



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES**

**FACULTAD DE INGENIERÍA PESQUERA**

**ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE INGENIERÍA  
PESQUERA**

**TESIS**

**IMPLEMENTACIÓN DE PROTOCOLOS DE PCR  
Y q-PCR PARA LA DETECCIÓN DE  
HERPESVIRUS EN *Crassostrea gigas* y  
*Argopecten purpuratus***

**PRESENTADO POR:**

**Bach. CAROLINA MILENA SOLANO CHÁVEZ**

**PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE INGENIERO PESQUERO**

**TUMBES, PERÚ**

**2013**

## JURADO CALIFICADOR

Dr. Adan Alvarado Bernuy

---

Presidente

M.Sc. Oscar A. Mendoza Neyra

---

Secretario

Ing. Tessy Peralta Ortiz

---

Vocal

## RESPONSABLES

Br. Carolina Milena Solano Chávez

---

Ejecutora

Ing. Alberto Ordinola Zapata

---

Asesor

M.Sc. Ricardo Avellán Llaguno

---

Co-Asesor

## **DEDICATORIA**

A Dios por ser mi guía en los momentos más difíciles y darme la fortaleza para poderlos afrontar.

A mis hijos: Jean y Mardy que son mi motor y motivo para que yo no desista en concretar mis metas trazadas.

A mis padres: Wilfredo y Milena por confiar en mí y brindarme su apoyo incondicional.

A mi esposo Manuel por apoyarme con mis hijos.

A mis amigas Yovanni, Yuliana, Juanita, Ana Lucia y Rosa María por brindarme su amistad y por apoyarme en todo momento.

## **AGRADECIMIENTO**

A mi asesor Ing. Alberto Ordinola Zapata, por su apoyo incondicional en la elaboración del presente informe y por los consejos brindados durante mi formación profesional.

A mi Co-asesor Ricardo Avellán Llaguno por sus conocimientos impartidos, su comprensión, por su amistad y sobre todo su paciencia hacia mi persona. Los cuales contribuyeron en la realización de este presente informe.

A la Dra. Eneida Vieyra Peña, Dr Adan Alvarado Bernui, M.Sc. Oscar Mendoza Neyra, Ing. Tessy Peralta Ortiz, Ing. John Sandoval Ramayoni e Ing. Jorge Carrasco Casariego, destacados y admirados docentes de la Universidad Nacional de Tumbes, por los conocimientos y consejos brindados, que ayudaron a mi desenvolvimiento profesional y personal.

Al personal de Inca'Biotec: Erick Mialhe, Benoit Diringer, Melany Sahuquet, y Beder Ramírez Segura por apoyarme en la ejecución de la presente tesis.

A Yuliana Saavedra Olivos y a Ivonne Mogollón Saldarriaga, por apoyarme en la ejecución de este trabajo de investigación.

## CONTENIDO

Pág.

Resumen

I. INTRODUCCIÓN.....	7
II. MATERIAL Y MÉTODOS .....	14
2.1. Material .....	14
2.2. Lugar de ejecución.....	17
2.3. Obtención y limpieza de los ejemplares de <i>Crassostrea</i> <i>gigas</i> y <i>Argopecten purpuratus</i> .....	18
2.4. Extracción de ADN de acuerdo al protocolo CTAB .....	19
2.5. Amplificación por PCR .....	20
2.6. Real time PCR .....	22
2.7. Secuenciación de amplicones.....	22
2.8. Análisis de la secuencia de ADN .....	23
III. RESULTADOS .....	24
3.1. Amplificación del gen constituido de actina.....	24
3.2. Detección de herpesvirus en <i>A. purpuratus</i> y <i>C. gigas</i> mediante PCR y semi nested PCR .....	25
3.3. Detección de herpesvirus en <i>A. purpuratus</i> y <i>C. gigas</i> mediante real time PCR (q-PCR).....	29
3.4. Análisis de la secuencia de los amplicones positivos .....	33
IV. DISCUSIÓN.....	36
V. CONCLUSIONES.....	38
VI. RECOMENDACIONES .....	39
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	40

Anexos

## RESUMEN

La presente investigación se realizó del 5 de diciembre del 2011 al 20 de marzo del 2012 en el Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ingeniería Pesquera de la Universidad Nacional de Tumbes, y tuvo como objetivo implementar protocolos de PCR Y q-PCR para la detección de herpesvirus en *Crassostrea gigas* y *Argopecten purpuratus*. Se recolectaron ejemplares de *C. gigas* y *A. purpuratus* de 13 puntos de recolección en las regiones de Piura, Ancash, Lima e Ica. De cada ejemplar se extrajo 100 mg de masa visceral y se realizó la extracción de ADN mediante el protocolo de CTAB. La calidad del ADN extraído fue previamente comprobada mediante la amplificación por PCR del gen de referencia actina con los *primers* Bi-actin-Fw y Bi-actin-Rev. Los protocolos de PCR se realizaron con los *primers* C2, C4 y C6 como estándares y los nuevos primer OsHV1Fw1, OsHV1Rev1, OsHV1Rev2 y OsHV1Rev3, se incluyeron un control negativo y un positivo de *Ostreid herpesvirus1* proporcionado por el Instituto Francés de Investigación para la explotación del Mar (IFREMER). En el caso de la PCR simple solo se logró la amplificación del control positivo, y no de las muestras. En el caso de la semi nested PCR se logró amplificar 13 muestras de *A. purpuratus*, las cuales luego de ser secuenciadas se confirmó la presencia de *Ostreid herpesvirus1* en 7 muestras, con respecto a la q-PCR se logró amplificar el control positivo probando diluciones de  $10^0$ ,  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  y  $10^{-4}$  con los *primers* OsHV1Fw1/OsHV1Rev2.

Las secuencias de ADN de las muestras que resultaron positivas mostraron una similitud del 100 % con *Ostreid herpesvirus 1* y de 99 a 100 % con *Chlamys acute necrobiotic virus* un herpesvirus reportado en moluscos. En esta investigación se detectó por primera vez la presencia de herpesvirus en un bivalvo en el Perú y es la primera vez que se reporta para la especie *A. purpuratus*

**PALABRAS CLAVE:** *Ostreid herpesvirus1*, *Crassostrea gigas*, *Argopecten purpuratus*, PCR, semi nested PCR, q-PCR.

## ABSTRACT

This research was conducted from December 5, 2011 to March 20, 2012 at the Laboratory of Molecular Biology, Faculty of Fisheries Engineering, National University of Tumbes, and aimed to implement protocols for PCR and q-PCR for herpesvirus detection in *Crassostrea gigas* and *Argopecten purpuratus*. Sampling of *C. gigas* and *A. purpuratus* collection of 13 points in the regions of Piura, Ancash, Lima and Ica. From each specimen was extracted 100 mg visceral mass and underwent DNA extraction by CTAB protocol. The quality of previously extracted DNA was checked by PCR amplification of the reference gene with primers actin, actin-Fw Bi and Bi-actin-Rev. PCR protocols were performed with primers C2, C4 and C6 as standards and new first OsHV1Fw1, OsHV1Rev1, OsHV1Rev3 OsHV1Rev2 and we included a negative control and a positive Ostreid herpesvirus1 provided by the French Research Institute for Exploitation of the sea (IFREMER). For simple PCR amplification was achieved only the positive control, and not the samples. In the case of semi nested PCR was amplified 13 samples of *A. purpuratus*, which after being sequenced confirmed the presence of Ostreid herpesvirus1 in 7 samples, with respect to the q-PCR amplification was achieved by testing the positive control dilutions of 100.  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  and  $10^{-4}$  with primers OsHV1Fw1/OsHV1Rev2. The DNA sequences of the positive samples showed a 100% similarity with Ostreid herpesvirus 1 and 99 to 100% with acute Chlamys necrobiotic a herpesvirus virus reported in molluscs. In this research, first detected in the presence of a bivalve herpesviruses in Peru and is the first time that the species is reported for *A. purpuratus*

KEYWORDS: *Ostreid herpesvirus1*, *Crassostrea gigas*, *Argopecten purpuratus*, PCR, semi nested PCR, q-PCR.

## I. INTRODUCCIÓN

El cultivo de moluscos es una de las actividades acuícolas más importantes, según datos de la FAO (2010). Para el año 2008, ocupó el segundo lugar en volumen de producción con 13,1 millones de toneladas lo que representó el 24,9 % del volumen de producción total de la acuicultura, siendo superado solo por el cultivo de peces de agua dulce.

Si bien la acuicultura de moluscos bivalvos en Latinoamérica contribuye con una fracción pequeña de la producción a nivel mundial, habiendo alcanzado solo al 1,07 % de la producción mundial en el año 2005, considerando que en 1993, sólo equivalía 0,19 %, los países que lideran este sector en la región son Chile, Brasil y Perú (Lovatelli, Vannuccini y McLeod 2008).

En el Perú, el cultivo de moluscos bivalvos está representado fundamentalmente por la concha de abanico (*Argopecten purpuratus*), el cual para el año 2006, alcanzó las 12 337 T. Aparte de este bivalvo, se ha realizado esfuerzos por diversificar el cultivo de moluscos por parte del Fondo Nacional de Desarrollo Pesquero (Fondepes), que en el año 1996 introdujo la ostra del pacífico *Crassostrea gigas* con semilla adquirida desde Chile. Desde 1997 a 2005 el estado peruano y algunas asociaciones de pescadores artesanales realizaron el cultivo de *C. gigas* en el litoral de Ancash, Lima, Moquegua y Tacna (Cavero y Rodríguez 2008).

El interés de cultivar moluscos bivalvos de importancia comercial sigue en aumento debido a la demanda existente, el cual conlleva a la expansión del sector y proveer de oportunidades de empleo en el Perú.

La problemática del cultivo de moluscos en el Perú se resume en: falta de disponibilidad de semillas, falta de diversificación de especies, falta de laboratorios especializados para sanidad acuática; se requiere



además fortalecer las capacidades de prevención, control, seguimiento de la sanidad acuícola, fortalecer las normas sanitarias y sistemas de control de calidad en las empresas públicas y privadas. La calificación sanitaria del sector está regulada por la Norma Sanitaria de Moluscos Bivalvos Vivos (D.S N° 07-2004-PRODUCE), a cargo del Servicio Nacional de Sanidad Pesquera (SANIPES) del Instituto Tecnológico Pesquero (ITP) (Cavero y Rodríguez 2008).

El incremento en la densidad de cultivo y el intercambio comercial de los moluscos bivalvos, ha establecido las condiciones para el surgimiento, proliferación y transmisión de agentes patógenos; los cuales son investigados ya que afectan a especies nativas o aquellas que se cultivan a nivel mundial, tales como *C. gigas*, *C. virginica*, *Ostrea edulis*, *Mytilus edulis*, *M. galloprovincialis*, *Ruditapes philippinarum*, *Saccostrea glomerata*, *Argopecten purpuratus* entre otras (Cáceres y Vásquez 2008).

La Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) (2012), ha señalado que los patógenos más importantes que afectan a los moluscos son los protozoarios: *Perkinsus marinus*, *Perkinsus olseni*, *Haplosporidium nelsoni*, *Marteilia refringens*, *Bonamia exitosa*, *Bonamia ostreae*, *Abalone herpes-like virus* y *Ostreid herpesvirus 1* (OsHV-1), en el caso de América Latina, se han detectado ya algunos de ellos tales como, *P. marinus* en *C. virginica* y *P. olseni* en *Pitar rostrata*; *Bonamia* sp. en *Tiostrea chilensis* y *Ostrea puelchana*.

Aparte de los virus antes señalados, Renault (2006) precisa que una gran cantidad de virus afectan a los moluscos marinos, estando representados por las siguientes familias: Papovaviridae, Herpesviridae, Iridoviridae, Togaviridae, Retrovertidae, Paramyxoviridae, Reoviridae y Birnaviridae.

*Ostreid herpesvirus 1* (OsHV-1), es reportada en invertebrados y ha estado relacionada con mortalidades de hasta el 100 % en cultivos de

*Crassostrea edulis* (Nicolas et al. 1992 citados en Batista et al. 2007), *Crassostrea gigas*, (Hine et al. 1992 citado en Batista, et al 2007), *Tiostrea chilensis* (Hine, Wesley y Besant 1998), *C. angulata* y *C. rivularis* (Arzul, Renault and Lipart 2001a); *Pecten maximus* (Arzul et al. 2001b); *Ruditapes philippinarum* (Renault, Lipart and Arzul 2001) y gasterópodos como *Haliotis* spp.(Crane et al. 2009). Los primeros casos se produjeron en Estados Unidos con *C. Virginica* reportados por (Farley et al. 1972 citados en Arzul, Renault and Lipart 2001); luego en Europa y después se propagaron por todo el mundo. Las larvas de *C. gigas* son muy susceptibles a este virus (Arzul, Renault and Lipart 2001). Las mortalidades registradas parecen estar relacionadas con el aumento rápido de la temperatura del agua de mar que se da en los período de verano (Schikorski et al. 2011).

La especie *Ostreid herpesvirus 1* es un virus perteneciente al orden Herpesvirales, ha sido reordenado por el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (<http://www.ictvonline.org>), asignándolo a una nueva familia denominada *Malacoherpesviridae* debido a que presentan una característica ectotérmica (Davinson et al. 2009 citado en Burge 2010).

Estos virus poseen un genoma de ADN de doble cadena densamente envasados en una cápside icosaédrica de 125 nm que contiene 162 capsómeros, 12 pentámeros, 150 hexámeros, un tegumento de glicoproteínas amorfo que parece un sobre con picos (McGeoch, Rixon y Davinson 2006 y Sollic 2004), su ADN de 207439 pb ha sido secuenciado completamente y esta accesible en GenBank bajo el número de acceso AY509253 (Batista et al. 2007).

El OsHV-1 es un virus altamente patógeno, cuya detección es importante para asegurar la sanidad de un cultivo tanto de *C. gigas* como *A. purpuratus*. El Manual de Diagnóstico para Enfermedades de Animales Acuáticos de la OIE (OIE 2009) precisa que las técnicas serológicas para la detección de este patógeno deben ser directas a

través de la detección del antígeno, sin embargo Mialhe et al. (1992) citados en Campalans et al. (2001) precisan que estas técnicas serológicas tienen el grave inconveniente de que no exista suficiente cantidad de antígeno, pues no es posible cultivar este virus debido a la carencia de líneas celulares de moluscos (Renault et al. 2000); es por ello que no se puede tampoco lograr una inmunización y producción de anticuerpos en invertebrados inoculados con dicho virus, debido a la baja cantidad de viriones que se inocula; adicionalmente Renault et al. (2000) precisa que estas técnicas serológicas no son factibles por que los moluscos no producen anticuerpos.

Aparte de la técnicas serológicas, también existen métodos para el diagnóstico específico y sensible de los patógenos a través de técnicas moleculares tales como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), esta técnica permite una detección rápida de virus tales como el herpesvirus (Renault et al. 2000), adicionalmente, se menciona que la técnica tiene como ventajas: la facilidad de procesamiento de la muestra, reactivos fáciles de obtener, y que requieren comparativamente menos tiempo y tiene menor costo (Renault and Novoa 2004).

La técnica de PCR se ha utilizado en muchas investigaciones para detectar la presencia de patógenos. Segarra et al. (2010) realizaron un estudio preliminar sobre cepas de herpesvirus para lo que usaron *primers* que apuntaban a diversas regiones de su genoma como: la región A que codifica una proteína de función desconocida, la región B que codifica un péptido que pertenece a la familia de las proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAP), la región C que codifica dos proteínas de origen y función desconocida y está presente dos veces en el genoma y la región Gp que codifica una glicoproteína putativa. (Arzul, Renault 2001).

Los herpesvirus al igual que otros virus tienen tendencia a mutar rápidamente esto se ha evidenciado en un trabajo realizado por

Segarra et al. (2010) quienes realizaron análisis en muestras recogidas desde la costa mediterránea a Normandía en 2008 y otras recogidas en China en el 2002, reportaron OsHV-1, otra variante conocida hasta el momento OsHV-1var y una nueva cepa al que llamaron OsHV-1  $\mu$ Var, esta última fue analizada y comparada con 76 secuencias conocidas, determinando que es un genotipo emergente que podría haber surgido por condiciones meteorológicas desfavorables para los cultivos, malas prácticas en la acuicultura o la transferencias de animales a diferentes regiones geográficas; debido a que las condiciones ambientales son distintas en los países donde se han realizado los estudios para el desarrollo de *primers* que permitan identificar a los OsHV-1, en comparación con las de otras regiones del mundo como por ejemplo Perú, existe una duda razonable de si las cepas virales de OsHV-1 que estén presentes en Perú podrían tener diferencias en cuanto a la secuencia genética de su ADN.

Para determinar si dos o más cepas virales difieren genéticamente, se debe secuenciar los fragmentos de ADN amplificados, los cuales son realizados por laboratorios especializados; las secuencias obtenidas son alineadas y comparadas con la bases de datos GenBank. Así mismo Segarra et al. (2010) realizaron estos trabajos para identificar la nueva cepa emergente que llamaron OsHV-1  $\mu$ var.

La detección de los OsHV-1 a través de PCR, podría complicarse debido a que cepas de otras regiones con diferentes secuencias genéticas podrían no ser detectadas por *primers* diseñados para cepas de otros lugares geográficos, esto se complica puesto que como han señalado Arzul et al. (2002) hay portadores asintomáticos que podría tener los virus de OsHV-1 en cantidades tan bajas que no podrían ser detectadas, a la vez estos adultos asintomáticos desempeñarían el papel de portadores sanos y reservorios de virus.

Como posibles alternativas a estas desventajas de la PCR, se tiene a la Nested PCR o semi nested PCR, que es una de sus variantes que

consiste en una segunda amplificación del primer producto mediante *primers* que limitan un segmento de ADN interno de este producto, aumentando más la sensibilidad y especificidad (Bertrand et al. 2009). Otra alternativa sería la utilización de la PCR en tiempo real (q-PCR), que permite cuantificar la cantidad de ADN presente en la muestra; para definir cuál de las alternativas sería más recomendable, se puede acudir al trabajo realizado por Kawada et al. (2004) quienes realizaron análisis de Nested PCR y PCR en tiempo real para detectar el herpesvirus simplex (HSV), determinando que los análisis en tiempo real tenía una sensibilidad de 100 % y la especificidad de 99 % en comparación con la Nested PCR. Otra de las ventajas principales de la PCR en tiempo real sería un menor tiempo para obtener los resultados, mayor velocidad, posibilidad de cuantificación del ADN y además poder reducir la probabilidad de contaminación, por el uso de compuestos tóxicos como el bromuro de etidio.

La PCR en tiempo real, ya ha sido utilizada para la detección de OsHV-1, así, Schikorski et al. (2011) realizaron experimentos de cuantificación en tiempo real inyectando intramuscularmente con un macerado de ostras infectadas a individuos sanos de *C. gigas*, detectando presencia de ADN de OsHV-1 en altas cantidades lo que indicó que la replicación del virus fue activa. Esto demuestra que la PCR en tiempo real fue eficiente en la detección de OsHV-1.

Así mismo, Schikorski et al. (2010) realizaron un experimento sobre la cinética de la detección del ADN del OsHV-1 por PCR en tiempo real en agua de mar y en muestras de *C. gigas*; para ello colocaron ostras infectadas experimentalmente en agua de mar y determinaron la presencia del ADN del virus en diferentes tiempos. Los resultados mostraron que a las 6 horas no se detectó ADN de OsHV-1; pero luego; la cantidad de ADN del virus fue incrementándose hasta las 48 horas, se estabilizó a las 54 horas y disminuyó cuando se retiraron las ostras del agua.

De acuerdo a los antecedentes antes citados, es probable que las cepas de OsHV- 1, en el Perú, pudieran tener diferencias genéticas con las cepas de otros países donde se diseñaron *primers* para su detección por lo que dichos *primers* probablemente no podrían ser eficientes en la detección de cepas nativas del Perú, por lo que se debería ensayar con *primers* diseñados para cepas específicas del Perú, adicionalmente y dado que existen portadores asintomáticos con una cantidad de viriones muy baja para ser detectadas por PCR convencional, sería conveniente ensayar los *primers* propuestos utilizando PCR en tiempo real.

Por lo que surge la pregunta:

¿La implementación de protocolos de PCR y q-PCR utilizando *primers* universales (C2/C6 y C2/C4) o *primers* diseñados por Inca'Biotec S.A.C (OsHV1Fw1/OsHV1Rev1, OsHV1Fw1/OsHV1Rev2 y OsHV1Fw1/OsHV1Rev3) permitirán la detección de herpesvirus en *Crassostrea gigas* y *Argopecten purpuratus*?

Planteándose como hipótesis:

La implementación de protocolos de PCR y q-PCR utilizando tanto *primers* universales (C2/C6 y C2/C4) como *primers* diseñados por Inca'Biotec S.A.C (OsHV1Fw1/OsHV1Rev1, OsHV1Fw1/OsHV1Rev2 y OsHV1Fw1/OsHV1Rev3) permiten la detección de herpesvirus en *Crassostrea gigas* y *Argopecten purpuratus*

Y como objetivo:

Implementar protocolos de PCR y q-PCR utilizando tanto *primers* universales (C2/C6 y C2/C4) como *primers* diseñados por Inca'Biotec S.A.C (OsHV1Fw1/OsHV1Rev1, OsHV1Fw1/OsHV1Rev2 y OsHV1Fw1/OsHV1Rev3) que permitan la detección de herpesvirus en *Crassostrea gigas* y *Argopecten purpuratus*.

## **II. MATERIAL Y MÉTODOS.**

### **2.1. Material.**

#### **2.1.1. Material biológico.**

- 44 ejemplares de *Crassostrea gigas*
- 220 ejemplares de *Argopecten purpuratus*

#### **2.1.2. Materiales de laboratorio.**

- 50 maceradores de acero
- 2 cajas de tubos Falcon de 50 ml marca Axigen
- 5 racks con puntas con filtro de 10  $\mu$ l
- 2 racks con puntas con filtro de 100  $\mu$ l
- 5 racks con puntas con filtro de 1000  $\mu$ l
- 2 cajas tubos eppendorf de 1,5 y 0,2 mL
- 1 micropipeta de 0,5-10  $\mu$ l
- 1 micropipeta de 10-100  $\mu$ l
- 1 micropipeta de 100-1000  $\mu$ l
- 1 caja de hojas de bisturí N° 20
- 1 caja de jeringuillas de 1 ml.
- 6 rollo de papel absorbente
- 3 rollo de papel aluminio
- 1 paquete de algodón
- 1 rollo parafilm
- 1 Matraz Erlenmeyer de 250 ml
- 1 matraz Erlenmeyer de 500 ml
- 3 cajas de Guantes talla S

- Estuche de disección
- Toca quirúrgica
- Mascarillas descartables
- 4 Piscetas de 500 ml

### **2.1.3. Equipos de laboratorio**

- 1 cámara de flujo laminar marca Esco modelo LHC-4A3.
- 1 balanza analítica marca Sartorius modelo TE214S
- 1 balanza gramera marca Sartorius modelo TE2101
- 1 estufa marca Binder modelo ED53
- 1 autoclave marca All American modelo 25X-2
- 1 termociclador marca Techne modelo FTC3102D
- 1 equipo de baño maría marca Bionet modelo BM5
- 1 centrífuga marca Sigma modelo 1-15K
- 1 horno de microondas marca Panasonic modelo NN-S52PE
- 1 transiluminador marca UVP modelo White/UV
- 1 cámara fotográfica marca Olympus modelo E-330
- 1 congeladora marca Bosch modelo GSD32

### **2.1.4. Insumos**

- 50 g de cloruro de sodio grado reactivo
- 1 L de alcohol al 95 %
- 3 L de agua desionizada autoclavada
- 5 L de agua destilada
- 10 ml de agua ultra pura



- 1 ml de proteinasa K (895 U/ml; 19,6 mg/ml) marca Fermentas
- 50 ml de fenol saturado marca Invitrogen
- 50 ml de cloroformo marca Merck
- 10 ml de alcohol isoamil marca Merck
- 50 ml de etanol al 75 %.
- 50 ml de etanol al 95 %.
- 500  $\mu$ l de 10X PCR RXn buffer (-MgCl<sub>2</sub>) marca Invitrogen.
- 250  $\mu$ l de MgCl<sub>2</sub> (50 mM) marca Invitrogen.
- 200  $\mu$ l de dNTP's (10 mM) marca Fermentas.
- 100  $\mu$ l de taq polimerasa (5 U/  $\mu$ l) marca Invitrogen.
- 20  $\mu$ l de *primer forward OsHVC2* (20 pmol)
- 20  $\mu$ l de *primer reverse OsHVC6* (20 pmol).
- 270  $\mu$ l de *primer reverse OsHVF1* (20 pmol).
- 270  $\mu$ l de *primer reverse OsHVR1* (20 pmol).
- 250  $\mu$ l de *primer reverse OsHVR2* (20 pmol).
- 10  $\mu$ l de *primer reverse OsHVR3* (20 pmol).
- 15  $\mu$ l de *primer reverse Bi-actin-Fw* (20 pmol).
- 15  $\mu$ l de *primer reverse Bi-actin-Rev* (20 pmol).
- 20,0  $\mu$ l de marcador de peso molecular de 100 pb (0,5  $\mu$ g/  $\mu$ l) marca Fermentas.
- 20 g de agarosa marca Cleaver
- 2 L de TAE 1X (2 M Tris, 0,1 M EDTA, pH 8,0 ajustado con ácido acético).
- 50  $\mu$ l de bromuro de etidio (solucion acuosa al 1 %) para electroforesis marca Merck.

- 5 ml de TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA).
- 50 ml de tampón CTAB (0,1 M Tris; 1,4 M NaCl; 0,02 M EDTA; 2 % CTAB).
- 150 µl tampón de depósito 6X marca Fermentas

## 2.2. Lugar de ejecución.

La investigación se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ingeniería Pesquera de la Universidad Nacional de Tumbes (figura1), que se encuentra ubicado en la villa de Puerto Pizarro, en el distrito, provincia y región Tumbes, a: 3° 30' 17,31" S de latitud y 80° 23' 35,44" O de longitud.



Figura 1. Imagen satelital modificada para incluir la ubicación del Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ingeniería Pesquera (Fuente Google Earth 2013).

### 2.3. Obtención y limpieza de los ejemplares de *Crassostrea gigas* y *Argopecten purpuratus*.

Los ejemplares de *C. gigas* de aproximadamente 13,30 cm de longitud, fueron obtenidos del Centro de Acuicultura La Arena, perteneciente al Fondepes, ubicado en la región Ancash y los ejemplares *A. purpuratus* de 10 cm de longitud aproximadamente fueron obtenidos, con el apoyo de Sanipes, de cultivos suspendidos en Pisco, Callao, Chimbote y Sechura (figura 2).

En cada una de las zonas de recolección se disectó a los ejemplares para extraer muestras de masa visceral, las que fueron conservadas en alcohol al 96 % y ARN later, luego fueron transportadas vía terrestre en cajas de tecnopor con hielo hasta el Laboratorio de Biología Molecular.



Figura 2. Imagen satelital de las zonas de recolección de los ejemplares muestreados. (Fuente Google Earth 2013).

#### 2.4. Extracción de ADN de acuerdo al protocolo CTAB

Se tomó una pequeña porción del tejido (branquias y masa visceral) de aproximadamente 50 a 100 mg estos fueron colocados en un tubo Eppendorf debidamente rotulados, se les añadió 500 µl de solución salina al 0,85 % para eliminar restos del conservante o cualquier impureza de la muestra, este paso se realizó 3 veces. Después se congelaron las muestras a -20 °C por un tiempo de 10 min, y se procedió a triturar o macerar con una varilla de metal. Seguidamente a todas las muestras se les añadió 500 µl de buffer de lisis CTAB y 2 µl de proteinasa K, se incubaron en el baño maría a 55 °C durante 2 horas, después se incorporó 1 µl de ARNasa, nuevamente se incubaron a 55 °C por 10 min. Transcurrido dicho tiempo se adicionó 300 µl de fenol, 300 µl de cloroformo/alcohol isoamil (25:24:1) y se centrifugó a 13 000 rpm durante 10 min. Se recuperó el sobrenadante y se adicionó cloroformo/alcohol isoamil en igual proporción que el sobrenadante recuperado, y luego se centrifugó a 13 000 rpm durante 10 min. Se recuperó el sobrenadante y se agregó etanol al 95 % en proporción equivalente al doble de lo recuperado, se homogenizó y se centrifugó a 13 000 rpm durante 10 min, eliminando el sobrenadante para adicionar 1 ml de etanol al 75 %. Se centrifugó a 10 000 rpm durante 2 min y se descartó el sobrenadante. La muestra se dejó secar durante 10 min a temperatura ambiente y luego se resuspendió en 50 µl de TE y se almacenaron a -20 °C.

Para verificar la extracción adecuada del ADN, se seleccionó aleatoriamente 10 muestras de branquias y masa visceral de *C. gigas* y se realizó una amplificación del gen de referencia (gen constitutivo) de actina mediante PCR, utilizando los *primers* Bi-actin-Fw y Bi-actin-Rev; y siguiendo el protocolo que se detalla en el anexo 1 y 2.

## 2.5. Amplificación por PCR.

Los reactivos se adicionaron en un microtubo Eppendorf de 1,5 ml en cantidades que dependieron de la cantidad de muestras, luego fueron distribuidos en microtubos Eppendorf de 0,2 ml. La cantidad de reactivos por cada reacción fue:

- 39,2 µl de agua ultra pura
- 5,0 µl de solución buffer 10X
- 1,5 µl de solución de MgCl<sub>2</sub> (50 mM)
- 1,0 µl de solución de dNTP's (10 mM)
- 1,0 µl de *primer forward* (20 pmol/ µl)
- 1,0 µl de *primer reverse* (20 pmol/ µl)
- 0,3 µl taq polimerasa ( 5 U/ µl)
- 1,0 µl de ADN extraído

Se utilizaron pares de *primers* para herpesvirus, diseñados y desarrollados en investigaciones publicadas que fueron como figuran en la tabla 1:

Tabla 1. *Primers* diseñados para detectar herpesvirus en moluscos.

<i>Primers</i>	Secuencia	Temp. Media (°C)	Tamaño (pb)	Referencia
C2	CTCTTTACCATGAAGATACCCAC	59,4	708	Arzul, Renault, and Lipart (2001)
C6	GTGCACGGCTTACCATTTTT	58,2		
C2	CTCTTTACCATGAAGATACCCAC	59,4	352	Arzul et al. (2001)
C4	GCAGTTGTGGTATACTCGAGATG	59		

Así como los *primers* diseñados por la empresa Inca'biotec S.A.C. como figuran en la tabla 2.

Tabla 2. *Primers* diseñados por la empresa Inca´biotec S.A.C. para detectar herpesvirus en moluscos.

<i>Primers</i>	secuencia	Temperatura Media (°C)	Tamaño (pb)
OsHV1Fw1 OsHV1Rev1	CTATTGGAAAGGTTGCGGG TTCTCTTTCATTCTTTTGACCTCC	58,4 59,4	468
OsHV1Fw1 OsHV1Rev2	CTATTGGAAAGGTTGCGGG CTCTCTTTTTTCCTTTCCTTATCC	58,4 58,1	233
OsHV1Fw1 OsHV1Rev3	CTATTGGAAAGGTTGCGGG TCTCCGAGACTTCCCTGACC	58,4 58,9	150

El programa que se empleó para el termociclador fue de 35 ciclos como se observa en la tabla 3:

Tabla 3. Programación del termociclador para realizar la PCR.

Fase	Temperatura (°C)	Tiempo	Número de ciclos
Pre desnaturalización	94	5 min	1
Amplificación			40
Desnaturalización	94	45 s	
Hibridación	Variable*	Variable*	
Polimerización	72	45 s	
Polimerización final	72	5 min	1

\*La temperatura y el tiempo durante la hibridación fueron variables de acuerdo al juego de *primers* utilizados.

La temperatura de hibridación por cada par de *primers* fueron las siguientes:

- Para el juego de *primers* OsHV1C2/ OsHV1C6 y OsHV1Fw1/ OsHV1Rev1 la temperatura fue 56 °C en 45 s.

- Para el juego de *primers* OsHV1C2/ OsHV1C4, OsHV1Fw1/ OsHV1Rev2 y OsHV1Fw1/ OsHV1Rev3 la temperatura fue 57 °C en 45 s.

## 2.6. Real time PCR.

Todas las reacciones de amplificación se realizaron en un equipo de PCR en tiempo real de 48 pocillos.

Los reactivos se adicionaron en microtubos Eppendorf de 0,2 ml, luego fueron distribuidos en placas de 48 pocillos, la cantidad preparada fue la siguiente:

- 10 µl mix SYBR green
- 1 µl de *primers forward*
- 1 µl de *primers reverse*
- 7 µl de agua ultra pura
- 1 µl de ADN

El mix SYBR green fue incorporado directamente en los pocillos de la placa, luego de la mezcla del resto de los reactivos.

### 2.6.1. Electroforesis.

La migración electroforética de los amplicones (productos de la PCR) se realizó en geles de agarosa al 2 % conteniendo 5 µl de bromuro de etidio, se utilizó como tampón de migración 120 ml de TAE 1X. Para la migración se tomó 10 µl de cada amplicon y se mezcló con 2 µl de tampón de depósito, también se migró el marcador de peso molecular de 100 pb mezclando para ello 1 µl de marcador, 1 µl del tampón y 4 µl de agua destilada. El potencial eléctrico empleado fue de 68 V durante 30 min; para todas las pruebas realizadas.

## **2.7. Secuenciación de amplicones**

Para la secuenciación, se tomó 20 µl del producto obtenido por amplificación en la PCR, fue colocado en un tubo eppendorf de 0,2 ml junto con 15 µl de uno de los *primers*, éstos fueron debidamente rotulados y empacados en cajas de tecnopor conteniendo hielo seco para ser enviados a la empresa MacroGen en la ciudad de Nueva York, Estados Unidos, para obtener las secuencia de los productos amplificados.

## **2.8. Análisis de la secuencia de ADN**

Una vez recibidas las secuencias de ADN, éstas fueron editadas, comparadas y analizadas con las secuencias de ADN que se encuentra en la base de datos de acceso público del GenBank mediante el software libre BLAST ([www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)). Las secuencias de ADN también fueron alineadas con el software libre Mega versión 4, para la determinar la homología con herpesvirus.



### III. RESULTADOS

#### 3.1. Amplificación del gen constitutivo de actina.

En la figura 3, se observa el resultado de la amplificación de 10 muestras de ADN de *C. gigas*, obtenidos de las branquias (en la figura aparecen etiquetados de Br1 a Br10) y de la masa visceral (en la figura aparecen etiquetados de Mv1 a Mv10). Como se observa, existe una banda bien definida en cada uno de ellos que corresponde a un fragmento de 190 pb del gen de actina. Bi-actin-Fw (TTCTTGGGAATGGAATCTGC) y Bi-actinRev (TGGAGCCACCGATCCAGAC). Los controles negativos (C-) en ambos casos no mostraron bandas como era previsible. Estos resultados indican que la técnica de extracción de ADN a partir de muestras de branquias y vísceras de *C. gigas* fue adecuada.

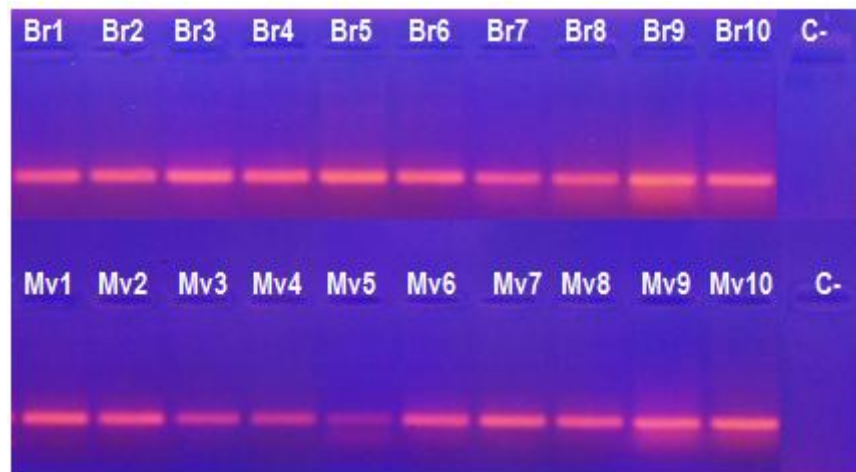


Figura 3. Bandas de ADN teñido con bromuro de etidio sobre gel de agarosa correspondiente a la amplificación de un fragmento del gen de actina en 10 muestras de branquias (Br) y 10 muestras de masa visceral (Mv) de *Crassostrea gigas*

### 3.2. Detección de herpesvirus en *A. purpuratus* y *C. gigas* mediante PCR y semi nested PCR

En las figuras 4, 5, 6, 7 y 8 se observa los geles donde se realizó la migración de amplicones de PCR y semi nested PCR de ejemplares de *A. purpuratus* y de *C. gigas*, en la mayoría se aprecia la falta de bandas fluorescentes indicando que no se detectó ADN de herpesvirus para cada una de las muestras migradas correspondientes a la Isla del Frontón (Callao) (etiquetadas como Fro1 a Fro20); a Chimbote en las zonas de Boquita (Boq1 a Boq13), Dorado (Dor1 a Dor20), Guaynuma (Gua1 a Gua20), Tortugas (Tor1 a Tor7); Pisco en las zonas de Atenas (Ate1 a Ate20), Lagunillas (Lag1 a Lag20), Pozo (Poz1 a Poz20), Queso (Que1 a Que20); a Sechura en las zonas de Chulliyachi (Chu1 a Chu20), Delicias (Del1 a Del20), Puerto Rico (Pto1 a Pto20).

Las muestras de *C. gigas* se muestran etiquetadas como C.g1 a C.g20.

En la figura 4 las muestras fueron amplificadas con los *primers* OsHV1Fw1/OsHV1Rev1 (para la PCR) y OsHV1Fw1/OsHV1Rev3 (para la semi nested PCR), se aprecia que en caso de la PCR no hubo migración en ninguna de las muestras solo en el control positivo se observa migración para ambas amplificaciones.

Las figuras 5 y 6 muestran la migración de amplicones obtenidos con los *primers* OsHV1Fw1/OsHV1Rev1 (para la PCR) y OsHV1Fw1/OsHV1Rev2 (para la semi nested PCR), se aprecia que en caso de la PCR no hubo migración para ninguna de las muestras, pero en el caso de la semi nested PCR si se observó migración en el caso de las muestras: 20 de Puerto Rico (Pto20), 14 y 18 de Chulliyachi (Chu14 y Chu18), 14, 16 y 18 de Tortugas (Tor14, Tor16 y Tor18) y 14 y 16 de Guaynuma (Gua14 y Gua16), 12, 16 y 18 de Queso (Que12, Que16 y Que18).

En la figura 7 se aprecia el gel de migración de amplicones de *A. purpuratus* correspondientes a la PCR y semi nested PCR, de muestras de varias zonas que se sospechaba pudieran tener contaminación cruzada. Se usaron los mismos *primers* anteriores: OsHV1Fw1/OsHV1Rev1 (para la PCR) y OsHV1Fw1/OsHV1Rev2 (para la semi nested PCR), en este gel se observa migración en cada una de las muestras de Atenas 18 (Ate18), Pozo14 (Pzo14), Tortugas 16 y 18 (Tor16 y Tor18) confirmando que no hubo contaminación cruzada.

En la figura 8 se aprecia el gel de migración de amplicones de *A. purpuratus*, que resultaron positivos en el ensayo previo, estos se volvieron a amplificar con los *primers* C2/C6 (para la PCR) y C2/C4 (para la semi nested PCR), observándose migración en las muestras de Pozo 14 (Pzo14), Puerto Rico 20 (Pto20), Tortugas 16 y 18 (Tor16 y Tor18), Queso 12, 16 y 18 (Que12, Que16 y Que18), confirmando la correcta amplificación realizada por los *primers* anteriores.



Figura 4. Gel de migración de amplicones de *A. purpuratus* y *C. gigas* producto de la PCR (fila superior) y semi nested PCR (fila inferior) de ejemplares de Puerto Rico, Delicias, Dorado, Boquita, Queso y Frontón. No se observa migración de amplicones en ninguna de las muestras, solo en el control positivo (C+). La columna de la derecha muestra el marcador de peso molecular. Estas muestras fueron amplificadas con los *primers* universales OsHV1Fw1/OsHV1Rev1 (para la PCR) y OsHV1Fw1/OsHV1Rev3 (para la semi nested PCR).



Figura 5. Gel de migración de amplicones de *A. purpuratus* producto de PCR (fila superior) y semi nested PCR (fila inferior), se observa migración en la muestra 20 de Puerto Rico (Pto20), en las muestras 14 y 18 de Chulliyachi (Chu14 y Chu18), en las muestras 14, 16 y 18 de Tortugas (Tor14, Tor16 y Tor18) y en las muestras 14 y 16 de Guaynuma (Gua14 y Gua16).

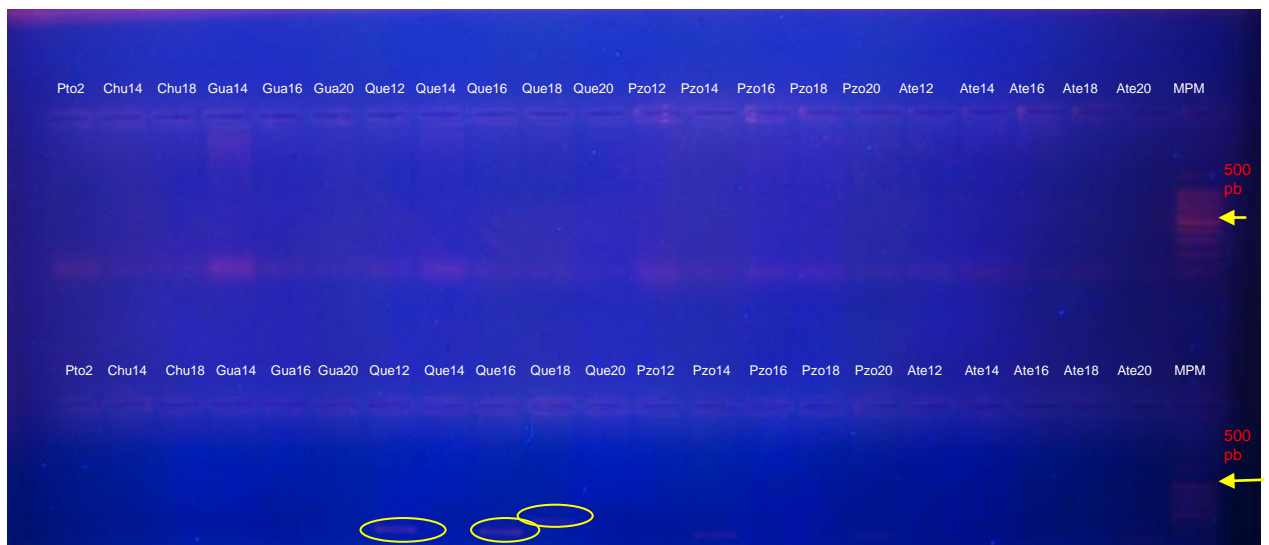


Figura 6. Gel de migración de amplicones de *A. purpuratus* producto de PCR (fila superior) y semi nested PCR (fila inferior) de las zonas de Puerto Rico, Chulliyachi, Guaynuma, Queso, Pozo y Atenas. Se observa migración en las muestras 12, 16 y 18 de Queso (Que12, Que16 y Que18).

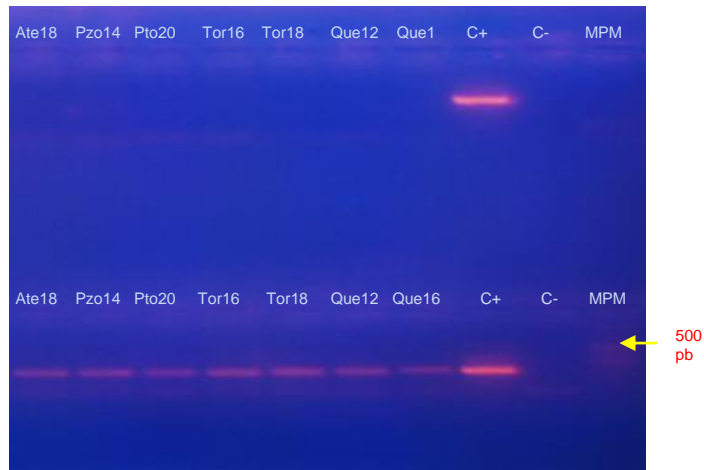


Figura 7. Gel de migración de amplicones de *A. purpuratus* producto de PCR (fila superior) y semi nested PCR (fila inferior), de muestras de varias zonas que se sospechaba pudieran tener contaminación cruzada. Se observa migración en cada una de las muestras de Atenas 18 (Ate18), Pozo14 (Pzo14), Tortugas 16 y 18 (Tor16 y Tor18). Tanto en la PCR como en la semi nested PCR se observa migración en el control positivo (C+).



Figura 8. Gel de migración de amplicones de *A. purpuratus* producto de PCR (izquierda) y semi nested PCR (derecha), se observan migración en las muestras de Pozo 14 (Pzo14), Puerto Rico 20 (Pto20), Tortugas 16 y 18 (Tor16 y Tor18), Queso 12, 16 y 18 (Que12, Que16 y Que18) y en el control positivo (C+) para ambas. Estas muestras fueron amplificadas con los *primers* universales (C2/C6 y C2/C4).

### 3.3 Detección de herpesvirus en *A. purpuratus* y *C. gigas* mediante real time PCR (q-PCR).

En las figuras 9 a 13 se aprecia los resultados de los ensayos de q-PCR con ADN de herpesvirus en *A. purpuratus*. Aquí se aprecia que en 5 ensayos sucesivos realizados de octubre de 2011 a enero de 2012, no se pudo lograr una amplificación eficiente ya que los resultados fueron inconsistentes debido a que el control positivo y las muestras que resultaron positivas amplificaron inadecuadamente, pero también lo hicieron los controles negativos, estos resultados no son consistentes ni siquiera con problemas de amplificación de las muestras, pues previamente se habían realizado ensayos con el control positivo utilizando diluciones seriadas de  $10^0$ ,  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  y  $10^{-3}$ , observándose amplificación consistente usando la q-PCR (figura 14); así mismo, se evaluó la temperatura de fusión ( $T_m$ ) la que alcanzó un pico en el reportero derivativo en la temperatura de 81,26 °C, lo que indicó una adecuada amplificación del control positivo, en ensayos previos antes de realizar la amplificación de las muestras.

Se intento descartar posibles errores en la técnica puesto que pudo haber problemas de contaminación, pero esto no era consistente con el hecho de que los controles positivos previamente ensayados y probados, no amplificaban adecuadamente por lo que se llegó a la conclusión que era problemas técnicos del equipo.

En la tabla 4 se detallan la incidencia en porcentajes de los resultados en las técnicas de PCR y semi nested PCR para la detección de herpesvirus en las especies *A. purpuratus* y *C. gigas* de acuerdo a la zona y estación de muestreo.

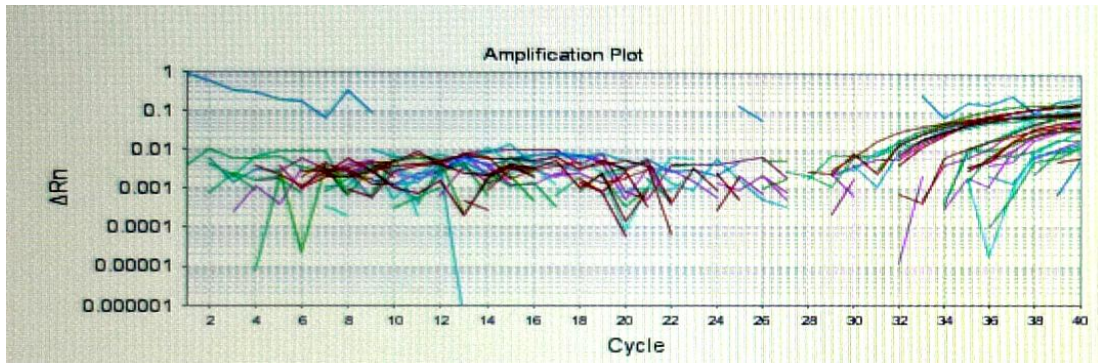


Figura 9. Ensayo de amplificación OsHV-1 por q-PCR con los *primers* OsHV1Fw1/OsHV1Rev2. Utilizando muestras de *A. purpuratus*. Se observa de acuerdo a las curvas de emisión de fluorescencia que no existió una amplificación eficiente. Estos resultados indican una amplificación inconsistente en la q-PCR.

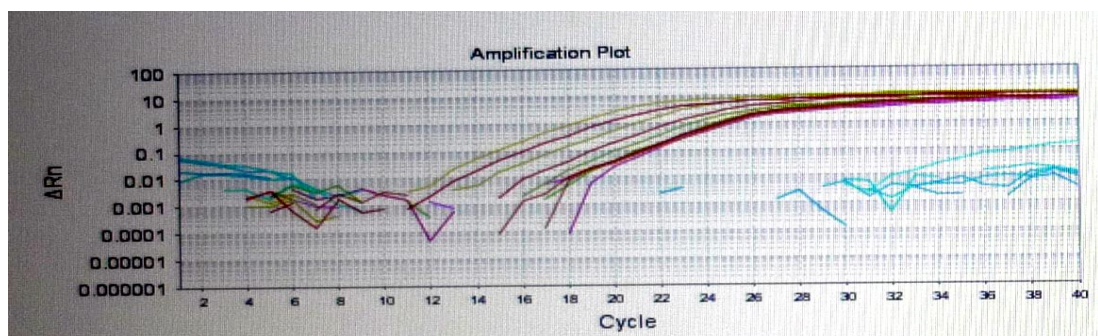


Figura 10. Ensayo de amplificación OsHV-1 por q-PCR con los *primers* OsHV1Fw1/OsHV1Rev2. Utilizando muestras de *A. purpuratus*. Se observa que las curvas de emisión de fluorescencia de acuerdo al número de ciclos, en la cual se nota una amplificación consistente en el caso de los controles positivos (líneas en color rojo); sin embargo, no hubo amplificación en algunos ciclos para las muestras analizadas (líneas en color celeste), a partir del ciclo 32 hay una amplificación aleatoria en las muestras y se observa que hubo amplificación en el control negativo (línea en color violeta). Estos resultados indican una amplificación inadecuada.

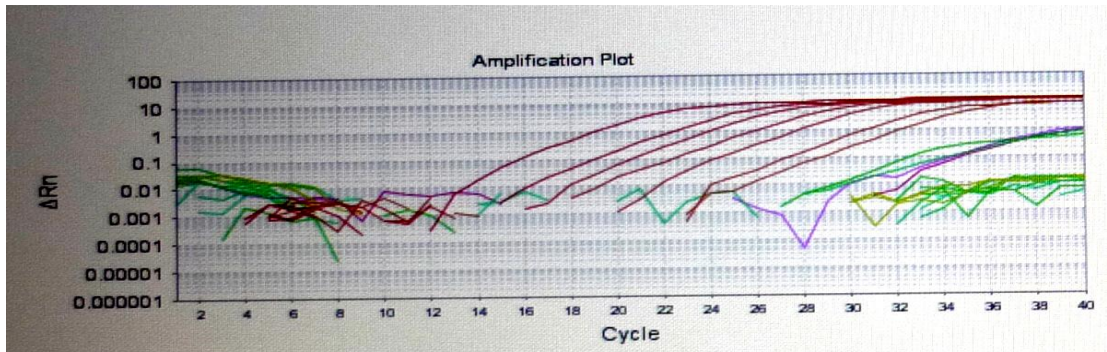


Figura 11. Ensayo de amplificación OsHV-1 por q-PCR con los *primers* OsHV1Fw1/OsHV1Rev2. Utilizando muestras de *A. purpuratus* en la cual se nota una amplificación consistente en el caso de los controles positivos (líneas en color rojo) sin embargo no hubo amplificación en algunos ciclos para las muestras analizadas (líneas en color celeste y verde), a partir del ciclo 32 hay una amplificación aleatoria en las muestras y se observa que hubo amplificación en el control negativo (línea en color violeta).

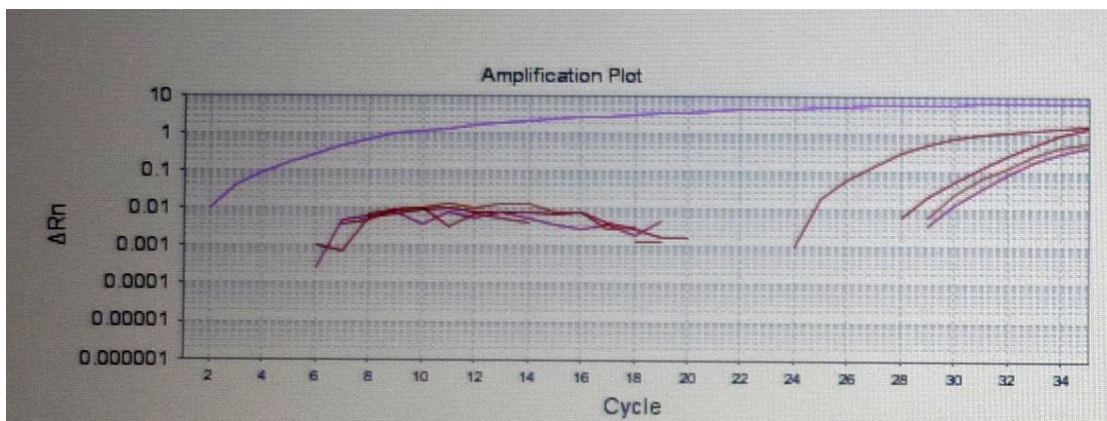


Figura 12. Ensayo de amplificación OsHV-1 por q-PCR con los *primers* OsHV1Fw1/OsHV1Rev2. Utilizando muestras de *A. purpuratus*. Se observa la curva de emisión de fluorescencia de acuerdo al número de ciclos, la cual se nota una amplificación consistente en el caso del control positivo (línea en color violeta) sin embargo las muestras comenzaron a amplificar a partir del ciclo 24. (líneas en color rojo). Estos resultados indican una amplificación inadecuada en la q-PCR.



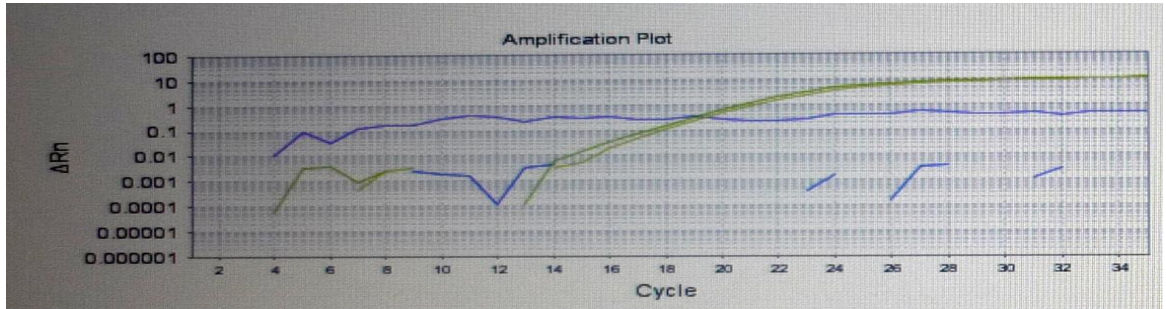


Figura 13. Ensayo de amplificación OsHV-1 por q-PCR con los primers OsHV1Fw1/OsHV1Rev2. Utilizando muestras de *A. purpuratus*. Se observa la curva de emisión de fluorescencia de acuerdo al número de ciclos, no hubo amplificación en algunos ciclos para las muestras analizadas (líneas en color verde), a partir del ciclo 4 se amplificó el control negativo (línea en color violeta). Estos resultados indican una amplificación inadecuada.

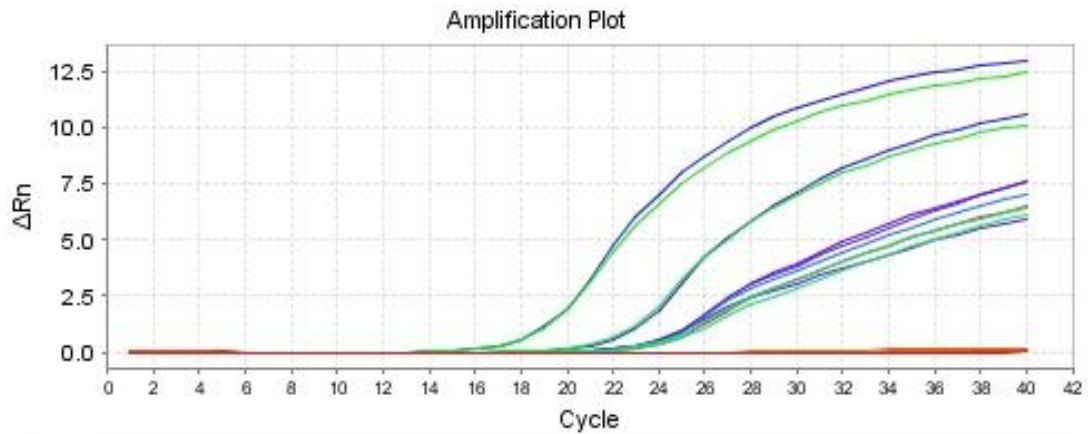


Figura 14. Ensayo de amplificación del control positivo de OsHV-1 por q-PCR con los primers OsHV1Fw1/OsHV1Rev2. Cada par de líneas (en color azul y verde) representa dos repeticiones de cada dilución. La pareja de líneas que alcanza mas altura corresponde a la dilución 100, el siguiente par de líneas de menor altura corresponde a la dilución  $10^{-1}$  y las líneas restantes que se encuentran agrupadas a menor altura corresponde a las diluciones  $10^{-2}$  a  $10^{-3}$  y  $10^{-4}$ .

Tabla 4. Resultados de las técnicas de PCR y semi nested PCR para la detección de herpesvirus en *A. purpuratus* y *C. gigas*.

Especie	Zona de recolección	Estación de muestreo	Muestras de ADN			Incidencia (%)
			amplificadas	positivas para Herpesvirus según técnica		
				PCR	Semi nested PCR	
<i>A. purpuratus</i>	Callao	Frontón	20	0	0	0,00
	Chimbote	Boquita	13	0	0	0,00
		Dorado	20	0	0	0,00
		Guaynuma	20	0	2	10,00
		Tortuga	7	0	3	42,90
	Pisco	Atenas	20	0	1	5,00
		Lagunillas	20	0	0	0,00
		Pozo	20	0	1	5,00
		Queso	20	0	3	15,00
	Sechura	Chuliyachi	20	0	2	10,00
		Delicias	20	0	0	0,00
		Puerto Rico	20	0	1	5,00
	<i>C. gigas</i>	Chimbote	La Arena	44	0	0

### 3.3. Análisis de la secuencia de los amplicones positivos.

En la tabla 5 se muestran los resultados de la secuenciación fueron analizados en la base de datos online BLAST, para cada individuo de *Argopecten purpuratus* se observa similitud de 100 % con *Ostreid herpesvirus 1* y 99 % y 100 % *Chlamys acute necrobiotic virus*. De las muestras de Atenas 18 (Ate18), Puerto rico 20 (Pto20), Pozo 14 (pzo14), Tortugas 16 y 18 (Tor16), (Tor18), Queso 12 y 16, (Que12) y (Que16).

Estas muestras fueron alineadas y agrupadas en árbol filogenético con las secuencias de *Ostreid herpesvirus 1*, *Chlamys acute necrobiotic virus* mediante el programa online Mega 5, en la figura 15 se observa que se encuentran relacionadas entre sí en un 100 % y que la muestra 20 de Puerto rico (Pto20) se encuentra en el grupo aunque no se especifica en que porcentaje.

Tabla 5. Alineamiento de secuencias en el programa BLAST de las muestras de *A. purpuratus*.

Muestra	Secuencias con mayor similitud a la secuencia de la muestra		
	Virus	Similitud (%)	N° de acceso en Genbank
Pto20	<i>Ostreid herpesvirus 1</i>	100	AY509253.1
	<i>Chlamys acute necrobiotic virus</i>	99	GQ153938.1
Tor16	<i>Chlamys acute necrobiotic</i>	100	GQ153938.1
	<i>Ostreid herpesvirus 1</i>	100	AY509253.1
Tor18	<i>Ostreid herpesvirus 1</i>	100	AY509253.1
	<i>Chlamys acute necrobiotic virus</i>	99	GQ153938.1
Que12	<i>Ostreid herpesvirus 1</i>	100	AY509253.1
	<i>Chlamys acute necrobiotic virus</i>	99	GQ153938.1
Que16	<i>Ostreid herpesvirus 1</i>	100	AY509253.1
	<i>Chlamys acute necrobiotic virus</i>	99	GQ153938.1
Ate18	<i>Chlamys acute necrobiotic virus</i>	100	GQ153938.1
	<i>Ostreid herpesvirus 1</i>	100	AY509253.1
Pzo14	<i>Ostreid herpesvirus 1</i>	100	AY509253.1
	<i>Chlamys acute necrobiotic virus</i>	99	GQ153938.1

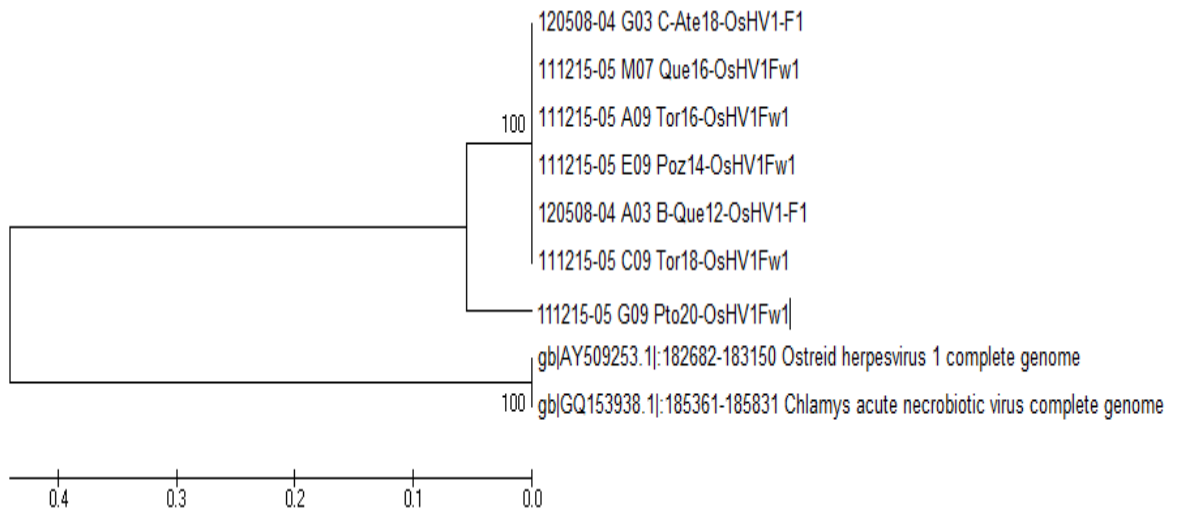


Figura 15. Árbol filogenético de las secuencias de ADN del virus presente en *A. purpuratus*. Se observa que las muestras correspondientes a Atenas 18 (Ate18), Queso 16 (Que16), Tortuga 16 (Tor16), Pozo 14 (Poz14), Queso 12 (Que12), y Tortuga 18 (Tor18), muestran un 100 % de similitud entre ellas, mostrando una distancia filogenética de 0,05 con la muestra de Puerto Rico 20 (Pto20). Todas estas muestras tienen una distancia filogenética de 0,45 con las secuencias de *Ostreid herpesvirus 1* y *Chlamys acute necrobiotic virus*. La escala inferior indica la distancia filogenética.

#### IV. DISCUSIÓN

El protocolo de PCR simple utilizando los *primers* OsHV1Fw1/OsHV1Rev1 y C2/C6 no permitió detectar herpesvirus en ninguna de las muestras de *Crassostrea gigas* y *Argopecten purpuratus*, pero si logró amplificar el ADN de herpesvirus del control positivo; sin embargo, cuando se aplicó el protocolo de semi nested PCR utilizando los *primers* OsHV1Fw1/OsHV1Rev2, OsHV1Fw1/OsHV1Rev3 y C2/C4 se logró la amplificación de ADN de herpesvirus de 13 de las muestras de *A. purpuratus* de las cuales 7 pudieron ser exitosamente secuenciadas, estos resultados son consistentes con lo encontrados Arzul, Renault and Lipart (2001), Arzul, Nicolas et al. (2001), Arzul, Renault, Lipart et al. (2001), Batista et al. (2005, 2007), Friedman et al. (2005), Garcia et al. (2011), Pepin, Rioua and Renault (2008), Schikorski et al. (2011) y Segarra et al. (2010) quienes ensayaron el par de *primers* C2/C4 logrando amplificaciones exitosas del ADN de herpesvirus.

Las secuencias de ADN amplificadas en la presente investigación mostraron 100 % de similitud con *Ostreid herpesvirus 1*, y entre 99 y 100 % de similitud con *Chlamys acute necrobiotic virus* un virus perteneciente al orden de los herpesvirales, aunque no clasificados en la familia de los *Malacoherpesviridae* (Genbank número de acceso GQ153938.1), esto indica que las secuencias de ADN correspondieron a un *Ostreid herpesvirus 1*.

En cuanto al protocolo de q-PCR se realizó ensayos utilizando los *primers* OsHV1Fw1/OsHV1Rev2, se pudo observar una amplificación apropiada del control positivo en todas sus diluciones salvo en las ultimas diluciones en las que no hubo una amplificación adecuada. También se observó la disociación de la curva en la cual se obtuvo una temperatura media constante de 81,26 °C. Se realizaron otros ensayos donde el control positivo y las muestras que resultaron positivas en ensayos de semi nested PCR amplificaron inadecuadamente, pero

también lo hizo el control negativo, pues el equipo de q-PCR presentaba fallas técnicas.

En la presente investigación se detectó la presencia de *Ostreid herpesvirus 1* en *Argopecten purpuratus*, lo cual ampliaría el rango de especies que son afectadas por este patógeno y su distribución geográfica ya que no ha sido reportado por la OIE (2012), constituyendo el primer reporte de la presencia de este patógeno en *A. purpuratus* y en el Perú. La presencia del virus en *A. purpuratus*, es consistente con el hecho que el patógeno tiene un amplio rango de hospederos como se ha demostrado en diferentes investigaciones en *Crassostrea virginica* (Farley et al. 1972 citado en Friedman et al. 2005), *Tiostrea chilensis* (Hine, Wesney and Besant 1998), *C. angulata* y *C. rivularis* (Arzul, Renault, Lipart, 2001), *Pecten maximus* (Arzul, Nicolas et al. 2001) y gasterópodos como *Haliotis* spp. (OIE 2012). La presencia de *Ostreid herpesvirus 1* en el Perú obedece a que este virus tiene una amplia distribución mundial, que abarca a países como: USA (Farley et al. 1972 citado en Friedman et al. 2005), Francia (Le deuff and Renault 1999; Arzul, Renault and Lipart 2001; Arzul, Nicolas et al 2001; Arzul, Renault, Lipart et al 2001, Renault and Arzul 2001), México (Vásquez, Cáceres and Figueras 2004), Australia (Hine, Wesney and Besant 1998 y Savin et al. 2010), Nueva Zelanda (Hine, Wesney and Besant 1998) e Irlanda (Lynch et al. 2012). *Ruditapes philippinarum* (Renault, Lipart and Arzul 2001).

## V. CONCLUSIONES

- 1) El protocolo de semi nested-PCR utilizando los *primers* OsHV1F1 / OsHV1Rev2, OsHV1F1 / OsHV1Rev3 y C2/C4 permitió detectar la presencia de herpesvirus en *A. purpuratus*.
- 2) El protocolo de PCR simple utilizando los *primers* OsHV1F1 / OsHV1Rev1, y C2/C6 no permitió detectar la presencia de herpesvirus en *A. purpuratus* ni en *C. gigas*.
- 3) Se logró amplificar ADN del control positivo en diluciones con el factor  $10^0$ ,  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  y  $10^{-4}$  por medio del protocolo de la q-PCR con los *primers* OsHV1F1 / OsHV1Rev2.
- 4) No se logró amplificar el ADN de herpesvirus en las muestras *A. purpuratus* ni de *C. gigas* por q-PCR.
- 5) No se pudo detectar presencia de herpesvirus en *C. gigas*.
- 6) Se detectó por primera vez la presencia de herpesvirus en un bivalvo en el Perú, siendo la primera vez que se reporta para la especie *A. purpuratus*.
- 7) La amplificación del ADN viral mediante semi nested-PCR utilizando los *primers* OsHV1F1 / OsHV1Rev2 y C2/C4, permitió detectar la presencia de herpesvirus en *A. purpuratus*, pero no fue específica para determinar si se trataba de uno de los dos virus: *Ostreid herpesvirus 1* o *Chlamys acute necrobiotic virus*. Con los cuales tuvo un 100 % de similitud.

## VI. RECOMENDACIONES

- 1) Realizar la secuenciación completa del genoma del herpesvirus presente en *A. purpuratus* en el Perú, lo que permitirá diseñar *primers* para la detección específica del mismo.
- 2) Realizar monitoreos permanentes para detectar presencia de herpesvirus en *A. purpuratus* del litoral del Perú.
- 3) Ensayar protocolo de q-PCR para la detección de herpesvirus en *A. purpuratus* y *C. gigas*.
- 4) Ensayar el uso de kit comerciales de purificación de ADN, que permita tener ADN de mejor calidad para las secuenciaciones.



## VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arzul, I., J. Nicolas, A. Davison and T. Renault. 2001. French Scallops: A New Host for Ostreid herpesvirus-1. *Virology* 290(2): 342-349. <http://www.archimer.ifremer.fr/doc/2001/publication-739.pdf>
- Arzul, I., T. Renault, A. Thébault y A. Gérard. 2002. Detection of oyster herpesvirus DNA and proteins in asymptomatic *Crassostrea gigas* adults. *Virus Research*. 84(1-2): 151-160 [http://www.dx.doi.org/10.1016/S0168-1702\(02\)00007-2](http://www.dx.doi.org/10.1016/S0168-1702(02)00007-2)
- Arzul, I., T. Renault and C. Lipart. 2001. Experimental herpes-like viral infections in marine bivalves: demonstration of interspecies transmission. *Diseases of Aquatic Organisms*. 46(22): 1–6. [www.int-res.com/articles/dao/46/d046p001.pdf](http://www.int-res.com/articles/dao/46/d046p001.pdf) -
- Arzul, I., T. Renault, C. Lipart and A. Davison. 2001. Evidence for interspecies transmission of oyster herpesvirus in marine bivalves. *Journal of General Virology* 82(4): 865–870. <http://jgv.sgmjournals.org/content/82/4/865.full>
- Batista, F., I. Arzul, J. Pepin, F. Ruano, C. Friedman, P. Boudry and T. Renault. 2007. Detection of ostreid herpesvirus 1 DNA by PCR in bivalve mollusc: A critical review. *Journal of Virological Methods* 139(1): 1–11. <http://archimer.ifremer.fr/doc/2007/publication-2322.pdf>

- Batista, F., N. Taris, P. Boudry and T. Renault. 2005. Detection of ostreid herpesvirus-1 (OsHV-1) by PCR using a rapid and simple method of DNA extraction from oyster larvae. *Diseases of Aquatic Organisms*. 64 (6): 1–4. <http://archimer.ifremer.fr/doc/2005/publication-2916.pdf>
- Bertrand, M., A. Flores, R. Goyechea and S. Martinez. 2009. *Diagnóstico de CMV congénito por nested-PCR*. Madrid, España: Hispanoamericana. [http://www.exa.unne.edu.ar/NESTED-PCR\\_EN\\_CMV\\_CONGEnITO.pdf](http://www.exa.unne.edu.ar/NESTED-PCR_EN_CMV_CONGEnITO.pdf)
- Burge, C., 2010. *Examining the roles of environment, host, and pathogen in the host-pathogen relationship between the oyster herpesvirus and the Pacific oyster*. Ph. D. Dissertation, University of Washington. <http://escholarship.org/uc/item/34k218j0>
- Cáceres, J. y R. Vásquez. 2008. La patología en moluscos bivalvos: principales problemas y desafíos para la producción de bivalvos en América Latina. En Estado actual del cultivo y manejo de moluscos bivalvos y su proyección futura: factores que afectan su sustentabilidad en América Latina. En *Estado actual del cultivo y manejo de moluscos bivalvos y su proyección futura: factores que afectan su sustentabilidad en América Latina*. Ed. Lovatelli A., A. Farías e I. Uriarte, 327–337. Roma, Italia: Food and Agriculture Organization. <http://www.fao.org/docrep/011/i0444s/i0444s00.htm>
- Campalans, M., P. Rojas, J. Campalans, I. Guerrero, S. bravo, y X. Figueroa. 2001. *Técnicas de diagnóstico de enfermedades de salmónidos, mitílidos, pectínidos y ostreidos*. Valparaíso, Chile: Fondo de Investigación Pesquera (FIP).

<http://detenganlavacuna.files.wordpress.com/2011/02/inffinal-2001-09.pdf>

Cavero, P. y P. Rodríguez. 2008. Producción sostenida de moluscos bivalvos en el Perú: acuicultura y repoblamiento. En *Estado actual del cultivo y manejo de moluscos bivalvos y su proyección futura: factores que afectan su sustentabilidad en América Latina*. Ed. Lovatelli, A., A. Farías e I. Uriarte, 209-218. <http://www.fao.org/docrep/011/i0444s/i0444s00.htm>

FAO (Food and Agriculture Organization). 2010. *El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2010*. Roma, Italia: Food and Agriculture Organization. <http://www.fao.org/docrep/013/i1820s/i1820s00.htm>

Friedman, C., R. Estes, N. Stokes, C. Burge, J. Hargove, B. Barber, R. Elston, E. Burreson and K. Reece. 2005. Herpes virus in juvenile Pacific oysters *Crassostrea gigas* from Tomales Bay, California, coincides with summer mortality episodes 63(25): 33–41, *Diseases of Aquatic Organisms*. <http://www.int-res.com/articles/dao2005/63/d063p033.pdf>

Garcia, C., A. Thébault, L. Dégremont, I. Arzul, L. Miossec, M. Robert, B. Chollet, C. François, J. Joly, S. Ferrand, N. Kerdudou and T. Renault. 2011. *Ostreid herpesvirus 1* detection and relationship with *Crassostrea gigas* spat mortality in France between 1998 and 2006. *Veterinary research*. 42: 73. <http://www.veterinaryresearch.org/content/42/1/73/>

Hine, P., B. Wesley and P. Besant. 1998. Replication of a herpes-like virus in larvae of the flat oyster *Tiostrea chilensis* at ambient

temperatures. *Diseases of Aquatic Organisms*. 32(3): 161-171.  
<http://www.int-res.com/articles/dao/32/d032p161.pdf>

Kawada, J., H. Kimura, Y. Ito, Y. Hoshino, N. Tanaka, Y. Ando, M. Futamura and T. Morishima. 2004. Comparison of Real-time and nested PCR Assays for Detection of *Herpesvirus simplex virus* DNA. *Microbiol Immunol*. 48(5): 411-415. <http://www.classes.soe.ucsc.edu/bme215/Spring09/Reading%20Materials/nested%20pcr.pdf>

Le Deuff, R., and T. Renault. 1999. Purification and partial genome characterization of a herpeslike virus infecting the Japanese oyster, *Crassostrea gigas*. *Journal of General Virology*. 80(1): 1317–1322. <http://www.vir.sgmjournals.org/content/80/5/1317.full.pdf>

Lovatelli, A., S. Vannuccini, y D. McLeod. 2008. Estado actual de la acuicultura y comercio de moluscos bivalvos. En *Estado actual del cultivo y manejo de moluscos bivalvos y su proyección futura: factores que afectan su sustentabilidad en América Latina*. Ed. Lovatelli, A., A. Farías, e I. Uriarte, 45-59. Roma, Italia: Food and Agriculture Organization. <http://www.fao.org/docrep/011/i0444s/i0444s00.htm>

Lynch, S., J. Carlsson, A. Reilly, E. Cotter and S. Culloty. 2012. A previously undescribed ostreid herpes virus 1 (OsHV-1) genotype detected in the pacific oyster *Crassostrea gigas* in Ireland. *Research Gate* 1(8):17. [http://www.journals.cambridge.org/abstract\\_S0031182012000881](http://www.journals.cambridge.org/abstract_S0031182012000881)

McGeoch, D, F. Rixon and A. Davison. 2006 .Topics in herpesvirus genomics and evolution. *Virus Research* 117 (1) 90–104. [https://www.researchgate.net/publication/7287491\\_Top...](https://www.researchgate.net/publication/7287491_Top...)

Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE). 2012. Manual de las pruebas de diagnóstico para los animales acuáticos. Paris, Francia: OIE. <http://www.oie.int/es/normas-internacionales/manual-acuatico/acceso-en-linea/>

Pépin, J., A. Rioua and T. Renault. 2008. Rapid and sensitive detection of ostreid herpesvirus 1 in oyster samples by real-time PCR. *Journal of Virological Methods* 149(1): 269-276. <http://archimer.ifremer.fr/doc/2008/publication-3951.pdf>

Renault, T. 2006. Les virus infectant les bivalves marins. *Virologie*. 10:35–41. <http://www.archimer.ifremer.fr/doc/2006/publication-2925.pdf>

Renault, T., and I. Arzul. 2001. Herpes-like virus infections in hatchery-reared bivalve larvae in Europe: specific viral DNA detection by PCR. *Journal of Fish Diseases* 24(3): 161- 167. <http://www.eurl-mollusc.eu/Main-activities/Tutorials/Herpes-virus-OsHV-1>

Renault, T., C. Lipart and I. Arzul. 2001. A herpes-like virus infects a non-ostreid bivalve species: virus replication in *Ruditapes philippinarum* larvae. *Diseases of Aquatic Organisms* 45(4) : 1 - 7. <http://www.int-res.com/articles/dao/45/d045p001.pdf>

- Renault, T., R. Le Deuff, B. Chollet, N. Cochenec and A. Gérard. 2000. Concomitant herpes-like virus infections in hatchery-reared larvae and nursery-cultured spat *Crassostrea gigas* and *Ostrea edulis*. *Diseases of Aquatic Organisms* 42(28): 173–183. <http://www.int-res.com/articles/dao/42/d042p173.pdf>
- Renault, T. and B. Novoa. 2004. Viruses infecting bivalve molluscs. *Aquat Living Resour.* 17(4): 397–409. <http://archimer.ifremer.fr/doc/2004/publication-2910.pdf>
- Savin, K., Benjamin, G. Cocks, F. Wong, T. Sawbridge, N. Cogan, D. Savage and S. Warner. 2010. A neurotropic herpesvirus infecting the gastropod, abalone, shares ancestry with oyster herpesvirus and a herpesvirus associated with the amphioxus genome. *Virology Journal* 7(1): 308. <http://www.virologyj.com/content/7/1/308/>
- Schikorski, D., N. Faury, J. Pepin, D. Saulnier, D. Tourbiez and T. Renault. 2010. Experimental ostreid herpesvirus 1 infection of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*: Kinetics of virus DNA detection by q-PCR in seawater and in oyster samples. *Virus research* 155(1):28-34. <http://archimer.ifremer.fr/doc/00025/13607/10688.pdf>
- Schikorski, D., T. Renaul, D. Saulnier, N. Faury, P. Moreau and J. Pépin. 2011 Experimental infection of Pacific oyster *Crassostrea gigas* spat by *Ostreid herpesvirus 1*: demonstration of oyster spat susceptibility. *Veterinary Research.* 42(1):1-27. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3042938/>

- Segarra, A., J. Pépin, I. Arzul, B. Morga, N. Faury and T. Renault. 2010. Detection and description of a particular Ostreid herpesvirus 1 genotype associated with massive mortality outbreaks of Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, in France in 2008. *Virus Research* 153 (1): 92-99. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20638433>
- Sollicec, G. 2004. *Recherche par PCR d'OsHV-1 (Ostreid Herpesvirus type 1), dans des échantillons d'eau de claires ostréicoles*. Diploma de Ecole Pratique des Hautes Etudes, Université de La Rochelle. [http://www.coquillages.com/home\\_setH.htm](http://www.coquillages.com/home_setH.htm)
- Vásquez R., J. Cáceres and A. Figueras. 2004. Herpes- like virus associated with eroded gills of the pacific oyster *crassostrea gigas* in Mexico. *Journal of Shellfish Research* 23(2): 417-419. <http://www.biodiversitylibrary.org/pdf3/005584500022139.pdf>

## Anexos

### Anexo 1. Composición del kit PCR utilizada para la amplificación de un fragmento del gen de actina

Reactivo	μl/reacción
Agua ultra pura	39,2
Buffer 10X	5
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	1,5
dNTP`s (10 mM)	1
Bi-actin-Fw	1
Bi-actin-Rev	1
Taq	0,3
Volumen final	49 μl/ tubo

### Anexo 2. Programación de amplificación utilizada para la amplificación de un fragmento del gen de actina

Programación del termociclador	
Desnaturalización inicial:	95 °C - 5 min.
Ciclos: 40	
Desnaturalización:	94 °C - 30 seg
Hibridación:	50 °C - 45 seg.
Polimerización:	72 °C - 45 seg.
Polimerización final:	72 °C - 5 min.