

Presuntas hipnosporas de *Perkinsus* sp. en la almeja *Megapitaria squalida* del golfo de California

Presumptive *Perkinsus* sp. hyphospores in the clam *Megapitaria squalida* from the Gulf of California

Andrés Martín Góngora-Gómez¹, Juan Francisco Arzola-González², Lizeth Carolina Villanueva-Fonseca¹, Felipa Sotelo-López¹, Juan Antonio Hernández-Sepúlveda¹ Manuel García-Ulloa¹

¹Instituto Politécnico Nacional, Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, Unidad Sinaloa, Guasave, Sinaloa, Blvd. Juan de Dios Bátiz Paredes No. 250, Col. San Joaquín, AP 280, Guasave, Sinaloa, CP 81101, México. Tel: + 687 8729626, ext. 87651, México.

²Facultad de Ciencias del Mar, Universidad Autónoma de Sinaloa, Mazatlán, Sinaloa, México.

Correspondencia: Manuel García-Ulloa  E-mail: turbotuag@hotmail.com

Artículo original | Original article

Palabras clave

Parasitología,
Almeja,
Prevalencia,
Infección,
Sinaloa.

RESUMEN | Se detectaron presuntas hipnosporas de *Perkinsus* sp. en una población silvestre de la almeja *Megapitaria squalida* (enero-diciembre 2013) al norte del estado de Sinaloa, México, con la técnica de tinción de tioglicolato (MFTR). Se colectaron 30 almejas cada mes (64.08 ± 4.75 mm altura de la concha y 68.76 ± 14.34 g de peso). Se obtuvieron los parámetros fisicoquímicos del agua (temperatura, salinidad, pH, oxígeno disuelto, profundidad y transparencia). La prueba MFTR detectó células esféricas de color oscuro, indicando la presencia de presuntas hipnosporas de *Perkinsus* sp. todos los meses de muestreo menos en diciembre. La intensidad de la infección promedio fluctuó de negativa a ligera, mientras que la prevalencia máxima fue de 70% observada en mayo. La carga parasitaria mostró correlación con los indicadores métricos de la almeja. No se obtuvo correlación ($p > 0.05$) entre la prevalencia del patógeno con todos los parámetros estudiados. Los resultados sugieren que *M. squalida* es poco susceptible a la infección de *Perkinsus* sp.

Keywords

Parasitology,
Clam,
Prevalence,
Infection,
Sinaloa.

ABSTRACT | Presumptive *Perkinsus* sp. hyphospores were detected in a wild population of the callista clam *Megapitaria squalida* (January-December 2013) from the north of the state of Sinaloa, Mexico, using the thioglycollate staining technique (MFTR). 30 clams were collected each month (64.08 ± 4.75 mm shell height and 68.76 ± 14.34 g weight). The physicochemical parameters of the water (temperature, salinity, pH, dissolved oxygen, depth, and transparency) were obtained. The MFTR test detected spherical cells of dark color every sampling month, except in December, indicating the presence of presumptive *Perkinsus* sp. hyphospores. The intensity of infection fluctuated from negative to light, while the maximum prevalence was 70% observed in May. The parasitic load showed correlation with the metric indicators of the clam. No correlation ($p > 0.05$) was obtained between the prevalence of the pathogen with all the parameters studied. The results suggest that *M. squalida* is little susceptible to the infection of *Perkinsus* sp.

INTRODUCCIÓN

Los protozoarios del género *Perkinsus* spp. han sido asociados a la mortalidad de varias especies de moluscos bivalvos de importancia comercial, y en ocasiones, se mencionan como los responsables directos de colapsos en la producción, entre los que destacan reportes para diversas especies de ostiones y almejas en diferentes países. En poblaciones silvestres, por ejemplo, Sanil *et al.* (2012) registraron por primera vez la presencia de *Perkinsus beihaiensis* en bancos naturales del ostión *Crassostrea madrasensis* en la costa

sur de la India, mientras que el mismo parásito fue detectado por Pinho Ferreira *et al.* (2015) en ejemplares de una comunidad silvestre de la almeja *Anomalocardia brasiliensis* en Brasil. Diferentes especies de *Perkinsus* spp. (*P. atlanticus* y *P. olseni*) se encontraron en almejas dentro del Mar Mediterráneo y en costas del noroeste del Atlántico noreste (Murrel *et al.*, 2002; Ruano *et al.*, 2015). *Perkinsus marinus* fue señalado como el responsable de mortalidades en el ostión del este *Crassostrea virginica*, en la línea de costa del Atlántico estadounidense durante el siglo pasado (Ray, 1996).

En México, Cáceres-Martínez y Vázquez-Yeomans (2013) reportaron un inventario de enfermedades y parásitos en ostiones comercialmente importantes, destacando la presencia de *P. marinus* en el ostión del este *C. virginica* en varias lagunas costeras del Golfo de México. Por el lado del Océano Pacífico, Enríquez-Espinoza *et al.* (2010) asociaron la mortalidad de *C. gigas* cultivado en el Golfo de California, a la infección de *P. marinus*. Más hacia el sur, el mismo parásito fue reportado en el ostión de piedra *Crassostrea corteziensis* (Cáceres-Martínez *et al.*, 2010) y el ostión de mangle *Saccostrea palmula* (Cáceres-Martínez *et al.*, 2012). La prevalencia e intensidad de la infección de *Perkinsus* sp. en un cultivo de *C. gigas* en la costa media de Sinaloa fue reportada por Villanueva-Fonseca y Escobedo-Bonilla (2013). Mientras que el desarrollo de *P. marinus* en ostreidos está más vinculado a la salinidad en el Golfo de México (Cáceres-Martínez y Vázquez-Yeomans, 2013), los meses más calurosos del año dictan la expresión del parásito en las especies de bivalvos del Golfo de California y costa del Pacífico mexicano, como reportaron Cáceres-Martínez *et al.* (2012) y Villanueva-Fonseca y Escobedo-Bonilla (2013). Sin embargo, todos los registros de *Perkinsus* spp. fueron realizados en ostreidos de importancia comercial y son pocos los reportes disponibles acerca de otras especies de bivalvos de menor relevancia. En Sonora, Enríquez-Espinoza *et al.* (2015) encontró *P. marinus* en un cultivo de la almeja *Chione fluctifraga*, mientras que Góngora-Gómez *et al.* (2016) detectaron *Perkinsus* sp. en el callo de hacha *Atrina maura* de una población silvestre del norte de Sinaloa.

Una parte del trabajo que el grupo de investigación del Laboratorio de Malacología (LM) del Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, Unidad Sinaloa (CIIDIR-Sinaloa), del Instituto Politécnico Nacional (IPN) desarrolla en las poblaciones naturales de bivalvos de Sinaloa, se enfoca en estudiar la dispersión de este parásito en otras especies importantes para la economía estatal y nacional. El presente trabajo, complementa la información que ha sido generada para la almeja chocolate mexicana *Megapitaria squalida*, de la que existen solamente reportes técnicos o tesinas en poblaciones silvestres (Góngora-Gómez, en revisión) y cultivadas (Góngora-Gómez *et al.*, aceptado en Hidrobiológica), en la costa central de Sinaloa. El objetivo de este estudio consiste en reportar la prevalencia e intensidad de infección de *Perkinsus* sp. de una población natural de la almeja *M. squalida* al norte de Sinaloa, dentro del Golfo de California, usando la técnica del medio fluido de tioglicolato de Ray.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las almejas (n = 30 cada mes) fueron recolectadas del estero Bacorehuis, Sinaloa (26° 16' 00" N y 109° 07' 59" O) mediante buceo libre (< 1 m de profundidad), desde enero a diciembre de 2013. Los ejemplares se colocaron en un recipiente con agua de mar fresca y aireación constante para ser transportados al LM. Los parámetros del agua (temperatura, oxígeno, salinidad, pH, transparencia y profundidad) se registraron cada mes en el sitio de muestreo.

Antes de ser procesadas para *Perkinsus* sp., las almejas fueron lavadas, medidas (altura, longitud y ancho de la concha, mm) y pesadas (g). Inmediatamente después, se desconcharon y se realizó un análisis visual de la condición morfológica de los tejidos, en los cuales, no se observaron deformaciones, coloración inusual ni daño físico que sugirieran un efecto infeccioso del parásito. Después, se abrieron para extraer una muestra de 5 g de tejidos, la cual, fue colocada en un tubo conteniendo Medio Fluido de Tioglicolato de Ray, MFTR (agua = 750 ml, MFTR = 23.35 g, dextrosa = 21.77 g, NaCl = 14.46 g, pemprocilina = 500 U/ml, estreptomicina = 500 U/ml y nistatina = 500 U/ml) para su incubación durante 7 días en oscuridad, a 22-25 °C (OIE, 2009). Finalmente, las muestras fueron colocadas en un portaobjetos, teñidas con dos gotas de lugol (20%), maceradas con una hoja de bisturí y cubiertas con un cubreobjetos para su observación al microscopio con magnificación usando objetivos 10X y 40X.

La presencia de *Perkinsus* sp. fue evaluada obteniendo la carga parasitaria (hipnosporas/g de tejido, Yarnall *et al.*, 2000), la prevalencia (% de almejas con presencia de hipnosporas, Cáceres-Martínez *et al.*, 2010) y la intensidad de la infección, clasificada como negativa (0 hipnosporas), ligera ($< 1 \times 10^4$ hipnosporas/g), moderada (1×10^4 a 5×10^5 hipnosporas/g) o fuerte ($> 5 \times 10^5$ hipnosporas/g) (Bushek *et al.*, 1994).

Los análisis estadísticos fueron aplicados después de examinar la normalidad de los datos (prueba de Lilliefors). Se usó estadística descriptiva (media, desviación estándar, valor máximo, valor mínimo y coeficiente de variación) para todos los parámetros estudiados (ambientales, biométricos e infecciosos). Los promedios mensuales de la carga parasitaria fueron transformados ($1/Y$) para su análisis estadístico (Bhujel, 2008). La prevalencia y carga parasitaria fueron relacionadas (correlación de Pearson) con todas las variables biométricas de la almeja y factores ambientales. Todas las pruebas estadísticas se realizaron con el programa Statgraphic Plus 5.0, a un nivel de significancia de 95%.

RESULTADOS

Después del análisis visual de las almejas desconchadas, no se observaron deformaciones, coloración inusual ni daño físico que sugirieran un efecto infeccioso del parásito. La Tabla 1 muestra el resumen de todos los factores estudiados durante los 12 meses de muestreos.

Tabla 1. Estadística descriptiva de los parámetros ambientales (temperatura, salinidad, oxígeno disuelto, pH, profundidad y transparencia), métricos de *M. squalida* (altura, largo y ancho de la concha, peso total) e infecciosos (prevalencia y carga parasitaria de *Perkinsus* sp.), en el estero Bacorehuis, Sinaloa, México.

	Temperatura (°C)	Salinidad (%)	Oxígeno (mg/L)	pH	Profundidad (m)	Transparencia (m)	Altura (mm)	Largo (mm)	Ancho (mm)	Peso (g)	Prevalencia (%)	*Carga parasitaria
Media	26.68	35.16	5.70	8.15	1.07	0.96	64.08	51.56	30.20	68.76	29.66	0.36
DE [§]	5.55	2.97	1.86	0.18	0.37	0.3	4.75	3.77	1.98	14.34	19.82	0.35
Mínimo	16.9	29	2.72	7.85	0.5	0.5	56.17	44.5	26.29	46.95	0	0
Máximo	34	40	10.17	8.4	1.95	1.5	70.86	52.29	33.66	91.25	70	1
CV	20.66	8.44	32.63	2.20	34.57	31.25	7.41	7.31	6.55	20.85	66.82	97.22

*Hipnosporas/g de tejido; transformados a $1/Y$. [§]DE = Desviación estándar; CV = Coeficiente de variación

El intervalo mensual de la carga parasitaria fue desde 0 (enero y diciembre) hasta 117 hipnosporas encontradas por gramo de tejido analizado (julio), mientras que la prevalencia fluctuó desde 0 (diciembre) hasta 70% (mayo) (Figura 1). El 29% ($n = 105$) de las almejas analizadas ($n = 360$) mostró presuntas hipnosporas en sus tejidos.

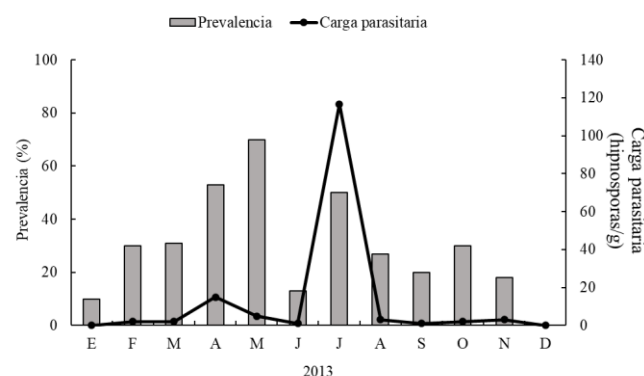


Figura 1. Prevalencia y carga parasitaria mensual de *Perkinsus* sp. en la almeja chocolate *Megapitaria squalida*, del estero Bacorahuis, Sinaloa, México.

La intensidad de la infección promedio varió de no infectado a ligera. En el mes de julio se observó la mayor carga parasitaria, habiendo registrado una almeja con 2 hipnosporas/g como el valor más bajo, hasta

un ejemplar que contabilizó 2,150 hipnosporas/g como máxima cantidad encontrada. La prevalencia y la carga parasitaria no mostraron correlación entre sí ($r = -0.239$, $P = 0.45$). De ambos indicadores infecciosos, sólo la carga parasitaria mostró correlación significativa ($P < 0.05$) con los parámetros métricos de la almeja (Tabla 2).

Tabla 2. Correlación de la carga parasitaria (CP) de *Perkinsus* sp. y los factores biométricos de *M. squalida*, en el estero Bacorehuis, Sinaloa, México.

	Valor de r	Valor de P
CP vs. Altura de la concha	0.705	0.010
CP vs. Largo de la concha	0.718	0.008
CP vs. Ancho de la concha	0.664	0.018
CP vs. Peso total	0.717	0.008

Ambos indicadores de la infección (prevalencia y carga parasitaria) no mostraron estar relacionados con la temperatura ($r = 0.359$, $P = 0.250$ y $r = 0.260$, $P = 0.413$, respectivamente) o con la salinidad ($r = 0.047$, $P = 0.884$ y $r = -0.064$, $P = 0.842$, respectivamente).

DISCUSIÓN

Considerando la fácil capacidad de transmisión del género *Perkinsus* spp. (Villalba *et al.*, 2004) entre sus hospederos conocidos, los reportes de su infección en ostiones (Enríquez-Espinoza *et al.*, 2010; Cáceres-Martínez y Vázquez-Yeomans, 2008) y otros bivalvos (Enríquez-Espinoza *et al.*, 2015; Góngora-Gómez *et al.*, 2016) dentro del Golfo de California, y la presente detección del parásito en la almeja chocolate *M. squalida* en la costa norte de Sinaloa, es posible indicar que el género *Perkinsus* continúa encontrando nuevos moluscos bivalvos, a los cuales, puede potencialmente infectar.

Aunque la técnica de tinción de MFTR no discrimina entre las especies del género *Perkinsus*, es barata, simple (OIE, 2009), más sensible cuando se compara con histología (McLaughlin & Faisal, 1999) y los datos de infección colectados pueden ser contabilizados (Auderman *et al.*, 2008) y categorizados en una escala (Mackin, 1962; Bushek *et al.*, 1994). La detección y observación microscópica de esferas de color oscuro en el tejido blando de la almeja chocolate *M. squalida* del estero Bacorehuis, Sinaloa, analizada con MFTR, confirmó el diagnóstico para la presencia de presuntas hipnosporas de *Perkinsus* sp., con un grado de infección que fluctuó de no infectado a ligero. Aunque la prevalencia de *Perkinsus* sp. en *M. squalida* se registró en casi todos los meses de muestreo de 2013, el grado de infección fue ligero, lo que sugiere que la almeja es poco susceptible a ser infectada por el parásito.

Se ha reportado que cuando el grado de infección provocado por el parásito es considerable, el tejido presenta granulomas blanquecinos (Park y Choi, 2001) o una consistencia acuosa (Ruano *et al.*, 2015), lo cual, no se observó en la revisión visual del tejido de *M. squalida* del estero Bacorehuis, en Sinaloa.

Este trabajo forma parte de un inventario de moluscos en los que se ha detectado el parásito *Perkinsus* sp. en la zona norte-centro de las costas de Sinaloa, México, correspondiente a la parte más al sureste del Golfo de California. Al mismo tiempo, complementa el registro de detección de dicho protozoario en la almeja *M. squalida* encontrado en los principales bancos naturales (estero Bacorehuis, presente estudio, y Bahía Altata, Góngora-Gómez *et al.*, en revisión), además de la población sembrada con fines de repoblación dentro de un corral pesquero en la costa central del estado (Góngora-Gómez *et al.*, aceptado en Hidrobiológica).

Hasta ahora, son tres los grupos de bivalvos, silvestres o cultivados (ostreidos, Villanueva-Fonseca y Escobedo-Bonilla, 2013; pinnidos, Góngora-Gómez *et al.*, 2016; venéridos, el presente trabajo), de las costas sinaloenses en los que se ha detectado la presencia de *Perkinsus* sp. usando la técnica de MFTR (y de confirmación con PCR en los dos primeros), sin concluir para todos ellos, que la ocurrencia del parásito comprometa su estado sanitario. Para verificar el potencial daño en los tejidos de *M. squalida* de este estudio, es necesario realizar análisis complementarios con la técnica histológica.

CONCLUSIONES

Se detectó la presencia de presuntas hipnosporas de *Perkinsus* sp. en una población silvestre de la almeja chocolata mexicana *Megapitaria squalida*, al norte de la costa sinaloense, en México, mediante la técnica de MFTR, con un grado de infección ligera, sugiriendo poca susceptibilidad de la almeja al efecto infeccioso de este protozoario.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran no tener conflictos de interés relacionado con el presente trabajo.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Instituto Politécnico Nacional (IPN) por el apoyo financiero y logístico otorgado al presente trabajo (Proyecto IPNSIP 20140118: Efecto de los factores ambientales sobre el crecimiento y la supervivencia entre organismos diploides y triploides de ostión japonés *C. gigas* cultivados en el estero de Bacorehuis, Ahome, Sinaloa), a través de la Secretaría de Investigación y Estudios de Posgrado (SIP-IPN) y de la Comisión de Operaciones y Fomento de Actividades Académicas (COFAA-IPN).

REFERENCIAS

- Audemard, C., Carnegie, R. B., Burreson, E. M. (2008). Shellfish tissues evaluated for *Perkinsus* spp. Using the Ray's fluid thioglycollate medium culture assay can be used for downstream molecular assays. *Diseases of Aquatic Organisms*, 80:235-239.
- Bhujel, R. C. (2008). Statistics for aquaculture. 1st. Ed., Wiley-Blackwell Publishing, Iowa, USA.
- Bushek, D., Ford, S. E., Allen, S. K. (1994). Evaluation of methods using Ray's fluid thioglycollate medium for diagnosis of *Perkinsus marinus* infection in the eastern oyster, *Crassostrea virginica*. *Annual Review of Fish Diseases*, 4, 201-217.
- Cáceres-Martínez, J., Vázquez-Yeomans, R. (2013). Enfermedades, parásitos y episodios de mortalidad de ostiones de importancia comercial en México y sus implicaciones para la producción. *Ciencia Pesquera*, 21: 5-48.
- Cáceres-Martínez, J., Vázquez-Yeomans, R., Padilla-Lardizábal, G. (2010). Parasites and symbionts of the pleasure oyster *Crassostrea corteziensis* cultured in Nayarit, México. *Journal of Aquatic of Animal Health*, 22: 141-151.
- Cáceres-Martínez, J., García-Ortega, M., Vázquez-Yeomans, R., Pineda-García, T. J., Stokes, N. A., Carnegie, R. B. (2012). Natural and cultured populations of the mangrove oyster *Saccostrea palmula* from Sinaloa, Mexico, infected by *Perkinsus marinus*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 110: 321-325.
- Enríquez-Espinoza, T. L., Grijalva-Chon, J. M., Castro-Longoria, R., Ramos-Paredes, J. (2010). *Perkinsus marinus* in *Crassostrea gigas* in the Gulf of California. *Diseases of Aquatic Organisms*, 89: 269-273.
- Enríquez-Espinoza, T. L., Castro-Longoria, R., Mendoza-Cano, F., Grijalva-Chon, J. M. (2015). *Perkinsus marinus* in *Crassostrea gigas* and *Chione fluctifraga* from Kino Bay, Sonora, Mexico. *Biotecnica*, 27(1): 10-13.
- Góngora-Gómez, A. M., Rubio-Zepeda, F., Villanueva-Fonseca, L. C., Álvarez-Dagnino, E., Muñoz-Sevilla, N. P., Hernández-Sepúlveda, J. A., García-Ulloa, M. (2016). Primer registro de *Perkinsus* sp.

- (Protozoa, Apicomplexa) en el callo de hacha *Atrina maura* en Sinaloa, México. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 51(3): 689-694.
- Mackin, J. G. (1962). Oyster disease caused by *Dermocystidium marinum* and other microorganisms in Louisiana. Institute for Marine Science University of Texas. USA. 7:132-229.
- McLaughlin, S. M., Faisal, M. (1999). A comparison of diagnostic assays for detection of *Perkinsus* spp. in the softshell clam *Mya arenaria*. *Aquaculture*, 172: 197-204.
- Murrell, A., Kleeman, S. N., Barker, S. C., Lester, R. J. G. (2002). Synonymy of *Perkinsus olseni* Lester & Davis 1981 and *Perkinsus atlanticus* Azevedo 1989 and an update on the phylogenetic position of the genus *Perkinsus*. *Bulletin of the European Association of Fish Pathology*, 22: 258-265.
- OIE. (2009). Manual of diagnostic tests for aquatic animals. World Health Organization. Office International des Epizooties, Paris.
- Park, K.-I., Choi, K.-S. (2001). Spatial distribution of the protozoan parasite, *Perkinsus* sp., found in the manila clam, *Ruditapes philippinarum* in Korea. *Aquaculture*, 203: 9-22.
- Pinho Ferreira, L., Costa Sabry, R., da Silva, P. M., Vasconcelos Gesteira, T. C., de Souza Romão, L., Pinheiro Paz, M., Galdino Feijó, R., Pinheiro Dantas Neto, M., Maggioni, R. (2015). First report of *Perkinsus beihaiensis* in wild clams *Anomalocardia brasiliana* (Bivalvia: Veneridae) in Brazil. *Experimental Parasitology*, 150: 67-70.
- Ray, S. M. (1996). Historical perspective of *Perkinsus marinus* disease of oysters in the Gulf of México. *Journal of Shellfish Research*, 15: 9-11.
- Ruano, F., Batista, F. M., Arcangeli, G. (2015). Perkinsosis in the clams *Ruditapes decussatus* and *R. philippinarum* in the Northeastern Atlantic and Mediterranean Sea: A review. *Journal of Invertebrate Pathology*, 131: 58-67.
- Sanil, N. K., Suja, G., Lijo, J., Vijayan, K. K. (2012). First report of *Perkinsus beihaiensis* in *Crassostrea madraensis* from the Indian subcontinent. *Diseases of Aquatic Organisms*, 98: 209-220.
- Villanueva-Fonseca, L. C., Escobedo-Bonilla, C. M. (2013). Prevalencia del protozoario *Perkinsus* sp. en un cultivo de ostión japonés *Crassostrea gigas* en Sinaloa, México. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 4(15): 996-1002.
- Yarnall, H. A., Reece, K. S., Stokes, N. A., Burreson, E. M. (2000). A quantitative- competitive polymerase chain reaction assay for the oyster pathogen *Perkinsus marinus*. *Journal of Parasitology* 86: 827-837.

Recibido: 08-08-2019.
Aprobado: 29-10-2019.
Versión final: 04-11-2019

