

UNIVERSIDAD PERUANA CAYETANO HEREDIA

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia



“Determinación de la presencia de *Perkinsus* spp. en conchas de abanico (*Argopecten purpuratus*) procedentes de la región de Ancash mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)”

Tesis para optar el Título Profesional de:

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

Manuela Vivanco Salazar

Bachiller en Medicina Veterinaria y Zootecnia

LIMA – PERÚ

2019

*A mis padres Jorge y
Rosario por darme su
apoyo incondicional
siempre que lo necesitaba.
A mi hermana María
Fernanda por su
motivación y ser un buen
ejemplo a mi persona*

AGRADECIMIENTOS

A los doctores Enrique Serrano Martínez y Luis Llanco Albornoz por guiarme en la elaboración de la tesis, siempre estar en disposición para ayudarme y brindar su conocimiento a mi persona.

A los laboratorios de Parasitología Veterinaria y Biología molecular de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia por dejarme hacer uso de sus equipos en la elaboración de mi tesis

A la Dra. Marcela Mora por brindarme sus conocimientos durante mis prácticas en su laboratorio.

A Adhemir Ayrton por brindarme las muestras y darme consejos en la elaboración de esta tesis.

A Cynthia por su paciencia y estar siempre dispuesta a brindarme su apoyo.

ABSTRACT

The aim of this study was to determine the presence of *Perkinsus* spp., parasite of mandatory report to OIE, in samples of scallops (*Argopecten purpuratus*) from Ancash-Peru by Polymerase Chain Reaction (PCR). Samples were collected monthly (January to August 2017). A total of 56 gill tissues were selected, with suggestive histological lesions of infection with this parasite like hemocytic infiltration and necrosis, then, DNA was obtained from pools of 2 or 3 animals. Specific primers were used to detect *Perkinsus* spp. and limit of detection by conventional PCR was determined by serial dilutions of positive control (*P. olsenii*). All analyzed samples were negative to PCR and a limit sensitivity of DNA detection was determined (1.63 ng/μl). Despite the negativity of results obtained, positive DNA controls of *P. beihaiensis* and *P. olsenii* were successful amplified and allowed to standardize the technique for future research.

Key Words: *Perkinsus*, *Argopecten purpuratus*, PCR, bivalves

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue determinar la presencia de *Perkinsus* spp., parásito de reporte obligatorio ante la OIE, en muestras de concha de abanico (*Argopecten purpuratus*) de la región de Ancash mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Las muestras fueron recogidas mensualmente durante los meses de enero a agosto del 2017 y en total se seleccionaron 56 tejidos de branquia con lesiones histológicas sugestivas de infección con este parásito como infiltración hemocítica y necrosis, a las cuales se les extrajo el ADN a partir de grupos de 2 o 3 individuos. A continuación, se utilizaron cebadores específicos para detectar *Perkinsus* spp. y se determinó el límite de detección de *Perkinsus* por PCR haciendo diluciones seriadas del control positivo (*P. olsenii*). Todas las muestras analizadas resultaron negativas y se determinó el límite de detección del ADN molde (1.63 ng/μl). A pesar de la negatividad de los resultados obtenidos, los controles positivos con ADN de *P. beihaiensis* y *P. olsenii* fueron amplificados exitosamente y permitieron estandarizar la técnica para futuras investigaciones.

Palabras clave: *Perkinsus*, *Argopecten purpuratus*, PCR, bivalvos

INTRODUCCIÓN

La acuicultura en el Perú se ha incrementado en los últimos años, siendo los langostinos (*Litopenaeus* spp.), concha de abanico (*Argopecten purpuratus*), trucha (*Oncorhynchus* spp.), tilapia (*Oreochromis* spp.) y otras especies amazónicas las de mayor producción (Cavero y Rodríguez, 2008). En la costa peruana, la acuicultura de moluscos bivalvos está sustentada principalmente por el cultivo de conchas de abanico, siendo los departamentos Piura y Ancash los primeros en producción y exportación de este molusco, esto es debido a las condiciones de temperatura y riqueza marina de la costa que permiten alcanzar la talla comercial en menor tiempo de cultivo (Baltazar, Palacios, y Mina, 2015). Esta especie es de gran importancia económica para el país debido a su alta demanda en el mercado internacional (Francia, Holanda y Estados Unidos) y a las divisas que genera (Cavero y Rodríguez, 2008).

El cultivo de concha de abanico se practica desde la década de los setenta, pero fue recién en 1982 que la explotación de este recurso se llevó con fines de exportación comercial debido a la presencia del fenómeno El Niño, que incrementó la población de conchas de abanico en la costa peruana. En el 2006, la producción acuícola nacional fue mayor de 28 TM, correspondiendo más del 43% (12 TM) a la producción de esta especie (Cavero y Rodríguez, 2008). Por otro lado, si bien la producción se ha incrementado en los últimos años, se tiene poco conocimiento sobre las enfermedades que afectan a estos moluscos. Las conchas de abanico pueden ser afectados por bacterias, virus y parásitos, entre ellos, los protozoos, quienes son causantes de la mayoría de las enfermedades de reporte obligatorio en el país (Cavero y Rodríguez, 2008; Novoa, Dios, y Figueras, 2005). Uno de los parásitos protozoarios más conocidos es *Perkinsus* spp., cuyo género posee 7 especies, siendo *P. marinus* y *P. olseni* de reporte obligatorio (OIE, 2018).

Perkinsus spp. es un parásito protozoario de moluscos marinos que ha sido asociado con severos casos de mortalidad y pérdidas económicas significativas (Dantas-Neto *et al.*, 2015). Su ciclo de vida es de huésped a huésped, el cual inicia cuando el parásito ingresa a la cavidad

paleal de los moluscos como trofozoíto y es fagocitado por una célula sanguínea denominada hemocito, donde se mantiene viable y se multiplica. El hemocito infectado migra por todos los tejidos del molusco y al desintegrarse, liberará los trofozoítos al exterior, causando una infección sistémica y finalmente, la muerte del huésped (S. Bower, 2013). El molusco infectado elimina trofozoítos en el agua por vía fecal y se repetirá el ciclo al ser ingeridos por otros moluscos (Bidegain *et al.*, 2017). Los moluscos con infecciones graves presentan lesiones multifocales, infiltración hemocítica a nivel microscópico, no obstante estos signos no son patognomónicos de una infección por *Perkinsus* (OIE, 2017).

Las especies del género *Perkinsus* afectan a diversas poblaciones de moluscos marinos y son de distribución mundial (Moss, Xiao, Dungan, y Reece, 2008). *P. marinus* fue identificado en el 1950 y ha infectado diversas especies de ostiones a lo largo de la costa este de Norteamérica, desde Maine, USA hasta Campeche, México (OIE, 2017); *P. olseni* ha sido reportado en diversas especies de almejas, ostras y abulones en Europa, Australia, Corea y Japón (Cremonte, Balseiro, y Figueras, 2005). Otras especies identificadas de menor grado de infección son *P. atlanticus* en almeja fina (*T. decussatus*) en Portugal (Azevedo, 1989), *P. qugwadi* en *Patinopecten yessoensis* en Columbia británica de Canadá (S. M. Bower, Blackburn, Meyer, y Welch, 1999), *P. chesapeaki* en *Mya arenaria* en la Bahía de Chesapeake de USA (Casas, Villalba, y Reece, 2002), *P. andrewsi* en *Macoma balthica* en la Bahía de Delaware de USA (Coss, Robledo, Ruiz, y Vasta, 2001) y *P. beihaiensis* en ostras del sur de China y *C. brasiliensis* de Brasil (Luz *et al.*, 2018; Moss *et al.*, 2008).

La amplia distribución de este parásito se debe a su capacidad de tolerar bajas temperaturas y diferentes concentraciones de salinidad, lo cual genera una amenaza para el cultivo de moluscos marinos (S. Bower, 2013). Asimismo, la prevalencia de infección por este parásito varía según el huésped, condiciones oceanográficas (temperatura y salinidad) y clima; por ejemplo: En Sinaloa, México, se encontraron prevalencias distintas de *P. marinus* en *C. virginica* a lo largo del año: 70% de febrero a mayo (temporada seca), 23% de junio a septiembre (lloviznas) y 7% octubre a enero (ventiscas) (Gullian-Klanian, Herrera-Silveira,

Rodríguez-Canul, y Aguirre-Macedo, 2008). Mientras que en USA, encontraron prevalencias entre 10 a 100% de *P. marinus* en la misma especie de ostiones (*C. virginica*) a lo largo de la orilla de Connecticut entre los años 1996 a 1997 (Karolus, Sunila, Spear, y Volk, 2000).

Actualmente, hay varios métodos de detección de *Perkinsus* spp., desde pruebas histológicas e incubación en caldo fluido de Tioglicolato (RFTM), hasta pruebas moleculares como la Reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El cultivo en Tioglicolato es uno de los métodos más usados por su alta sensibilidad al permitir el crecimiento de todas las especies de *Perkinsus* spp. y por su bajo costo, mientras que las pruebas de PCR son más específicas, permitiendo identificar la especie dentro del género *Perkinsus*, pero son más costosas (Audemard, Reece, y Burrenson, 2004). En un estudio llevado a cabo en la frontera entre Perú y Ecuador, se detectó la presencia de *Perkinsus* spp. en conchas negras por métodos de visualización microscópica y pruebas moleculares. No obstante, los reportes de detección por técnicas moleculares de *Perkinsus* spp. en el país siguen siendo escasos (Pretell *et al.*, 2017).

Para identificar este parásito por PCR, se utilizan cebadores específicos diseñados contra la región del espaciador transcrito interno (ITS) del ARN ribosómico, el cual es un marcador molecular muy útil para diferenciar especies dentro de un mismo y diferente género (Audemard *et al.*, 2004; Freire, Arias, Méndez, y Insua, 2009). Actualmente, las secuencias moleculares de todas las especies del género *Perkinsus* se encuentran depositadas en la base de datos del GenBank y pueden emplearse para la síntesis comercial de cebadores en laboratorios especializados (Casas *et al.*, 2002).

Es importante investigar sobre la detección de *Perkinsus* spp. en conchas de abanico provenientes de medios naturales y centros de cultivo debido a la importancia económica que tienen en la acuicultura peruana y a fin de conocer el estatus sanitario en moluscos bivalvos que permita tomar medidas correctivas. Por otro lado, la detección de este parásito mediante el uso de pruebas moleculares permitirá obtener resultados más rápidos, de mayor sensibilidad y especificidad (Abollo, Casas, Ceschia, y Villalba, 2006; OIE, 2017). El objetivo de este estudio fue determinar la presencia de *Perkinsus* spp. en muestras de concha de abanico (*Argopecten*

purpuratus) provenientes de la bahía de Samanco en la región de Ancash mediante la técnica de PCR en tiempo final.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Lugar de estudio

El estudio se desarrolló en el Laboratorio de Parasitología y Biología Molecular de la facultad de Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Peruana Cayetano Heredia.

2. Tipo de estudio

Estudio descriptivo

3. Tamaño de muestra

Las muestras de tejido branquial utilizadas de concha de abanico (*Argopecten purpuratus*) fueron obtenidas del banco del Laboratorio de Parasitología de la Universidad Peruana Cayetano Heredia las cuales se encontraban conservadas en solución fijadora de Davidson Estas fueron recolectadas en el año 2017 procedentes de ambientes naturales y centros de producción de la Bahía de Samanco, Ancash, durante los meses de verano (enero, febrero y marzo) e invierno (junio, julio y agosto), siendo un total de 200 muestras. Durante los meses de recolección no se distinguieron individuos clínicamente enfermos de individuos sanos y no se consideró una talla promedio de cada espécimen, asimismo, se registraron los valores de temperatura, pH, oxígeno y salinidad.

Se estimó el tamaño de muestra utilizando la fórmula de muestreo aleatorio y diagnóstico perfecto descrito por Martin, Meek, y Willeberg, (1987), para ello se consideró un nivel de confianza de 95% y una prevalencia mínima esperada de 7% (Gullian-Klanian *et al.*, 2008). Se seleccionaron al azar 56 muestras de tejido de branquia de concha de abanico que en un estudio histopatológico anterior mostraron

lesiones compatibles con infección por *Perkinsus* spp. (necrosis, infiltración hemocítica e hiperplasia epitelial) descritas por Valera, (2018).

4. Criterios de inclusión y exclusión

Se incluyeron todas las muestras del banco del laboratorio de Parasitología de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Peruana Cayetano Heredia almacenadas en fijador de Davidson provenientes de la Bahía de Samanco, Ancash que fueron recogidas durante los meses de verano (enero, febrero y marzo) e invierno (junio, julio y agosto). Solo se consideraron las zonas de las branquias y se excluyó el manto. Se excluyeron las muestras de individuos que no presentaron lesiones histopatológicas o que se encontraban en mal estado de conservación (tejido oscuro y seco).

5. Extracción de ADN

La extracción de ADN se realizó con el Kit comercial Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, USA), según el protocolo de los fabricantes. Se trabajó con conglomerados de 2 a 3 individuos de los cuales se tomó 50 mg de tejido de branquia y se homogenizaron en un mortero para después extraer el DNA a partir de 30 mg del homogenizado. Se midieron las concentraciones (ng/μl) de ADN y la ratio A260/A280 de todas las muestras en un espectrofotómetro NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, USA) para determinar su pureza (Ver anexo 1).

6. Determinación de la presencia de *Perkinsus* spp. por PCR convencional

Se realizó un PCR convencional según el procedimiento descrito por Casas *et al.*, (2002), empleando los cebadores PerkITS-85 (5' CCGCTTTGTTTGA 3') y PerkITS-750 (5' ACATCAGGCCTTCTAATGATG 3'), que tienen como blanco una región del espaciador transcrito interno (ITS), que genera un amplicón de tamaño esperado de 703 bp. Cada reacción se llevó a cabo empleando los controles antes descritos.

La reacción de PCR fue llevada en un volumen final de 25 μ L, incluyendo 12.5 μ L de buffer 2X del kit comercial Green Master Mix GoTaq® G2 (Promega, USA) el cual contiene 400 μ M dATP, 400 μ M dGTP, 400 μ M dCTP, 400 μ M dTTP, 3 mM de $MgCl_2$, 1 μ L de cada primer (10 pmol), 50 ng de ADN molde y 2.5 unidades/ μ L Taq Polimerasa para amplificar 1 Kb de ADN por min. Se realizó una denaturación inicial de 94°C por 4 minutos, seguido de 35 ciclos de amplificación de 94°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto y 72°C por 1 minuto y una extensión final de 72°C por 10 minutos. Las muestras se corrieron a 80 mV, durante 1 h, en gel de agarosa 1% en tampón TAE (Tris Acetato EDTA) junto a un marcador de peso molecular InnuSTAR 100 bp Ladder Express (Analytik Jena, Alemania) y se utilizó agua libre de DNAsas como control negativo de la reacción. El producto se sometió a electroforesis en gel de agarosa 1% con bromuro de etidio (5 mg/mL), visualizados en transiluminador BioDoc-IT (Analytik Jena, Alemania) y fotodocumentados.

7. Controles positivos

Se utilizó como controles positivos los DNA de *P. beihaiensis* y *P. olseni*, cedidos por el Dr. Maximiano P. Dantas Neto del Instituto de Ciencias Marinas – LABOMAR en Brasil. Estos DNA fueron diluidos en agua ultrapura y se midió su concentración en espectrofotómetro NanoDrop (Thermo Fisher, USA).

8. Límite de detección de ADN con PCR convencional

Se determinó el límite de detección del PCR en tiempo final mediante una dilución decimal seriada del DNA de *P. olseni* con el ADN extraído de las muestras de *A. purpuratus*. El control positivo tenía una concentración inicial de 16.6 ng/ μ L.

9. Plan de análisis de datos

Los resultados obtenidos por PCR convencional fueron ordenados y almacenados en un libro de Excel para luego ser organizados en cuadros.

10. Consideraciones éticas

El presente estudio no realizó manipulación de animales vivos y fue aprobado bajo el código de inscripción 102863 por el Comité Institucional de Ética para el Uso de Animales de la Universidad Peruana Cayetano Heredia

RESULTADOS

1. Determinación de la presencia de *Perkinsus* spp. por PCR convencional

De las 56 muestras de tejido de branquia de concha de abanico que fueron analizadas mediante la técnica de PCR, ninguna dio resultado positivo a *Perkinsus* spp. (Figura 1).

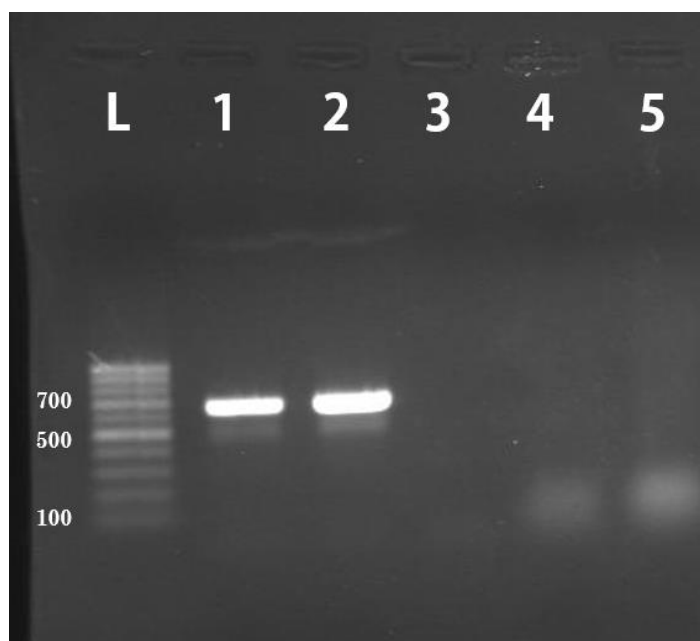


Figura 1. Gel agarosa (1%), teñido con bromuro de etidio, visto en transiluminador UV. Amplificación PCR con cebadores PerkITS-85 y PerkITS-585. Carril L: Marcador de peso molecular 100 bp; Carril 1: Control positivo *P. beihaiensis*; Carril 2: Control positivo *P. olseni*; Carril 3: Control negativo; Carriles 4 y 5: muestras analizadas.

2. Límite de detección de *Perkinsus* con PCR convencional

El PCR convencional mostró una amplificación del control positivo *Perkinsus olseni* hasta la dilución 1.63 ng/μl (Figura 2).

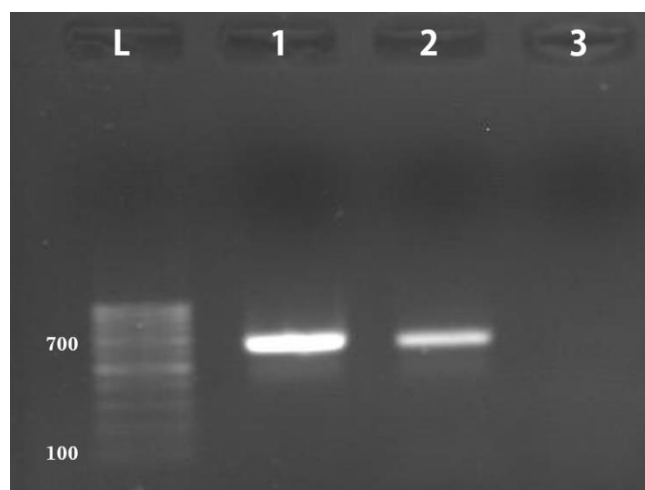


Figura 2. Gel agarosa (1%), teñido con bromuro de etidio, visto en transiluminador UV. Dilución seriada de control positivo (DNA de *P. olseni*). Carril L: Marcador de peso molecular 100 bp; Carril 1: Control positivo sin diluir (16.3 ng/μl); Carril 2: Dilución 10^{-1} (1.63 ng/μl); Carril 3: Dilución 10^{-2} (0.163 ng/μl).

DISCUSIÓN

Perkinsus spp. es un parásito protozoo de moluscos marinos con una alta distribución en el mundo. Algunas especies como *P. marinus* y *P. olseni* se encuentran en la lista de notificación obligatoria de la OIE por causar impactos económicos severos en los centros de producción (Petty, 2014). Debido a los signos clínicos inespecíficos que produce en sus huéspedes, la OIE recomienda la incubación en caldo fluido de Tioglicolato (RFTM) y técnicas moleculares como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) que permitan identificar este parásito (Enríquez-Espinoza, Grijalva-Chon, Castro-Longoria, y Ramos-Paredes, 2010; OIE, 2017).

En el estudio presente, se utilizó el protocolo de PCR convencional descrito por La Peyre, Casas, Villalba, y La Peyre, (2008) en muestras de tejido de concha de abanico con signos histológicos de necrosis e infiltración hemocítica. Nuestros resultados fueron negativos en todas las 56 muestras, a pesar de que los cebadores elegidos amplificaron la región ITS de los controles positivos de *P. beihaiensis* y *P. olseni*, obteniendo el amplicón esperado de 703 bp. En Perú, el reporte más reciente de *Perkinsus* fue realizado por Pretell *et al.*, (2017), los cuales describieron la presencia de *Perkinsus chesapeake* en ejemplares de *A. tuberculosa* de medios naturales en Tumbes-Perú entre los años 2016-2017 utilizando métodos de detección proteómica, molecular y visualización microscópica. De las muestras evaluadas 91.67% (55/60) fueron negativas y 8.33% (5/60) positivas. Por otro lado, Enríquez-Espinoza *et al.*, (2010) reportaron una prevalencia variable de 3.3 a 60% en *C. gigas* y *C. fluctifraga* en la bahía Kino de México, una zona donde ha habido reportes anteriores de este parásito (Cáceres-Martínez, Vásquez-Yeomans, Padilla-Lardizábal, y del Río Portilla, 2008; Enríquez-Espinoza *et al.*, 2010; Villanueva-Fonseca y Escobedo-Bonilla, 2013). A diferencia de los estudios mencionados, nuestro proyecto utilizó muestras de *A. purpuratus* de la bahía de Samanco, una especie y ubicación en la que no se han reportado casos anteriores de *Perkinsus* y que posee características ambientales diferentes (Valera, 2018).

Con relación a la susceptibilidad del huésped, Escobedo-Fregoso, Ramirez-Salcedo, y Vázquez-Juárez, (2017) señalan que hay especies de bivalvos donde la proliferación de *Perkinsus* es mayor que en otras, siendo la ostra oriental adulta (*C. virginica*) una de las más susceptibles a este parásito. Esto puede ser debido a que el cultivo de esta especie se da en temperaturas mayores que las observadas en Bahía de Samanco y en épocas de calor de la costa este de USA, donde llega a 26°C o más, habiendo mayor riesgo de proliferación de *P. marinus*. En cambio, Valera, (2018) describe que, en el año 2017, la Bahía de Samanco presentó temperaturas promedio de 19.14°, 25.09° y 23.74°C durante los meses de enero, febrero, marzo y abril seguido de 19.66°, 19.04° y 17.95°C durante junio, julio y agosto respectivamente.

Respecto al tamaño de muestra, debido a la escasez de estudios de prevalencia de *Perkinsus* en países de Latinoamérica, se consideró una prevalencia esperada de 7% descrita por Gullian-Klanian *et al.*, (2008) la cual fue determinada mediante la detección de *P. marinus* en *C. virginica* del Golfo de México, una zona con antecedentes de infección por *Perkinsus* debido a las condiciones de temperatura y salinidad de los mares en las zonas de cultivo. Además, según el manual acuático de la OIE, los signos microscópicos de infiltración hemocítica y lesiones multifocales se producen en la mayoría de las infecciones por lo que no son considerados específicos de una infección por *Perkinsus* por lo que el método de anatomopatología microscópica debe acompañarse con una prueba diagnóstica de mayor sensibilidad y especificidad como el PCR (OIE, 2017).

Por otro lado, los resultados obtenidos se pueden deber a una infección leve o que la cantidad de tejido extraído por muestra no era suficiente para asegurar la detección del *Perkinsus*. Villanueva-Fonseca y Escobedo-Bonilla, (2013) describen un caso parecido donde una de las posibilidades de que sus resultados tengan más positivos por el método de cultivo FTM que por PCR sea la cantidad de tejido utilizado, ya que habría menor probabilidad que se detecte ADN de *Perkinsus* en PCR si se trata de una infección leve. En nuestro estudio, la extracción de ADN se realizó con una pequeña cantidad de 25 a 30 mg por muestras, mientras

que en el método estándar de cultivo en medio RFTM se requieren de 1 a 3 gramos y en otras pruebas como el frotis de hemolinfa se trabajan con huéspedes vivos (OIE, 2017).

Para la extracción de ADN se utilizaron las branquias de los bivalvos debido a que no se recomienda el uso de tejidos intestinales en PCR por la presencia de inhibidores (OIE, 2017). Una de las limitantes del estudio fue que las muestras utilizadas se encontraban en fijador de Davidson, el cual contiene isopropanol que, en exceso, puede actuar como un inhibidor de PCR (Bessetti, 2007). Si bien antes de cualquier procedimiento, las muestras fueron lavadas repetidas veces con agua destilada para eliminar restos de fijador, el tiempo de almacenamiento puede haber causado denaturación de los ácidos nucleídos de los tejidos, reduciendo la calidad del ADN (Gauthier, Miller, y Wilbur, 2006). Asimismo, a pesar de que trabajar con conglomerados tuvo un beneficio de costo sobre la extracción de DNA de cada muestra de forma individual, el haber sido almacenadas en fijador de Davidson puede haber afectado el protocolo de PCR.

Esto también se observó al momento de determinar el límite de detección, ya que si bien había la formación del amplicón 703 bp, solo se consiguió una amplificación hasta la dilución 10^{-1} equivalente a 1.63ng/ μ l, a diferencia de Gauthier *et al.*, (2006), el cual logró identificar 10 fg de *P. marinus* mediante PCR en tiempo real. Según el manual de diagnósticos para especies acuáticas, en una situación ideal donde haya tenga disponibilidad de tejidos frescos, estos pueden ser incubados por 5 días en caldo fluido de Tioglicolato el cual debe contener antibióticos y antifúngico para permitir el enriquecimiento específico de Perkinsus y después realizar la extracción de ADN genómico (OIE, 2017).

Para la técnica de PCR, se utilizó el protocolo descrito por La Peyre *et al.*, (2008) y se realizaron algunos cambios de temperaturas y tiempo en las fases de amplificación para agilizar el proceso. En el estudio presente se mantuvo la temperatura de 94°C por 4 minutos para asegurar la función máxima de la enzima Taq Polimerasa y la desnaturalización inicial de las moléculas grandes de ADN. Se decidió reducir los ciclos de amplificación de 40 a 35 para evitar un posible daño de las muestras desnaturalizadas. En la fase de alineamiento se siguió la descripción de OIE, (2017) y se programaron tiempos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 55°C y

1 minuto a 72°C con una extensión final de 10 minutos a 72°C y periodo de reposo a 4°C. Según Ehtisham, Wani, Wani, Kaur, y Nissar, (2016), cuando se utiliza Taq Polimerasa la temperatura más apropiada para la fase de alineamiento es de 72°-78°C para que la enzima pueda insertar un aproximado de 1000 nucleótidos por minuto.

Debido a que los controles positivos funcionaron con normalidad, se hizo una dilución seriada del ADN de *P. olsenii* para determinar la sensibilidad del PCR. Para ello, se simuló un escenario de muestra positiva diluyendo un control positivo con ADN de las muestras y se obtuvo una sensibilidad de hasta 10^{-1} siendo la concentración inicial de 16.3 ng/μl lo cual indica que, sin hacer ningún cambio en los volúmenes o concentraciones del máster mix y manteniendo las mismas temperaturas de amplificación se podrían detectar hasta 1.63 ng/μl de ADN de *Perkinsus* spp.

CONCLUSIONES

- No se determinó la presencia de *Perkinsus* spp. en las muestras tejido branquial de conchas de abanico (*A. purpuratus*) en la Bahía de Samanco de la región de Ancash.
- Se obtuvo un límite de detección de ADN de 1.63 ng/μl mediante la dilución de los controles positivos con el ADN de las muestras de tejido branquial.

RECOMENDACIONES

- Realizar más estudios moleculares relacionados a la detección de microorganismos de reporte obligatorio para la OIE en la concha de abanico de otras zonas de cultivo del país.
- Ejecutar estudios de técnicas moleculares similares en otras especies de moluscos bivalvos importantes para la acuicultura peruana tanto en zonas de cultivo como de ambiente natural.

ANEXOS

Tabla 1. Concentración y pureza del ADN extraído de branquias de Conchas de abanico (*A. purpuratus*) procedentes de la Bahía de Samanco, Ancash-2017

Grupo	Grupos de muestras	ng/uL	A260/A280
Ambiente natural en verano	152, 153	80.2	1.92
	117, 131	92.1	1.94
	118, 101, 158	75.3	1.92
	132, 119, 128	87.5	1.94
	112, 126, 114	95.2	1.93
Producción en invierno	56, 62, 70	94.0	1.97
	31, 64, 4	103.6	1.99
	34, 53, 57	110.2	2.00
	35, 65, 11	103.5	1.96
Ambiente natural en invierno	20, 6, 8	109.5	1.98
	69, 9, 7	106.5	1.89
	68, 41, 30	93.6	1.99
	67, 44, 36	103.9	1.84
	61, 43, 25	90.2	1.98
Producción en verano	8, 63	86.7	1.95
	10, 69	95.8	1.98
	23, 25, 35	85.1	2.00
	20, 68, 38	98.0	1.98
	22, 12, 34	103.0	1.82
	11, 52, 33	91.0	2.00
Control positivo	<i>P. beihaiensis</i>	18.3	1.88
	<i>P. olsenii</i>	16.3	2.00

LITERATURA CITADA

- Abollo, E., Casas, S. M., Ceschia, G., & Villalba, A. (2006). Differential diagnosis of Perkinsus species by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism assay. *Molecular and Cellular Probes*, 20(6), 323-329. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2006.04.001>
- Audemard, C., Reece, K. S., & Bureson, E. M. (2004). Real-time PCR for detection and quantification of the protistan parasite Perkinsus marinus in environmental waters. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(11), 6611-6618. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.11.6611-6618.2004>
- Azevedo, C. (1989). Fine structure of Perkinsus atlanticus n. Sp. (Apicomplexa, Perkinsea) parasite of the clam Ruditapes decussatus from Portugal. *The Journal of Parasitology*, 75(4), 627-635.
- Baltazar, P. M. G., Palacios, J. L., & Mina, L. V. (2015). Producción, comercialización y perspectivas de desarrollo de la acuicultura peruana. *Revista de la Univesidad Científica del Sur*, 11(2). <https://doi.org/10.21142/cient.v11i2.191>
- Bessetti, J. (2007). An Introduction to PCR Inhibitors. Recuperado 5 de junio de 2019, de Promega Corporation website: <https://worldwide.promega.com/resources/profiles-in-dna/2007/an-introduction-to-pcr-inhibitors/>
- Bidegain, G., Powell, E. N., Klinck, J. M., Hofmann, E. E., Ben-Horin, T., Bushek, D., ... Guo, X. (2017). Modeling the transmission of Perkinsus marinus in the Eastern oyster Crassostrea virginica. *Fisheries Research*, 186, 82-93. <https://doi.org/10.1016/j.fishres.2016.08.006>
- Bower, S. (2013). Synopsis of Infectious Diseases and Parasites of Commercially Exploited Shellfish: Perkinsus marinus («Dermo» Disease) of Oysters. Recuperado 9 de agosto de 2018, de Fisheries and Oceans Canada website: <http://www.dfo-mpo.gc.ca/science/aah-saa/diseases-maladies/pmdoy-eng.html>

- Bower, S. M., Blackbourn, J., Meyer, G. R., & Welch, D. W. (1999). Effect of *Perkinsus* qugwadi on various species and strains of scallops. *Diseases of Aquatic Organisms*, 36(2), 143-151. <https://doi.org/10.3354/dao036143>
- Cáceres-Martínez, J., Vásquez-Yeomans, R., Padilla-Lardizábal, G., & del Río Portilla, M. A. (2008). *Perkinsus marinus* in pleasure oyster *Crassostrea corteziensis* from Nayarit, Pacific coast of México. *Journal of Invertebrate Pathology*, 99(1), 66-73. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2008.03.005>
- Casas, S. M., Villalba, A., & Reece, K. S. (2002). Study of perkinsosis in the carpet shell clam *Tapes decussatus* in Galicia (NW Spain). I. Identification of the aetiological agent and in vitro modulation of zoosporulation by temperature and salinity. *Diseases of Aquatic Organisms*, 50(1), 51-65. <https://doi.org/10.3354/dao050051>
- Cavero, P., & Rodríguez, P. (2008). Producción sostenida de moluscos bivalvos en el Perú: Acuicultura y repoblamiento. *FAO Actas de Pesca y Acuicultura (FAO)*. Recuperado de <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=XF2009439321>
- Coss, C. A., Robledo, J. a. F., Ruiz, G. M., & Vasta, G. R. (2001). Description of *Perkinsus andrewsi* n. Sp. Isolated from the Baltic Clam (*Macoma balthica*) by Characterization of the Ribosomal RNA Locus, and Development of a Species-Specific PCR-Based Diagnostic Assay. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 48(1), 52-61. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2001.tb00415.x>
- Cremonte, F., Balseiro, P., & Figueras, A. (2005). Occurrence of *Perkinsus olseni* (Protozoa: Apicomplexa) and other parasites in the venerid commercial clam *Pitar rostrata* from Uruguay, southwestern Atlantic coast. *Diseases of Aquatic Organisms*, 64(1), 85-90. <https://doi.org/10.3354/dao064085>
- Dantas-Neto, M. P., Sabry, R. C., Ferreira, L. P., Romão, L. S., Maggioni, R., Dantas-Neto, M. P., ... Maggioni, R. (2015). *Perkinsus* sp. Infecting the oyster *Crassostrea rhizophorae* from estuaries of the septentrional Northeast, Brazil. *Brazilian Journal of Biology*, 75(4), 1030-1034. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.06314>

- Ehtisham, M., Wani, F., Wani, I., Kaur, P., & Nissar, S. (2016). Polymerase Chain Reaction (PCR): Back to Basics. *Indian Journal of Contemporary Dentistry*, 4(2), 30. <https://doi.org/10.5958/2320-5962.2016.00030.9>
- 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(3), 269-273. <https://doi.org/10.3354/dao02199>
- Escobedo-Fregoso, C., Ramirez-Salcedo, J., & Vázquez-Juárez, R. (2017). Host Response when Perkinsus marinus Infection Intensities Increase in the Oyster Crassostrea corteziensis. *Journal of Shellfish Research*, 36(3), 717-727. <https://doi.org/10.2983/035.036.0321>
- Freire, R., Arias, A., Méndez, J., & Insua, A. (2009). Sequence variation of the internal transcribed spacer (ITS) region of ribosomal DNA in Cerastoderma species (Bivalvia: Cardiidae). *Journal of Molluscan Studies*, 76(1), 77-86. <https://doi.org/10.1093/mollus/eyp047>
- Gauthier, J. D., Miller, C. R., & Wilbur, A. E. (2006). TAQMAN® MGB REAL-TIME PCR APPROACH TO QUANTIFICATION OF PERKINSUS MARINUS AND PERKINSUS SPP. IN OYSTERS. *Journal of Shellfish Research*, 25(2), 619-624. [https://doi.org/10.2983/0730-8000\(2006\)25\[619:TMRPAT\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.2983/0730-8000(2006)25[619:TMRPAT]2.0.CO;2)
- Gullian-Klanian, M., Herrera-Silveira, J. A., Rodríguez-Canul, R., & Aguirre-Macedo, L. (2008). Factors associated with the prevalence of Perkinsus marinus in Crassostrea virginica from the southern Gulf of Mexico. *Diseases of Aquatic Organisms*, 79(3), 237-247. <https://doi.org/10.3354/dao01910>
- Karolus, J., Sunila, I., Spear, S., & Volk, J. (2000). Prevalence of Perkinsus marinus (Dermo) in Crassostrea virginica along the Connecticut shoreline. *Aquaculture*, 183(3), 215-221. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(99\)00306-3](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(99)00306-3)
- La Peyre, M. K., Casas, S. M., Villalba, A., & La Peyre, J. F. (2008). Determination of the effects of temperature on viability, metabolic activity and proliferation of two Perkinsus species, and its significance to understanding seasonal cycles of perkinsosis. *Parasitology*, 135(4), 505-519. <https://doi.org/10.1017/S0031182008004150>

- Luz, M. S. A., Carvalho, F. S., Oliveira, H. C., Boehs, G., Luz, M. S. A., Carvalho, F. S., ...
Boehs, G. (2018). Perkinsus beihaiensis (Perkinsozoa) in oysters of Bahia State, Brazil.
Brazilian Journal of Biology, 78(2), 289-295. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.07016>
- Martin, S. W., Meek, A. H., & Willeberg, P. (1987). *Veterinary Epidemiology: Principles and Methods*. Recuperado de <https://books.google.com.pe/books?id=m3ygQgAACAAJ>
- Moss, J. A., Xiao, J., Dungan, C. F., & Reece, K. S. (2008). Description of Perkinsus beihaiensis n. Sp., a new Perkinsus sp. Parasite in Oysters of Southern China. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 55(2), 117-130. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2008.00314.x>
- Novoa, B., Dios, S., & Figueras, A. (2005). Nuevas tecnicas de diagnóstico de patógenos que afectan al cultivo de moluscos bivalvos. Recuperado 1 de agosto de 2018, de Ministerio de agricultura, Pesca y Alimentación website: https://www.mapa.gob.es/app/JACUMAR/ayudas/DocumentosPremiosJacumar/2_VI_Premio_Jacumar_Investigacion_2005.pdf
- OIE. (2017). Manual de las Pruebas de Diagnóstico para los Animales Acuáticos. Recuperado 15 de septiembre de 2018, de Organización Mundial de Sanidad Animal website: <http://www.oie.int/es/normas/manual-acuatico/acceso-en-linea/>
- OIE. (2018). Enfermedades, infecciones e infestaciones de la Lista de la OIE en vigor en 2018. Recuperado 10 de septiembre de 2018, de Organización Mundial de Sanidad Animal website: <http://www.oie.int/es/sanidad-animal-en-el-mundo/oie-listed-diseases-2019/>
- Petty, D. (2014). Perkinsus infections of bivalve molluscs. Recuperado 12 de septiembre de 2018, de Fisheries and aquatic sciences website: <https://shellfish.ifas.ufl.edu/wp-content/uploads/Perkinsus-Infections-of-Bivalve-Molluscs.pdf>
- Pretell, K. M., Zapata, K. Y., Masias, P. M., Cedeño, V. A., Lignot, J., Mialhe, E., & Diringer, B. (2017). Detección de Perkinsus sp. En el bivalvo Anadara tuberculosa Tumbes, Perú. Recuperado 5 de junio de 2019, de IV Conferencia Internacional Sanidad e Inocuidad de la Pesca y la Acuicultura website:

<https://www.sanipes.gob.pe/web/index.php/en/sanipes-a-tu-servicio/prensa/noticias/244-cisipa>

- Valera, A. A. (2018). *Detección de microorganismos parasitarios y caracterización de lesiones histopatológicas en la concha de abanico (Argopecten purpuratus) procedentes de Áncash-Perú durante los periodos de verano e invierno* (Universidad Peruana Cayetana Heredia). Recuperado de <http://repositorio.upch.edu.pe/handle/upch/3837>
- 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*, 41(5), 996-1002. <https://doi.org/103856/vol41-issue5-fulltext-19>