

*Short Communication*

## Prevalencia del protozooario *Perkinsus* sp. en un cultivo de ostión japonés *Crassostrea gigas* en Sinaloa, México

Lizeth Carolina Villanueva-Fonseca<sup>1</sup> & César Marcial Escobedo-Bonilla<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Acuacultura Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional (IPN-CIIDIR-SINALOA) Blvd. Juan de Dios Bátiz Paredes 250, Guasave, Sinaloa, México.

**RESUMEN.** *Crassostrea gigas* es un molusco bivalvo de gran importancia comercial. En el noroeste de México su producción es afectada por mortalidades cuyo origen infeccioso no ha sido determinado claramente. En este trabajo se determinó la prevalencia e intensidad de la infección por *Perkinsus* sp. en un cultivo de *C. gigas* en el ciclo 2011-2012. El cultivo se hizo en un sistema de línea suspendida con densidades de 28 y 42 ostiones/canasta y se determinó un tamaño de muestra de 30 ostiones por mes. La detección de *Perkinsus* sp. se hizo de acuerdo a los protocolos de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) para Medio Fluido de Tioglicolato y PCR. Con ambos métodos se determinó la prevalencia de *Perkinsus* sp., que varió entre 3,3 y 40%. La intensidad de la infección estuvo en niveles 1 y 2, de acuerdo a la escala de Mackin. La mortalidad acumulativa en las densidades de 28 y 42 ostiones por canasta fue del 4 y 6%, respectivamente. Las mayores mortalidades del ostión y las mayores prevalencias de *Perkinsus* sp. ocurrieron en septiembre (2,7 y 16,6%) y octubre (1,5 y 23,3%), respectivamente, cuando la temperatura fue alta. En conclusión, *Perkinsus* sp. fue detectado en un cultivo de *C. gigas* en el estero La Pitahaya con prevalencia moderada, baja intensidad de infección y mayor presencia en los meses más calurosos del ciclo de cultivo.

**Palabras clave:** *Crassostrea gigas*, *Perkinsus*, prevalencia, tioglicolato, acuicultura, México.

## Prevalence of the protozoan *Perkinsus* sp. in cultured Pacific oyster *Crassostrea gigas* in Sinaloa, Mexico

**ABSTRACT.** *Crassostrea gigas* is a bivalve mollusk of great commercial importance. In northwest Mexico its production is affected by mortalities whose infectious origin has not been clearly determined. This study determined the prevalence and intensity of infection with *Perkinsus* sp. in a culture of *C. gigas* in 2011-2012. The culture was performed in a long-line system with densities of 28 and 42 oysters/tray. A sample size of 30 oysters per month was determined. Diagnosis of *Perkinsus* sp. was done according to the protocols of the World Organization for Animal Health (OIE) for Fluid Thioglycolate Medium and PCR. Both methods were able to determine the prevalence of *Perkinsus* sp., which ranged between 3.3 and 40%. The infection intensity was low (levels 1-2) according to the Mackin scale. Cumulative mortality in densities between 28 and 42 oysters per tray was 4 and 6% respectively. The highest mortality of oysters and the highest prevalence of *Perkinsus* sp. occurred in September (2.7 and 16.6%) and October (1.5 and 23.3%), respectively, when the temperature was high. In conclusion, *Perkinsus* sp. was detected in a *C. gigas* culture in the Estero La Pitahaya, with moderate prevalence, low infection and increased presence in the warmest months of the culture cycle.

**Keywords:** *Crassostrea gigas*, *Perkinsus*, prevalence, Thioglycolate, aquaculture, Mexico.

---

Corresponding author: César M. Escobedo-Bonilla (cesar\_escobedomx@yahoo.com)

El ostión *Crassostrea gigas* es originario de Japón. Debido a su rápido crecimiento y gran tolerancia a variaciones de salinidad y temperatura, se cultiva en más de 20 países alrededor del mundo (FAO, 2008). En México, *C. gigas* se introdujo en 1973 en la bahía de San Quintín, Baja California. Los primeros cultivos

experimentales en Baja California Sur se efectuaron en 1976, y a partir de 1980, su cultivo se extendió en el noroeste del país (Mazón-Suástegui, 1996). En 1998 ocurrieron episodios de mortalidad en ostiones cultivados en diferentes sitios en el Golfo de California (Luna-González *et al.*, 2008). Hasta ahora, las causas de las

altas mortalidades son desconocidas, pero es posible que factores ambientales (alta temperatura del agua, altas densidades de siembra, presencia de contaminantes y pobre manejo de cultivo) y/o bióticos (estrés asociado a la madurez sexual y reproducción, o la acción de patógenos), sean responsables de tales pérdidas (Gouletquer *et al.*, 1998).

Estudios previos han demostrado la presencia de *P. marinus* en la parte oriental de México desde 1962, infectando a *C. virginica* de 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, pero debido a mortalidades registradas en el noroeste de México surgió la necesidad de determinar el estado sanitario de las especies cultivadas en la región. Desde 2008, la presencia de *Perkinsus* sp. ha sido reportada en los estados de Nayarit, Sonora y Sinaloa en las especies *C. corteziensis*, *C. gigas* y *Saccostrea palmula*, respectivamente (Cáceres-Martínez *et al.*, 2008). El origen de este parásito en la zona es desconocido, pero puede estar asociado a la introducción de *C. virginica* proveniente de la costa este de Estados Unidos o desde el Golfo de México (Enríquez-Espinoza *et al.*, 2010; Cáceres-Martínez *et al.*, 2012). El objetivo del presente trabajo fue determinar la presencia de *Perkinsus* sp. en un cultivo del ostión *C. gigas* en el estero La Pitahaya, Guasave, para determinar la prevalencia mensual e intensidad de la infección durante un ciclo anual de cultivo.

El área de estudio se localizó en el estero La Pitahaya, Guasave, Sinaloa, situado en la costa sureste del Golfo de California entre 25°18' y 25°24'N y 108°32' y 108°45'W (Fig. 1). Se sembraron 6.000 ostrillas de *C. gigas* de tamaño entre 3 y 4 mm provenientes del Centro de Reproducción de Especies Marinas del Estado de Sonora (CREMES). La siembra se realizó en marzo del 2011 y se manejaron dos densidades de cultivo: 28 y 42 ostiones por canasta. El sistema de cultivo fue el de línea suspendida de acuerdo a Ruíz-García (2006) y tuvo una duración de 13 meses.

El mantenimiento del cultivo se hizo quincenalmente. En cada ocasión se limpiaron canastas, se registró la mortalidad de ostiones y se determinó la temperatura y salinidad. En cada muestreo se midió el peso total (g) de 50 animales para determinar la tasa de crecimiento específico (Ziaei-Nejad *et al.*, 2006).

$$SGR = \frac{\ln W_t - \ln W_0}{t} 100 \quad (1)$$

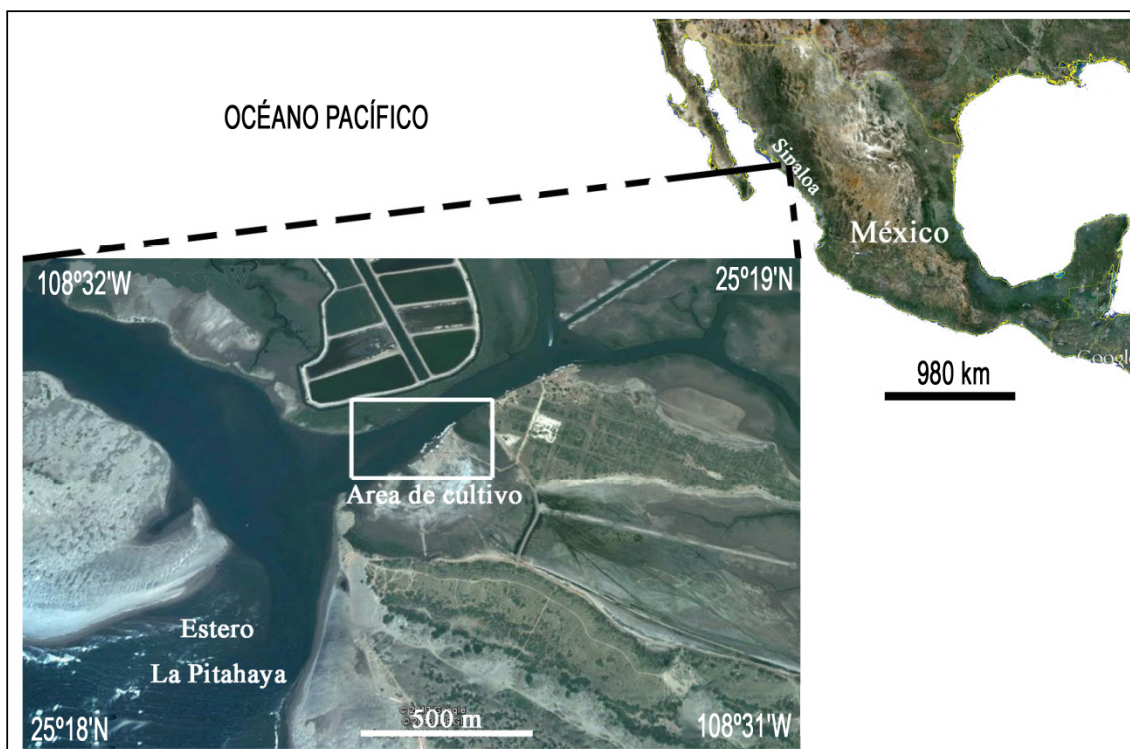
donde: t = periodo de cultivo en días,  $\ln W_0$  = logaritmo natural del peso (g) del ostión al inicio del periodo y  $\ln W_t$  = logaritmo natural del peso (g) del ostión en el día t.

Para evaluar la presencia de *Perkinsus* sp., mensualmente se colectaron 30 ostiones al azar de acuerdo a la tabla de Amos (1985). Este número corresponde a una población de menos de 10.000 individuos para una prevalencia esperada de 10%. En total se colectaron 390 animales durante todo el ciclo para hacer el análisis de *Perkinsus* sp. El cálculo de la prevalencia mensual (Pm) se realizó mediante la fórmula de Thrusfield (1995):

$$Pm = \frac{\text{número de animales infectados}}{\text{total de animales colectados}} 100 \quad (2)$$

Los animales colectados fueron procesados para el análisis de *Perkinsus* sp. de acuerdo a los protocolos definidos por la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE, 2009). La detección de *Perkinsus* sp. se realizó mediante el cultivo en Medio Fluido de Tioglicolato (MFT) utilizando branquias y manto. Los tejidos fueron colocados en tubos Falcon de 15 mL que contenían MFT con antibióticos. Las preparaciones fueron incubadas a temperatura ambiente (28°C), por siete días en la oscuridad. Después de la incubación, los tejidos se maceraron con un bisturí estéril sobre un portaobjetos, se añadieron tres gotas de solución yodada de lugol, se colocó un cubreobjetos y se incubó por 10 min. Después, cada muestra fue analizada en un microscopio compuesto (Leica DM750) a 100x y 400x, respectivamente. Para determinar la intensidad de la infección, en el microscopio se realizó el conteo de hiposporas de *Perkinsus* sp., utilizando la escala relativa de Mackin (Ray, 1954), y se determinó la prevalencia mensual (Thrusfield, 1995).

La técnica MFT fue complementada con técnica de PCR. La extracción de ácidos nucleicos se hizo a partir de tejidos del manto y branquia de los ostiones. El ADN fue extraído con DNAzol® (Molecular Research Center, Inc. Cincinnati OH, USA), siguiendo las indicaciones del fabricante. El análisis de PCR se hizo con los iniciadores PerkITS85 (5'-CCG CTT TGT TTG GAT CCC-3') y PerkITS750 (5'-ACA TCA GGC CTT CTA ATG ATG-3'), que amplifican la región espaciadora transcrita interna (internal transcribed spacer, ITS) del ARN ribosomal de *Perkinsus* sp., obteniendo un producto de 703 pares de bases (pb) (OIE, 2009). La mezcla de reacción para el PCR consistió de amortiguador PCR 1X (10 mM Tris-HCl, pH 8,5, 50 mM KCl), 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM



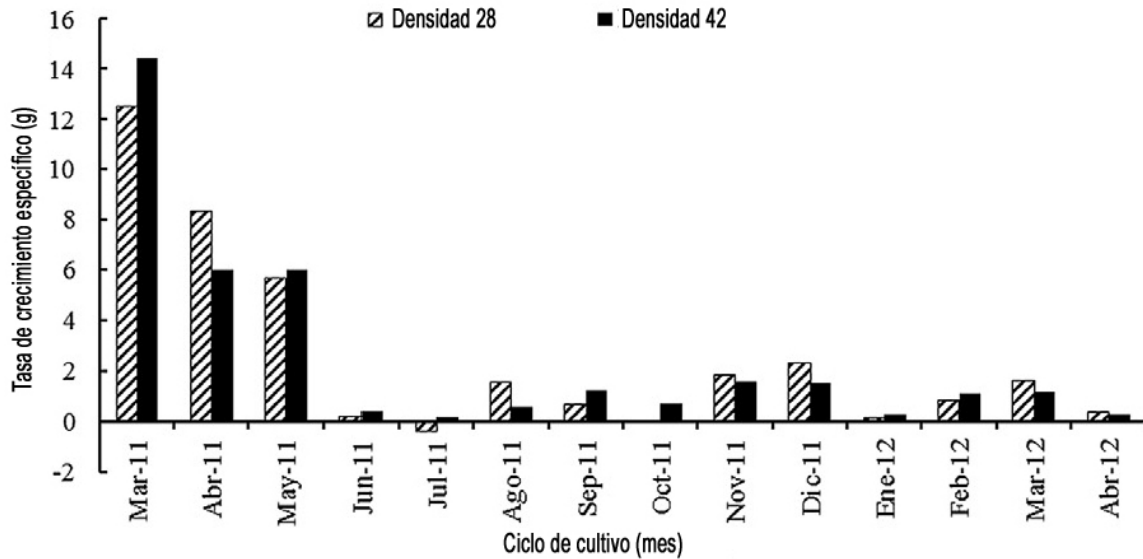
**Figura 1.** Localización geográfica con coordenadas del área de estudio y ubicación del sitio de cultivo de *C. gigas* en el estero La Pitahaya, Guasave, Sinaloa, México.

dNTP's, 0,01 mM de cada iniciador y 1,5 U de *Taq* ADN polimerasa (Bioline, Boston MA, USA). Para la reacción se utilizó 1  $\mu$ L (100 ng) de ADN. Estos iniciadores detectan cualquier especie conocida del género *Perkinsus* sp. excepto *P. qugwadi* (OIE, 2009). El volumen de cada reacción de PCR fue de 25  $\mu$ L. 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 la mezcla de reacción de la PCR sustituyendo el ADN por agua estéril. Las condiciones de amplificación fueron: 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; extensión final de 72°C por 5 min. Los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa al 1%. Se aplicó una carga de 90 volts por 45 min y el gel fue teñido con una solución de bromuro de etidio (1  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>).

La desviación estándar de la prevalencia mensual de *Perkinsus* sp., fue determinada con el método de distribución binomial (Zar, 1998).

El cultivo se realizó durante 13 meses en los cuales los animales tuvieron una tasa de crecimiento

específica promedio de  $2,52 \pm 1,00$  g para la densidad de 28 ostiones y  $2,54 \pm 1,05$  g para la densidad de 42 ostiones por canasta, respectivamente. La temperatura del agua tuvo mayor influencia en el crecimiento del ostión, ya que de junio a octubre fueron los meses más calurosos del año (temperatura del agua entre 29 y 32°C), donde se observaron las menores tasas de crecimiento (Fig. 2) y la mayor mortalidad. Igualmente, en enero de 2012 la tasa de crecimiento específica fue baja debido que la temperatura del agua fue de 17°C. Estos datos indican que temperaturas mayores a 27°C y menores a 22°C influyen negativamente en su crecimiento. A los 13 meses de cultivo, alcanzaron un peso máximo de  $204,07 \pm 18,97$  g y  $207,09 \pm 15,29$  g para las densidades de 28 y 42 animales por canasta, respectivamente. Al final del cultivo, la supervivencia fue 95,9 y 94,3% para las densidades de 28 y 42 ostiones por canasta, respectivamente. La tasa de crecimiento específico registró los valores más bajos entre junio y octubre de 2011 y en enero y abril de 2012, en animales cultivados a densidades de 28 y 42 por canasta, respectivamente. Incluso se registraron dos valores de crecimiento negativo a la densidad de 28 en julio y octubre, que se explicarían por cambios fisiológicos. En esos meses el ostión madura



**Figura 2.** Tasa de crecimiento específico mensual del peso total (g) en *C. gigas* cultivado a densidades de 28 y 42 organismos/canasta durante el ciclo de cultivo.

sexualmente y desova reduciendo la gónada, por lo que el peso de los animales disminuye considerablemente.

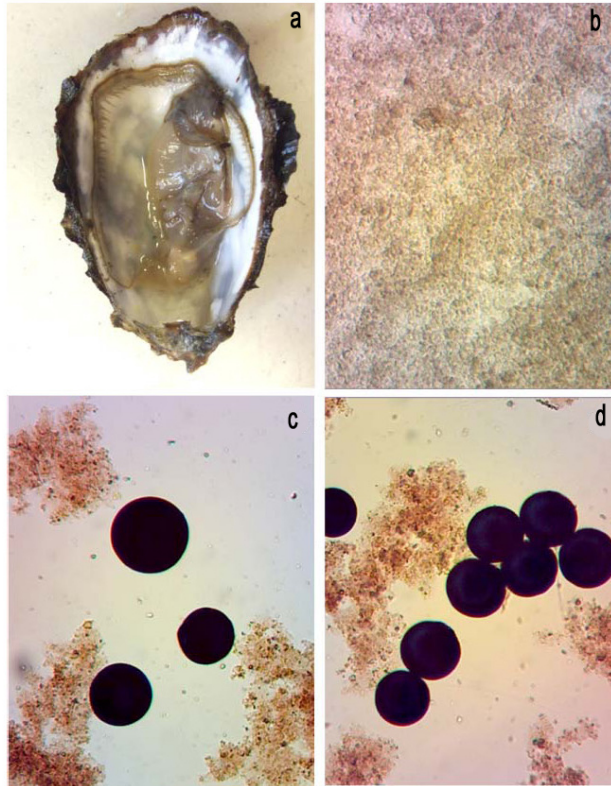
La detección de *Perkinsus* sp., con la técnica de MFT indicó la presencia de células esféricas de color oscuro, indicativo de un estadio vegetativo de dicho protozooario en los ostiones cultivados. La intensidad de la infección siempre estuvo entre los niveles 1 y 2, de acuerdo al número de hiposporas en el tejido (escala de Mackin) (Fig. 3). Además, el análisis de PCR indicó una banda de tamaño aproximado a 703 pb (Fig. 4) en animales infectados con *Perkinsus* sp.

Los primeros animales infectados fueron detectados dos meses después de la siembra, usando la técnica del MFT. La prevalencia de *Perkinsus* sp. con MFT varió entre 16,6 y 23,3% en los meses más cálidos del año (agosto a octubre). En los meses fríos (diciembre, a febrero) ésta disminuyó a valores de 20, 13,3 y 10%, respectivamente. La infección aumentó y registró el valor más alto al final del cultivo, en marzo y abril del siguiente año, con una prevalencia entre 26,6 y 40%, respectivamente. En contraste, el análisis de PCR detectó los primeros ostiones positivos después de cinco meses de iniciado el cultivo y la prevalencia mensual siempre fue menor en comparación con la obtenida por MFT. No obstante, ambos análisis registraron el mismo patrón de prevalencia. Por PCR se obtuvieron las mayores prevalencias del año 2011 de octubre a diciembre (10, 6,6 y 13,3%, respectivamente), disminuyendo en enero y febrero de 2012 (6,6 y 0%, respectivamente), volviendo a aumentar a fines del cultivo (marzo y abril

de 2012), con una prevalencia de 16,6 y 26,6 %, respectivamente (Fig. 5). Durante el ciclo de cultivo, la prevalencia promedio de *Perkinsus* sp., por el método MFT, fue de  $14,76 \pm 2,85\%$  y por el método de PCR fue de  $6,67 \pm 2,10\%$ , respectivamente.

El protozooario *Perkinsus* sp. se encontró en el cultivo de *Crassostrea gigas* en el estero La Pitahaya en Guasave, Sinaloa. A pesar que éste no es el primer reporte del patógeno en Sinaloa, el presente estudio amplía el área de registro del patógeno en este estado. Un reporte muy reciente demostró la presencia de este patógeno tanto en poblaciones naturales como cultivadas de los bivalvos *Saccostrea palmula* y *C. corteziensis* en cuatro zonas costeras de Sinaloa que incluye: Cospita, la Reforma, Topolobampo y el área de la Bocanita (Cáceres-Martínez *et al.*, 2012). Esta última está muy cercana al área de estudio del presente trabajo.

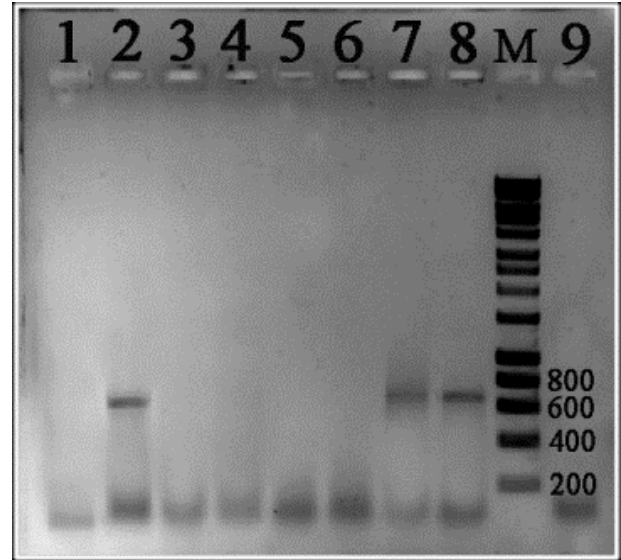
El método de análisis utilizado en el presente estudio influyó en el valor de prevalencia de *Perkinsus* sp. La prevalencia obtenida con MFT siempre fue mayor que la obtenida por PCR. Por MFT la prevalencia varió entre 6,7 y 40%, mientras que por PCR varió entre 3,3 y 26,6%. A pesar que el PCR es un método altamente sensible no se obtuvo una mayor prevalencia del patógeno ni fue posible detectarlo antes que por MFT. La razón de estas diferencias probablemente radica en la cantidad de tejidos usados en cada técnica cuando hay baja intensidad de infección del patógeno. Para MFT se usó mayor cantidad de tejidos (1-3 g) que se someten a cultivo. En cambio, para PCR se usó una pequeña



**Figura 3.** Detección de *Perkinsus* sp. mediante la prueba de Medio Fluido de Tioglicolato (MFT). a) Ostión con signos de enfermedad, b) tejido de manto libre de hipnosporas de *Perkinsus* sp. observado a 150x, c) y d) tejidos de manto con hipnosporas de *Perkinsus* sp. observadas a 150x mostrando un grado de infección 2 de acuerdo a la escala de Mackin (Ray, 1954).

muestra (50 mg) de tejido para extraer ADN total. Estos resultados implican que en *C. gigas* fue menos probable encontrar ácidos nucleicos de *Perkinsus* sp. por PCR que incubando una mayor cantidad de tejidos con MFT, donde se obtuvo una mayor proporción de muestras positivas.

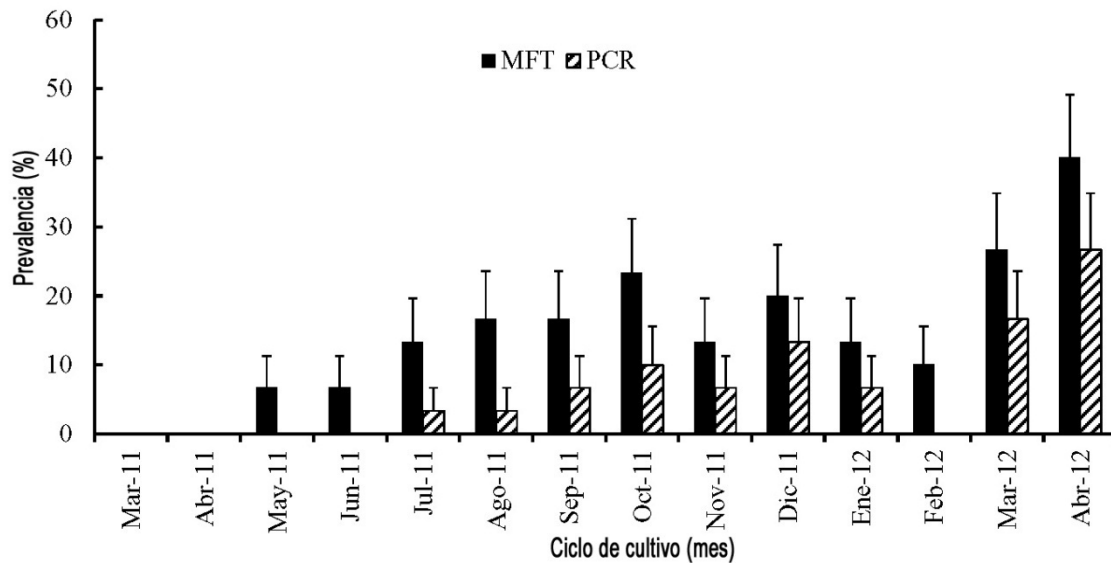
Estos resultados son similares a los reportados por Navas-Triano *et al.* (2008) quienes determinaron la sensibilidad y especificidad de tres métodos de diagnóstico (histología, MFT y PCR), para la detección de infecciones por *Perkinsus olseni* en *Ruditapes decussatus*. Los valores de sensibilidad encontrados para histología fueron 0,20-0,23; para MFT 0,93-0,95, y para PCR 0,86. Los valores de especificidad fueron 0,99; 0,89-0,95 y 0,92, respectivamente. Estos resultados indicaron que MFT fue más sensible que PCR, debido a que para este último se usan pequeñas cantidades de tejidos ( $\approx$ 20 mg). Además, calcularon el coeficiente Kappa



**Figura 4.** Detección de *Perkinsus* sp. por PCR con el uso de oligonucleótidos para la región ITS en *C. gigas* cultivado en el estero La Pitahaya, Guasave, Sinaloa. Carriles 1, 3, 4, 5 y 6 muestras negativas de *Perkinsus* sp.; carriles 2 y 7 muestras positivas de *Perkinsus* sp.; carril 8 Control positivo de *Perkinsus* sp; M: Marcador de peso molecular, y 9: Control negativo.

de Cohen para determinar la concordancia de resultados entre las tres técnicas. Este coeficiente tiene un intervalo entre 0 y 1; donde 0 no hay concordancia y cuando es 1 la concordancia es total. Para el MFT e histología, el coeficiente tuvo un valor de 0,23; mientras que entre MFT y PCR el valor fue de 0,49. Los autores concluyeron que estos valores fueron bajos debido a que la prevalencia del patógeno en las muestras fue baja. Es posible que los resultados obtenidos en nuestro estudio tuvieran un comportamiento semejante al reporte anterior debido a que la intensidad de la infección de *Perkinsus* sp. en *C. gigas* también fue baja.

La prevalencia de *Perkinsus* sp. encontrada en el cultivo de *C. gigas* fue mayor a lo reportado por Cáceres-Martínez *et al.* (2012), que evaluaron infecciones de *P. marinus* en *Saccostrea palmula* colectados de octubre a noviembre de 2010, en cuatro zonas del estado de Sinaloa: Topolobampo, La Bocanita, La Reforma y Cospita registrando una prevalencia de infección de 13,3%, 6,7%, 13,3% y 20%, respectivamente. En el presente trabajo, la prevalencia de *Perkinsus* por MFT varió entre 6,6 y 40%, la cual fue mayor a la reportada en La Bocanita, que es una zona muy cercana al sitio de cultivo de este trabajo.



**Figura 5.** Prevalencia (con desviación estándar) de la infección por *Perkinsus* sp. durante los trece meses de cultivo de *C. gigas* usando las técnicas de MFT y PCR.

La diferencia en las mayores prevalencias, entre los dos sitios de estudio, se puede deber a dos factores: la especie estudiada y la intensidad de muestreo. En la Bocanita la especie analizada fue *Saccostrea palmula* mientras que en La Pitahaya fue *C. gigas*. Ambas especies parecen ser poco susceptibles a la infección por *Perkinsus* sp., comparado con los valores de intensidad y prevalencia en otras especies como *C. virginica* y *C. corteziensis* (OIE, 2009; Navarro-Barrera, 2011). La susceptibilidad de cada especie a *Perkinsus* sp., no ha sido evaluada pero este factor podría explicar las diferencias de prevalencia encontradas. En cuanto a la intensidad del muestreo, el realizado en la Bocanita fue puntual, es decir, sólo se hizo un muestreo en una época del año, en un punto del estero y se tomó una muestra con un número limitado ( $n = 15$ ) de animales. En contraste, el muestreo en el presente trabajo se hizo durante un ciclo de cultivo, realizando muestreos mensuales de un mayor número de animales ( $n = 30$ ), que dan mayor información sobre el desarrollo y comportamiento de la enfermedad. Este factor puede explicar por qué se registraron mayores prevalencias conforme aumentaba el tiempo de cultivo en este trabajo.

La intensidad de infección encontrada en el cultivo indica que *C. gigas* es menos susceptible a la perkinsiosis y tiene mayor tolerancia a variaciones del ambiente. La infección por *Perkinsus* sp. debe inducir diferentes respuestas defensivas de acuerdo a la especie hospedera. Es posible que *C. gigas* sea menos susceptible a la infección de *Perkinsus* sp. que *C. virginica*. La menor susceptibilidad de *C. gigas* a *Perkinsus* sp. ha sido atribuida a una respuesta más

eficiente del sistema de defensa, como la mayor concentración de hemocitos circulantes, alto porcentaje de granulocitos y hemaglutininas humorales, lo que no sucede en otras especies como *C. virginica* (Chu & LaPeyre, 1996).

En conclusión, el protozoo patógeno *Perkinsus* sp. se encontró en un cultivo de *C. gigas* en el estero La Pitahaya, con una prevalencia que varió de 6,6 a 40% y una intensidad de infección grado 2. Esto indica que *Perkinsus* sp. está presente en este sistema lagunar y que bajo estas condiciones de cultivo la especie *C. gigas* es poco susceptible a este patógeno.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Dra. Nancy Stokes del Virginia Institute of Marine Science, College of William and Mary, Gloucester Point, Virginia, por la amable donación de controles positivos de *Perkinsus* para la realización de este trabajo. LCVF recibió una beca CONACyT (367886). Este trabajo fue apoyado con recursos de los proyectos SIP 20110016 y SIP20121103.

## REFERENCIAS

- Aguirre-Macedo, M.L., R.A. Sima-Álvarez, M.K. Román-Magaña & J.I. Güemez-Ricalde. 2007. Parasite survey of the eastern oyster *Crassostrea virginica* in coastal lagoons of the southern Gulf of México. *J. Aquat. Anim. Health*, 19: 270-279.

- Amos, K.H. 1985. Procedures for the detection and identification of certain fish pathogens. Fish Health Section, American of Fisheries Society, Corvallis, 114 pp.
- Cáceres-Martínez, J., R. Vásquez-Yeomans, G. Padilla-Lardizábal & M.A. Del Río Portilla. 2008. *Perkinsus marinus* in pleasure oyster *Crassostrea corteziensis* from Nayarit, Pacific coast of México. J. Invertebr. Pathol., 99: 66-73.
- Cáceres-Martínez, J., M. García-Ortega, R. Vásquez-Yeomans, T. Pineda-García, N.A. Stokes & R.B. Carnegie. 2012. Natural and cultured populations of the mangrove oyster *Saccostrea palmula* from Sinaloa, Mexico, infected by *Perkinsus marinus*. J. Invertebr. Pathol., 110: 321-325.
- Chu, F.E. & J.F. LaPeyre. 1996. Effect of salinity in *Perkinsus marinus* susceptibility and defense-related activities in eastern oysters, *Crassostrea virginica*. J. Shellfish. Res., 10: 294.
- Enríquez-Espinoza, T.L., J.M. Grijalva-Chon, R. Castro-Longoria & J. Ramos-Paredes. 2010. *Perkinsus marinus* in *Crassostrea gigas* in the Gulf of California. Dis. Aquat. Organ., 89: 269-273.
- Food and Agriculture Organization (FAO). 2008. Cultured Aquatic Species Information Programme *Crassostrea gigas*. FAO Fisheries and Aquaculture Department (on line) [http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Crassostrea\\_gigas/en](http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Crassostrea_gigas/en)
- Gouletquer, P., P. Soletchnik, O. Le Moine, D. Razet, P. Geairon, N. Faury & S. Taillade. 1998. Summer mortality of the Pacific cupped oyster *Crassostrea gigas* in the bay of Marennes-Oléron France. Cons. Int. Explor. Mer, CM 1998/VV14: 20 pp.
- Luna-González, A., M.J. Romero-Gerardo, A. Campa-Cordova, J. Orduña-Rojas, R. Valles-Jiménez & C.A. Ruiz-Verdugo. 2008. Seasonal variations in the immunological and physiological parameters of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* cultured in Bahía de Macapule, Sinaloa, Mexico. Aquat. Res., 39: 1488-1497.
- Mazón-Suástegui, J.M. 1996. Cultivo de ostión japonés *Crassostrea gigas*. In: M. Casas-Valdez & G. Ponce-Díaz (eds.). Estudio del potencial pesquero y acuícola de Baja California Sur. CIBNOR, La Paz, B.C.S., 2: 625-650.
- Navarro-Barrera, A.A. 2011. Distribución, prevalencia e intensidad de *Perkinsus marinus*, parásito del ostión de placer *Crassostrea corteziensis*, en el estado de Nayarit, México. Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Ensenada, Baja California, 66 pp.
- Navas-Triano, J.I., R. De la Herran-Moreno, M. Quintero, I.M. García-Pardo, Ruíz-Rejón M. & J.C. Manzano-Harriero. 2008. Evaluation of the sensitivity and specificity by latent class analysis of Ray's method, histological assay, and PCR diagnosis of *Perkinsus olseni* in *Ruditapes decussates*. Workshop for the analysis of the impact of Perkinsiosis to the European shellfish industry. Comision Europea, Vigo, 36 pp.
- World Organisation of Animal Health (OIE). 2009. Manual of diagnostic tests for aquatic animals. World Organisation of Animal Health, Paris, 383 pp.
- Ray, S.M. 1954. Biological studies of *Dermocystidium marinum*, a fungous parasite of oysters. Ph.D. Doctoral Thesis, Rice Institute, Houston, 119 pp.
- Ruiz-García, M.C. 2006. Efecto de la densidad y fecha de siembra en el crecimiento de ostión de placer *Crassostrea corteziensis* en Bahía Agiabampo, Sonora. Tesis Licenciatura en Biología, Centro de Estudios Superiores del Estado de Sonora, Sonora, 74 pp.
- Thrusfield, M. 1995. Veterinary epidemiology. Blackwell Publishing, Ames Iowa, 593 pp.
- Zar, J.H. 1998. Biostatistical analysis. Prentice Hall International, New Jersey, 660 pp.
- Ziaei-Nejad, S., M.H. Rezaei, G.A. Takami, D.L. Lovett, A.R. Mirvaghefi & M. Shakouri. 2006. The effect of *Bacillus* spp. bacteria used as probiotics on digestive enzyme activity, survival and growth in the Indian white shrimp *Fenneropenaeus indicus*. Aquaculture, 252: 516-524.

Received: 17 December 2012; Accepted: 27 August 2013