

UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES

ESCUELA DE POSTGRADO

MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR



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)

TESIS

**Para optar el grado académico de Maestra en ciencias con
mención en:**

Biotecnología Molecular

Autora: Blga. Jóselyn Marilyn Zavala Arellano

Tumbes, 2020

UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES

ESCUELA DE POSTGRADO

MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR



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)

Tesis aprobada en forma y estilo por:

Dr. David Edilberto Saldarriaga Yacila (presidente)

Dr. Héctor Sanchez Suarez (vocal)

Ms.C. Juan Quimi Mujica (secretario)

Tumbes, 2020

UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES

ESCUELA DE POSTGRADO

MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR



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)

Los suscritos declaramos que la tesis es original en su contenido y forma:

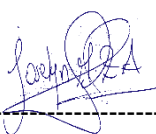
Blga. Jóselyn Marilyn Zavala Arellano (autora)

Ph.D. Benoit Diringer (asesor)

Tumbes, 2020

DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD

Yo, Jóselyn Marilyn Zavala Arellano, declaro que los resultados reportados en esta tesis son producto de mi trabajo con el apoyo permitido de terceros en cuanto a su concepción y análisis. Asimismo, declaro que hasta donde yo sé, no contiene material previamente publicado o escrito por otra persona excepto, donde se reconoce como tal a través de citas y con propósitos exclusivos de ilustración o comparación. En este sentido, afirmo que cualquier información presentada sin citar a un tercero es de mi propia autoría. Declaro, finalmente, que la redacción de esta tesis es producto de mi propio trabajo con la dirección y apoyo de mis asesores de tesis y mi jurado calificador, en cuanto a la concepción y al estilo de la presentación o a la expresión escrita.



Blga. Jóselyn Marilyn Zavala Arellano

DEDICATORIA

A Dios por permitirme llegar hasta esta etapa de mi vida, y haberme dado fortaleza y voluntad para cumplir mis objetivos.

A mis padres; María Arellano y Félix Zavala por ser el pilar fundamental en todo lo que soy, en toda mi educación tanto académica como personal, por su incondicional apoyo permanente a través del tiempo.

A mis hermanos; Junior, Victoria y Lisandro, quienes me motivan a darles el mejor de los ejemplos.

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios en primer lugar, por haber permitido que llegue hasta esta etapa de mi vida, sin él nada hubiera sido posible.

A mis padres, Félix Zavala Flores y María Arellano Chávez, por todo el apoyo desde siempre.

A mis hermanos, Junior, María Victoria y Lisandro por ser mi motivación en darles el mejor de los ejemplos.

A mi asesor, maestro y amigo, Benoit Diringer por todos los conocimientos compartidos y paciencia en cada paso de esta investigación.

A mis compañeros de equipo: Krizia, Karina, Javier y Jerson por todas las experiencias y conocimientos compartidos.

A Vladimir Lajones, por todo su apoyo incondicional en este tiempo.

Por supuesto, a mis amigos de maestría, mi grupo 5, quienes me han acompañado en días y noches de estudio y hemos compartido gratos momentos durante dos largos años, los quiero mucho.

Por último y de manera especial, agradezco al Consejo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación tecnológica por permitirme acceder a la beca la maestría y a la empresa IncaBiotec S.A.C por acogerme en su gran equipo humano.



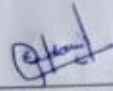
ACTA DE SUSTENTACION DE TESIS

En Tumbes, a los veintiséis días del mes de febrero del año dos mil veinte, a las 14:00 horas, en EN EL AULA N° 003 DE LA ESCUELA DE POSGRADO DE LA UNTUMBES, se reunieron los miembros del jurado designados con Resolución Directoral N° 052-2019/UNTUMBES-EPG-D; Dr. David Edilberto Saldarriaga Yacila - Presidente; Dr. Héctor Alfredo Sánchez Suarez - Secretario; M.Sc. Juan Gerardo Quimi Mujica - Vocal y con Resolución Directoral N° 035-2020/UNTUMBES-EPG-D, se fijó la fecha se sustentación y defensa de la tesis: 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), presentada por la estudiante del Programa de Maestría en Ciencias con mención en Biotecnología Molecular Joselyn Marilyn Zavala Arellano, asesorada por la Ph. D Benoit Mathieu Diringer.

Concluida la exposición y sustentación, absueltas las preguntas y efectuadas las observaciones, lo declaran: SOBRESALIENTE, dando cumplimiento al Art. 29° del Reglamento de Investigación con fines de Graduación en la Escuela de Posgrado de la Universidad Nacional de Tumbes.

Siendo las 14:25 horas, se dio por concluido el acto académico, y dando conformidad se procedió a firmar la presente acta en presencia del público.

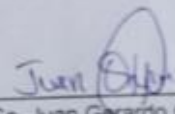
Tumbes, 26 de febrero de 2020.



Dr. David Edilberto Saldarriaga Yacila
Presidente
DNI: 00320699



Dr. Héctor Alfredo Sánchez Suarez
Secretario
DNI: 02837863



M.Sc. Juan Gerardo Quimi Mujica
Vocal
CI: 0923409239

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	XI
ABSTRACT	XII
CAPITULO I	13
1. INTRODUCCIÓN	13
CAPITULO II	18
2. ESTADO DEL ARTE	18
CAPITULO III	27
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	27
3.1. Recolección de ejemplares	27
3.2. Detección de Perkinsus sp. por cultivo en medio tioglicolato fluído rays (RFTM).....	28
3.3. Identificación molecular de Perkinsus sp. mediante PCR.	29
3.3.1..... Extracción de ADN a partir de branquias de Argopecten purpuratus y Anadara tuberculosa	29
3.3.2..... Caracterización molecular de las muestras de branquias mediante la amplificación de la región ITS.	29
3.3.3. Electroforesis	30
3.4. Detección de Perkinsus sp. mediante Shotgun proteomic.....	30

3.4.1.Extracción de proteínas	30
3.4.2.Digestión en solución de proteínas	31
a. Análisis de secuenciamiento	31
b. Análisis por espectrometría de masas, MALDI TOF-TOF.....	32
CAPITULO IV	33
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	33
4.1. Detección por cultivo de tejidos en RFTM.....	33
4.2. Identificación molecular de Perkinsus sp. mediante PCR.	40
4.3. Detección de Perkinsus sp. mediante Shotgun proteomic.....	44
CAPITULO V	52
5. CONCLUSIONES	52
CAPITULO VI	53
6. RECOMENDACIONES.....	53
CAPITULO VII	54
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54
CAPITULO VIII	68
8. ANEXOS.....	68

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1: Escala de intensidad de infección de <i>Perkinsus sp.</i> en tejidos de bivalvos propuesta por Mackin (Ray, 1954).	28
Cuadro 2: Muestras de tejido en RFTM positivas a <i>Perkinsus sp.</i> de individuos silvestres de <i>Argopecten purpuratus</i> (concha de abanico).....	34
Cuadro 3: Muestras de tejido en RFTM positivas a <i>Perkinsus sp.</i> de individuos silvestres de <i>Anadara tuberculosa</i> (concha negra).....	36
Cuadro 4: Especies de <i>Perkinsus sp.</i> identificados mediante PCR en los moluscos bivalvos <i>Argopecten purpuratus</i> (concha de abanico) y <i>Anadara tuberculosa</i> (concha negra).....	41
Cuadro 5: Péptidos identificados mediante espectrometría de masas MADI TOF TOF a partir de los cultivos de tejidos de branquia positivos en RFTM de <i>A. purpuratus</i>.	45
Cuadro 6: Péptidos identificados mediante espectrofotometría de masas MALDI TOF TOF a partir de los cultivos de tejido de branquias positivos en RFTM de <i>A. tuberculosa</i>.....	46

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Detección de *Perkinsus sp.* en individuos de *Argopecten purpuratus* mediante la prueba de cultivo del medio fluído de tioglicolato. A) Tejido de branquia de *A. purpuratus* (concha de abanico) sin presencia de hipnosporas. B), C), D), E) F), G), H) muestras de tejido de branquias de concha de abanico con presencia de hipnosporas de *Perkinsus sp.*, observadas a 100X. 35

Figura 2 Detección de *Perkinsus sp.* en individuos de *Anadara tuberculosa* mediante la prueba de cultivo del medio Fluído de tioglicolato. A) Tejido de branquia de *A. tuberculosa* (concha negra) sin presencia de hipnosporas de *Perkinsus sp.*, B), C), D) y E) tejido de branquia con presencia de hipnosporas de *Perkinsus sp.* observadas a 100X. 37

Figura 3 Diagnóstico de *Perkinsus sp.* dirigido a la región ITS ARNr mediante PCR. MP: marcador molecular(100pb); P1CA y P2CA: pool1 y pool 2 de concha de abanico con muestras positivas a *Perkinsus sp.* por RFTM; P1CN, P2CN, pool 1 y pool 2 de concha negra con muestras positivas a *Perkinsus sp.* por RFTM; P3CAy P3CN, pools de muestras negativas por RFTM, C+: control positivo; C-: control negativo; CE: control de extracción..... 40

RESUMEN

Los protozoarios del género *Perkinsus sp.* son patógenos invasivos, responsables de mortalidades masivas de diversos moluscos bivalvos, y generan grandes pérdidas económicas. Hasta la fecha, los métodos de diagnóstico son limitantes en término de rapidez, sensibilidad y especificidad. El objetivo de este estudio fue detectar e identificar *Perkinsus sp.* en bivalvos de origen silvestre con importancia económica y social: *Argopecten purpuratus* y *Anadara tuberculosa* mediante técnicas alternativas, más sensibles y rápidas. Se colectaron 129 individuos de *A. purpuratus* y 138 de *A. tuberculosa* en el transcurso del 2017- 2018. El diagnóstico preliminar de *Perkinsus sp. sp* fue realizado mediante la observación microscópica de hipnosporas en branquias incubadas en el medio tioglicolato fluído (RFTM), mientras que la identificación taxonómica fue realizada a nivel molecular por PCR. En paralelo se evaluó un nuevo método de diagnóstico basado en la detección de proteínas de *Perkinsus sp.* mediante “Shotgun proteomic”. La prevalencia de *Perkinsus sp.* fue 13,95% en *A. purpuratus* y 21,7% en *A. tuberculosa*. Los individuos de *A. purpuratus* mostraron niveles de infección de muy leves a moderados, mientras que fueron únicamente muy leves en *A. tuberculosa*. Los análisis moleculares basados en la secuenciación del ITS permitieron identificar a *P. chesapeakei* en *A. purpuratus* y *P. beihaiensis*, así como, *P. chesapeakei* en *A. tuberculosa*. El diagnóstico por shotgun proteomic concordó al 100% para las muestras de *A. purpuratus* y al 73.3% para *A. tuberculosa* con muestras previamente diagnosticadas por RFTM. De estas muestras se identificó 23 fragmentos distintos de péptidos pertenecientes a *Perkinsus sp.*. El 60.8% de estos péptidos provienen de proteínas codificadas por *Perkinsus sp.* pero con funciones desconocidas mientras que las demás intervienen en procesos biológicos conocidos. Este trabajo constituye el primer reporte de *Perkinsus sp.* en moluscos bivalvos en el Perú.

Palabras clave: *Perkinsus sp.*, *Argopecten purpuratus*, *Anadara tuberculosa*, RFTM, PCR, Shotgun proteomic.

ABSTRACT

Protozoa of the genus *Perkinsus sp.* are invasive pathogens, responsible for massive mortalities of various bivalve mollusks, and generate large economic losses. To date, diagnostic methods are limiting in terms of speed, sensitivity and specificity. The objective of this study was to detect and identify *Perkinsus sp.* in bivalves of wild origin and of economic and social importance: *Argopecten purpuratus* and *Anadara tuberculosa* through alternative, more sensitive and rapid techniques. 129 individuals of *A. purpuratus* and 138 of *A. tuberculosa* were collected in the course of 2017-2018. The preliminary diagnosis of *Perkinsus sp.* was made by microscopic observation of hypnospores in gills incubated in the fluid thioglycolate medium (RFTM), while Taxonomic identification was performed at the molecular level by PCR. In parallel, a new diagnostic method based on the detection of *Perkinsus sp.* proteins was evaluated using "Shotgun proteomic". The prevalences of *Perkinsus sp.* were 13.95% in *A. purpuratus* and 21.7% in *A. tuberculosa*. Individuals of *A. purpuratus* showed very mild to moderate levels of infection, while they were only very mild in *A. tuberculosa*. Molecular analyzes based on the sequencing of the ITS gen allowed to identify *P. chesapeaki* in *A. purpuratus* and *P. beihaiensis* and *P. chesapeaki* in *A. tuberculosa*. The diagnosis by proteomic shotgun agreed 100% for *A. purpuratus* samples and 73.3% for *A. tuberculosa* with samples previously diagnosed by RFTM. Of these samples 23 different fragments of peptides belonging to *Perkinsus sp.* were identified. 60.8% of these peptides come from proteins encoded by *Perkinsus sp.* but with unknown functions while the others intervene in known biological processes. This work constitutes the first report of *Perkinsus sp.* in bivalve molluscs in Peru.

Keywords: *Perkinsus sp.*, *Argopecten purpuratus*, *Anadara tuberculosa*, RFTM, PCR, Shotgun proteomic.

CAPITULO I

1. INTRODUCCIÓN

A nivel mundial, la acuicultura es una actividad importante para la alimentación, nutrición y genera millones de empleos. Con un incremento de la productividad anual del 5,8% entre 2001 y 2016, la acuicultura es el sector de producción de alimentos con la mayor tasa de crecimiento y proporciona más de la mitad del pescado destinado al consumo humano (FAO, 2018).

La producción acuícola mundial hasta el 2016 está representada en primer lugar por peces con 80,0 millones de toneladas de pescado comestible y 54,1 millones de toneladas de pescado comestible cultivado, seguido con 31,0 millones de toneladas de plantas acuáticas, 17,1 millones de toneladas de moluscos y 7,9 millones de toneladas de crustáceos (FAO, 2018).

De acuerdo con los datos de la FAO, de los 17,1 millones de toneladas de producción de moluscos, 16,9 millones de toneladas están constituidas por moluscos bivalvos los cuales representan el 58.8% de la producción de la acuicultura marina-costera.

A nivel mundial, China representa el 85% de la producción de moluscos bivalvos, posicionándose entonces como el principal productor. En América del Sur, la mayor parte de producción de moluscos se encuentra en Chile (mejillones y vieiras), seguido por Perú (vieiras) (Wijsman, Troost, Fang, & Roncarati, 2019).

En el Perú el cultivo de moluscos está constituido principalmente por la viera *Argopecten purpuratus*, (concha de abanico), que habita la costa desde Paita hasta Ilo y posee una gran importancia económica. Estas producciones son destinadas fundamentalmente a la exportación, netamente al mercado de países desarrollados (Francia, Estados Unidos y Bélgica).

En el año 2013, la producción de concha de abanico se ubicó como el primer sector de producción acuícola del país con un récord de exportaciones de US\$ 160 millones (PromPerú, 2015).

La dependencia de la captación de semilla del medio natural ha originado su escasez debido a la sobreexplotación de los bancos naturales, por lo que se ha optado en los últimos años establecer sistemas de producción de semilla en condiciones controladas.

Si bien, existen hatcherys que desarrollan la producción de la concha de abanico, el proceso de engorde enfrenta varios cuellos de botella como; factores abióticos (hipoxia, altas temperaturas y variaciones de salinidad) y bióticos (mareas rojas, contaminaciones antrópicas, infecciones por patógenos).

Por otro lado, *Anadara tuberculosa* (concha negra), un bivalvo de tipo arca, es considerado como una especie emblemática del ecosistema de manglar del Pacífico y su importancia radica en que su extracción es el sustento de muchas familias de bajos recursos. En las últimas décadas, varios estudios han señalado una disminución preocupante de poblaciones silvestres en países de América del Sur (Colombia, Ecuador, Perú), debido a la sobreexplotación, la pérdida o degradación del hábitat, el aumento del esfuerzo pesquero y la falta de una estrategia eficaz de gestión de poblaciones (Mora, Moreno, & Jurado, 2011; Lucero, Cantera, & Neira, 2011; Ordinola, Montero, Alemán, & Llanos, 2007).

Con el fin de revertir esta realidad, proyectos de producción de semilla en laboratorio han sido conducidos en Perú (Diringer, Vasquez, Moreno, Prettel, & Sahuquet, 2012) y en Ecuador; (Concepto Azul, 2014), sin embargo, en ambos países los cultivos sufrieron mortalidades causadas por patógenos de tipo bacterianos y protozoarios.

Entre los patógenos más alarmantes para los cultivos de moluscos se encuentran los parásitos protozoarios del género *Perkinsus sp.* causantes de la enfermedad, referida como “Perkinsosis” o “dermo”, responsables de mortalidades masivas en moluscos bivalvos alrededor del mundo como: *Crassostrea virginica*, *Ruditapes philippinarum*, *R. decussatus* y *Anomalocardia brasiliana* respectivamente (Hasanuzzaman et al., 2018; Pinho Ferreira et al., 2015; Ruano, Batista, & Arcangeli, 2015).

Los eventos de mortalidad relacionados a *Perkinsus sp.* han venido incidiendo tanto en poblaciones silvestres como cultivadas, constituyendo un impedimento relevante para la producción comercial.

Actualmente, el género incluye 7 especies válidas: *P. marinus*, *P. olsenii* (*P. atlanticus*), *P. Chesapeakei* (*P. andrewsi*), *P. beihainensis*, *P. honshuensis*, *P. mediterraneus*, y *P. qugwadi*.

De las siete especies de *Perkinsus sp.* conocidas, cuatro han sido reportadas en Sudamérica, en particular *P. marinus* y *P. olsenii* que son de notificación obligatoria a la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE, 2017).

En ese sentido, mortalidades que han excedido el 80% fueron asociados con la presencia de *P. marinus* en ostras tanto silvestres como cultivadas (*Crassostrea*

virginica) (Burreson & Ragone Calvo, 1996; Ríos-Quintal, Gutiérrez S, Jiménez-García , Lango-Reynoso , & Salcedo- Garduño, 2010), mientras que *P. olseni* fue responsable de hasta 80% de mortalidad de *Ruditapes decussatus* en Europa. Especies de *Perkinsus sp.* han sido relacionadas con elevadas mortalidades de *Ruditapes philippinarum* en Korea del Sur (Choi & Park, 1997; Park, Park , Jehee, & Choi, 2005).

El ciclo de vida de *Perkinsus sp.* incluye dos etapas:

- Parásita, donde los trofozoítos proliferan en el interior del organismo mediante palintomía.
- Libre, cuando a la muerte del hospedero las hipnosporas son liberadas en el agua y se convierten en zoosporas capaces de introducirse en los tejidos de otros hospederos generando así nuevas infecciones (Ordás & Figueras Huerta, 1998).

La infección inicia probablemente a través de las branquias, manto e intestino en donde el parásito destruye el epitelio, lisa la membrana basal y se expande vía hemocitos a todas las partes del cuerpo (Gosling, 2003; Smolowitz, 2015).

Es importante mencionar que cada etapa de la vida del parásito es infecciosa y la transmisión de la enfermedad es directamente de hospedador a hospedador, es decir, de manera horizontal.

En este sentido las células viables son liberadas mediante las heces o por medio de los tejidos en descomposición al morir el hospedero y éstas son probablemente ingeridas por otro cuando está filtrando para alimentarse (Villanueva Fonseca L. C, 2012).

Los síntomas asociados a una perkinsosis corresponden a palidez de tejidos, débil cierre de valvas, menor desarrollo gonadal y degeneración de tejidos, resultando

en un desbalance energético que provoca un crecimiento lento y por ende la muerte (Villalva, Reece, Ordás, Casas, & Figueroa, 2004; Soudant, Chu, & Volety, 2013).

Reportes han demostrado que las altas temperaturas y salinidades, así como, la contaminación, la pobre condición fisiológica del hospedero relacionada a su alimentación, su estadio gonadosomático o la densidad de individuos en el cultivo favorecen el desarrollo de *Perkinsus sp.* (Cáceres Martines, 2002; Byers, Blakeslee, Linder, Cooper & Maguire, 2008).

A pesar del importante impacto económico de este patógeno, la detección e identificación a nivel de especie sigue siendo un desafío. Las técnicas de referencia convencionales para diagnosticar la presencia de infecciones por *Perkinsus sp.* corresponden a: 1) ensayos de cultivo en medio Tioglicolato fluído (RFTM) que consiste en la visualización de hipnosporas después de varios días de incubación de tejidos en RFTM (Danta Neto, et al. 2016; Pinho et al. 2014; Choi and Waki, 2016) y 2) secuenciación de amplicones obtenidos por PCR punto final dirigido a la región ITS respectivamente (Audemard, Carnegie, & Burreson, 2008; Ferreira, et al. 2014).

Si bien, estas técnicas presentan ventajas como bajo costo y facilidad de desarrollo, son limitantes a nivel de tiempo de diagnóstico, especificidad y sensibilidad en caso de infecciones leves.

Es por ello que este estudio tiene como objetivo detectar mediante técnicas de diagnóstico molecular convencionales y proteómica la presencia de *Perkinsus sp.* en poblaciones silvestres de *Argopecten purpuratus* concha de abanico y *Anadara tuberculosa* concha negra

CAPITULO II

2. ESTADO DEL ARTE

La enfermedad Demo o Perkinsosis, fue referida por primera vez en el año 1946, cuando la industria petrolera financió investigaciones para encontrar la causa que conllevaba a las masivas mortalidades de la ostra *Crassostrea virginica* en la costa de Louisiana en Estados Unidos (Ray S,1996).

Los resultados preliminares y por ende la conclusión de dichas investigaciones revelaron la detección de un patógeno no conocido, denominado en ese entonces *Dermocystidium marinus*, actualmente conocido como *Perkinsus marinus* como responsable de las extensas mortalidades de la ostra (Mackin, 1950).

Una vez descubierto, este patógeno ha ido expandiendo su rango de distribución con la influencia de los innumerables ingresos incontrolados del ostión americano en diferentes localidades. Hasta la fecha, su distribución va desde Maine hasta Florida en la Costa Este de E.E.U.U y algunas localidades del Golfo de México, como también, posiblemente en el Caribe, Hawái, Venezuela, Portugal y Brasil (Cáceres Martínez, Vásquez Yeomans, & Padilla Lardizabal, 2007).

Los *Perkinsus sp.* son parásitos protistas que infectan principalmente a moluscos bivalvos en todo el mundo, entre ellos, ostras, vieiras, almejas, pero también a gasterópodos como abulones (Bower, 2010).

El parásito afecta directamente a los hemocitos paliales después de ser fagocitado y en lugar de ser eliminado por el sistema inmune del huésped, éste comienza a multiplicarse, causando anemia hemolítica y putrefacción de los tejidos, los cuales conllevan a un desbalance energético, lento crecimiento y por ende a la muerte (Lay, Santos, Barbosa, Pales Espinosa, & Allam, 2018; Lau, Gambino, Santos, Pales Espinosa, & Allam, 2018).

Hace muchos años, se creía que estos patógenos pertenecían al phylum Apicomplexa. Sin embargo, Fong et al. (1993) y Goggin & Barker (1993), publicaron la primera secuencia de ADN para una especie de *Perkinsus sp.*, donde, los resultados de análisis filogenéticos basados en la secuencia del gen del ARN ribosómico de la subunidad pequeña (ARNr SSU) y utilizando una base de datos taxonómico de protistas, indicó que las especies de *Perkinsus sp.* son estrechamente relacionadas a los dinoflagelados, aunque mantienen también cierta relación con los Apicomplexas dentro del grupo de taxa de los alveolates (Villalva, Reece, Ordás, Casas, & Figueroa, 2004).

Los *Perkinsus sp.* fueron recientemente incluidos al filo Perkinsozoa, siendo el primer grupo que se ramifica cerca de la línea compartida por los dinoflagelados y Apicomplexa (F. Robledo, et al. 2011).

En ese aspecto, hay siete especies aceptadas en el género *Perkinsus sp.*: *P. marinus*, *P. olseni*, *P. qugwadi*, *P. cheasapeki*, *P. mediterraneus*, *P. honshuensis* y *P. beihainensis* (Villalva et al. 2004).

De todas las especies mencionadas, *P. marinus* y *P. olseni*, son las mas invasivas y peligrosas, ya que han sido asociadas a masivas mortalidades de moluscos silvestres y cultivados a tal punto que su presencia es de notificación obligatoria por la Organización Mundial de Sanidad Animal (World Organisation for Animal Health, 2017).

El ciclo de vida de *Perkinsus sp.* es muy similar para todas las especies y consiste en dos fases: parásita y libre (D, Petty, 2010).

De todos los estadios, las hipnosporas son las más resistentes en el ciclo de vida de *Perkinsus sp.*, la cual permite que se desarrolle aún en condiciones desfavorables (Casas, Villalva, & Reece, 2002).

El equipo de Ford, Chintala, & Bushek, (2002) demostró experimentalmente que todos los estadios de *Perkinsus sp.* son infecciosas en las ostras.

La transmisión del patógeno es directa entre hospederos, sin depender de la densidad de individuos (Guo & Ford, 2016).

En este aspecto, Bushek, Ford, & Chintala (2002), cuantificaron por infección experimental las células de *P. marinus* en las heces y pseudoheces de las ostras infectadas de *C. virginica*. Los resultados demostraron que las células eliminadas por las heces o pseudoheces representaban solo es el 5% de la dosis inyectada en los individuos, por lo que concluyen que la liberación de células de *P. marinus* mediante las heces es relativamente baja en comparación con el gran numero que se desprende a partir de cadáveres de ostras.

Por otro lado, ensayos *in vitro* han confirmado que la influencia de una alta temperatura y salinidad torna un ambiente más favorable para la viabilidad y actividad de las células de *P. marinus*. Además, experimentos *in vivo* han demostrado la relación directa que tienen ambos factores ambientales en incrementar la infección y la progresión de la enfermedad (Villalva, Reece, Ordás, Casas, & Figueroa, 2004).

Los investigadores Gullian-Klanian, Herrera-Silveira, Rodríguez-Canul & Aguirre-Macedo (2008), además de demostrar la asociación de los parámetros ambientales como temperatura, salinidad, amonio, nitrato, nitrito y sílice, estudiaron también, los parámetros fisiológicos (densidad de hemocitos, concentración de proteínas) e inmunológicos (lisozima y aglutinación) en relación con la infección. Los resultados sugirieron mayor prevalencia del patógeno (70%) en verano que en temporada de frío (7%), que las variaciones de salinidad, fosforo y sílice influyen las prevalencias, así como concentraciones de proteínas, lisozima y aglutinación.

La Peyre, Casas, Villalba, & La Peyre (2008), evaluaron los efectos de la temperatura sobre la viabilidad, actividad metabólica y proliferación de aislados de *P. marinus* y *P. olseni*, demostrando que hubo una disminución en la actividad metabólica y proliferación cuando se bajó la temperatura de 28 a 15°C, mientras que a 4°C hubo una escasa actividad metabólica y proliferación nula.

Cáceres Martínez, Madero López, Padilla Lardizábal, & Vásquez Yeomans (2016) identificaron la presencia de *Perkinsus marinus* en la ostra *Crassostrea corteziensis* in Nayarit en la costa del Pacífico – México. Con la finalidad de obtener data epizootiológica sobre el comportamiento de este patógeno en un nuevo hospedero, este equipo evaluó la relación de la temperatura y salinidad como también el tamaño y sexo del hospedero sobre la enfermedad. Sus resultados revelan que la prevalencia fue muy baja en invierno (<6%) cuando la temperatura y la salinidad iban en rango de 24°C y 33 ppt respectivamente, sin embargo, la alta prevalencia ocurrió en verano (37%) cuando la temperatura y salinidad fueron cerca de 30°C y 20ppt respectivamente.

Ramos Queiroga, Marques Santos, Almeida de Medeiros, & Da Silva (2016) evaluaron los efectos de la temperatura y salinidad sobre la proliferación y diseminación de un aislado de *P. marinus* a partir de ostras nativas de *Crassostrea gasar* y *Crassostrea rhizophora* en el noreste de Brasil. Realizaron tres ensayos: 15°C, 25°C y 35°C y 5, 20 y 35 ppt, respectivamente en 15 días de tratamiento,

demostrando que *P. marinus* se multiplica más activamente a temperaturas y salinidades altas (35°C y 35 ppt).

Una investigación similar realizado por Malek & Byers (2018), demostró que los individuos de la ostra *Crassostrea virginica* que habitan en las zonas intermareal tienen una intensidad y prevalencia de infección mucho más alta que las ostras submareales. Los autores indican que la intensidad de infección llegó a su punto más alto en 35°C, mientras que la sobrevivencia del hospedero disminuyó en cuanto aumentaba la temperatura (47-50°C) ocasionando mortalidades masivas.

La técnica de detección estándar para la vigilancia de *Perkinsus sp.* son los ensayos de cultivo de tejidos de individuos infectados en medio tioglicolato fluído (RFTM). Este método desarrollado por primera vez en 1950 por Sammy Ray (1950) permite estimar la intensidad de infección de forma semicuantitativa. El ensayo consiste en cortar pequeños fragmentos del tejido de los animales, generalmente branquia, manto y recto que son incubados por varios días (05-07 días) en el medio de cultivo RFTM incubado entre 25-30°C y a una salinidad de 20 -50 ppt (714mOsm kg⁻¹) en oscuridad, donde, las células de *Perkinsus sp.* se agrandan de 2-10 µm hasta 50-70 µm, convirtiéndose en hipnosporas. Posterior a la incubación se tiñe la muestra con yodo lugol para que las hipnosporas sean fácilmente visibles (Dungan & Bushek, 2015; Audemard, Carnegie, & Burreson, 2008; Ashton, Kim, & Powell, 2006).

El ensayo por RFTM es el más sensible de todos los métodos histológicos, además, de ser un protocolo de ejecución simple y de no requerir equipos y materiales costosos o especializados. Sin embargo, su principal limitante reside en la imposibilidad de diferencias entre sí a las especies de *Perkinsus sp.*, ya que las hipnosporas son muy similares (Smolowitz, 2015).

Si bien, la OIE reconoce la técnica de RFTM como un método de vigilancia de la presencia de *Perkinsus sp.*, el diagnóstico es válido únicamente en zonas y por

especies (huésped y patógeno) donde se haya realizado previamente un diagnóstico complementario confirmativo. En otras palabras, la identificación taxonómica del patógeno, así como la validación de la presencia de *Perkinsus sp.* en un bivalvo o una zona geográfica nueva requerirá de un diagnóstico confirmatorio de tipo molecular. El análisis molecular de referencia se basa en la amplificación y secuenciación por PCR, de genes de tipo ITS (Internal transcribed spacer) o NTS (non-transcribed spacer) que permiten la realización de análisis filogenéticos y la identificación del patógeno a nivel de especie (Pagenkopp Lohan, et al. 2018).

Estos análisis complementarios de la técnica de RFTM permitieron en los últimos años revolucionar los estudios de epidemiología descriptiva y analítica; 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.*

Así Ek-Huchim et al. (2017), determinaron la posible translocación de *P. marinus* desde el Golfo de México hasta la costa del Pacífico mediante PCR dirigido a la región NTS-ADNr y la detección por RFTM en la ostra. *Crassostrea virginica* de cuatro lagunas principales (Machona Pajonal Carmen, Mandinga, Veracruz y La Pesca), indicando una mayor prevalencia en el complejo Laguna Carmen, Pajonal-Machona (73% por PCR y 58% por RFTM). Además, se caracterizaron 10 secuencias individuales, los cuales comparten una similitud del 96-100% con 18 secuencias de la base de datos GenBank provenientes de infecciones de la costa del Pacífico y E.E.U.U.

Cáceres Martínez, et al. (2012) estudiaron a la ostra del manglar *C. palmula* como huésped alternativo de *Perkinsus sp.* ya que en su hábitat coexiste con *Crassostrea corteziensis*, especie donde ya se confirmó Perkinsosis. Los tejidos de *C. palmula* fueron evaluados utilizando RFTM, indicando que existe una prevalencia de 6.7

hasta el 20%, la cual fue confirmada con análisis de PCR basado en NTS confirmando la especie *P. marinus* con una similitud del 98-100% con el banco de datos GenBank.

Por otra parte, Da Silva, et al. (2013) reportaron por primera vez en Sudamérica la presencia de *P. marinus*, infectando las otras del manglar *Crassostrea rhizophorae* del estuario de Paraíba-Brasil. La detección se realizó mediante la incubación de porciones de branquias en RFTM, obteniendo una prevalencia hasta del 70%. Posteriormente el parásito fue aislado y propagado *in vitro* para someterlo en análisis de PCR, RLFP y el secuenciamiento dirigido a la región ITS permitió identificar la especie como *P. marinus*.

Por su parte Cunha, et al. (2018) detectaron por RFTM y análisis de PCR a *P. marinus* en las ostras *C. gasar* y *C. gigas* en São Francisco do Sul en Brasil.

Así mismo, existen investigaciones de detección de *P. olseni*, entre ellas Ruano, Batista, & Arcangeli (2015) menciona que *P. olseni* había sido referida por primera vez por Lester y Davis (1981) en el abulón *Haliotis ruber* en Australia.

Pinho Brandao et al. (2013) determinaron la presencia e identificación por RFTM y PCR de *P. olseni* en 900 ostras *C. rhizophorae*, obteniendo una prevalencia de hasta el 63% con una intensidad de infección que varía desde muy ligera a avanzada.

Waki, et al. (2018) relacionaron el decrecimiento productivo de la almeja de Manila, *Ruditapes philippinarum* con la identificación de *P. olseni* en 7 grupos de individuos silvestres mediante análisis de PCR en tiempo real. La prevalencia por pool alcanzó el 100%, reportando que llegaron a observar hasta 10^6 células/g en setiembre.

Choi & Waki (2016), detectaron *P. olseni* en la almeja de Manila *R. philippinarum* revelando que la intensidad de infección con 1 y 10^6 cel/g causó putrefacción y lesiones en los tejidos como branquias y manto. También reportaron una maduración lenta de gónadas y la pérdida de energía. En la misma investigación estos autores identificaron a *P. houshuensis* en la almeja *R. variagata* de la isla Jeju.

En la India, se han iniciado programas de vigilancia de enfermedades de animales acuáticos, donde, Shamal et al. (2018) observaron infecciones por *P. olseni* en la almeja amarilla *Paphia malabarica*. La detección fue llevada a cabo por RFTM, y la identificación por hibridación *in situ* y taxonomía molecular, siendo el primer reporte en esta especie.

Hasanuzzaman, et al. (2018) caracterizaron y compararon la expresión de genes de los hemocitos involucrados en la respuesta inmune de *R. philippinarum* infectados naturalmente y experimentalmente con *P. olseni* (10 h, 24 h, 8 días). En el experimento se encontraron genes de señalización de NIK/NF-KappaB, receptor tipo Toll y apoptosis. En cuanto al estudio en individuos naturalmente infectados se observó genes relacionados a la organización del citoesqueleto, sobrevivencia celular, apoptosis, encapsulación, células redox y homeostasis lipídica como principal sistema de respuesta del hospedero.

Por otro lado, Ramos Queiroga, Tubinno Vianna, Barreto Vieira, Dantas Farias, & Da Silva (2015) han realizado la detección e identificación de *P. beihaiensis* infectando la ostra *Crassostrea gasar* en el noreste de Brasil, mediante RFTM, obteniendo una prevalencia de 48,9%, análisis de PCR dirigido a la región ITS utilizando primers específicos, como también, por PCR-RFLP con la finalidad de obtener marcadores de localización en las ostras enfermas y sanas.

En cuanto a *P. chesapeaki*, Danta Neto, et al. (2016), reportaron el primer animal infectando a la ostra *C. rhizophorae* en América del Sur, específicamente en el

estuario Jaguaribe. Evaluaron mediante RFTM a 150 ostras y realizaron análisis de PCR para confirmar e identificar la presencia de *P. Chesapeakei*.

Kang, et al. (2016), mencionan que *P. honshuensis*, una nueva especie de *Perkinsus sp.* que infecta a las almejas de Manila *R. philippinarum* en Japón también estaría infectando a las almejas *R. variegatus* en Corea, confirmando su teoría al observar la morfología “signet ring” en el tejido conectivo y glándula digestiva con una intensidad de infección menor y al obtener secuencias con un porcentaje de identidad de 99% con *P. honshuensis* después de un análisis de PCR dirigido a la región ITS y NTS.

Con respecto a *P. qugwadi*, se identificó por primera vez en 1988 en Canadá durante eventos de mortalidades en la vieira *Patinopecten yessoensis*. No obstante, este patógeno no volvió a ser notificado después de 1997, hasta que, Itoh et al. (2013) volvieron a detectarlo.

P. mediterraneus fue detectado por primera vez en el 2004 en la especie *Ostrea edulis* en Mahon, Islas Baleáricas, España. Después esta especie se volvió a encontrar infectando poblaciones de ostras en Andratx y en el Golfo de Manfredonia, Italia. Valencia, Bassitta, Picornell, Ramon, & Castro (2014) detectaron a *P. mediterraneus* en *Arca noae* y *Mimachlamys varia* mediante RFTM y análisis de PCR -RFLP a partir de branquias de individuos sintomáticos

CAPITULO III

3. MATERIAL Y MÉTODOS.

3.1. Recolección de ejemplares

Ejemplares del molusco concha de abanico *Argopecten purpuratus*, fueron adquiridos mediante la modalidad de compra directa a los buzos en la Bahía de Sechura, Piura (n=129), para luego ser transportados por un periodo de 5 horas dentro de una caja térmica que contenía capas de gel pack a la ciudad de Tumbes, en los meses de diciembre del 2017 y abril del 2018.

En el caso de individuos de concha negra *Anadara tuberculosa* (n=138), fueron colectados manualmente con la ayuda de un extractor (conchero) en los manglares de Puerto Pizarro, Tumbes en las coordenadas 3°30'12.96" S- 80°23'55.87" O, respectivamente en febrero, marzo y junio del 2018.

Para ambos casos los animales fueron lavados con agua de mar con el objetivo de eliminar detritus impregnado en las valvas y seleccionados de acuerdo a la talla mínima legal de extracción: $\geq 6,5$ cm (*A. purpuratus*) y $\geq 4,5$ cm (*A. tuberculosa*) respectivamente, según la RM. N°209-2001 PE.

Posteriormente fueron transportados a los laboratorios de IncaBiotec S.A.C, para la recepción y procesamiento de muestras.

3.2. Detección de *Perkinsus sp.* por cultivo en medio tioglicolato fluído rays (RFTM)

Las branquias fueron recuperadas a partir de cada individuo, cortadas en fragmentos de 5 x 5 mm e incubadas individualmente en medio Tioglicolato fluído (RFTM) (Ray,1966) conteniendo antibióticos (400,000U Penicilina ,400mg/L Sulfato de streptomycin,400mg/L Eritromicina) (Casas, et al. 2008). Después de siete días de incubación en la oscuridad a temperatura de 25-28°C, los tejidos fueron macerados en un porta objeto teñido con yodo de Lugol (3%) y después de 10 minutos, examinados en un microscopio para la observación y contabilización de hiposporas de *Perkinsus sp.*

La prevalencia de infección fue calculada mediante la fórmula de Thrusfield (1995):

$$\text{Prevalencia} = \frac{\text{N.º de organismo con evidencia de infección}}{\text{N.º total de animales muestreados}} \times 100$$

Cuadro 1: Escala de intensidad de infección de *Perkinsus sp.* en tejidos de bivalvos propuesta por Mackin (Ray, 1954).

Nivel de Infección de <i>Perkinsus sp.</i>	Nº de células de <i>Perkinsus sp.</i>	Valores numéricos
1	0, No infectada	0
2	1, 10 células	0.33
3	11,30 células	0.67, 1.0, 1.33
4	31,100 células	1.67, 2.0, 2.33
5	Más de 101 células	2.67, 3.0, 3.33

3.3. Identificación molecular de *Perkinsus sp.* mediante PCR.

3.3.1. Extracción de ADN a partir de branquias de *Argopecten purpuratus* y *Anadara tuberculosa*

Las muestras de branquias positivas en RFTM fueron destinadas para extracción de ADN, por lo cual se tomó 0.1g de tejido en un tubo Eppendorf de 1.5 ml y fue lavado con solución salina al 2%. Posteriormente se maceró el tejido y se agregó 700 µl de CTAB lisis (100 mM-tris HCl pH 8, 1.4 M NaCl; EDTA 20mM; CTAB 2%) más 3 µl de proteinasa K (20mg/ml) se incubó en baño seco a 55°C por 3 horas, vortexeando cada 20 minutos. Después se colocó un volumen final igual (300:300 µl) de fenol: cloroformo/isoamil (25:24:1). Se centrifugó la muestra a 10 000 rpm por 10 minutos y se recuperó 250 µl del sobrenadante y se transfirió a un nuevo tubo. Posteriormente se agregó 2 volumen de etanol al 96% y se incubó a -20°C por 30 minutos a 1 hora. Luego se centrifugó a 13 000 rpm por 10 minutos. Se eliminó el sobrenadante y se agregó 500 µl de etanol al 75% y se centrifugó a 10 000 rpm por 5 minutos. Después se eliminó el sobrenadante y se dejó secar el pellet por 10 minutos a temperatura ambiente. Se resuspendió el pellet seco en 50 µl de TE (10mM Tris HCl pH 8; 1mM EDTA) y finalmente se agregó 1 µl de ARNasa 10mg/ml y se incubó a 65°C por 10 minutos antes de ser guardado para su conservación a -20°C

3.3.2. Caracterización molecular de las muestras de branquias mediante la amplificación de la región ITS.

La región ITS fue amplificada utilizando los primers PK-ITSF 85 (CCGCTTTGTTTGGATCCC) y PK-ITSR 750(ACATCAGGCCTTCTAATGATG), los cuales generan un producto de 503 pb. El mix de PCR dio un volumen final de 25 µl y consistió de 2,5 µl de buffer a 10 X, 2,5 µl de MgCl₂ a 25 mM, 0,5 dNTPs a 10 mM, 5 U de Taq DNA Polimerasa, 0,6 µl, Primer F a 15 Pmol, 0,6 µl Primer R a 15 Pmol y 16,4 µl de agua ultra pura. La programación del termociclador es: 95°C por 4 minutos, 95°C por 1 minuto (40 ciclos), 55°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto, 72°C por 10 minutos y 4°C por 24 horas (OIE, 2017).

En la reacción realizada se incluyó un control positivo de ADN genómico de *C. gigas* infectado por *P. marinus* (donado por la MsC. Lizeth Villanueva Fonseca, Instituto Politécnico Nacional, Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional Unidad Sinaloa, México).

3.3.3. Electroforesis

Los productos de PCR fueron observados en un gel de agarosa a una concentración de 1,5 %, con la adición de bromuro de etidio como sustancia de revelado (0,5 mg/ml). En la electroforesis, se utilizó como tampón de migración TAE 1 X (Tris + Ácido acético + EDTA) y como tampón de depósito, azul de bromofenol.

Para la migración se colocó 6 µl de amplicón más 2 µl de tampón de depósito por cada muestra y 4 µl de marcador de peso de 1000pb, el potencial eléctrico utilizado fue de 90V por 30 minutos. Las amplificaciones de tamaño esperado fueron enviadas a secuenciar a Macrogen USA.

3.4. Detección de *Perkinsus sp.* mediante Shotgun proteomic.

3.4.1. Extracción de proteínas

Las branquias positivas del ensayo de RFTM fueron lavadas con agua grado HPLC dos veces a 12000 rpm por 5 minutos y luego se procedió a macerar el tejido, adicionamos 600 µl de buffer lisis (8M urea, 20 mM DTT, 4% CHAPS) y se continuó macerando. Luego se agregó 1mM de PMSF, se siguió macerando y se sonicó por 5 minutos, se centrifugó a 12 000 g por 20 minutos a 4°C y se recuperó el sobrenadante. Posteriormente se agregó un volumen de acetona y se incubó por 2 horas a -20°C. Después se centrifugó a 13000 rpm por 10 minutos y se eliminó el sobrenadante, se lavó el pellet con acetona. Luego se secaron las muestras a temperatura ambiente sobre hielo, una vez seco el pellet se resuspendió en 100 µl

buffer de lisis. Finalmente, las muestras fueron conservadas a -20°C.

3.4.2. Digestión en solución de proteínas

a. Reducción y Alquilación

A cada muestra se le agregó 15 µl de 50mM de bicarbonato de amonio, 1.5 de 100 mM de DTT y 10 µl de proteína y aforar a 27 µl, luego se incubó a 95°C por 5 minutos en baño seco.

Posteriormente se añadió 3 µl de 100 mM de iodoacetamida y se incubó en oscuridad por 20 minutos.

b. Digestión

Para la digestión se agregó a cada muestra 2 µl de tripsina (0.1g/µl) y se incubó a 37°C por 4 horas, después se añadió 1.5 µl de TFA.

c. Enriquecimiento de péptidos después de la digestión zip tip (c18)

Se humedeció la columna con una solución de 80% de ACN en agua grado HPLC, luego se equilibró con una solución de 0.1% de TFA en agua grado HPLC. Posteriormente se aspiró y dispensó la muestra (10 veces para humedecer, equilibrar, extraer péptidos) en la columna.

Después se equilibró nuevamente la columna con una solución de 0.1% de TFA en agua grado HPLC y se realizó la elución de péptidos en una solución de 80% de ACN en agua grado HPLC.

Por último, se dejó secar las muestras en una cámara de vacío, se resuspendió en 0.1% TFA en agua grado HPLC y se espió en placa opti –TOF 1-1 V/V con matriz CHCA 10mg/ml A (0.1% de TFA en agua grado HPLC) y solución B (0.1% de TFA en Acetonitrilo) 50/50.

3.4.3. Procesamiento de datos

a. Análisis de secuenciamiento

El análisis de los amplicones obtenidos por PCR de muestras positivas a *Perkinsus* sp. se realizó solamente a partir de las secuencias que presentaban pictogramas

legibles. Las secuencias fueron alineadas utilizando el programa MEGA 7 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0), posteriormente se compararon las secuencias completas con la base de datos Blast (NCBI 2019). <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.

b. Análisis por espectrometría de masas, MALDI TOF-TOF

El análisis de proteínas se obtuvo a partir de un sistema analizador proteómico MALDI-TOF/TOF (5800, AB SCIEX System), Los espectros fueron captados en modo MS, reflector positivo con un láser Nd: YAG de 349 nm con una intensidad de 2800 y una velocidad de 600 $\mu\text{m}/\text{segundo}$,750 disparos dentro de un rango de masas entre 800-4000 m/z, y procesados en el software proteinPilot™; para la calibración del equipo se utilizó un kit Mass Standards AB SCIEX TOF/TOFTM Instruments. Las secuencias no alineadas por el programa ProteinPilot™, fueron analizadas mediante Protein BLAST.

CAPITULO IV

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Detección por cultivo de tejidos en RFTM

El cultivo de tejido en RFTM indica la presencia de *Perkinsus sp.* en 18 de los 129 individuos silvestres de *Argopecten purpuratus* (concha de abanico) analizados (**Tabla 02**). En las muestras positivas se logró contabilizar de 01 hasta 90 estructuras esféricas de 20 a 50 μm , dispersas y separadas de color oscuro reconocidas como hipnosporas, un estadio de la fase vegetativa del patógeno (**Figura 01**). En conjunto estos datos indican una prevalencia de infección de 13,95%, donde el 8.52% presenta un grado de intensidad de infección de nivel 2 (0.33), el 2.32% presenta un grado de intensidad de infección de nivel 3 (0.67) y el 3.10% presenta un grado de intensidad de infección de nivel 4 (1.67) según la escala de Mackin.

Cuadro 2: Muestras de tejido en RFTM positivas a *Perkinsus* sp. de individuos silvestres de *Argopecten purpuratus* (concha de abanico).

FECHA DE INGRESO	CÓDIGO DE MUESTRA	N° DE HIPNOSPORAS	NIVEL/N° INTENSIDAD DE INFECCIÓN
Dic-2017	13CH	90	4/1.67
	10CH	2	2/0.33
	1CH	4	2/0.33
	I3	2	2/0.33
	7G	1	2/0.33
	8G	1	2/0.33
	11G	1	2/0.33
	18G	25	3/0.67
	19G	33	4/1.67
	22G	10	2/0.33
Abr-2018	23G	35	4/1.67
	25G	31	4/1.67
	9M	13	3/0.67
	14M	1	2/0.33
	24M	30	3/0.67
	1P	1	2/0.33
	15P	3	2/0.33
	39P	3	2/0.33

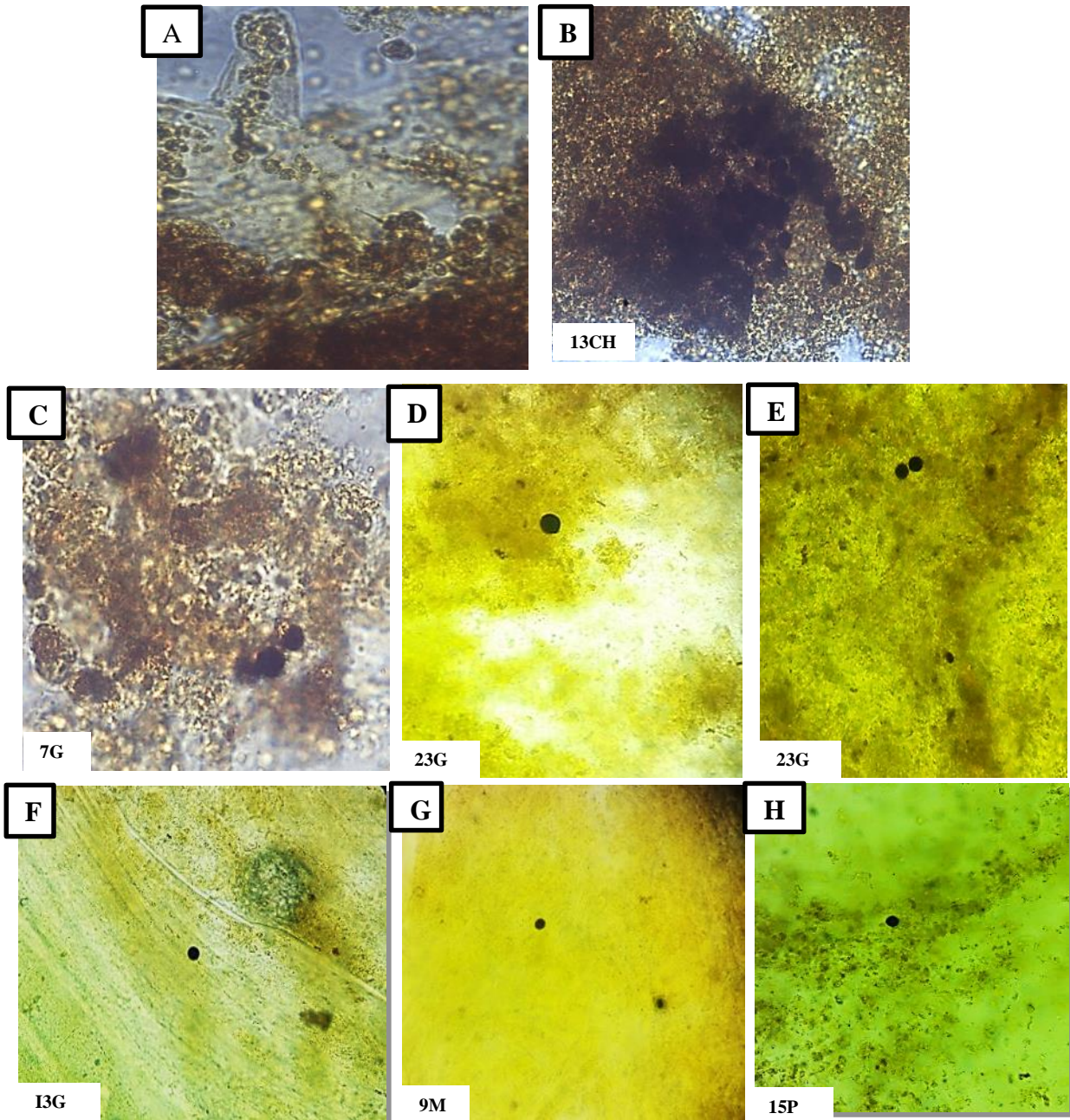


Figura 1: Detección de *Perkinsus* sp. En individuos de *Argopecten purpuratus* mediante la prueba de cultivo del medio líquido de tioglicolato. A) Tejido de branquia de *A. purpuratus* (concha de abanico) sin presencia de hiposporas. B), C), D), E) F), G), H) muestras de tejido de branquias de concha de abanico con presencia de hiposporas de *Perkinsus* sp. sp, observadas a 100X.

Por otro lado, se evidenció la presencia de *Perkinsus sp.* en 30 de los 138 individuos silvestres de *Anadara tuberculosa* (concha negra) (**Tabla 03**), se observó y contabilizó de 1 a 2 estructuras esféricas de 20 a 50 μ m, reconocidas como hipnosporas, representando una prevalencia de infección de 21,7 % y un grado de intensidad de infección de nivel 1 (0.33) según la escala de Mackin (**Figura 02**).

Cuadro 3: Muestras de tejido en RFTM positivas a *Perkinsus sp.* de individuos silvestres de *Anadara tuberculosa* (concha negra).

INGRESO DE INDIVIDUOS	CÓDIGO DE MUESTRA	N° DE HIPNOSPORAS	NIVEL/N° DE INTENSIDAD DE INFECCIÓN.
02/2018	2C	1	2/0.33
	7C	1	2/0.33
	9C	1	2/0.33
	11C	1	2/0.33
	3T	2	2/0.33
	5T	1	2/0.33
	6T	2	2/0.33
	16T	1	2/0.33
	17T	1	2/0.33
	21T	1	2/0.33
	1PS	1	2/0.33
	2PS	1	2/0.33
	9PS	1	2/0.33
03/2018	1CN	1	2/0.33
	2CN	1	2/0.33
	6CN	1	2/0.33
	7CN	1	2/0.33
	10CN	2	20.33
	40CN	2	2/0.33
	2CN	1	2/0.33
	22CN	2	2/0.33

07/2019	11CN	1	20.33
	16CN	1	2/0.33
	27CN	1	2/0.33
	12CN	1	2/0.33
	19CN	1	2/0.33
	7RCN	1	2/0.33
	20CN	1	2/0.33
	13CN	1	2/0.33

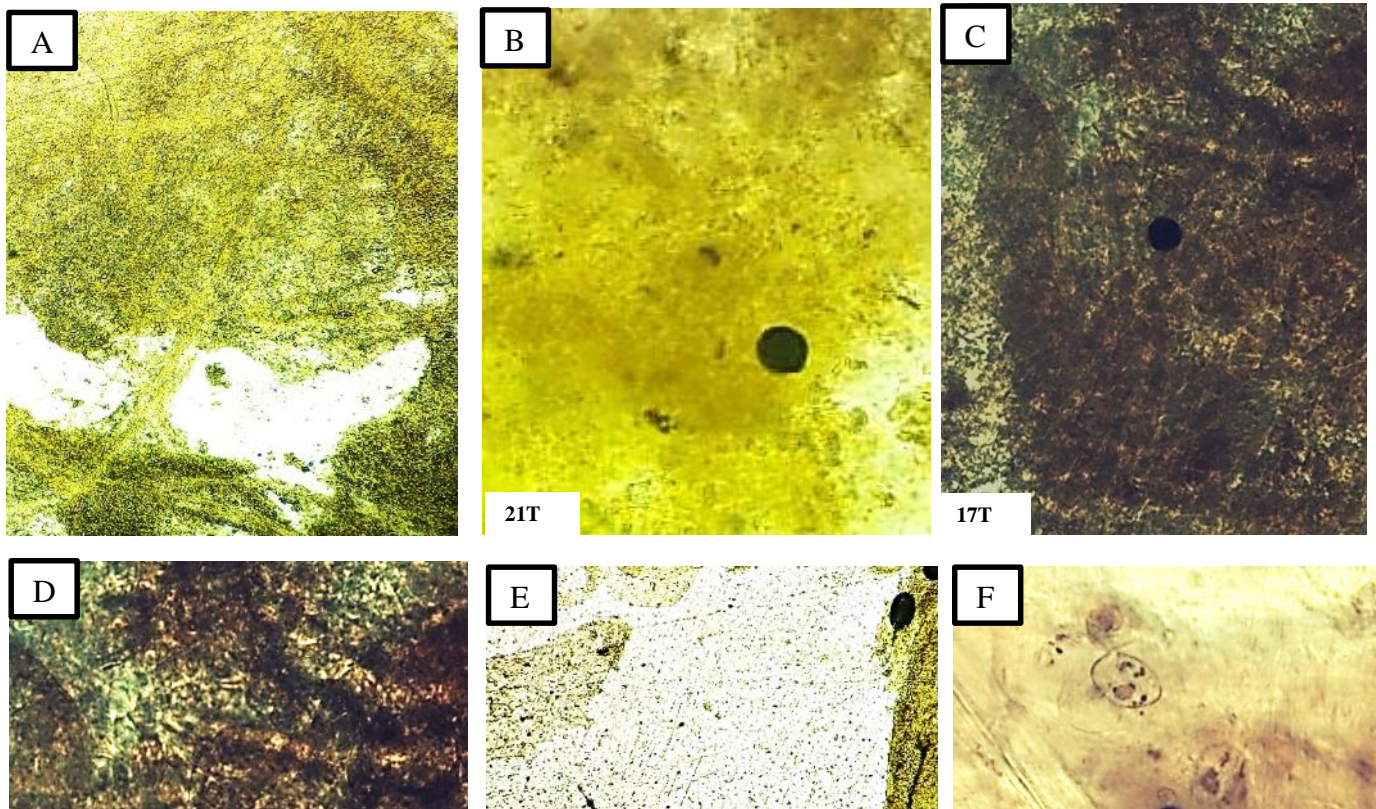


Figura 2: Detección de *Perkinsus sp.* en individuos de *Anadara tuberculosa* mediante la prueba de cultivo del medio Fluido de tioglicolato. A) Tejido de branquia de *A. tuberculosa* (concha negra) sin presencia de hiposporas de *Perkinsus sp.*, B), C), D) y E) tejido de branquia con presencia de hiposporas de *Perkinsus sp.* observadas a 100X.

A nuestro conocimiento, los resultados presentados en este trabajo constituyen el primer reporte de *Perkinsus sp.* en Perú. Interesantemente, se logró detectar este parásito en 02 especies de bivalvos que no comparten el mismo hábitat; uno que pertenece al ecosistema manglar bañado de aguas cálidas, mientras que, el otro reside en los arenales de aguas templadas a frías en Sechura. Estos datos sugieren que otras especies de bivalvos podrían ser portadoras de este tipo de parásito, por lo que, se recomendaría una evaluación más amplia a nivel del País.

Este estudio sería particularmente importante debido a que la mayoría de los animales recolectados eran asintomáticos y además levemente infectados; con 01 a 02 hipnosporas por muestra. La única excepción corresponde a la muestra 13CH que albergaba más de 90 hipnosporas aglomeradas, cuyo tejido correspondía a un animal que llegó moribundo al laboratorio, estado que asumimos era por el transporte.

Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Cáceres Martínez, et al. (2012); Shamal, et al. (2018); Villanueva Fonseca L. (2012); Kang, et al. (2016); Brendao, et al. (2013), quienes han detectado *Perkinsus sp.* mediante RFTM en diversos ecosistemas y distintas especies de bivalvos en México, la India, Corea y Brasil, revelando hipnosporas con características similares a las observadas en este estudio. Además, la investigación de Ruano, Batista, & Arcangeli (2015) sugiere que la ausencia de síntomas fisiopatológicos es común, sobre todo en casos de baja intensidad de infección.

En este estudio, la prevalencia más baja fue observado en *A. purpuratus* con 13.95%, mientras que el índice de prevalencia registrado en *A. tuberculosa* alcanzó los 21.7%. Sin embargo, los niveles de infección en concha negra no superaron el primer escalón (Nivel 1), mientras que, varios individuos de concha de abanico presentaron niveles de 3 y 4.

En ese contexto, es aún muy complejo pensar que los *Perkinsus sp.* presentes en los animales analizados son realmente patógenos, en particular en el caso de *A. tuberculosa*. En efecto, se cree que algunos bivalvos son sensibles a ciertas especies de *Perkinsus sp.* y “portadores asintomáticos” de otros. Sin embargo, Dang et al. (2013) demostraron que la presencia de *Perkinsus sp.* en concentraciones celulares entre 10^5 a 10^6 cel/g⁻¹ afecta las funciones fisiológicas de estos animales “resistentes” reduciendo en hasta un 25% su crecimiento, es decir que, si bien su presencia no conlleva necesariamente a la muerte, esta podría afectar su sobrevivencia en caso de eventos adversos (otro patógeno, degradación de las condiciones abióticas).

En cuanto a las diferencias de prevalencias y de niveles de infección encontrados en este trabajo, es posible relacionarlos con la temporalidad del estudio. En efecto, los ejemplares de *A. purpuratus* fueron recuperados al finalizar el invierno, mientras que los ejemplares de *A. tuberculosa* fueron recolectados en el apogeo de verano. Justamente, según La Peyre, Casas, Villalba , & La Peyre, (2008) ; Ramos Queiroga, Marques Santo, Almeida de Medeiros, & da Silva (2016), las altas temperaturas serían más favorables para la infección por *Perkinsus sp.*, y las prevalencias se incrementan gradualmente hasta alcanzar su máximo al finalizar el verano.

No obstante, Calvo & Burreson, (1994) reportan que la interacción de la temperatura y la salinidad es relevante para la proliferación y diseminación de los trofozoítos de *Perkinsus sp.*, lo cual podría ser la razón de que a pesar que los ejemplares de *A. tuberculosa* presentan mayor prevalencia, su nivel de infección es menor (1) en comparación a los ejemplares de *A. purpuratus* (3-4), teniendo en cuenta que esta especie habita en ecosistemas manglares, en esteros, donde predomina más el agua dulce que salada. También sería de considerar el tiempo de vida de ambas especies; de 10 a 14 meses para llegar a una talla comercial en *A. purpuratus* (Alcázar Zamora & Mendo-Aguilar, 2008) contra probablemente de 15 a 36 meses para *A. tuberculosa* (Flores L, 2010).

4.2. Identificación molecular de *Perkinsus sp.* mediante PCR.

A partir de los resultados obtenidos por RFTM, se realizó para cada bivalvo estudiado 03 pools de muestras. Un pool era constituido de 10 animales negativos a *Perkinsus sp.* por RFTM (P3CA y P3CN), y 02 pools por animales positivos (P1-P2CA y P1-P2CN).

El análisis de PCR, confirmó la presencia de la región ITS de *Perkinsus sp.* en 01 de 02 pool de tejidos positivos en RFTM de *A. purpuratus* concha de abanico y 02 de 02 pool de tejidos positivos de *A. tuberculosa* concha negra, obteniendo un tamaño de banda de 703 pb. Los pools constituidos de animales negativos no amplificaron (**Figura 03**).

Al comparar las secuencias obtenidos a partir de los amplicones positivos a la amplificación de la región ITS, se obtuvo 100 % de similitud con la especie de *Perkinsus chesapeaki* en la muestra de concha de abanico, mientras que para concha negra la homología de las secuencias analizadas fue a fin a *P. chesapeaki* y *P. beihaiensis*. (**Tabla 04**)

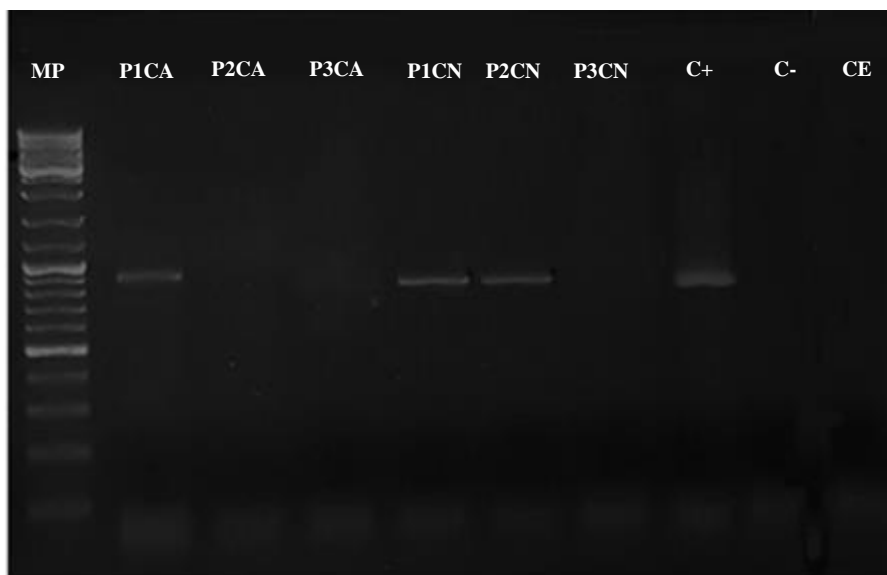


Figura 3: Diagnóstico de *Perkinsus sp.* dirigido a la región ITS ARNr mediante PCR. MP: marcador molecular(100pb); P1CA y P2CA: pool1 y pool 2 de concha de abanico con muestras positivas a *Perkinsus sp.*

por RFTM; P1CN, P2CN, pool 1 y pool 2 de concha negra con muestras positivas a *Perkinsus sp.* por RFTM; P3CAy P3CN, pools de muestras negativas por RFTM, C+: control positivo; C-: control negativo; CE: control de extracción.

Cuadro 4: Especies de *Perkinsus sp.* identificados mediante PCR en los moluscos bivalvos *Argopecten purpuratus* (concha de abanico) y *Anadara tuberculosa* (concha negra).

MUESTRA	ESPECIE	DESCRIPCIÓN	COBERTURA	% DE SIMILITUD	N° ACCESO
P1CA	<i>Argopecten purpuratus</i>	<i>Perkinsus chesapeaki</i>	100%	100%	KU172670.1
P1CN	<i>Anadara tuberculosa</i>	<i>Perkinsus chesapeaki</i>	100%	100%	KU678212.1
P2CN		<i>Perkinsus beihaiensis</i>	100%	100%	KU172655.1

Hasta la fecha, la mayoría de investigaciones relacionadas a la detección de *Perkinsus sp.* se basan en la técnica de RFTM debido a su bajo costo de implementación y simplicidad. Sin embargo, la técnica de RFTM no permite discriminar entre las diferentes especies de *Perkinsus sp.* e incluso las hipnosporas pueden confundirse con otros protistas como *Coldopella*, el cual tiene características relativamente similares (Villalva, Reece, Ordás, Casas, & Figueroa, 2004).

La necesidad de desarrollar métodos alternativos para la detección e identificación de *Perkinsus sp.*, se realizó en primer lugar para caracterizar a *P. marinus* y *P. olseni* por ser los primeros *Perkinsus* reportados y los más invasivos. Con el tiempo, muchas técnicas moleculares fueron desarrolladas y permitieron de identificar las diferentes especies de *Perkinsus* conocidas (Balseiro, Montes, Fernández Conchas, Novoa, & Figueras, 2010).

Actualmente hay más de 300 secuencias depositadas en GenBank de *Perkinsus*. La mayoría de estas son secuencias de ADN para regiones del complejo de genes de ARN ribosómico particularmente la región ITS (NCBI, 2020). En general se ha reportado que esa región es útil para la discriminación de especies de *Perkinsus sp.* con variación intraespecífica entre secuencias dentro de una especie de *Perkinsus sp.* que varía de 0 a aproximadamente 4-14% (Brown et al. 2004).

En este estudio, los análisis de PCR dirigidos a la región (ITS) de muestras de *A. purpuratus*, permitieron obtener amplicones visibles en 01 de las 02 muestras positivas, mientras que todas las muestras positivas de tejido proveniente de *A. tuberculosa* pudieron ser amplificadas. Los resultados de secuenciación, permitieron identificar a las especies *P. chesapeaki* en *A. purpuratus* y *P. chesapeaki* con *P. beihaiensis* en *A. tuberculosa*. Estos resultados corresponden a la primera identificación molecular de *Perkinsus sp.* en estas especies de moluscos bivalvos y a la primera detección confirmada de *Perkinsus sp.* en el Perú.

Si bien es cierto las técnicas de PCR son caracterizadas por su mayor sensibilidad y especificidad, en el presente estudio la no amplificación de una muestra puede atribuirse a algunos factores:

1) la cantidad de tejido evaluado por RFTM abarca de 1 a 3 g, mientras que la PCR se realiza a partir de ADN extraído de un máximo de 1g.

2) Los bajos niveles de infección en algunas muestras pueden conllevar a falsos negativos debido a la insuficiencia de ADN diana (Villalva, Reece, Ordás, Casas, & Figueroa, 2004; Villanueva Fonseca L. , 2012; Soudant, Chu, & Volety, 2013).

3) Necesidad de realizar nuevos métodos de diagnósticos más sensibles como: nested PCR o q PCR (Ríos, et al. 2019 ; Wu, Lingtong, Wang, Cui, & Wang, 2019).

En su conjunto estos resultados son acorde con la presencia de estas 02 especies de *Perkinsus sp.* en el continente americano; donde *P. beihaiensis* fue reportado en Brasil en la especie *Anomalocardia brasiliiana* con una prevalencia de 14.7% (Pinho Ferreira, et al. 2014) mientras que (Dantas Neto, 2016) reportó por primera vez la especie *P. chesapeakei* en la ostra del manglar *Crassostrea rhizophorae* al noreste de Brasil mediante ensayos de RFTM y PCR dirigido a la región ITS. Más cercano a Perú, Pagenkopp Lohan, et al. (2016) revelaron la presencia de *P. chesapeakei* y *P. beihaiensis* en moluscos bivalvos de las costas de Panamá, a lo que se presume una posible translocación de parásitos hasta las localidades del Pacífico Sur.

Hasta la fecha, *P. chesapeakei* no ha sido previamente identificado en Pectínidos. Sin embargo, *P. chesapeakei* pudo ser detectado en diversas especies de moluscos bivalvos *Mya arenaria*, *Macoma balthica*, *Tagelus plebeius* (Reece, Dungan, & Burrenson, 2008) y recientemente aislado en *Anadara trapezia*, unas arcas que viven en los manglares de Australia (Reece, Scott, Dang, & Dungan, 2017).

En este estudio se pudo determinar la presencia de 02 especies de *Perkinsus sp.* (*P. chesapeakei* y *P. beihaiensis*) afectando a arcas habitando la misma zona geográfica, sin poder determinar precisamente si podían existir infecciones simultáneas. La co-infección de *Perkinsus sp.* en un mismo hospedero, ha sido reportada previamente por Dungan, Hamilton, Reece, & Burrenson (2007) quienes mencionan una alta incidencia de infección por *P. marinus* y *P. chesapeakei* en *C. virginica* y *Mya arenaria*. Poco después, Reece, Dungan, & Burrenson (2008) observaron que el 6% de sus muestras de *C. virginica* albergaban *P. marinus* y *P. chesapeakei* con prevalencia de 20 a 28%.

Más recientemente, Reece, Scott, Dang, & Dungan (2017) confirmaron la presencia de una fracción menor de células de *P. chesapeakei* en un aislado *in vitro* de *P. olseni* y demostró la presencia de células de ambas especies de *Perkinsus*

sp. en los tejidos branquiales de *A. trapezia* mediante la utilización de sondas fluorescentes específicas (FISH). Este tipo de técnica podría ser interesante a desarrollar localmente para verificar la posibilidad de co-infecciones. En efecto, por PCR la identificación tendría a detectar la especie de *Perkinsus sp.* predominante o a arrojar pictogramas con picos no definidos en las zonas de superposición de secuencias.

4.3. Detección de *Perkinsus sp.* mediante Shotgun proteomic.

Los tejidos que se revelaron ser positivos por RFTM y/o PCR fueron analizados por shotgun proteomic con la intención de identificar a proteínas relacionadas a *Perkinsus*. El análisis fue realizado confrontando los péptidos extraídos frente a la base que agrupa 24 282 secuencias de *Perkinsus sp.* disponible en la biblioteca de Uniprot. (Uniprot, 2019)

Para el caso de *A. purpuratus*, se analizó los 03 pools previamente evaluados por PCR, y se obtuvo 3 péptidos distintos (**Tabla 5**). Se identificaron secuencias de péptidos que pertenecen a proteínas hipotéticas o putativas, es decir, proteínas que pueden ser codificadas a partir del genoma de *Perkinsus sp.*, pero que se desconoce su funcionalidad (hipotética) o que son identificadas por similitud de secuencia con otras proteínas pertenecientes a otros organismos (putativa).

Cuadro 5: Péptidos identificados mediante espectrometría de masas MAD I TOF TOF a partir de los cultivos de tejidos de branquia positivos en RFTM de *A. purpuratus*.

De los 03 péptidos, 02 presentaron niveles de confianza (E value) muy cerca de 0

Muestra	Mejor secuencia	% Identidad	Descripción	E value
P2CA	AGGGDITVR	100%	dynein-1-alpha heavy chain, flagellar inner arm I1 complex, putative [<i>Perkinsus marinus</i> ATCC 50983]	2.3.e-01
P1CA	RSEEESSVVG CTDRAGGR	100%	hypothetical protein Pmar_PMAR006543 [<i>Perkinsus marinus</i> ATCC 50983]	4.e-10
	AGSTPEDPCPT CSALVLAR	100%	NFX1-type zinc finger protein-containing protein, putative [<i>Perkinsus marinus</i> ATCC 50983]	3.e-11

(alto nivel de probabilidad que la secuencia sea única y no se pueda encontrar en otro organismo) debido a su largo tamaño. El tercer péptido presentó una similitud de secuencia de 100% con el genoma de *Perkinsus sp.*, pero obtuvo una E value de 23 (>1). En consecuencia, la muestra P1CA puede ser considerada como positiva mientras que la muestra P2CA tendría un diagnóstico incierto.

Estos resultados concuerdan con los datos obtenidos por PCR (P1CA positivo y las 02 otras muestras negativas).

En el caso de concha negra se analizó 15 muestras positivas por RFTM. De estas, se pudo detectar al menos 01 péptido relacionado a *Perkinsus sp.* con un E value inferior a 01 en 11 muestras (73.3%) (**Tabla 6**).

Cuadro 6: Péptidos identificados mediante espectrofotometría de masas MALDI TOF TOF a partir de los cultivos de tejido de branquias positivos en RFTM de *A. tuberculosis*.

Muestra	Mejor secuencia	% Identidad	Descripción	E value
1	ACLATNIATHSFFIVYAFIL TTSR	100%	type v p-typeATPase isoform, putative <i>[Perkinsus marinus]</i>	1.e-16
	RTAGKSNSGVSRRPFLAL SVGNNELAK	100%	hypothetical protein Pmar_PMAR020572 <i>[Perkinsus marinus]</i>	1.e-17
	QCMVILDWDDTIMPTGVL TDHGGK	100%	hypothetical protein Pmar_PMAR011791 <i>[Perkinsus marinus]</i>	1.e-17
3	HKMVDTSLQVGPELYRPT VAAPHR	100%	hypothetical protein Pmar_PMAR023079 <i>[Perkinsus marinus]</i>	3.e-16
4	ARSPCTTTTNGEVAVQD SDEGTPVK	100%	cell adhesion molecule, putative <i>[Perkinsus marinus ATCC 50983]</i>	5.e-17
	QLSRMGALQRSVETMDR KNANALK	100%	conserved hypothetical protein <i>[Perkinsus marinus]</i>	1.e-15
6	SEAASMDEGRWDDGFS WEVDR	100%	hypothetical protein Pmar_PMAR018787 <i>[Perkinsus marinus]</i>	4.e-14
	VVEEITAAGGEAIPNYNSV TDGEAIK	100%	estradiol 17 beta-dehydrogenase, putative <i>[Perkinsus marinus]</i>	5.e-18
3,5,6	RLMPPETDLNTLFDWLDV DR	100%	hypothetical protein Pmar_PMAR021087 <i>[Perkinsus marinus]</i>	2.e-13
11	ANPDKKTMNSINMR	85%	Conserved hypothetical protein <i>[Perkinsus marinus]</i>	5.1
	AAVISLGFVLCNSPQR	100%	26S proteasome regulatory subunit RPN2, putative <i>[Perkinsus marinus]</i>	7.e-11

19	DDNQMEILWRLMRR	100%	hypothetical protein Pmar_PMAR025495 [<i>Perkinsus marinus</i>]	1e-11
20	GIDVFIaviclgvgvr	100%	hypothetical protein Pmar_PMAR018644 [<i>Perkinsus marinus</i>]	4e-11
	YQAVYYLPMLTLLH	100%	hypothetical protein Pmar_PMAR018644 [<i>Perkinsus marinus</i>]	1.e-10
22	YSVFETDLWVEEEKAAR	72%	HIRA-interacting protein, putative [<i>Perkinsus marinus</i>]	0.10
	REIEVMQAPTlgqdr	100%	DNA topoisomerase 3-beta-1, putative [<i>Perkinsus marinus</i>]	2.1
	VIDFITIVPFDGGYPR	50%	hypothetical protein Pmar_PMAR011464 [<i>Perkinsus marinus</i>]	0.87
	ANETIWKIEEEGPT	85%	hypothetical protein Pmar_PMAR010160 [<i>Perkinsus marinus</i>]	1.8
	TTGIVMDSGDGVSHTVPIY EGYALPHAILR	100%	actin [<i>Perkinsus marinus</i> KSR-2007]	2e-4
27	DLELLSKEHERNLRR	93%	pyruvate dehydrogenase, putative [<i>Perkinsus marinus</i>]	0.37
	IVGGAIMEHYLDNGER	43%	hypothetical protein Pmar_PMAR005452 [<i>Perkinsus marinus</i>]	1.8

La mayoría de los péptidos encontrados presentaron niveles de similitud del 100% y E value cercanos a 0. Las secuencias de péptidos más pequeñas presentaron generalmente los niveles de similitudes y E value más bajos. Aquello indica que el tamaño de la secuencia importa, por lo que sería primordial optimizar la extracción y digestión de proteínas para garantizar la obtención de grandes secuencias.

Sin embargo, si las secuencias tienen una similitud inferior a 100% es quizás porque las especies de *Perkinsus* identificados en este trabajo presentan diferencias con la especie modelo (*P. Marinus*).

En efecto, se pudo apreciar en las tablas 5 y 6 que todas las secuencias identificadas son relacionadas a proteínas de *P. marinus* mientras que las secuencias por PCR reconocen a *P. chesapeakei* y *P. beihaiensis*. Aquello se debe a que el único genoma de *Perkinsus sp.* secuenciado es de *P. marinus* y en consecuencia las bases de datos (Blast, Uniprot, Protein Pilot) son focalizados a esta especie (NCBI, 2019).

Por lo tanto, es importante realizar aislamientos *in vitro* de las otras especies (Queiroga, Marques, De Medeiros, & Da Silva, 2016; Reece, Scott, Dang, & Dungan, 2017) y de ir secuenciando el genoma de los parásitos purificados. La secuenciación de genoma completo está siendo cada vez más accesible con el desarrollo de nuevas plataformas de secuenciación en tiempo real como por ejemplo el MinION (Oxford Nanopore Technologies). La eficiencia de esta tecnología muy reciente en el estudio de genomas de parásitos ha sido repetitivamente demostrada (Yamagishi, et al. 2017; Eccles, et al. 2018; Fauver, Martin, Weil, Mitreva, & Ficher, 2019).

Dentro de las 11 muestras positivas que representan en total 23 secuencias distintas, se pueden resaltar a las muestras 19 que presenta una sola secuencia y la a 22 que presenta hasta 5 péptidos distintos.

Es importante añadir que la muestra 22 mostró péptidos de diferentes niveles de similitud (de 50% a 100%) y de E value (2 péptidos con E value >1), pero que la presencia de algunos péptidos largos y por ende muy confiables, permite validar el diagnóstico.

Para la muestra 27 se observaron dos péptidos con una confianza de 93% y 43% y con E value superiores a 0.37 y 1.8 respectivamente. Es posible poner en duda la presencia de *Perkinsus*. en esta muestra. En efecto, es importante considerar

que las muestras evaluadas contaban con bajas prevalencias de *Perkinsus*, y que otros parásitos o incluso otros artefactos (gotas de lugol) pueden confundirse como hiposporas y ser consideradas como falsos positivos (Ray S. 1950). El ideal siendo de confirmar cada muestra por una técnica de validación.

Interesantemente, un mismo péptido de alta confiabilidad pudo ser encontrado en 03 muestras distintas (3, 5, y 6), indicando que esta secuencia debería ser frecuentemente cortada por la tripsina.

A nivel de sensibilidad, 13 de las 17 (76.5%) muestras identificadas como positivas por RFTM fueron confirmadas por shotgun proteomic. Esta proporción es interesante considerando el nivel muy bajo de infección de los tejidos evaluados (01 a 02 hiposporas por 02-03 gramos de muestras por RFTM) y merecería ser reajustada con muestras más infectadas. Una ventaja adicional del shotgun proteomic reside en el tiempo de análisis de las muestras; de 05 a 07 días para el RFTM, de 03 a 05 horas para la PCR (varios días si se secuencia), contra 02 a 03 horas para el shotgun proteomic. Es importante resaltar que esta técnica tiene el potencial de evaluar con la misma muestra simultáneamente a *Perkinsus sp.*, pero también a cualquier patógeno conocido, emergente o nuevo con solo utilizar las bases de datos disponibles. Como demostración, al margen de este estudio, se logró identificar un malacoherpesvirus cercano al OsHV1 en individuos de concha negra. Las principales desventajas de esta técnica residirían en el costo del equipo, y la dependencia del análisis de identificación a las bases de datos existentes.

De las 23 secuencias detectadas por MALDI TOF TOF, 14 (60.8%) provienen de proteínas con funciones desconocidas resaltando la necesidad de estudiar más intensamente a este parásito que merma tan severamente a las poblaciones de moluscos del mundo.

El presente estudio es especialmente interesante porque también completa la escasa información disponible a nivel proteómico de *Perkinsus sp.* Entre ellos está la investigación de Fernández Boo, et al. (2014) quienes analizaron perfiles proteómicos de tres especies de *Perkinsus sp.*: *P. marinus*, *P. olseni* y *P.*

chesapeakei utilizando electroforesis 2D. Los autores encontraron spots comunes entre las tres especies identificadas como: C kinasa activada y sintasa pseudouridine, mientras que, entre en *P. marinus* y *P. chesapeakei* identificaron la sub unidad B ATPasa vacuolar y fosfato acetiltransferasa.

El presente estudio permitió también de identificar la presencia inequívoca de varias proteínas entre las cuales se encuentran:

A las proteínas de la familia de dineínas, motores moleculares que transforman la energía química de la unión del ATP y la hidrólisis en fuerza mecánica, lo que da como resultado unos microtúbulos de movimiento dirigidos por el extremo negativo. Estos motores desempeñan un rol relevante en diferentes procesos celulares como eventos mitóticos, movimiento de vesículas, cilios y la motilidad. (Perrone, Myster, Bower, O'Toole, & Porter, 2000). Por lo tanto, estos datos sugieren que la proteína dynein-1-alpha heavy chain, flagellar inner arm I1 complex, puede estar relacionada a la función de movilidad de los flagelos de las zoosporas de los parásitos *Perkinsus sp.*

La proteína NFX1-type zinc finger está implicada en las funciones biológicas, específicamente sobre las respuestas por estrés a altas salinidades (Zhao, Yu, Kong, & Li, 2012).

Con respecto a los *Perkinsus sp.* afectando a *A. tuberculosa*, se identificó la proteína cell adhesion molecule, la cual, pertenece a una subfamilia relacionada a inmunoglobulinas y juega un rol importante en las respuestas del sistema inmune (Arzeta Pino, et al. 2018).

En adición, se logró identificar a delta8-desaturase, una proteína que permite sintetizar el ácido araquidónico, un ácido graso esencial. Este resultado coincide con los trabajos de Joseph et al. (2010), quienes al cultivar trofozoítos de *P. marinus*

in vitro demostraron que este parásito en la etapa de prezoosporangia utiliza las vías delta-8- desaturasa.

Se conoce que la proteína actina está involucrada en el desarrollo del citoesqueleto de las células, y esta importante proteína pudo también ser detectada (Tirard, Grossfeld, Volety , Volety & Chu, 1995).

Se identificó la isoforma type v-ATPase, una proteína presente en la membrana plasmática de los protozoarios Apicomplexa, que tiene un rol crucial en la regulación del pH intracelular (Fernández Boo et al. 2014). A su vez Toei, Saum, & Forgac (2010) reportan que cumple la función de tornar ácidos los espacios intracelulares, de facilitar la endocitosis y esporádicamente transporta protones.

De acuerdo a Bard, et al. (2018) las funciones de la 26S proteasome regulatory subunit RPN2 residen en la división celular, la transducción de señales, la homeostasis de proteínas y la respuesta a estrés por diferentes factores.

La enzima estradiol 17 beta-dehydrogenase, está involucrada en el metabolismo lipídico (Jianguo, Zhifeng, Xiaoshi, Shaoshuai & Dandan,2014).

Loyola & Almouzni (2004) revelan que las proteínas histónicas están estrechamente ligadas con el ADN, básicamente para formar el nucleosoma, unidad imprescindible de la cromatina y participan en la disposición de las histonas.

En su conjunto, este estudio demostró la aplicabilidad de la técnica de shotgun proteomic para el diagnóstico de *Perkinsus sp.*, lo cual se aleja de los enfoques clásicos basados en el análisis de spots en geles 1D o 2D generalmente destinados a evaluar respuestas diferenciales entre tratamientos (Fernández Boo, Villalba, & Cao, 2016).

CAPITULO V

5. CONCLUSIONES

- Se detectó por RFTM hipnosporas del protozooario *Perkinsus sp.* en individuos silvestres de *A. purpuratus* y *A. tuberculosa*.
- Se logró identificar molecularmente a las especies *P. chesapeakei* en *A. purpuratus* y *A. tuberculosa* y a *P. beihaiensis* en *A. tuberculosa* por PCR mediante secuenciación de los ADN obtenidos.
- Se identificaron proteínas relacionadas a la presencia de *Perkinsus sp.* por Shotgun proteomic, siendo este estudio el primer reporte del uso de esta técnica como posible herramienta de diagnóstico.
- Se demostró por primera vez la presencia de *Perkinsus sp.* en especies de bivalvos del Perú, y se realizó el primer análisis epidemiológico descriptivo.

CAPITULO VI

6. RECOMENDACIONES

- Desarrollar ensayos de aislamiento de *Perkinsus sp.* para poder realizar ensayos de patología experimentales con el fin de evaluar si estos parásitos pueden provocar pérdidas económicas (mortalidades y retraso de crecimiento) y determinar la influencia de factores físico-químico en el desarrollo de su patogenicidad.
- Desarrollar protocolos de diagnóstico por PCR más sensibles, de tipo qPCR o Nested PCR y así poder detectar *Perkinsus sp.* en animales con bajos niveles de infección.
- Optimizar los protocolos de diagnóstico por shotgun proteomic, en particular analizando más muestras, con diferentes niveles de infección, y evaluando la repetitividad, y sensibilidad de la técnica.
- Determinar si las 02 especies de *Perkinsus sp.* encontradas pueden co-infectar al mismo huésped.
- Extender el estudio de diagnóstico de *Perkinsus sp.* en otras especies de vieiras y arcas que comparten hábitat con las especies evaluadas.

CAPITULO VII

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Balseiro, P., Montes, J., Fernández Conchas, R., Novoa, B., & Figueras, A. (2010). Comparison of diagnostic techniques to detect the clam pathogen *Perkinsus olseni*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 90, 143-151. doi: 10.3354/dao02194
- Bard, J., Goodall, E., Greene, E., Jonsson, E., Dong, K., & Martin, A. (2018). Structure and Function of the 26S Proteasome. *Annual Review of Biochemistry*, 87, 697-724. Retrieved from <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-062917-011931>
- 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. doi: 10.1111/jfd.1295
- Joseph, S., Fernández-Robledo, J., Gardner, M., El-Sayed, N., Horng Kuo, C., Schott, E., . . . Vasta, G. (2010). The Alveolate *Perkinsus marinus*: Biological Insights from EST Gene Discovery. *BMC Genomics*, 11, 228. doi:10.1186/1471-2164-11-228
- Pinho Ferreira, L., Costa Sabry, R., da Silva, P. M., Vasconcelos Gesteira, T., de Souza Romão, L., Pinheiro Paz, M., . . . Maggioni, R. (2014). First report of *Perkinsus beihaiensis* in wild clams *Anomalocardia brasiliana* (Bivalvia: Veneridae) in Brazil. *Experimental Parasitology*. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2014.07.012>
- (ICES), I. C. (2011). Dermo disease of oysters caused by *Perkinsus marinus*. *Identification Leaflets for Diseases and Parasites of Fish and Shellfish.*, 30, 5.
- Agricultura(FAO), O. d. (2018). *El estado mundial de la pesca y la acuicultura. Cumplir los objetivos de desarrollo sostenible*. Licencia: CC BY-NC-SA 3.0 IGO., Roma.

al, F. e., Tomado, G. a., Villalba, A., Reece, K., Ordás, M. C., Casas, S., & Figueroa, A. (2004).

Perkinsosis in molluscs: A review. *Sciences*, 17, 411-432.

- Alcázar Zamora, J., & Mendo-Aguilar, J. (2008). Growth and Survival of Juveniles of *Argopecten purpuratus* in Bottom and Suspended Cultures in Casma, Perú. *Ecología Aplicada*, 7(1,2).
- Angus, S., Edelmann, R., & Pennock, D. (2001). Targeted gene knockout of inner arm 1 in *Tetrahymena thermophila*. *European journal of cell biology*, 80(7), 486-497.
doi:10.1078/0171-9335-00178
- Arzeta Pino, L., Acosta, A., Sarmiento, M., Rojas, M., Rodríguez Jaramillo, R., & Vásquez Juárez, R. (2018). Herpesvirus OsHV-1 and the protist *Perkinsus marinus* modify the expression of the Down syndrome cell adhesion molecule gene in gill and mantle of *Crassostrea* spp. *Aquaculture Research*. doi:10.1111/are.13832
- Ashton, K., Kim, Y., & Powell, E. (2006). *Perkinsus marinus* Assay. *Journal of Invertebrate Pathology*.
- Audemard, C., Carnegie, R. B., & Burrenson, E. M. (2008). Shellfish tissues evaluated for *Perkinsus* spp. using the rays fluid thioglycollate medium culture assay can be used for downstream molecular assays. *DISEASES OF AQUATIC ORGANISMS*, 80, 235-239. doi: 10.3354/dao01944
- Bower, S. M. (2010). Synopsis of Infectious Diseases and Parasites of Commercially Exploited Shellfish: *Perkinsus olseni* of Abalone.
- Brendao, R., Boesh, G., Sabry, R., Ceuta, L., Mdos, L., Queiroga, F., & da Silva, P. (2013). *Perkinsus* sp. infecting oyster *Crassostrea rhizophorae* (Guilding, 1828) on the coast of Bahia, Brazil. 112(2), 138-141. doi:10.1016/j.jip.2012.11.003.
- Burrenson, E. M., & Ragone Calvo, L. (1996). Epizootiology of *Perkinsus marinus* disease of oysters in Chesapeake Bay, with emphasis on data since 1985. *Journal of Shellfish Research*, 15, 17-34.

- Bushek, D., Ford, S. E., & Chintala, M. M. (2002). Comparison of in vitro-cultured and wild-type *Perkinsus marinus*. III. Fecal elimination and its role in transmission. *Diseases of Aquatic Organisms*, 4(51), 217-225. doi:10.3354/dao051217
- Byers, J., Blakeslee, A., Linder, E., Cooper, A., & Maguire, T. (2008). CONTROLS OF SPATIAL VARIATION IN THE PREVALENCE OF TREMATODE PARASITES INFECTING A MARINE SNAIL. *Ecological Society of America*, 89(2), 439-451.
- Cáceres Martínez, J., Vásquez Yeomans, R., & Padilla Lardizabal, G. (2007). *Perkinsus marinus* AGENTE CAUSAL DE LA ENFERMEDAD DE "DERMO" ENCONTRADO EN EL OSTIÓN DE PLACER *Crassostrea corteziensis* DEL PACÍFICO MEXICANO. Boletín del Programa Nacional de Sanidad Acuícola y la Red de Diagnóstico . Retrieved from https://www.researchgate.net/publication/267038550_Perkinsus_marinus_agente_causal_de_la_enfermedad_de_Dermo_encontrado_en_el_ostion_de_Placer_Crassostrea_corteziensis_del_Pacifico_Mexicano
- Cáceres- Martínez , J. (2002). Algunas enfermedades de moluscos: Enfermedad de Dermo o Perkinsosis. In *Boletín del programa Nacional de Sanidad Acuícola y la Red de Diagnóstico*. (Vol. 5, pp. 2-6).
- 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. doi: 10.1016/j.jip.2012.03.019.
- Cáceres-Martínez, J., Madero-López, L. H., Padilla-Lardizábal, G., & Vásquez-Yeomans, R. (2016). Epizootiology of *Perkinsus marinus*, parasite of the pleasure oyster. *Journal of Invertebrate Pathology*, 139, 12-18. doi:10.1016/j.jip.2016.07.003.
- Calvo, G. W., & Burreson, E. M. (1994). In vitro and in vivo effects of eight chemotherapeutants on the oyster parasite *Perkinsus marinus* (Mackin,Owen,and Collier). *Journal of Shellfish*

Research, 13, 101-107.

- Casas, M. S., Reece, S. K., Li, Y., Moss, A. J., Villalba, A., & La Peyre, F. J. (2008). Continuous Culture of *Perkinsus mediterraneus*, a Parasite of the European Flat Oyster *Ostrea edulis*, and Characterization of Its Morphology, Propagation, and Extracellular Proteins in Vitro. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 55(1), 34-43. doi:10.1111/j.1550-7408.2008.00301.x
- Casas, S., Villalba, A., & Reece, K. (2002a). 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. *Disease Aquatic*(50), 51-65. doi: 10.3354/dao050051
- Choi, K. S., & Waki, T. (2016). *Perkinsus olsenii* (Lester and Davis 1981) infection in the Manila clam (*Ruditapes philippinarum*) in Korea; species identification, impacts and spatio-temporal distribution. *Bulletin of Japan Fisheries Research*, 42, 23-27.
- Choi, K., & Park, K. (1997). Report on occurrence of *Perkinsus* sp. in the Manila clam *Ruditapes philippinarum* in Korea. *Korean J Aquacult*, 10(227-237).
- Concepto Azul. (2014). Manual Práctico de Producción de Concha prieta (*Anadara tuberculosa*) en condiciones de Laboratorio. Ecuador.
- 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. doi:10.1016/j.jip.2013.02.002.
- Dang, C., de Montaudouin, X., Binias, C., Salvo, F., Caill, M., Bald, J., & Soudant, P. (2013). Correlation between perkinsosis and growth in clams *Ruditapes* spp. *Diseases of Aquatic Organisms*, 106(3), 255-265. doi:10.3354/dao02640.
- 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. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2016.10.007>
- Dantas Neto, P., Vaconcelos Gesteira, T., Costa Sabry, R., Galdino Feijó, G., Martins Forte, J., Boesh, G., & Maggioni, R. (2016). First record of Perkinsus chesapeakei infecting Crassostrea rhizophorae in South America. *Journal of Invertebrate Pathology*, 141, 53-56. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2016.10.007>
- Diringer, B., Vasquez, R., Moreno, V., Prettel, K., & Sahuquet, M. (2012). Studies Blood Cockles for Stock Enhancement Aquaculture. *Global Aquaculture Advocate*, 48-50.
- Dungan, C., Hamilton, R., Reece, K., & Burreson, E. (2007). Experimental cross-infections by Perkinsus marinus and P. chesapeakei in three species of sympatric Chesapeake Bay oysters and clams. *Disease of Aquatic Organisms*, 76, 67-75.
- Dungan, C., & Bushek, D. (2015). Development and applications of Rays fluid thioglycollate media for detection and manipulation of Perkinsus spp. pathogens of marine molluscs. *Journal of invertebrate Pathology*.
- Eccles, D., Chandler, J., Camberis, M., Henrissat, B., Koren, S., Le, G. G., & Ewbank, J. J. (2018). De novo assembly of the complex genome of Nippostrongylus brasiliensis using MinION long reads. *BMC biology*, 16(1), 6.
- 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. doi: 10.1186/s13071-017-2304-4
- Fauver, J., Martin, J., Weil, G., Mitreva, M., & Ficher, P. (2019). De novo Assembly of the Brugia malayi Genome Using Long Reads from a Single MinION Flowcell. *Scientific Reports*, 9(19), 521.

- Fernández Boo, S., Chicano Gálvez , E., Alhama, J., Barea, J., Villalba, A., & Cao, A. (2014). Comparison of protein expression profiles between three Perkinsus spp., protozoan parasites of molluscs , through 2D electrophoresis and mass spectrometry. *Journal of Invertebrate Pathology*, 118, 47-58.
- Fernández Boo, S., Villalba, A., & Cao1, A. (2016). Protein expression profiling in haemocytes and plasma of the Manila clam *Ruditapes philippinarum* in response to infection with *Perkinsus olseni*. *Journal of Fish Diseases*. doi: doi:10.1111/jfd.12470
- Fernandez Robledo, J. A., Caler, E., Matsuzaki , M., Keeling, P. J., Shanmugam, D., Roos, D. S., & Vasta, G. R. (2011). The search for the missing link: A relic plastid in *Perkinsus*? *International Journal for Parasitology*, 41, 1217-1229.
- Ferreira, L., Sabry, R., da Silva, P., Vasconcelos , T., de Souza, L., Pinheiro, M., . . . Maggioni, R. (2014). First report of *Perkinsus beihaiensis* in wild clams *Anomalocardia brasiliana* (Bivalvia: Veneridae) in Brazil. *Experimental Parasitology*.
- Flores, L. (2010). Tasa de crecimiento de *Anadara tuberculosa* (Sowerby, 1833) (Bivalvia: Arcidae) en la reserva ecológica manglares Cayapas-Mataje (REMACAM): Un análisis basado en sistemas de cajas suspendidas. *Ciencias del Mar y Limnología*, 4(1), 89-98.
- Fong , D., Rodríguez, R., Koo, K., Sun, J., Sogin, M. L., Bushek, D., . . . Ford, S. E. (1993). Small subunit ribosomal RNA gene sequence of the oyster parasite *Perkinsus marinus*. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 2, 346-350.
- Ford, S., Chintala, M., & Bushek, D. (2002). , Comparison of in vitro cultured and wild-type *Perkinsus marinus*. I. Pathogen virulence. *Disease Aquatic*, 51, 187-201.
doi:10.3354/dao051187
- Goggin , C. L., & Barker , S. C. (1993). Phylogenetic position of the genus *Perkinsus* (Protista, Apicomplexa) based on small subunit ribosomal RNA. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 60, 65-70.

- Gosling, E. (2003). Bivalve Molluscs Biology , Ecology and Culture. *Fishing NewsBooks*, 439.
- Gullian-Klanian, M., Herrera-Silveira, J. A., Rodríguez-Canul, R., & Aguirre-Macedo, L. (2008). Factors associated with the prevalence of *Perkinsus marinus* in *Crassostrea virginica* from the southern Gulf of Mexico. *Diseases Aquatic Organisms*, 8(79), 237-247. doi:10.3354/dao01910.
- Guo, X., & Ford, S. (2016). Infectious diseases of marine molluscs and host responses as revealed by genomic tool. *Philosophical Transactions of the Royal Society*, 371, 201-206.
- Hasanuzzaman, A. F., Rubiolo, J. A., Robledo, D., Gómez Tato, A., Álvarez Dios, J. A., Fernández Boo, S., . . . Matínez, P. (2018). Gene expression analysis of *Ruditapes philippinarum* haemocytes after experimental *Perkinsus olseni* zoospore challenge and infection in the wild. *Fish and Shellfish Immunology*, 72, 611-621. Retrieved from <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.11.033>
- Itoh, N., Meyer, G., Tabata, A., Lowe, G., Abbott, C., & Johnson, S. (2013). Rediscovery of the Yesso scallop pathogen *Perkinsus qugwadi* in Canada, and development of PCR tests. *Disease of Aquatic Organisms*, 104, 83-91. doi: 10.3354/dao02578.
- Jianguo, L., Zhifeng, Z., Xiaoshi, M., Shaoshuai, L., & Dandan, Y. (2014). Characteristics of 17-hydroxysteroid dehydrogenase 8 and its potential role in gonad of Zhikong scallop *Chlamys farreri*. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 141, 77-86.
- Kang, H. S., Yang, H., Reece, K. S., Hong, H., Park, K. L., & Choi, K. S. (2016). First report of *Perkinsus honshuensis* in the variegated carpet shell clam *Ruditapes variegatus* in Korea. *Disease of Aquatic Organisms*, 122, 35-41. doi:10.3354/dao03063
- La Peyre, M. K., Casas, M. S., Villalba, A., & La Peyre, J. F. (2008). Determination of the effects of temperature on viability, metabolic activity and proliferation of two *Perkinsus* species, and its significance to understanding seasonal cycles of perkinsosis. *Parasitology*, 135(4), 505-519. doi:10.1017/S0031182008004150.

- Lau, Y. T., Gambino, L., Santos, B., Pales Espinosa, E., & Allam, B. (2018). Regulation of oyster (*Crassostrea virginica*) hemocyte motility by the intracellular parasite *Perkinsus marinus*: A possible mechanism for host infection. *Fish & Shellfish Immunology*, *78*, 18-25.
doi:10.1016/j.fsi.2018.04.019.
- Lau, Y. T., Gambino, L., Santos, B., Pales Espinosa, E., & Allam, B. (2018). Transepithelial migration of mucosal hemocytes in *Crassostrea virginica* and potential role in *Perkinsus marinus* pathogenesis. *Invertebrate Pathology*, *30*, 271-279.
doi:https://doi.org/10.1016/j.jip.2018.03.004
- Lay, Y. T., Santos, B., Barbosa, M., Pales Espinosa, E., & Allam, B. (2018). Regulation of apoptosis-related genes during interactions between oyster hemocytes and the alveolate parasite *Perkinsus marinus*. *Fish & Shellfish Immunology*, *83*, 180-189.
doi:10.1016/j.fsi.2018.09.006.
- Loyola, A., & Almouzni, G. (2004). Histone chaperones, a supporting role in the limelight. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression*, *15*, 3-11. Retrieved from <https://doi.org/10.1016/j.bbaexp.2003.09.012>
- Lucero, C., Cantera, J., & Neira, R. (2011). Pesquería y crecimiento de la piangua (Arcoide: Arcidae) *Anadara tuberculosa* en la Bahía de Málaga del Pacífico Colombiano , 2005-2007. *Revista de Biología tropical*, *60*(1), 203- 2017.
- Mackin, J. G. (1950). Preliminary Note on the Occurrence of a New *Derrnocystiriz'm marinum* n. sp. in *Crassostrea virgiazica* (Gmelin). *Science*, *111*, 328-329.
- Malek, J. C., & Byers, J. E. (2018). Responses of an oyster host (*Crassostrea virginica*) and its protozoan parasite (*Perkinsus marinus*) to increasing air temperature. *PeerJ*, *50*. doi: 10.7717/peerj.5046.
- Mora, E., Moreno, J., & Jurado , V. (2011). *Un análisis de la pesquería del recurso concha en Ecuador durante el 2010*. Boletín científico y técnico .

- Morris, P. (1996). *A field Guide to pacific Shells. The Peterson Field Guide Series*, Houghton, Mifflin Co. (2 ed.). Boston.
- National Center for Biotechnology Information. (n.d.). Retrieved from <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
- Ordás, M. C., & Figueras Huerta, A. (1998). In vitro culture of *Perkinsus atlanticus*, a parasite of the carpet shell clam *Ruditapes decussatus*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 33, 129-136.
- Ordinola, E., Montero, P., Alemán, S., & Llanos, J. (2007). Prospección de Recurso Concha negra (*Anadara tuberculosa*) en los Manglares de Tumbes.
- Pagenkopp Lohan, K. M., Hill Spanik, K., Torchin, 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.
- Pagenkopp Lohan, K. M., Hill-Spanik, K. M., Torchin, M. E., Aguirre Macedo, L., Fleischer, R. C., & Ruíz, G. M. (2016). Richness and distribution of tropical oyster parasites in two oceans. *Parasitology*, 143, 1119-1132.
- Park, K.-I., Park, J.-K., Jehee, L., & Choi, K.-S. (2005). Use of molecular markers for species identification of Korean *Perkinsus* sp. isolated from Manila clams *Ruditapes philippinarum*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 66, 255-263.
- Perrone, C. A., Myster, S. H., Bower, R., O'Toole, E. T., & Porter, M. E. (2000). Insights into the Structural Organization of the I1 Inner Arm Dynein from a Domain Analysis of the 1 b Dynein Heavy Chain. *Molecular Biology of the Cell*, 11, 2297-2313.
- Petty, D. (2010). *Perkinsus Infections of Bivalve Molluscs*. Institute of Food and Agricultural Sciences, Fisheries and Aquatic Sciences, Florida. Retrieved from <https://shellfish.ifas.ufl.edu/wp-content/uploads/Perkinsus-Infections-of-Bivalve-Molluscs.pdf>

- 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. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2012.11.003>
- PromPerú. (2015). Retrieved from SIICEX:
http://www.siicex.gob.pe/siicex/portal5ES.asp?_page_=869.42200
- Queiroga, F. R., Marques, S. L., De Medeiros, I. A., & Da Silva, P. M. (2016). Effects of salinity and temperature on in vitro cell cycle and proliferation of *Perkinsus marinus* from Brazil. *Parasitology*, 143(4), 457-87.
- Ramos Queiroga, F., Marques Santo, L., Almeida de Medeiros, I., & da Silva, M. (2016). Effects of salinity and temperature on in vitro cell cycle and proliferation of *Perkinsus marinus* from Brazil. *Parasitology*, 143, 475-487. doi:10.1017/S0031182015001602
- 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. doi:doi:10.1017/S0031182014001863
- Ramos Queiroga, F., Marques Santos, L. F., Almeida de Medeiros, I., & Da Silva, P. M. (2016). Effects of salinity and temperature on in vitro cell cycle and. *Parasitology*, 143, 475-487. doi:10.1017/S0031182015001602.
- Ray, S. (1950). Ray's Fluid Thioglycollate Method-A Standard Practical Guide for Oyster Sentinel Participants.
- Ray, S. (1996). historical perspective on perkinsus marinus disease of oysters in the Gulf of Mexico. *Journal of Shellfish Research*, 15, 9-11.
- Reece, K. S., Scott, G. P., Dang, C., & Dungan, C. (2017). A novel monoclonal *Perkinsus chesapeaki* in vitro isolate from an Australian cockle, *Anadara trapezia*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 148, 86-93. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2017.05.007>

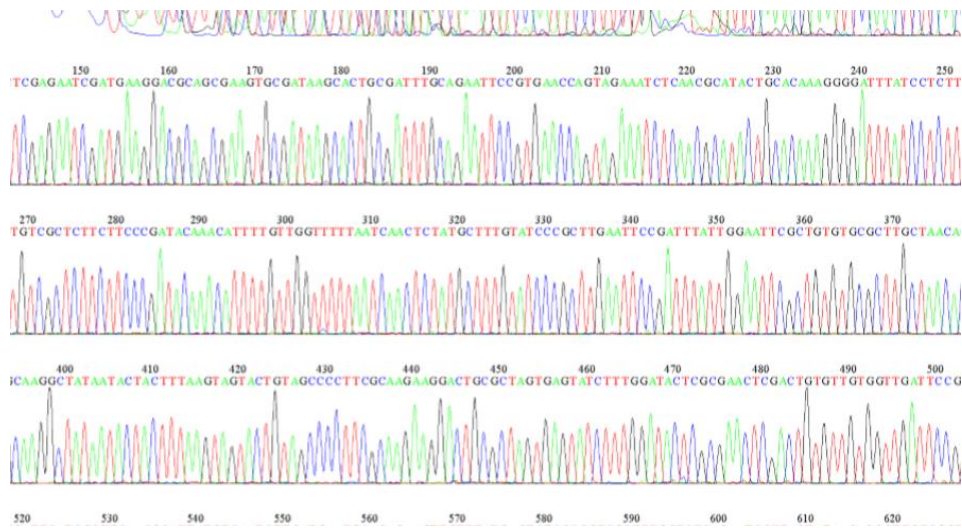
- Reece, K., Dungan, C., & Burreson, E. M. (2008). Molecular epizootiology of *Perkinsus marinus* and *P. chesapeaki* infections among wild oysters and clams in Chesapeake Bay, USA. *DISEASES OF AQUATIC ORGANISMS*, 82, 237-248. doi:10.3354/dao01997
- Ríos, R., Aranguren, R., Gastaldelli, M., Arcangeli, G., Novoa, B., & Figueras, A. (2019). Development and validation of a specific real-time PCR assay for the detection of the parasite *Perkinsus olseni*. *Journal of Invertebrate Pathology*. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jip.2019.107301>
- Ríos-Quintal, J., Gutiérrez S, Jiménez-García, I., Lango-Reynoso, F., & Salcedo- Garduño, M. (2010). Dinámica de la infección por *Perkinsus marinus* en *Crassostrea virginica* de la Laguna de Mandinga, Veracruz.
- Ruano, F., Batista, F. M., & Arcangeli, G. (2015). Perkinsosis in the clams *Ruditapes decussatus* and *R. philippinarum* in the Northeastern Atlantic and Mediterranean Sea: a review. *Journal of Invertebrate Pathology*. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2015.07.015>
- Sakamoto, H., Suzuki, S., Nagamune, K., Kita, K., & Matsuzaki, M. (2016). Investigation into the Physiological Significance of the Phytohormone Abscisic Acid in *Perkinsus marinus*, an Oyster Parasite Harboring a Non-Photosynthetic Plastid. *All rights reserved*. doi:10.1111/jeu.12379-4768
- 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*. Retrieved from <https://doi.org/10.1016/j.jip.2018.10.001>
- Smolowitz, R. (2015). A Review of Current State of Knowledge Concerning *Perkinsus marinus* Effects on *Crassostrea virginica* (Gmelin) (the Eastern Oyster). *Diseases of Aquatic Animals*, 50(3), 404-411. doi:10.1177/0300985813480806

- Soudant , P., Chu, F. L., & Volety , A. (2013). Host-Parasite Interactions: Marine Bivalve Molluscs and Protozoan parasites, Perkinsus species. *Journal Of Invertebrate Pathology* .
- Soudant, P., Chu, F.-L., & Volety, A. (2013). Host- Parasite Interaccions : Marine Bivalve Molluscs and Protozoan parasites, Perkinsus species. *Journal of Invertebrate Pathology*.
doi:<http://dx.doi.org/10.1016/>
- Tirard', C., Grossfeldl,*, R., . K. volety2, , Volety, A., & Chu, F. (1995). Heat shock proteins of the oyster parasite Perkinsus marinus. *DISEASES OF AQUATIC ORGANISMS*, 22, 147-151.
- Toei, M., Saum, R., & Forgac, M. (2010). Regulation and Isoform Function of the V-ATPases. *Biochemistry*, 49(23), 4715-4723. doi:10.1021/bi100397s
- Uniprot*. (2019, 09 15). Retrieved from
<https://www.uniprot.org/uniprot/?query=Perkinsus&sort=score> 2019
- 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. doi:10.3354/dao02795.
- Villalva, A., Reece, K. S., Ordás, M. C., Casas, S. M., & Figueroa, A. (2004). Perkinsosis in molluscs: A review. *Science*, 17, 411-432.
- Villanueva Fonseca , L. C. (2012). Detección de los protozoarios patógenos Perkinsus sp. y Haplosporidium sp. y su relación con los parámetros ambientales en el cultivo experimental del ostión japonés Crassostrea gigas(Thunberg, 1851) en el estero " La Pitahaya", Guasave , Sinaloa. *Tesis*. Guasave, Sinaloa, México.
- Villanueva Fonseca, L. (2012). Detección de los protozoarios patógenos Perkinsus sp. y Haplosporidium sp. y su relación con los parámetros ambientales en un cultivo experimental del ostión japonés Crassostrea gigas(Thunberg,1851) en el estero "La Pitahaya", Guasave, Sinaloa. Guasave, Sinaloa, México.

- Waki, T., Takahashi, M., Eki, T., Hiasa, M., Umeda, K., Karakawa, N., & Yoshinaga, T. (2018). Impact of *Perkinsus olseni* infection on a wild population of Manila clam *Ruditapes philippinarum* in Ariake Bay, Japan. *Journal of Invertebrate Pathology*, 153, 134-144. Retrieved from <https://doi.org/10.1016/j.jip.2018.03.001>
- Wijsman, J., Troost, K., Fang, J., & Roncarati, A. (2019). Global Production of Marine Bivalves. Trends and Challenges. In A. Smaal, J. Ferreira, Grant J, J. Petersen , & Strand, *Good and Service of Marine Bivalves*. Springer , Cham. Retrieved from https://doi.org/10.1007/978-3-319-96776-9_2
- World Organisation for Animal Health, (. (2017).
- Wu, L., Lingtong, Y., Wang, Z., Cui, Y., & Wang, J. (2019). Utilization of recombinase polymerase amplification combined with a lateral flow strip for detection of *Perkinsus beihaiensis* in the oyster *Crassostrea hongkongensis*. *Parasites Vectors*, 12(360). doi:10.1186/s13071-019-3624-3.
- Yamagishi, J., Asada, M., Hakimi, H., Tanaka, T. Q., Sugimoto, C., & Kawazu, S. I. (2017). Whole-genome assembly of *Babesia ovata* and comparative genomics between closely related pathogens. *BMC Genomics*, 18(1), 832.
- Zhao, X., Yu, H., Kong, L., & Li, Q. (2012). Transcriptomic Responses to Salinity Stress in the Pacific Oyster *Crassostrea gigas*. 7. doi: doi:10.1371/ journal.pone.0046244

CAPITULO VIII

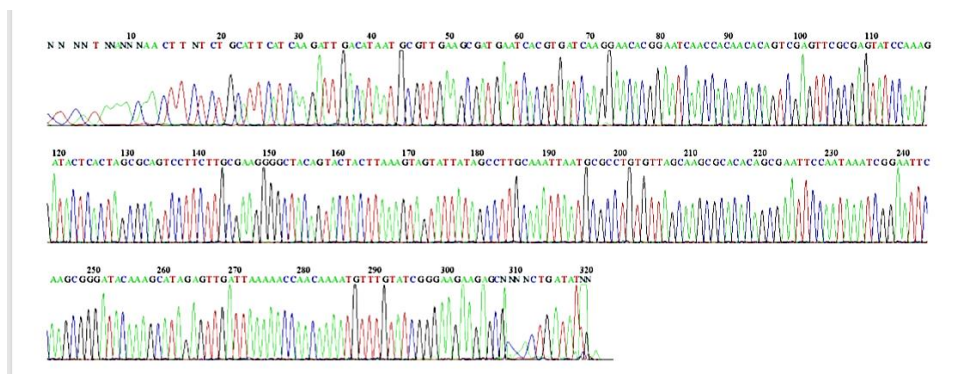
8. ANEXOS



Secuencia/P1CA

```
TCTGCATTCATCAAGATTGACATAATGCGTTGAAGCGATGAATCACGTGATC
AAGGAACACGGAATCAACCACAACACAGTCGAGTTCGCGAGTATCCAAAGA
TACTCACTAGCGCAGTCCTTCTTGCGAAGGGGCTACAGTACTACTTAAAGT
AGTATTATAGCCTTGCAAATTAATGCGCCTGTGTTAGCAAGCGCACACAGC
GAATTCCAATAAATCGGAATTCGAAGCGGGATACAAAGCATAGAGTTGATTAA
AAACCAACAAAATGTTTGTATCGGGAAGAAGAGC
```

Anexo 1 Pictograma y secuencia de la muestra de A. purpuratus P1CA.





Anexo 4 Recepción de individuos de *A. purpuratus* para disección de muestra.



Anexo 5 Muestras (branquias) en medio tioglicolato líquido.



Anexo 6 Observación de muestras incubadas en RFTM en microscopio 40X.



Anexo 7 Programación de PCR para procesar muestras positivas a *Perkinsus sp.*



Anexo 8 Extracción de proteínas de muestras positivas en RFTM Y PCR de *A. purpuratus* y *A. tuberculosa*.