

COMUNICACIÓN

**Evaluación molecular de la presencia de *Perkinsus* spp en muestras de concha de abanico (*Argopecten purpuratus*) del norte del Perú**

**Molecular evaluation of the presence of *Perkinsus* spp in samples of scallops (*Argopecten purpuratus*) from northern Peru**

**Manuela Vivanco S.<sup>1</sup>, Adhemir Valera A.<sup>1</sup>, Luis Llanco A.<sup>2</sup>,  
Enrique Serrano-Martínez<sup>2,3</sup>**

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue evaluar la presencia de *Perkinsus* spp, parásito de reporte obligatorio ante la OIE, en muestras de concha de abanico (*Argopecten purpuratus*) de Ancash, Perú, mediante la técnica de PCR. Se seleccionaron 56 muestras de las colectadas para un estudio previo en 2015. Las muestras seleccionadas fueron tejidos de branquia con lesiones histológicas sugestivas de infección con el protozoo (infiltración hemocítica y necrosis). Se extrajo el ADN de las muestras y se utilizaron cebadores específicos para detectar *Perkinsus* spp por PCR. Además, se evaluó el límite de detección de la técnica. Todas las muestras resultaron negativas. Se determinó que 1.63 ng fue la menor cantidad de DNA molde detectable en uno de los controles positivos.

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

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the presence of *Perkinsus* spp, a parasite that is mandatory to be report to the OIE, in samples of calico scallop (*Argopecten purpuratus*) from Ancash, Peru, using the PCR technique. In total, 56 samples were selected from

<sup>1</sup> Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima, Perú

<sup>2</sup> Grupo SANIVET, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima, Perú

<sup>3</sup> E-mail: enrique.serrano@upch.pe

Recibido: 5 de marzo de 2020

Aceptado para publicación: 24 de septiembre de 2020

Publicado: 21 de diciembre de 2020

those collected for a previous study in 2015. The selected samples were gill tissues with histological lesions suggestive of infection with the protozoan (hemocytic infiltration and necrosis). DNA was extracted from the samples and specific primers were used to detect *Perkinsus* spp by PCR. In addition, the detection limit of the technique was evaluated. All samples were negative. It was determined that 1.63 ng was the least detectable template DNA in one of the positive controls.

**Key words:** *Perkinsus*, *Argopecten purpuratus*, PCR

## INTRODUCCIÓN

*Perkinsus* spp es un parásito protozoario de moluscos marinos, asociado a nivel mundial con elevada mortalidad y pérdidas económicas significativas en el cultivo de moluscos (Moss *et al.*, 2008). Siete especies han sido identificadas, siendo *P. marinus* y *P. olseni* de reporte obligatorio (OIE, 2018). La amplia distribución de este parásito se debe a la variedad de huéspedes que infecta y a su capacidad de persistir bajo condiciones ambientales estresantes (baja temperatura y diferentes concentraciones de salinidad, entre otras), representando una amenaza para el cultivo de moluscos marinos (Bower, 2018).

En estudios sobre la presencia de *P. marinus* en *Crassostrea virginica* en México, se reportaron prevalencias entre 7 y 70%, dependiendo de la época del año (Gullian-Klanian *et al.*, 2008; Villanueva-Fonseca y Escobedo-Bonilla, 2013). Similarmente, en Connecticut, USA, se detectaron prevalencias entre 10 y 100% de *P. marinus* en esta especie de ostiones (Karolus *et al.*, 2000).

Actualmente, para la detección de *Perkinsus* spp se emplean pruebas histológicas y de incubación en caldo fluido de tioglicolato (RFTM) (OIE, 2018), así como técnicas moleculares que son más sensibles y rápidas. En la PCR se utilizan cebadores específicos diseñados contra la región del espaciador transcrito interno (ITS) del ARN ribosómico, permitiendo identificar el parásito a nivel de especie (Audemard *et al.*, 2004; Freire *et al.*, 2009).

En un trabajo llevado a cabo en 2015 en la frontera entre Perú y Ecuador, se evaluó la presencia de *Perkinsus* spp en reproductores de *Anadara tuberculosa* «concha negra». Por microscopía electrónica, PCR y MALDI-TOF se detectó una prevalencia de 63.7% en animales moribundos (Pretell *et al.*, 2017). A pesar de la importancia económica que tiene la concha de abanico para la acuicultura nacional y la elevada prevalencia de este parásito en países de América del Norte y del Sur, son escasos los estudios de detección de *Perkinsus* spp en el Perú. Es así que el objetivo del presente estudio fue evaluar la presencia de *Perkinsus* spp en conchas de abanico (*Argopecten purpuratus*), provenientes de la bahía de Samanco en Ancash, Perú, mediante un ensayo de PCR, a fin de conocer su estatus sanitario y poder adoptar medidas preventivas oportunas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Animales

En total se analizaron 56 muestras de branquia de concha de abanico (*Argopecten purpuratus*), que forman parte del banco de muestras del Laboratorio de Parasitología de la Facultad de Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (Lima, Perú). Estas muestras fueron recolectadas entre enero y agosto de 2017 de centros de producción y ambiente natural situados en la Bahía de Samanco, Ancash, y seleccionadas en base a la observación de

lesiones histológicas sugestivas de la presencia de *Perkinsus* spp (necrosis, infiltración hemocítica e hiperplasia epitelial) (Valera, 2018).

El número de muestras para analizar se estimó considerando un nivel de confianza de 95% y una prevalencia mínima esperada de 7% de 360 conchas de abanico (Gullian-Klanian *et al.*, 2008). Muestras de tejido intestinal no fueron consideradas porque presentan inhibidores de PCR (OIE, 2017).

### Extracción del ADN

Las muestras se encontraban preservadas en solución de Davidson y fueron limpiadas con agua destilada. Se tomaron 50 mg de tejido de branquia de 2-3 conchas de abanico, que fueron trituradas en mortero y se tomaron 30 mg del homogenizado para la extracción de ADN a partir de 30 mg. La extracción del ADN se realizó con la prueba comercial Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, USA), según las indicaciones del fabricante. Se midió la concentración y pureza de todas las muestras en un espectrofotómetro NanoDrop considerando una concentración mínima de 10-100 ng y una pureza con una proporción de A260/280 mayor a 1.8 (Thermo Fisher Scientific, USA).

### PCR Convencional

El PCR se realizó en julio del 2018 según el protocolo 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) (amplicón de 703 bp). Brevemente, la reacción de PCR fue realizada en termociclador (Eppendorf-Mastecycler), en volumen final de 25 µl, incluyendo buffer 2X Green Master Mix GoTaq® G2 (Promega, USA), 1 µl de cada cebador (10 pmol), 50 ng de ADN molde y

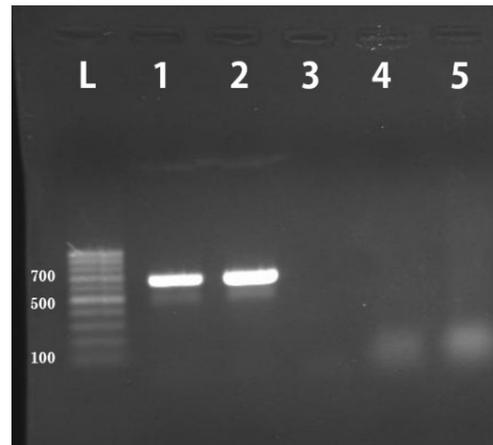


Figura 1. Detección de *Perkinsus* spp por PCR. Gel agarosa (1%), teñido con bromuro de etidio visto en transiluminador UV. Carril L: Marcador de peso molecular 100 bp; Carril 1: Control positivo *P. beihaiensis*; Carril 2: Control positivo *P. olseni*; Carriles 3, 4 y 5: muestras analizadas

agua ultra pura. Cada reacción empleó como controles positivos el ADN de *P. beihaiensis* y *P. olseni*, cedidos gentilmente por el Dr. Maximiano P. Dantas Neto, del Instituto de Ciencias Marinas – LABOMAR, Brasil. Como control negativo se empleó agua libre de DNAsas. Las reacciones del PCR convencional se llevaron a una denaturación inicial de 94 °C por 4 min, seguido de 35 ciclos de amplificación de 94 °C por 1 min, 55 °C por 1 min y 72 °C por 1 min y una extensión final de 72 °C por 10 min.

Los productos se corrieron en gel de agarosa 1%, en tampón TAE (Tris Acetato EDTA), junto al marcador de peso molecular InnuSTAR 100 bp Ladder Express (Analytik Jena, Alemania), a 90 V durante 1 h. Los amplificados fueron teñidos con bromuro de etidio (5 mg/ml), visualizados en transiluminador BioDoc-IT (Analytik Jena, Alemania) y fotodocumentados. Se analizó el límite de detección del PCR haciendo una dilución decimal seriada del DNA de *P. olseni*, a partir de una concentración inicial de 16.6 ng.

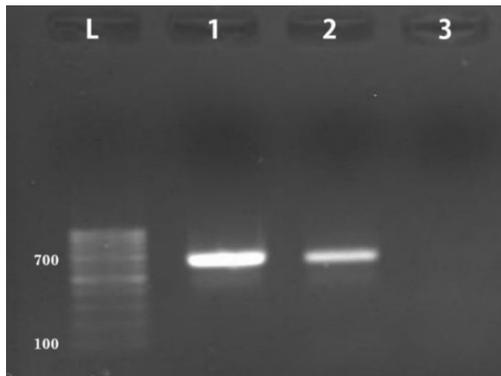


Figura 2. Límite de detección de *Perkinsus* spp por PCR. Gel agarosa (1%), teñido con bromuro de etidio, visto en transiluminador UV. Dilución seriada de control positivo (DNA de *P. olseni*). Carril L: Marcador de peso molecular 100 bp; Carril 1: Control positivo sin diluir; Carril 2: Dilución  $10^{-1}$ ; Carril 3: Dilución  $10^{-2}$

## RESULTADOS

Las 56 muestras analizadas mediante PCR resultaron negativas a *Perkinsus* spp (Figura 1). La mínima cantidad de ADN blanco detectable, mediante la presencia de un amplicón visible, fue de 1.63 ng, correspondiente a la dilución  $10^{-1}$  del control positivo (*P. olseni*) (Figura 2).

## DISCUSIÓN

Los resultados negativos en las muestras analizadas estarían indicando ausencia de *Perkinsus* spp en la Bahía de Samanco, Ancash; al menos para el periodo en que fueron colectadas (año 2017). Al respecto, Pretell *et al.* (2017), reportaron bajas prevalencias de *P. chesapeake* en *Anadara tuberculosa* en medios naturales de Ecuador (3.7%) y Perú (5%). Por otro lado, Enríquez-Espinoza *et al.* (2015) reportaron 3.3% de prevalencia

en *Crassostrea gigas* y *C. fluctifraga*, en la Bahía Kino de México, zona con antecedentes del protozoo. En el Perú no ha sido reportada la presencia de especies de *Perkinsus* en *A. purpuratus*; además, la Bahía de Samanco posee características ambientales diferentes a las zonas donde ha sido reportado (Valera, 2018).

Otra posible razón de los resultados negativos obtenidos en el PCR puede deberse a la selección de muestras con signos inespecíficos de infección por *Perkinsus* spp (infiltración hemocítica, necrosis y lesiones multifocales). Por esto, la detección microscópica no se puede utilizar como una técnica de confirmación diagnóstica y se debe acompañar de una técnica de mayor sensibilidad y especificidad, como el PCR (OIE, 2017).

Con relación a la susceptibilidad del huésped, Escobedo-Fregoso *et al.* (2017) señalan que la proliferación de *Perkinsus* spp en algunas especies de bivalvos es mayor que en otras, siendo la ostra oriental adulta (*C. virginica*) una de las más susceptibles a este parásito. Esto se debe a que los cultivos de esta especie se dan a temperaturas mayores de  $20^{\circ}\text{C}$  y, en épocas de calor, la costa este de los Estados Unidos de Norteamérica puede alcanzar  $26^{\circ}\text{C}$  o más, lo que favorece la proliferación de *P. marinus*. En ese sentido, Valera (2018) observó que durante los meses de verano de 2017, en la Bahía de Samanco, la temperatura varió entre  $19.1$  y  $25.1^{\circ}\text{C}$ , y por debajo de  $20^{\circ}\text{C}$  durante los meses de invierno. Esta variación en la temperatura limitaría la multiplicación de *Perkinsus* spp en esta región.

## CONCLUSIÓN

- Las muestras de *Argopecten purpuratus* colectadas en 2017 en la Bahía Samanco, Ancash, Perú, se encuentran libres de *Perkinsus* spp.

## Agradecimientos

Los autores agradecen a FONDECYT-CONCYTEC por el apoyo financiero brindado al Programa de Maestría en Sanidad Acuícola de la UPCH (Convenio de Gestión N.º 230-2015 FONDECYT-De-PROMOCIÓN 2); que permitió los análisis del estudio.

## LITERATURA CITADA

1. **Audemard C, Reece K, Burreson E. 2004.** Real-time PCR for detection and quantification of the protistan parasite *Perkinsus marinus* in environmental waters. *Appl Environ Microb* 70: 6611-6618. doi: 10.1128/AEM.70.11.6611-6618.2004
2. **Bower S. 2018.** *Perkinsus marinus* («Dermo» disease) of oysters. Fisheries and Oceans Canada [Internet]. Disponible en: <http://www.dfo-mpo.gc.ca/science/aah-saa/diseases-maladies/pmdoy-eng.html>
3. **Casas S, Villalba A, Reece K. 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. *Dis Aquat Organ* 50: 51-65. doi: 10.3354/dao050051
4. **Enríquez-Espinoza T, Grijalva-Chon J, Castro-Longoria R, Ramos-Paredes J. 2010.** *Perkinsus marinus* in *Crassostrea gigas* in the Gulf of California. *Dis Aquat Organ* 89: 269-273. doi: 10.3354/dao02199
5. **Escobedo-Fregoso C, Vasquez Juarez R. 2017.** Host response when *Perkinsus marinus* infection intensities increase in the oyster *Crassostrea corteziensis*. *J Shellfish Res* 36: 717-727. doi: 10.2983/035.036.0321
6. **Freire R, Arias A, Mendez J, Insua A. 2009.** Sequence variation of the internal transcribed spacer (ITS) region of ribosomal DNA in *Cerastoderma* species (Bivalvia: Cardiidae). *J Mollus Stud* 76: 77-86. doi: 10.1093/mollus/eyp047
7. **Gullian-Klanian M, Herrera-Silveira J, Rodríguez-Canul R, Aguirre-Macedo L. 2008.** Factors associated with the prevalence of *Perkinsus marinus* in *Crassostrea virginica* from the southern Gulf of Mexico. *Dis Aquat Organ* 79: 237-247. doi: 10.3354/dao01910
8. **Karolus J, Sunila I, Spear S, Volk J. 2000.** Prevalence of *Perkinsus marinus* «Dermo» in *Crassostrea virginica* along the Connecticut shoreline. *Aquaculture* 186: 215-221. doi: 10.1016/S0044-8486(99)00306-3
9. **Moss J, Xiao J, Dungan C, Reece K. 2008.** Description of *Perkinsus beihaiensis* n. sp., a new *Perkinsus* sp parasite in oysters of Southern China. *J Eukaryot Microbiol* 55: 117-130. doi: 10.1111/j.1550-7408.2008.00314.x
10. **[OIE] Organización Mundial de Sanidad Animal. 2017.** Manual de las pruebas de diagnóstico para los animales acuáticos. [Internet]. Disponible en: <http://www.oie.int/doc/ged/D11947.PDF>
11. **[OIE] Organización Mundial de Sanidad Animal. 2018.** Enfermedades, infecciones e infestaciones de la lista en vigor en 2018. [Internet]. Disponible en: <http://www.oie.int/es/sanidad-animal-en-el-mundo/enfermedades-de-la-lista-de-la-oie-2018/>
12. **Pretell K, Zapata K, Masias P, Cedeño V, Lignot M, Mialhe E, Diringer B. 2017.** Detección de

*Perkinsus* sp en el bivalvo *Anadara tuberculosa* «Concha Negra» Perú-Ecuador. En: IV Conferencia Internacional Sanidad e Inocuidad de la pesca y acuicultura. Lima, Perú: CISIPA.

13. **Valera A. 2018.** Detección de microorganismos parasitarios y caracterización de lesiones histopatológicas en la concha de abanico (*Argopecten purpuratus*) procedentes de Ancash-Perú duran-

te los periodos de verano e invierno. Tesis de Maestría. Lima, Perú: Univ. Peruana Cayetano Heredia. 118 p.

14. **Villanueva-Fonseca L, Escobedo-Bonilla C. 2013.** Prevalencia del protozooario *Perkinsus* sp en un cultivo de ostión japonés *Crassostrea gigas* en Sinaloa, México. Lat Am J Aquat Res 41: 996-1001. doi: 10.3856/vol41-issue5-fulltext-19