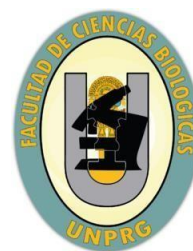




UNIVERSIDAD NACIONAL PEDRO RUIZ GALLO

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE PESQUERÍA Y ZOOLOGÍA



TESIS

Detección y caracterización molecular del parásito *Perkinsus sp.*,

en el bivalvo *Nodipecten subnodosus* “Concha mano de león”

(SOWERBY, 1835).

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADO EN

BIOLOGÍA – PESQUERÍA

AUTOR

Br. Vera Bonilla Jorge Jerson

ASESOR

MSc. Jorge Luis Chanamé Céspedes

CO-ASESOR

Dr. Benoit Mathieu Diringer

LAMBAYEQUE – PERÚ

2022

**Detección y caracterización molecular del parásito *Perkinsus sp*,
en el bivalvo *Nodipecten subnodosus* “Concha mano de león”
(SOWERBY, 1835).**

TESIS

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE
LICENCIADO EN BIOLOGÍA - PESQUERÍA**

APROBADO POR:

Dra. Angulo de Alva Elsa Violeta

PRESIDENTE



Dr. Rodríguez Delfín Luis Alberto

SECRETARIO



Dr. Fupuy Chung Jorge Antonio

VOCAL



Dr. Jorge Luis Chanamé Céspedes

ASESOR



LAMBAYEQUE, PERÚ

2022

AGRADECIMIENTO

En primer lugar, a mi familia por el apoyo incondicional en los momentos más difíciles de mi vida, por enseñarme que cada problema tiene más de una solución y motivarme a no desmayar jamás.

De manera especial a mis padres y abuelos que fueron el pilar y motivación para ingresar, culminar y ser una persona de bien para la sociedad.

Agradezco a mi madre por ser mi principal fuente de inspiración, por enseñarme que las cosas buenas valen el esfuerzo y por ser mi sustento, motivación e inspiración en los momentos más difíciles de mi vida.

Agradezco a todos los docentes que formaron el profesional que ahora soy y formaron mi personalidad con cada prueba académica y social.

De manera especial a la Dra. Elsa Angulo, por ser mi mentora y amiga desde aquel tan lejano tercer ciclo en el que desaprobé su curso y me motivo a mejorarme y ser el profesional que ahora soy.

A doña Rosita Otiniano por siempre estar dispuesta a apoyarme con cualquier inconveniente o duda administrativa, le agradezco sus mensajes de: ¿Cómo va la tesis? Se lo agradezco muchísimo.

A mi asesor el Dr. Jorge Chanamé, por su tiempo y dedicación para sacar adelante este proyecto y disipar mis dudas.

Agradezco a Rocío Del Pilar Rimarachín Zamora por ser la persona que me escuchaba cuando estaba desanimado o cansado por las horas de trabajo y estudio; por motivarme y decirme que: Puedo con eso y más, que puedo con todo. Gracias Chio, vales un Perú.

A Inca'Biotec S.A.C, por acogerme en su equipo de investigadores y confiar en mi persona. Sin su apoyo no hubiera sido posible la realización de esta investigación. De manera especial a la MSc. Krizia Pretell, por ser mi mentora profesional y enseñarme todo lo que sé, a trabajar con pasión y por exigirme a sacar lo mejor de mí; muchas gracias Krizia.

DEDICATORIA

Le dedico mi esfuerzo, horas de investigación y logros a:

Mi familia, por ayudarme a convertirme en el primer profesional de la familia y servir de ejemplo para las nuevas generaciones.

A mis padres: Jorge Luis Vera Sánchez, el manganzón. Te dedico este y todos mis logros, por ser esa imagen de superación y por apoyarme en todo lo que pudiste y más. Esto es para ti papá. A mi madre: Janet Bonilla Chapoñan, te dedico mi tesis, mi tiempo y mi vida; porque te lo debo y no me alcanzará la vida para agradecerte todo lo que hiciste por mí. Soy testigo de tu esfuerzo y sacrificio. ¡Te amo mamá! ¡Te amo papá!

A mis abuelos Maternos: Don Víctor Bonilla y Doña Felicita Chapoñan; por ser quienes me aguantan cada locura y por ser quienes me jalan las orejas cuando me equivoco, por enseñarme con su amor y rectitud, que siempre puedo mejorar. Por siempre tener un consejo, una sonrisa, por darme esa inspiración. Para ti, Papi Víctor, para ti Mami Fely.

A mis abuelos Paternos: Don Manuel Yovera y Doña Dilcia Sánchez; por siempre recibirme con alegría y ofrecerme el quedarme el tiempo que guste. A ti abuelito Manuel por tus hermosas historias que me motivaban a mejorar y me mostraban la realidad de dónde venimos; bellas historias que estoy seguro ahora cuentas en el cielo. A mi Lifis, abuelita Dilcia; esto es para ti y lo celebro con una tasita de café bien cargado como te gustaban, un brindis hasta el cielo. ¡Los extraño!

A mis hermanos: Patrick, Anthony, Jheyson, Marjhory, Evelin, Rodrigo y George; por ser esa motivación de superación para servirles de ejemplo y que ustedes sean mejores que yo.

Te la dedico Chio, por siempre hacerme ver qué; aunque demore, nunca es tarde. Para ti, Rocío del Pilar Rimarachín Zamora.

ÍNDICE DE CONTENIDO

RESUMEN	9
ABSTRACT	11
I. INTRODUCCIÓN.....	13
II. MARCO TEÓRICO.....	16
1. ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN	16
2. BASE TEÓRICA	19
2.1. Concha Mano de León “ <i>Nodipecten subnodosus</i> ” (Sowerby, 1835)	19
2.2. <i>Perkinsus spp</i>	25
III. MATERIALES Y MÉTODOS	32
1. MATERIALES.....	32
1.1 Población y muestra.....	32
2. METODOLOGÍA	34
2.1 Obtención de la muestra	34
2.2 Caracterización de control positivo	36
2.3 Análisis de muestras y contra muestras	36

IV. RESULTADOS	46
1. CARACTERIZACIÓN DEL CONTROL POSITIVO	46
2. PRUEBAS MICROBIOLÓGICAS.....	48
1.1 Análisis microscópico del cultivo en RFTM	48
3. PRUEBAS MOLECULARES	49
2.1 Extracción y cuantificación de ADN genómico	49
2.2 PCR y Electroforesis.....	49
V. DISCUSIÓN	53
VI. CONCLUSIONES.....	56
VII. RECOMENDACIONES	57
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58
IX. ANEXOS	66

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Índice de infección de acuerdo a la escala de Mackin (1962). Modificado por Craig et al, 1989.....	38
---	----

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Morfología externa de <i>Nodipecten subnodosus</i>	20
Figura 2 Morfología interna de <i>Nodipecten subnodosus</i>	22
Figura 3 Ciclo biológico de <i>Nodipecten subnodosus</i>	24
Figura 4 Distribución geográfica de <i>Nodipecten subnodosus</i>	24
Figura 5 Representación simplificada de un Protozoo - <i>Perkinsus sp.</i>	26
Figura 6 Ciclo de vida de <i>Perkinsus sp</i> – fase vegetativa.....	28
Figura 7 Ciclo de vida de <i>Perkinsus sp</i> – fase de vida libre	30
Figura 8 Distribución global de <i>Perkinsus sp.</i>	31
Figura 9 Adultos de <i>Nodipecten subnodosus</i>	32
Figura 10 Cortes (muestras) de <i>Nodipecten subnodosus</i>	33
Figura 11 Obtención de la muestra, etapa uno.....	34
Figura 12 Obtención de muestras y contra muestras, etapa dos	35
Figura 13 Espectrofotómetro UV-Vis Implén NanoPhotometer™ NP80	40

Figura 14 Representación de una Nested PCR	43
Figura 15 Pictograma de secuencia de <i>Perkinsus chesapeaki</i>	46
Figura 16 Pictograma de secuencia de <i>Perkinsus beihaiensis</i>	47
Figura 17 Presuntas hipnosporas de <i>Perkinsus</i>	48
Figura 18 Electroforesis de gen COI.....	50
Figura 19 Electroforesis ITS <i>Perkinsus sp.</i>	51
Figura 20 Electroforesis Nested <i>Perkinsus</i>	52

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1 Análisis microbiológico	66
Anexo 2 Extracción de ADN	66
Anexo 3 Protocolo de extracción de ADN – CTAB modificado.....	67
Anexo 4 Protocolo de extracción de ADN – Kit Power Soil.....	68
Anexo 5 Cuantificación de ADN	70
Anexo 6 Valores de cuantificación de ADN extraído con CTAB	70
Anexo 7 PCR	71
Anexo 8 Valores de cuantificación de ADN extraído con Kit Power Soil.....	71
Anexo 9 Reactivos de PCR- gen COI.....	72
Anexo 10 Perfil térmico para la amplificación del gen COI.	73
Anexo 11 Reactivos de PCR - ITS <i>Perkinsus sp.</i>	74
Anexo 12 Perfil térmico para la amplificación de ITS <i>Perkinsus sp.</i>	75
Anexo 13 Reactivos de PCR1 Nested <i>Perkinsus sp.</i>	76
Anexo 14 Perfil térmico de PCR1 Nested <i>Perkinsus sp.</i>	77
Anexo 15 Reactivos de PCR2 Nested <i>Perkinsus sp.</i>	78
Anexo 16 Perfil térmico para la amplificación de PCR2 Nested <i>Perkinsus sp.</i> ..	79

Anexo 17 Reactivos utilizados en preparación de TAE	80
Anexo 18 Proceso de electroforesis	80

RESUMEN

El género *Perkinsus*, alberga a los principales patógenos de bivalvos (Organización Mundial de Sanidad Animal - OMSA, 2019). El objetivo principal de esta investigación fue determinar la presencia/ausencia de *Perkinsus spp* en organismos silvestres de *Nodipecten subnodosus* extraídos en la región Tumbes, por lo que se analizaron muestras del recto/manto y branquias de cada organismo (100 individuos) de *N. subnodosus* (Mackin, 1951).

A cada animal se le realizó cortes de 5mm², dos cortes en el recto/manto y dos en las branquias (muestra y contra muestra). Las muestras se procesaron utilizando el medio RFTM (diagnóstico microbiológico) y las contra muestras fueron conservadas a -20°C para el diagnóstico molecular.

Los resultados obtenidos con el diagnóstico microbiológico, indicaban que el 20% de las muestras estaban presuntamente infectadas por *Perkinsus spp*. Para su confirmación las contra muestras de las presuntas muestras positivas, fueron analizadas mediante técnicas de diagnóstico molecular.

El diagnóstico molecular constó de dos técnicas de extracciones de ADN, el método CTAB modificado y el Kit de extracción de ADN Power Soil. El ADN obtenido mediante CTAB modificado fue utilizado en una PCR dirigida al gen COI, donde todos los amplicones salieron positivos. Luego, con el ADN extraído de ambas técnicas se realizó una PCR y posteriormente una Nested PCR, amplificando solo los controles positivos, confirmando que los individuos de *N. subnodosus* analizados en esta investigación, estaban exentos de *Perkinsus spp*.

Los controles positivos fueron caracterizados de una muestra positiva proveniente de *Anadara tuberculosa* “concha negra”, en un trabajo conjunto con Zavala M, en el 2020 que permitió

conocer que *P. chesapeaki* y *P. beihaiensis* están presentes en la región Tumbes. Siendo esta la primera detección confirmada de *Perkinsus sp.* en el Perú (Zavala, 2020).

La ausencia de *Perkinsus spp* en los individuos de *N. subnodosus* muestreados, podría deberse a una posible resistencia o refractabilidad de *N. subnodosus* frente a *Perkinsus sp.* lo que representaría una ventaja para el cultivo de esta especie.

Esta tesis abre las puertas a nuevas investigaciones; como explorar los mecanismos de resistencia de *N. subnodosus* ante *Perkinsus sp*, nuevas técnicas de diagnóstico de *Perkinsus sp*, etc.

Palabras clave: *Nodipecten subnodosus*, *Perkinsus spp*, RFTM, Hipnosporas, CTAB, Power Soil, diagnóstico molecular, PCR, Nested PCR, OMSA.

ABSTRACT

The *Perkinsus* genus is home to the main bivalve pathogens (World Organization for Animal Health - OMSA, 2019), so the main objective of this research was to determine the presence/absence of *Perkinsus* spp in wild organisms of *Nodipecten subnodosus* extracted in the Tumbes region. Therefore, samples of the rectum/mantle and gills of each organism (100 individuals) of *N. subnodosus* were analyzed (Mackin, 1951).

Each animal underwent 5mm² cuts, two cuts in the rectum/mantle and two in the gills (sample and counter sample). The samples were processed using the RFTM medium (microbiological diagnosis) and the counter samples were kept at -20°C for molecular diagnosis.

The results obtained with the microbiological diagnosis indicated that 20% of the samples were presumably infected by *Perkinsus* spp. For confirmation, the counter samples of the presumed positive samples were analyzed using molecular diagnostic techniques.

The molecular diagnosis consisted of two DNA extraction techniques, the modified CTAB method and the Power Soil DNA extraction kit. The DNA obtained by modified CTAB was used in a PCR directed to the COI gene, where all the amplicons were positive. Then, with the DNA extracted from both techniques, a PCR was carried out and later a Nested PCR, amplifying only the positive controls, confirming that the *N. subnodosus* individuals analyzed in this investigation were free of *Perkinsus* spp.

The positive controls were characterized, from a positive sample from *Anadara tuberculosa* "black shell", in a joint work with Zavala M, in 2020 and allowed to know that *P. chesapeakei* and *P. beihaiensis* are present in the Tumbes region. This being the first confirmed detection of *Perkinsus* sp. in Peru (Zavala, 2020).

The absence of *Perkinsus spp* in the *N. subnodosus* individuals sampled could be due to a possible resistance or refractability of *N. subnodosus* against *Perkinsus sp.* which would represent an advantage for the cultivation of this species.

This thesis opens the doors to new investigations; how to explore the resistance mechanisms of *N. subnodosus* against *Perkinsus sp*; new diagnostic techniques for *Perkinsus sp.*, etc.

Keywords: *Nodipecten subnodosus*, *Perkinsus spp*, RFTM, Hypnospores, CTAB, Power Soil, molecular diagnosis, PCR, Nested PCR, OMSA.

I. INTRODUCCIÓN

En el ambiente marino, se estima que el 23% del total de organismos conocidos son moluscos; por lo que son un grupo significativo a nivel de abundancia y diversidad; esta abundancia y diversidad de organismos se encuentra distribuida en tres clases taxonómicas: Gasterópodos, Cefalópodos y Pelecípodos (Bivalvos). (Brusca y Brusca, 2003).

Estos últimos, son organismos con conchas o valvas de dos piezas; que generalmente tienen una vida sedentaria o sésil, presentan una amplia distribución geográfica y tienen un valor comercial muy importante; entre los que destacan los pectínidos, debido a su tamaño y color llamativo (Waller 1991, citado por Peña 2001).

Los pectínidos están conformados por 06 géneros: *Aequipecten*, *Argopecten*, *Chlamys*, *Euvola*, *Pecten* y *Nodipecten*. (Waller 1991, citado por Peña 2001). Los organismos del género *Nodipecten* cuentan con dos especies representativas; *N. nodosus* y *N. subnodosus*; con distribución en el Atlántico y el Pacífico respectivamente (Smith, 1991).

N. subnodosus conocida en Perú como concha “Mano de León”; presenta una distribución geográfica que va desde el noroeste de México a lo largo de la costa del Pacífico y el Golfo de California, hasta el norte de Perú (Tumbes y Talara - Piura). La "Mano de león", es la especie de pectínido más grande de aguas tropicales y sub tropicales, despertando un gran interés comercial por el gran tamaño que logra alcanzar en su etapa adulta; hasta más de 200 mm de longitud y más de 1.5 kg de peso (incluida la concha) (Morales y Cáceres, 1996). A pesar de su potencial acuícola, su explotación a nivel nacional se limita a la extracción esporádica de pequeños bancos naturales.

Por recomendaciones de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OMSA), debemos prestar atención a las enfermedades parasitarias en moluscos bivalvos, principalmente las generadas

por *Perkinsus sp*; ya que, a nivel mundial las perkinsiosis son las patologías más severas que afectan la producción de bivalvos. Esta enfermedad es causada por un grupo de protistas del género *Perkinsus* pertenecientes al Phylum *Apicomplexa*.

La enfermedad es denominada como perkinsiosis, perkinsosis o enfermedad de Dermo cuando el patógeno es *Perkinsus marinus*; (inicialmente identificado como: *Dermocystidium marinum*, por considerar que se trataba de un hongo) (Mackin et al., 1950). Actualmente, se han caracterizado 07 especies de este género: *Perkinsus marinus*, *Perkinsus olseni* (*P. atlanticus*), *Perkinsus cheasapeaki* (*P. andrewsi*), *Perkinsus beihainensis*, *Perkinsus honshuensis*, *Perkinsus mediterraneus* y *Perkinsus qugwadi*.

En Perú, ya existen registros de este parásito tanto en organismos cultivados como en individuos silvestres. Se detectó la presencia de *P. chesapeaki* y *P. beihaiensis* en *Anadara tuberculosa* “Concha negra” (Pretell, et al 2017) y de *P. marinus* en *Argopecten purpuratus* “Concha de abanico” (Zavala, 2020). Por lo que, en esta investigación se planteó el siguiente problema: ¿*Nodipecten subnodosus* podría ser portador de *Perkinsus spp*; qué especies podría presentar?, sugiriendo como hipótesis: *Nodipecten subnodosus* era portador de al menos una especie de *Perkinsus sp*.

A partir del problema planteado y la hipótesis sugerida, se planteó como objetivo principal, el detectar parásitos del género *Perkinsus* en organismos silvestres de *Nodipecten subnodosus*; mediante pruebas microbiológicas y moleculares. Se plantearon tres objetivos específicos, determinar la prevalencia de *Perkinsus spp* en *Nodipecten subnodosus* mediante Ray's Fluid Thioglicolato Medium (RFTM); evaluar la frecuencia de infección de *Nodipecten subnodosus* por *Perkinsus sp*. e identificar las especies de *Perkinsus spp* en *Nodipecten subnodosus*, mediante técnicas de PCR o alguna de sus variantes.

El ADN de las muestras positivas para *Perkinsus sp*, se enviaría a secuenciar para caracterizar a las especies de *Perkinsus sp*. presentes en *N. subnodosus*.

En Perú, *N. subnodosus*, es un recurso potencial para la diversificación de la maricultura nacional; sobre todo, en el norte del país debido a la presencia de aguas más cálidas. Este bivalvo tiene todas las características para ser una especie económicamente importante, pero para una confiable actividad extractiva y de cultivo, es necesario el realizar un estudio epidemiológico sobre los animales silvestres.

Esta investigación es muy importante, ya que los resultados son los primeros a nivel mundial en generar reportes epidemiológicos de *Perkinsus sp* sobre *Nodipecten subnodosus*, y servirán para asentar las bases de la sanidad acuícola de esta especie.

II. MARCO TEÓRICO

1. ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN

Los pectínidos, presentan una gran distribución en el continente americano, tanto en aguas del Océano Pacífico como del Océano Atlántico. La actualización taxonómica más reciente fue realizada por Smith en 1991, en su tratado sobre la “Nomenclatura y distribución en espacio y tiempo de pectínidos del Pacífico y Atlántico americano”; en donde pone en evidencia la existencia de 39 especies. A pesar del gran número de especies, son pocas las de importancia comercial, las más relevantes se encuentran en los géneros *Aequipecten*, *Argopecten*, *Chlamys*, *Euvola*, *Pecten* y *Nodipecten*. (Waller 1991, citado por Peña 2001).

El género *Nodipecten*, presenta dos especies bandera, *N. nodosus* (Atlántico) y *N. subnodosus* (Pacífico); *Nodipecten subnodosus* es muy relevante en la economía de México, ya que este país es el principal extractor de este recurso. México presenta los mayores bancos naturales de este pectínido, *N. subnodosus* habita en lagunas, bahías y canales con una profundidad mayor a los 5 metros y con presencia de corrientes fuertes. Su mayor población se registra sobre fondos arenosos y conchales de lagunas marinas estenohalinas (35 a 38 ppt), principalmente en las lagunas costeras del Pacífico de la Península de Baja California; en la Laguna Ojo de Liebre. (Keen, 1971).

En México, la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT), agrupa las estadísticas pesqueras anuales (captura y producción) de bivalvos, bajo el concepto de “Almeja”; englobando a pectínidos, arcas, callos de hacha y las mismas almejas (SEMARNAT, 2018) por lo que es difícil obtener datos precisos de las estadísticas pesqueras oficiales sobre la captura de *N. subnodosus*. La autoridad que administra la pesquería de *N. subnodosus* es la Comisión Nacional de Pesca y Acuicultura (CONAPESCA) en coordinación con SEMARNAT, ya que las zonas de

captura se encuentran dentro de un área natural protegida. Las evaluaciones y control del recurso son realizadas por el Centro Regional de Investigaciones Pesqueras (CRIP) en La Paz, Baja California Sur. (Maeda y Lodeiros, 2011). México es poseedor del mejor y más completo registro de esta especie; a pesar de ello, aún no logran una reproducción exitosa en laboratorio. Registros del Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas (CENAIM) muestran que el mejor resultado obtenido en producción es de ± 500 semillas obtenidas de desoves esporádicos (CENAIM, 2019). Aunque *N. subnodosus* es relevante en la economía de México, existe una carencia de estudios epidemiológicos sobre estos organismos.

En Sudamérica, Ecuador realiza la extracción de reproductores mediante buceo artesanal, los organismos colectados luego son llevados a laboratorio y acondicionados, en donde alcanzan la madurez gonadal, para luego ser inducidos al desove. (Blacio, 2002). Pero hasta la fecha no hay evidencia de éxito.

En Perú la extracción de este recurso está limitada al norte del país (Tumbes y el norte de Piura); en el 2018 inició su cultivo experimental, impulsado por la empresa privada Incabiotec SAC y cofinanciada por el Programa Nacional de Innovación de Pesca y Acuicultura (PNIPA); tomando como modelo el éxito de los cultivos de *Argopecten purpuratus* “concha de abanico”. Se logró el primer desove y cultivo exitoso de la especie. (PNIPA, 2018).

Gracias al logro obtenido en Perú y teniendo en cuenta experiencias globales en los cultivos de bivalvos, debemos prestar atención a las infecciones generadas por *Perkinsus spp*; ya que, a nivel mundial la perkinsiosis es la principal enfermedad que afecta la producción de bivalvos.

El registro documentado más antiguo de perkinsiosis se remonta a los años 30s, donde *Perkinsus sp* fue observado por primera vez en cortes histológicos (almacenados) del “ostión

americano” *Crassostrea virginica*, en Luisiana (Estados Unidos de América). Diez años antes de que fuera asociado directamente con las mortalidades masivas del ostión en los años 40s. (Cáceres et al., 2007).

En todos los continentes, existen reportes de este parásito, registrando mortandades muy elevadas en la producción anual de bivalvos. El caso europeo más relevante fue causado por *Perkinsus olseni*, quien fue responsable del 80% de los brotes de perkinsiosis en la “Almeja fina” *Ruditapes decussatus*. En el continente asiático (Corea del Sur), existen reportes de mortandades similares en la “Almeja de Manila” *Ruditapes philippinarum* (Park y Choi 2001).

En América del Norte (Golfo de México), *Perkinsus sp* es el patógeno más relevante, infectando principalmente a *Crassostrea virginica* “Ostión de Virginia”, ocasionando mortandades superiores al 80% en las poblaciones cultivadas y silvestres (Burreson y Ragone, 1996, citado por Gutiérrez et al., 2003). En los estados de Sonora, Sinaloa y Nayarit, se presentan mortandades similares en los cultivos artesanales de *Crassostrea corteziensis*, “Ostión del placer” y de *C. virginica* “Ostión de Virginia” (Guzmán, 2014).

Perkinsus marinus y *Perkinsus olseni* ocasionan las más altas tasas de mortalidad; ocasionando un impacto económico negativo en los cultivos de bivalvos; debido a esto, han sido listadas por la Organización Mundial de Sanidad Animal (OMSA), como agentes patógenos de declaración obligatoria (Madero, 2014).

En Perú, se ha reportado *P. chesapeakei* y *P. beihaiensis* en *Anadara tuberculosa* “Concha negra” (Pretell et al, 2017) y *P. marinus* en *Argopecten purpuratus* “concha de abanico” (Zavala, 2020). Mientras que en *Nodipecten subnodosus* este es el primer estudio de detección de *Perkinsus sp*.

2. BASE TEÓRICA

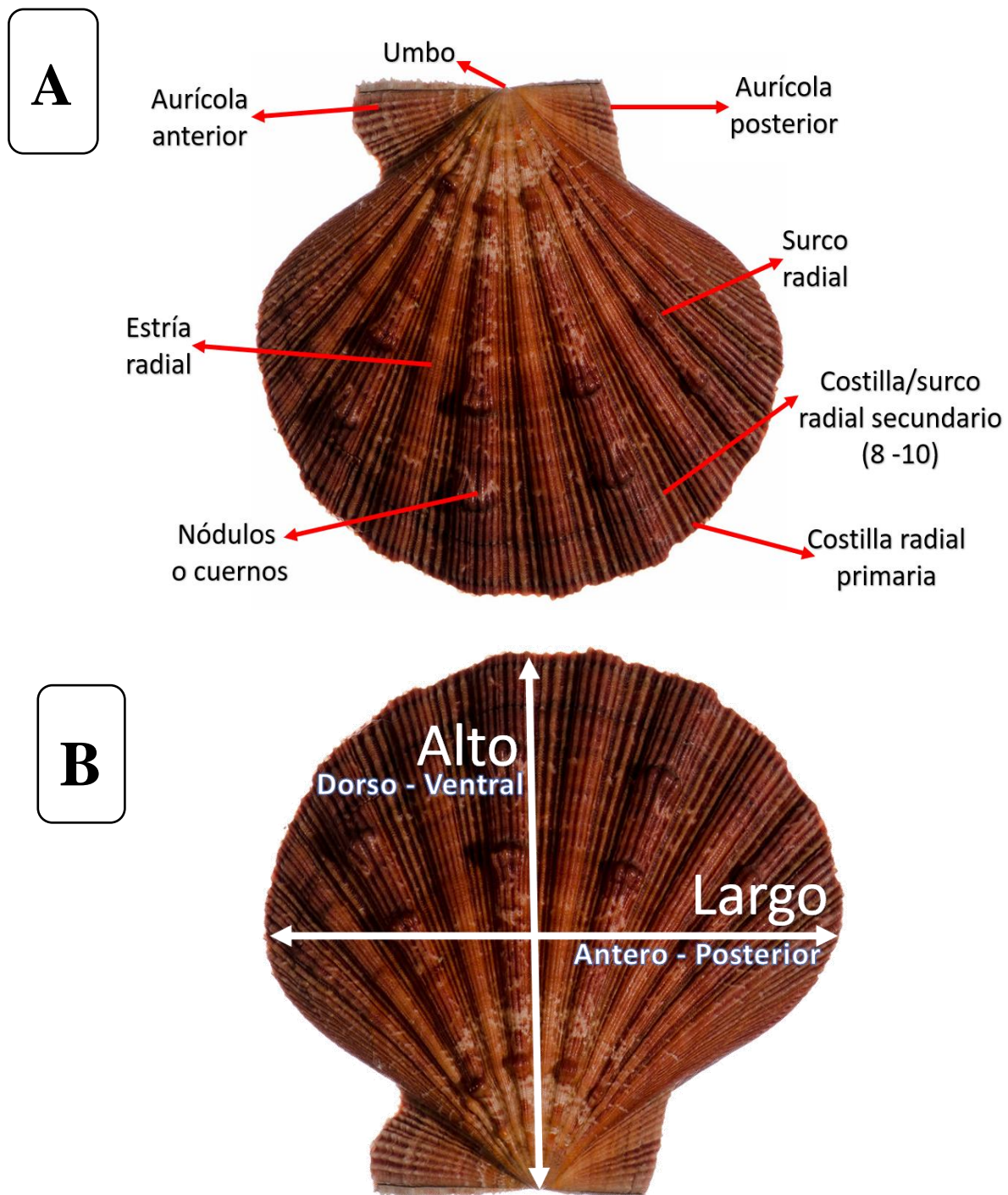
2.1. Concha Mano de León "*Nodipecten subnodosus*" (Sowerby, 1835)

A. Morfología externa.

N. subnodosus es un bivalvo de conchas desiguales, una de ellas siempre es más larga que alta, ambas valvas son bastante fuertes y resistentes a la trituración. Este pectínido cuenta con la concha más grande y pesada entre sus similares de América tropical. El color de sus valvas puede variar de entre moradas tenues a naranja intenso, indistintamente en ambos casos las valvas pueden presentar entre 8 y 10 surcos con o sin protuberancias a manera de cuernos romos. Las dos valvas se unen en el margen dorsal gracias a la fuerte estructura de su charnela y a sus 5 pares de dientes bien definidos a cada lado de la fosa de la misma, dos del lado derecho y tres del izquierdo. El margen anterior de la charnela sobresale del cuerpo de la concha formando una estilizada aurícula que por su lado ventral forma con el cuerpo de la concha un ángulo de aproximadamente 45° (Figura 1).

Figura 1

Morfología externa de Nodipecten subnodosus



Nota. A) Estructuras externas. B) Puntos referenciales

B. Morfología interna

Presentan un manto fino de color naranja casi transparente, que se encarga de secretar ambas valvas y delimita el volumen de la cavidad paleal. Los dos lóbulos del manto se fusionan entre ellos por la zona dorsal del animal, así como con la masa visceral. El borde del manto es particularmente grueso y con llamativos contrastes; en su pliegue mediano se ubican los tentáculos sensoriales y los ojos paleales. Sobre el manto descansan las branquias las cuales se encargan del intercambio gaseoso.

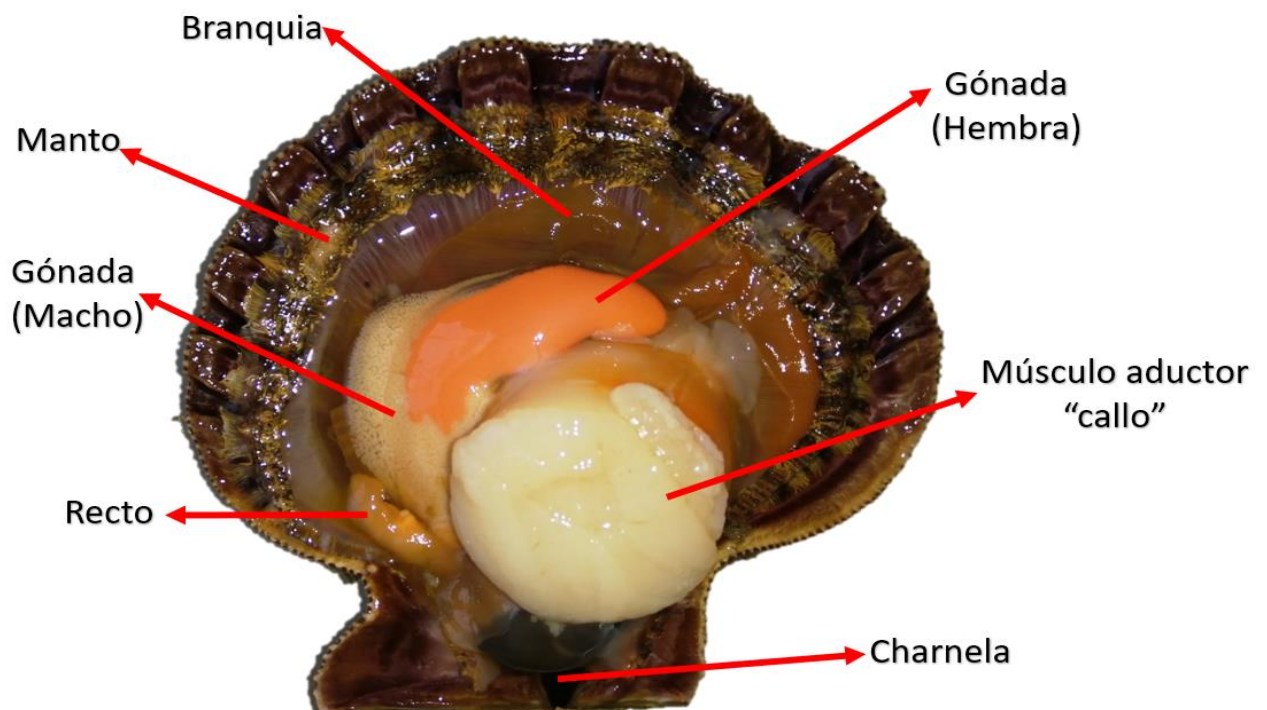
El músculo aductor o callo, es el órgano más grande y vistoso del cuerpo visceral, excepto durante la época de reproducción; que es cuando las gónadas ocupan hasta más del 70% del volumen total del tejido blando. El callo tiene una forma cilíndrica y se encarga de unir fuertemente las dos valvas en la parte dorso-posterior del cuerpo, hacia la parte media baja del umbo.

Los organismos de esta especie son hermafroditas funcionales; ya que su gónada presenta porción de macho (color blanquecino) y porción de hembra (color naranja vivo) (Sowerby, 1842). Presentan una glándula digestiva o hepatopáncreas, la cual se ubica en la parte dorso - anterior del cuerpo; en épocas de reproducción se puede distinguir por su color característico: oscuro casi negro que se nota apenas por debajo de los palpos labiales (Figura 2).

De todos los órganos, los de mayor importancia comercial son: el callo, seguido de la gónada. Se estima que en valores estándares, un organismo de 16 cm de largo puede llegar a presentar una masa muscular fresca de entre 65g y 108g.

Figura 2

Morfología interna de Nodipecten subnodosus.



C. Taxonomía

La sistemática, taxonomía y clasificación general de los pectínidos se basa en el Código Internacional de Nomenclatura Zoológica, por lo que el ordenamiento de las especies es revisado y actualizado permanentemente. En la actualidad, además de criterios fenotípicos, se utilizan las técnicas moleculares; con la finalidad de actualizar y tener una taxonomía más certera.

Phylum: Mollusca

Clase: Bivalvia (Pelecypoda) → Goldfuss, 1820

Orden: Ostreoida → Férussac, 1822

Familia: Pectinidae → Wilkes, 1810

Género: *Nodipecten* → Dall, 1898

Especie: *Nodipecten subnodosus* → Sowerby, 1835

D. Ciclo biológico

Nodipecten subnodosus alcanza su máximo índice de madurez sexual entre los dieciocho y veinticuatro meses de vida. (Maldonado et al., 2004). Para ejecutar la fecundación, expulsan sus gametos al agua, luego de 24h o 48h; aparecen las primeras larvas trocófora, misma que al dividirse da origen a la larva veliger. Las larvas veliger (larvas “D”) se pueden observar entre el segundo y el tercer día posterior al desove.

Posteriormente, al octavo día, la larva pierde parte de su velo y las valvas empiezan a calcificarse; originando a la larva umbonada. Entre los diez a quince días, aparecen las manchas oculares (denominadas “ojo”); signo de culminación de su etapa pelágica e iniciará su ciclo bentónico (fijación). En su estadio, la larva desarrolla un pie musculoso que le sirve para explorar el sustrato y desplazarse, a esta larva se le denomina Pediveliger (presenta vida natatoria y reptante). Al encontrar el sustrato adecuado, la larva inicia el proceso irreversible de fijación, con cambios morfológicos importantes (larva metamorfoseada), luego se desarrolla a manera de un adulto de diminuto tamaño (semillas/juveniles) (Figura 3).

Figura 3

Ciclo biológico de Nodipecten subnodosus.



E. Distribución

Nodipecten subnodosus presenta una distribución que abarca desde el Golfo de California en el norte de México, la laguna Ojo de Liebre; hasta el norte de Perú, incluyendo el departamento de Tumbes y la provincia de Paita, al norte del departamento de Piura (Álamo y Valdivieso, 1987) (Figura 4).

Figura 4

Distribución geográfica de Nodipecten subnodosus



2.2. *Perkinsus spp*

Los *Perkinsus*, son un grupo de protistas que parasitan e infectan a diversas especies de bivalvos. Los registros históricos y la reciente evidencia científica, muestran que son capaces de generar enfermedades a mejillones, almejas, ostiones, arcides y pectínidos; por lo que, ocasionan mortandades en los principales grupos de bivalvos con importancia comercial en la pesquería y maricultura (Villalba et al., 2004).

Además, existen evidencias de que ocasionan impactos negativos en las comunidades silvestres, por lo que su detección en nuevas localidades y especies debe ser explorada (Burreson, 1991, citado por Encomio et al., 2005, a su vez citado por Gullian et al., 2008). Este diagnóstico exploratorio es particularmente importante si se desea iniciar el cultivo de algún bivalvo de interés a partir de animales silvestres; como lo es *Nodipecten subnodosus* en Perú.

Los *Perkinsus spp* son patógenos letales y que potencian su patogenicidad en aguas cálidas y con mayor concentración de sal (33 ppt a más). Estos parásitos atacan a los hemocitos del huésped, causando anemia hemolítica y por consiguiente la degeneración de tejidos, lo que resulta en un desequilibrio energético, crecimiento lento que puede conllevar a la muerte del organismo infectado. (Guzmán, 2014). Las tasas de mortalidades dependerán tanto de la especie infectada, como de la especie del patógeno. Es así que se reportan infecciones sin mortalidades; y otras más extremas con mortalidades de más del 80% de los organismos (OMSA, 2021).

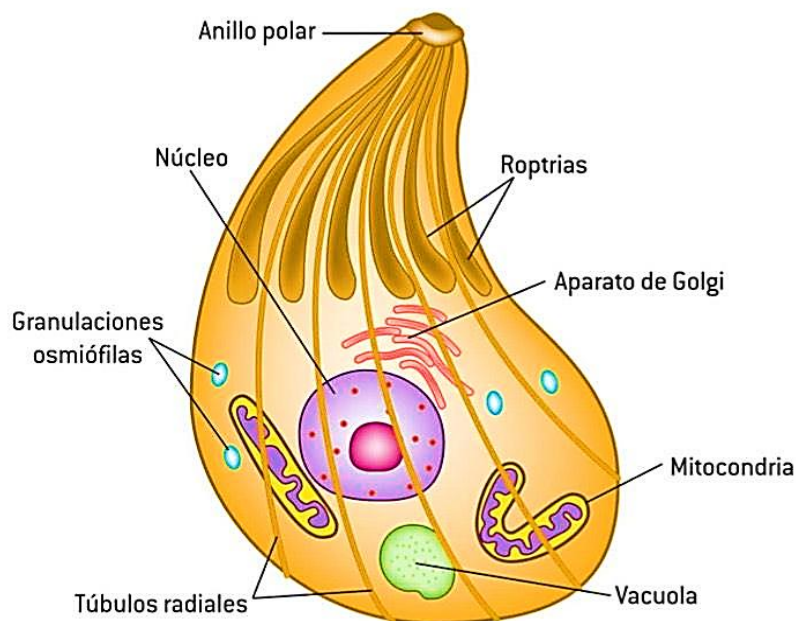
A. Morfología

Los *Perkinsus* pertenecen a los protozoos Apicomplexos, por lo que están provistos de un complejo apical y una membrana sub pelicular; son capaces de formar microsporas y zoosporas, características que comparte con otros miembros del grupo de los Apicomplexos (Figura 5).

Además, las zoosporas de algunas especies de *Perkinsus sp* muestran un flagelo y una vacuola anterior, característica que no se presentan todos los Apicomplexos (Levine, 1978).

Figura 5

Representación simplificada de un Protozoo -Perkinsus sp.



Nota. Tomada de Estructura de un Protozoos de <https://www.chegg.com/>

B. Taxonomía

En un inicio los miembros del género *Perkinsus* estaban considerados dentro del reino Fungi (Género: *Dermocystidium*), pero en la actualidad están dentro del reino Protista; presentando la siguiente clasificación taxonómica:

Phylum: Apicomplexa

Clase: Perkinsea

Orden: Perkinsida

Familia: Perkinsidae

Género: *Perkinsus*

Especie: *Perkinsus sp*

Clasificación taxonómica resultante del análisis y la observación de estructuras, tales como: la presencia de un complejo apical, una membrana sub pelicular, así como la formación de microsporas y zoosporas; durante su ciclo de vida (Perkins, 1976, citada por Levine, 1978). Que luego fue confirmado gracias a las técnicas moleculares (Leander y Keeling, 2004).

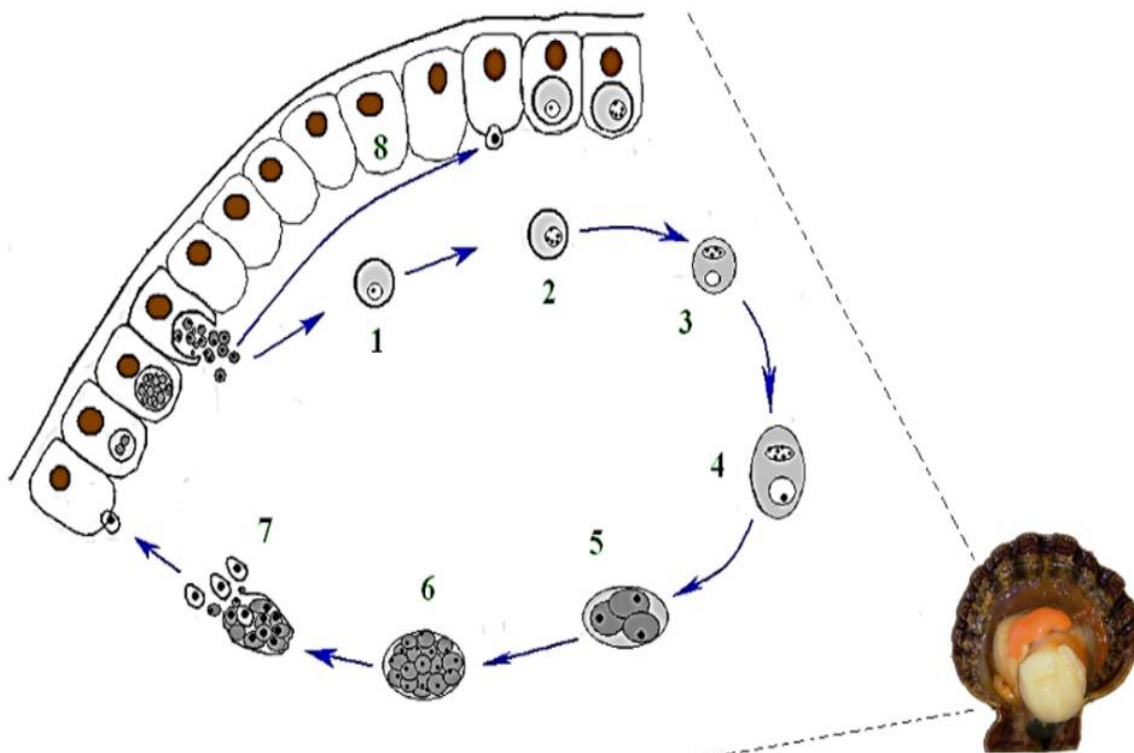
C. Ciclo biológico

- **Fase Vegetativa:** Se podría considerar como su fase netamente parasitaria, ya que ocurre dentro de los bivalvos. Esta fase inicia con la aparición de un trofozoíto inmaduro (3 a 7 μm) de forma esférica y con bordes regulares. Al madurar, este trofozoíto incrementa su tamaño (10 a 20 μm) gracias al desarrollo de una vacuola excéntrica arandelada, llamada vacuoplasto. (Goggin y Lester, 1995) (Figura 6).

Luego, esta célula al dividirse por fisión múltiple (esquizogonia), origina de 8 a 32 células hijas; a este conjunto de células hijas dentro de una vacuola se le denomina Tomonte (10 a 40 μm) (Soniati, 1996). Posteriormente, la pared del tomonte se rompe y libera a los trofozoitos inmaduros los cuales iniciarán un nuevo ciclo de infección.

Figura 6

Ciclo de vida de Perkinsus sp – fase vegetativa



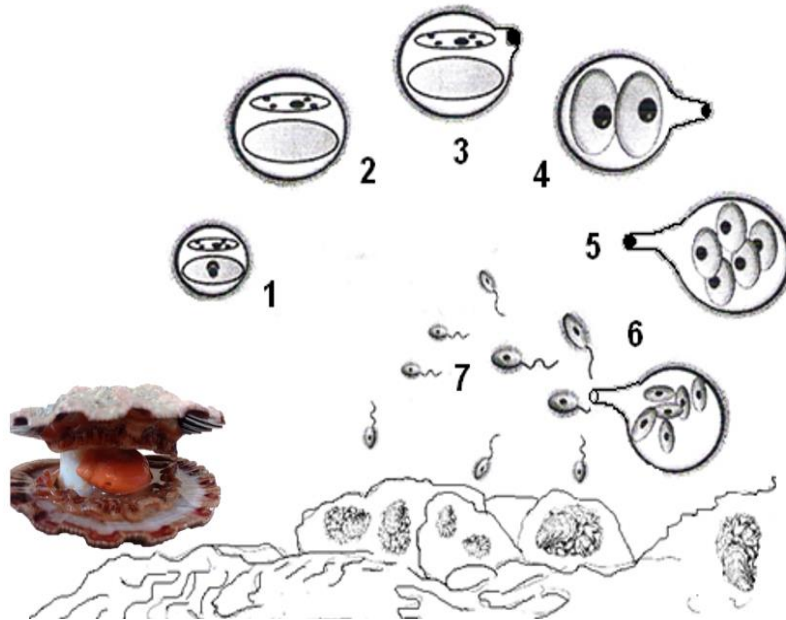
Nota. Se indica (1-2) trofozoíto inmaduro, (3) trofozoíto en desarrollo de vacuola, (4) trofozoíto maduro, (5) trofozoíto en fisión múltiple, (6) tomonte, (7) rompimiento de la pared del tomonte y liberación de trofozoitos inmaduros, (8) células de ostión. Modificada de Guzmán, 2014.

- **Fase de vida libre:** *Perkinsus sp.*, tiene la capacidad de sobrevivir fuera de un hospedero, bajo un estado denominado hipnospora. Este estadio se origina cuando el trofozoíto aumenta su tamaño entre los 40 y 150 μm , desintegra su vacuoplasto y se rodea de una pared gruesa (Figura 7). Esta metamorfosis fue evidenciada por Ray en 1952; originando la técnica de detección microbiológica de RFTM.

En el medio, la hipnospora puede dividirse o entrar en etapa de latencia por largos periodos con la capacidad de esporular (Casas et al., 2002). La hipnospora origina un poro con un tubo de descarga, mientras en simultáneo se produce un proceso palintómico, que consiste en una reproducción asexual dentro de un quiste; con lo que se forman numerosas zoosporas (1000 a 2000) mononucleadas, con múltiples vacuolas móviles, debido a que portan dos flagelos laterales (Perkins y Menzel, 1966, citado por Casas et al., 2002). Las zoosporas liberadas en el agua, pueden infectar a nuevos bivalvos, infectando principalmente los tejidos de branquia y manto. Presumiblemente las zoosporas pierden sus flagelos y complejo apical, convirtiéndose en trofozoitos inmaduros una vez que entran al hospedero (Perkins, 1996).

Figura 7

Ciclo de vida de *Perkinsus* sp – fase de vida libre



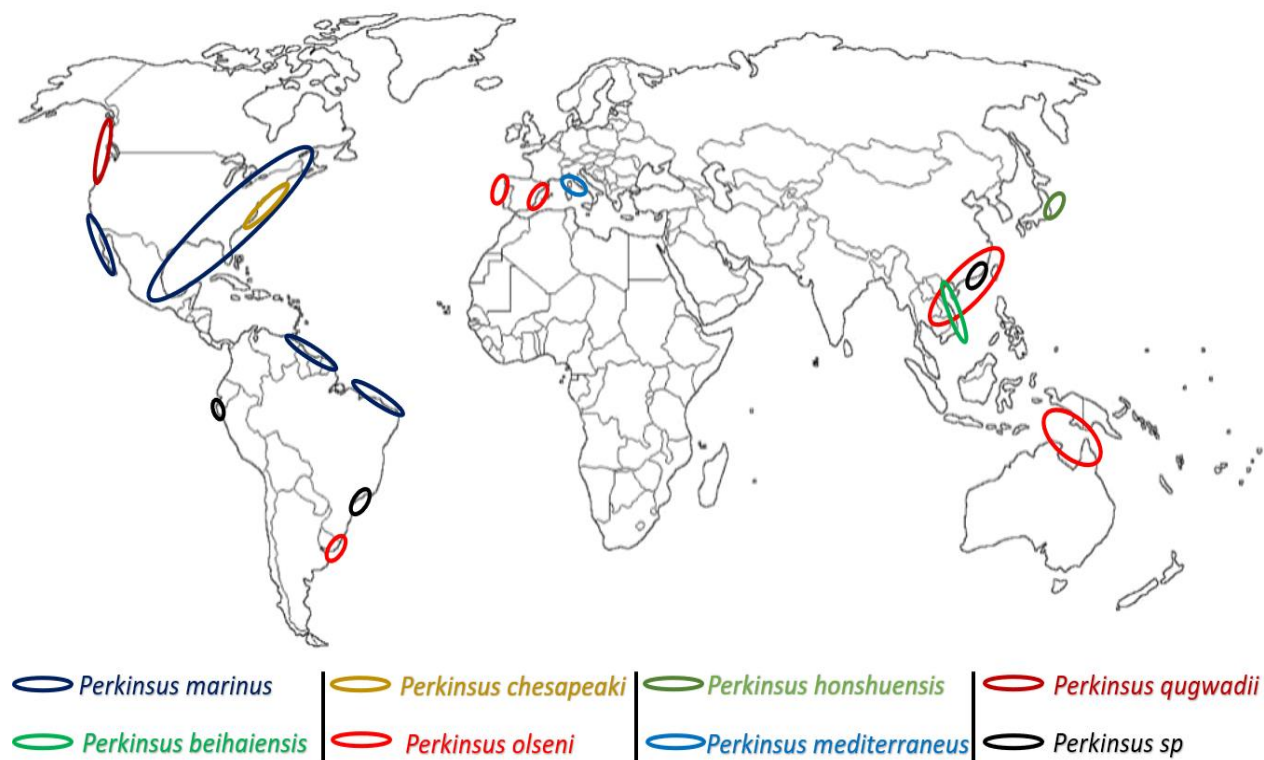
Nota. Se indica (1 - 2) Aumento notable de tamaño del trofozoitos maduro y pérdida del vacuoplasto, (3) desarrollo de tubo de descarga y poro, (4 - 6) formación de numerosas zoosporas biflageladas por palintomía, (7) liberación de zoosporas móviles. Modificada de Guzmán, 2014.

D. Distribución

Se han descrito 7 especies del género *Perkinsus*, las cuales están distribuidas a nivel mundial (Figura 8). *P. olseni*, *P. marinus*, *P. beihaiensis*, *P. chesapeaki*, *P. qugwadii*, *P. mediterraneus* y *P. honshuensis*, siendo las dos primeras las que generan mayor impacto en la producción de bivalvos; por lo que son de reporte obligatorio para la OMSA (Villalba, 2008).

Figura 8

Distribución global de Perkinsus sp.



E. Transmisión y Método de infección

Los *Perkinsus* se transmiten mediante una infección horizontal, los estadios parasitarios son liberados mediante las excretas o al morir el animal (Bushek et al., 2002). La velocidad de división y capacidad de infección, dependerá de la susceptibilidad del hospedador, las condiciones ambientales y la especie del parásito (Chu, 1996). A la fecha no se han portado evidencias de una transmisión vertical (OMSA, 2021).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

1. MATERIALES

1.1 Población y muestra

A. Población

La población estuvo conformada por cien (100) organismos adultos de *Nodipecten subnodosus*, comprados a los pescadores artesanales de Puerto Pizarro (Figura 9). Se trabajó con organismos vivos (a fin de preservar el buen estado de la muestra) y que hayan alcanzado por lo menos 8cm de altura valvar (organismos adultos con al menos un desove en su ambiente natural).

Figura 9

Adultos de Nodipecten subnodosus



Nota. Se muestran animales extraídos por los pescadores artesanales, acondicionados en las instalaciones del CEBAP.

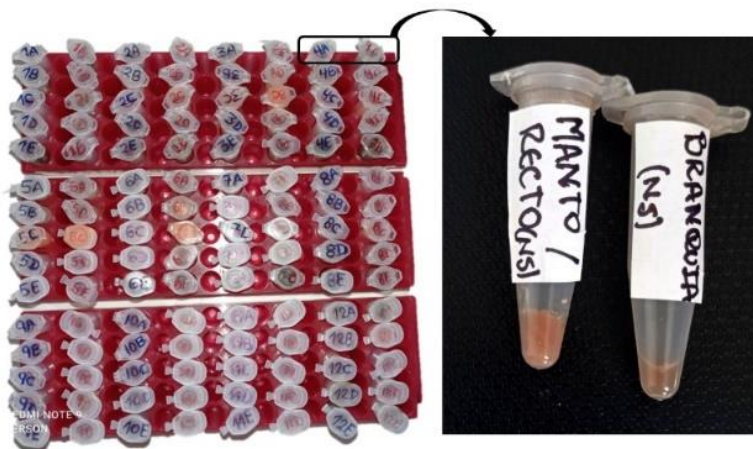
B. Muestra y Contramuestra

A cada *N. subnodosus* se le realizó cuatro (04) cortes histológicos de 5mm² (aproximadamente), dos provenientes de recto/manto y dos de las branquias; haciendo un total de 400 cortes histológicos. Por organismo se obtuvo dos muestras provenientes de recto/manto y branquia (Figura 10); y dos contra muestras homólogas a las muestras procesadas.

Muestras y contramuestras fueron rotuladas con los mismos códigos, las muestras fueron encubadas por siete días en RFTM y las contramuestras fueron conservadas a -20°C, hasta su uso.

Figura 10

Cortes (muestras) de Nodipecten subnodosus



2. METODOLOGÍA

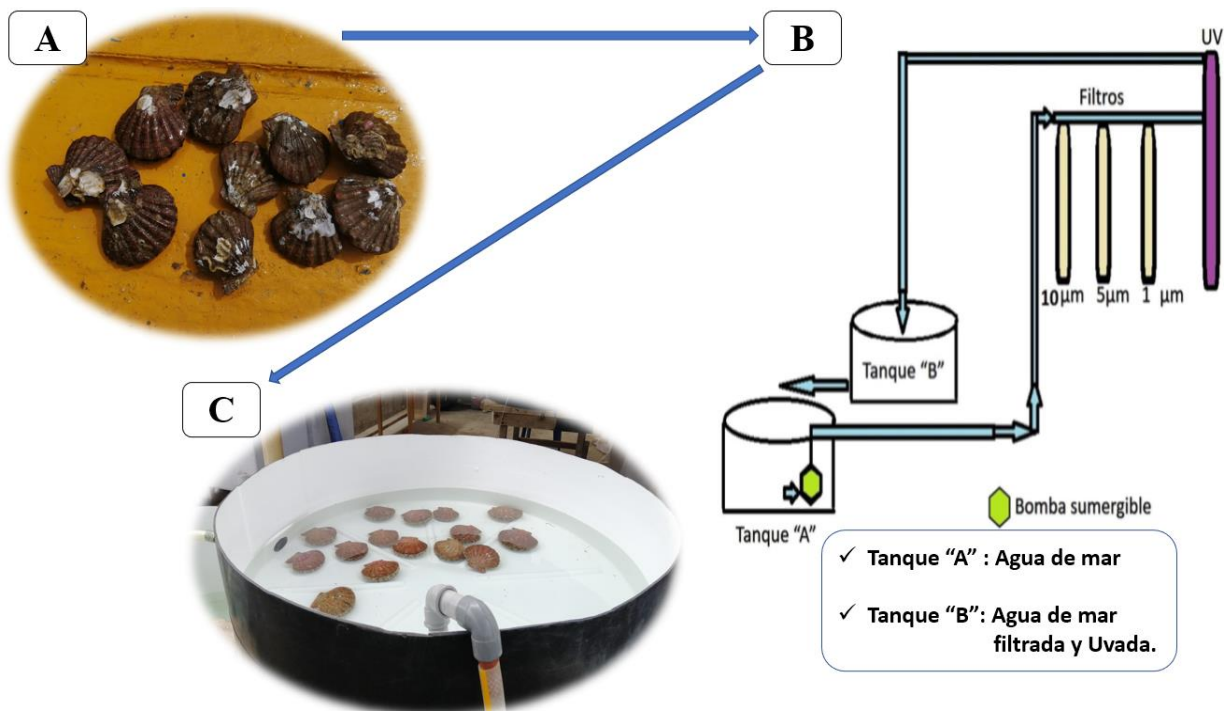
2.1 Obtención de la muestra

A. Etapa uno

Al llegar los organismos al CEBAP, inmediatamente fueron lavados con abundante agua de mar a fin de extraer cualquier epibionte y/o sustancia que este sobre sus valvas. Los organismos limpios fueron llevados a una sala de acondicionamiento, en donde fueron colocados en tanques, con agua de mar filtrada y expuesta a radiación UV (orden de filtrado: 10 μm - 5 μm y 1 μm). Esto a fin de evitar que el animal adquiriera nuevos patógenos durante su acopio y acondicionamiento (Figura 11).

Figura 11

Obtención de la muestra, etapa uno



Nota. A) Organismos capturados por pescadores artesanales; B) Sistema de filtrado y UVado del agua de mar; C) Organismos en acondicionamiento.

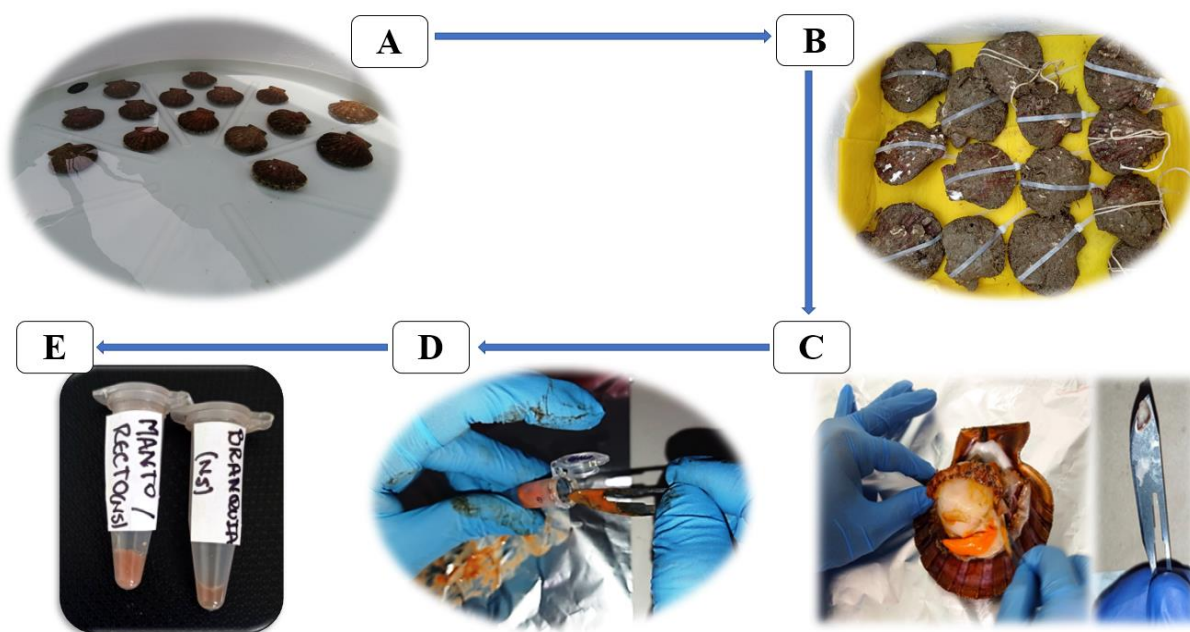
B. Etapa dos

Los animales acondicionados que se presentaban moribundos o morían en el proceso, eran trasladados frescos (en húmedo) a las instalaciones de Inca'Biotec para tomar la muestra y contra muestra. Los animales sobrevivientes, eran utilizados como reproductores en otras investigaciones.

Para la toma de muestras y contra muestras se utilizó un bisturí estéril por cada organismo, los cortes fueron colocados en tubos eppendorf individuales de 1.5ml; rotulados indicando el código del organismo ("1, 2, 3 ...") y la procedencia de la muestra ("MR" recto/manto, "B", branquia) (Figura 12). Las contramuestras fueron conservadas a -20°C.

Figura 12

Obtención de muestras y contra muestras, etapa dos



Nota. A) Organismos acondicionados; B) Traslado en húmedo; C) Toma de muestra (5mm²); D) Colocación de muestra en tubos eppendorf de 1.5ml; E) Muestra final.

2.2 Caracterización de control positivo

En una investigación realizada en el 2020, se detectó por primera vez la presencia de *Perkinsus spp* en *Anadara tuberculosa* y *Argopecten purpuratus* (Zavala M, 2020).

Los amplicones positivos para *Perkinsus sp*, fueron enviados a secuenciar a la empresa Macrogen (Korea del Sur), las secuencias obtenidas fueron alineadas utilizando el programa MEGA 7 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis Versión 7.0), las secuencias completas fueron comparadas con la base de datos de Blast (National Center for Biotechnology Information- NCBI, 2020) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Se eligió la clasificación hasta el nivel de especie para las secuencias con valores de 99 al 100% de similitud.

2.3 Análisis de muestras y contra muestras

A. Prueba microbiológica.

De acuerdo a las recomendaciones de la Organización Mundial de Sanidad Animal – OMSA, 2019; se realizó la prueba de RFTM.

• Incubación de Ray's en Medio Líquido de Tioglicolato (RFTM)

Las muestras fueron incubadas individualmente en RFTM (Ray,1966) suplementado con antibióticos (400,000u de penicilina ,400mg/L sulfato de estreptomicina y 400mg/L eritromicina) a fin de evitar el crecimiento de bacterias contaminantes (Casas, et al., 2008). Luego de siete días de incubación en total oscuridad y a una temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$, los tejidos fueron macerados sobre un porta objeto, teñidos con yodo de lugol al 3% y examinados con un microscopio en búsqueda de

hipnosporas de *Perkinsus sp.* Las presuntas hipnosporas fueron medidas con el programa IC measure a un aumento de 100X.

• **Estimación de la prevalencia de *Perkinsus* en la muestra**

La prevalencia parasitaria es el número de organismos infectados (OI) entre el número de organismos examinados (OE) expresado en porcentaje (Cáceres- Martínez et al., 2010), y se determinó con la siguiente fórmula:

$$PE (\%) = \{OI/OE\} \times 100$$

Dónde:

PE%= Porcentaje de organismos infectados en la población estudiada.

OI= Número de organismos infectados

OE= Número de organismos examinados.

• **Estimación de la prevalencia de *Perkinsus* por organismo**

La prevalencia parasitaria por organismo es la estimación de que tanto o tan poco está infectado un organismo, es una estimación individual; para ello se le asigna un grado de intensidad de infección y un valor numérico de infección; ambos deben calzar dentro de la descripción asignada por Makin, 1962.

Tabla 1

Índice de infección de acuerdo a la escala de Mackin (1962). Modificado por Craig et al, 1989.

SIGLAS	INTENSIDAD DE INFECCIÓN	VALOR NUMÉRICO	DESCRIPCIÓN
N	NEGATIVA	0.00	Sin hipnosporas
VL	MUY LIGERA	0.33	1 - 10 hipnosporas
L-	LIGERA	0.67	11 – 74 hipnosporas
L		1.00	75 – 125 hipnosporas
L+		1.33	>125 pero <25% del tejido
LM-		1.67	>25% del tejido
LM		2.00	25% del tejido
LM+	LIGERA/MODERADA	2.33	>25% pero <50% del tejido

M-		2.67	>25% pero <50% del tejido
M	MODERADA	3.00	50% del tejido
M+		3.33	>50% pero <75% del tejido
MH-		3.67	>50% pero <75% del tejido
MH	MODERADA/INTENSA	4.00	75% del tejido
MH+		4.33	> 75% pero mucho >100% del tejido
H-		4.67	>75% del tejido visible
	INTENSA		
H		5.00	100% del tejido

B. Pruebas moleculares

• Obtención de ADN genómico

Para la extracción de ADN genómico se utilizaron las contramuestras de las presuntas muestras positivas mediante el diagnóstico microbiológico, previamente conservadas a -20°C. Dichas contramuestras pasaron por un proceso de descongelamiento progresivo a fin de no generar un shock térmico que dañe el material genético. Fueron puestas a 4°C por 3 horas y posteriormente a temperatura ambiente por 1 hora más. Luego de 4 horas de descongelamiento progresivo, se realizó la extracción de ADN genómico; siguiendo los protocolos de extracción: CTAB modificado y Kit Power Soil.

• Cuantificación de ADN

El ADN extraído fue cuantificado en un espectrofotómetro UV-Vis Implen NanoPhotometer™ NP80; con el que se valoró la concentración del ADN extraído teniendo en cuenta una longitud de onda de 260nm; mientras que para estimar la pureza se utilizó el valor de absorbancia de A260/280 y A260/230 (Figura 13).

Figura 13

Espectrofotómetro UV-Vis Implen NanoPhotometer™ NP80



Primero se calibró el espectrofotómetro colocando 1µl de blanco (control de extracción) sobre el láser, se limpió con hidróxido de sodio (NaOH) al 0.2 normal y se secó con papel tissue. Luego se cuantificó cada muestra y se blanqueó cada 10 mediciones para evitar contaminaciones y/o errores de lectura. La limpieza y secado del láser se realizó después de cada medición.

• **Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

Para el Master mix de PCR, se utilizó una enzima termoestable (Taq polimerasa), dinucleótidos (dNTPs), iniciadores (Primers Forward y Reverse), agua ultra pura (AUP), buffer 10X, sales (MgCl₂); todo esto en un volumen neto de 24 ul (Pre Master Mix) y se enrazó con 1ul de ADN genómico, haciendo un volumen total de 25 ul (Master Mix). La reacción se realizó en un termociclador TurboCycler 2 (Blue-Ray Biotech).

Todas las PCR se realizaron con las muestras correspondientes y los controles necesarios, manteniendo los siguientes códigos:

- ✓ B: Branquias.
- ✓ MR: Manto/Recto.
- ✓ C+: Control positivo (ADN proveniente de *Anadara tuberculosa*, confirmado por PCR, Nested PCR y secuenciamiento de bases).
- ✓ C-: Control negativo (ADN proveniente del control de extracción).
- ✓ PCR: Control de PCR (Pre Master Mix).
- B y MR, se codificaron también con el número correspondiente a la muestra (1B, 2B.....
- 1MR, 2MR....).

• **PCR gen COI**

El gen mitocondrial citocromo oxidasa I (COI) es la subunidad principal del complejo citocromo C oxidasa (COX1) (complejo proteico transmembrana - “complejo respiratorio IV”). Se encuentra en bacterias y en las mitocondrias de organismos eucariontes, por lo que presenta una alta fidelidad al ser usado como un código de barras de ADN para identificar organismos (Luo et al., 2011).

La amplificación del gen COI, establece la veracidad y efectividad de la extracción de ADN genómico, ya que este gen se manifiesta en diferentes especies de moluscos y protozoos.

Reactivos por cada reacción de PCR: 0.1µl Taq polimerasa, 0.5µl dNTPs mix, 0.6 µl de cada Primers: F (HCO 1490) GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G / R (LCO 2198) TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA, 2.5µl Buffer 10x, 19.7µl de AUP y 1 µl ADN molde. La reacción se realizó con las siguientes temperaturas: 95°C – 1min (1 ciclo), seguida de 35 ciclos de 95°C – 30seg, 50°C – 45seg, 72°C – 45seg y finalmente 72°C – 5min (1 ciclo). Obtuvimos un amplicón de 725pb

• **PCR ITS *Perkinsus***

El espaciador transcrito interno (ITS, del inglés Internal Transcribed Spacer) es un fragmento del genoma del ADN espaciador, situado entre el ADN ribosómico (ADNr) nuclear y es una zona altamente conservada entre los miembros del género *Perkinsus*. Reactivos por cada reacción de PCR: 0.1µl de Taq polimerasa, 0.5µl dNTPs mix, 2.5µl Buffer 10x, 19.7µl AUP, 1µl plantilla de ADN y 0.6µl de cada Primers: F (PerkITS-85) CCG CTT TGT TTG GAT CCC / R

(PerkITS-750) ACA TCA GGC CTT CTA ATG ATG; estos Primers permiten detectar cualquier especie de *Perkinsus*, con excepción de *P. qugwadi*.

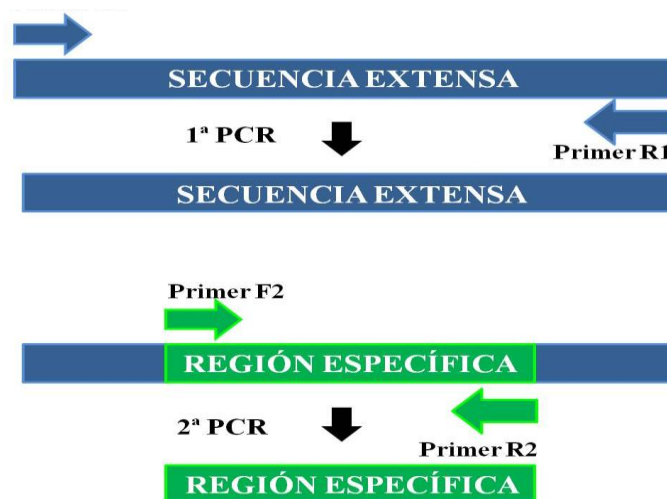
La reacción se realizó con las siguientes temperaturas: 94°C – 4min (1 ciclo), seguida de 40 ciclos de 95°C – 1min, 55°C – 1min, 72°C – 1min y finalmente 72°C – 10min (1 ciclo). Obtuvimos un amplicón de 703pb.

• PCR Nested *Perkinsus*

También llamada PCR anidada es una variante de la PCR convencional, que presenta una mayor sensibilidad y especificidad. Consiste en una PCR doble y continua, en la primera corrida o PCR₁ se utilizan primers externos y en la PCR₂ se utilizan primers internos. Por lo que en la PCR₁ obtenemos un amplicón de mayor tamaño y de menor especificidad que en la PCR₂ (Figura 14).

Figura 14

Representación de una Nested PCR



Nota. Imagen tomada de Analytical Biotech, PCR anidada. Recuperado de

<https://analyticalbiotech.wordpress.com/pcr-anidada/>. Obra de dominio público

Reactivos por cada reacción de PCR₁: 0.2 µl de Taq polimerasa, 0.5 µl de dNTPs mix, 2.5µl de Buffer 10x, 2.5µl MgSO₄, 17.1µl de AUP, 1µl plantilla de ADN y 0.6µl de cada Primers: F (Pk ITS Fw 1) AAA ACG AAA TTC CAA ACT CTC AAC / R (Pk ITS Rev 1) GTG CAA ACC GAC AAG CGT G.

La reacción se realizó con las siguientes temperaturas: 94°C – 5min (1 ciclo), seguida de 35 ciclos de 94°C – 30seg, 58°C – 45seg, 72°C – 45seg y finalmente 72°C – 6min (1 ciclo). Obtuvimos un amplicón de 526pb.

Para realizar la PCR₂ se utilizó 0.2 µl de Taq polimerasa, 0.5 µl de dNTPs mix, 2.5µl de Buffer 10x, 2.5µl MgSO₄, 17.1µl de AUP, 1µl plantilla de ADN y 0.6µl de cada Primers: F (Pk ITS Fw 2) ATA TCA GTG TCG CTC TTC TTC CC / R (Pk ITS Rev 1) GTG CAA ACC GAC AAG CGT G.

La reacción se realizó con las siguientes temperaturas: 95°C – 5min (1 ciclo), seguida de 35 ciclos de 94°C – 30seg, 58°C – 30seg, 72°C – 45seg y finalmente 72°C – 6min (1 ciclo). Obtuvimos un amplicón de 368pb.

• **Electroforesis y revelado del gel**

Los amplicones se analizaron cuantitativamente mediante electroforesis. Se preparó un gel de agarosa al 1.5%, preparado con Buffer TAE 1X (Tris-Acetato-EDTA), bromuro de etidio al 0.5 ng/ml; como intercalante fluorescente y migrado en Buffer TAE 1X.

Los amplicones fueron homogenizados con azul de bromofenol 6X y colocados en los pocillos del gel, en un volumen final de 6µl, migrados a 70 V durante 45 min. Se empleó un

marcador de peso molecular de 1Kb (abre cada 100pb) que permitió determinar el tamaño de los amplicones.

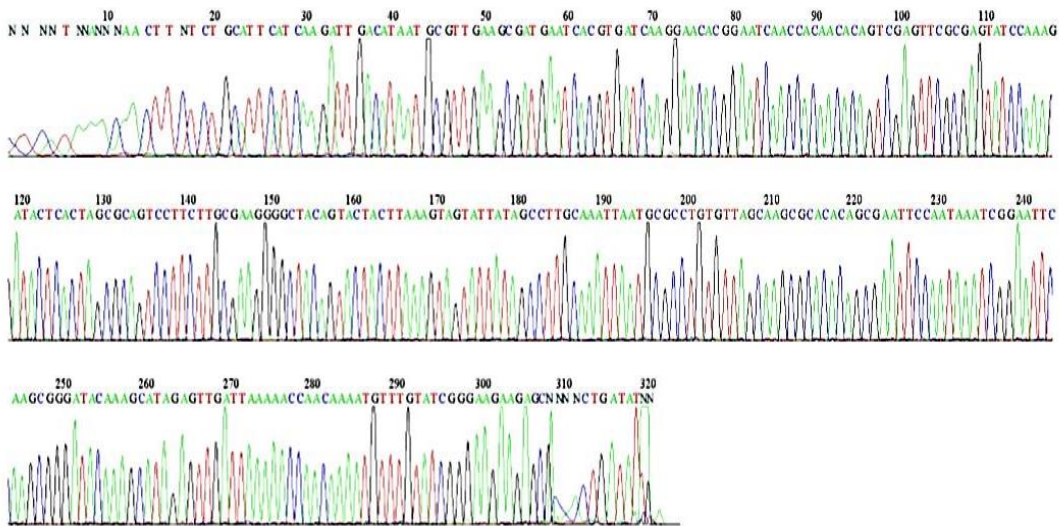
Finalmente, se visualizó el gel en un transiluminador UV, marca Vilber Lourmat Super Bright, modelo FTX - 20MX, con un tamaño de filtro 200nm x 200nm.

IV. RESULTADOS

1. CARACTERIZACIÓN DEL CONTROL POSITIVO

Los resultados de la secuenciación, permitieron identificar a las especies *Perkinsus chesapeaki* y *Perkinsus beihaiensis* en *Anadara tuberculosa*. Estos resultados corresponden a la primera identificación molecular de *Perkinsus sp* en esta especie de moluscos bivalvos y a la primera detección confirmada de *Perkinsus sp* en el Perú.

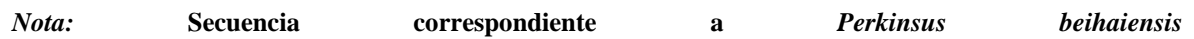
Figura 15
Pictograma de secuencia de *Perkinsus chesapeaki*



Nota: Secuencia correspondiente a *Perkinsus chesapeaki*

TCTGCATTTCATCAAGATTGACATAATGCGTTGAAGCGATGAATCACGTGATCAAGGAACACGGAA
TCAACCACAACACAGTCGAGTTTCGCGAGTATCCAAAGTACTCACTAGCGCAGTCCTTCTTTCGAA
GGGGCTACAGTACTACTTAAAGTAGTATTATAGCCTTGCAAATTAATGCGCCTGTGTTAGCAAGC
GCACACAGCGATTCCAATAAATCGGAATTCAAGCGGGATACAAAGCATAGAGTTGATTAAAAACC
AACAAAATGTTTGTATCGGGAAGAAGAGC.

Pictograma de secuencia de Perkinsus beihaiensis



La caracterización mediante secuenciamiento de nucleótidos; nos da la certeza de tener un control positivo idóneo para las PCR que permitan detectar *Perkinsus spp* en *Nodipecten subnodosus*.

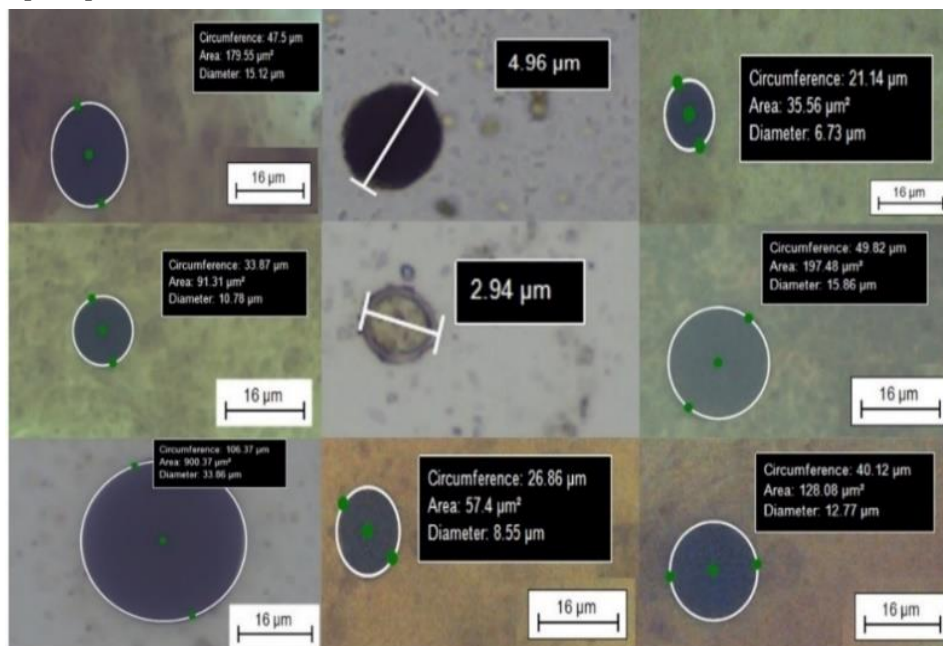
2. PRUEBAS MICROBIOLÓGICAS

1.1 Análisis microscópico del cultivo en RFTM

Se analizaron las muestras siguiendo las recomendaciones de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OMSA,2019). A la observación microscópica, veinte (20) organismos presentaban estructuras similares a hipnosporas, por lo que recibieron la denominación de “presuntas hipnosporas” (Figura 15). Al ser observadas a 100X y medidas con el programa IC Measure, se pudo evidenciar que no todas cumplían con la morfología típica de hipnosporas de *Perkinsus spp.*

Figura 17

Presuntas hipnosporas de Perkinsus.



3. PRUEBAS MOLECULARES

El diagnóstico molecular es necesario para evitar los falsos positivos y errores de una mala lectura del diagnóstico microbiológico (RFTM).

2.1 Extracción y cuantificación de ADN genómico

A. Extracción con CTAB modificado y Kit Power Soil

Ambas técnicas proporcionaron un ADN con una óptima concentración y de alta pureza, ADN ideal para las PCR.

- Concentración de ADN extraído con CTAB modificado: Entre los 500 ng/μl y 1000 ng/μl. Por lo que se realizó una dilución de 1/10.
- Concentración de ADN extraído Kit Power Soil: Entre los 100 ng/μl y 500 ng/μl. Y con una mayor pureza que el obtenido con CTAB modificado.

2.2 PCR y Electroforesis

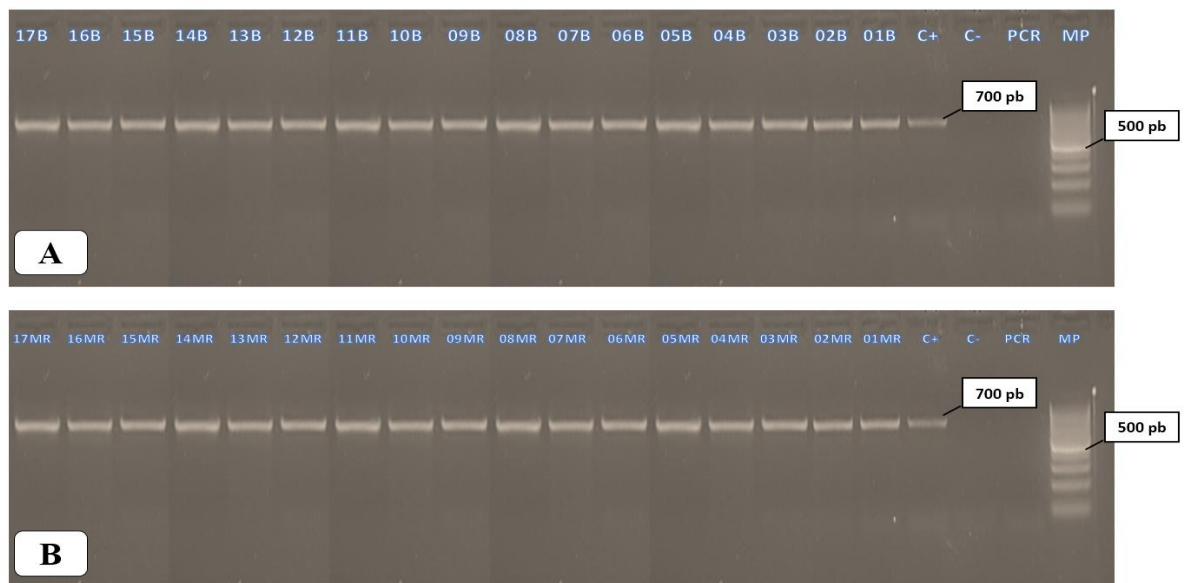
Los amplicones obtenidos en las pruebas de PCR fueron revelados en un gel de agarosa al 1.5% (análisis cualitativo). Todas las PCR presentan los siguientes códigos: C⁻=Control negativo; C⁺=Control positivo; PCR=Control de PCR y MP=Marcador de Peso Molecular.

A. Gen COI

Todos los amplicones resultaron positivos para el gen COI, los controles de PCR y C- salieron negativos; mientras que el C+ salió positivo. (Figura 18).

Figura 18

Electroforesis de gen COI



Nota. Se muestra A) Corrida de muestras branquiales; B) Corrida de muestras de manto/recto.

Los amplicones obtenidos presentan un tamaño aproximado a los 700pb.

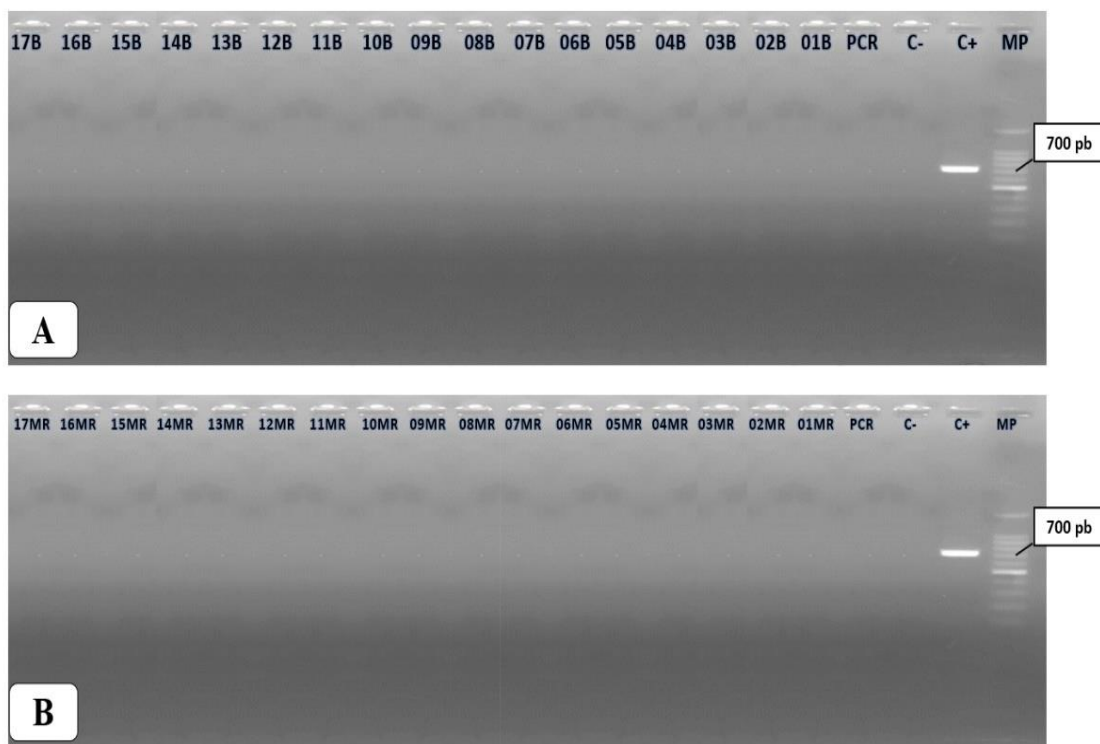
B. ITS *Perkinsus sp.*

El 100% de los amplicones salieron negativos para ITS *Perkinsus sp.*, el control de PCR y C-, salieron negativos; mientras que el C+ salió positivo con un tamaño aproximado de 700pb (Figura 19).

Los resultados obtenidos con la PCR ITS *Perkinsus sp.*, nos indican que la infección por *Perkinsus sp.*, es nula. Debido a este resultado se optó por realizar una Nested PCR, ya que basados en los antecedentes y reportes del parásito en especies similares y cercanas a *Nodipecten subnodosus*; es muy poco probable que *N. subnodosus* no presente infección o contagio.

Figura 19

Electroforesis ITS Perkinsus sp.



Nota. Se muestra A) Corrida de muestras branquiales; B) Corrida de muestras de manto/recto. Los amplicones obtenidos en la PCR resultaron negativos; solo amplifico el C+, con un tamaño aproximado de 700pb.

C. Nested *Perkinsus sp.*

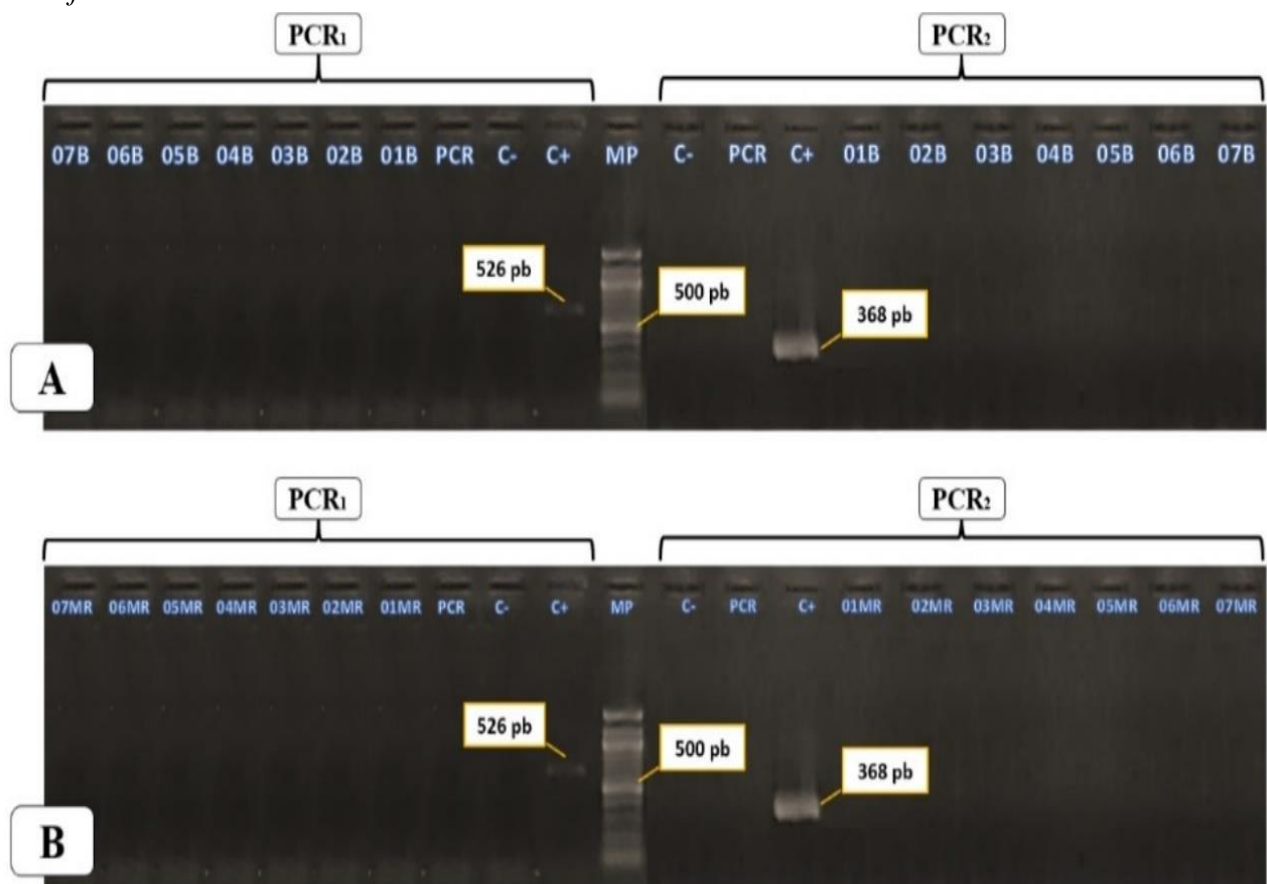
Debido a que, el 100% de los amplicones (muestras) de ITS *Perkinsus sp.*, salieron negativos; se realizó una Nested *Perkinsus sp.* PCR, como prueba confirmatoria. Con los resultados

obtenidos con la Nested PCR, confirmamos la ausencia de *Perkinsus sp.* en las muestras de *Nodipecten subnodosus*. En la PCR₁ y PCR₂; solo amplificaron los C+ (Figura 20).

Algunos amplicones mostraron smear, proveniente de restos Primers; al no encontrar un ADN molde con quien hibridarse, estos reactivos se mantienen y se reflejan en forma de bandas muy tenues en la parte inferior del gel. La presencia de smear no resta relevancia a los resultados obtenidos en esta investigación; por el contrario, ya que muestra la ausencia de material genómico de *Perkinsus sp.*

Figura 20

Electroforesis Nested Perkinsus



Nota. Se muestra A) Corrida de muestras branquiales; B) Corrida de muestras de manto/recto. Los amplicones obtenidos en la PCR₁ y PCR₂, resultaron negativos; con excepción del C+, con un tamaño aproximado de 520pb para PCR₁ y 360pb para PCR₂.

V. DISCUSIÓN

La hipótesis planteada: “Los organismos silvestres de *Nodipecten subnodosus*, analizados en esta investigación eran portadores de al menos una especie de *Perkinsus sp.*”; fue rechazada.

La hipótesis planteada se basó en los antecedentes y reportes globales de este patógeno en múltiples especies de bivalvos (Guzmán, 2014) afianzados con los primeros reportes en Perú de *Perkinsus chesapeaki* y *Perkinsus beihaiensis* en poblaciones silvestres y de laboratorio de *Anadara tuberculosa* “concha negra” (Pretell, 2017) y *Perkinsus chesapeaki* en *Argopecten purpuratus* “concha de abanico” (Zavala, 2020). Dichas especies habitan ecosistemas muy cercanos al hábitat de *N. subnodosus*, además de convivir en ambientes controlados en laboratorio.

Aunque, existen múltiples técnicas para diagnosticar Perkinsiosis, las técnicas microbiológicas presentan limitaciones; hasta los años 2000, el RFTM era la mejor técnica de detección de *Perkinsus spp.*, debido a su sensibilidad, simplicidad y bajo costo; pero actualmente se sabe que puede llevar a diagnosticar falsos positivos (Audemard et al., 2008, citado por la OMSA, 2019) por lo que es necesaria una confirmación genómica de la detección.

Cáceres Martínez, et al. (2012), Da Silva, et al. (2013), Pinho Brandao et al. (2013), Valencia, Bassitta, Picornell, Ramon, & Castro (2014), Ramos Queiroga, Tubinno Vianna, Barreto Vieira, Dantas Farias, & Da Silva (2015), Danta Neto, et al. (2016), Ek-Huchim et al. (2017), Cunha, et al. (2018), Shamal et al. (2018), entre otros; utilizaron la técnica RFTM solo como una prueba preliminar de detección más no de identificación, ni mucho menos como prueba definitiva. En la actualidad el diagnóstico de *Perkinsus sp* no se basa solo en los resultados obtenidos mediante RFTM, si no que deben ser validados por técnicas moleculares como la PCR o alguna de sus variantes (Pagenkopp Lohan, et al. 2018).

Estos análisis complementarios a la técnica de RFTM en los últimos años revolucionaron los estudios epidemiológicos tanto descriptivos como analíticos; con el establecimiento de la repartición geográfica, la evaluación de la interacción patógeno-hospedero, el entendimiento de las respuestas inmunológicas frente a la enfermedad y así mejorar nuestro conocimiento de las características de las especies de *Perkinsus sp.* (Zavala, 2020).

Las técnicas de detección basadas en el reconocimiento y amplificación del ADN sirven para diagnosticar con precisión el patógeno e incluso identificar nuevas especies. Dentro de entre todas las técnicas moleculares, el diagnóstico basado en PCR es considerado como el de mayor confiabilidad. En esta investigación se evidencia lo dicho líneas arriba, ya que el cultivo en RFTM permitió detectar presuntas hipnosporas de *Perkinsus sp.*, mientras que las pruebas moleculares negaron la presencia del patógeno, evitando un mal diagnóstico y un falso positivo.

Esta investigación buscó detectar por primera vez la presencia de *Perkinsus spp* en poblaciones silvestres de *Nodipecten subnodosus* del departamento de Tumbes, con el fin de evaluar el riesgo sanitario de iniciar actividades acuícolas con este pectínido tropical. Sin embargo, *Nodipecten subnodosus* no mostró evidencias de infección frente a *Perkinsus spp*, por lo que sería una especie muy atractiva para la acuicultura debido a su gran tamaño, rápido crecimiento además de su presunta refractabilidad frente a *Perkinsus sp.*

La ausencia de *Perkinsus sp.* en *N. subnodosus*, podría deberse a algún tipo de resistencia ya demostrada en otros bivalvos. Por ejemplo, Mohammad Alavi et al., 2009; demostraron que *Crassostrea ariakensis* es tolerante a *Perkinsus sp.*, debido que el patógeno muestra una reducción en su patogenicidad para dicho bivalvo, más que una resistencia a la infección por parte del mismo. Es decir, *Perkinsus sp.*, no es letal ante todos los huéspedes que infecta.

Dicha letalidad puede ser controlada por procesos bioquímicos proteicos dentro del hospedador, así lo demostraron Dina Proestou & Mary Sullivan en el 2020; tras estudiar la respuesta a la infección por *P. marinus*, en ostras orientales. Las autoras concluyen que la resistencia de estos bivalvos se debe a transcripciones asociadas a los procesos biológicos de “regulación de la proteólisis” y “proceso de oxidación-reducción”; procesos bioquímicos que constituyen un fenotipo Dermoresistente. Por su parte, Morgan Smits et al., 2020; estudiaron la resistencia de *Ruditapes philippinarum* “almeja manila” frente a *Perkinsus olseni*, dentro de un área comercial con una alta prevalencia del patógeno. Sus resultados y conclusiones manifiestan que la resistencia está ligada a condiciones genéticas heredables entre un 75% y 85%; es decir que, a padres resistentes, prole resistente.

Jiulin Chan et al., 2021; compararon las respuestas transcriptómicas frente a la infección de *P. marinus* en dos especies de ostra, *C. virginica* y *C. gigas*. Sus hallazgos sugieren que *C. virginica* y *P. marinus* tienen una historia de coevolución, por lo que los casos más actuales de perkinsosis, pueden deberse a un aumento de la virulencia del parásito. Mientras que *C. gigas* muestra una regulación positiva significativa de los inhibidores de la apoptosis (IAP); es decir presenta mayor resistencia por estar mejor equipada genéticamente.

En su conjunto, estos trabajos evidencian que existen mecanismos de resistencia a *Perkinsus* sp. dejando abierta la posibilidad que *N. subnodosus*, pueda también presentar algún tipo de resistencia conocido u otra aún no descrita. La capacidad de controlar las infecciones a *Perkinsus* podría explicar la ausencia del mismo en este bivalvo como queda evidenciado en este trabajo.

VI. CONCLUSIONES

- 1) No se detectó la presencia de *Perkinsus sp.* en conchas silvestres de *Nodipecten subnodosus*. Los individuos de *N. subnodosus* analizados en esta investigación, aparentemente no son susceptibles a infecciones por *Perkinsus sp.* Se puede suponer que presentan un tipo de resistencia a la infección y/o al desarrollo de la enfermedad.
- 2) La prevalencia y frecuencia de infección de *Perkinsus sp.* en *Nodipecten subnodosus* mediante Ray's Fluid Thioglicolato Medium (RFTM) fue nula ya que solo se hallaron presuntas hipnosporas; pero la PCR invalidó este diagnóstico. Las pruebas microbiológicas se deben usar solo como técnicas presuntivas para el diagnóstico de las infecciones y/o agentes patógenos. La técnica de RFTM puede conllevar a diagnosticar falsos positivos.
- 3) La identificación de las especies de *Perkinsus spp* en *Nodipecten subnodosus*, mediante técnicas de PCR o alguna de sus variantes no fue posible debido a la ausencia de amplificación de ADN de *Perkinsus spp*. Sin embargo, se logró secuenciar y caracterizar el control positivo de *Perkinsus sp.* en otra especie que convive con *N. subnodosus* validando la técnica y los resultados.
- 4) Las pruebas genómicas nos permiten realizar un correcto diagnóstico e identificación de los patógenos a los que nos enfrentamos.

VII. RECOMENDACIONES

- 1) A los investigadores: Siempre validar los resultados obtenidos con pruebas moleculares a fin de no dar un diagnóstico equivocado; falsos positivos o falsos negativos.
- 2) A los empresarios: Inclinar por el cultivo y/o comercialización de esta especie, ya que presenta una inocuidad frente a un patógeno que existe en otras especies de interés comercial; como lo son la concha negra y la concha de abanico.
- 3) A los estudiantes: No asustarse si la hipótesis propuesta es contraria a sus resultados, siempre habrá que formar de presentar los resultados obtenidos.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alison C., Eric N., Roger R. & James M. (1989). Distribution of *Perkinsus marinus* in gulf coast oyster populations.
- Audemard C., Reece K. & Bureson E. (2004). Real-time PCR for the detection and quantification of the protistan parasite *Perkinsus marinus* in environmental waters.
- Balseiro P., Montes J., Fernández R., Novoa B. & Figueras A. (2010). Comparison of diagnostic techniques to detect the clam pathogen *Perkinsus olseni*.
- Barrios Ruiz, Chávez villalba & Cáceres Martinez. (2003). Growth of *Nodipecten subnodosus* (bivalvia: pectinidae) in the Paz bay, México.
- Bernard, F., Mckinnell & Jamieson. (1991). Distribution and zoogeography of the bivalvia of the eastern pacific ocean.
- Blacio, E. (2002). Posibilidades de diversificación en la acuicultura ecuatoriana. Revista el mundo acuícola (CENAIM), vol. 8, pag. 2.
- Brusca, R. & Brusca. (2003). Invertebrates, second edition. Sinauer associates.
- Bureson y Ragone Calvo (1996). Epizootiología de la perkinsiosis del “osti6n de placer” *Crassostrea corteziensis* en el estado de Nayarit.
- Cáceres M., Vasquez Y. & Padilla L. (2007). *Perkinsus marinus* agente causal de la enfermedad de “dermo” encontrado en el osti6n de placer *Crassostrea corteziensis* del pacífico mexicano.

Cáceres, M. & Vásquez V. (2008). La patología en moluscos bivalvos: Principales problemas y desafíos para la producción de bivalvos en América Latina. Estado actual del cultivo y manejo de moluscos bivalvos y su proyección futura: factores que afectan su sustentabilidad en América Latina. Taller técnico regional de la FAO. 20-24 de agosto de 2007.

Cáceres-Martínez, J., García Ortega, M., Vásquez-Yeomans, R., Pineda García, T., 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. <http://doi:10.1016/j.jip.2012.03.019>

Casas, S., La Peyre, Reece, K., Azevedo C. & Villalba, A. (2002). Continuous in vitro culture of the carpet shell clam *Tapes decussatus* protozoan parasite *Perkinsus atlanticus*.

Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas - CENAIM, (2019). Reproducción, larvicultura y engorde de “ostras” *C. gigas* y “scallop” *A. ventricosus*.

Choi, K. (1997) Report on occurrence of *Perkinsus* sp. In the Manila clam *Ruditapes philippinarum* in Korea.

Chunyan Feng, Caixia Wang, Xiangmei Lin, Yongning Zhang, Jizhou Lv, Junhua Deng, Xiangfen Yuan, Lin Mei & Shaoqiang Wu (2013). Development of a loop-mediated isothermal amplification method for detection of *Perkinsus* spp. In mollusks.

Craig, A., Powell, R. & Brooks, M. (1989). Distribution of *Perkinsus marinus* in gulf coast oyster populations.

Cunha, A. L., Pontinha, V., de Castro, M. A., Sühnel, S., Medeiros, S., Moura da Luz, Á., Dafre, A. L. (2018). Two epizootic *Perkinsus spp.* events in commercial oyster farms at Santa Catarina, Brazil. Journal of Fish Disease, 1-9. <http://doi:10.1111/jfd.1295>.

Da Silva, P. M., Tubino Vianna, R., Guertler, C., Pinho Ferreira, L., Nunes Santana, L., Fernández-Boo, S., . . . Villalba, A. (2013). First report of the protozoan parasite *Perkinsus marinus* in South America, infecting mangrove oysters *Crassostrea rhizophorae* from the Paraíba River (NE, Brazil). Journal of Invertebrate Pathology, 113, 96-103. <http://doi:10.1016/j.jip.2013.02.002>.

Dall, W. (1898). Contributions to the tertiary fauna of florida, with especial reference to the miocene silex- beds of tampa, and the pliocene beds of the caloosahatchie river, including in many cases a complete revision of the generic groups treated of and their american tertiary species.

Danta Neto, M., Vasconcelos Gesteira, T., Costa Sabry, R., Galdino Feijó, R., Martins Forte, J., Boehs, G., & Maggioni, R. (2016). First record of *Perkinsus Cheseapeki* infecting *Crassostrea rhizophorae* in South America. Journal of Invertebrate Pathology, 141, 53-56. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2016.10.007>

Dungan, C. & Hamilton, R. (1995). Use of a tetrazolium-based cell proliferation assay to measure effects of in vitro conditions on *Perkinsus marinus* (apicomplexan) proliferation.

Eble, A. & Scro, R. (1996). The eastern oyster, *Crassostrea virginica*. Chapter 2 general anatomy, pag 04.

Ek-Huchim, J., Aguirre Macedo, L., Améndola-Pimenta, M., Vidal Martínez, V. M., Pérez Vega, J. A., Simá-Alvarez, R., Rodríguez Canul, R. (2017). Genetic signature analysis of *Perkinsus marinus* in Mexico suggests possible translocation from the Atlantic Ocean to the Pacific coast of Mexico. *Parasites & Vectors*, 372. <http://doi: 10.1186/s13071-017-2304-4>.

Elston, R., Dungan, C., Meyers, T. & Reece, K. (2004). *Perkinsus sp* Infection risk for manila clams, *Venerupis philippinarum* on the pacific coast of North and Central America.

Elvira Abollo, Sandra M., Casas Giuseppe, Ceschia & Antonio Villalba (2006). Differential diagnosis of *Perkinsus* species by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism assay.

Gil Recio, (2016). Laboratorio de biotecnología: bivalvos, características y clasificación. Obtenido de <https://invertebrados.paradais-sphinx.com/moluscos/bivalvos-caracteristicas-clasificacion.htm>

Guzmán L. (2014). Cultivo in vitro de *Perkinsus marinus* y desarrollo de la infección en el ostión de placer *Crassostrea corteziensis*, bases para el establecimiento de medidas de bioseguridad.

Holguin Quiñones (1976). Catálogo de especies marinas de importancia comercial en baja california sur. México. Instituto Nacional de Pesca, pag 117.

Itoiz S., Morgan P., Mouronvalle C., Derelle E., Le Goic N., Bidault A., Montaudouin X., Arzul I., Philippe S., & Chambouvet A. (2021). Development of duplex taqman-based real-time PCR assay for the simultaneous detection of *Perkinsus olseni* and *P. Chesapeakei* in host manila clam tissue samples.

La Peyre, Faisal M. & Burreson E. (1993). In vitro propagation of the protozoan *Perkinsus marinus*, a pathogen of the eastern oyster, *Crassostrea virginica*.

Mackin J., Owen M., & Collier A. (1950). Preliminary note on the occurrence of a new protistan parasite, *Dermocystidium maranum* sp in *Crassostrea virginica*.

Mackin, J (1951). Histopathology of infection of *Crassostrea virginica* by *Dermocystidium marinum* mackin, owen, and collier. Bulletin of marine science, vol 1, pag 72-87.

Madero López (2014). Epizootiología de perkinsosis en el ostión del placer (*Crassostrea corteziensis*) en el estado de nayarit.

Maeda M. & Lodeiros S. (2011). Biología y cultivo de los moluscos pectínidos del género nodipecten. Editorial Limusa, México. Pag 400.

Marquis D., Bishop J., Record R., Countway D. & Fernández R. (2020). A qPCR-based survey of *Haplosporidium nelsoni* and *Perkinsus spp.* In the eastern oyster, *Crassostrea virginica* in maine.

Morales Hernández & Cáceres Martinez (1996) Pesquería de la almeja mano de león *Lyropecten subnodosus*. En estudio del potencial pesquero y acuícola de baja

california sur. Publicado por La Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales - SEMARNAT Pag 87 -100.

Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación - FAO, taller técnico regional. (2007): Estado actual del cultivo y manejo de moluscos bivalvos y su proyección futura factores que afectan su sustentabilidad en américa latina.

Organización Mundial de Sanidad Animal- OMSA (2019) - Infección por *perkinsus marinus*.

Organización Mundial de Sanidad Animal- OMSA (2019) - Infección por *perkinsus olseni*.

Pagenkopp Lohan, K. M., Hill Spanik, K., Tochin, M. E., Fleischer, R. C., Carnegie, R. B., Reece, K. S., & Ruiz , G. M. (2018). Phylogeography and connectivity of molluscan parasites: *Perkinsus spp.* in Panama and beyond. Journal of Parasitology Research, 48(2), 135-144.

Parra Laca (2010). *Urastoma sp* y *Perkinsus marinus* en los ostiones de importancia acuícola *Crassostrea virginica* y *Crassostrea corteziensis*, ¿coevolución o transfaunación?

Peña J. (2001). Taxonomía, morfología, distribución y hábitat de los pectínidos iberoamericanos. Ciencia y acuicultura. Editorial limusa, México. Pag. 1-25.

Pinho Brandao, R., Boehs, G., Costa Sabry , R., Oliveira Ceuta, L., Dos Santos Aguiar Luz, M., Ramos Queiroga, F., & da Silva, P. M. (2013). *Perkinsus sp.* infecting

oyster *Crassostrea rhizophorae* (Guilding, 1828) on the coast of Bahia, Brazil. Journal of Invertebrates Pathology, 112, 138-141. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2012.11.003>

Pretell M., Zapata V., Masias R., Cedeño E., Lignot J., Mialhe E. & Diringer B. (2017). Detección de *Perkinsus* sp en el bivalvo *Anadara tuberculosa* “concha negra” Perú - Ecuador.

Ramos Queiroga , F., Tubinno Vianna, R., Barreto Vieira , C., Dantas Farias , N., & Da Silva, P. M. (2015). Parasites infecting the cultured oyster *Crassostrea gasar* (Adanson, 1757) in Northeast Brazil. Parasitology, 142(6), 756-766. <http://doi:doi:10.1017/S0031182014001863>

Ray M. (1954). Biological studies of *Dermocystidium marinus*, a fungus parasite of oysters. Rice inst. Pamph. Monogr. Biol. Special issue, rice university, houston, tx, pag 114.

Ríos R., Aranguren R., Arcangeli G., Novoa B. & Figueroa A. (2019). Development and validation of a specific real-time PCR assay for the detection of the parasite *Perkinsus olseni*.

Shamal, P., Zacharia, P. U., Binesh, C. P., Pranav, P., Suja, G., Asokan, P. K., Sanil, N. K. (2018). *Perkinsus olseni* in the short neck yellow clam, *Paphia malabarica* (Chemnitz, 1782) from the southwest coast of India. Journal of Invertebrate Pathology. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2018.10.001>

Smith J. (1991). Cenozoic giant pectinids from california and the tertiary caribbean province: *Lyropecten*, “*macrochlamis*”, *Veripecten* and *Nodipecten* species. Government printing office, Washington.

Valencia, J., Bassitta, M., Picornell, A., Ramon, C., & Castro, J. (2014). New data on *Perkinsus mediterraneus* in the Balearic Archipelago: locations and affected species. Disease of Aquatic Organisms, 112(1), 69-82. <http://doi:10.3354/dao02795>.

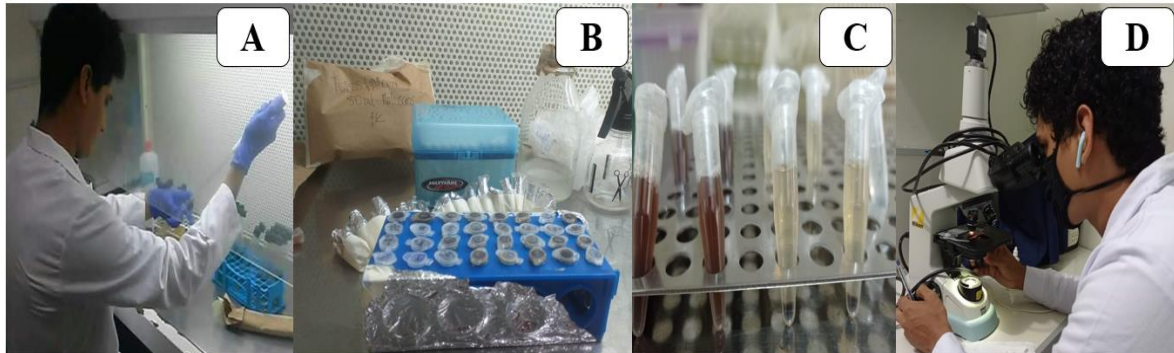
Zavala A. (2020). Detección por cultivo, identificación molecular y “shotgun proteomic” de *Perkinsus sp* en *Argopecten purpuratus* “concha de abanico” (lamarck, 1819) y *Anadara tuberculosa* “concha negra” (sowerby, 1833).

Zhixun Xie, Liji Xie, Qing Fan, Yaoshan Pang, Xianwen Deng, Zhi Qin Xie, Jiabo Liu & Mazhar Khan (2013). A duplex quantitative real-time PCR assay for the detection of Haplosporidium and Perkinsus species in shellfish.

IX. ANEXOS

Anexo 1

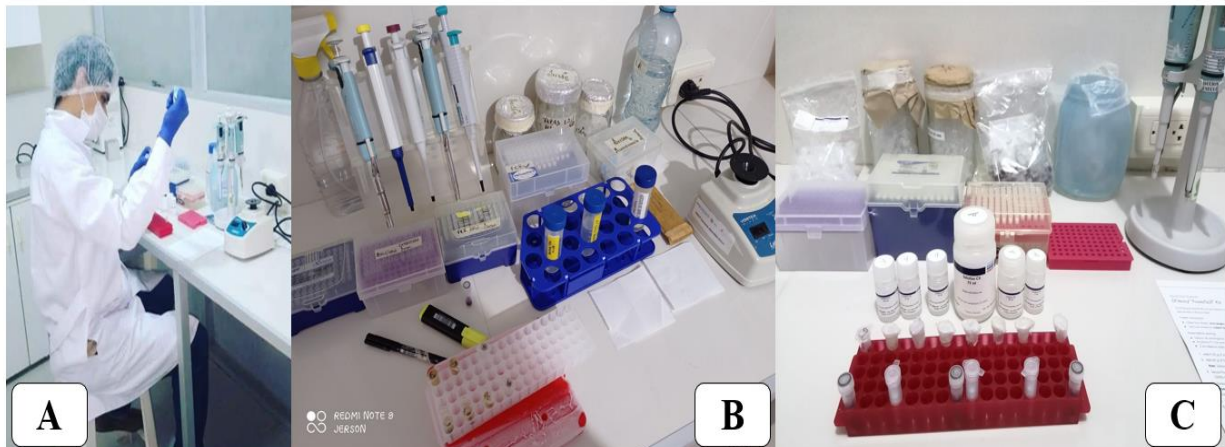
Análisis microbiológico



A) Inoculación de RFTM suplementado con antibiótico; B) Abertura de muestras con siete días de incubación; C) Las muestras evidencian diferencias colorimétricas (oscuro=Branquias, claro= Recto/Manto); D) Análisis microscópico de las muestras.

Anexo 2

Extracción de ADN



A) Procedimiento; B) Materiales y reactivos utilizados en método CTAB modificado; C) Materiales y reactivos utilizados en método Kit Power Soil.

Anexo 3

Protocolo de extracción de ADN – CTAB modificado

Los tejidos se digirieron en 500 μ l de CTAB modificado, que contiene: 0.1M Tris-HCl pH 8.0, EDTA 20 mM pH 8.0, NaCl 1.4 M, 2% de CTAB w / v) que contiene 1 μ l de β -mercaptoetanol (Sigma-Aldrich) y 60 μ l de Proteinasa K (se agregaron inmediatamente antes de incubar).

- 1) Pesar 0.1g (aprox) de tejido y colocarlo en un tubo de 1.5 ml.
- 2) Lavar el tejido con solución salina al 2% (Centrifugar a 10000 rpm por 5 min).
- 3) Sacar el tejido lavado en un nuevo tubo y agregar de 500 μ l a 700 μ l de CTAB modificado.
- 4) Agregar 60 μ l de Proteinasa K.
- 5) Incubar toda la noche a 56°C en una plataforma de agitación (rpm ajustado a 150).
- 6) Enfriar a temperatura ambiente (10 a 15 min)
- 7) Luego, se agrega 500 μ l de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) a cada muestra, mezclar por inversión y centrifugado a 12 000 G durante 15 min a 4°C.
- 8) Transferir el sobrenadante a tubos nuevos que contengan un volumen de 2/3 de isopropanol, (2 propanol), mezclar por inversión, y dejar precipitar el ADN.
- 9) Reposar a temperatura ambiente durante 30 minutos, luego centrifugar a 12000 G durante 15 min a 4°C.
- 10) Recuperar el pellet y lavar 2 veces con etanol helado al 75%
- 11) Resuspender en 30 μ l de tampón Tris-HCl 5 mM (pH = 8,5).
- 12) Agregar 50 μ g de RNasa (Thermo Fisher)

Anexo 4

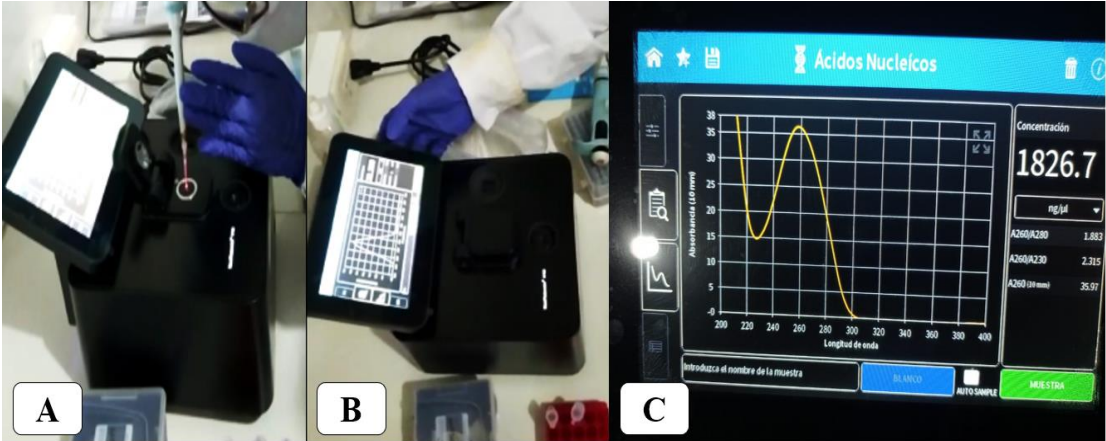
Protocolo de extracción de ADN – Kit Power Soil

- 1) Agregar 0.2gr (aprox) de muestra en los tubos PowerBead.
- 2) Vortexear suavemente hasta homogenizar.
- 3) NOTA: Verificar si la SOLUCION C1 está precipitada, en caso lo estuviera calentar a 60°C, para que se disuelva antes de su uso.
- 4) Agregar 60 µl de la SOLUCION C1 e invertir varias veces o vortexear brevemente.
- 5) Vortexear vigorosamente por 10 minutos.
- 6) Centrifugar a 10,000xg por 30 segundos.
- 7) Transferir el sobrenadante (entre 400-500ul) a los tubos de 2 ml Collection Tube
- 8) Agregar 250 µl de la SOLUCION C2 y vortexear por 5 segundos.
- 9) incubar a 4°C por 5 minutos.
- 10) Centrifugar los tubos a temperatura ambiente a 10,000xg por 1 minuto.
- 11) Transferir 600 µl del sobrenadante a los tubos de 2 ml Collection Tube tratando de no llevar restos del pellet.
- 12) Agregar 200 µl de la SOLUCION C3 y vortexear brevemente.
- 13) Incubar a 4°C por 5 minutos.
- 14) Centrifugar los tubos a temperatura ambiente a 10,000xg por 1 minuto.
- 15) Recuperar (600-750 µl) del sobrenadante a los tubos de 2 ml Collection Tube tratando de no llevar restos del pellet.
- 16) Agite ligeramente la solución C4 antes de usar.
- 17) Agregar (960-1200 µl) de la SOLUCION C4 al sobrenadante y vortexear por 5 segundos.

- 18) Filtrar la mezcla dentro de los SPIN FILTER.
- 19) NOTA: Este proceso se debe realizar cargando un aproximado de 700 μ l de la mezcla dentro de los SPIN FILTER, centrifugar a temperatura ambiente a 10,000xg por 1 minuto y eliminar el filtrado. Realizar el mismo proceso 2 veces más hasta filtrar toda la mezcla en el mismo SPIN FILTER (usar el mismo Collection Tube de 2ml en este proceso).
- 20) Agregar 500 μ l de la SOLUCION C5 al SPIN FILTER y centrifugar los tubos a temperatura ambiente a 10,000xg por 30 segundos.
- 21) Descartar lo filtrado.
- 22) Centrifugar nuevamente los tubos a temperatura ambiente a 10,000xg por 1 minuto (para terminar de descartar la solución).
- 23) Descartar lo filtrado.
- 24) Transferir el SPIN FILTER a un nuevo Collection Tube de 2ml.
- 25) Agregar 30 μ l de la SOLUCION C6.
- 26) Centrifugar los tubos a temperatura ambiente a 10,000xg por 30 segundos y descartar el SPIN FILTER.

Anexo 5

Cuantificación de ADN



A) Colocación de muestra (1 µl); B) Obtención de cantidad y pureza de ADN cuantificado; C) Vista a detalle de cuantificación obtenida.

Anexo 6

Valores de cuantificación de ADN extraído con CTAB



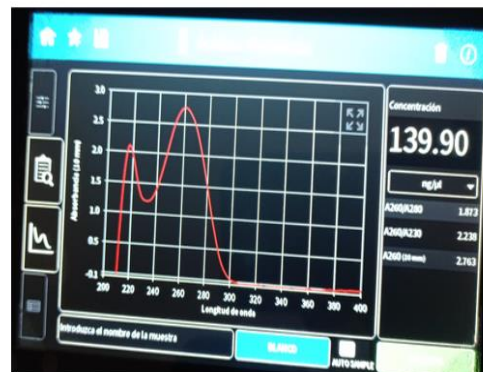
Las concentraciones del ADN extraído, oscilaron de 500 ng/µl a 1000 ng/µl; por lo que fue necesaria una dilución de 1/10; para poder utilizarlos correctamente en una PCR.

Anexo 8

Valores de cuantificación de ADN extraído con Kit Power Soil

Kit Power Soil							
CÓDIGO	LECTURA	CÓDIGO	LECTURA	CÓDIGO	LECTURA	CÓDIGO	LECTURA
1B	139.90	11B	208.00	1MR	288.80	11MR	208.10
2B	136.80	12B	169.70	2MR	208.00	12MR	149.70
3B	506.04	13B	268.40	3MR	493.40	13MR	257.00
4B	359.40	14B	364.70	4MR	408.00	14MR	341.20
5B	157.40	15B	495.40	5MR	200.00	15MR	467.30
6B	482.90	16B	483.10	6MR	345.70	16MR	384.00
7B	500.00	17B	349.40	7MR	384.30	17MR	321.50
8B	157.60	18B	174.00	8MR	150.00	18MR	174.00
9B	376.00	19B	463.50	9MR	357.50	19MR	452.50
10B	465.70	20B	501.60	10MR	387.00	20MR	438.50

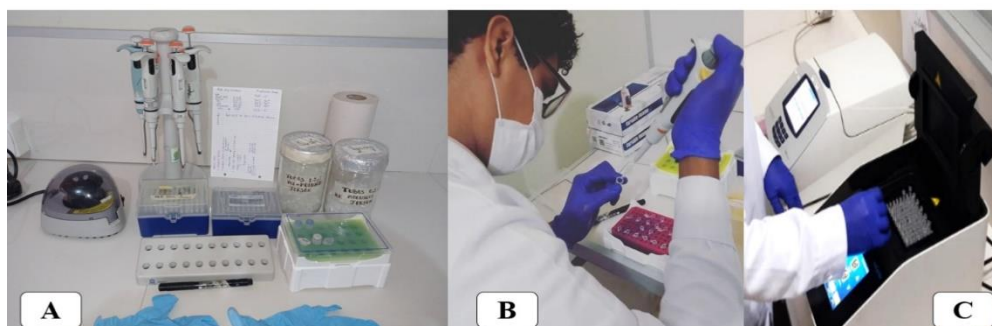
LEYENDA: Branquia = B y Manto/recto = MR



Los ADN extraídos con el kit Power Soil presentaron concentraciones entre los 100 ng/μl y 500 ng/μl.

Anexo 7

PCR



A) Materiales y reactivos utilizados en Master Mix PCR; B) Preparación de Master Mix PCR; C) Colocación de Mix PCR en termociclador TurboCycler 2 (Blue-Ray Biotech).

Anexo 9

Reactivos de PCR- gen COI.

Reactivo	Concentraciones de Reactivos	Concentraciones Empleadas	Volumen por reacción (µl)
H ₂ O PCR	-	-	19.7
Buffer (MgCl ₂)	10X (17.5nM)	10X (17.5nM)	2.5
dNTPs	10 mM	10 mM	0.5
Primer-F	100 pmol/µl	15 pmol/µl	0.6
Primer-R	100 pmol/µl	15 pmol/µl	0.6
Taq DNA polimerasa	5 000 U/ml	5 000 U/ml	0.1
Volumen del master mix por reacción			24 µl
Volumen total de reacción (añadiendo 1µl de ADN)			25 µl

Anexo 10

Perfil térmico para la amplificación del gen COI.

Primers	Temperatura	Tiempo	Ciclos
HCO 1490 LCO2198	95°C	5 min	1
	95°C	30 seg	
	50°C	45 seg	35
	72°C	45 seg	
	72°C	5 min	1
	4°C	n horas	-

Anexo 11

Reactivos de PCR - ITS Perkinsus sp.

Reactivo	Concentraciones de Reactivos	Concentraciones Empleadas	Volumen por reacción (µl)
H ₂ O PCR	-	-	19.7
Buffer (MgCl ₂)	10X (17.5nM)	10X (17.5nM)	2.5
dNTPs	10 mM	10 mM	0.5
Primer-F	100 pmol/µl	15 pmol/µl	0.6
Primer-R	100 pmol/µl	15 pmol/µl	0.6
Taq DNA polimerasa	5 000 U/ml	5 000 U/ml	0.1
Volumen del master mix por reacción			24 µl
Volumen total de reacción (añadiendo 1µl de ADN)			25 µl

Anexo 12

Perfil térmico para la amplificación de ITS Perkinsus sp.

Primers	Temperatura	Tiempo	Ciclos
ITS 85 ITS 750	95°C	4 min	1
	95°C	1 min	
	55°C	1 min	40
	72°C	1 min	
	72°C	10 min	1
	4°C	n horas	-

Anexo 13

Reactivos de PCR1 Nested Perkinsus sp.

Reactivo	Concentraciones de Reactivos	Concentraciones Empleadas	Volumen por reacción (µl)
H ₂ O PCR	-	-	17.1
Buffer	10X (17.5nM)	10X (17.5nM)	2.5
MgCl ₂	20mM	2M	2.5
dNTPs	10 mM	10 mM	0.5
Primer-F	100 pmol/µl	15 pmol/µl	0.6
Primer-R	100 pmol/µl	15 pmol/µl	0.6
Taq DNA polimerasa	5 000 U/ml	5 000 U/ml	0.2
Volumen del master mix por reacción			24 µl
Volumen total de reacción (añadiendo 1µl de ADN)			25 µl

Anexo 14

Perfil térmico de PCR1 Nested Perkinsus sp.

Primers	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Pk ITS Fw 1 Pk ITS Rev 1	95°C	5 min	1
	94°C	30 seg	
	58°C	45 seg	35
	72°C	45 seg	
	72°C	6 min	1
	4°C	n horas	-

Anexo 15

Reactivos de PCR2 Nested Perkinsus sp.

Reactivo	Concentraciones de Reactivos	Concentraciones Empleadas	Volumen por reacción (µl)
H ₂ O PCR	-	-	17.1
Buffer	10X (17.5nM)	10X (17.5nM)	2.5
MgCl ₂	20mM	2M	2.5
dNTPs	10 mM	10 mM	0.5
Primer-F	100 pmol/µl	15 pmol/µl	0.6
Primer-R	100 pmol/µl	15 pmol/µl	0.6
Taq DNA polimerasa	5 000 U/ml	5 000 U/ml	0.2
Volumen del master mix por reacción			24 µl
Volumen total de reacción (añadiendo 1µl de ADN)			25 µl

Anexo 16

Perfil térmico para la amplificación de PCR2 Nested Perkinsus sp.

Primers	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Pk ITS Fw 2 Pk ITS Rev 1	95°C	5 min	1
	94°C	30 seg	
	58°C	30 seg	35
	72°C	45 seg	
	72°C	6 min	1
	4°C	n horas	-

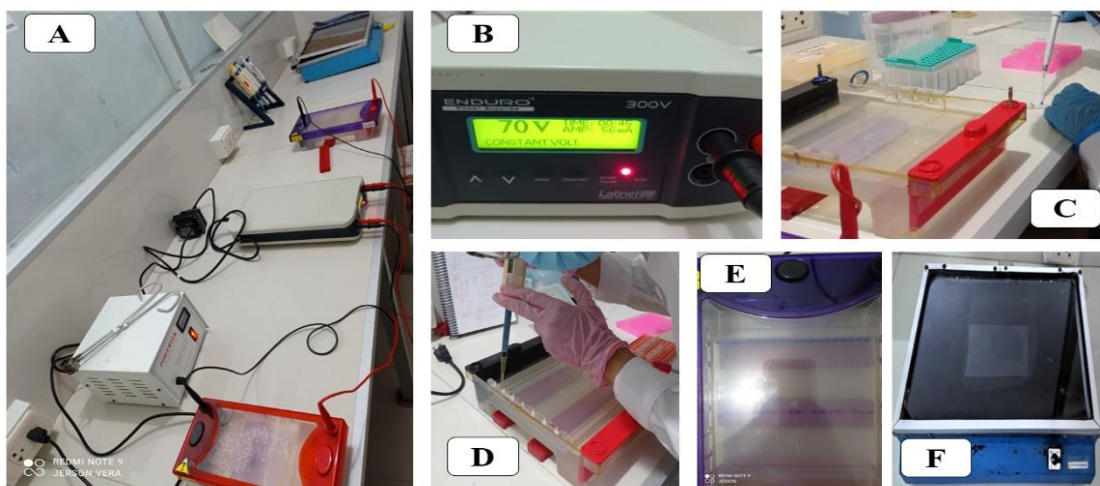
Anexo 17

Reactivos utilizados en preparación de TAE

REACTIVOS	CANTIDADES	CONCENTRACIÓN	CONCENTRACIÓN
		FINAL 50X	FINAL 1X
Tris Base	242 gramos	-	40mM
EDTA	18.6 gramos	0.0001 M	20mM
Ácido Acético Glacial	57.1 ml	-	1mM

Anexo 18

Proceso de electroforesis



A) Área de migración; B) Programa utilizado (Fuente de poder); C) Homogenización de amplicón con Azul de Bromofenol 6X; D) Carga de amplicón teñido en pocillos; E) Pocillos cargados; F) Transiluminador UV.



UNIVERSIDAD NACIONAL PEDRO RUÍZ GALLO

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

UNIDAD DE INVESTIGACIÓN



ACTA DE SUSTENTACIÓN

ACTA DE SUSTENTACION VIRTUAL N° 034-A-022-FCCBB-UI



Siendo las 12:00 horas del día 27 de diciembre de 2022, se reunieron vía plataforma virtual, meet.google.com/qua-ydnj-may los Miembros del Jurado evaluador de la tesis titulada **“Detección y caracterización molecular del parásito Perkinsus sp, en el bivalvo Nodipecten subnodosus “Concha mano de león” (SOWERBY 1835)”**, designados por Resolución 057-2019-UI-FCCBB de fecha 30 de septiembre de 2019, con la finalidad de evaluar y calificar la sustentación de la tesis antes mencionada, conformada por los siguientes docentes:

Dra. Elsa Violeta Angulo de Alva
Dr. Luis Alberto Rodríguez Delfín
MSc. Jorge Antonio Fupuy Chung
MSc. Jorge Luis Chanamé Céspedes

Presidenta
Secretario
Vocal
Asesor

Acto de sustentación fue autorizado por Resolución N° 361-2022-VIRTUAL-FCCBB/D, de fecha 26 de diciembre de 2022.

La Tesis presentada y sustentada por el **Bachiller JORGE JERSON VERA BONILLA** tuvo una duración de 40 minutos. Después de la sustentación y absueltas las preguntas y observaciones de los miembros del jurado; se procedió a la calificación respectiva, otorgándole el calificativo de 18 (MUY BUENO) en la escala vigesimal.

Por lo que el Bachiller **JORGE JERSON VERA BONILLA** queda **APTO** para obtener el título profesional de Licenciado en Biología - Pesquería, de acuerdo con la Ley Universitaria 30220 y la normatividad vigente de la Facultad de Ciencias Biológicas y la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo.

Siendo las 13:45 horas se dio por concluido el presente acto académico, dándose conformidad al presente acto, con la firma de los miembros del jurado.

Firman

Dra. Elsa Violeta Angulo de Alva,
Presidenta

Dr. Luis Alberto Rodríguez Delfín
Secretario

MSc. Jorge Antonio Fupuy Chung,
Vocal

MSc. Jorge Luis Chanamé Céspedes,
Asesor

CONSTANCIA DE APROBACIÓN DE ORIGINALIDAD DE TESIS

Yo, Jorge Luis Chanamé Céspedes, Docente¹/Asesor²/ Revisor de investigación³, del (los) estudiante(s), Vera Bonilla Jorge Jerson.

Titulada:

Detección y caracterización molecular del parásito Perkinsus sp, en el bivalvo Nodipecten subnodosus "Concha mano de león" (SOWERBY, 1835), luego de la revisión exhaustiva del documento constato que la misma tiene un índice de similitud del 9% verificable en el reporte de similitud Turnitin.

El suscrito analizó dicho reporte y concluyó que cada una de las coincidencias detectadas no constituyen plagio. A mi leal saber y entender la tesis cumple con todas las normas para el uso de las citas y referencias establecidas por la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo.

Lambayeque, 15 de febrero del 2024



Jorge Luis Chanamé Céspedes

DNI: 16538022

ASESOR

Detección y caracterización molecular del parásito Perkinsus sp., en el bivalvo Nodipecten subnodosus “Concha mano de león” (SOWERBY, 1835).

INFORME DE ORIGINALIDAD

9%

INDICE DE SIMILITUD

10%

FUENTES DE INTERNET

2%

PUBLICACIONES

%

TRABAJOS DEL
ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1

cicese.repositorioinstitucional.mx

Fuente de Internet

3%

2

www.cienciasinaloa.ipn.mx

Fuente de Internet

2%

3

cybertesis.unmsm.edu.pe

Fuente de Internet

<1%

4

repository.unad.edu.co

Fuente de Internet

<1%

5

cdigital.dgb.uanl.mx

Fuente de Internet

<1%

6

repositorio.upch.edu.pe

Fuente de Internet

<1%

7

www.gob.mx

Fuente de Internet

<1%

8

dspace.uib.es

Fuente de Internet

<1%




Recibo digital

Este recibo confirma que su trabajo ha sido recibido por **Turnitin**. A continuación podrá ver la información del recibo con respecto a su entrega.

La primera página de tus entregas se muestra abajo.

Autor de la entrega: Jerson Vera Bonilla
Título del ejercicio: borrador
Título de la entrega: Detección y caracterización molecular del parásito Perkinsus...
Nombre del archivo: TESIS_FINAL_1.docx
Tamaño del archivo: 11.34M
Total páginas: 82
Total de palabras: 11,701
Total de caracteres: 63,417
Fecha de entrega: 10-ago.-2023 05:28p. m. (UTC-0500)
Identificador de la entrega... 2144124518



UNIVERSIDAD NACIONAL PEDRO RUIZ GALLO

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE PESQUERÍA Y ZOOLOGÍA

TESIS

Detección y caracterización molecular del parásito *Perkinsus* sp.,
en el bivalvo *Nodipecten subnodosus* "Concha mano de león"
(SOWERBY, 1835).

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADO EN
BIOLOGÍA - PESQUERÍA

AUTOR: Br. Vera Bonilla Jorge Jerson

ASESOR: Dr. Jorge Luis Chanamé Céspedes

CO-ASESOR: Dr. Benoit Mathieu Diringier

LAMBAYEQUE - PERÚ

2022

Jorge Luis Chanamé Céspedes