


Original

Reporte de presuntas hipnosporas de *Perkinsus* sp., en *Megapitaria squalida* del Golfo de California con la técnica de tinción con tioglicolato

Andrés Góngora-Gómez¹  Ph.D.; Lizeth Villanueva-Fonseca¹  M.Sc.; Pedro Sandoval-Rivera²  M.Sc.; Juan Hernández-Sepúlveda¹  Lic; Ana L. Domínguez-Orozco¹  Ph.D.; Brenda Villanueva-Fonseca³  Ph.D.; Manuel García-Ulloa^{1*}  Ph.D.

¹Instituto Politécnico Nacional, Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, Unidad Sinaloa, Guasave, Sinaloa, México.

²Departamento de Ecología, Gobierno Municipal de Guasave, Sinaloa, México.

³Universidad Autónoma de Occidente, Unidad Guasave, Guasave, Sinaloa, México.

*Corresponding: turbotuag@hotmail.com

Recibido: Agosto 2019; Aceptado: Enero 2020; Publicado: Mayo 2020.

ABSTRACT

Objective. To detect the presence of presumptive hypnospores of the protozoan *Perkinsus* sp. in a wild population of the Mexican chocolata clam *Megapitaria squalida* in the southeastern Gulf of California, using Ray's fluid thioglycollate medium (RFTM). **Material and methods.** Thirty specimens with size between 56.17 and 69.04 mm were captured each month, during an annual cycle. Infection prevalence and intensity and water parameters were recorded monthly from September 2012 to September 2013. **Results.** *Perkinsus* sp. was detected in tissue samples from the Mexican chocolate clam using the RFTM test by the presence of dark round corpuscles that represent parasite's hypnospores. Monthly samplings revealed a prevalence of 0-43.33% and an infection intensity ranging from 1 to 4 (no infection = 0 hypnospores/entire preparation, to moderate = 34 hypnospores/entire preparation). **Conclusions.** *Perkinsus* sp. is reported for the first time in a wild population of *M. squalida* in the southernmost Gulf of California. The results indicate that this protozoan is dispersed intraspecifically and would now, potentially, parasiting a new host in the region.

Keywords. Parasitology, bivalves, protozoa, prevalence, Sinaloa, Mexico (*Source: MeSH*).

RESUMEN

Objetivo. Detectar la presencia de presuntas hipnosporas del protozoario *Perkinsus* sp. en una población silvestre de la almeja chocolata mexicana (*Megapitaria squalida*) del sureste del Golfo de California, usando el medio fluido de tioglicolato de Ray (RFTM). **Materiales y métodos.** Cada mes durante un ciclo anual, se capturaron 30 especímenes con una longitud entre 56.17 y 69.04 mm. La prevalencia e intensidad de la infección y los parámetros del agua se registraron mensualmente desde septiembre 2012 a septiembre 2013. **Resultados.** Se detectó la presencia de presuntas hipnosporas de *Perkinsus* sp. en muestras de tejido de la almeja chocolata mexicana usando la prueba RFTM, por la presencia de corpúsculos redondos y oscuros que representan hipnosporas del parásito. Los muestreos mensuales revelaron un rango de prevalencia e intensidad de la infección

Como citar (Vancouver).

Góngora-Gómez AM, Villanueva-Fonseca LC, Sandoval-Rivera P, Hernández-Sepúlveda JA, Domínguez-Orozco AL, Villanueva-Fonseca BP, García-Ulloa M. Reporte de presuntas hipnosporas de *Perkinsus* sp. en *Megapitaria squalida* del Golfo de California con la técnica de tinción con tioglicolato. Rev MVZ Córdoba. 2020; 25(2):e1805. <https://doi.org/10.21897/rmvz.1805>



©El (los) autor (es), Revista MVZ Córdoba 2020. Este artículo se distribuye bajo los términos de la licencia internacional Creative Commons Attribution 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>), que permite a otros distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir de su obra de modo no comercial, siempre y cuando den crédito y licencien sus nuevas creaciones bajo las mismas condiciones.

de 0-43.33% y 1-4 (infección negativa = 0 hipnosporas/preparación, a moderada = 34 hipnosporas/preparación), respectivamente. **Conclusiones.** *Perkinsus* sp. es reportado por primera vez en una población silvestre de *M. squalida* en la parte más al sureste del Golfo de California. Los resultados indican que el parásito está disperso intraespecíficamente y, potencialmente, parasitaría un nuevo huésped en la región.

Palabras clave. Parasitología, bivalvos, protozooario, prevalencia, Sinaloa, México (*Fuente: MeSH*).

INTRODUCCIÓN

Varios organismos similares a *Perkinsus* están involucrados en la infección y mortalidad de moluscos bivalvos silvestres y cultivados causando la enfermedad conocida como dermo o perkinsosis, la cual, ha sido reportada en diferentes países y en diferentes especies. En ostreidos, por ejemplo, se identificó a *Perkinsus beihaiensis* en los tejidos de la ostra ahuecada del Pacífico *Crassostrea rhizophorae* y de la ostra brasileña *Crassostrea brasiliana*, con alta prevalencia del parásito (1). También en América del Sur, se registró la infección de *Perkinsus marinus* y *Perkinsus olseni* en *Crassostrea gasar* (*C. brasiliana*) mediante análisis molecular (2,3).

Pagenkopp-Lohan et al (4) investigaron la distribución de parásitos tropicales en Panamá encontrando a *P. marinus* infectando a *C. rhizophorae* y *Crassostrea virginica* en el Océano Atlántico, y a *Crassostrea columbiensis* en la costa del Pacífico. La presencia de organismos similares a *Perkinsus* en varios moluscos de la Gran Barrera de Coral se registró en Australia (5), mientras que *Perkinsus mediterraneus* se detectó parasitando la ostra plana europea (*Ostrea edulis*) (6). Durante poco más de dos décadas, las poblaciones silvestres y cultivadas de la ostra del este (*Crassostrea virginica*) en el sureste de los Estados Unidos de Norteamérica (7) y en el Golfo de México y el Mar Caribe, en México (8), se han visto afectadas resultando en mortalidades vinculadas con la presencia de *P. marinus*. Mientras que, en el Océano Pacífico y el Golfo de California, *P. marinus* se ha asociado con pérdidas en la producción de la ostra japonesa (*Crassostrea gigas*) en granjas comerciales (9).

Los protistas del género *Perkinsus* son parásitos intracelulares que infectan a los hemocitos de moluscos bivalvos; su vida libre es característica por la presencia de zoosporas biflageladas, mientras que, en su forma vegetativa, los trofozoitos se multiplican intra o extracelularmente

dentro del huésped. Cuando los trofozoitos maduran, se dividen rápidamente para formar una hipnospóra que posteriormente libera zoosporas biflageladas (10). Por lo tanto, su ciclo de vida les permite dispersarse fácilmente en el agua. Debido a su capacidad de transmisión y dispersión entre moluscos de diferentes grupos taxonómicos (11), varias especies de *Perkinsus* spp. también se han encontrado en almejas (12). Por ejemplo, *Perkinsus quwadi* se relacionó con la mortalidad en la almeja japonesa *Patinopecten yessoensis* cultivada en Canadá (13) y *Perkinsus honshuensis* se descubrió en muestras de tejido de la almeja Manila (*Ruditapes philippinarum*) (14).

Por otro lado, se reportó la presencia de *Perkinsus chesapeaki* en las almejas de concha delgada *Mya arenaria* y *Tagelus plebeius* de la Bahía de Chesapeake en el Atlántico medio de Estados Unidos de Norteamérica (15), y la información de perkinsosis en las almejas venosa verrugosa (*Venus verrucosa*), vieira abigarrada (*Chamys varia*) y berberecho común (*Cerastoderma edule*) fue actualizada para nuevos sitios de la costa noroeste del Mediterráneo (16). En la costa de Sonora, México, se identificó a *Perkinsus* sp. en la almeja venus lisa (*Chione fluctifraga*) utilizando la técnica de tinción basada en medio de tioglicolato (17). Pero hasta ahora, no hay informes sobre la presencia de este parásito en almejas de la costa de Sinaloa, que incluyen a la almeja chocolata mexicana (*Megapitaria squalida*). Detectar la presencia de presuntas hipnosporas de *Perkinsus* sp. en el tejido de *M. squalida* en una población silvestre del sureste del Golfo de California, utilizando el medio fluido de tioglicolato de Ray (RFTM), representa el objetivo de este estudio.

MATERIALES Y MÉTODOS

Sitio de colecta. Las almejas se recolectaron en Bahía de Altata (24° 20'-24 ° 40 'N y 107 ° 30'-108 ° 00' O), en la línea costera central de Sinaloa, México, desde septiembre de 2012 hasta

septiembre de 2013 (Figura 1). Se capturaron 30 especímenes (63.04 ± 6.8 mm) por buceo libre cada mes, los cuales, fueron transportados al laboratorio en un tanque de 30 L conteniendo agua de mar. En cada muestreo, se registraron la temperatura del agua ($^{\circ}\text{C}$) y la salinidad (%).

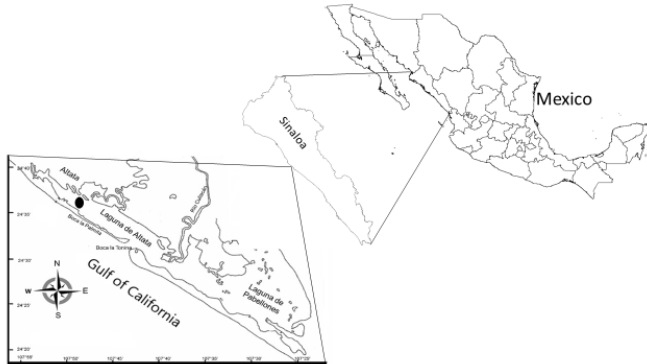


Figura 1. Mapa de México indicando el estado de Sinaloa y el sitio de muestreo (•) en Bahía de Altata.

Los estudiantes del Laboratorio de Malacología del Instituto Politécnico Nacional-Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo, Integral Regional (IPN-CIIDIR), Unidad Sinaloa, colectaron y transportaron las almejas siguiendo los procedimientos estándares (NOM-031-SSA1-1993, Bienes y Servicios. Productos de la pesca. Moluscos bivalvos frescos-refrigerados y congelados). Esta investigación fue aprobada por el Comité de Ética (Colegio de Maestros) del IPN-CIIDIR.

Procesamiento de las almejas. Se obtuvieron las branquias, el manto y la glándula digestiva de cada almeja para incubarse en RFTM (25°C y siete días en condiciones de oscuridad), de acuerdo con las especificaciones estándar (18). Posteriormente, se maceraron, se tiñeron con solución de Lugol y se dejaron descansar durante 10 minutos antes de ser observados bajo el microscopio (10X y 40X) para detectar hipnosporas de *Perkinsus* sp.

Análisis de la infección. Cada mes, se calculó la prevalencia (% de almejas que presentaron presuntas hipnosporas). También mensualmente, la intensidad de la infección (número de presuntas hipnosporas observadas/preparación completa) se calculó para muestras que fueron positivas para la presencia del parásito con RFTM, y se clasificó en función de

los cinco niveles de la escala de Mackin (19): 1=negativo (0 hipnosporas), 2=muy ligero (1 a 10 hipnosporas/preparación completa), 3=ligero (11 a 30 hipnosporas/preparación completa), 4=moderado (31 a 100 hipnosporas/preparación completa), y 5=pesado (>101 hipnosporas/preparación completa).

Estadísticos. Se aplicaron los análisis estadísticos apropiados después de examinar la normalidad de los datos (Lilliefors). Cada mes, se realizaron ANOVA y prueba de Tukey a la intensidad de la infección. Las correlaciones entre la prevalencia e intensidad de la infección con la temperatura y salinidad del agua también se evaluaron mensualmente. Todas las pruebas estadísticas se analizaron con el software Statgraphic Plus 5.0; el nivel de significancia se estableció en 95%.

RESULTADOS

Se detectó a *Perkinsus* sp. en muestras de tejido de la almeja chocolate mexicana usando la prueba RFTM, lo cual, se basó en la presencia de presuntas hipnosporas (Figura 2). Según el Manual de Diagnóstico para Animales Acuáticos (18), estos corpúsculos redondos y oscuros representan etapas vegetativas del protozoo.

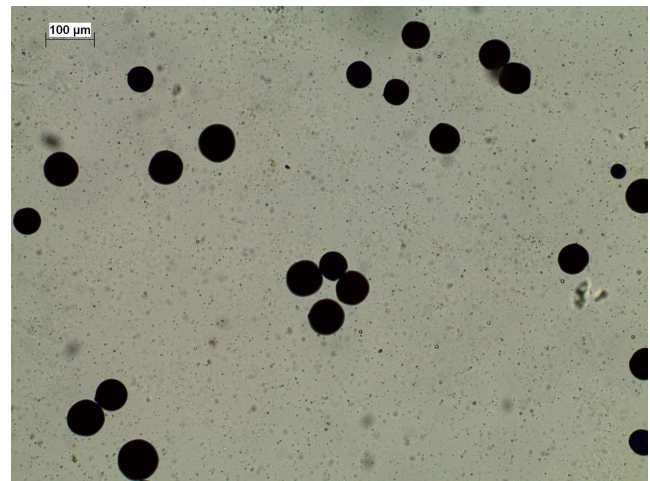


Figura 2. Detección de presuntas hipnosporas de *Perkinsus* sp. en tejido de *Megapitaria squalida* por medio de la técnica de tinción de MFTR (40X). Intensidad de infección en nivel 2 (escala de Mackin). Escala de la barra = 100 μm .

La temperatura del agua en el sitio de muestreo fluctuó de 16.9°C (enero de 2013) a 37°C (julio

de 2013), mientras que la salinidad varió de 29‰ en octubre de 2012 a 40‰ en abril de 2013. La prevalencia mensual de presuntas hiposporas en *M. squalida* mostró diferencias significativas ($F=2.78$, $p=0.004$) y fluctuó de 0% en noviembre de 2012 a 43.3% en marzo y junio de 2013 (Figura 3), cuando la temperatura del agua aumentó sin alcanzar el gradiente máximo.

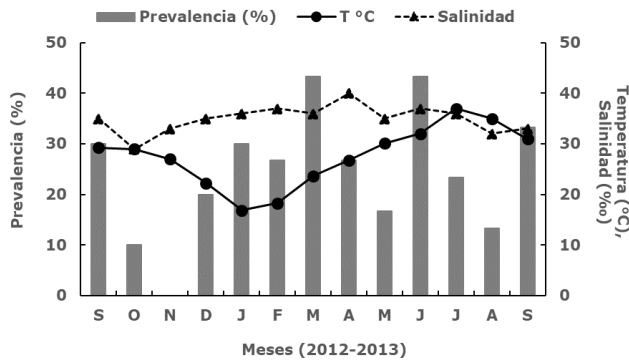


Figura 3. Prevalencia (%) de presuntas hiposporas de *Perkinsus* sp. in *Megapitaria squalida* detectadas con MFTR, y temperatura (°C) y salinidad (‰) en Bahía de Altata (Sinaloa, México), de septiembre 2012 a septiembre 2013.

La intensidad de la infección varió de 1 a 3 (escala de Mackin) (19), ya que el número de presuntas hiposporas observadas por preparación completa varió de 0 (noviembre de 2012) a 34 (febrero de 2013) (Tabla 1).

Las correlaciones entre los parámetros estudiados y los índices de infección se muestran en la tabla 2. Solo la salinidad se correlacionó con la prevalencia ($r=0.56$, $p=0.04$).

Tabla 2. Correlaciones (r) de la prevalencia e intensidad de la infección de *Perkinsus* sp. con la temperatura y salinidad del agua de Bahía de Altata, Sinaloa, México.

Prevalencia vs. Temperatura	Prevalencia vs. Salinidad	Intensidad de infección vs. Temperatura	Intensidad de infección vs. Salinidad
$r=0.14$	$r=0.56$	$r=0.34$	$r=0.22$
$p=0.64$	$p=0.04^*$	$p=0.24$	$p=0.45$

*Correlación positiva ($p<0.05$).

DISCUSIÓN

Entre todos los factores ambientales, la temperatura y la salinidad son reconocidos como los que tienen una influencia más importante en la expresión infecciosa de *Perkinsus* spp. en diferentes especies de moluscos. Junto con la densidad y el tipo de sustrato, los factores ambientales antes mencionados determinaron la prevalencia e intensidad de la infección causada por *P. olseni* en *Ruditapes philippinarum* de 24 localidades en Corea (20). Se documentaron observaciones similares para la almeja de concha acanalada (*Ruditapes decussatus*) y la almeja japonesa (*Ruditapes philippinarum*) en el Atlántico nororiental y el Mediterráneo (21). Aunque algunas temperaturas registradas en el presente estudio se encontraron dentro del rango óptimo para la esporulación del protozoo (24 a 28°C) (22), la prevalencia y la intensidad de la infección no se correlacionaron con este parámetro. Por otro lado, la prevalencia más alta (43.33%) ocurrió cuando la salinidad excedió 35‰ (es decir, entre marzo y julio).

Tabla 1. Intensidad de la infección mensual (número de presuntas hiposporas observadas/preparación completa) de *Perkinsus* sp. en *Megapitaria squalida* de Bahía de Altata, Sinaloa, México.

	Sep 2012	Oct	Nov	Dic	Ene	Feb	Mar	Abr	May	Jun	Jul	Ago	Sep 2013
M	4.9 ^{abc}	2.7 ^{abc}	ND	3.0 ^{abc}	11.5 ^d	7.0 ^{cd}	5.5 ^{bc}	6.5 ^c	4.4 ^{abc}	5.5 ^{bc}	1.2 ^{ab}	1.5 ^{abc}	1.3 ^a
SD	3.4	1.1	ND	1.6	8.7	1.1	3.8	3.3	1.7	4.0	0.7	1.0	0.4
MML	2-10	2-4	ND	2-6	2-24	2-34	1-14	2-12	2-8	2-12	1-3	1-3	1-2
N	9	3	0	6	9	8	13	8	5	13	7	4	10

M = media; SD = desviación estándar; MML = límites mínimo y máximo; N = número de observaciones; ND = no determinado. Diferentes letras superscriptas muestran diferencias estadísticas; ANOVA, $F=2.78$, $p=0.004$.

El clima del sistema lagunar Altata-Ensenada de Pabellones, donde se encuentra la Bahía de Altata, se caracteriza por ser cálido con temperaturas que varían anualmente de 19 a 35°C; con lluvias de junio a octubre y secas de noviembre a mayo. Durante la estación seca, la salinidad supera los 30‰, mientras que 0‰ puede ser registrado en la estación lluviosa, lo que junto con la influencia de los desagües derivados de la actividad agrícola en el área podría haber afectado el efecto infeccioso de *Perkinsus* sp en la almeja callista. Es aceptado que la prevalencia de la perkinsosis en poblaciones silvestres de moluscos aumenta cuando se presentan altas salinidades como parte de la dinámica de la infección (10). Aunque la salinidad en marzo y julio fue superior al límite máximo óptimo para la formación de esporas del protozoario (35%), como se demostró *in vitro* (22), la alta prevalencia obtenida pudiera ser más el resultado de la combinación de altos niveles de salinidad y temperatura, que la acción aislada de la salinidad, ya que la temperatura también aumentó de 23.7 a 37° C durante esos meses. La intensidad de la infección moderada obtenida durante los 13 meses de muestreo en la Bahía de Altata, sugiere que la variación estacional de estos dos parámetros no potenció el efecto infeccioso de *Perkinsus* sp. en *M. squalida*.

Debido a su sensibilidad, simplicidad y bajo costo (18,23), la técnica de RFTM en la identificación de presuntas hipnosporas de *Perkinsus* spp. se considera como un método preliminar fiable para después, llevar a cabo ensayos moleculares en los tejidos procesados. La detección de esferas redondas oscuras en *M. squalida*, característica de presuntas hipnosporas de *Perkinsus* sp. con RFTM, confirmaron la presencia de esta etapa vegetativa del parásito en el tejido de la almeja con una intensidad de infección que varió de negativa a moderada. Los nódulos blanquecinos (20) o los tejidos acuosos (21) pueden indicar lesiones causadas por el protozoo; sin embargo, no se observó daño tisular. Algunos autores mencionan que esto puede deberse a un bajo nivel en la intensidad de la infección (17), al pequeño tamaño de la muestra de tejido procesada con esta técnica (24) y/o a hipnosporas encontradas fuera de los tejidos en la capa externa del manto que se incorporaron en la muestra teñida durante el procesamiento. Solo una de las 95 almejas con presencia positiva por RFTM, tuvo más de 30 hipnosporas por preparación completa analizada, lo que refleja un nivel de infección bajo.

Se reportan, por primera vez, presuntas hipnosporas de *Perkinsus* sp. en una población silvestre de la almeja chocolate mexicana (*M. squalida*) del sureste del Golfo de California, detectadas con RFTM, con una prevalencia moderada y una intensidad de infección que varió de negativa a

moderada, aparentemente sin comprometer la salud de la almeja, ya que no se observó daño tisular visualmente. Para las almejas en el Golfo de California, solo hay un informe sobre la detección de *Perkinsus* sp. utilizando la técnica RFTM en una población cultivada de la almeja venus (*Chione fluctifraga*) (17).

Específicamente, la detección de *Perkinsus marinus* en los bivalvos del Golfo de California se ha centrado principalmente en diferentes especies de ostras (*Crassostrea gigas*, *C. corteziensis* y *Saccostrea palmula*) debido a su importancia comercial (10,25,26,27). Considerando la confirmación de la especie (*P. marinus*) y su alta incidencia en la región, es posible suponer que la especie *Perkinsus* en este estudio es la misma que ya se ha dispersado en diferentes localidades y en varias especies de bivalvos no ostreidos. Se detectó *Perkinsus* sp. en el callo de hacha (*Atrina maura*) de una localidad a pocos kilómetros al norte del área de estudio del presente trabajo (28).

Esto refuerza el argumento de que el parásito en cuestión se ha dispersado intraespecíficamente y ha encontrado nuevos hospedadores bivalvos en el sureste del Golfo de California, por lo tanto, la almeja chocolate mexicana debe considerarse en el catálogo de especies infectadas con *Perkinsus* sp. (18).

Con relación a la parasitación de *Perkinsus* sp. a *M. squalida* en la región, es necesario realizar más estudios sobre la patología, la interacción huésped-huésped, los patrones de infección y la epidemiología utilizando RFTM, junto con otras técnicas de confirmación de detección del parásito (histología, PCR, secuenciación genética y análisis filogenético), con el fin de aclarar el estado de salud actual de este bivalvo e implementar un programa de monitoreo permanente.

Conflicto de intereses

Los autores declaran que no existió conflicto de intereses de ningún tipo durante la realización y elaboración de este trabajo.

Agradecimientos

Los autores agradecen profundamente el apoyo logístico y financiero del Instituto Politécnico Nacional (IPN), la Secretaría de Investigación y Posgrado (SIP-IPN), la Comisión de Operaciones y Fomento de Actividades Académicas (COFFA-IPN) y el Estímulo para el Desempeño de los Investigadores (EDI-IPN), para la realización del presente estudio con los proyectos: SIP-IPN 20120471 y SIP-IPN 20130858.

REFERENCIAS

1. Luz MSA, Carvalho FS, Oliveira HC, Boehs G. *Perkinsus beihaiensis* (Perkinsozoa) in oysters of Bahia State, Brazil. *Braz J Biol.* 2018; 78(2):289-295. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.07016>
2. Da Silva PM, Scardua MP, Vianna RT, Mendonça RC, Vieira CB, Dungan, et al. Two *Perkinsus* spp. infect *Crassostrea gasar* oysters from cultured and wild populations of the Rio São Francisco Estuary, Sergipe, northeastern Brazil. *J Invert Pathol.* 2014; 119:62-71. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2014.04.005>
3. Queiroga FR, Vianna RT, Vieira CB, Farias ND, da Silva PM. Parasites infecting the cultured oyster *Crassostrea gasar* (Adanson, 1757) in northeast Brazil. *Parasitology.* 2015; 142(6):756-766. <https://doi.org/10.1017/S0031182014001863>
4. Pagenkopp-Logan KM, Hill-Spanik KM, Torchin ME, Aguirre-Macedo L, Fleisher RC, Ruíz GM. Richness and distribution of tropical oyster parasites in two oceans. *Parasitology.* 2016; 143(9):1119-32. <https://doi.org/10.1017/S0031182015001900>
5. Waki T, Yoshinaga T. Experimental challenges of juvenile and adult Manila clams with protozoan *Perkinsus olseni* at different temperature. *Fish Sci.* 2013; 79:779-786. <https://doi.org/10.1007/s12562-013-0651-4>
6. Valencia JM, Bassitta M, Picornell A, Ramon C, Castro JA. New data on *Perkinsus mediterraneus* in the Balearic Archipelago: locations and affected species. *Dis Aquat Org.* 2014; 112:69-82. <https://doi.org/10.3354/dao02795>
7. Ford SE, Tripp MR. The Eastern oyster: *Crassostrea virginica*. 1st. Ed. Maryland (USA): College Park, MD: Maryland Sea Grant College; 1996. <https://www.worldcat.org/title/eastern-oyster-crassostrea-virginica/oclc/35164271>
8. Huicab-Pech ZG, Curiel-Ramírez S, Castañeda-Chávez M, Lango-Reynoso F, Carrillo-Alejandro P. Variación estacional de *Perkinsus marinus* en el ostión americano *Crassostrea virginica* del sistema lagunar Carmen-Machona-Pajonal en Tabasco, México. *Trop Subtrop Agroecosys.* 2012; 15(Sup 2):S40-S50. <http://www.revista.ccba.uady.mx/ojs/index.php/TSA/article/view/1743>
9. Enríquez-Espinoza TL, Grijalva-Chon JM, Castro-Longoria R, Ramos-Paredes J. *Perkinsus marinus* in *Crassostrea gigas* from the Gulf of California. *Dis Aquat Org.* 2010; 89:269-273. <https://doi.org/10.3354/dao02199>
10. Villalba A, Reece KS, Ordás MC, Casas SM, Figueras A. Perkinsosis in molluscs: a review. *Aquat Liv Res.* 2004; 17:411-432. <https://doi.org/10.1051/alr:2004050>
11. Percher WT, Alavi MR, Schott EJ, Fernández-Robledo JA, Roth L, et al. Assessment of the northern distribution range of selected *Perkinsus* species in Eastern oyster (*Crassostrea virginica*) and hard clams (*Mercenaria mercenaria*) with the use of PCR-base detection assays. *J Parasitol.* 2008, 94:410-422. <https://doi.org/10.1645/GE-1282.1>
12. Choi K-S, Waki T. *Perkinsus olseni* (Lester and Davis 1981) infection in the Manila clam (*Ruditapes philippinarum*) in Korea: species identification, impacts and spatio-temporal distribution. *Bull Jap Fish Res Edu Agency.* 2016, 42:23-27. <https://www.fra.affrc.go.jp/bulletin/bull/bull42/42-06.pdf>
13. Itoh N, Meyer GR, Tabata A, Lowe G, Abbott CL, Johnson SC. Rediscovery of the Yesso scallop pathogen *Perkinsus qugwadi* in Canada, and development of PCR tests. *Dis Aquat Org.* 2013; 104:83-91. <https://doi.org/10.3354/dao02578>

14. Arzul I, Chollet B, Michel J, Robert M, Garcia C, Joly J-P, et al. One Perkinsus species may hide another: characterization of Perkinsus species present in clam production areas of France. *Parasitology*. 2012; 139(13):1575-1771. <https://doi.org/10.1017/S0031182012001047>
15. Glasspie CN, Seitz RD, Ogburn MB, Dungan CF, Hines AH. Impacts of predators, hábitat, recruitment, and disease on soft-shell clams *Mya arenaria* and stout razor clams *Tagelus plebeius* in Chesapeake Bay. *Biorxiv*. 2017; 22:1-55. <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/224071v2>
16. Ramilo A, Carrasco N, Reece KS, Valencia JM, Grau A, et al. Update of information on perkinsosis in NW Mediterranean coast: identification of Perkinsus spp. (Protista) in new locations and hosts. *J Invert Pathol*. 2015; 125:37-41. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2014.12.008>
17. Enríquez-Espinoza TL, Castro-Longoria R, Mendoza-Cano F, Grijalva-Chon JM. Perkinsus marinus in Crassostrea gigas and Chione fluctifraga from Kino Bay, Sonora, Mexico. *Biotecnia*. 2015; 17(1):10-13. <https://biotecnia.unison.mx/index.php/biotecnia/article/view/6>
18. OIE. Manual of diagnostic tests for aquatic animals 2018. World Organization of Animal Health. 2019. Available at: <http://www.oie.int/international-standard-setting/aquatic-manual/access-online/>
19. Mackin JG. Oyster disease caused by Dermocystidium marinum and other microorganisms in Louisiana. Institute for Marine Science University of Texas. USA. 1962; 7:132-229. <https://repositories.lib.utexas.edu/handle/2152/22811>
20. Sang H-S, Yang H-S, Reece KS, Cho Y-G, Lee H-M, Kim C-W, et al. Survey on Perkinsus species in Manila clam Ruditapes philippinarum in Korea waters using species-specific PCR. *Fish Pathol*. 2017; 52(4):202-205. <https://doi.org/10.3147/jsfp.52.202>
21. Ruano F, Batista FM, Arcangeli G. Perkinsosis in the clams Ruditapes decussatus and R. philippinarum in the Northeastern Atlantic and Mediterranean Sea: A review. *J Invert Pathol*. 2015; 131:58-67. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2015.07.015>
22. Auzoux-Bordenave S, Vigário AM, Ruano F, Domart-Coulon I, Doumenc D. In vitro sporulation of the clam pathogen Perkinsus atlanticus (Apicomplexa, Perkinsea) under various environmental conditions. *J Shellfish Res*. 1995; 14:469-475. https://archive.org/details/cbarchive_37449/invitrosporulationoftheclampat1995/page/n2
23. Auderman C, Carnegie RB, Bureson EM. Shellfish tissues evaluated for Perkinsus spp. using the Ray's fluid thioglycollate medium culture assay can be used for downstream molecular assays. *Dis Aquat Org*. 2008; 80:235-239. <https://doi.org/10.3354/dao01944>
24. Villanueva-Fonseca LC, Escobedo-Bonilla CM. Prevalencia del protozoo Perkinsus sp. en un cultivo de ostión japonés Crassostrea gigas en Sinaloa, México. *Lat Amer J Aquat Res*. 2013; 41(5):996-1002. <https://doi.org/103856/vol41-issue5-fulltext-19>
25. Cáceres-Martínez J, Vásquez-Yeomans R, Padilla-Lardizábal G, del Río-Portilla MA. Perkinsus marinus in pleasure oyster Crassostrea corteziensis from Nayarit, Pacific Coast of Mexico. *J Invert Pathol*. 2008; 99(1):66-73. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2008.03.005>
26. Cáceres-Martínez J, Vásquez-Yeomans R, Padilla-Lardizábal G. Parasites and symbionts of the pleasure oyster Crassostrea corteziensis cultured in Nayarit, México. *J Aquat Anim Health*. 2010; 22:141-151. <https://doi.org/10.1577/H09-052.1>
27. Cáceres-Martínez J, García-Ortega AM, Vásquez-Yeomans R, Pineda-García TJ, Stokes NA, Carnegie RB. Natural and cultured populations of the mangrove oyster Saccostrea palmula from Sinaloa, Mexico, infected by Perkinsus marinus. *J Invert Pathol*. 2012; 110(3):321-325. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2012.03.019>
28. Góngora-Gómez AM, Rubio-Zepeda F, Villanueva-Fonseca LC, Álvarez-Dagnino E, Muñoz-Sevilla N., Hernández-Sepúlveda JA, et al. Primer registro de Perkinsus sp. (Protozoa, Apicomplexa) en el callo de hacha Atrina maura en Sinaloa, México. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*. 2016; 51(3):689-694. <https://doi.org/10.4067/S0718-1957201600030002>