la cara externa corrugada y gruesa, por lo cual recibe el nombre la especie; tiene de 2 a 4 orificios respiratorios abiertos, son tubulares y altos. La cara interna es de coloración variable que va del rosado al verde pálido (Figura 3B). El tamaño máximo alcanzado es de 18 cm de longitud de la concha (Cox, 1962; SAGARPA-CONAPESCA, 2009).

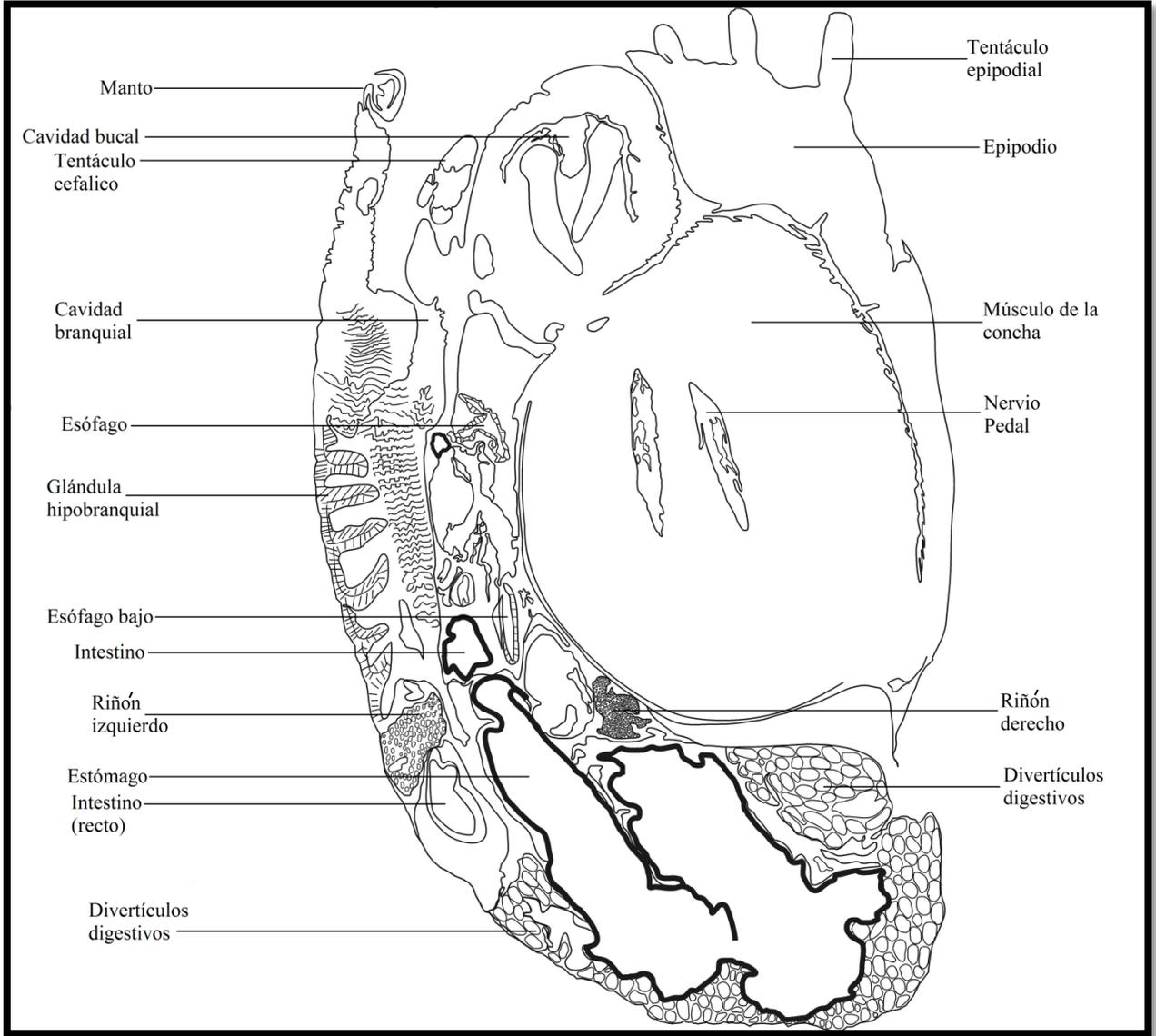


Figura 2. Anatomía interna de *Haliotis* spp. Modificado de Beverlander, 1988, p. 37.

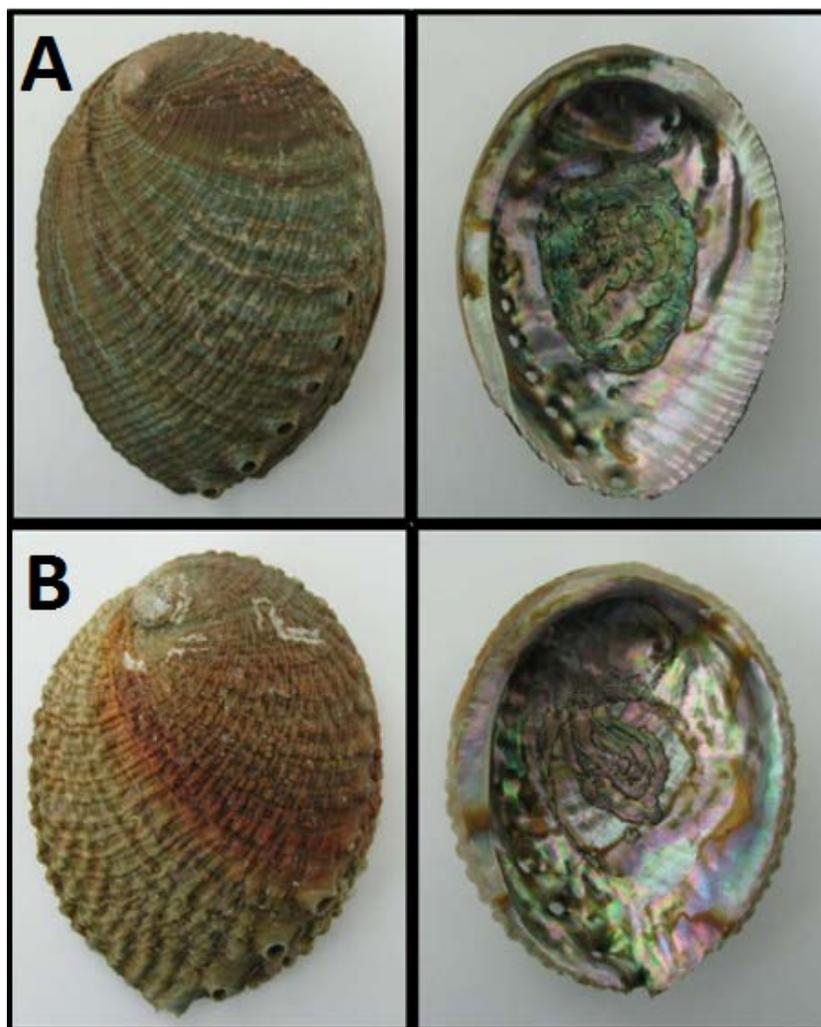


Figura 3. Concha de abulón azul *H. fulgens* (A) y amarillo *H. corrugata* (B), se muestra la cara externa e interna de cada una (SAGARPA-CONAPESCA, 2009, p. 6).

La importancia de estos gasterópodos radica en que tienen una gran demanda comercial en el mercado asiático por su sabor y propiedades culinarias; debido a esto sus poblaciones soportan una pesquería intensiva la cual ha venido disminuyendo (Ramade-Villanueva *et al.*, 1998). Las especies de abulón mexicano son preferidas en el mercado asiático sobre los abulones de otras regiones del mundo, por su calidad gastronómica y el origen histórico de la pesquería en nuestro país, ya que inicialmente fue concesionada a chinos y japoneses (Cox, 1962). En este escenario, una lata de abulón mexicano de 454 gramos alcanza un valor de 37 a 60 dólares americanos (SAGARPA-CONAPESCA, 2009). A nivel nacional existe un pequeño mercado de abulón enlatado. El precio de abulón en lata de 454 gramos en el mercado nacional es de 435.00 a 475.00 pesos (SAGARPA-CONAPESCA, 2009).

Las conchas de abulón también tienen un valor comercial de acuerdo con su calidad, que está relacionada con la carga de epibiontes y la apariencia de la concha. Estas conchas se exportan a Taiwán, Corea y China, para la elaboración de joyería, alcanzando un valor de 1,500 dólares americanos por tonelada (Álvarez-Tinajero *et al.*, 2001).

La captura de abulón en la península de Baja California está reservada de manera exclusiva a cooperativas pesqueras. Con base en la Ley Federal de Pesca y su Reglamento (1992), la captura se realiza mediante el otorgamiento de títulos de concesión por 20 años a dichas organizaciones pesqueras para la extracción, captura, aprovechamiento comercial en un área determinada y de acuerdo a la distribución del recurso. Esta disposición continúa vigente en el marco de la Ley General de Pesca y Acuicultura Sustentables (SAGARPA-CONAPESCA 2009). Actualmente, 22 Sociedades Cooperativas pescan el recurso (INAPESCA, 2002). La principal zona de captura abulonera se encuentra situada en la parte central de la península de Baja California, en esta zona se sitúan nueve sociedades cooperativas que tiene concesionados los permisos de pesca del recurso.

1.3 Disminución de la pesquería

La pesquería de abulón azul y amarillo, ha presentado una disminución gradual desde sus inicios hasta el día de hoy, con eventos marcados por grandes reducciones en los volúmenes de captura. Los primeros datos de captura de abulón se remontan al año de 1929 con 1,721 toneladas (Guzmán del Prío, 1989) y fueron incrementando hasta llegar a 6,000 toneladas en 1950, figurando como el registro más alto que se ha alcanzado en la historia de esta pesquería (Guzmán del Prío, 1989).

De 1974 a 1984, la pesquería se caracterizó por una disminución gradual en sus capturas, con cifras levemente superiores a las 400 toneladas en 1984 (INAPESCA, 2006). Es conveniente señalar que en este período, la ocurrencia del FEN durante los años 1976 a 1977 y 1982 a 1983, el incremento en la incidencia de tormentas y de posibles enfermedades, fueron la posible causa, en diversa magnitud, de la disminución en capturas (León *et al.*, 1995). En las temporadas de 1984 a 1985 y 1991 a 1992, se presentó un incremento paulatino en la producción, alcanzando

cifras próximas a las 1,100 toneladas. La tendencia de recuperación moderada de la producción en el bienio 1992 a 1993 a nivel regional presentó decrementos, posiblemente asociados a que en 1992 se presentó el FEN muy marcado. Para la temporada de pesca de 1993 a 1994, los volúmenes de producción fueron en descenso (León *et al.*, 1996).

De 1994 a 2000 las capturas se mantuvieron en el rango de las 400 a 490 toneladas y del 2000 al 2010 se alcanzaron las 778 toneladas (CONAPESCA, 2010). En el 2011 se registra una disminución en la captura reportándose una cifra de 465 toneladas (CONAPESCA, 2011). En el 2012 disminuye dramáticamente a 300 toneladas (CONAPESCA, 2012).

Algunas de las disminuciones en la captura comercial de abulón en México se han asociado con el FEN (León *et al.*, 1995; Cáceres-Martínez, 2000; Cáceres-Martínez, 2002; Cáceres-Martínez *et al.*, 2011). En Estados Unidos, se ha establecido una relación entre el FEN y el aumento de la temperatura con el SD, que como se ha mencionado, a mediados de los años 80 redujo paulatinamente las poblaciones de abulón negro *H. cracherodii* en un 99% causando el cierre de la pesquería de esta especie en California, Estados Unidos.

1.4 Síndrome de deshidratación

En 1986, se encontraron evidencias de mortalidades inusuales de abulón negro, *H. cracherodii*, en diferentes sitios intermareales en las Islas Channel en California, Estados Unidos (Haaker *et al.*, 1992). Las densidades de abulón negro en las Islas de Anacapa, Santa Cruz, Santa Bárbara e Islas Santa Rosa, se redujeron en un 99%. A simple vista, los abulones enfermos de estas áreas mostraban signos de inanición, debilidad, letargo, apariencia de deshidratación del músculo del pie, retracción del manto, pobre desarrollo gonadal, pérdida de la capacidad de adherirse al sustrato y muerte. Los estudios sobre la condición del abulón, mostraron degeneración de miofibras y reemplazo con tejido conectivo en el músculo del pie (Friedman *et al.*, 1997).

En 1988 se encontraron grandes cantidades de abulón negro moribundos en la Ensenada del Diablo, en el condado de San Luis Obispo en el centro de California, Estados Unidos (Steinbeck *et al.*, 1992). La Ensenada era el sitio de descarga de aguas de enfriamiento de la planta de

energía eléctrica del Cañón del Diablo. Los animales moribundos encontrados en la Ensenada presentaron los mismos signos que los abulones encontrados en las Islas Channel. Los estudios demostraron que este fenómeno se restringió a las áreas más cercanas y más influenciadas por la descarga de agua caliente de la planta eléctrica. Experimentos en laboratorios demostraron una correlación entre las temperaturas más altas del agua y el incremento de mortalidad. Un examen histológico reveló infecciones masivas del riñón ocasionadas por un protozooario del tipo de los coccidios hoy identificado como *Pseudoklossia haliotis* (Friedman *et al.*, 1993). Sin embargo, no se pudo establecer una correlación entre las infecciones por el coccidio y las mortalidades de abulón en la Ensenada del Diablo (Steinbeck *et al.*, 1992). *P. haliotis* fue descartado como el agente etiológico del SD debido a que se encontraba presente tanto en ejemplares saludables como moribundos y su presencia podía ser un factor secundario.

De 1985 a 1989, las poblaciones de abulón negro *H. cracherodii* disminuyeron en abundancia de un 82% a 96% en cuatro de las Islas Channel de California. Otras especies de abulón también se vieron afectadas, las poblaciones de abulón rojo *H. rufescens* se redujeron de un 97% a 98% y el abulón amarillo disminuyó de un 51% a 94% en las Islas Channel (Haaker *et al.*, 1992).

La expansión de las mortalidades de abulón a través de las Islas Channel y la costa de California, impulsó las investigaciones para encontrar al agente causante del SD y reforzó la hipótesis de que el origen de las mismas se debía a un agente infeccioso (Cáceres-Martínez, 2002).

Gardner *et al.* (1995) sugirieron una estrecha relación del SD con un agente patógeno del Orden Rickettsiales que posiblemente podía alterar la absorción de nutrientes y la secreción enzimática en la glándula digestiva.

1.5 *Xenohaliois californiensis*

Friedman *et al.* (2000) describen a este agente patógeno como un cocobacilo pleomórfico, Gram-negativo, negativo para la técnica Schiff, con una etapa celular esférica irregular (~332-1550nm) (Figura 4). Se tiñe basófila con hematoxilina eosina. No es motil. La pared celular Gram-negativa de *X. californiensis* carece de peptidoglicanos visibles y de capas de mucus, es rica en ribosomas

con un nucleoide fibrilar. Se replica dentro de vacuolas esféricas intracitoplasmáticas de las células epiteliales del tracto gastrointestinal o epitelio de absorción del abulón. Las vacuolas llenas de bacterias se encuentran generalmente situadas distales al núcleo de la célula huésped. No es cultivable en medios sintéticos o líneas celulares de peces. Es sensible a tetraciclinas pero no a cloranfenicol, claritromicina o ciprofloxacino. Basado en el análisis de secuenciación del gen 16S rDNA la bacteria es miembro del grupo indefinido α -subclase de la clase *Proteobacteria*.

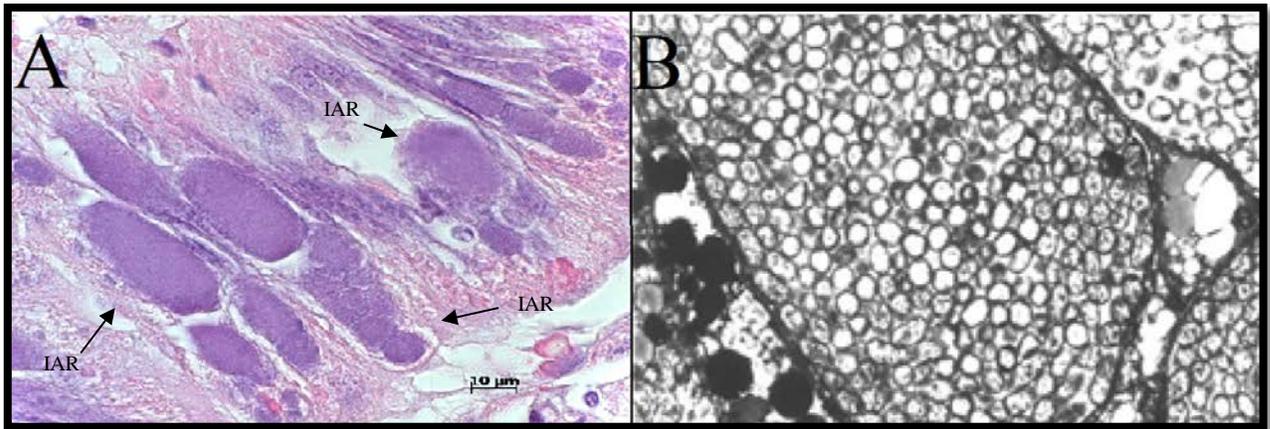


Figura 4. Inclusiones intracelulares de *X. californiensis* en las células columnares ciliadas del tracto gastrointestinal del abulón. A) Se observan numerosas inclusiones asociadas a rickettsia (IAR) que corresponden a *X. californiensis* en el epitelio del esófago, nótese como tiñen rosado a violeta con hematoxilina eosina. B) Inclusiones intracelulares de tres células vecinas infectadas que contienen a *X. californiensis* (MET)(x5300) (Cáceres-Martínez *et al.*, 2011, p. 9).

Se confirmó a *X. californiensis* como el agente etiológico causante del SD basándose en estudios de inyección o inmersión en baños de antibióticos contra rickettsias en abulones enfermos y su recuperación después del tratamiento (Friedman *et al.*, 2003; García-Esquivel *et al.*, 2011).

1.6 Distribución de *Xenohaliotis californiensis*

El desarrollo de la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y pruebas de hibridación *in situ* han permitido confirmar la presencia de *X. californiensis* en varias especies de abulón Mexicano (Cáceres-Martínez, 2002; Cáceres-Martínez *et al.*, 2011). Aunque en México no se cuenta con registros formales de mortalidades inusuales de abulón negro a mediados de los años 80, sí se cuentan con registros de disminuciones en los volúmenes de captura de abulón azul

y amarillo de 1980 a 1984, que concuerdan con las mortalidades que se presentaron en California, Estados Unidos (Cáceres-Martínez, 2002). Es notorio que actualmente las poblaciones de abulón negro de algunas zonas de la península de Baja California, tales como Isla de Cedros e Isla San Benito han prácticamente desaparecido y de hecho, esta especie ya no se considera en la pesquería comercial (Cáceres-Martínez, 2002). En la península de Baja California se ha comprobado la presencia de *X. californiensis* en todas las especies de abulón de importancia comercial: abulón negro, rojo, azul y amarillo (Valles-Rios, 2000; Cáceres-Martínez *et al.*, 2001; Álvarez-Tinajero *et al.*, 2002) y ocasionalmente se observan afectadas por el SD; sin embargo, las mortalidades a nivel poblacional no han sido estimadas y su efecto en la pesquería no ha sido establecido. Tampoco se conoce su distribución y prevalencia en la principal zona pesquera. Para Baja California, es posible que la susceptibilidad de las especies de abulones al SD sea menor que la de los abulones en California, Estados Unidos, o que la virulencia de *X. californiensis* sea diferente con relación a la de Estados Unidos (Cáceres-Martínez, 2002), por lo que estas hipótesis deben ser puestas a prueba.

Desde la aparición del SD en las Islas Channel en California, Estados Unidos a mediados de los años 80 (Haaker *et al.*, 1992), esta enfermedad se ha registrado en toda la costa de California hasta Oregón. En Baja California se ha detectado en la Bahía de Ensenada, en la Isla de Cedros e Islas San Benito (Cáceres-Martínez *et al.*, 2001; Álvarez-Tinajero *et al.*, 2002). Como se mencionó antes, la prevalencia e intensidad del parásito en otras áreas de la península de Baja California es desconocida y es especialmente importante conocer cómo se encuentra distribuida en la principal zona de captura abulonera que va desde Islas de Cedros hasta Punta Abreojos, esto permitirá optimizar las medidas de control para combatir a esta enfermedad y dimensionar con precisión su impacto e importancia en la pesquería y cultivo del abulón en México.

1.7 Detección de *Xenohaliotis californiensis*

Actualmente existen una variedad de métodos para la vigilancia, detección y diagnóstico de *X. californiensis*. Cada método varía considerablemente en su disponibilidad, especificidad y sensibilidad diagnóstica. Los métodos de diagnóstico fueron desarrollados para detectar a *X.*

californiensis en abulón rojo y negro del sur de California, Estados Unidos; sin embargo, estos métodos no han sido validados en México.

Los métodos que actualmente se manejan son, análisis de la apariencia externa, frotis tisulares, histología, microscopía electrónica de transmisión, reacción en cadena de la polimerasa (PCR) e hibridación *in situ*.

La apariencia externa se refiere a la reducción del tamaño del músculo del pie, retracción del manto, cambio en la coloración y pérdida de adherencia al sustrato. Estas son observaciones de carácter general y se usan como una primera aproximación para determinar la afección por *X. californiensis*.

Frotis tisulares: Los frotis de tejidos se pueden utilizar como técnicas presuntivas para detectar infecciones de *X. californiensis* de intensidad moderada a alta (Friedman *et al.*, 1997; OIE, 2012). Existen dos variaciones de esta prueba, una mediante tinción celular con Giemsa modificado y otra mediante un colorante fluorescente para ácidos nucleicos como yoduro de propidio. Sin embargo, este método es menos sensible que el histológico y no permite diferenciar la morfología bacteriana (OIE, 2012). Se puede emplear como un método de examen rápido en el rango conocido de *X. californiensis*, sin embargo, es una técnica poco fiable.

Histología: El método histológico permite la visualización de los focos bacterianos intracelulares en los epitelios del tracto digestivo, por lo tanto la OIE lo recomienda como un método confirmativo y es la prueba de referencia para esta enfermedad. No obstante, también se puede confirmar la presencia de *X. californiensis* mediante histología junto con PCR y análisis de secuencia o hibridación *in situ* (OIE, 2012).

Microscopía electrónica de transmisión: Este método permite visualizar individualmente a las procariotas bacilares, sus ribosomas y las paredes celulares trilaminares, acumuladas en colonias intracelulares dentro de vacuolas limitadas por una membrana (Friedman *et al.*, 2000; Cáceres-Martínez *et al.*, 2011; Friedman *et al.*, 2012; OIE, 2012). La OIE establece que este método posee ciertas limitaciones, principalmente por el costo económico y para considerarlo como un diagnóstico confirmativo debe ser acompañado por histología, PCR o hibridación *in situ*.

Reacción en cadena de la polimerasa: Una amplificación positiva por PCR es sólo un diagnóstico presuntivo porque detecta ADN y no necesariamente un patógeno viable (OIE, 2012). Es esencial la utilización de otras técnicas para visualizar al patógeno, como la histología e hibridación *in situ* (Friedman *et al.*, 2000; OIE, 2012). La OIE recomienda además la secuenciación, cuando se trata de una nueva especie de hospedero en un área geográfica nueva para el parásito. Una amplificación positiva por PCR, en conjunto con un resultado positivo por histología, se considera un diagnóstico confirmativo.

Hibridación *in situ*: La hibridación *in situ* permite visualizar una sonda específica que hibrida con una secuencia determinada en el organismo. Es uno de los métodos de elección para confirmar la identidad de *X. californiensis* (OIE, 2012).

Capítulo 2

2. Justificación, hipótesis y objetivos

2.1 Justificación

La pesca de *H. fulgens* y *H. corrugata* es una actividad de gran importancia económica para las comunidades pesqueras de la península de Baja California, México, por lo tanto, la salud del animal es fundamental.

Si sabemos que existe un parásito, *X. californiensis*, que parece ser letal para todas las especies de abulón, es necesario saber cómo está distribuido en la principal zona de captura de la península de Baja California, México como un primer paso para contribuir a su control.

Aún no se han establecido comparaciones entre las diferentes técnicas de detección del parásito en la Península de Baja California que permitirán validar su especificidad y sensibilidad, esta validación es indispensable para determinar la mejor técnica a emplear en la vigilancia epidemiológica de la zona.

2.2 Hipótesis

El parásito *X. californiensis* se encuentra en la principal zona de captura comercial de la península de Baja California, México y su prevalencia e intensidad en poblaciones naturales es la misma.

Las técnicas de diagnóstico utilizadas son igualmente efectivas para la detección de *X. californiensis*.

2.3 Objetivo general

Determinar la distribución de *X. californiensis* parásito del abulón *H. fulgens* y *H. corrugata*, en la principal zona de captura comercial de la península de Baja California, México y determinar la prevalencia e intensidad de la infección utilizando distintas técnicas de diagnóstico.

2.4 Objetivos particulares

- Determinar la posible presencia de *X. californiensis* en siete zonas de captura comercial de abulón en la península de Baja California, México.
- Determinar la prevalencia e intensidad de *X. californiensis* en *H. fulgens* y *H. corrugata* en las localidades donde se encuentre.
- Determinar la presencia de *X. californiensis* por medio de histología, reacción en cadena de la polimerasa (PCR) e hibridación *in situ*.
- Asociar la presencia de *X. californiensis* con el desarrollo del Síndrome de Deshidratación en la zona de estudio.

Capítulo 3

3. Materiales y métodos

3.1 Descripción del área de estudio

La península de Baja California se encuentra localizada al noroeste de México y tiene una longitud aproximada de 1250 km y entre 45 y 250 km de ancho, formada por los estados de Baja California y Baja California Sur. Se encuentra rodeada por las aguas del Océano Pacífico (al oeste y al sur) y al este por el Golfo de California o Mar de Cortés. El tipo de clima de la región es seco desértico, cálido, con escasas lluvias todo el año, pero que predominan en invierno con nieblas frecuentes (Pesca, 1997). La captura del abulón en la península de Baja California es regulada por la Norma Oficial Mexicana NOM-005-PESC-1993. En el área de estudio se encuentran situadas nueve sociedades cooperativas, estas son: La Purísima, Pescadores Nacionales de Abulón, Buzos y Pescadores, Bahía Tortugas, Emancipación, California de San Ignacio, Leyes de Reforma, Progreso y Punta Abreojos (Figura 5).

3.2 Descripción del muestreo

Se obtuvieron muestras de siete Sociedades Cooperativas. El muestreo se realizó del 25 al 28 de abril del año 2012. Las muestras fueron proporcionadas por los productores en función de disponibilidad, mismas que se tomaron aleatoriamente de la captura comercial. Se recolectaron 98 abulones azules y 139 abulones amarillos. En la Tabla 1 se muestra el número de organismos proporcionados por cada cooperativa y la talla promedio \pm la desviación estándar.

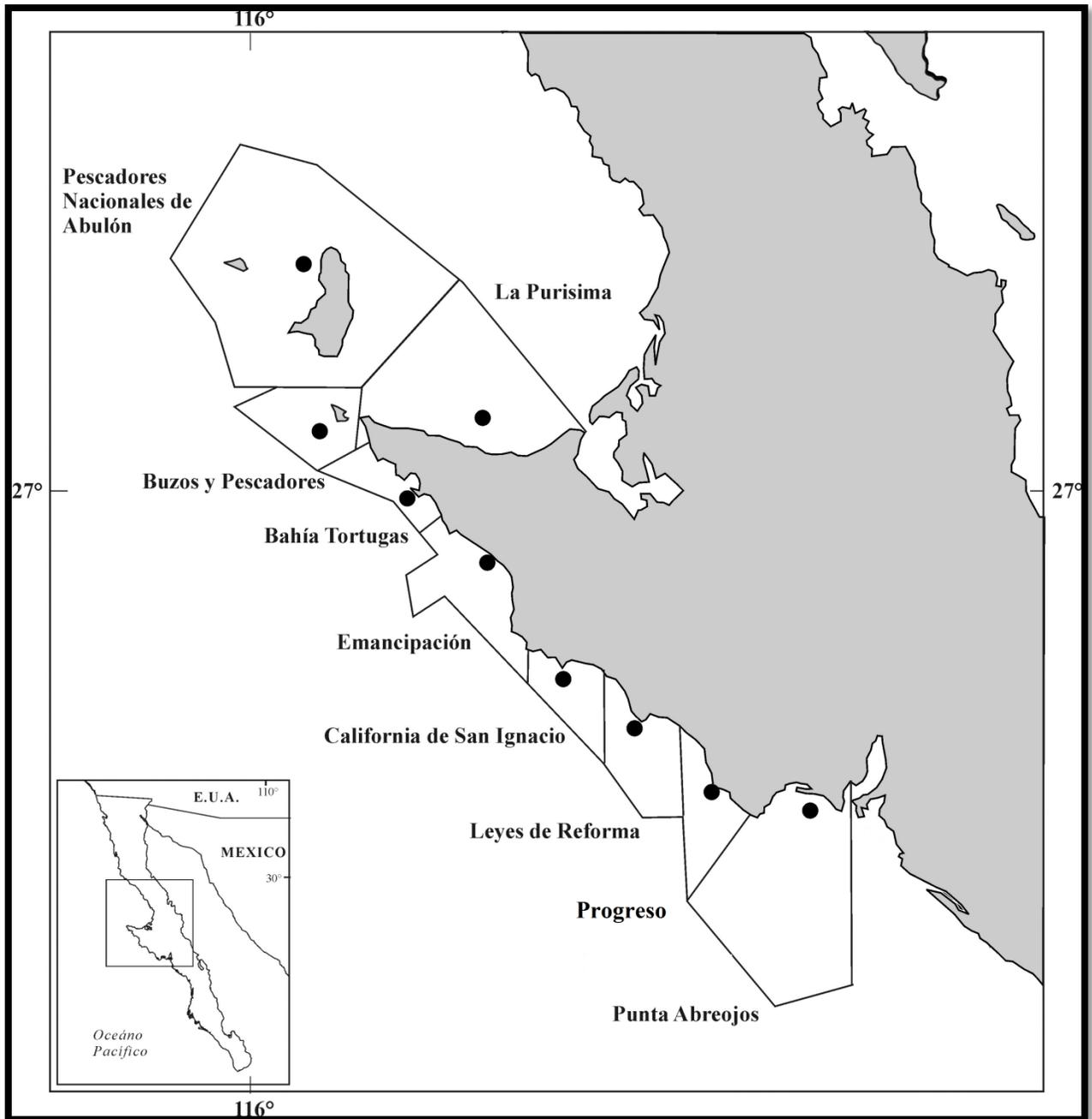


Figura 5. Ubicación de las Sociedades Cooperativas que fueron muestreadas en la principal zona de captura abulonera.

Adicionalmente, se realizó un muestreo de contingencia dirigido a obtener abulones con signos externos de deterioro (SED) o alteraciones visuales, incluyendo pérdida de pigmentación, achicamiento del pie, ablandamiento del pie, retracción del manto y masa visceral, cavernas, ampollas o manchas. En este muestreo participaron seis cooperativas: Pescadores Nacionales de Abulón, Bahía Tortugas, Emancipación, California de San Ignacio, Leyes de Reforma, Progreso,

Punta Abreojos. Se obtuvieron 82 abulones 61 azules y 21 amarillos. No todos los organismos enviados por los cooperativistas pudieron ser analizados debido al estado de la muestras.

Tabla 1. Número de organismos proporcionados por cooperativa, mostrando la talla promedio \pm la desviación estándar.

Abulón Azul	No. de muestras	Talla(cm)	Abulón Amarillo	No. de muestras	Talla(cm)
La Purísima	8	16.4 \pm 2.6	La Purísima	20	15.2 \pm 1.1
Bahía Tortugas	30	16.7 \pm 1.1	Bahía Tortugas	2	16.6 \pm 0.4
Emancipación	11	18.7 \pm 1.6			
California de san Ignacio	30	15.8 \pm 1.9	California de san Ignacio	26	14.1 \pm 1.5
			Leyes de reforma	31	14.1 \pm 0.5
Progreso	10	16.8 \pm 2.3	Progreso	30	14.0 \pm 1.3
Punta Abreojos	9	15.4 \pm 0.7	Punta Abreojos	30	15.1 \pm 0.9
Total	98	16.6 \pm 1.2	Total	139	14.8 \pm 1.0

3.3 Análisis en fresco y fijación de las muestras

Los ejemplares fueron etiquetados en el campo registrándose los siguientes datos: longitud del eje mayor de la concha, sexo y la madurez gonadal (basados en la coloración de la gónada). Adicionalmente se registró el tamaño del callo, la coloración del cuerpo blando, la dureza del callo, la movilidad, el olor, facilidad de desconchado, presencia o ausencia de cavernas, ampollas o manchas. Estos datos permitieron caracterizar la apariencia externa general, así como los signos del SD, en particular el achicamiento y consistencia del callo. El formato para la toma de muestra se encuentra en el Apéndice 1.

Una vez revisada la apariencia externa de los ejemplares, se tomó una porción de branquia, post esófago y recto que se fijaron en alcohol al 95% para su posterior análisis por PCR. El resto de las vísceras se fijaron con formalina al 10% (Apéndice 2) y las muestras fueron transportadas al Laboratorio de Biología y Patología de Moluscos del CICESE.

3.4 Análisis histopatológico

De la víscera ya fijada se cortaron secciones transversales oblicuas de aproximadamente 5mm de ancho de branquias (1); esófago, riñones, estómago (2); divertículos digestivos, estómago (3 y 4); y gónada, divertículos, estómago (5 y 6) (Figura 6). Las secciones se colocaron en casetes histológicos y se deshidrataron en un histoquinette LEICA TP 1040, mediante la utilización de alcoholes, posteriormente se incluyeron en parafina utilizando un incluidor LEICA EG 1160 y se realizó un corte de 5µm de espesor de los tejidos mediante un micrótopo AO Spencer 820. Posteriormente los cortes se tiñeron con la técnica Hematoxilina Eosina (Shaw y Battle, 1957) (Apéndice 3).

Las laminillas histológicas se revisaron con la ayuda de un microscopio compuesto (aumentos progresivos de 10x a 63x). Para determinar la prevalencia e intensidad de *X. californiensis* en cada laminilla se realizó un barrido en zigzag en todo el tejido contándose y diferenciándose las inclusiones correspondientes por órgano y en total. Este tipo de conteos son relativos y son considerados estándar en la metodología histopatológica (Guzmán-García *et al.*, 2009) y nos indican la prevalencia que en términos matemáticos se calcula como:

(1)

$$PE (\%) = \{AI/AE\} \times 100.$$

Dónde,

PE = Prevalencia del parásito en porcentaje

AI = Número de abulones infectados

AE = Número de abulones examinados (Cáceres-Martínez *et al.*, 2010).

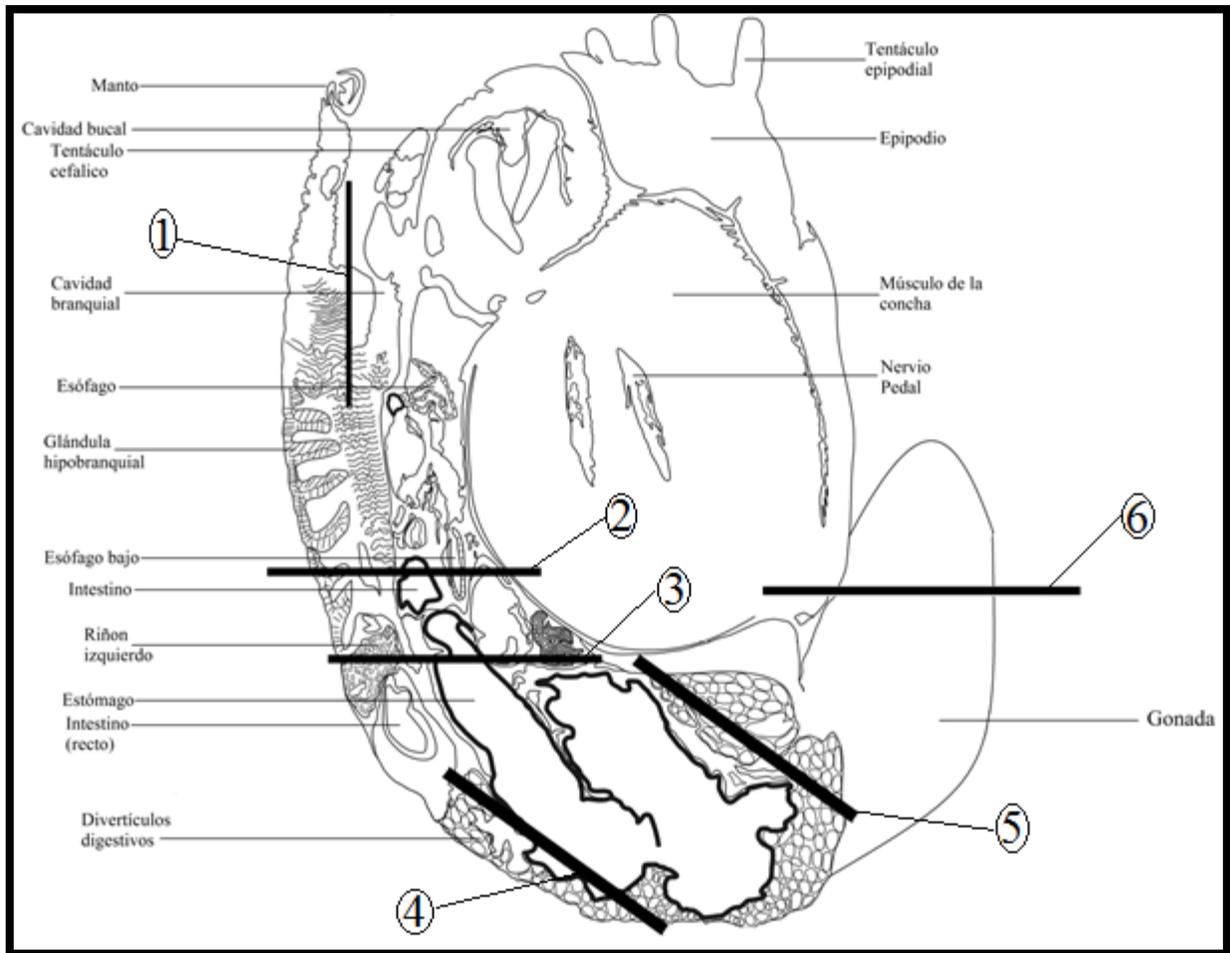


Figura 6. Cortes del cuerpo blando del abulón para el diagnóstico por histología. Las líneas negras y los números indican la zona donde se realizaron los cortes y se observa los tejidos que abarcaron: branquias (1); esófago, riñones, estómago (2); divertículos digestivos, estómago (3 y 4); y gónada, divertículos, estómago (5 y 6). En círculos se muestra el número del corte y los tejidos que abarca cada corte. Modificado de Beverlander, 1988, p. 37.

La intensidad de inclusiones asociadas a *Rickettsia* (IAR) se calculó de acuerdo con la siguiente escala modificada de Álvarez-Tinajero, (2000), donde: Grado 0, ausencia de IAR; Grado 1, 1-10 IAR; Grado 2, 11-300 IAR; Grado 3, 301-500 IAR y Grado 4, 501-1000 IAR. La intensidad promedio se define como el promedio de los grados de intensidad y se calcula como:

(2)

$$IP = \frac{\sum_{i:1}^N GI}{N}$$

Dónde,

IP = Intensidad promedio

GI = Grado de intensidad (>0)

N = Número de abulones analizados.

El grado de “metaplasia”, que se refiere a un cambio estructural tendiente a imitar el tamaño, forma y organización normal de las células epiteliales del tracto digestivo, así como un aumento en el tejido conectivo entre los divertículos digestivos, se estableció de acuerdo a la siguiente escala: Grado 0, <5%; Grado 1, 6-10%; Grado 2, 11-25% y Grado 3, >25% (Moore *et al.*, 2009).

Adicionalmente, el diagnóstico histológico permitió detectar otros parásitos y organismos asociados en los tejidos, de los cuales se hizo un registro fotográfico de los mismos con la descripción correspondiente.

3.5 Extracción de ADN de post esófago de abulón

Se utilizaron muestras del post esófago de cada abulón, previamente preservadas en etanol al 95% y colocadas en un tubo eppendorf estéril de 1.6 ml. La extracción se realizó utilizando el kit QIAGEN DNeasy® Blood & Tissue Kit siguiendo la metodología del fabricante (Apéndice 4).

Se cuantificó el ADN de las muestras en un NanoDrop Lite (ThermoFisher Scientific).

3.6 Diagnóstico por PCR

Se utilizaron los iniciadores Xen0 RA 5-1 (5'-GTTGAACGTGCCTTCAGTTTAC -3') y Xen0 RA 3-6 (5'-ACTTGGACTCATTCAAAGCGGA- 3') que amplifican un fragmento del gen 16S rDNA del genoma de *X. californiensis* obteniendo un producto de 160pb (Andree *et al.*, 2000; Cáceres-Martínez *et al.*, 2011). La mezcla de PCR se preparó siguiendo el protocolo que se describe en la Tabla 2. La reacción de PCR se realizó en un termociclador Apollo (marca Continental Lab Products).

Tabla 2. Componentes y concentraciones finales para la detección de *X. californiensis* por PCR.

Componente	Cantidad (µl)	Concentración final
Amortiguador 10X para <i>Taq</i>	2.0	1X (Tris-HCl 10 mM pH 8.5, KCl 50 mM, MgCl ₂ 1.5 mM)
dNTP's (10 mM)	0.4	200 µM
Iniciador Xen0 5-1 (10 µM)	4.0	1 µM
Iniciador Xen0 3-6 (10 µM)	4.0	1 µM
<i>Taq</i> polimerasa (5 U/µl)	0.32	1.5 Unidades por reacción
BSA (10mg/ml)	0.8	0.4 mg/ml
Agua grado biología molecular	6.48	-
ADN genómico total	2.0	Variable

En todas las reacciones realizadas se incluyó como control positivo, ADN genómico de *H. cracherodii* infectado por *X. californiensis*. Como control negativo se utilizó agua estéril. Las condiciones de amplificación se describen en la Tabla 3.

Tabla 3. Condiciones de amplificación para la detección de *X. californiensis* por PCR.

Paso	Temperatura	Tiempo	Evento
1	95°C	5 min	Pre calentado
	40 ciclos (2, 3, y 4)	-	
2	95°C	1 min	Desnaturalización
3	62°C	30 s	Hibridación
4	72°C	30 s	Elongación
5	72°C	10 min	Extensión

Los productos de PCR (10 µl) se detectaron por medio de la técnica de electroforesis en gel de agarosa al 2.2 %. Se aplicó una carga de 80 V por 1 h y el gel se tiñó con una solución de bromuro de etidio (1 µg/ml). Se utilizó como referencia un marcador de peso molecular de 0.1 a 2 Kpb (Invitrogen) a una concentración de 1 µg/µl.

3.7 Hibridación *in situ*

Para corroborar la identidad de *X. californiensis* en abulón, se llevó a cabo una hibridación *in situ* de acuerdo al protocolo de Antonio *et al.* (2000), donde se hibridaron sondas de oligonucleótidos marcadas específicas con el ARN ribosómico de la subunidad pequeña de la bacteria. Esta hibridación se detectó con un anticuerpo conjugado que reconoce las sondas marcadas. Se añadió un sustrato para el anticuerpo conjugado lo que causó una reacción colorimétrica que permitió visualizar las hibridaciones de ADN de sonda-parásito. La descripción de los reactivos utilizados en la hibridación *in situ* se muestra en el Apéndice 5.

Se utilizaron los oligonucleótidos RA 5-1 (5'-GTTGAACGTGCCTTCAGTTTAC-3'), RA 3-6 (5'-ACTTGGACTCATTCAAAAGCGGA-3'), RA 3-8 (5'-CCACTGTGAGTGGTTATCTCC-TG-3') y RA 5-6 (5'-GAAGCAATATTGTGAGATAAAGCA-3') marcados con Digoxigenina en los extremos 3'.

Se obtuvieron cortes histológicos de 5 μ m los cuales se desparafinaron, rehidrataron y permeabilizaron con Proteinasa K (50 μ g/ml) en una solución amortiguadora (Tris-HCl 0.2M pH 7.2, CaCl₂ 2mM) incubándose a 37°C por 45 minutos. Posteriormente las laminillas se lavaron en una solución de PBS 1X (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 1.8 mM, pH 7.4), se les agregó una solución de pre hibridación (para 1.0 ml de solución: 0.50 ml de Formamida desionizada, 0.20 ml SSC 20X [NaCl 0.15 M, Citrato de sodio 0.015 M pH 7], 0.01 ml Solución Denhart 100X, 0.01 ml ADN de espermatozoos de salmón desnaturalizado [0.1mg/ml], 0.2 ml sulfato de dextrán y 0.08 ml de H₂O grado PCR) incubándose a una hora en cámara húmeda y a temperatura ambiente.

Al término del tiempo la solución de pre-hibridación se descartó, lavándose en una solución SSC 2X. Las laminillas se dejaron secar y se añadió la solución de hibridación esta contiene los mismos componentes que la solución de pre hibridación más se le agregaron los oligonucleótidos marcados a una concentración final de 400 fmol/ μ l calentándose a 100°C por 5 minutos en una placa térmica. La hibridación se llevó a cabo toda la noche a 40°C en cámara húmeda. Después, las laminillas se lavaron en una solución amortiguadora SSC 2X por 30 minutos, tres lavados en SSC 1X por 10 minutos y por último un lavado con SSC 0.5X por 10 minutos. Las laminillas se

equilibraron en una solución amortiguadora I (Tris-HCl 100 mM pH 7.5, NaCl 10 mM), incubándose en cámara húmeda por 10 minutos a temperatura ambiente y se bloqueó con la solución amortiguadora I conteniendo suero de borrego 2% y Tritón X-100 0.3% a temperatura ambiente en cámara húmeda por una hora.

Se eliminó la solución de bloqueo y se lavaron las laminillas con la solución amortiguadora I. Posteriormente se agregó el anticuerpo anti-DIG conjugado con Fosfatasa alcalina (1:1000) preparado en solución amortiguadora I y se incubaron por 3 horas a temperatura ambiente en cámara húmeda. Después de ese tiempo se descartó la solución con el anticuerpo y el conjugado enzimático y se lavó con una solución amortiguadora II (Tris-HCl 100 mM pH 9.5, NaCl 100 mM) incubándose por 10 minutos a temperatura ambiente.

Se preparó el sustrato NBT/BCIP de acuerdo al protocolo del fabricante (Roche Diagnostics GmbH) el cual se agregó a las laminillas incubándose por cuatro horas a temperatura ambiente en cámara húmeda y en completa oscuridad. Después se realizó un lavado con agua destilada estéril y se contra-tiñó con Café Y de Bismark 0.05% por 3 minutos como máximo. Las laminillas se deshidrataron con dos cambios de etanol (70 y 100%) por 3 minutos cada uno, se secaron al aire y se montaron con resina sintética para su observación.

3.8 Análisis estadístico

Se determinó el porcentaje de efectividad de las tres técnicas de diagnóstico tomando en cuenta el porcentaje de abulones con IAR, con respecto al total de muestras analizadas. La efectividad se calculó tomando los valores porcentuales totales de cada técnica y determinando su valor con respecto al resultado final. Para el análisis se consideró como caso positivo cuando dos técnicas dieron un resultado positivo para el mismo ejemplar y cuando en histología se observó la presencia del parásito.

Debido a la naturaleza de los datos, se utilizó la prueba no paramétrica Q de Cochran para determinar la diferencia entre las técnicas. Esta prueba se utiliza para más de dos muestras relacionadas y proporciona un método para examinar si tres o más conjuntos igualados de frecuencias o porciones difieren significativamente entre sí. Esta prueba es particularmente adecuada cuando los datos están en una escala nominal o se ha dicotomizado la información

ordinal (Siegel, 1979). En este caso, se le asignó un valor numérico de 0 y 1 a la ausencia y presencia de *X. californiensis*, respectivamente para cada técnica utilizada (Apéndice 6).

La ecuación estadística de la prueba es:

$$Q = \frac{(K - 1) \left[K \sum_{j=1}^K G_j^2 - \left(\sum_{j=1}^k G_j \right)^2 \right]}{K \sum_{i=1}^N L_i - \sum_{i=1}^N L_i^2} \quad (3)$$

Dónde:

Q = estadístico chi cuadrada de la prueba Q de Cochran.

k = número de técnicas.

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

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

N = número de muestras.

3.9 Estimación de la morbilidad y mortalidades asociadas con *X. californiensis*

La morbilidad, es decir, el número de abulones enfermos encontrados durante el estudio, se calculó considerando los animales infectados y con evidencias histológicas de desarrollo de la enfermedad (grados de intensidad 2 a 4). En términos matemáticos la fórmula para calcular la morbilidad asociada a *X. californiensis* sería:

$$M_o(\%) = \left(\frac{O_r}{N} \right) \times 100 \quad (4)$$

Dónde:

M_o: Morbilidad asociada con *X. californiensis*

O_r: Número de organismos con *X. californiensis* con un grado de intensidad ≥ 2

N: Número de muestras

De acuerdo con Friedman *et al.* (2003), abulones severamente infectados por *X. californiensis* no pueden recuperarse, es decir, llegan a una condición irreversible de la enfermedad; por otro lado, se conocen los factores estresantes externos que contribuyen al desarrollo de la misma (Moore *et al.*, 2009). Tomando en cuenta la información mencionada, se consideró que los abulones infectados por *X. californiensis* en grados de intensidad 4 podrían alcanzar la etapa irreversible de la enfermedad y morir, si ocurren eventos estresantes externos. En términos matemáticos la fórmula para calcular la mortalidad asociada a *X. californiensis* es:

$$M_r(\%) = \left(\frac{O_r}{N} \right) \times 100 \quad (5)$$

Dónde:

M_r : Mortalidad probablemente asociada con *X. californiensis*

O_r : Número de organismos con *X. californiensis* con un grado de intensidad de 4

N : Número de muestras

Por otra parte, se consideró la pérdida económica derivada del muestreo de contingencia, considerando que esos animales no se recuperarían. Para estimar la posible pérdida económica que dicha mortalidad representaría, se tomó un valor económico promedio de \$70 dólares americanos por lata de producto.

Capítulo 4

4. Resultados

4.1 Distribución prevalencia e intensidad de *X. californiensis* en *H. fulgens* y *H. corrugata* de la captura comercial

Xenohalictis californiensis se detectó en abulón azul y amarillo de las seis cooperativas estudiadas (Figura 7 y 8). La prevalencia promedio del parásito fue mayor en el abulón azul que en el amarillo con valores del 95.4% y 65.5%, respectivamente. El grado de intensidad promedio (GIP) fue mayor en el abulón azul que en el amarillo con valores de 2.6 y 2.2, respectivamente. En las zonas pesqueras asignadas a las cooperativas La Purísima, Bahía Tortugas y Progreso la prevalencia de *X. californiensis* en abulón azul fue del 100%. Los abulones de las cooperativas Emancipación y Punta Abreojos presentaron una prevalencia del 90.9% y 77.8%, respectivamente. El GIP en las distintas cooperativas en abulón azul fue de 2.1, 2.3, 3.9, 3.5 y 2.0 en las localidades de La Purísima, Bahía Tortugas, Emancipación, Progreso y Punta Abreojos respectivamente. La prevalencia del parásito en el abulón amarillo fue de 75%, 0%, 38.7%, 76.6% y 80% con un GIP de 1.8, 0, 1.8, 2.8 y 2.1 en las cooperativas La Purísima, Bahía Tortugas, Leyes de Reforma, Progreso y Punta Abreojos, respectivamente (Figura 8). Los abulones que no se fijaron adecuadamente, no se tomaron en cuenta para el diagnóstico.

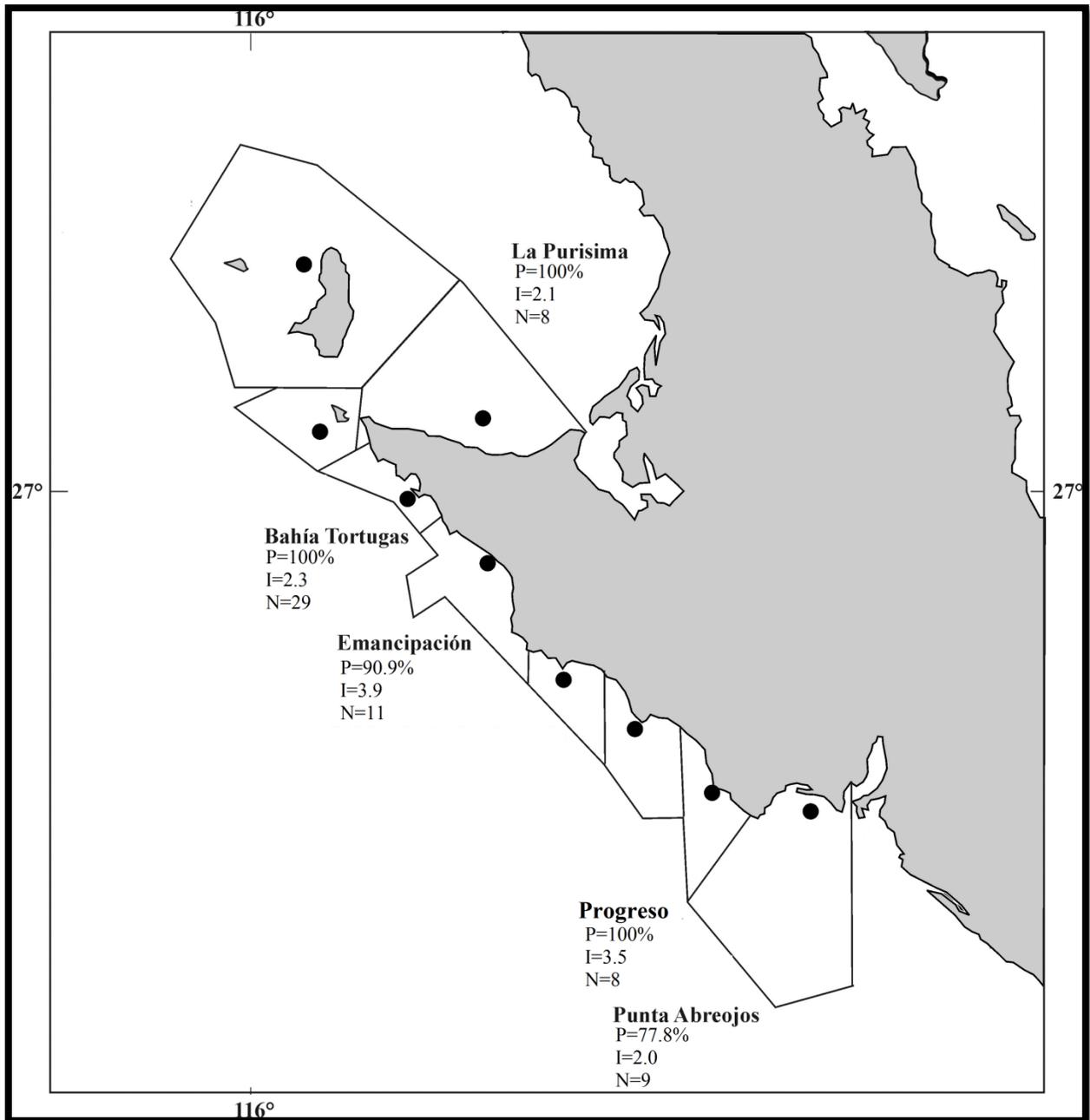


Figura 7. Mapa de distribución de *X. californiensis* en la principal zona de captura abulonera de la Península de Baja California, México en *H. fulgens* proveniente de la captura comercial, mostrando la prevalencia e intensidad promedio del parásito por histología en cada localidad estudiada. P, prevalencia; I, Intensidad promedio; N, tamaño de muestra.

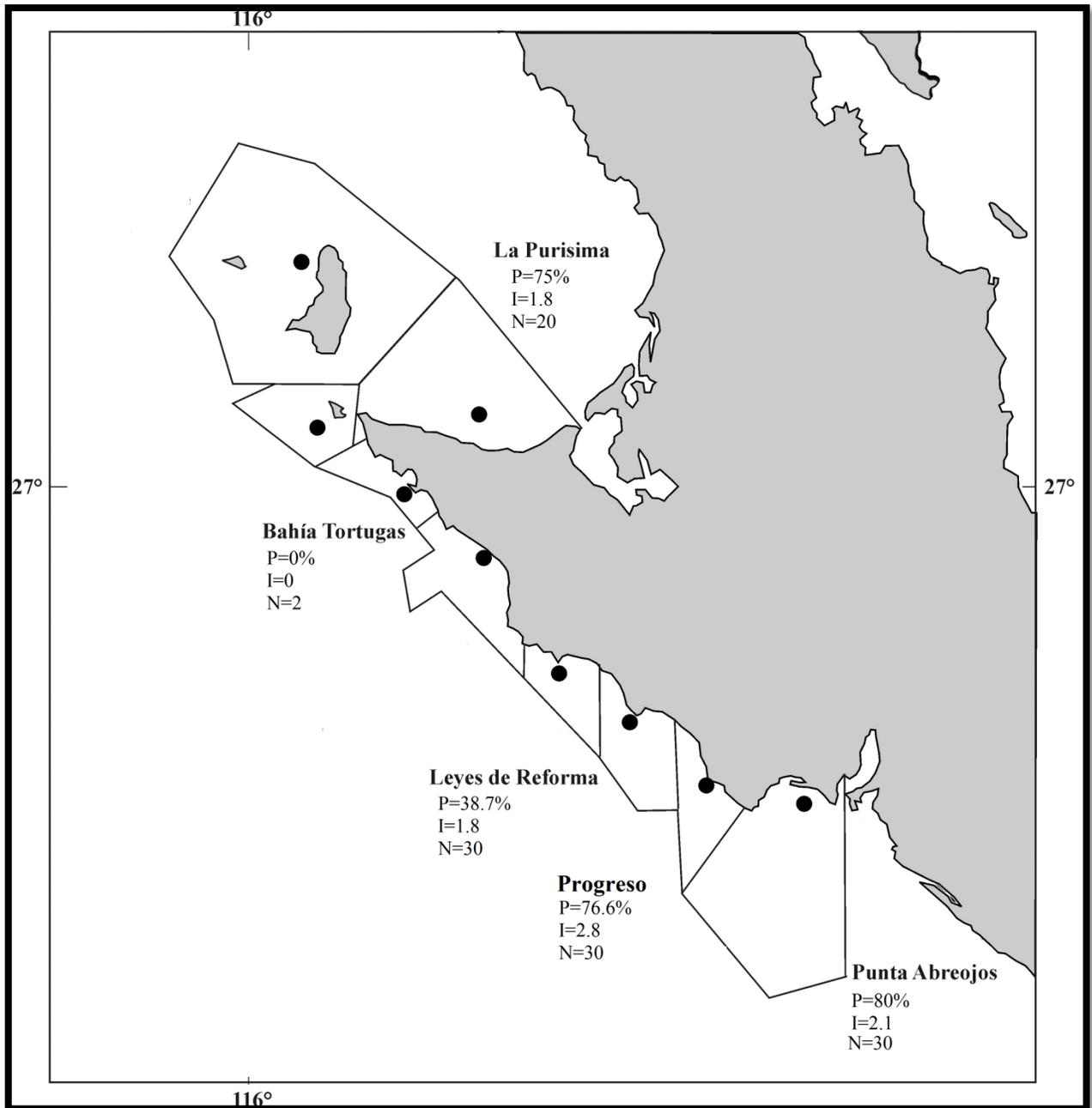


Figura 8. Mapa de distribución de *X. californiensis* en la principal zona de captura abulonera de la Península de Baja California, México en *H. corrugata* proveniente de la captura comercial, mostrando la prevalencia e intensidad promedio del parásito por histología en cada localidad estudiada. P, prevalencia; I, Intensidad promedio; N, Tamaño de muestra.

La proporción de organismos en distintos grados de intensidad se muestra en la Tabla 4. En el abulón azul el 53.8% de los organismos mostraron un grado de intensidad de 2 a 3, mientras que el 30.8% de los organismos presentó un grado de intensidad de 4. En *H. corrugata* el 48.7% de los abulones presentaron un grado de intensidad de 0 a 1. Sólo el 10.6% de los abulones amarillos se encontraron con grado de intensidad de 4. En las dos especies de abulón la prevalencia de *X.*

californiensis fue similar en el estómago y en los divertículos digestivos. La prevalencia del parásito fue menor en el esófago (Tabla 5).

Tabla 4. Proporción de *H. fulgens* y *H. corrugata* de acuerdo al grado de intensidad de *X. californiensis*. Az, *H. fulgens*; Am, *H. corrugata*. Los valores se expresan en porcentaje (%).

Escala	La Purísima		Bahía Tortugas		Emancipación	Leyes de Reforma	Progreso		Punta Abreojos	
	Az	Am	Az	Am	Az	Am	Az	Am	Az	Am
0	0.0	25.0	0.0	100	9.1	61.3	0.0	23.3	22.2	20.0
1	12.5	20.0	17.2	0.0	0.0	12.9	0.0	6.7	11.1	20.0
2	62.5	50.0	55.2	0.0	0.0	22.6	25.0	26.7	55.6	40.0
3	25.0	0.0	10.3	0.0	9.1	0.0	0.0	20.0	11.1	10.0
4	0.0	5.0	17.2	0.0	81.8	3.22	75.	23.3	0.0	10.0
N	8	20	29	2	11	30	8	30	9	30

Tabla 5. Prevalencia de IAR en los diferentes epitelios del tracto digestivo de *H. fulgens* y *H. corrugata* provenientes de la captura comercial. Az, *H. fulgens*; Am, *H. corrugata*; Conductos, conductos de los divertículos digestivos. Los valores se expresan en porcentaje (%).

Tejido	La Purísima		Bahía Tortugas		Emancipación	Leyes de Reforma	Progreso		Punta Abreojos	
	Az	Am	Az	Am	Az	Am	Az	Am	Az	Am
Esófago	25.0	10.0	6.9	0.0	72.7	16.7	37.5	60.0	11.1	56.7
Estómago	62.5	60.0	72.4	0.0	72.7	26.7	75.0	63.3	33.3	46.7
Conductos	75.0	60.0	96.5	0.0	91.0	23.3	100	56.7	77.8	50.0

4.2 Prevalencia de signos externos de deterioro (SED) en abulones de captura comercial

Dentro de este muestreo la aparición de organismos con SED fue relativamente baja. En la mayoría de los organismos se detectó al parásito pero no se manifestaron signos externos de enfermedad. En ambas especies de abulón más del 40% de los organismos presentó el parásito, sin mostrar signos externos de deterioro (Figura 9). En la Tabla 6, se muestra la proporción de organismos con SED y sin ellos.

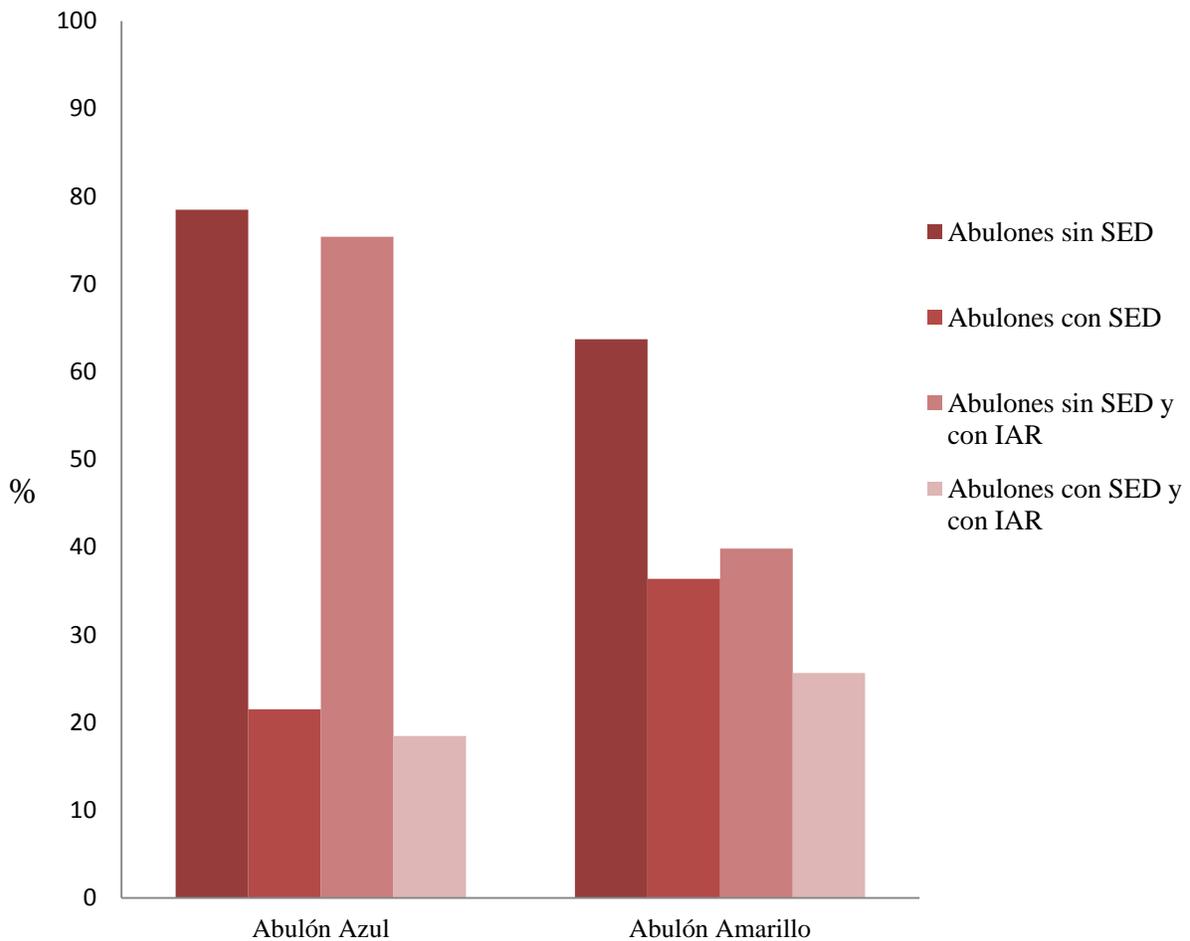


Figura 9. Proporción de abulones con signos externos de deterioro (SED) y sin ellos, así como con presencia o ausencia de *X. californiensis*, para *H. fulgens* y *H. corrugata* de la captura comercial.

Tabla 6. Proporción de abulones por cooperativa con signos externos de deterioro (SED) y sin ellos. Az, *H. fulgens*; Am, *H. corrugata*; 1, Abulones sin SED; 2, Abulones con SED; 3, Abulones sin SED y con IAR; 4, Abulones con SED y con IAR; IAR, inclusiones asociadas a rickettsia. Los valores se expresan en porcentaje (%).

	La Purísima		Bahía Tortugas		Emancipación	Leyes de Reforma		Progreso		Punta Abreojos	
	Az	Am	Az	Am		Az	Am	Az	Am	Az	Am
1	87.5	60.0	93.1	100.0	0.0	74.2	100.0	36.7	100.0	80.0	
2	12.5	40.0	6.9	0.0	100.0	25.2	0.0	30.0	0.0	20.0	
3	87.5	40.0	93.1	0.0	0.0	29.0	87.5	30.0	80.0	29.3	
4	12.5	35.0	6.9	0.0	90.9	9.7	0.0	46.7	0.0	9.7	

4.3 Distribución prevalencia e intensidad de *X. californiensis* en *H. fulgens* y *H. corrugata* con signos externos de deterioro (muestreo de contingencia)

El parásito *X. californiensis* se detectó tanto en abulón azul como amarillo de las cinco cooperativas estudiadas (Figura 10 y 11). El GIP fue de 2.4 en el abulón azul mientras que en el abulón amarillo fue de 2.1. *H. fulgens* presentó una prevalencia promedio de 85.2%, menor a la encontrada en *H. corrugata* con el 91.7%. En el abulón azul de las localidades correspondientes a las cooperativas Bahía Tortugas, Leyes de Reforma y Progreso la prevalencia fue del 100%, mientras que en las localidades correspondientes a las cooperativas Pescadores Nacionales de Abulón y California de San Ignacio la prevalencia fue de 60% y 83.3%, respectivamente. El GIP que se obtuvo en cada localidad para el abulón azul fue de 1.9, 2.7, 2.4, 2.7 y 2.3 para las cooperativas Pescadores Nacionales de Abulón, Bahía Tortugas, California de San Ignacio, Leyes de Reforma y Progreso, respectivamente. En el abulón amarillo de las cooperativas de Bahía Tortugas y Progreso la prevalencia de *X. californiensis* fue del 100%, mientras que en abulones provenientes de la cooperativa California de San Ignacio fue del 66.7%. El GIP en *H. corrugata* fue menor que en el abulón azul, el GIP para abulones provenientes de las cooperativas Bahía Tortugas, California de San Ignacio y Progreso fue de 2.5, 1 y 2.3, respectivamente. No todas las muestras proporcionadas por las cooperativas fueron analizadas debido a problemas de fijación.

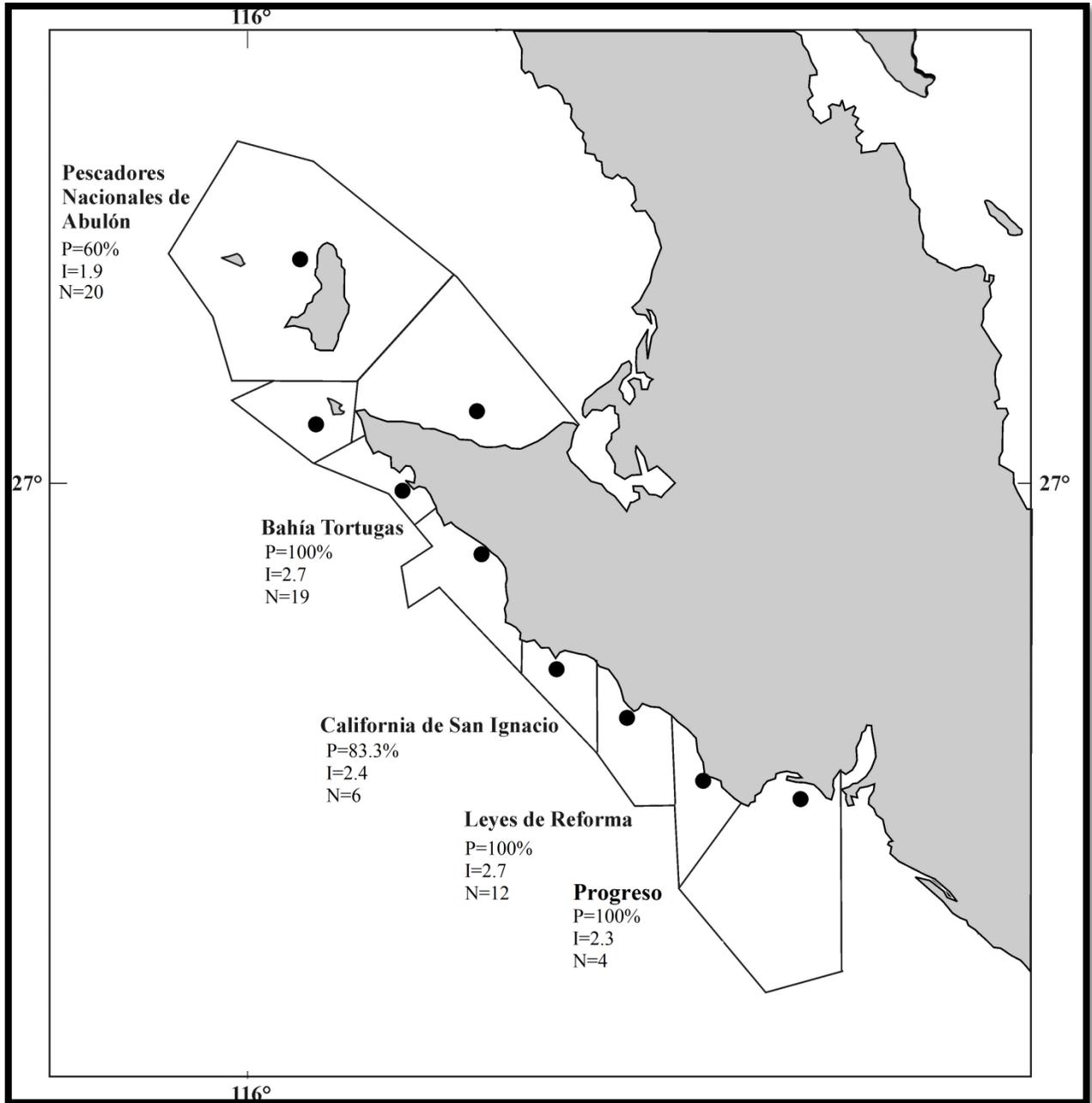


Figura 10. Mapa de distribución de *X. californiensis* en la principal zona de captura abulonera de la Península de Baja California, México en abulón azul del muestreo de contingencia, mostrando la prevalencia e intensidad promedio del parásito por histología en cada localidad estudiada. P, prevalencia; I, Intensidad; N, número de organismos.

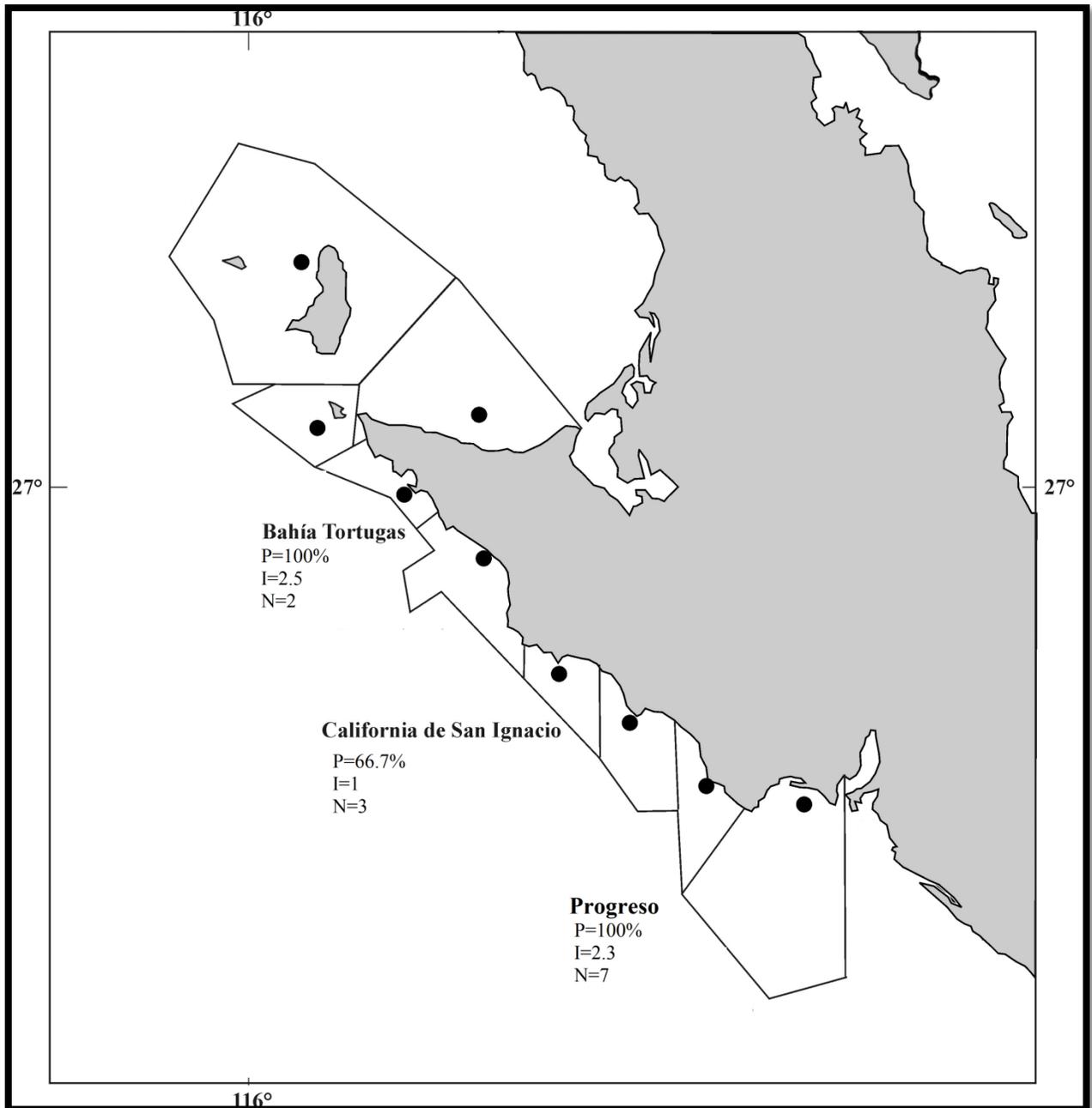


Figura 11. Mapa de distribución de *X. californiensis* en la principal zona de captura abulonera de la Península de Baja California, México en abulón amarillo del muestreo de contingencia, mostrando la prevalencia e intensidad promedio del parásito por histología en cada localidad estudiada. P, prevalencia; I, Intensidad; N, Número de organismos.

La proporción de organismos con distintos grados de intensidad de *X. californiensis* en *H. fulgens* y *H. corrugata* se muestra en la Tabla 7. En *H. fulgens* el grado de intensidad del parásito fue de medio a alto con el 54.1% de los organismos en un grado de 2-3. En el abulón amarillo el 25.0% de los organismos presentó un grado 1, el 41.7% un grado 2, el 16.7% un grado 3 y el 8.3% un grado 4 de intensidad. En la Tabla 8 se indica la prevalencia de IAR por epitelio. En ambas

especies de abulón los tejidos más afectados fueron el epitelio columnar ciliar del estómago y los divertículos digestivos y en menor proporción los epitelios del esófago.

Tabla 7. Proporción de *H. fulgens* y *H. corrugata* de acuerdo al grado de intensidad de *X. californiensis*. Az, *H. fulgens*; Am, *H. corrugata*. Los valores se expresan en porcentaje (%).

Escala	Pescadores Nacionales de Abulón	Bahía Tortugas		California de San Ignacio		Leyes de Reforma	Progreso	
	Az	Az	Am	Az	Am	Az	Az	Am
0	40.0	0.0	0.0	16.7	33.3	0.0	0.0	0.0
1	15.0	15.8	0.0	0.0	66.7	0.0	25.0	14.3
2	40.0	31.6	50.0	0.0	0.0	58.3	50.0	57.2
3	0.0	21.1	0.0	83.3	0.0	16.7	0.0	14.3
4	5.0	31.6	50.0	0.0	0.0	25.0	25.00	14.3
N	20	19	2	6	3	12	4	7

Tabla 8. Prevalencia de IAR en los diferentes epitelios del tracto digestivo de *H. fulgens* y *H. corrugata* del muestreo de contingencia. Az, *H. fulgens*; Am, *H. corrugata*; Conductos, Conductos de los divertículos digestivos. Los valores se expresan en porcentaje (%).

Tejido	Pescadores Nacionales de Abulón	Bahía Tortugas		California de San Ignacio		Leyes de Reforma	Progreso	
	Az	Az	Am	Az	Am	Az	Az	Am
Esófago	15.0	57.9	100.0	16.7	0.0	16.7	25.0	85.7
Estómago	40.0	89.5	100.0	83.3	0.0	83.3	25.0	85.7
Conductos	55.0	84.2	100.0	83.3	66.7	91.2	74.0	71.4

4.4 Prevalencia de signos externos de deterioro (SED) en abulones del muestreo de contingencia

El 100% de los abulones azules y amarillos de este muestreo presentaron SED; esto es, achicamiento y ablandamiento del pie, coloración oscura, pobre desarrollo gonadal y movilidad nula. Sin embargo, no todos los organismos fueron positivos por histología a *X. californiensis*. El

14.8% de los abulones azules no presentó al parásito pero mostraron SED, mientras que en el 8.3% de los abulones amarillos no se detectó al parásito pero si mostraron signos externos de deterioro (Figura 12).

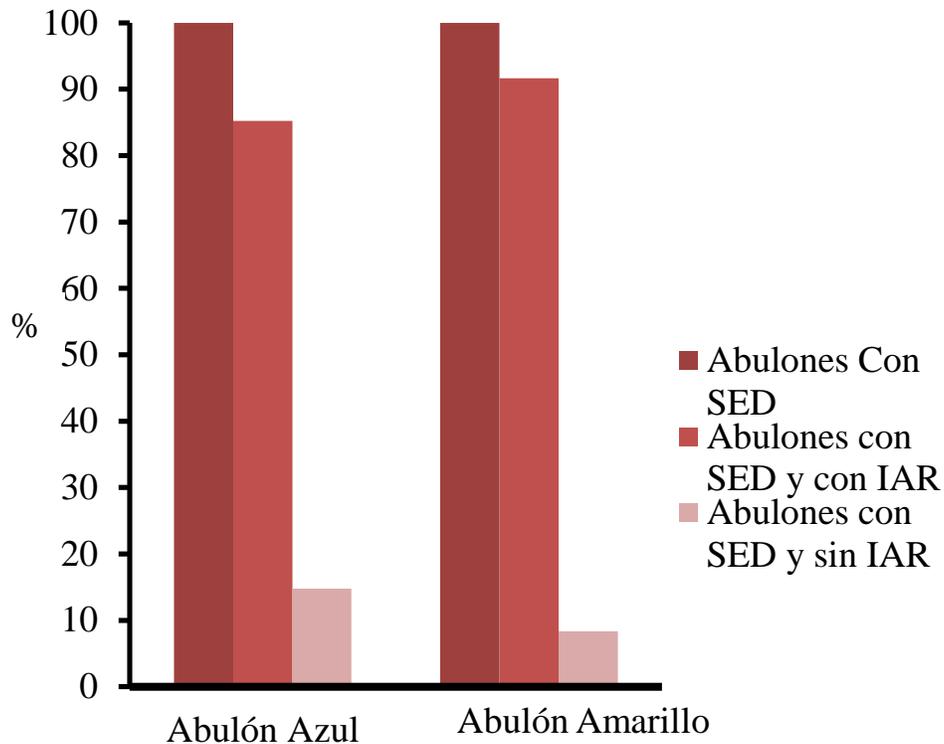


Figura 12. Proporción de abulones con signos externos de deterioro (SED) y sin ellos, así como con presencia o ausencia de *X. californiensis*, para *H. fulgens* y *H. corrugata* del muestreo de contingencia.

4.5 Alteraciones histológicas en *H. fulgens* y *H. corrugata* por *X. californiensis*

A nivel histológico los organismos infectados con *X. californiensis* con grado de intensidad 1 no mostraron desarrollo de la enfermedad. A partir de grados de infección de 2 se observó un desplazamiento del núcleo de la célula hospedera, hipertrofia de la misma y, como avanzó la enfermedad, se observó un desarreglo celular, aumento del tejido conectivo en las zonas aledañas a la infección, degeneración y desprendimiento de los epitelios, en los casos más severos (grados 3 a 4). En infecciones severas, la degeneración tisular alcanzó a los divertículos digestivos produciendo metaplasia y el tejido gonádico se observó indiferenciado o en estado de reabsorción.

La infección en *H. fulgens* y *H. corrugata* fue similar a la que se ha descrito en *H. cracherodii* y *H. rufescens*. En la Figura 13 se muestra un epitelio columnar ciliar no infectado del tracto digestivo de *H. corrugata* y un epitelio del mismo, infectado por *X. californiensis*. En infecciones ligeras (Grado 1) se puede observar la presencia de pocas IAR en los epitelios gastrointestinales del abulón sin alteraciones evidentes que demuestren el desarrollo de la enfermedad (Figura 14 B). En infecciones severas se observó un incremento en el número de IAR dentro los epitelios gastrointestinales (Figura 14 C y D), también se apreció un desarreglo celular de los tejidos adyacentes a las IAR (Figura 14 E y F). En algunos casos se puede observar el desprendimiento de las células epiteliales infectadas (Figura 15).

Otra alteración observada fue el cambio arquitectónico en los divertículos digestivos que tienden a adquirir el tamaño, forma y organización normal de las células epiteliales del tracto gastrointestinal, se presentó también un aumento en el tejido conectivo de la zona (Figura 16 y 17). A este cambio estructural, diversos autores le han llamado metaplasia (Gradner *et al.*, 1995; Friedman *et al.*, 2000; Moore *et al.*, 2011). En raras ocasiones se observó la proliferación de las células cafés (Figura 18).

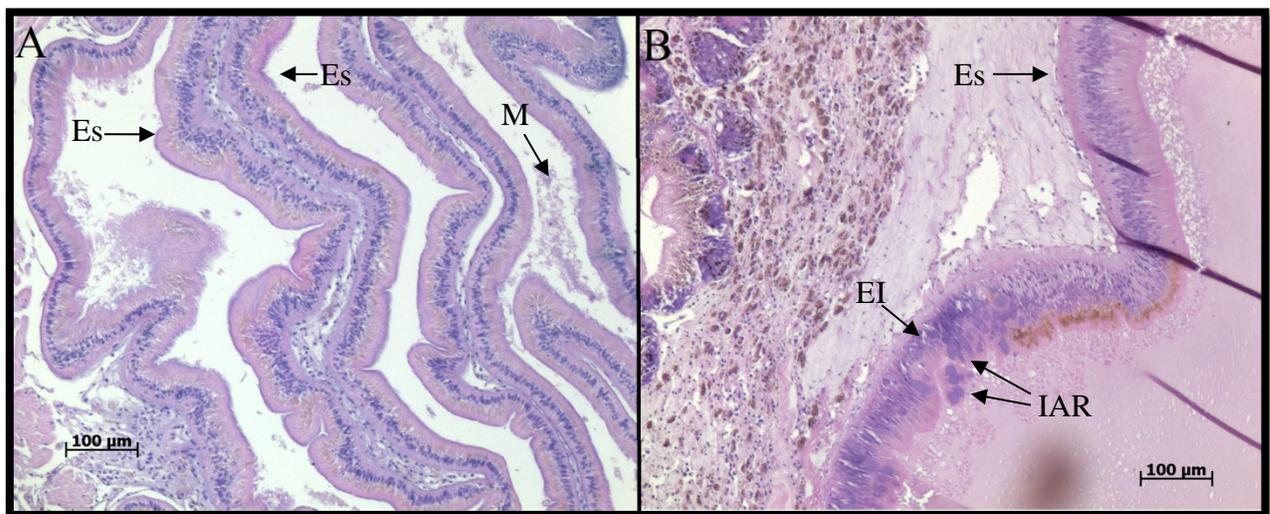


Figura 13. Epitelios gastrointestinales de *H. corrugata*. A) Vista panorámica de epitelios sanos (Es) de *H. corrugata*, con presencia de mucus (M). B) Epitelio infectado (EI) de *H. corrugata*, en el cual se pueden apreciar claramente las inclusiones intracitocelulares (IAR) formadas por *X. californiensis*.

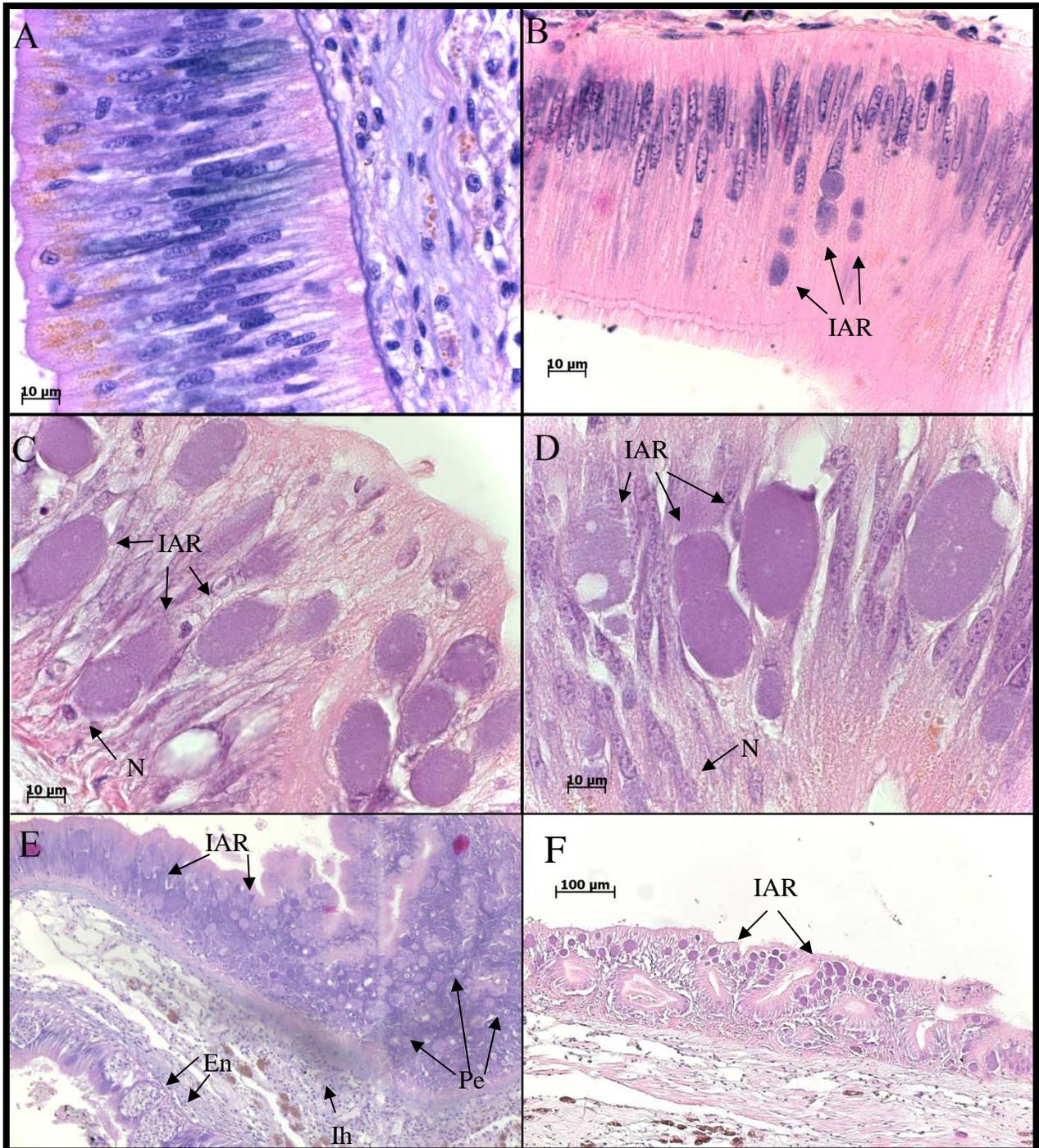


Figura 14. Serie de imágenes mostrando la infección de *X. californiensis* en los epitelios del tracto digestivo de *H. fulgens* y *H. corrugata*. A) Epitelio columnar ciliar sano del estómago de *H. fulgens*. B) Infección ligera con pocas IAR y sin alteraciones tisulares. C) y D) Infecciones severas por el parásito, numerosas IAR que desplazan al núcleo (N) de la célula hospedera hipertrofiándola. E) y F) Vista panorámica de una infección severa por *X. californiensis*. Se observa una gran cantidad de IAR que han causado la pérdida estructural (Pe) del epitelio donde se encuentran. E) Algunas encapsulaciones de naturaleza desconocida (En) y una leve infiltración de hemocitos (Ih).

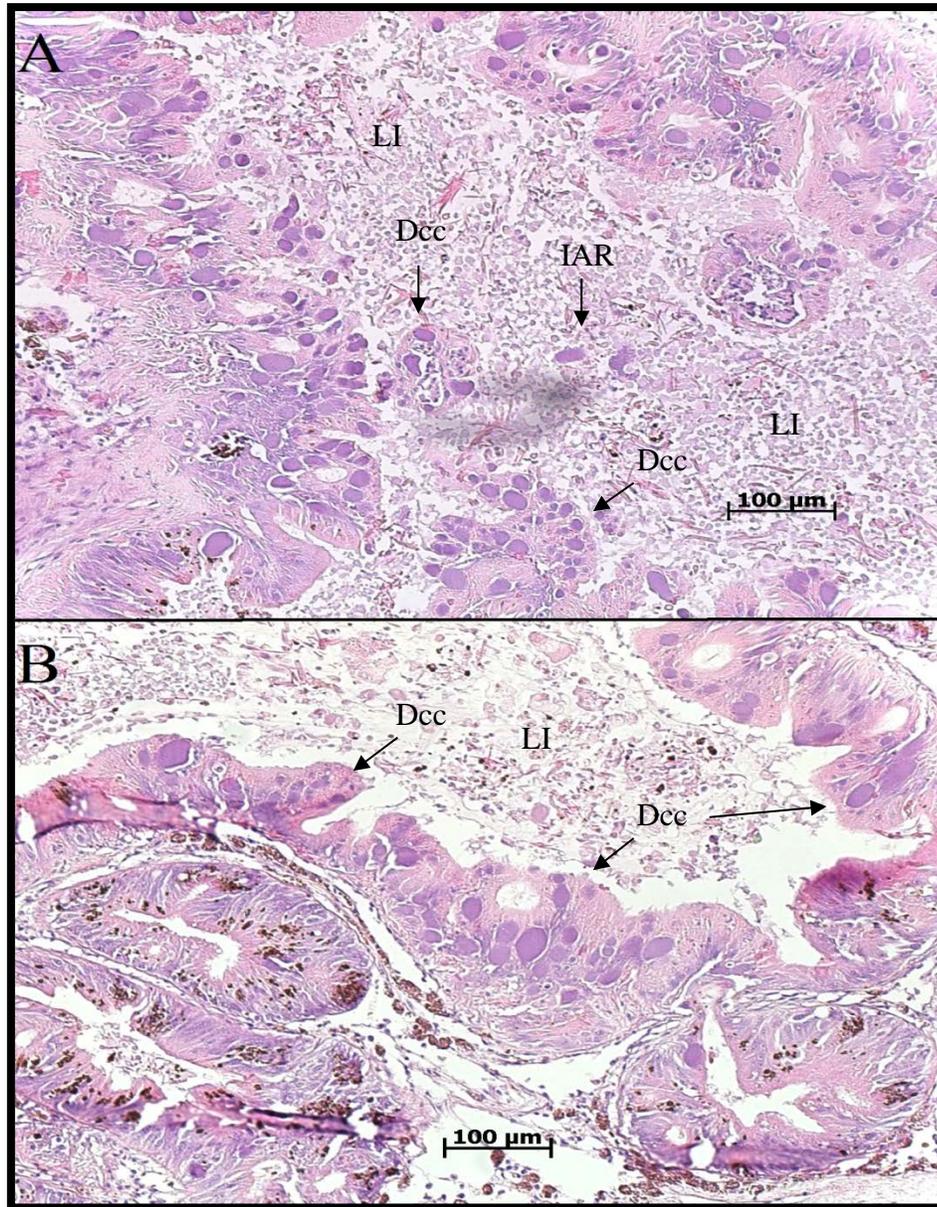


Figura 15. Desprendimiento de células epiteliales infectadas. Serie de imágenes del lumen del intestino (LI) en *H. fulgens* y *H. corrugata*, con infecciones severas por *X. californiensis* mostrando el desprendimiento de células columnares ciliares (Dcc). A) Infección severa en *H. fulgens* con evidencia de ruptura de las células hospederas y la expulsión del parásito al lumen del intestino. B) Severa infección en *H. corrugata*, donde se observa la pérdida de estructura del epitelio, al igual que en la imagen A se ve evidencia del desprendimiento de las células afectadas por *X. californiensis*.

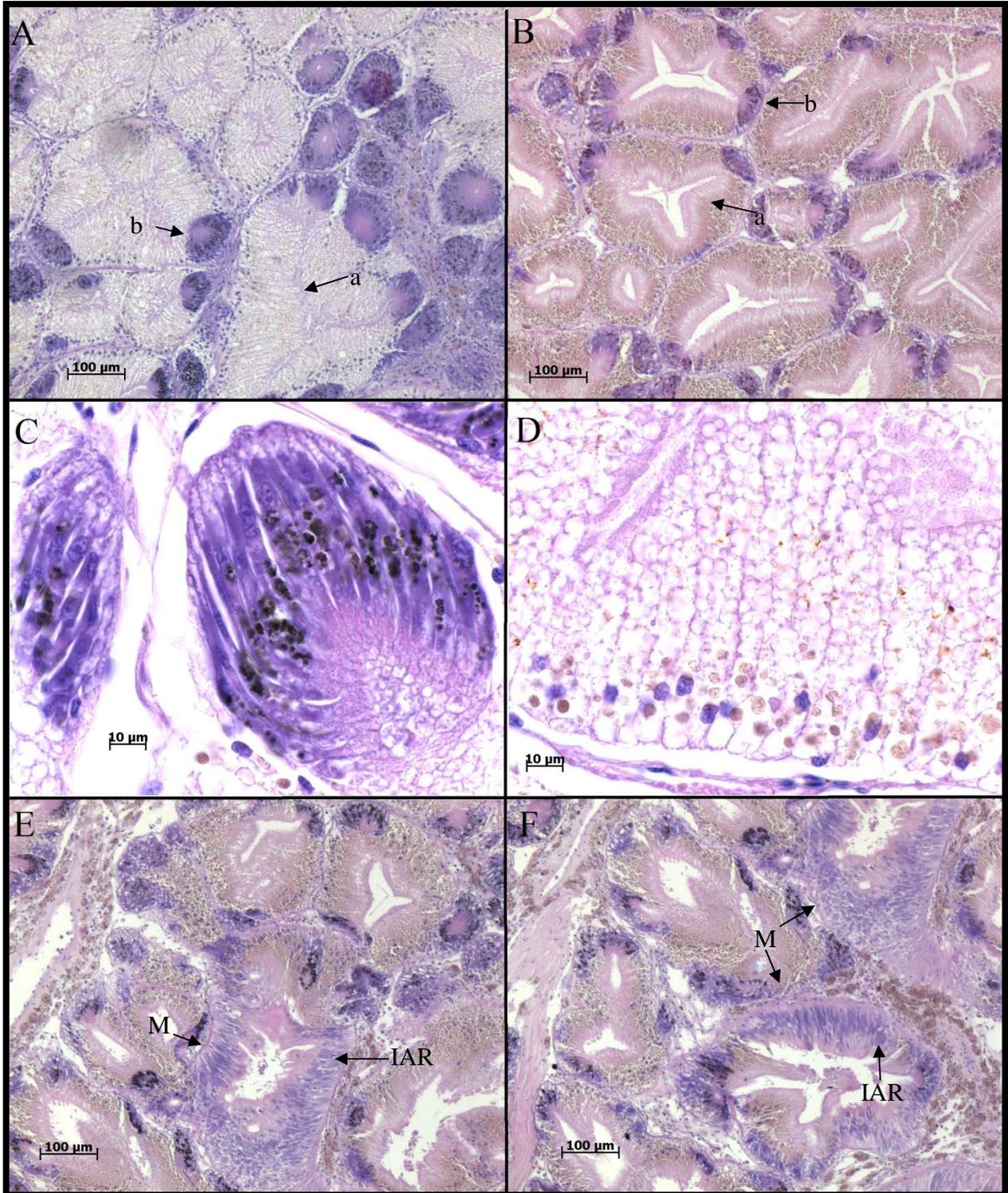


Figura 16. Metaplasia de los divertículos digestivos en *H. fulgens* y *H. corrugata*. Conformación normal de los divertículos digestivos de A) *H. fulgens* y B) *H. corrugata*; en ambas se observan las células crípticas (b) y la células adyacentes o células alfa (a). C) Células crípticas ricas en gránulos citoplasmáticos que contienen enzimas digestivas. D) Se aprecia la estructura de las células alfa también secretoras de enzimas de carácter digestivo. E) y F) se observa el cambio arquitectónico

(M) de los divertículos digestivos y se aprecian algunas IAR en los divertículos con la nueva estructura.

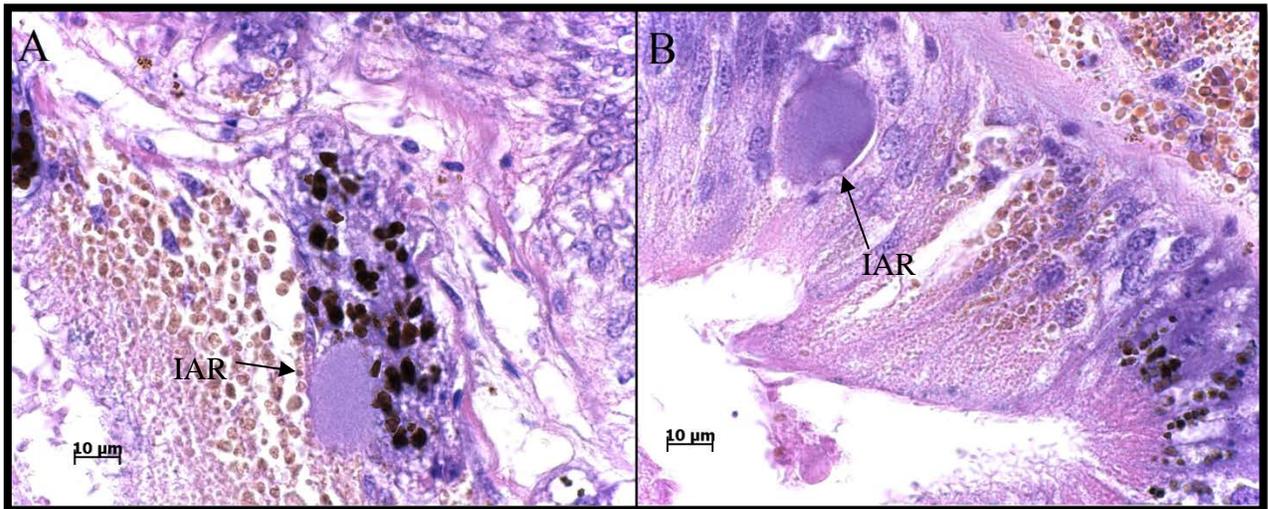


Figura 17. *Xenohalictis californiensis* en los divertículos digestivos. A) se observa una IAR dentro de una célula críptica. B) Se puede apreciar una IAR dentro de las células alfa que ha tomado la forma, tamaño y estructura de las células epiteliales del tracto digestivo.

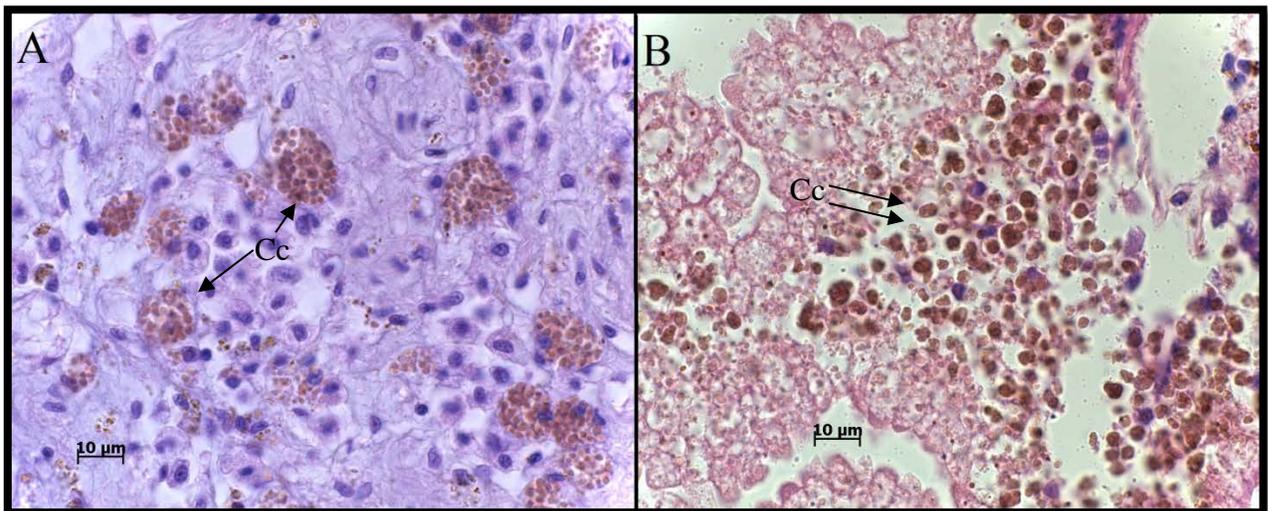


Figura 18. Abundantes células cafés (Cc), en A) y B). En ocasiones se observaron en conjunto de infecciones severas por *X. californiensis*.

En la Tabla 9 se muestra la proporción de organismos de acuerdo al grado de metaplasia. En el 47.5% de los organismos se encontró un grado de metaplasia de 0.

Tabla 9. Proporción de *H. fulgens* y *H. corrugata* provenientes de la captura comercial en distintos grados de metaplasia. Az, *H. fulgens*; Am, *H. corrugata*. Los valores están expresados en porcentaje (%).

Metaplasia	La Purísima		Bahía Tortugas		Emancipación	Leyes de Reforma		Progreso		Punta Abreojos	
	Az	Am	Az	Am	Az	Am	Az	Am	Az	Am	
0	37.5	90.0	44.8	50.0	18.2	80.7	0.0	60.0	33.3	60.0	
1	12.5	5.0	24.1	50.0	0.0	16.1	50.0	16.7	44.4	16.7	
2	37.5	5.0	24.1	0.0	9.1	0.0	50.0	16.6	22.2	6.7	
3	12.5	0.0	6.9	0.0	72.7	3.2	0.0	6.7	0.0	16.7	
Total	8	20	29	2	11	30	8	30	9	30	

En abulón azul se encontró una correlación significativa entre el grado de metaplasia y la intensidad de infección en abulones de todas las localidades estudiadas con la excepción de Punta Abreojos. En abulón amarillo sólo se encontró una correlación significativa en organismos de las cooperativas Leyes de Reforma, Progreso y Punta Abreojos (Tabla 10).

Tabla 10. Análisis de correlación de Spearman entre el grado de metaplasia y la intensidad de *X. californiensis* en el abulón azul y amarillo de la captura comercial. Az, *H. fulgens*; Am, *H. corrugata*. Los números en rojo indican una correlación estadísticamente significativa.

	La Purísima		Bahía Tortugas		Emancipación	Leyes de Reforma		Progreso		Punta Abreojos	
	Az	Am	Az	Am	Az	Am	Az	Am	Az	Am	
R	0.75	0.23	0.81	*	0.69	0.52	0.76	0.65	0.48	0.84	
Nivel de Significancia	0.03	0.30	0.00	*	0.01	0.00	0.02	0.00	0.18	0.00	

*Tamaño de muestra insuficiente para realizar el análisis.

4.6 Prevalencia e intensidad de *X. californiensis* infectado por un bacteriófago

Se detectó la presencia de una variante morfológica de *X. californiensis*; esta variante tiñe de azul marino profundo con hematoxilina eosina y tiene una apariencia granulosa o áspera (Figura 19). De acuerdo a Friedman *et al.* (2012) esta apariencia se debe a la presencia de un bacteriófago que se encuentra hiperparasitando a *X. californiensis*. La presencia de esta variante morfológica fue

confirmada en abulón azul en todas las localidades estudiadas. En el abulón amarillo esta variante morfológica se detectó en abulones de cuatro de las localidades estudiadas (Tabla 11).

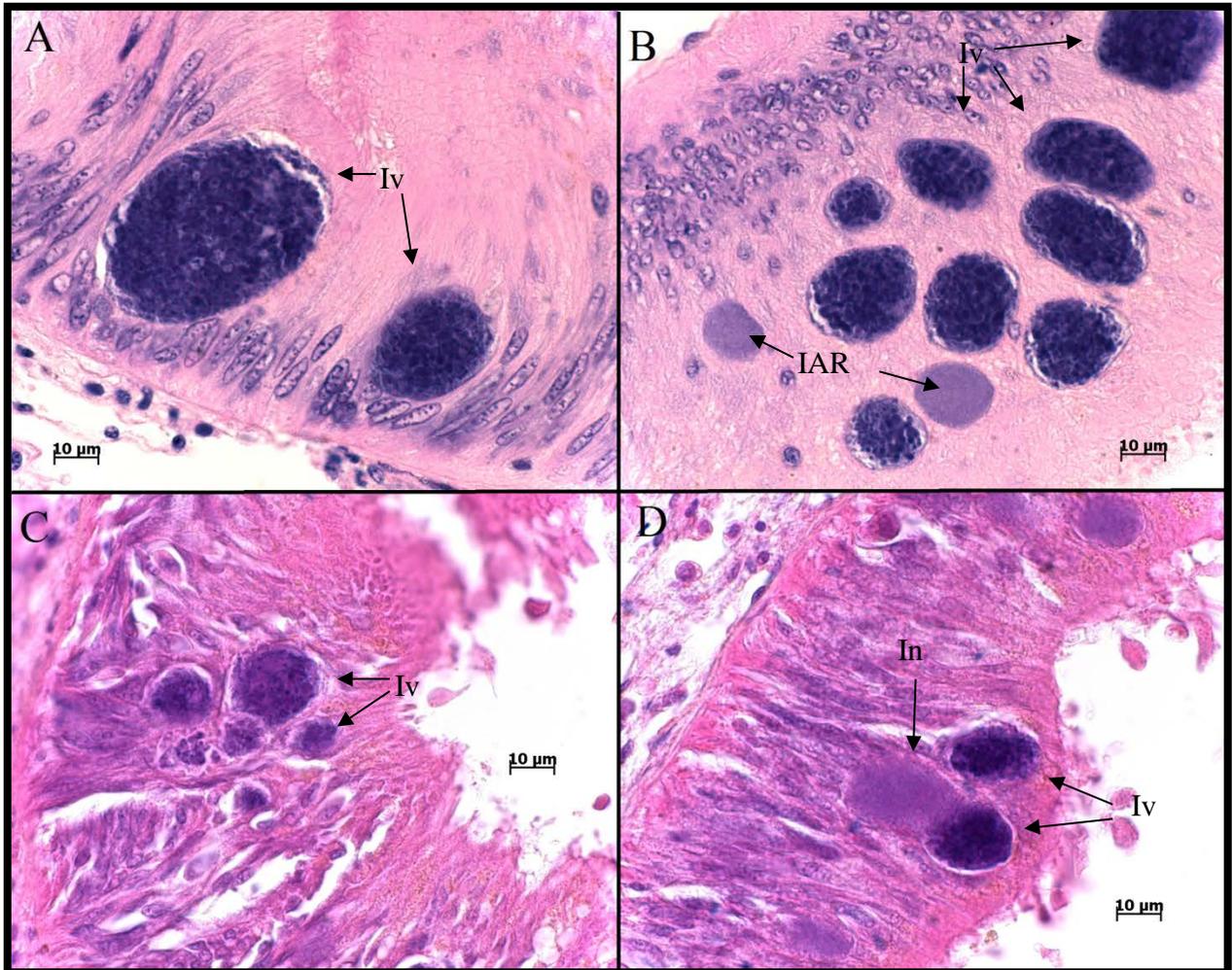


Figura 19. *Xenohalotis californiensis* hiperparasitado por un bacteriófago. Serie de imágenes mostrando las características morfológicas de las inclusiones de *X. californiensis* infectado por un bacteriófago. En A) y B) se observan los dos tipos de inclusiones en abulón rojo, especie donde fueron detectadas y estudiadas por primera vez, nótese la clara diferencia en la pigmentación, la clásica IAR (In) tiñe violeta rosado, mientras que la inclusión variante (Iv) tiñe azul marino profundo y tiene un aspecto áspero o rugoso. En C) y D) se observan las inclusiones variantes en abulón azul, se aprecia la clara similitud entre las inclusiones variantes de las dos especies de abulón. En D) se puede apreciar una inclusión con apariencia típica en una parte y rugosa, en otra.

El grado de intensidad de las inclusiones con fago fue menor que las inclusiones típicas de *X. californiensis* en las dos especies de abulón. En *H. fulgens* el 96% de los organismos mostro una cantidad de IAR con fago equivalente a un grado de intensidad de 1 a 2 y solamente un organismo presentó un grado de intensidad de 3. En el abulón amarillo el 100% de los

organismos presentaron una intensidad de la variante morfológica de *X. californiensis* de 1 a 2 (Tabla 12).

Tabla 11. Prevalencia de las inclusiones de *X. californiensis* infectado por un bacteriófago en las distintas localidades examinadas.

Localidad	<i>H. fulgens</i>	<i>H. corrugata</i>
	Prevalencia (%)	Prevalencia (%)
La Purísima	50.0	25.0
Bahía Tortugas	44.8	0.0
Emancipación	45.5	*
Leyes de Reforma	*	10.0
Progreso	12.5	33.3
Punta Abreojos	33.3	16.7

*Sin datos para esa especie

Las inclusiones de *X. californiensis* infectadas por el bacteriófago se registraron principalmente en el epitelio del estómago y en los divertículos digestivos y en menor grado en el resto de los epitelios del tracto digestivo. La Tabla 13 indica la prevalencia de las IAR con bacteriófago por epitelio en *H. fulgens* y *H. corrugata*.

Tabla 12. Proporción de *H. fulgens* y *H. corrugata* de acuerdo al grado de intensidad de *X. californiensis* parasitado por un bacteriófago. Az, *H. fulgens*; Am, *H. corrugata*. Los valores se expresan en porcentaje (%).

Escala	La Purísima		Bahía Tortugas		Emancipación	Leyes de Reforma		Progreso		Punta Abreojos	
	Az	Am	Az	Am	Az	Am	Az	Am	Az	Am	
0	50.0	75.0	55.2	0	54.5	90.0	87.5	66.7	66.7	83.3	
1	25.0	5.0	17.2	0	18.2	10.0	0.0	0.0	22.2	0.0	
2	25.0	20.0	27.6	0	18.2	0.0	12.5	33.33	11.1	16.7	
3	0.0	0.0	0.0	0	9.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
4	0.0	0.0	0.0	0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
N	8	20	29	2	11	30	8	30	9	30	

Tabla 13. Prevalencia de IAR con bacteriófago en los diferentes epitelios del tracto digestivo en donde se encontraron en *H. fulgens* y *H. corrugata*. Az, *H. fulgens*; Am, *H. corrugata*; Conductos, Conductos de los divertículos digestivos. Los valores están expresados en porcentaje (%).

Tejido	La Purísima		Bahía Tortugas		Emancipación Az	Leyes de Reforma Am	Progreso		Punta Abreojos	
	Az	Am	Az	Am			Az	Am	Az	Am
Esófago	12.5	5.0	3.4	0.0	27.3	6.7	12.5	33.3	0.0	16.7
Estómago	12.5	25.0	20.7	0.0	18.2	3.3	12.5	26.7	11.1	16.7
Conductos	37.5	10.0	31.0	0.0	0.0	0.0	12.5	20.0	33.3	10.0

4.7 Detección de *X. californiensis* por amplificación de un fragmento del gen 16S rDNA

Mediante el diagnóstico por PCR, se llevó a cabo la amplificación de un fragmento del gen 16S rDNA de *X. californiensis* en *H. fulgens* y *H. corrugata*. Se obtuvo un fragmento aproximado al tamaño esperado de 160pb (Figura 20). Se detectó a *X. californiensis* en el abulón azul y amarillo de todas las localidades estudiadas del muestreo de captura comercial; estos resultados corroboran la distribución del parásito establecida por el diagnóstico histológico.

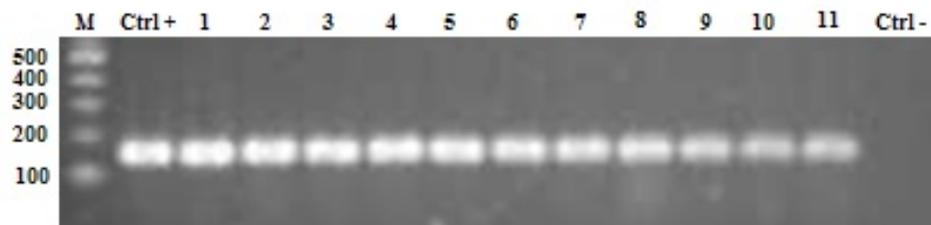


Figura 20. Detección de *X. californiensis* en *H. fulgens* y *H. corrugata* por PCR con el uso de primers para un fragmento del gen 16s rDNA. M, Marcador molecular de 0.1 a 1Kb (Invitrogen); Ctrl +, Control positivo; 1-6, Muestras de *X. californiensis* en *H. fulgens*; 7-11, Muestras de *X. californiensis* en *H. corrugata*; Ctrl. -, Control negativo.

4.8 Confirmación de *X. californiensis* por hibridación *in situ*

La hibridación *in situ* confirmó que las inclusiones observadas en *H. fulgens* y *H. corrugata* por histología corresponden a *X. californiensis* (Figura 21). Las laminillas sin inclusiones de *X. californiensis* no presentaron evidencia de hibridación.

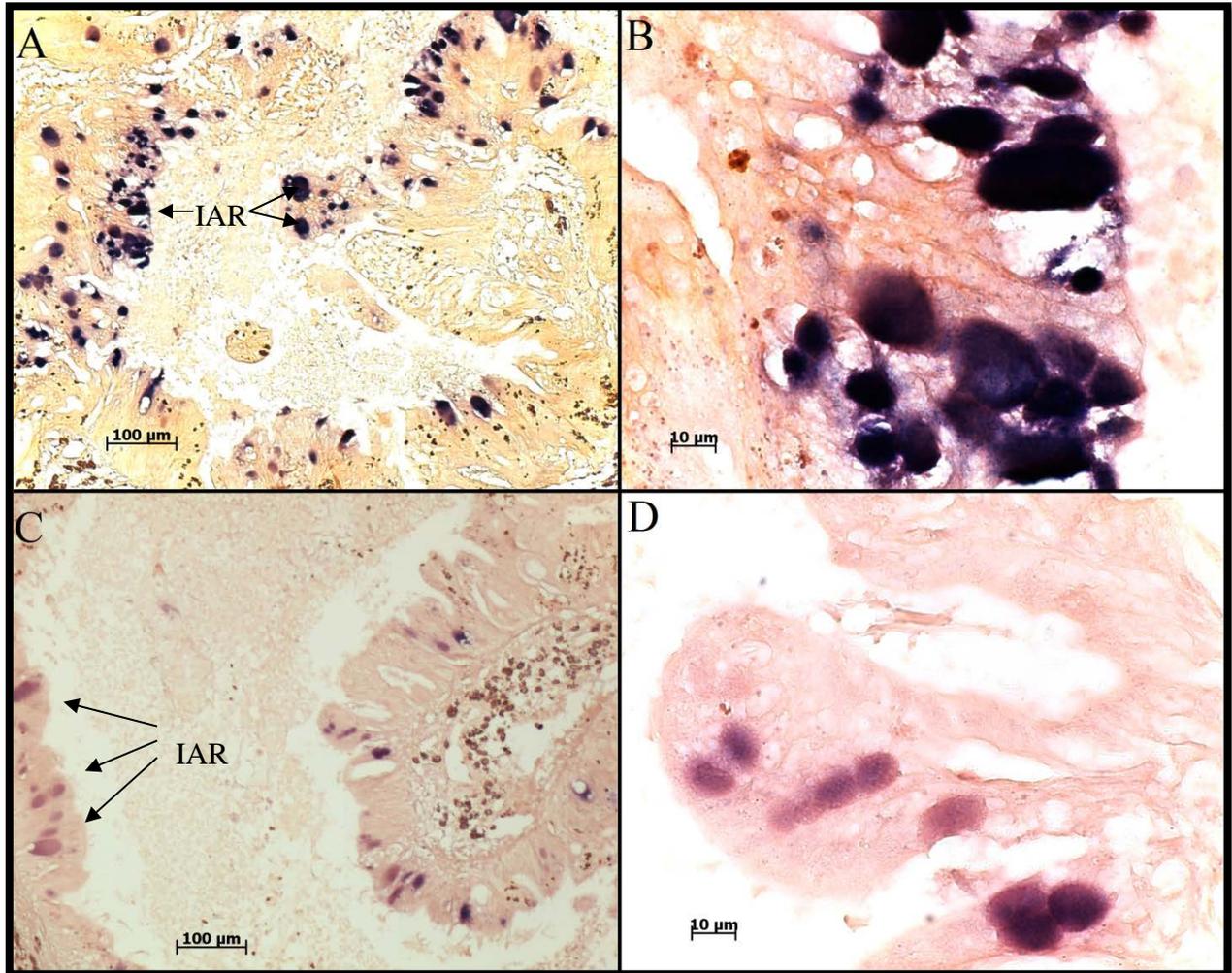


Figura 21. Detección por hibridación *in situ*. Serie de imágenes mostrando tejido infectado por *X. californiensis* en A) *H. fulgens* y C) *H. corrugata*; se observa la coloración azul a morado donde se unió la sonda en las inclusiones llenas de *X. californiensis*. En B) y D) se aprecia con mayor claridad la hibridación de la sonda con las inclusiones formadas por *X. californiensis*.

4.9 Validación de técnicas de detección para *X. californiensis*

Se compararon las tres técnicas de diagnóstico utilizadas (Histología, PCR y SED). Para la comparación se consideraron 70 de los resultados obtenidos por signos externos, histología y PCR. Se tomó como un caso positivo cuando dos técnicas dieron un resultado positivo para el mismo ejemplar y en los casos que por histología se mostró la presencia del parásito. La prueba Q de Cochran mostró que entre las tres técnicas de diagnóstico para *X. californiensis* hay diferencias altamente significativas ($Q = 69.77049^{***}$, $P < 0.000$) (Tabla 14).

Tabla 14. Prueba Q de Cochran para las técnicas de diagnóstico de *X. californiensis*.

Número de Casos: 70 $Q = 69.77049$, $G1=2$, $P < 0.000$			
Técnica	Suma	% de 0	% de 1
Histología	65.00	7.14	92.85
PCR	29.00	58.57	41.42
Signos externos de deterioro	13.00	81.42	18.57

La detección con la técnica que considera los signos externos de deterioro mostró ser la menos efectiva, con un porcentaje del 19.6%. La técnica histológica presentó un porcentaje de efectividad del 98.4%, siendo la técnica más efectiva. Para la técnica de PCR, su efectividad fue del 43.9%.

4.10 Simbiontes de *H. fulgens* y *H. corrugata*

El análisis histopatológico de los abulones *H. fulgens* y *H. corrugata*, mostró la presencia de simbiontes en los distintos tejidos analizados. En las branquias se encontraron artrópodos, protozoarios ciliados y protozoarios tipo *Ancistrocoma*. En la zona del esófago se detectaron protozoarios ciliados multinucleados y en el estómago, protozoarios tipo ameboideo y encapsulaciones de naturaleza desconocida. En el riñón se detectó la presencia de *P. haliotis*.

En la cavidad branquial, entre los filamentos branquiales, se encontró la presencia de protozoarios ciliados. Estos organismos presentaron una gran variedad de formas, de elongadas a esféricas. En general no se observó una respuesta celular por parte del hospedero aunque en ocasiones, cuando la intensidad de estos organismos fue alta, se presentó secreción de mucus (Figura 22). En el abulón azul de la captura comercial la prevalencia fue de 31.7%, mientras que la prevalencia en el abulón amarillo fue 30.4%. La prevalencia de los protozoarios ciliados fue de 22.5% y 6.3% en el abulón azul y amarillo del muestreo de contingencia, respectivamente.

En el 100% de los abulones del muestreo de contingencia de la cooperativa Progreso se detectaron artrópodos no asociados a una reacción por parte del hospedero y en algunos casos se pudieron observar los sacos ovígeros en las hembras (Figura 23). En las branquias se detectaron protozoarios tipo *Ancistrocoma* (Figura 24). Estos sólo se detectaron en el abulón azul de la captura comercial y tuvieron una prevalencia del 4.2%.

En la bolsa del esófago, para ambas especies de abulón, se encontraron protozoarios ciliados multinucleados (Figura 25). En el muestreo de abulones provenientes de la captura comercial se observó una prevalencia del 4.5% en abulón azul y del 1.0% en abulón amarillo; mientras que su prevalencia fue de 3.2% y 4.7% en el abulón azul y amarillo del muestreo de contingencia respectivamente.

En el estómago se detectaron protozoarios tipo ameboideo, estos poseían estructuras tipo pseudópodos con las que se sostenían del epitelio columnar ciliar del estómago, causando un daño evidente y erosionando el epitelio (Figura 26 y 27). Se observó una respuesta inflamatoria por parte del hospedero consistente en una infiltración de hemocitos y la secreción de mucus. Se encontraron exclusivamente en el abulón azul de la cooperativa Bahía Tortugas del muestreo de la captura comercial y presentaron una prevalencia de 10.3%.

En el riñón se observaron infecciones de ligeras a severas por el coccidio renal *P. haliotis*. A pesar de que el tejido renal puede estar invadido por el parásito, no se detectó una reacción hemolítica por parte del hospedero, con excepción de dos casos donde se registró una infiltración de hemocitos (Figura 28). En el abulón azul la prevalencia de este parásito fue del 15.6% y 7.3% en el muestreo de la captura comercial y muestreo de contingencia, respectivamente. En el abulón

amarillo la prevalencia fue del 10.3% en organismos provenientes de la captura comercial, mientras que el parásito no se observó en el muestreo de contingencia.

En algunas ocasiones se observaron encapsulaciones con presencia de hemocitos, pero no se observó el agente causante, estas se detectaron en los epitelios del estómago y en los divertículos digestivos (Figura 29).

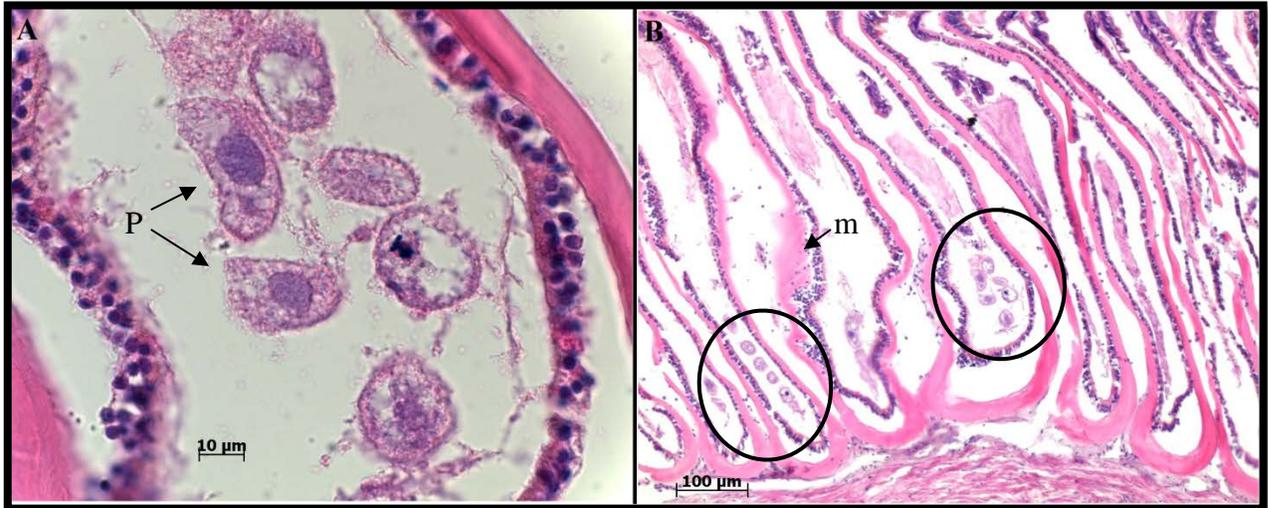


Figura 22. Protozoarios ciliados en los filamentos branquiales. A) Se muestran detalles de la morfología de los protozoarios ciliados (P) entre los filamentos branquiales. B) Se muestra una vista panorámica de las branquias de *H. corrugata* con algunos protozoarios ciliados (en círculos) y se aprecian secreciones de mucus (m).

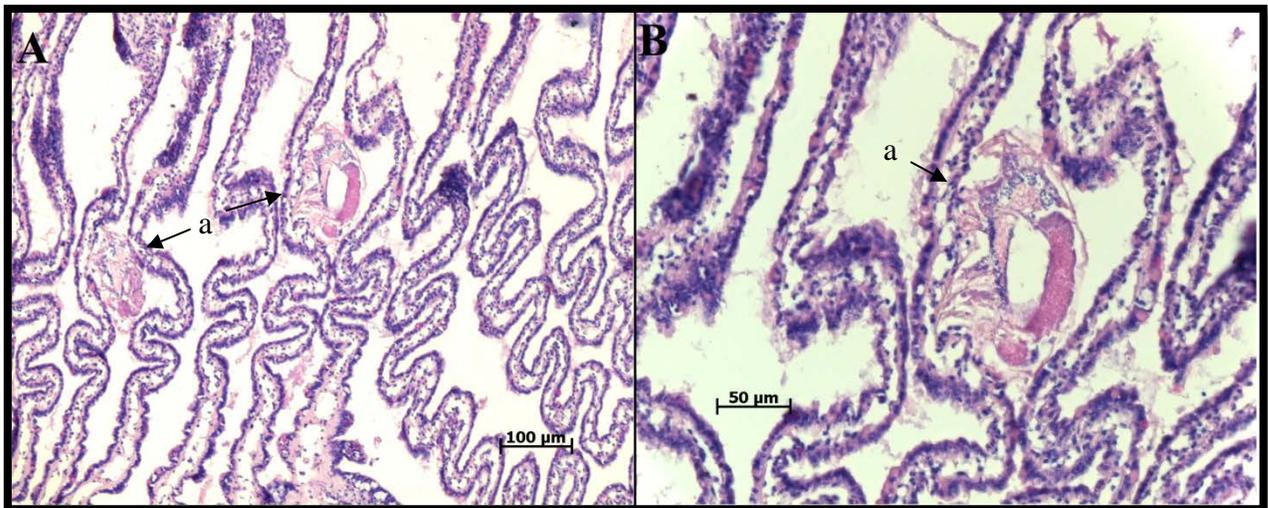


Figura 23. Artrópodos entre los filamentos branquiales. A) Se muestra una vista panorámica de las branquias de *H. corrugata*, donde se pueden apreciar dos artrópodos (a) entre los filamentos branquiales. B) Se muestra a detalle la morfología de estos artrópodos.

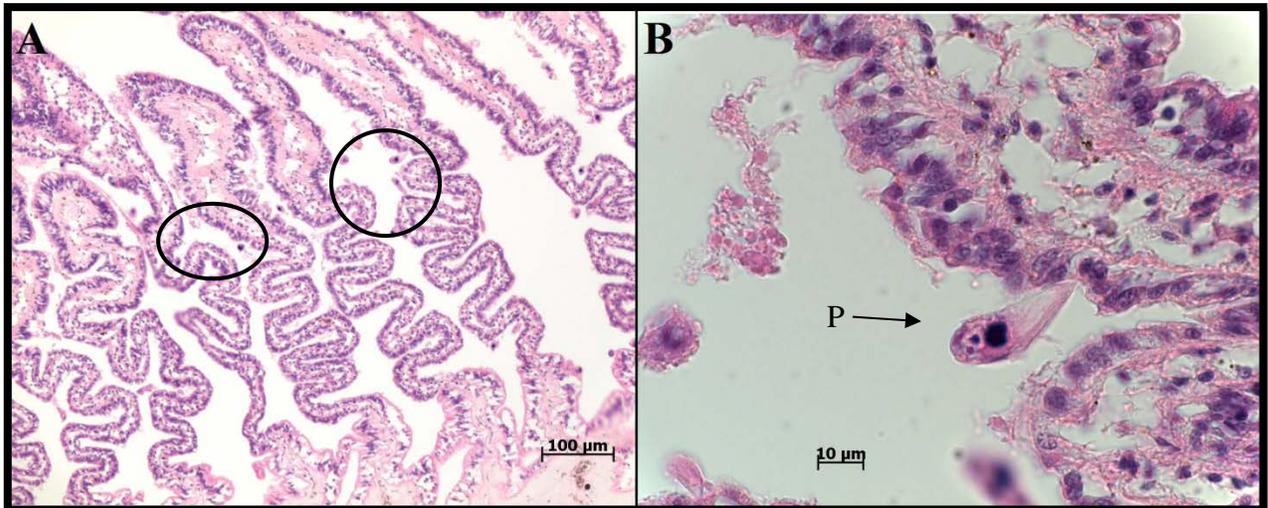


Figura 24. Serie de imágenes que muestran protozoarios tipo *Ancistrocoma* adheridos al epitelio branquial de *H. fulgens*. A) Se muestra una vista panorámica de las branquias con algunos protozoarios encerrados en círculos. Los protozoarios (P) se adhieren a las células del epitelio. En B) se muestran a detalle la morfología de los protozoarios.

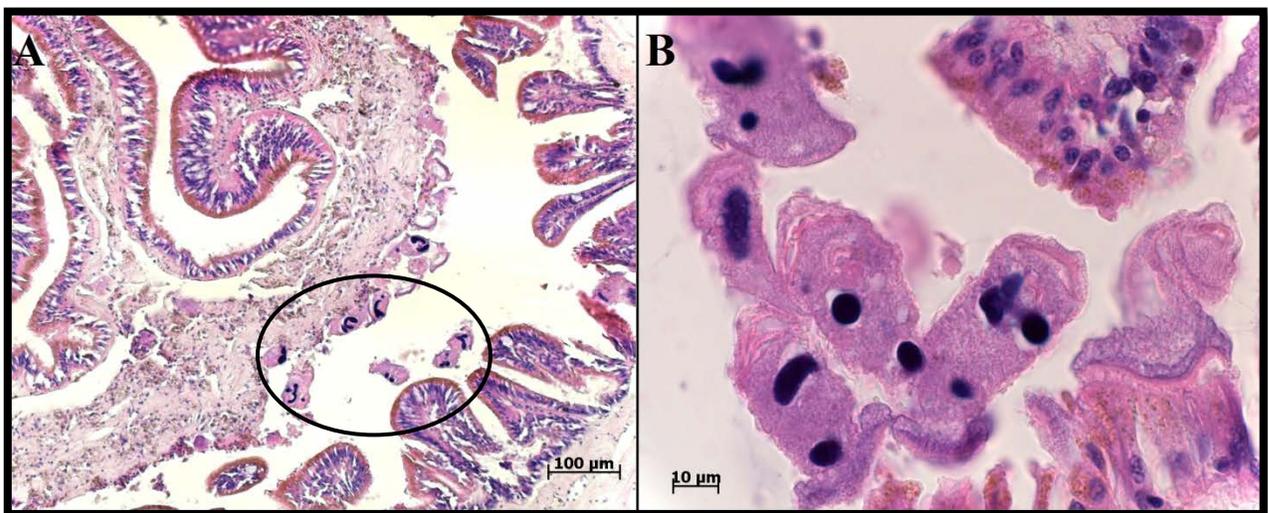


Figura 25. Imágenes que muestran protozoarios ciliados multinucleados en la bolsa del esófago de *H. fulgens*. En A) se muestra una vista panorámica de la bolsa del esófago con algunos protozoarios encerrados en círculos. En B) se muestran detalles de la morfología de los protozoarios.

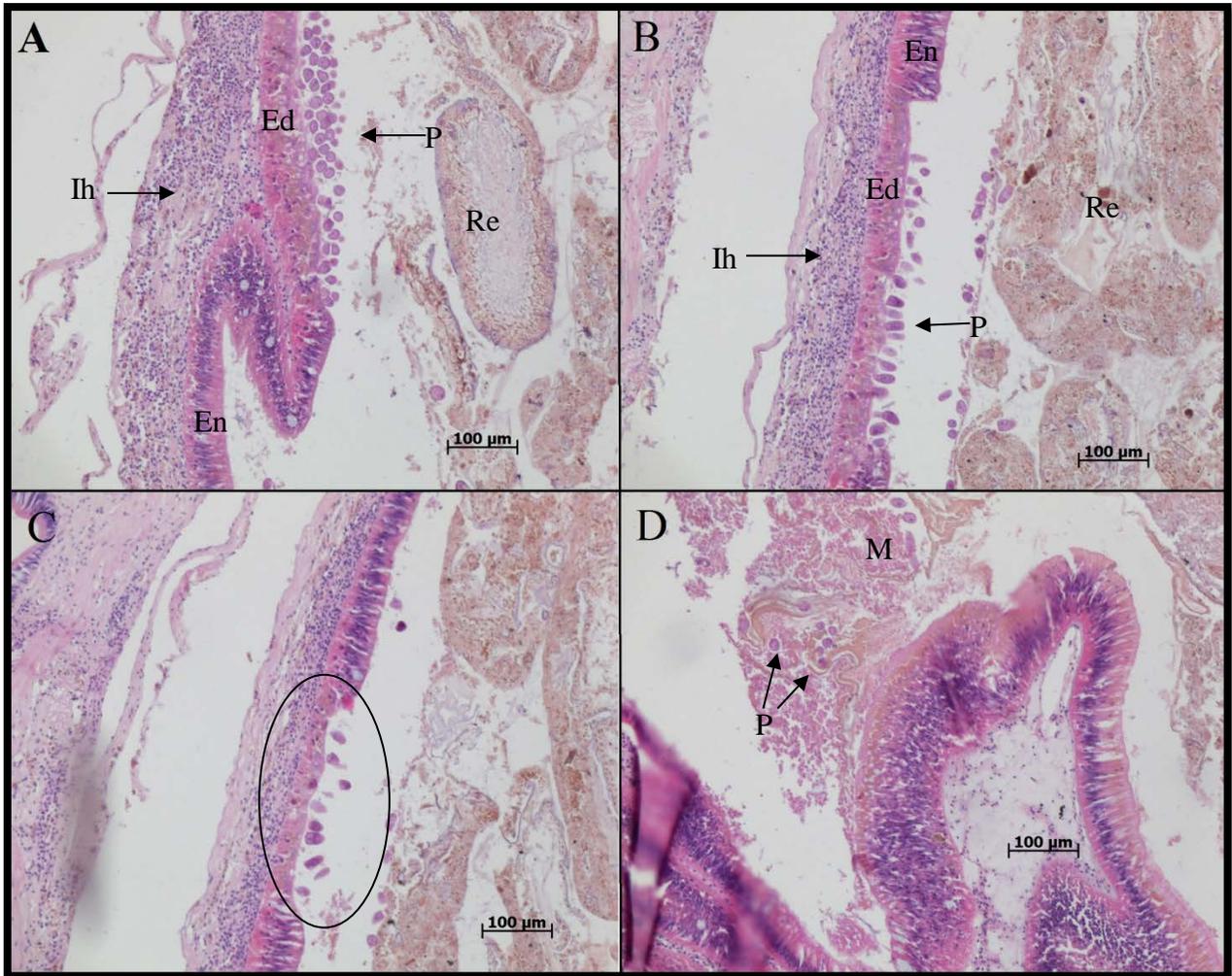


Figura 26. Serie de imágenes que muestran protozoarios tipo ameboideo adheridos al epitelio columnar ciliar del estómago de *H. fulgens*. En A) y B) se muestran vistas panorámicas del epitelio invadido por protozoarios, el daño en el epitelio es evidente (Ed) en comparación con el epitelio normal (En) en donde las células columnares mantienen su estructura. Los protozoarios (P) se adhieren a las células del epitelio; en el tejido conectivo contiguo se observa una infiltración hemocítica (Ih) mostrando que los mecanismos de defensa del abulón están activos. En el lumen del estómago se observan restos de alimento (Re). En C) se muestra la zona afectada (dentro del círculo) y en D), se observan protozoarios envueltos en mucus (m) en el lumen del estómago.

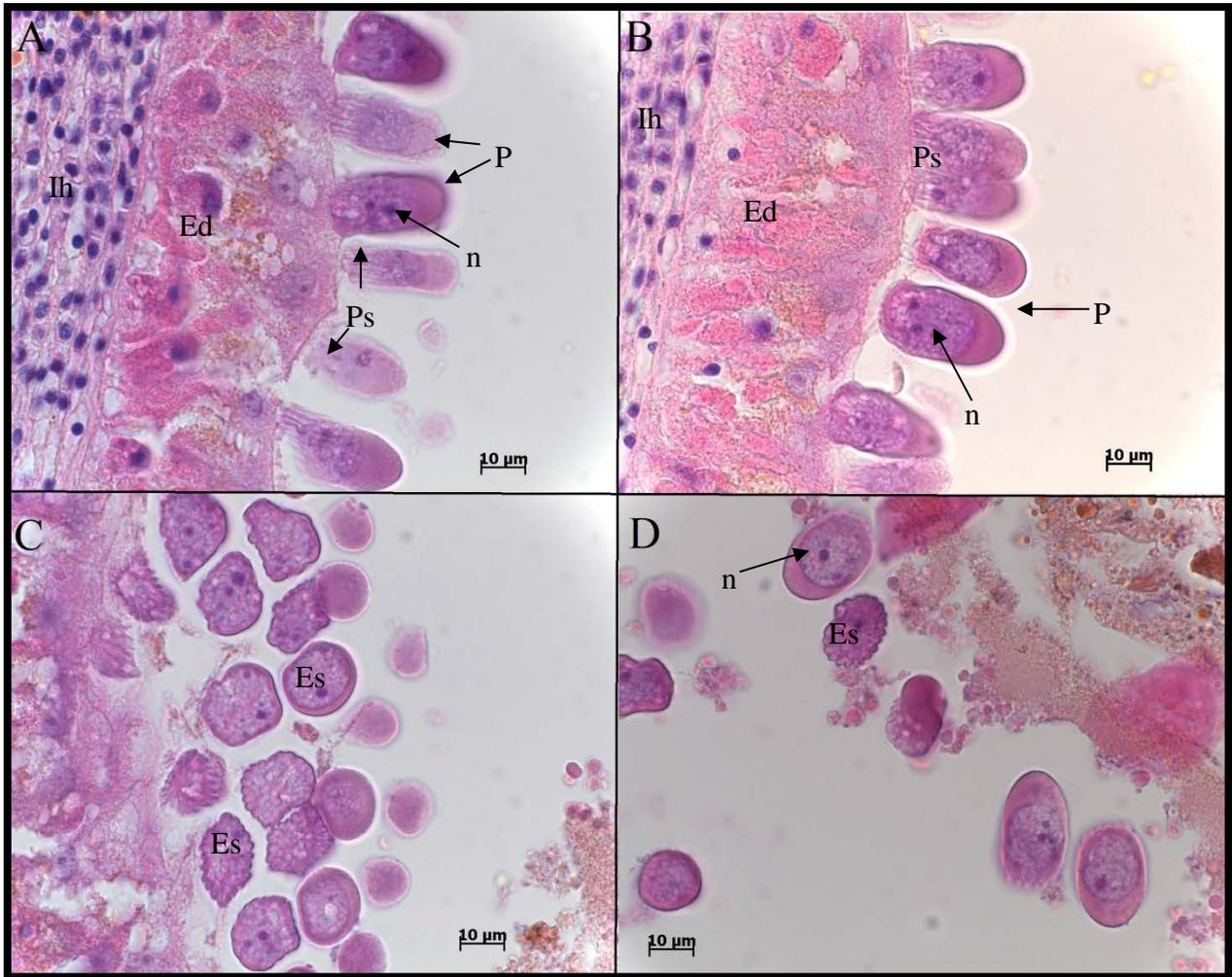


Figura 27. Serie de imágenes que muestran la morfología de los protozoarios tipo ameboideo adheridos al epitelio columnar ciliar del estómago de *H. fulgens*. En A) y B) se muestran detalles del epitelio invadido por protozoarios, el daño en el epitelio es evidente (Ed). Los protozoarios (P) se adhieren a las células del epitelio mediante estructuras tipo pseudópodos (Ps). En el tejido conectivo contiguo se aprecia una infiltración hemocítica (Ih). También se aprecian detalles de la estructura del parásito, núcleo (n). En C) y D) se observan diferentes planos o estadios (ES) de desarrollo del parásito.

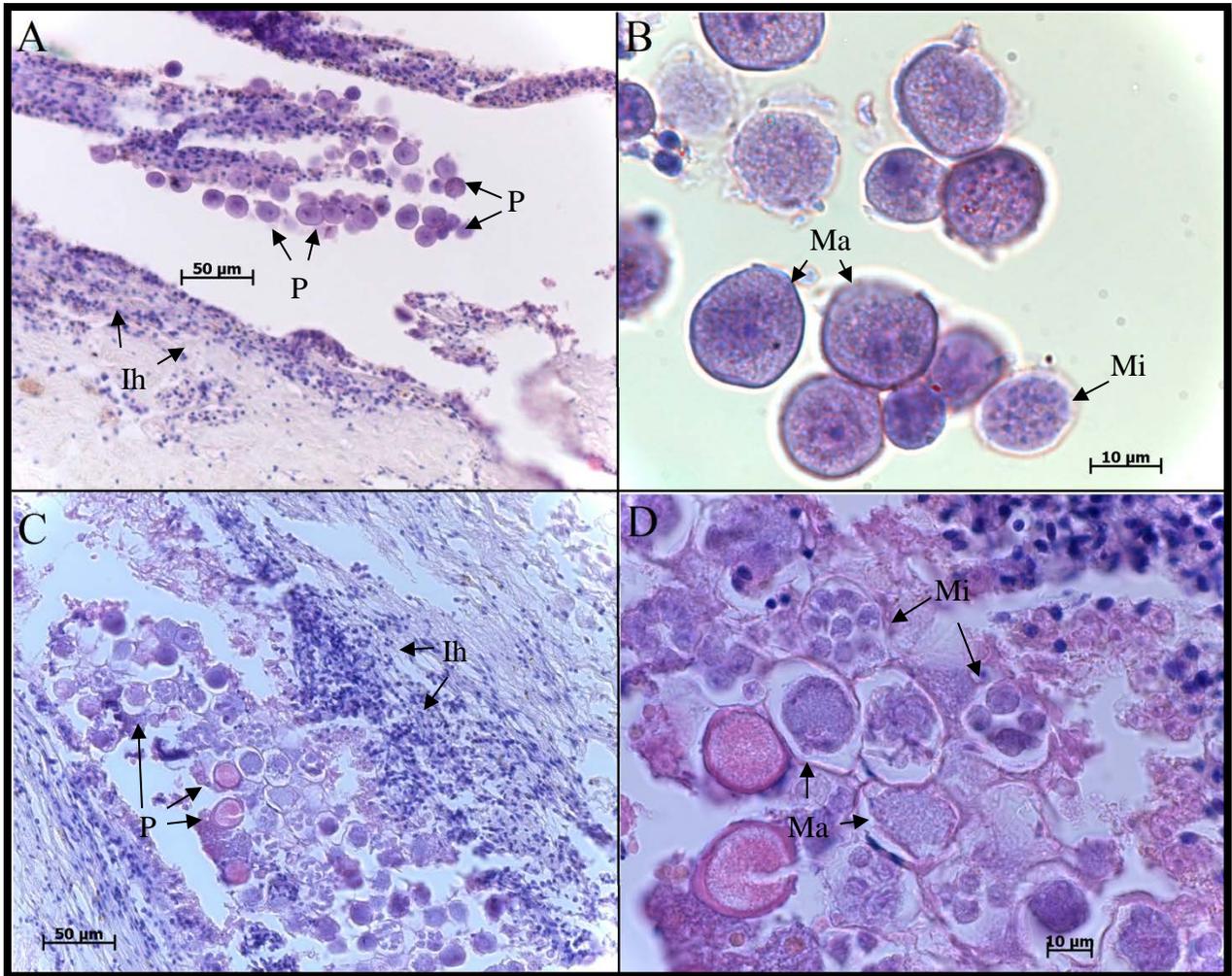


Figura 28. Serie de imágenes que muestran la infección por *P. haliotis* en *H. fulgens* y *H. corrugata*. En A) y C) se muestra una vista panorámica del riñón de *H. fulgens* y *H. corrugata* respectivamente infectados por *P. haliotis* (P), se puede observar una infiltración de hemocitos (Ih). En B) y D) se muestra la morfología de *P. haliotis* en distintos estadios de desarrollo como macrogametos (Ma) y microgametos (Mi).

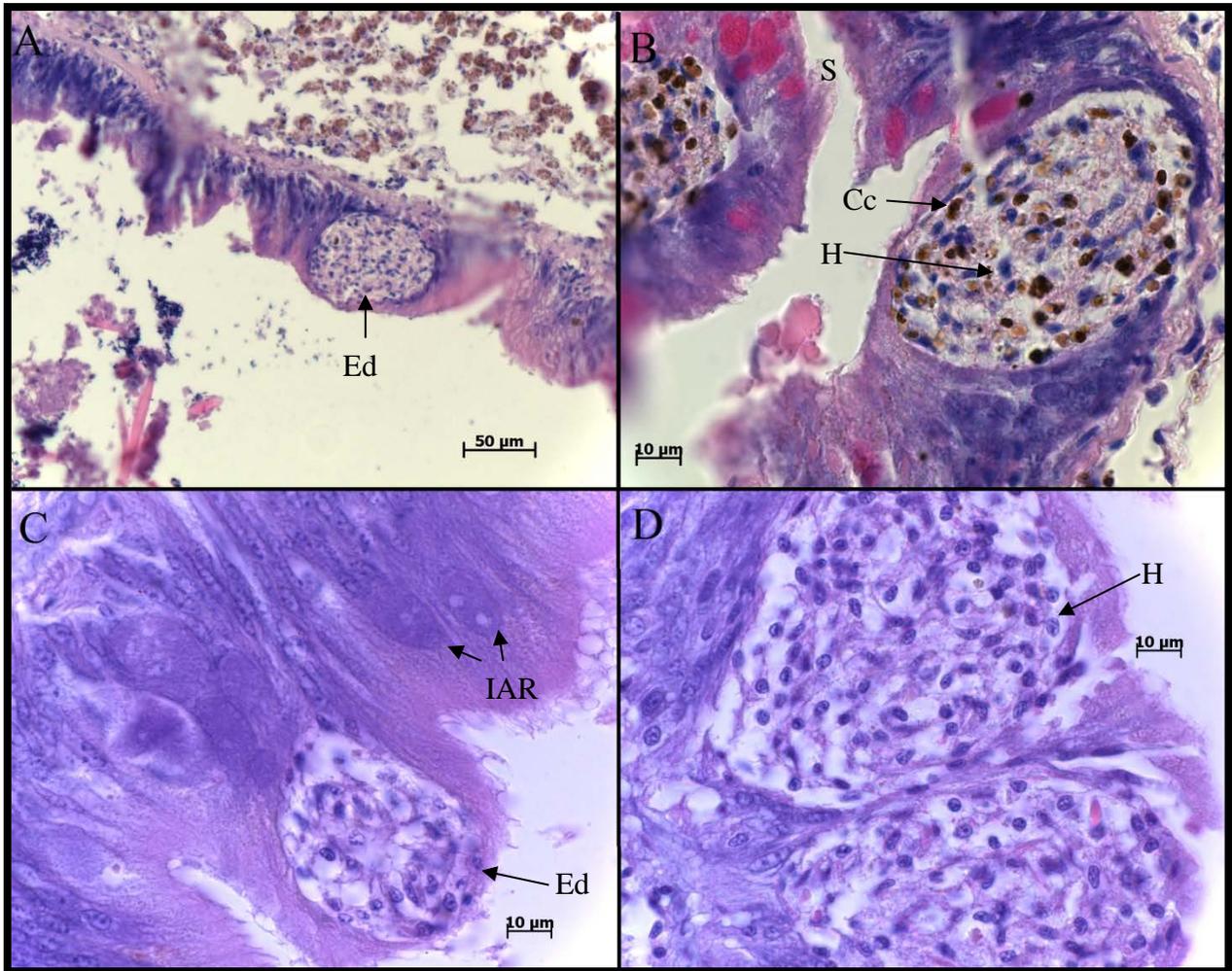


Figura 29. Encapsulaciones de naturaleza desconocida. A) se observa una encapsulación de naturaleza desconocida (Ed) en el epitelio gastrointestinal de *H. fulgens*. B) y D) Acercamiento a las encapsulaciones de naturaleza desconocida; se pueden observar hemocitos (H) y células cafés (Cc) dentro de las encapsulaciones y por fuera de estas secreciones acidófilas (S). C) Se observan inclusiones de naturaleza desconocida e IAR.

4.11 Estimación de la morbilidad y mortalidades asociadas con *X. californiensis*

El porcentaje total de abulón azul infectado por *X. californiensis* y con evidencias de desarrollo de la enfermedad (grados de intensidad ≥ 2) constituyó la morbilidad durante el desarrollo del estudio, misma que representó el 84.5%. Mientras que dicha proporción, en el caso del abulón amarillo fue del 51.3%, para un promedio general del 54.8%.

Los animales enfermos con grados de intensidad 4 podrían entrar en la etapa irreversible de la enfermedad y se esperaría que en condiciones de estrés tuvieran altas probabilidades de morir. El

porcentaje de abulón azul en estas condiciones fue del 30.8% y del 10.6% en el caso del abulón amarillo, representando un 15.1% de los abulones estudiados.

Respecto al muestreo de contingencia y dado el estado de los abulones, se esperaría que todos ellos pudieran morir ya sea infectados o no por *X. californiensis*. Considerando que se obtuvieron 82 animales de este muestreo, la pérdida económica estimada representa un valor de 5,740 dólares americanos.

Capítulo 5

5.1 Discusión

Xenohaliotis californiensis se encuentra ampliamente distribuido en poblaciones naturales de *H. fulgens* y *H. corrugata* en la principal zona de captura abulonera, lo que indica que el parásito se encuentra bien establecido en las localidades estudiadas y debe ser considerado endémico en la región. El primer artículo publicado que reportó la presencia de inclusiones celulares en el tracto digestivo del abulón asociadas con el SD y posteriormente con *X. californiensis* en la Península de Baja California es en abulón negro (*H. craccherodii*) en 1998 (Valles-Ríos, 2000); en el 2000 se reporta la presencia de inclusiones asociadas al parásito en abulón rojo (*H. rufescens*) de cultivo (Cáceres-Martínez *et al.*, 2000) y en el 2002, en abulón azul y amarillo de Isla de Cedros e Islas San Benito (Álvarez-Tinajero *et al.*, 2002). Sin embargo, Valles-Ríos (2000) reporta la presencia de inclusiones asociadas a colonias de rickettsia en la glándula digestiva y divertículos digestivos de abulones que fueron recolectados en 1973, para un estudio sobre el ciclo reproductivo del abulón. Adicionalmente, en el Laboratorio de Patología de Moluscos del Departamento de Acuicultura del CICESE se cuenta con una laminilla histológica, proporcionada por la M.C. Olivia Tapia, preparada a mediados de los 80s que es positiva a las inclusiones características formadas por *X. californiensis*. Estos dos registros preceden a los primeros reportes de mortalidades en abulón negro en las Islas Channel en California, Estados Unidos, mucho antes de que se detectara o estableciera que el agente causante del SD fuera *X. californiensis*; lo que mostraría que el parásito ha estado presente en las costas de la península de Baja California desde esos años. Estos hallazgos apoyan el endemismo del parásito y abren una línea de investigación obligada para dilucidar su origen, sus posibles variaciones en virulencia y la susceptibilidad de sus hospederos. Por otro lado, la información obtenida en este trabajo muestra que la distribución geográfica del parásito va desde California, Estados Unidos hasta Punta Abreojos en Baja California Sur.

En el presente estudio la prevalencia del parásito en el abulón azul fue del 95.4% en el muestro de captura comercial y de 85.2% en el muestreo de contingencia, lo que contrasta con la prevalencia registrada por Moore *et al.* (2009) quienes reportan un valor del 44% en el sur de California, Estados Unidos, esto podría estar relacionado con la localidad geográfica, época del

año, talla o edad de los abulones estudiados, escala de intensidad utilizada y origen de los mismos ya que en ese caso fueron de cultivo. Por su parte, Álvarez-Tinajero *et al.* (2002) reportan una prevalencia del 100% en abulón azul recolectado en Isla de Cedros e Islas San Benito, durante el periodo 1997 a 1998 cuando ocurrió un evento de El Niño.

En el abulón amarillo, de la captura comercial, la prevalencia del parásito fue del 65.5% y del 91.7% en el muestreo de contingencia; la prevalencia del muestreo de captura comercial es muy similar a la reportada por Álvarez-Tinajero *et al.* (2002) en abulón amarillo de Isla de Cedros e Islas San Benito que fue del 63%.

La intensidad de la infección por *X. californiensis* en este estudio fue de media a alta (2-3) en el abulón azul de los dos muestreos. En el abulón amarillo el grado de intensidad fue medio (2) para ambos muestreos. Álvarez-Tinajero *et al.* (2002) reportan un grado de intensidad alto del parásito para ambas especies de abulón durante un evento de El Niño, condición que puede ayudar a explicar la diferencia observada. Por el contrario, Moore *et al.* (2009) reportaron un incremento no significativo en la intensidad de la infección por *X. californiensis* en abulón azul de cultivo con el aumento de la temperatura, bajo condiciones del FEN en el sur de California. Sin embargo, hay que subrayar que el incremento en temperatura durante ese estudio alcanzó los 18°C, mientras que en el caso de Álvarez-Tinajero *et al.* (2002) el registro de temperatura fue de más de 22°C y en condiciones silvestres.

Entre especies de abulón, la prevalencia de *X. californiensis* varía considerablemente, en el abulón negro silvestre la prevalencia del parásito va de 74% a 98% (Friedman *et al.*, 2003), en el abulón rojo silvestre la prevalencia va de 1% a 75% (Friedman *et al.*, 2003; Moore *et al.*, 2000), mientras que en abulón rojo cultivado se han registrado prevalencias del 90% al 100% (Friedman *et al.*, 2003; Moore *et al.*, 2000; Cáceres-Martínez *et al.*, 2000). En países con especies de abulón no endémicas de la costa oeste de Norte América, en donde se ha introducido abulón rojo infectado, se han reportado prevalencias del parásito del 14.5% a 52% en *H. tuberculata* de cultivo (Balseiro *et al.*, 2006) y del 53% al 61% en *H. diversicolor* de cultivo (Wetchateng, 2008; Wetchateng *et al.*, 2010).

Como se ha demostrado en otros estudios (Friedman *et al.*, 1997; Álvarez-Tinajero *et al.*, 2002; Moore *et al.*, 2003; Braide *et al.*, 2005) los signos externos del SD pueden ser el resultado de diversos factores, tales como escases de alimento, condición reproductiva o algún desorden fisiológico y no necesariamente a la infección por *X. californiensis*. En el muestreo de organismos provenientes de la captura comercial, la presencia de abulones con signos externos de deterioro asociados al SD fue baja en la mayoría de las localidades estudiadas; sin embargo, se encontró una prevalencia alta del parásito a nivel histológico con intensidades que van de ligeras a severas (1-4). El número de abulones de las dos especies que presentaron tanto signos externos de deterioro como la presencia de *X. californiensis* fue reducido. Incluso se encontraron organismos de ambas especies en los cuales, todos los tejidos se encontraban completamente infectados por el parásito, pero mostraban gran movilidad, consistencia muscular y masa visceral. Esto podría estar relacionado a que en esos ejemplares la infección está en proceso de desarrollo pero aún no ha llegado a causar los signos externos característicos del SD. En el abulón rojo y negro el desarrollo de los signos externos del SD parecen estar mejor relacionados con la intensidad de la infección por *X. californiensis* (Friedman *et al.*, 1997; Friedman *et al.*, 2000; Moore *et al.*, 2000; Vilchis *et al.*, 2005; Braid *et al.*, 2005; Moore *et al.*, 2009; González *et al.*, 2012).

En invertebrados marinos, el desarrollo de enfermedades se promueve fácilmente con cambios ambientales, como aquellos producidos por el FEN entre otras alteraciones fisicoquímicas del hábitat (descargas de contaminantes, surgencias entre otros) (Friedman *et al.*, 1997; Valles, 2000; Cáceres-Martínez *et al.*, 2013). La temperatura parece ser el factor que juega el papel más importante en el desarrollo de la enfermedad en el abulón rojo y negro (Haaker *et al.*, 1992; Gardner *et al.*, 1995; Friedman *et al.*, 1997; Friedman *et al.*, 2000; Friedman *et al.*, 2003; Braid *et al.*, 2005; Moore *et al.*, 2009). En el abulón rojo la mayoría de los estudios se basan en el efecto de la temperatura sobre la transmisión del parásito y el desarrollo de la enfermedad. Braid *et al.* (2005) probaron el efecto de la temperatura, suministro de alimento y exposición a *X. californiensis* sobre la salud y supervivencia. En dicho estudio se encontró que la temperatura tiene un papel muy importante en la transmisión del parásito, ya que organismos expuestos a *X. californiensis* a bajas temperaturas no contrajeron la infección, a diferencia de los organismos expuestos a altas temperaturas y al parásito; en estos casos se registraron prevalencias del 72.6% a 93.8%. Con respecto a los signos externos del SD los organismos expuestos al parásito y a altas

temperaturas presentaron los grados más altos de achicamiento y ablandamiento del pie, retracción del manto y mortalidad. En el estudio de Braid *et al.* (2005) encontraron que organismos con suministro de alimento a temperaturas elevadas sin exposición a *X. californiensis* no presentan achicamiento o ablandamiento del pie; lo que sugiere que el achicamiento y ablandamiento del pie en abulón rojo infectado por *X. californiensis* resulta en inanición o secuelas patológicas. Vilchis *et al.* (2005) estudiaron el efecto de la temperatura, la cantidad y calidad de alimento sobre el crecimiento y reproducción en el abulón rojo y azul en ausencia de *X. californiensis*; encontraron que todos los factores tienen un fuerte efecto en el crecimiento del abulón en ambas especies y aunque las dos especies reaccionaron ante los estímulos ambientales, la temperatura del agua tuvo un efecto distinto en cada especie. El abulón rojo tuvo una reacción claramente adversa a la temperatura más elevada, mientras que el abulón azul no se vio afectado. En el estudio mencionado anteriormente la elevada temperatura inhibió el crecimiento del abulón rojo y se asoció con la pérdida de masa muscular cuando se combinaba con escases de alimento o alimento de pobre calidad; lo opuesto sucedió con temperaturas frías, las cuales promovieron el crecimiento del abulón rojo a pesar de combinarse con alimento limitado o de mala calidad. Por otro lado, el abulón azul mantuvo su crecimiento en todas las temperaturas estudiadas, mismo que se vio más estimulado cuando se mejoraron sus condiciones alimenticias. El crecimiento de ambas especies disminuyó en condiciones de limitada disponibilidad y calidad del alimento, el factor más importante fue determinado por la disponibilidad. El abulón azul fue capaz de mantener su potencial reproductivo durante todo el experimento en todos los tratamientos. Por otra parte, Moore *et al.* (2009) realizaron un experimento con abulón azul infectado con *X. californiensis* en el cual se expuso a los organismos a un régimen de temperatura de 14°C y 18°C simulando el fenómeno de La Niña y El Niño en el sur de California, Estados Unidos. Se encontró que la exposición de organismos infectados con *X. californiensis* a temperaturas de 14°C y 18°C no inducen un incremento en la intensidad del parásito o conducen a la aparición de signos externos de la enfermedad. Moore *et al.* (2009) concluyeron que la modulación térmica difiere entre especies de abulón, siendo el abulón azul relativamente resistente a la expresión de la enfermedad bajo condiciones del FEN del sur de California. Sin embargo, estas condiciones son diferentes a las registradas en la parte media de la Península de Baja California en donde las temperaturas pueden alcanzar temperaturas de 28°C.

Como se mencionó anteriormente, en el presente estudio se observó una cantidad considerable de organismos de ambas especies con la presencia del parásito sin mostrar signos externos de la enfermedad. Álvarez-Tinajero *et al.* (2002) concluyeron que la presencia de *X. californiensis* tanto en abulón azul como amarillo no indica una relación significativa entre el parásito y signos externos del SD. La temperatura en la que se manifiesta la enfermedad en abulón azul y amarillo infectados por *X. californiensis* no ha sido determinada. Sin embargo, el abulón azul y el amarillo son especies de aguas más templadas que el abulón rojo y las primeras dos especies mencionadas habitan costas más sureñas y están expuestas a temperaturas más elevadas. Díaz *et al.* (2006) reportan que la temperatura preferida del abulón azul en un gradiente térmico es de 25.4°C mientras que la temperatura crítica máxima (temperatura en la que los organismos pierden la capacidad a adherirse) es de 33.6°C. Moore *et al.* (2009) sugieren que la temperatura a la que los signos externos se inducen en abulones infectados está relacionada, con la temperatura óptima de la especie.

Respecto a los abulones de ambas especies infectados por *X. californiensis* detectados en el muestreo general con grados de intensidad de 4 (15.1%), es previsible que estos animales podría entrar en la etapa irreversible de la enfermedad y pudieran morir ante un estrés debido a condiciones ambientales adversas, esta hipótesis debe ser probada a través de la continuidad de este tipo de estudios y bioensayos en laboratorio. Por otro lado, los animales enfermos (grados 2 a 4) detectados en el estudio constituyen un muy alto porcentaje de la población considerando ambas especies, es decir una morbilidad de 54.8% estos valores, muestran la vulnerabilidad de la población ante cambios ambientales estresantes (FEN, anomalías térmicas, hipoxias, etc). En este sentido, la vigilancia epidemiológica, incluyendo la morbilidad, nos permitiría detectar altos grados de intensidad de infección que alertará sobre posibles eventos de mortalidad durante el advenimiento de condiciones ambientales adversas. Estos elementos serían fundamentales para incorporarlos en el modelo epidemiológico y/o en el modelo para el cálculo de captura comercial. Es importante señalar que la morbilidad y episodios de mortalidad asociadas con enfermedades endémicas en poblaciones disminuidas resultan en un mayor impacto sobre las mismas.

De igual importancia resulta conocer el ciclo anual de *X. californiensis* en el abulón azul y amarillo. En este sentido, es necesario monitorear las poblaciones naturales mes con mes y

analizar los efectos ambientales de temperatura, salinidad y oxígeno disuelto al igual que la disponibilidad de alimento con la prevalencia y la intensidad encontradas.

En el presente estudio, *X. californiensis* se encontró en el citoplasma de las células epiteliales del tracto digestivo. La mayor prevalencia se registró en el estómago y en los divertículos digestivos, mientras que la menor prevalencia fue en el esófago. Álvarez-Tinajero *et al.* (2002) observaron una prevalencia alta del parásito en el estómago y una prevalencia baja en el esófago y en los divertículos digestivos, en contraste a lo reportado en este estudio. En el abulón azul, Moore *et al.* (2009) detectaron una prevalencia similar en el post esófago y en la glándula digestiva; mencionan también que la distribución del parásito en el tejido es similar a la reportada en otras especies de abulón. Para el abulón rojo, Braid *et al.* (2005) observaron una prevalencia similar del parásito en el post esófago y glándula digestiva. En el abulón negro, *X. californiensis* se encuentra en mayor prevalencia en el post esófago y divertículos digestivos y en menor prevalencia en el intestino (Friedman *et al.*, 2000). Es posible que la baja prevalencia del parásito en el esófago encontrada en este estudio, se deba a que la cantidad de tejido de dicho órgano en la muestra no fue la suficiente para hacer la comparación.

En infecciones ligeras, se observan pequeñas inclusiones intracitoplasmáticas en las células epiteliales del tracto digestivo (Valles, 2000; Gardner *et al.*, 1995) pero no hay evidencias de desarrollo de la enfermedad, es decir, que son animales infectados pero no enfermos. En infecciones más avanzadas, se encontraron numerosas colonias de *X. californiensis* en la mayoría de las células epiteliales del tracto digestivo, las colonias encontradas se localizaron en la región distal de la células, provocando un desplazamiento del núcleo celular hacia la región basal de la misma. El crecimiento de la colonia causa la hipertrofia de la célula ejerciendo presión en las células adyacentes. En infecciones avanzadas, hay ruptura de la membrana celular y liberación de bacterias al lumen. A nivel tisular, puede haber desprendimiento del tejido epitelial infectado y en los divertículos digestivos se pueden observar diferentes grados de transformación (metaplasia) evidenciando el desarrollo de la enfermedad. En algunos organismos de ambas especies se observó una respuesta celular defensiva (fagocitosis y encapsulación) por parte del abulón. Álvarez-Tinajero *et al.* (2002) no observaron una respuesta defensiva evidente en el abulón azul o amarillo ante el parásito, solamente en algunos casos se observó una respuesta inflamatoria ligera. *X. californiensis* al ser un parásito intracelular no se encuentra en contacto directo con la hemolinfa, debido a esto, es posible que no sea detectado por los mecanismos de defensa del

abulón, por lo que no se genera una respuesta por parte del hospedero, lo anterior se ha observado en abulón negro (Gardener *et al.*, 1995). En los moluscos, los mecanismos de defensa se activan cuando el agente extraño entra en contacto con la hemolinfa, los hemocitos activan los procesos de defensa ya sean celulares (fagocitosis e encapsulación) que son visibles o humorales (secreciones) que en su mayoría no son apreciables (Álvarez-Tinajero *et al.*, 2000).

En el presente estudio, se encontró una correlación significativa entre el grado de metaplasia y la intensidad de la infección por *X. californiensis* en el abulón azul y amarillo. En los casos del abulón negro y rojo, se ha descrito que estos cambios degenerativos en la estructura de la glándula digestiva interfieren con la absorción de nutrientes y secreción de enzimas, resultando en una mala nutrición del organismo, forzándolo a utilizar las reservas de glucógeno del músculo del pie hasta agotarlas, causando el achicamiento del pie, pérdida de la capacidad de adherirse al sustrato y finalmente la muerte (Gardner *et al.*, 1995; Friedman *et al.*, 2000; Moore *et al.*, 2000; OIE, 2012), es muy probable que este mismo proceso ocurra en el abulón azul y amarillo.

A nivel histológico, se ha observado la presencia de una variante morfológica de las inclusiones formadas por *X. californiensis* tanto en abulón azul y amarillo desde los primeros estudios, aunque la causa de su variación morfológica era desconocida (Cáceres-Martínez comunicación personal). A principios de 2005, se describió a la inclusión atípica en abulón rojo de cultivo de California, Estados Unidos, como de mayor tamaño, pleomórfica, granular e intensamente basófila (Friedman *et al.*, 2012). Estudios realizados por microscopía electrónica de transmisión por Friedman *et al.* (2012) revelaron que las bacterias dentro de estas inclusiones atípicas estaban infectadas por un bacteriófago, mostrando un caso de hiperparasitismo y abriendo una nueva línea de investigación al respecto. En este estudio se corroboró la presencia de ambos tipos de inclusiones a nivel histológico, indicando que dicho hiperparasitismo se extiende desde California, Estados Unidos hasta la Península de Baja California, México. Es fundamental profundizar en la interacción de este hiperparasitismo en el abulón azul y amarillo.

Para confirmar la identidad del parásito se llevaron a cabo análisis de PCR y de hibridación *in situ* en las inclusiones tipo rickettsia en abulón azul y amarillo. La Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) establece a la hibridación *in situ* como el método de elección para

confirmar la identificación del parásito ya que, permite visualizar una sonda específica que hibrida dentro de las inclusiones en donde se encuentra la rickettsia.

La estimación de la efectividad de las técnicas para detectar a *X. californiensis* sugirió a la histología como la técnica más efectiva para el diagnóstico. La detección por PCR presentó una efectividad por debajo de lo esperado y no se recomienda utilizarla de manera individual, debe ir siempre respaldada por un diagnóstico histológico. El diagnóstico tomando en cuenta los signos externos de deterioro para determinar el SD es la técnica menos confiable y no se recomienda utilizarla como método de diagnóstico en el abulón azul o amarillo. La baja eficiencia de la técnica de PCR podría estar relacionada con la cantidad de ADN del parásito y/o inhibidores de la reacción. La Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) reconoce al análisis histopatológico como el método recomendado para casos presuntivos y como método confirmativo por razones de disponibilidad, utilidad, especificidad y sensibilidad diagnóstica.

Por lo anterior para tener un resultado positivo para *X. californiensis* es necesario visualizar al parásito y encontrarse dentro de la distribución geográfica conocida del mismo. En caso de que sea un nuevo registro del parásito en un área geográfica donde no se ha reportado, se recomienda la hibridación *in situ* como prueba confirmativa. Adicionalmente, una prueba de PCR y la secuenciación del producto permiten confirmar la identidad de la bacteria.

Es necesario establecer un monitoreo mensual en todas las sociedades cooperativas presentes en la principal zona de captura abulonera, para determinar la prevalencia e intensidad y morbilidad asociadas al parásito a través del año. De esta manera se evaluaría con exactitud el impacto del parásito sobre las poblaciones naturales de abulón azul y amarillo y se establecería el efecto que tiene sobre la pesquería.

Como se ha mencionado antes, es importante hacer notar que el encontrar una alta intensidad de infección en ausencia de daños externos, puede ser debido a que la proliferación bacteriana es intensa pero muy reciente y aún no ha impactado al resto de los tejidos. Para determinar la patogénesis de la infección se requiere continuar con estudios de laboratorio. Es un hecho que la morbilidad y mortalidad que produce *X. californiensis*, en combinación con condiciones ambientales adversas, es un factor inherente a la regulación natural de las poblaciones de abulón

de la zona; sin embargo, el efecto puede ser dramático en poblaciones disminuidas. Adicionalmente, si en este tipo de poblaciones ocurre un brote epidemiológico, las posibilidades de recuperación disminuyen. Álvarez-Tinajero (2000) y Álvarez-Tinajero *et al.* 2002 estudiaron el SD en Isla de Cedros e Islas San Benito durante el bienio 1997 a 1998 cuando se registró un evento de El Niño. En dicho estudio, los abulones con grado de infección de 4, es decir, probable nivel irreversible de la enfermedad fue de 52.0% mientras que en este estudio solo fue del 15.1%.

Los parásitos encontrados en los distintos tejidos, han sido descritos en diferentes especies de abulón y no se han asociado con patologías de importancia, (Álvarez-Tinajero *et al.*, 2002; Friedman *et al.*,1995) con excepción de los protozoarios tipo ameboideo encontrados en el estómago del abulón y asociados con erosión de los epitelios estomacales. Estos protozoarios y su patología asociada nos demuestran la presencia de un patógeno no conocido previamente en la zona y aunque su prevalencia fue relativamente baja merece profundizarse en su estudio.

5.1 Conclusiones

- *Xenohaliotis californiensis*, parásito del abulón azul (*H. fulgens*) y abulón amarillo (*H. corrugata*), se encuentra ampliamente distribuido en la principal zona de captura abulonera de la Península de Baja California y debe ser considerado endémico en la zona.
- La prevalencia e intensidad del parásito es mayor en el abulón azul (*H. fulgens*) que en el abulón amarillo (*H. corrugata*).
- La morbilidad asociada a *X. californiensis* es de 84.5% en abulón azul (*H. fulgens*) y de 51.3% en abulón amarillo (*H. corrugata*).
- Los valores de prevalencia, intensidad de infección y morbilidad asociada con *X. californiensis* podrían contribuir a predecir eventos de mortalidad de *H. fulgens* y *H. corrugata* en la zona estudiada.
- La presencia e intensidad de *X. californiensis* no se asoció directamente con todos los signos externos del SD en el abulón azul (*H. fulgens*) y abulón amarillo (*H. corrugata*).
- La técnica histológica se recomienda para determinar la prevalencia, intensidad y morbilidad asociadas con el parásito y por lo tanto para vigilancia epidemiológica.

5.2 Recomendaciones

Se recomienda el establecimiento de un programa de monitoreo sanitario permanente en la zona para obtener una línea base de datos y para identificar las condiciones que inciden en un evento de mortalidad anómala.

Se recomienda valorar la incorporación de los datos de prevalencia, intensidad y morbilidad asociada con *X. californiensis* en las estimaciones de mortalidad esperada y determinación de cuotas de captura.

Se sugiere el uso de la técnica histológica para vigilancia sanitaria porque nos permite detectar no solo el desarrollo del SD a nivel tisular (morbilidad), sino también encontrar parásitos y patologías emergentes o desconocidas.

Se sugiere optimizar y validar la técnica de PCR para hacerla un método más confiable de detección del parásito en *H. fulgens* y *H. corrugata*.

Se sugiere realizar estudios más finos sobre las inclusiones de *X. californiensis* infectadas por el bacteriófago, para entender el papel que juega en el desarrollo del Síndrome de Deshidratación.

Se sugiere profundizar en estudios de laboratorio del efecto de la temperatura (simulando a temperaturas del fenómeno de El Niño en la principal zona de captura abulonera), suministro de alimento y exposición a *X. californiensis* en el abulón azul (*H. fulgens*) y abulón amarillo (*H. corrugata*).

Se recomienda estudiar y evaluar el impacto de los otros parásitos encontrados durante el estudio, en especial los protozoarios tipo ameboideos que claramente causan una patología.

Referencias bibliográficas

- Álvarez-Tinajero, M.C., 2000. Simbiontes De Los Abulones Amarillo (*Haliotis corrugata*) y Azul (*Haliotis fulgens*) De Isla De Cedros E Islas San Benito, Baja California, México. Tesis de Maestría. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, México.
- Álvarez-Tinajero, M.C., Cáceres-Martínez, J., González-Avilés, J.G., 2002. Histopathological evaluation of the yellow abalone *Haliotis corrugata* and the blue abalone *Haliotis fulgens* from Isla de Cedros and Islas San Benito, Baja California, México. J. Shellfish. Res. 21(2), 825-830.
- Álvarez-Tinajero, M.C., Cáceres-Martínez, J., González-Avilés, J.G., 2001. Shell boring clams in the blue abalone *Haliotis fulgens* and the yellow abalone *Haliotis corrugata* from Baja California, México. J. Shellfish. Res. 20(2), 889-893.
- Andree, K.B., Friedman, C.S., Moore, J.D., Hedrick, R.P., 2000. A polymerase chain reaction assay for the detection of genomic DNA of a rickettsiales-like prokaryote associated with withering syndrome in California abalone. J. Shellfish. Res. 19(1), 213-218.
- Antonio, D.B., Andree, K.B., Moore, J.D., Friedman, C.S., Hedrick, R.P., 2000. Detection of Rickettsiales-like prokaryotes by *in situ* hybridization in black abalone, *Haliotis cracherodii*, with withering syndrome. J. Invertabr. Pathol. 75, 180-182.
- Balseiro, P., Aranguren, R., Gestal, C., Novoa, B., Figueras, A., 2006. *Candidatus Xenohaliotis californiensis* and *Haplosporidium monforti* associated with mortalities of abalone *Haliotis tuberculata* cultured in Europe. Aquaculture. 258, 63-72.
- Bevelander, G. 1988. Abalone. Gross and Fine Structure. The Boxwood Press, Pacific Grove California.
- Braid, B.A., Moore, J.D., Robbins, T.T., Hedrick, R.P., Tjeerdema, R.S., Friedman, C.S., 2005. Health and survival of red abalone, *Haliotis rufescens*, under varying temperature, food supply, and exposure to the agent of withering syndrome. J. Invertabr. Pathol. 89, 219-231.
- Cáceres-Martínez, J, 2000. Relación del fenómeno de “El Niño” con el síndrome de deshidratación del abulón en Baja California. Simposio los efectos de "El Niño" en México. Distrito Federal, México, del 17 al 19 de mayo.
- Cáceres-Martínez, J., 2002. Síndrome de Deshidratación del Abulón o Rickettsiosis del Abulón. Boletín del Programa Nacional de Sanidad Acuícola y la Red de Diagnóstico. 2, 6-9.

- Cáceres-Martínez, J., Vásquez Yeomans, R., Padilla Lardizábal, G., 2010. Parasites of the pleasure Oyster *Crassostrea corteziensis* cultured in Nayarit, Mexico. *J. Aquat. Anim. Health.* 22, 141-151.
- Cáceres-Martínez, J., Vásquez-Yeomans, R., Flores-Saaib, R.D., 2011. Intracellular prokaryote *Xenohaliothis californiensis* in abalone *Haliotis* spp. From Baja California, México. *Ciencia Pesquera.* 19 (2), 5-11.
- Cáceres-Martínez., J., Tinoco-Orta, G.D., 2001. Symbionts of cultured red abalone, *Haliotis rufescens* from Baja California, México. *J. Shellfish. Res.* 20, 875-881.
- Cáceres-Martínez, J. y R. Vásquez-Yeomans. 2013. Manual de buenas prácticas para el cultivo de moluscos bivalvos. Organismo Internacional Regional de Sanidad Agropecuaria. En prensa.
- CONAPESCA. 2010. Anuario Estadístico de Acuicultura y Pesca 2010. Recuperado 09 de octubre de 2013 de: <http://www.conapesca.sagarpa.gob.mx/wb/cona/anuario2010>
- CONAPESCA. 2011. Anuario Estadístico de Acuicultura y Pesca 2011. Recuperado 09 de octubre de 2013 de: http://www.conapesca.sagarpa.gob.mx/wb/cona/anuario_2011
- CONAPESCA. 2012. Anuario Estadístico de Acuicultura y Pesca 2012. Recuperado 09 de octubre de 2013: http://www.conapesca.sagarpa.gob.mx/wb/cona/anuario_2012_zip
- Cox, K.W., 1960. Review of the abalone in California. *Cal Fish Game.* 46 (4), 381-406.
- Díaz, F., Re, A.D., Medina, Z., Re, G., Valdez, G., Valenzuela, F., 2006. Thermal Preference and tolerance of Green abalone *Haliotis fulgens* (Philippi, 1845) and pink abalone *Haliotis corrugata* (Gray, 1845). *Aquac. Res.* 37, 877-884.
- Friedman, C.S., Andree, K.B., Beauchamp, K.A., Moore, J.D., Robbins, T.T., Shields, J.D., Hedrick, R.P., 2000. '*Candidatus Xenohaliothis californiensis*', a newly described pathogen of abalone, *Haliotis* spp., along the west coast of North America. *Int. J. Syst. Evol. Micr.* 50, 847-855.
- Friedman, C.S., Crosson, L.M., 2012. Putative Phage Hyperparasite in the Rickettsial Pathogen of Abalone, "*Candidatus Xenohaliothis californiensis*". *Microb. Ecol.* 64(4), 1064-1072.
- Friedman, C.S., Finley, C.A., 2003. Anthropogenic introduction of the etiological agent of withering syndrome into northern California abalone populations via conservation efforts. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 60, 1424-1431.

- Friedman, C.S., Roberts, W., Kismohandaka, G., Hedrick, R.P., 1993. Transmissibility of a coccidian of abalone, *Haliotis* spp. J. Shellfish. Res. 12, 201-205.
- Friedman, C.S., Thomson, M., Chun, C., Haaker, P.L., Hedrick, R.P., 1997. Withering syndrome of the black abalone, *Haliotis cracherodii* (Leach): water temperature, food availability, and parasites as possible causes. J. Shellfish. Res. 16, 403-411.
- Friedman, C.S., Trevelyan, G., Robbins, T.T., Mulder, E.P., Fields, R., 2003. Development of an oral administration of oxytetracycline to control losses due to withering syndrome in cultured red abalone *Haliotis rufescens*. Aquaculture. 224, 1-23.
- García-Esquivel, Z., Cáceres-Martínez, J., Montes-Magallón, S., 2011. Tratamiento con baños de oxitetraciclina a jóvenes de abulón azul *Haliotis fulgens* (Philippi 1845) afectados por el síndrome de deshidratación. Cien. Mar. 37(2), 191-200.
- Gardner, G.R., Harshbarger, J.C., Lake, J.L., Price, K.L., Sawyer, T.K., Stephenson, M.D., Haaker, P.L., Togstad, H.A., 1995. Association of prokaryotes with symptomatic appearance of withering syndrome in black abalone, *Haliotis cracherodii*. J. Shellfish. Res. 13, 197-198.
- Geiger, D.L., Guido, G.P., 2000. A Chonchological Iconography: The Family Haliotidae. ConchBooks. Grudwerk.
- González, R.C., Brokordt, K., Lohrmann, K.B., 2012. Physiological performance of juvenile *Haliotis rufescens* and *Haliotis discus hannai* abalone exposed to withering syndrome agent. J. Invertabr. Pathol. 111, 20-26.
- Google Maps Imagery., 2012. Recuperado 15 de septiembre 2012 de: <https://www.google.com.mx/maps/preview#!data=!1m4!1m3!1d6718564!2d-111.7645515!3d27.0004089!2m1!1e3&fid=7>
- Guzmán del Prío, S.A., 1989. Una revisión sobre la biología y pesquería del abulón (*Haliotis* spp.) en México. Resumen 1 Simposio Internacional. Abulón. Biología, Pesquerías y Cultivo. La Paz, Baja California Sur, México del 22 al 24 de agosto.
- Guzmán del Prío, S.A., 1994. Biología, ecología y dinámica de población del (*Haliotis* spp.) de Baja California, México. Tesis Doctoral. Instituto Politécnico Nacional. La Paz, México.
- Guzmán-García, X., Ramírez-Romero, P., López, S., 2009. Manual de procedimientos estándares para el análisis histológico e histopatológicos en organismos acuáticos. Recuperado 10 de octubre de 2013

de: [http://www2.inecc.gob.mx/dgcenica/proname/informes/manual_de_procedimientos_e_cototoxicologicos_inecc_2013\(1\).pdf](http://www2.inecc.gob.mx/dgcenica/proname/informes/manual_de_procedimientos_e_cototoxicologicos_inecc_2013(1).pdf)

Haaker, P.L., Parker, D.O., 1992. Abalone population declines and fishery management in southern California. In: Shepherd, S.A., Tegner, J., Guzman del Prío, S.A., Abalone of the world: Biology, Fisheries and culture. Blackwell Scientific, p. 237-241.

Haaker, P.L., Parker, D.O., Togstad, H., Richards, D.V., Davis, G.E., Friedman, C.S., 1992. Mass mortality and withering syndrome in black abalone, *Haliotis cracherodii*, in California. In: Shepherd, S.A., Tegner, J., Guzman del Prío, S.A., Abalone of the world: Biology, Fisheries and culture. Blackwell Scientific, p. 214-222.

INAPESCA, 2006. Sustentabilidad y pesca responsable en México. Recuperado 09 octubre de 2013
de: http://www.inapesca.gob.mx/portal/documentos/publicaciones/pelagicos/libro_Rojo.pdf

León, C. G., Muciño, M., 1996. Pesquería de abulón. Estudio del potencial pesquero acuícola de Baja California. SEMARNAP, Gobierno del Estado de Baja California Sur.

León., C.G., Muciño, M., 1995. Nota informativa sobre la pesquería de abulón en Baja California. Informe Técnico del Instituto Nacional de Pesca. CRIP-La Paz.

Moore, J.D., Juhasz, C.I., Robbins, T.T., Vilchis, L.I., 2009. Green abalone, *Haliotis fulgens* infected with the agent of withering syndrome do not express disease signs under a temperature regimen permissive for red abalone, *Haliotis rufescens*. Mar. Biol. 153, 2325-2330.

Moore, J.D., Robbins, T.T., Friedman, C.S., 2000. Withering syndrome in farmed red abalone, *Haliotis rufescens*: thermal induction and association with a gastrointestinal Rickettsiales-like prokaryote. J. Aquat. Anim. Health. 12, 26-34.

OIE. 2012. Síndrome de marchitamiento de las orejas de mar (Infección por *X. californiensis*). Recuperado 09 de octubre de 2013
de: http://www.oie.int/esp/normes/fmanual/2.4.07_X_CALIF.pdf

PESCA, 1997. Folleto de información de campos pesqueros Isla de Cedros. Recuperado 09 de octubre de 2013 de: <http://digaohm.semar.gob.mx/cuestionarios/cnarioIslacedros.pdf>

Ponce, D. G., Vega, V. A., Ramade, V. M., León, C. G., Franco, S. R., 1998. Socioeconomic characteristics of abalone fishery along the west coast of Baja California Peninsula, México. J. Shellfish. Res. 17, 1-3.

- Ramade-Villanueva, M., Llucho-Cota, D.B., Hernández-Vázquez, S.E., Espinoza-Montes, A., Vega-Velázquez, A., 1998. An evaluation of annual quota mechanism as a management tool in the Mexican Abalone fishery. *J. Shellfish. Res.* 17, 847-851.
- SAGARPA-CONAPESCA. 2009. Recuperado 09 de Octubre 2013 de: http://www.conapesca.sagarpa.gob.mx/wb/cona/pmregional_abulon
- Shaw, B. L., Battle, H. I., 1957. The gross and microscopic anatomy of the digestive tract of the oyster *Crassostrea virginica* (Gmelin). *Can. J. Zool.* 35, 325-347.
- Siegel, S., 1979. Estadística no paramétrica aplicada a las ciencias de la conducta. Trillas. México D.F.
- Steinbeck, J.R., Groff, J.M., Friedman, C.S., Mc Dowell, T., Hedrick, R.P., 1992. Investigations into a mortality among populations of the California black abalone, *Haliotis cracherodii*, on the central coast of California. In: Shepherd, S.A., Tegner, J., Guzman del Prío, S.A., Abalone of the world: Biology, Fisheries and culture. Blackwell Scientific. p. 203-213.
- Valles-Rios, H., 2000. Análisis histopatológico del abulón negro *Haliotis cracherodii* afectado por el síndrome de deterioro. *Ciencia Pesquera.* 14, 5-18.
- Vanblaricom, G.R., Ruediger, J.L., Friedman, C.S., Woodard, D.D., Hedrick, R.P., 1993. Discovery of Withering Syndrome among black abalone *Haliotis cracherodii* Leach, 1814, populations at San Nicolas Island, California. *J. Shellfish. Res.* 12(2), 185-188.
- Vega-Velázquez, A.G., León-Carballo, M. Munciño-Díaz R., 1994. Sinopsis de información biológica, pesquera y acuicultura de los abulones (*Haliotis* spp.) de la península de Baja California, México. *PESCA.* 2, 118-122.
- Vilchis, L., Tegner, M., Moore, J., Friedman, C., Riser, K., Robbins, T., Dyton, P., 2005. Ocean warming effects on growth reproduction and survivorship of southern California abalone. *Ecol. Appl.* 15, 465-480.
- Wetchateng, T., 2008. Rickettsia-like organism (RLO) infection in the abalone *Haliotis diversicolor supertexta*: Histopathology, diagnosis and treatment. PhD. Dissertation, Mahidol University, Bangkok, Thailand.
- Wetchateng, T., Friedman, C.S., Wight, N.A., Lee, P.Y., Sriurairattana, S., Wongprasert, K., Withyachumnarkul, B., 2010. Withering syndrome in abalone *Haliotis diversicolor supertexta*. *Dis. Aquat. Org.* 90 (1), 69–76.

Apéndice 1. Formato de muestreo para los ejemplares de las dos especies

Entregado a las cooperativas para el envío de las muestras de contingencia y utilizado en el muestreo de la captura comercial.

CICESE ENVÍO DE MUESTRAS DE ABULÓN

NOMBRE DE LA COOPERATIVA: _____				
RECOLETA DE EJEMPLARES				
NOMBRE DEL RESPONSABLE			CLAVE DE IDENTIFICACIÓN	
FECHA Y HORA DE RECOLETA	ESPECIE DE ABULÓN ABULÓN AZUL (.....) ABULÓN AMARILLO (.....)		TALLA (cm)	
LOCALIDAD	BANCO		COORDENADAS (utm)	
DATOS AMBIENTALES				
TEMPERATURA		SALINIDAD	OXÍGENO	
TIPO DE FONDO			PROFUNDIDAD	
OBSERVACIONES DE LOS EJEMPLARES				
SEXO DEL ABULÓN				
MADUREZ	DESOVADO	INICIO	MEDIO	MADURO
TAMAÑO DEL CALLO	GRANDE	MEDIANO	CHICO	MUY CHICO
COLORACIÓN	NORMAL	DESCOLORIDO	MUY DESCOLORIDO	TRANSPARENTE
DUREZA DEL CALLO	DURO	MEDIANAMENTE DURO	AGUADO	MUY AGUADO
MOVILIDAD	MUY ACTIVO	ACTIVO	LENTO	INMÓVIL
OLOR	NORMAL	FÉTIDO	MUY FÉTIDO	OTRO
DESCONCHADO	NORMAL	FÁCIL	MUY FACIL	DESPRENDIDO
OTRAS CARACTERÍSTICAS DEL CALLO	CON CAVERNAS (.....)		SIN AMPOLLAS (.....)	CON MANCHAS (.....)
	SIN CAVERNAS (.....)		CON GRANOS (.....)	SIN MANCHAS (.....)
	CON AMPOLLAS (.....)		SIN GRANOS (.....)	
FOTOGRAFÍA	SI	NO	CLAVE DE LA FOTOGRAFÍA	
OTRAS OBSERVACIONES				

Apéndice 2. Formalina 10% (amortiguada)

Para preparar 1 litro de solución:

Fosfato de sodio monobásico	4.0 g
Fosfato de sodio dibásico	6.5 g
Formaldehído 37%	100.0 ml
Agua destilada	900.00 ml

Agitar bien ante de usarse.

Peligro: Cancerígeno.

Seguridad: Trabajar en un área ventilada, usar lentes de protección, guantes y bata de laboratorio.

Apéndice 3. Protocolo de técnica histológica

Fijación: La víscera del abulón se fija en formalina al 10% para su transporte, la relación volumen y liquido es de 1:5.

Técnica de deshidratación: Se utiliza un histoquinette Leica TP 1040 con los siguientes tiempos

Etanol 70% 1 hora

Etanol 96% - I 2 horas

Etanol 96% - II 2 horas

Etanol 100% - I 2 horas

Etanol 100% - II 2 horas

Etanol 100% - Benceno 3 horas

Benceno I 2 horas

Benceno II 2 horas

Parafina I 2 horas

Parafina II 2 horas

Total 23 horas

Incluir en parafina.

Tinción Hematoxilina Eosina: Esta técnica permite demostrar claramente un enorme número de diferentes estructuras tisulares. Esencialmente la hematoxilina tiñe al núcleo de la célula de un color azul a negro, con un buen detalle intranuclear; por otro lado, la eosina tiñe al citoplasma celular y a la mayoría de las fibras del tejido conectivo en variadas intensidades de rosa, naranja y rojo.

Desparafinación e Hidratación.

Xileno I 10 min. *

Xileno II 5 min. *

Xileno III 5 min. *

Etanol 100% - I 5 min.

Etanol 100% - II 5 min.

Etanol 96% 5 min.

Etanol 10% 5 min.

Agua destilada

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

Tinción Hematoxilina-Eosina/Floxina.

Desparafinar las muestras hasta hidratar en agua.

Hematoxilina 30 min.

Agua corriente Lavar.

Etanol ácido 5 seg.

Carbonato de litio 2 min.

Agua destilada 5 seg.

Etanol 96% 3 min.

Eosina/Floxina 1 min.

Etanol 96% - I 2 min.

Etanol 96% - II 2 min.

Etanol 100% - I 3 min.

Etanol 100% - II 3 min.

Xileno I 5 min.

Xileno II 5 min.

Xileno III 5 min.

Montar en resina sintética.

Apéndice 4. Protocolo de extracción de ADN con el kit DNEASY BLOOD AND TISSUE de QIAGEN.

- 1.- Cortar el tejido (~25 mg) en pequeños pedazos y colocar en un tubo eppendorf de 1.5 ml. Añadir 180 μ l de Buffer ATL , 20 μ l de Proteinasa K y mezclar mediante vórtex. Incubar a 56°C hasta que termine la lisis; en el caso de tejido de abulón alrededor de 1h 15 minutos. Mezclar ocasionalmente con vórtex durante la incubación cada 15 minutos.
- 2.- Añadir 200 μ l de Buffer AL. Mezclar mediante vórtex.
- 3.- Agregar 200 μ l de etanol al 96-100%. Mezclar mediante vórtex.
- 4.- Pipetear la mezcla en una columna DNeasy Mini spin column situada en un tubo de colecta de 2 ml. Centrifugar a 8000 rpm por 1 minuto. Descartar el tubo de colecta con el líquido colectado.
- 5.- Colocar la columna en un nuevo tubo de colecta de 2 ml. Agregar 500 μ l de Buffer AW1. Centrifugar por 1 minuto a 8, 000 rpm. Descartar el tubo de colecta y el líquido recuperado.
- 6.- Colocar la columna en un nuevo tubo de colecta de 2 ml. Agrega 500 μ l de Buffer AW2 y centrifugar por 3 minutos a 14, 000 rpm. Descartar el tubo de colecta y el líquido recuperado.
- 7.- Transferir la columna a un nuevo tubo eppendorf de 1.5 ml. Eluir el ADN añadiendo 200 μ l de Buffer AE al centro de la membrana de la columna. Incubar durante 15 minutos a temperatura ambiente (15-25 °C). Centrifugar a 8,000 rpm durante 1 minuto.
- 8.- Para incrementar la concentración de ADN, repetir el paso 7.

Apéndice 5. Reactivos utilizados en la hibridación *in situ*

Tabla I. Descripción de los principales reactivos utilizados en la hibridación *in situ*

REACTIVO	CONCENTRACIÓN FINAL
Proteinasa K 20 mg/ml en amortiguador Tris-HCl 0.2M pH 7.2, CaCl ₂ 2 mM	50 µg/ml
Mezcla de sondas RA5-6, RA3-8, RA3-6 y RA5-1. Stock 100 picomoles/µl de cada una.	400 femtomoles/µl (mezcla de las 4 sondas)
Conjugado enzimático: IgG Anti-Digoxigenina (Fracción FAB)-Fosfatasa Alcalina. Concentración: 150 Unidades. Fabricante: Roche, catálogo 11093274910	0.15 U
Cloruro de nitroazul de tetrazolio (NBT) 18.75 mg/ml + 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (sal de toluidina) (BCIP) 9.4 mg/ml en dimetil sulfóxido al 67%. Fabricante: Roche, catálogo: 1681451.	NBT 375 µg/ml BCIP 188 µg/ml

Apéndice 6. Prueba Q de Cochran

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

H0: No hay diferencia significativa entre las tres técnicas de diagnóstico para *X. californiensis*.

H1: Hay diferencia significativa entre las tres técnicas de diagnóstico para *X. californiensis*.

Los datos del estudio están en la tabla II. También aparecen en la tabla II los valores de Li (el número total casos positivos de todas las técnicas) y los valores de Li^2 . Por ejemplo en el primer conjunto igualado, las técnicas de histología y PCR mostraron un resultado positivo y signos externos de deterioro un resultado negativo. Así, $Li = 1 + 1 + 0 = 2$ y $Li^2 = 2^2 = 4$.

Los puntajes se colocaron en $k = 3$ columnas y $N = 70$ hileras. Se observó que $G1 = 13$ = número total de resultados positivos a la técnica de signos manifiestos. $G2 = 65$ = número total de resultados positivos a la técnica histológica. Y $G3 = 29$ = número total de resultados positivos a la técnica de PCR. El número total de resultados positivos para las tres técnicas = $\sum Gi = 13 + 65 + 29 = 107$ (la suma total de los casos positivos de las técnicas, $\sum Li$. El cuadrado de la suma de los casos positivos de las técnicas es $\sum Li^2 = 198$

Tabla II. Resultado positivo (1) y negativo (0) dados por las técnicas de diagnóstico para la detección de *X. californiensis*.

Muestra	Histología	PCR	Signos	Li	Li ²
1	1	1	0	2	4
2	1	0	0	1	1
3	1	1	0	2	4
4	1	0	0	1	1
5	0	0	1	1	1
6	1	0	0	1	1
7	1	0	0	1	1
8	1	1	0	2	4
9	1	0	0	1	1
...					
70	1	1	0	2	4
	G2 65	G3 29	G1 13	107	198

Poniendo estos valores en la formula tenemos:

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

$$Q = \frac{(3-1) \{ 3[(13^2) + (65^2) + (29^2)] - (107^2) \}}{3(107) - 198}$$

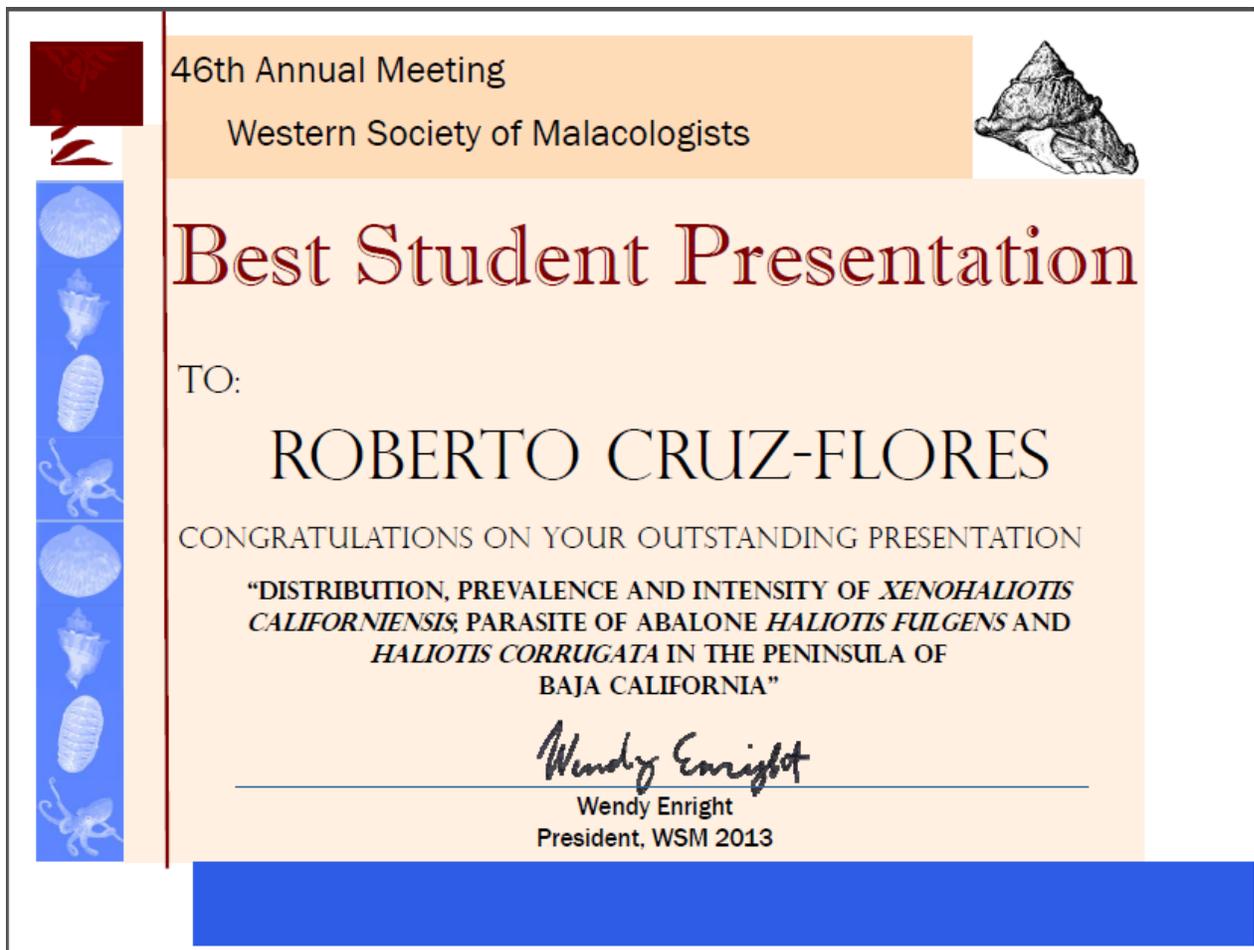
$$= 69.77$$

La referencia a la tabla de valores críticos de Chi cuadrada de Fisher y Yates revela que $Q = 69.77$ tiene una probabilidad de ocurrencia conforme a H_0 de $P < 0.001$, cuando $gl = k - 1 = 3 - 1 = 2$. Así, el valor de Q está en la región de rechazo y por lo tanto se tomó la decisión de rechazar la H_0 y aceptar la H_1 .

Apéndice 7. Participación en congresos

Resultados parciales de esta tesis se presentaron en el 46 Annual Meeting of the Western Society of Malacologists obteniendo el “Best Student Presentartion Award”.

Cruz-Flores, R., Cáceres-Martínez, J., Vásquez-Yeomans, R., Guerrero-Rentería, Y., 2013. Distribution, prevalence and intensity of *Xenohaliotis californiensis* parasite of abalone, *Haliotis fulgens* and *Haliotis corrugata* in the peninsula of Baja California, Mexico. 46th Annual Meeting Western Society of Malacologist.



46th Annual Meeting
Western Society of Malacologists

Best Student Presentation

TO:

ROBERTO CRUZ-FLORES

CONGRATULATIONS ON YOUR OUTSTANDING PRESENTATION

“DISTRIBUTION, PREVALENCE AND INTENSITY OF *XENOHALIOTIS CALIFORNIENSIS*, PARASITE OF ABALONE *HALIOTIS FULGENS* AND *HALIOTIS CORRUGATA* IN THE PENINSULA OF BAJA CALIFORNIA”

Wendy Enright

Wendy Enright
President, WSM 2013