

NOTA CIENTÍFICA

Primer registro de *Perkinsus* sp. (Protozoa, Apicomplexa) en el callo de hacha *Atrina maura* en Sinaloa, México

First record of *Perkinsus* sp. (Protozoa, Apicomplexa) in the pen shell *Atrina maura* in Sinaloa, Mexico

Andrés Martín Góngora-Gómez¹, Fernando Rubio-Zepeda¹, Lizeth Carolina Villanueva-Fonseca¹, Ernesto Alvarez-Dagnino¹, Norma Patricia Muñoz-Sevilla², Juan Antonio Hernández-Sepúlveda¹ y Manuel García-Ulloa^{1*}

¹Instituto Politécnico Nacional (IPN), Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional (CIIDIR), Unidad Sinaloa, Departamento de Acuicultura, Blvd. Juan de Dios Bátiz Paredes 250, Guasave, Sinaloa, México. *Autor correspondiente: turbotuag@hotmail.com

²Instituto Politécnico Nacional (IPN), Centro Interdisciplinario de Investigaciones y Estudios sobre Medio Ambiente y Desarrollo, Ciudad de México, México

Abstract.- We evaluated the presence of the protozoan *Perkinsus* sp. by determining of its prevalence and level of infection in *Atrina maura* during 2012. Pen shells were collected per season beside an oyster farm located at Estero La Piedra, Sinaloa, Mexico, and analyzed by Ray's fluid thioglycollate medium and polymerase chain reaction. The higher prevalence (90%) and infection level (2.3) were obtained when temperature and salinity were higher. The Mackin scale showed a non-infected to moderate infection range. PCR was positive to *Perkinsus* sp. This is the first record of the presence of *Perkinsus* sp. in *A. maura* in Sinaloa, Mexico.

Key words: *Atrina maura*, *Perkinsus* sp., prevalence, infection

INTRODUCCIÓN

La producción acuícola se ha incrementado de manera significativa en las últimas 3 décadas como respuesta a las necesidades cada vez mayores de alimento. Los moluscos aportan aproximadamente 16% de la producción mundial (FAO 2015), entre los cuales, se encuentra el bivalvo conocido como 'callo de hacha', *Atrina maura* (Sowerby, 1835). Góngora-Gómez *et al.* (2011) mencionan que este lamelibranquio es reconocido por su sabor y textura en los países de la costa del Pacífico, siendo apreciado entre los más selectos de los mariscos y moluscos por su calidad gastronómica. Se distribuye desde Baja California hasta Perú (Keen 1971) y habita enterrado en suelo arenosos, de limo y arcilla. Sus conchas son trigonales y delgadas, de un color que fluctúa de ámbar-purpúreo a café oscuro (Rodríguez-Jaramillo 2004). Los músculos aductores, principalmente el posterior, componen la parte comestible y comercial del animal, por la cual existe alta demanda en los mercados nacionales e internacionales (Ángel-Pérez *et al.* 2007).

Los primeros cultivos experimentales de este bivalvo se iniciaron en 1980 en el Puerto de San Blas, Nayarit, y su producción se extendió al noroeste del país a partir de 1991 (Miranda-Baeza 1994). En 2006, Almaraz-Salas (2008) reportó mortalidad en bancos naturales de callo de hacha en diferentes sitios del Golfo de California, aledaños a localidades donde se cultivan varias especies de ostión. Hasta ahora, las

causas de la mortalidad son desconocidas, pero es posible que factores ambientales tales como: alta temperatura del agua, presencia de contaminantes, estrés asociado a la madurez sexual y reproducción, disponibilidad de alimento y sobreexplotación, sean responsables de tales pérdidas (Gouletquer *et al.* 1998, Góngora-Gómez *et al.* 2011). No existen reportes de parásitos en *A. maura*, sin embargo, no se descarta su presencia debido a la cercanía de sus bancos naturales con áreas de cultivo de otros bivalvos en los que se han detectado (Enríquez-Espinoza *et al.* 2010, Cáceres-Martínez *et al.* 2012, Villanueva-Fonseca & Escobedo-Bonilla 2013).

El género *Perkinsus* sp. (Apicomplexa, Perkinsea) es un protozoario, parásito facultativo intracelular, responsable de mortalidades masivas en poblaciones silvestres y cultivadas de moluscos bivalvos como *Ruditapes decussatus* en el Mar Mediterráneo (Almeida *et al.* 1999, Leite *et al.* 2004) y *Crassostrea virginica* en el Golfo de México (Parra-Laca 2010). Estudios previos han confirmado la presencia de *P. marinus* en la parte oriental de México desde 1962, infectando a *C. virginica*, en Laguna Madre, Tamaulipas, y a finales de los 90' fue reportado en los estados de Tabasco y Veracruz (Aguirre-Macedo *et al.* 2007). La costa del Pacífico mexicano había sido considerada libre de este patógeno, sin embargo, su presencia en dicha región se atribuye al resultado de la transfaunación debido al movimiento de lotes de *C. virginica*

del Golfo de México, al noroeste del país (Enríquez-Espinoza *et al.* 2010, Cáceres-Martínez *et al.* 2012). De esta forma, es importante determinar la presencia de *Perkinsus* sp. en los moluscos de esa zona. Dado las mortalidades previamente registradas en cultivos experimentales de *A. maura* hacia el sur del Golfo de California, en las costas del estado de Sinaloa (Almaraz-Salas 2008, Góngora-Gómez *et al.* 2011), es necesario determinar el posible impacto de *Perkinsus* sp. en sus poblaciones. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la prevalencia estacional y el grado de infección de *Perkinsus* sp. en el callo de hacha *A. maura* del Estero La Piedra, Sinaloa, México.

MATERIALES Y MÉTODOS

RECOLECTA DE ORGANISMOS

Para evaluar la presencia de *Perkinsus* sp. en *A. maura*, se realizaron 4 muestreos (recolectas trimestrales) a lo largo del 2012, en un banco de callo de hacha del Estero La Piedra, Municipio de Guasave, Sinaloa, México, situado en la costa sureste del Golfo de California, entre 25°18' y 25°24'N y 108°32' y 108°45'W. Con la ayuda de rastrillos, se colectaron 30 organismos por captura aleatoria (longitud promedio 237,46 ± 93,5 mm). El tamaño de la muestra se calculó de acuerdo a la tabla de Amos (1985) considerada para una población de menos de 10,000 individuos con una prevalencia esperada de 10%. Durante cada muestreo, se obtuvieron *in situ*, datos de temperatura (°C) y salinidad del agua usando un oxímetro (YSI55, USA) y un refractómetro (ATAGO, USA), respectivamente. Los parámetros fueron obtenidos la primera semana de cada estación durante la mañana, a una profundidad de 1,5 m. Después, los callos fueron transportados en hieleras a 4°C al Laboratorio de Malacología del Centro Interdisciplinario de Investigación y Desarrollo Integral (CIIDIR), Unidad Sinaloa, del Instituto Politécnico Nacional (IPN), para su procesamiento y análisis.

PREVALENCIA POR MEDIO FLUIDO DE TIOLICOLATO (MFT)

Los animales recolectados fueron procesados para el análisis de *Perkinsus* sp. de acuerdo al protocolo definido por la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE 2015). Se eligió la técnica de incubación en fluido de tioglicolato para determinar la presencia de *Perkinsus* sp. en las muestras debido a su sensibilidad (Yarnal *et al.* 2000), bajo costo y por ser una técnica de uso estándar. El análisis por MFT (Karolus *et al.* 2000) se realizó utilizando 10 g de tejido compuestos por fracciones equivalentes de manto, branquia, glándula digestiva y músculos

aductores. Las muestras (25 mL) se incubaron en tubos desechables de 50 ml con medio MFT y antibióticos (500 U mL⁻¹ de penicilina G, 500 U mL⁻¹ de estreptomycinina y 400 U mL⁻¹ de nistatina). Durante la incubación, los tubos se mantuvieron en oscuridad a temperatura ambiente (28°C) durante 7 días para inducir la formación de hipnosporas de *Perkinsus* sp.

Tras la incubación, se recogieron los fragmentos de tejido y se trituraron con una hoja de bisturí sobre un portaobjetos de vidrio, se añadió 1 mL de solución yodada Lugol y se cubrió la preparación con un cubreobjetos, misma que se dejó reposar durante 10 min. Finalmente, se realizó el conteo de las presuntas hipnosporas de *Perkinsus* sp. a 100X de magnificación microscópica (Leica® DM750).

La prevalencia se calculó mediante la fórmula propuesta por Thrusfield (1995):

$$P = \frac{\text{número de animales infectados}}{\text{total de animales analizados}} \times 100$$

El índice de infección fue medido con relación al rango de 0 (negativo) a 5 (severamente infectado) de la escala de Mackin (1962), modificada por Craig *et al.* (1989), que resulta determinando el Log10 del total de hipnosporas o células de *Perkinsus* sp. contadas, entre el peso húmedo del tejido analizado.

CONFIRMACIÓN DE LA IDENTIDAD DE PRESUNTAS HIPNOSPORAS DE *PERKINSUS* SP. CON LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

La identidad de *Perkinsus* sp. a partir de las hipnosporas obtenidas del MFT fue confirmada por análisis de ADN con la técnica de PCR. Se realizó la extracción de ADN a partir de hipnosporas obtenidas de tejido del manto y branquia de los callos de hacha utilizando el método de DNAzol®, siguiendo las indicaciones del fabricante (Molecular Research Center, Inc. Cincinnati OH, USA). El análisis de PCR se hizo con los iniciadores PerkITS85 (5'-CCG CTTTGT TTG GAT CCC-3') y PerkITS750 (5'-ACA TCA GGC CTT CTA ATG ATG-3') (OIE, 2015), que amplifican la región del ARNr de *Perkinsus* sp., obteniendo un producto de 703 pb (Casas *et al.* 2002). Estos iniciadores pueden detectar cualquier especie conocida del género *Perkinsus* sp. excepto *P. qugwadi*. La mezcla de reacción para la PCR consistió de amortiguador PCR 1X (10 mM Tris-HCl, pH 8,5, KCl 50 mM), MgCl₂ 1,5 mM, dNTP's 0,2 mM, 0,01 mM de cada iniciador y 1,5 U de *Taq* ADN polimerasa (Bioline, Boston MA, USA). Para la reacción se utilizó 1 µL de ADN genómico (100 ng). El volumen final de cada reacción de PCR fue de 25 µL. En todas las

reacciones se incluyó un control positivo de ADN genómico de *C. ariakensis* infectado por *P. marinus* (Virginia Institute of Marine Science, William & Mary University, Virginia, USA), y un control negativo consistente en agua estéril. Las condiciones de amplificación fueron una desnaturalización inicial a 95°C por 5 min; 35 ciclos de 94°C por 1 min, 59°C por 1 min y 72°C por 1 min, con una extensión final de 72°C por 5 min.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La detección de *Perkinsus* sp. con la técnica MFT mostró la presencia de corpúsculos esféricos de color oscuro (hipnosporas) tal como lo describe el manual de diagnóstico para animales acuáticos, indicativo de estadios vegetativos del protozooario (Fig. 1), mientras que la identidad del parásito fue confirmada por el análisis de PCR mostrando un fragmento aproximado a 703 pb (OIE 2015) en callos de hacha con *Perkinsus* sp., procedentes del Estero La Piedra, Municipio de Guasave, Sinaloa, México. La presencia del patógeno infectando poblaciones naturales y cultivadas de diferentes especies de ostión, como *C. corteziensis*, *S. palmula*

(Cáceres-Martínez *et al.* 2008, 2012) y *C. gigas* (Villanueva-Fonseca & Escobedo-Bonilla 2013), en localidades cercanas al área de estudio del presente trabajo, sugiere una posible transmisión horizontal del protozooario entre las especies de moluscos en la zona. Las posibles hipnosporas se encontraron en organismos recolectados de las 4 estaciones, con los siguientes índices de infección de Mackin (1962), modificada por Craig *et al.* (1989): 0 en primavera (negativo), y de ligero/moderado para verano, otoño e invierno, con índices de infección de 2,3, 2,2 y 1,9, respectivamente.

Los grados de infección obtenidos en este trabajo fueron similares (2 y 3) con los reportados por Huicab-Pech *et al.* (2012) para *C. virginica* en el estado de Tabasco, pero inferiores al reportado (5) para el mismo ostión en la costa norte del Golfo de México, y para *Ruditapes decussatus* y *R. philippinarum* (Rodríguez & Navas 1995) en el Mar Mediterráneo. Cáceres-Martínez *et al.* (2008) obtuvieron valores similares (1,3 y 1,5) para *C. corteziensis* en el estado de Nayarit.

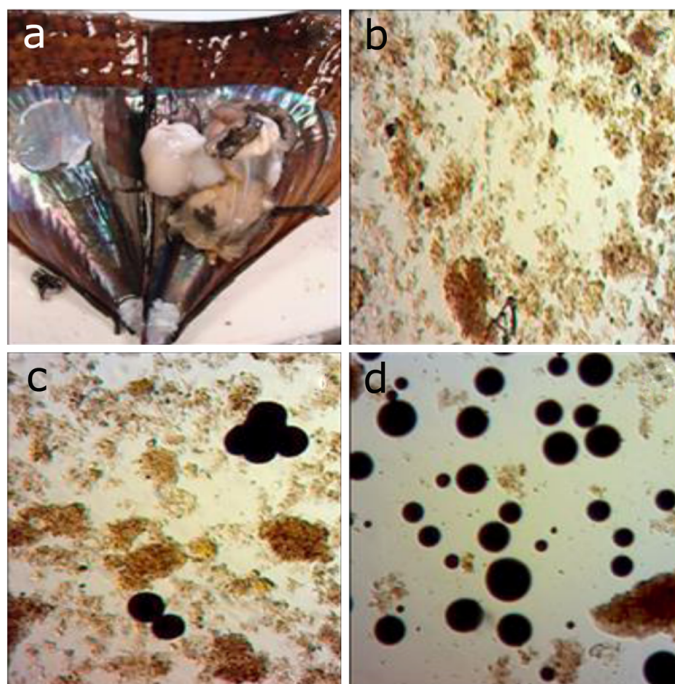


Figura 1. Detección de *Perkinsus* sp., en *A. maura* mediante la prueba de Medio Fluido de Tioglicolato (MFT). a) Callo de hacha analizado, b) Tejido de manto, branquia, músculo aductor, glándula digestiva y gónada libres de células de *Perkinsus* sp. observado a 100x, c) y d) Tejido de manto, branquia, músculo aductor, glándula digestiva y gónada con presuntas hipnosporas de *Perkinsus* sp. observadas a 100x / Detection of *Perkinsus* sp. in *A. maura* with the Fluid Thioglycolate Medium (FTM) method. a) Pen shell sampled, b) Tissue of gill, mantle, muscle, digestive gland and gonad free of *Perkinsus* sp. (100x), c) and d) Tissue of gill, mantle, muscle, digestive gland and gonad infected with hipnosporas of *Perkinsus* sp. (100x)

Por otro lado, la prevalencia de *Perkinsus* sp. encontrada en *A. maura* (Fig. 2) fue mayor a la reportada por Cáceres-Martínez *et al.* (2012), quienes evaluaron infecciones de *P. marinus* en *S. palmula* recolectados de octubre a noviembre 2010, en 4 zonas del estado de Sinaloa: Topolobampo, La Bocanita, La Reforma y Cospita, en las que registraron prevalencias de 13,3, 6,7, 13,3 y 20%, respectivamente. En el presente trabajo, la prevalencia de *Perkinsus* por MFT en *A. maura* varió entre 40 y 90%, siendo mayor a la reportada en La Bocanita para *S. palmula*, que es una zona cercana al sitio de cultivo al área de estudio. La diferencia entre los resultados anteriores y los obtenidos en este trabajo pueden deberse a las diferentes metodologías de estimación usadas, además de otros factores como: la especie estudiada, la intensidad del muestreo, la localidad y el tiempo de exposición al patógeno (Villanueva-Fonseca & Escobedo-Bonilla 2013). Los altos valores de prevalencia encontrados en *A. maura* no pueden compararse con otras especies, ya que la susceptibilidad de cada molusco a *Perkinsus* sp. debe ser evaluada con estudios de laboratorio y de campo de manera específica y local, por lo que es recomendable realizar ensayos en laboratorio y el monitoreo anual y continuo del protozoario en las poblaciones de callo de hacha.

El análisis de PCR indicó la presencia del parásito en las muestras analizadas de manto y branquia, ya que se amplificó la región ITS de *Perkinsus* sp. y se obtuvo un fragmento aproximado a 703 pb (Fig. 3). Villanueva-Fonseca & Escobedo-Bonilla (2013) encontraron diferentes valores de prevalencia comparando MFT y PCR en *C. gigas*, lo cual coincide con Navas-Triano *et al.* (2008) al aplicar los 2 métodos anteriores además de histología en la almeja *R. decussatus*. En el presente trabajo, se usó MFT para estimar la prevalencia de *Perkinsus* sp. por ser el método de detección más sensible (Yarnal *et al.* 2000), lo que confirma el efecto de la técnica usada en los resultados al comparar diferentes trabajos.

La intensidad de la infección encontrada en primavera y verano indica que *A. maura* es más susceptible a la Perkinsiosis cuando la temperatura del ambiente asciende, lo cual coincide con las observaciones reportadas por Chu & La Peyre (1991) para el ostión *C. virginica*, pero difiere a lo encontrado por Villanueva-Fonseca & Escobedo-Bonilla (2013) en *C. gigas*. La variación en la susceptibilidad a la infección entre diferentes moluscos en los meses más cálidos, puede ser atribuida a una respuesta más eficiente del sistema inmune reflejada en una mayor concentración de hemocitos circulantes, alto porcentaje de granulocitos y hemaglutininas humorales (Fisher 1988).

En conclusión, *Perkinsus* sp. fue detectado en una especie de moluscos diferente a las previamente reportadas. Este trabajo por tanto representa el primer reporte de *Perkinsus* sp. en

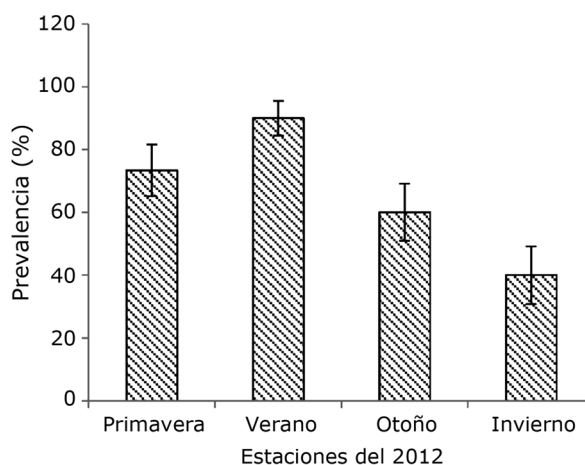


Figura 2. Prevalencia estacional de *Perkinsus* sp. en *A. maura* detectada por MFT (media \pm DE) / Seasonal prevalence of *Perkinsus* sp. in *A. maura* detected with FTM (mean \pm SD)

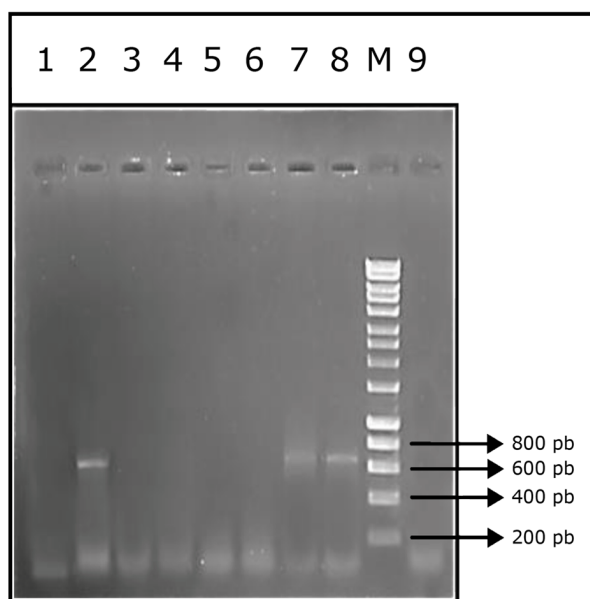


Figura 3. Identificación de *Perkinsus* sp., por PCR usando los oligonucleótidos para la región ITS en callo de hacha *Atrina maura* del Estero La Piedra, Municipio de Guasave, Sinaloa, México. Carriles 1, 3, 4, 5 y 6 muestras negativas de *Perkinsus* sp., 2 y 7 muestras positivas de *Perkinsus* sp., 8 control positivo de *Perkinsus* sp., M Marcador de peso molecular, y 9 control negativo de *Perkinsus* sp. / Identification of *Perkinsus* sp. with the oligonucleotids for the ITS region of the pen shell *A. maura* of the Estero La Piedra, Municipality of Guasave, Sinaloa, Mexico. Tracks 1, 3, 4, 5 and 6 negative samples of *Perkinsus* sp., 2 and 7 positive samples of *Perkinsus* sp., 8 positive control of *Perkinsus* sp., M molecular marker, and 9 negative control of *Perkinsus* sp.

Atrina maura en el Estero La Piedra, Municipio de Guasave, Sinaloa, México, con prevalencia e intensidad de infección leve a moderada, y con mayor presencia en los meses más calurosos del año. Los resultados contribuyen al conocimiento de la conducta del parásito en poblaciones naturales de la zona donde se pretende establecer el cultivo de *A. maura* a nivel comercial. Se recomienda el monitoreo continuo del patógeno en el Estero La Piedra, Sinaloa, para establecer medidas de bioseguridad que favorezcan la actividad acuícola.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo financiero y logístico del Instituto Politécnico Nacional (IPN) mediante los proyectos SIP-20090453 (Crecimiento y sobrevivencia del callo de hacha *Atrina maura* en un sistema de cultivo 'Parques o Encierros' en la ensenada La Palmita, Navolato, Sinaloa) y SIP-20100618 (Efecto de la densidad de la siembra en el cultivo de callo de hacha *Atrina maura* en la ensenada La Palmita, Navolato, Sinaloa).

LITERATURA CITADA

- Aguirre-Macedo ML, RA Sima-Álvarez, MK Román-Magaña & JI Güemez-Ricalde. 2007.** Parasite survey of the eastern oyster *Crassostrea virginica* in coastal lagoons of the southern Gulf of México. *Journal of Aquatic Animal and Health* 19: 270-279.
- Almaraz-Salas JC. 2008.** Primer cultivo experimental de callo de hacha *Atrina maura* (Sowerby, 1835) en la ensenada La Palmita, Navolato, Sinaloa. Tesis de Licenciatura. Universidad de Occidente, Unidad Guasave, Guasave, Sinaloa, 74 pp.
- Almeida M, F Berthe, A Thébault & MT Dinis. 1999.** Whole clam culture as a quantitative diagnostic procedure of *Perkinsus atlanticus* (Apicomplexa, Perkinsea) in clams *Ruditapes decussates*. *Aquaculture* 177: 325-332.
- Amos KH. 1985.** Procedures for the detection and identification of certain fish pathogens. *Fish Health Section*, 114 pp. American of Fisheries Society, Corvallis.
- Ángel-Pérez C, SJ Serrano-Guzmán & MA Ahumada-Sempoal. 2007.** Ciclo reproductivo del molusco *Atrina maura* (Pterioidea: Pinnidae) en un sistema lagunar costero, al sur del Pacífico tropical mexicano. *Revista de Biología Tropical* 55: 839-852.
- Cáceres-Martínez J, R Vásquez-Yeomans, G Padilla-Lardizábal & MA Del Río Portilla. 2008.** *Perkinsus marinus* in pleasure oyster *Crassostrea corteziensis* from Nayarit, Pacific coast of México. *Journal of Invertebrate Pathology* 99: 66-73.
- Cáceres-Martínez J, M García-Ortega, R Vásquez-Yeomans, T Pineda-García, NA Stokes & RB Carnegie. 2012.** Natural and cultured populations of the mangrove oyster *Saccostrea palmula* from Sinaloa, Mexico, infected by *Perkinsus marinus*. *Journal of Invertebrate Pathology* 110: 321-325.
- Casas SM, JF La Peyre, KS Reece, C Azevedo & A Villalba. 2002.** Continuous in vitro culture of the carpet shell clam *Tapes decussatus* protozoan parasite *Perkinsus atlanticus*. *Diseases of Aquatic Organisms* 52: 217-231.
- Chu FS & JF La Peyre. 1991.** Effect of salinity in *Perkinsus marinus* susceptibility and defense related activities in eastern oysters *Crassostrea virginica*. *Journal of Shellfish Research* 10: 294.
- Craig A, EN Powell & RR Fay. 1989.** Distribution of *Perkinsus marinus* in gulf coast oyster populations. *Estuaries* 12: 89-91.
- Enríquez-Espinoza TL, JM Grijalva-Chon, R Castro-Longoria & J Ramos-Paredes. 2010.** *Perkinsus marinus* in *Crassostrea gigas* in the Gulf of California. *Diseases of Aquatic Organisms* 89: 269-273.
- FAO. 2015.** FAO Global Aquaculture production database updated to 2013. Summary information. <<http://www.fao.org/fishery/statistics/en>>
- Fisher WS. 1988.** Disease processes in marine bivalve mollusks. Special Publication. American Fisheries Society 18: 1-315. American Fisheries Society, Bethesda
- Góngora-Gómez AM, M García-Ulloa, AL Domínguez-Orozco & JA Hernández-Sepúlveda. 2011.** Crecimiento del callo de hacha *Atrina maura* (Sowerby, 1835) (Bivalvia: Pinnidae) cultivado a diferentes densidades. *Avances en Investigación Agropecuaria* 15: 79-94.
- Goulletquer P, P Soletchnik, O Le Moine, D Razet, P Geairon, N Fauray & S Taillade. 1998.** Summer mortality of the Pacific cupped oyster *Crassostrea gigas* in the bay of Marennes-Oléron France, 20 pp. Council Meeting of the International Council for the Exploration of the Sea, Cascais (Portugal), 16-19 September 1998, ICES, Copenhagen.
- Huicab-Pech Z, GS Curiel-Ramírez, M Castañeda-Chávez, F Lango-Reynoso & P Carrillo-Alejandro. 2012.** Variación estacional de *Perkinsus marinus* en el ostión americano *Crassostrea virginica* del sistema lagunar Carmen-Machona-Pajonal, en Tabasco, México. *Tropical and Subtropical Agrosystems* 15: 40-50.
- Karolus J, L Sunila, S Spacer & J Volk. 2000.** Prevalence of *Perkinsus marinus* (Dermo) in *Crassostrea virginica* along the Connecticut shoreline. *Aquaculture* 183: 215-221.
- Keen AM. 1971.** Sea shells of Tropical West America, 347 pp. Stanford University Press, Stanford.
- Leite RB, R Afonso & ML Cancela. 2004.** *Perkinsus* sp. Infestation in carpet-shell clams, *Ruditapes decussates* (L.), along the Portuguese coast. Results from a 2-year survey. *Aquaculture* 240: 39-53.
- Mackin JG. 1962.** Oyster disease caused by *Dermocystidium marinum* and other microorganisms in Louisiana. Publications of the Institute for Marine Science University of Texas, Texas 7: 132-229.

- Miranda-Baeza M. 1994.** Cultivo experimental de callo de hacha *Atrina maura* (Pelecypoda: Pinnidae), en la laguna de Agiabampo, Sonora. Tesis de Licenciatura, Centro de Estudios Superiores de Sonora, Unidad Académica Navojoa, Sonora, 79 pp.
- Navas-Triano JL, R De la Herrán-Moreno, M Quintero, IM García-Pardo, M Ruiz-Rejón & JC Manzano-Harriero. 2008.** Evaluation of the sensitivity and specificity by latent class analysis of Ray's method, histological assay, and PCR diagnosis of *Perkinsus olensi* in *Ruditapes decussatus*, 36 pp. Workshop of the analysis of the impact of Perkinsiosis to the European Shellfish industry, Comision Europea, Vigo.
- OIE. 2015.** Manual of diagnostic tests for aquatic animals. World Organization of Animal Health, Paris <<http://www.oie.int/es/normas-internacionales/manual-acuatico/acceso-en-linea/>>
- Parra-Laca R. 2010.** *Urastoma* sp. y *Perkinsus marinus* en los ostiones de importancia acuícola *Crassostrea virginica* y *Crassostrea corteziensis*, ¿Coevolución o transfaunación? Tesis de Maestría, Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. Ensenada, Baja California, 82 pp.
- Rodríguez-Jaramillo MC. 2004.** Efecto de la temperatura sobre la gametogénesis en el callo de hacha *Atrina maura* (Sowerby, 1835) (Bivalvia: Pinnidae). Tesis de Maestría, Instituto Politécnico Nacional, Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas, La Paz, Baja California Sur, 92 pp.
- Rodríguez F & JL Navas. 1995.** A comparison of gill and hemolymph assays for the thioglycolate diagnosis of *Perkinsus atlanticus* (Apicomplexa, Perkinsea) in clams, *Ruditapes decussates* and *Ruditapes philippinarum* (Adams et Reeve). *Aquaculture* 132: 145-152.
- Thrusfield M. 1995.** *Veterinary epidemiology*, 593 pp. Blackwell Publishing, Ames Iowa.
- Villanueva-Fonseca LC & CM Escobedo-Bonilla. 2013.** Prevalencia del protozoario *Perkinsus* sp. en un cultivo de ostión japonés *Crassostrea gigas* en Sinaloa, México. *Latin American Journal of Aquatic Research* 41: 996-1002.
- Yarnal HA, KS Reece, NA Stokes & EM Burreson. 2000.** A quantitative- competitive polymerase chain reaction assay for the oyster pathogen *Perkinsus marinus*. *Journal of Parasitology* 86: 827-837.

Recibido el 25 de mayo de 2015 y aceptado el 8 de agosto de 2016

Editor: Claudia Bustos D.