



UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES
FACULTAD DE INGENIERÍA PESQUERA
ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE INGENIERÍA
PESQUERA

TESIS

**Identificación molecular por PCR y nested PCR
de rickettsias en *Crassostrea gigas*.**

PRESENTADO POR:

Br. KATHERINE YULIANA SAAVEDRA OLIVOS

PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE INGENIERO PESQUERO

TUMBES, PERÚ

2012

JURADO CALIFICADOR

M.Sc. Oscar A. Mendoza Neyra

Presidente

Ing. Tessy Peralta Ortiz

Secretario

Ing. John Sandoval Ramayoni

Vocal

RESPONSABLES

Br. Katherine Yuliana Saavedra Olivos

Ejecutora

Ing. Alberto Ordinola Zapata

Asesor

M.Sc. Ricardo Avellán Llaguno

Co-asesor

DEDICATORIA

A Dios y a la Virgen, seres divinos que protegen y guían mis pasos, por su infinito amor y bondad.

A mis padres: Encarnación y Maritza, por brindarme su amor, entrega, dedicación, y por su apoyo incondicional durante mi formación profesional. Que con su ejemplo me enseñaron que hay que sacrificar muchas cosas para lograr un objetivo, a pesar de los obstáculos que nos pone la vida.

A mis abuelos: Vicente y Julia, por enseñarme lo importante que es educarse para ser miembro activo en la sociedad.

A Jhon por su cariño, apoyo, comprensión y por los consejos brindados en los momentos que más lo necesite. Por apoyarme en mis decisiones y por contribuir de una u otra forma en mi formación profesional.

A Miguel Porras Prado, por recordarme el verdadero valor de la familia, y enseñarme que día a día se debe luchar para superarse sin medir las limitaciones económicas, por regalarme su sonrisa y darme ánimo cuando más lo necesité.

AGRADECIMIENTO

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

A mi co-asesor M.Sc. Ricardo Avellán Llaguno por su paciencia y por los conocimientos impartidos hacia mi persona tanto en lo laboral como en lo personal; y por apoyarme en la elaboración del presente informe.

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

Al personal de la Empresa Inca'Biotec S.A.C.: PhD. Erick Mialhe, M.Sc. Benoit Diringier, Blga. Melany Sahuquet, y al Ing. Beder Ramírez Segura, por su apoyo en la realización de la presente tesis.

A Carolina Solano Chávez y a Ivonne Mogollón Saldarriaga, por apoyarme en la ejecución de este trabajo de investigación.

A todos aquellos que confiaron en mí, y que contribuyeron a mi formación personal y profesional, por inculcar en mí grandiosos valores como el respeto, humildad y sencillez, y que me dieron la mano cuando más lo necesité. A todos ellos GRACIAS.

RESUMEN

La presente investigación se realizó del 5 de diciembre del 2011 al 20 de marzo del 2012 en el Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ingeniería Pesquera de la Universidad Nacional de Tumbes. Se pretendió determinar si los *primers* diseñados para PCR: CXcFw1 (CGGAAGGCAGCAGTAGGG) /CXcRev3 (CCGGGACTTTTTCTGTGGG) y nested-PCR: CxcFw1 (CGGAAGGCAGCAGTAGGG)/CXcRev4 (TATCTAAT CCTGTTTGCTCCCC) y CXcFw1/CXcRev2 (CGGAAGGCAGCAGTAGGG/ ACTTACTAAACCACCTACACACC) permitirían detectar un fragmento del gen 16S ARNr en rickettsias en *Crassostrea gigas*. Para ello se realizó la extracción de ADN de muestras de branquias y masa visceral de *C. gigas* siguiendo el protocolo CTAB y para verificar la extracción adecuada se realizó una amplificación del gen de referencia de actina mediante PCR utilizando los *primers* Bi-actin-Fw y Bi-actin-Rev. Los resultados indican que la extracción de ADN fue adecuada pues se logró amplificar el gen de la actina, sin embargo los *primers* ensayados tanto para PCR como nested-PCR no permitieron detectar rickettsias en *C. gigas*, pero si permitieron amplificar el fragmento del gen 16S ARNr de una muestra de *Ostrea iridescens* correspondiente a una bacteria, que según la búsqueda realizada en GenBank, correspondió a una bacteria no cultivable (similitud de 94 %) y no emparentada con ninguna de las rickettsias cuyas secuencias están depositadas en dicha base de datos (similitud de 84 %). Se concluye que los *primers* ensayados tanto para PCR como nested-PCR no pudieron detectar rickettsias en las muestras analizadas, ya sea porque procedieron de *C. gigas* no infectadas o porque los *primers* no tuvieron la suficiente especificidad para detectarlas. Se recomienda realizar ensayos de detección de rickettsias utilizando *primers* diseñados para detectar otros genes tales como los genes que codifican las proteínas rOmpA y rOmpB, el gen gltA que codifica la citrato sintasa y el gen D.

Palabras clave: rickettsias, *Crassostrea gigas*, identificación molecular, 16s ARNr, PCR, Nested-PCR.

ABSTRACT

This research took place from December 5th, 2011 to March 20th, 2012 at the Laboratory of Molecular Biology, at the Fisheries Engineering College, of the National University of Tumbes. In order determine if the designed primers for PCR: CxcFw1 (CGGAAGGCAGCAGTAGGG) /CxcRev3 (CCGGGACTTTTTCTGTGGG) and nested-PCR: CxcFw1 (CGGAAGGCAGCAGTAGGG)/CxcRev4 (TATCTAATCCTGTTTGCTCCCC) and CxcFw1/CxcRev2 (CGGAAGGCAGCAG TAGGG/ACTTACTAAACCACCTACACACC) would be able to detect a fragment of the gene 16S rRNA of rickettsiae in *Crassostrea gigas*. To cover this goals, the DNA extraction from gills and visceral mass of *C. gigas* following the protocol CTAB was completed, and to verify the proper extraction, an amplification of reference actin gene by PCR using the primers Bi-actin-Fw and Bi-actin-Rev.was performed. The results indicate that DNA extraction was adequate as it was able to amplify the actin gene, however primers for both PCR tested as nested-PCR were unable to detect rickettsiae in *C. gigas* but they allowed to amplify the fragment of the gene 16S rRNA from a sample of *Ostrea iridescens*, according to the search in GenBank, it corresponded to a non-culturable bacteria (94% similarity) and not related to any of the rickettsiae whose sequences are deposited in the database (similarity of 84%). We conclude that the PCR primers tested both as nested-PCR failed to detect rickettsiae in the analyzed samples, either because they came from uninfected *C. gigas* or because primers were not specific enough to detect them. Testing is recommended for detection of rickettsiae using primers designed to detect other genes such as genes encoding rOmpA and rOmpB proteins, the gltA gene which encodes citrate synthase and the D gene.

Keywords: rickettsiae, *Crassostrea gigas*, molecular identification, 16S rRNA, PCR, nested PCR.

CONTENIDO

	Página
RESUMEN	v
I. INTRODUCCIÓN	8
II. MATERIAL Y MÉTODOS	16
2.1. Materiales	16
2.2. Lugar y periodo de ejecución de la investigación	19
2.3. Obtención de los ejemplares de <i>Crassostrea gigas</i>	19
2.4. Taxonomía molecular	20
2.4.1. Extracción de ADN de muestras frescas de branquias y masa visceral.	20
2.4.2. Amplificación por PCR y nested-PCR.	21
2.4.3. Electroforesis	23
2.4.4. Secuenciación de amplicones	23
2.4.5. Análisis de la secuencia de ADN	24
III. RESULTADOS	25
3.1. Amplificación del gen constitutivo de actina	25
3.2. Detección de rickettsias en <i>C. gigas</i> mediante PCR	26
3.3. Detección de rickettsias en <i>C. gigas</i> mediante nested-PCR	27
3.4. Análisis de secuencias de ADN	28
IV. DISCUSIÓN	30
V. CONCLUSIONES	33
VI. RECOMENDACIONES	34
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35
ANEXOS	41

I. INTRODUCCIÓN

La ostra *Crassostrea gigas* es el molusco con mayor volumen de cultivo a nivel mundial, la FAO (2011) señaló que en el año 2003, la producción de *Crassostrea gigas* alcanzó los 4,38 millones de toneladas superando a cualquier otra especie de molusco, pez y crustáceo. La producción de este molusco, mantiene una tasa de producción mundial creciente, que se inició en 1950 con 156 000 toneladas, prosiguió en 1970 con 437 000 toneladas, en 1990 con 1,2 millones de toneladas, en el 2000 con 3,9 millones de toneladas y llegó a casi a los 4,4 millones de toneladas en 2003 (FAO 2011).

En el Perú, a partir del año 1996 se realizaron los primeros ensayos de cultivos suspendidos de *C. gigas* con semillas importadas de Chile, a través de un convenio interinstitucional entre la Fundación de Chile y Fondepes, cuyos resultados reflejaron la factibilidad en el manejo y producción de esta especie (Bermúdez 2006). Así mismo el estado peruano en el año 2005, otorgó concesiones para desarrollar la acuicultura a mayor escala de *C. gigas*, en los departamentos de Tacna y Moquegua, mediante las resoluciones directorales N° 015-2005-produce/DNA y N° 023-2005-produce/DNA respectivamente (Produce 2005a, 2005b)

La ostra japonesa, ostión u ostra del Pacífico *Crassostrea gigas* es un molusco bivalvo originario de Asia (China, Japón y Corea), que debido a su gran capacidad de adaptación a diferentes condiciones del medio, ha sido introducida en países de todos los continentes (Bermúdez 2006). *C. gigas* presenta una concha generalmente más larga que ancha pues la valva inferior es voluminosa y ahuecada y la superior es plana o cóncava. La impresión muscular está implantada sobre la cara interna de la valva y generalmente se presenta pigmentada (Polanco y Corral 2001).

Crassostrea gigas, es de carácter sedentario; presenta branquias cubiertas de mucus y cilios vibrátiles que participan en el proceso de filtración, reteniendo partículas en suspensión, entre ellos virus y bacterias que son agentes patológicos potenciales (Bermúdez 2006; Costa 2008). *Crassostrea gigas* posee una tasa elevada de filtración que oscila entre 5 a 25 litros/hora, debido a ello se les suele llamar “concentradores biológicos”, esta característica puede ser problemática ya que permite que cantidades significativas de patógenos puedan ingresar en ella en corto tiempo (Bermúdez 2006).

Entre las patologías que afectan a *Crassostrea gigas*, y que están relacionadas con mortalidades moderadas durante el engorde, se encuentran aquellas producidas por bacterias, virus y parásitos. Las patologías que se observan en la larvicultura de *C. gigas* son de las más importantes, siendo la más seria la infección por *Vibrio* spp. (FAO 2011).

Entre los parásitos que afectan a *C. gigas* se tiene: al gusano barrenador del ostión japonés *Ceratostoma inornatum*, el gusano plano del ostión *Pseudostylochus ostreophagus*, el copépodo *Mytilicola orientalis* (FAO 2011), los protozoarios *Perkinsus marinus*, *Mikrocytos mackini*, *M. roughley*, y *Bonamia ostreae*, así como el hongo *Minchinia armonicum*. Los virus que afectan a *C. gigas*, pertenecen generalmente a las familia herpesviridae, iridioviridae, papoviridae, y reoviridae (Corral, et al. 2000), mientras que las bacterias patógenas para este molusco son las rickettsias y clamidias (Corral, et al. 2000), las cuales son bacterias con un sistema de producción de energía muy limitado que las obliga a parasitar internamente las células de un hospedador para poder vivir y reproducirse. Las rickettsias no sólo se encuentran presente en esta especie, sino en la mayoría de moluscos, afectando con mayor incidencia al tubo digestivo (Comps, et al. 1977 citados en Polanco y Corral 2001; Mialhe 1992, citado en Campalans, et al. 2001).

En *C. gigas*, también se reporta la enfermedad denominada rickettsiosis, que es provocada por bacterias intracelulares pleomórficas, que se hospedan en el citoplasma de las células epiteliales de las branquias y glándula digestiva; también afecta a otros moluscos como *C. virginica*, mejillones, almejas y escalopas (Cáceres y Vásquez 2001).

Aguirre, et al. (2007), a través de exámenes histológicos identificaron la presencia de bacterias similares a rickettsias en el tracto digestivo y branquias de *C. virginica*, además indicaron que este tipo de bacterias está presente en todas las especies de ostras y con frecuencia en muchos moluscos marinos, sin embargo no están asociadas a una enfermedad específica, a pesar que ocasionalmente se les encuentran relacionadas a mortalidades en criaderos. También se ha reportado la presencia de estas bacterias en poblaciones de *Crassostrea ariakensis*, ocasionando mortalidades masivas (Aguirre, et al. 2007; y Zhu and Wu 2008).

La presencia de parásitos tipo rickettsiales no sólo se han reportado en ejemplares del género *Crassostrea*; sino también en una gran cantidad de invertebrados marinos, Valles (2000) cita una relación de organismos que son afectados por rickettsias como: el caracol *Bithynia siamensis goniomphalus*, la almeja *Tellina tenuis*, *Siliqua patula*, *Tapes japonica* y *Patinopecten yessoensis*, *Hippopus hippopus*, *Mya arenaria*, *Meretrix lusoria*, y *Placopecten magellanicus*, el camarón *Penaeus marginatus*, el cangrejo *Carcinus mediterraneus*, *Paralithodes platypus* y el mejillón *Mytilus edulis*. En la mayoría de los casos las infecciones se limitan a las regiones branquiales o al hepatopáncreas

Cabe señalar que también se reporta la presencia de estas bacterias en ejemplares del gastrópodo *Haliotis* sp. que presentan la enfermedad denominada síndrome de la deshidratación, marchitamiento o del deterioro, que se caracteriza por la degeneración de la glándula digestiva, pérdida de la pigmentación oral y de los tentáculos cefálicos,

atrofia del músculo del pie y de la masa visceral, y agotamiento de las reservas de glicógeno, que conlleva a que los animales dejen de alimentarse, y en última instancia lleguen a morir. La bacteria que causa tal infección ha sido designado provisionalmente *Candidatus Xenohaliotis californiensis* (Friedman, et al. 2000, Cáceres y Vásquez 2001). Adicionalmente Valles (2000), a través de un análisis histológico realizado en ejemplares de *Haliotis cracherodii* enfermos con el síndrome de deterioro, identificó parásitos intracitoplásmicos tipo rickettsiales, distribuidos en el epitelio del aparato digestivo, sobre todo en esófago, estómago, intestino y epitelio cilíndrico de los conductos del hepatopáncreas.

La rickettsia *Candidatus Xenohaliotis californiensis*, ha provocado severos daños a la pesquería del recurso en algunas islas de la costa de California, U.S.A. y Baja California (Cáceres y Vásquez 2001) ocasionando los mayores daños a la pesquería del sur de California durante el año 1988, alcanzando mortalidades superiores a 90 % (Haaker, et al. 1992; Davis 1993; Lafferty y Kuris 1993 citados en Valles 2000).

Azevedo, et al. (2006), mediante observaciones microscópicas de tejidos de *H. tuberculata*, detectaron la presencia de microorganismos procariotas similares a rickettsias, muy semejantes a otros previamente descritos en varias especies de la fauna acuática que han causado importantes pérdidas económicas en el cultivo de bivalvos comerciales.

En peces también se ha reportado la presencia de bacterias intracelulares tipo rickettsias, causando la enfermedad denominada piscirickettsiosis; esta fue descrita por primera vez en salmo coho, provocando mortalidades cercanas al 90 %; posteriormente se detectaron en otros salmónidos cultivados en Chile como en salmón del Atlántico, salmón chinook y trucha arcoiris (Campalans, et al. 2001).

A pesar de que existen muy pocos reportes en los que se han identificado rickettsias en *C. gigas*, se deben desarrollar protocolos que permitan su identificación debido a que estas bacterias ya se han visto relacionadas con brotes de enfermedades y a mortalidades que han conllevado a la declinación de la pesquería de muchos moluscos bivalvos; se debe tener en cuenta que cuando una especie es sometida a condiciones de cultivo, la densidad de organismos cultivados tiende a favorecer la aparición y proliferación de enfermedades graves que originan altas mortalidades y grandes pérdidas económicas (Campalans, et al. 2001).

En el Perú la acuicultura de bivalvos es reciente, por lo que existen pocos estudios relacionados con las patologías de los mismos, también se cuenta con un reducido de métodos de diagnóstico lo que obliga a desarrollar nuevas metodologías que permitan la identificación de posibles patógenos que afecten a los cultivos.

Entre los métodos tradicionales para el diagnóstico de rickettsias, se encuentran las técnicas histológicas que consisten en demostrar cambios en la estructura normal de los tejidos, incluyendo células y sus componentes, para lo cual se realiza una evaluación del tejido, fijación, procesamiento y tinción con hematoxilina-eosina, pinkerton u otros; y la microscopía electrónica de transmisión, que tiene el propósito de acceder a lesiones microscópicas de tejidos infectados (Valles 2000; Cuellar 2008; Bucke 1972 citado en Campalans, et al. 2001). Sin embargo Antonio, et al. (2000), señalan que la técnica de microscopía electrónica de luz, no permite determinar la presencia de rickettsias en fases tempranas de infección, por lo que se debe optar por el uso de técnicas moleculares ya que proporcionan mayor sensibilidad y especificidad.

Entre los métodos moleculares que permiten la identificación de microorganismos se encuentran; la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la PCR de tiempo real (q-PCR), la hibridación *in situ*

fluorescente (FISH) y la secuenciación. Estos tipos de métodos alternativos se caracterizan por ser precisos y rápidos, además de permitir el análisis de un gran número de muestras ambientales sin necesidad de cultivar a los microorganismos presentes (Hernández 2000; Olsen et al. 1986; Amann, Ludwig, y Schleifer 1995; Olmos, Paniagua, y Contreras 2000; Arellano y Olmos 2002 citados en Olmos 2003).

El diagnóstico molecular a través de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), comprende la síntesis enzimática *in vitro* de millones de copias de un fragmento de ADN, en esta técnica se usan *primers* específicos que reconocen secuencias blanco dentro del genoma de un patógeno determinado; por lo que constituye una herramienta útil en la identificación de rickettsias presentes en *C. gigas*.

Sin embargo esta técnica no es capaz de detectar la presencia del patógeno, cuando el ADN del mismo se encuentra en cantidades demasiado bajas o cuando hay cierto límite de impurezas; debido a ello, es que la técnica de nested-PCR se presenta como la mejor opción por tener un segundo paso de especificidad frente a la PCR convencional, lo que evita la detección de productos de amplificación no específica (Conde, Revollo, y Espada 2006), además el uso de *primers* externos e internos permiten obtener resultados más confiables, de alta especificidad y sensibilidad (Dieffenbach, Lowe, and Dveksler 1993). Las investigaciones de Fryer, et al. (1992), Maule, et al. (1996); reportadas en Antonio, et al. (2000); mostraron que la técnica de nested-PCR permitió detectar la presencia de *Piscirickettsia salmonis*, en portadores asintomáticos, dentro del cultivo del salmón, portadores que presentaban una carga muy baja de la bacteria.

Cabe mencionar que un pre-requisito para la realización de la técnica de PCR así como de nested-PCR es el diseño de *primers*, ya que estos deben de presentar niveles de especificidad variable que permitan

caracterizar a miembros de la familia rickettsiae. Al respecto Andree, et al. (2000), utilizando secuencias de *Anaplasma marginales*, *Ehrlichia bovis*, *Wolbachia pipientis*; así como rickettsias reportadas en especies de salmónidos y en langostino, diseñaron varios juegos de *primers*, entre ellos, RA-5,1 (GTTGAACGTGCCTTCAGTTTAC) y RA 3,6 (ACTTGGACTCATTCAAAGCGGA), que les permitió detectar la presencia de un procarionta similar a una rickettsia, en ejemplares de *Haliothis* sp. con sintomatología del síndrome de marchitamiento. Adicionalmente Friedman, et al. (2000) a través de un análisis filogenético basado en 16S ARNr, identificaron a esta bacteria, como taxón único y propusieron la designación provisional de *Candidatus Xenohaliothis californiensis*.

Como se señaló anteriormente es sabido que en el Perú se ha evaluado la factibilidad del cultivo de *C. gigas* y se ha demostrado que es una especie potencial para ser usada en acuicultura; siendo considerada como uno de los bivalvos de mayor importancia comercial. Sin embargo poco se sabe de los patógenos que causan severos daños en la pesquería de este recurso; en especial las bacterias intracelulares como las rickettsias, que se han visto relacionadas con brotes de enfermedades en *C. gigas* y a mortalidades de otros moluscos, provocando el colapso de sus pesquerías y pérdidas económicas elevadas; para el diagnóstico de este tipo de bacterias se han establecido modernos métodos de diagnóstico molecular basados en la PCR, como la nested-PCR que permite la detección rápida, sensible y específica de un agente patógeno.

En la actualidad no existen juegos de *primers* diseñados específicamente para detectar rickettsias en *C. gigas* por lo que la Empresa Incabiotec S.A.C. ha diseñado juegos de *primers* (tabla 1), utilizando las secuencias nucleotídicas de rickettsias que han afectado a invertebrados y han sido publicadas en la base de datos Pubmed; pretendiéndose que dichos *primers* amplifiquen el ADN de rickettsias presentes en la ostra japonesa *C. gigas*.

Tabla 1. Lista de *primers* diseñados para la identificación de rickettsias en *C. gigas*.

Tipo de PCR	<i>Primers</i>	Secuencia
PCR simple	CXcFw1 CXcRev3	CGGAAGGCAGCAGTAGGG CCGGGACTTTTTCTGTGGG
Nested-PCR (1ra reacción)	CXcFw1 CXcRev4	CGGAAGGCAGCAGTAGGG TATCTAATCCTGTTTGCTCCCC
Nested-PCR (2da reacción)	CXcFw1 CXcRev2	CGGAAGGCAGCAGTAGGG ACTTACTAAACCACCTACACACC

Los *primers* diseñados, deben ser ensayados a fin de determinar si realmente podrán detectar la presencia de rickettsias en *C. gigas*, por lo que surge la pregunta:

¿Los *primers* diseñados para PCR (CXcFw1/CXcRev3) y nested-PCR (CXcFw1/CXcRev4 y CXcFw1/CXcRev2) permitirán la detección de rickettsias en *C. gigas*?

Para la cual se plantea la siguiente hipótesis:

Los *primers* diseñados para PCR (CXcFw1/CXcRev3) y nested-PCR (CXcFw1/CXcRev4 y CXcFw1/CXcRev2) permitirán la detección de rickettsias en *C. gigas*

Teniendo como objetivo:

Determinar si los *primers* diseñados para PCR (CXcFw1/CXcRev3) y nested-PCR (CXcFw1/CXcRev4 y CXcFw1/CXcRev2) permiten detectar rickettsias en *C. gigas*.

II. MATERIAL Y MÉTODOS.

2.1. MATERIALES

2.1.1. Material biológico.

- 20 ejemplares de *Crassostrea gigas*

2.1.2. Materiales de laboratorio.

- 50 maceradores de acero
- 20 tubos Falcon de 50 ml
- 300 puntas con filtro de 10 μ l
- 300 puntas con filtro de 100 μ l
- 500 puntas con filtro de 1000 μ l
- 200 tubos Eppendorf de 1,5 y 0,2 ml
- 1 micropipeta de 0,5-10 μ l marca Axygen modelo AP-10
- 1 micropipeta de 10-100 μ l marca Axygen modelo AP-100
- 1 micropipeta de 100-1000 μ l marca Axygen modelo AP-1000
- 100 hojas de bisturí N° 20
- 100 jeringuillas de 1 ml
- 5 rollos de papel absorbente
- 1 rollo de papel aluminio
- 2 paquetes de algodón
- 5 matraces de 500 ml
- 1 probeta de 1000 ml

2.1.3. Equipos de laboratorio

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

2.1.4. Insumos

- 50 g de cloruro de sodio grado reactivo
- 1 L de alcohol al 95 %
- 3 L de agua desionizada autoclavada
- 5 L de agua destilada
- 10 ml de agua ultra pura
- 1 ml de proteinasa K (895 U/ml; 19,6 mg/ml) marca Fermentas
- 50 ml de fenol saturado marca invitrogen
- 50 ml de cloroformo marca Merck
- 10 ml de alcohol isoamil marca Merck

- 50 ml de etanol al 75 %.
- 50 ml de etanol al 95 %.
- 500 μ l de 10X PCR RXn buffer (no incluye $MgCl_2$) marca Invitrogen.
- 250 μ l de $MgCl_2$ (50 mM) marca Invitrogen.
- 200 μ l de dNTP's (10 mM) marca Fermentas.
- 100 μ l de taq polimerasa (5 U/ μ l) marca Invitrogen.
- 200 μ l de *primer forward* CXcFw1 (20 pMol)
- 200 μ l de *primer reverse* CXcRev2 (20 pMol).
- 200 μ l de *primer reverse* CXcRev3 (20 pMol).
- 200 μ l de *primer reverse* CXcRev4 (20 pMol).
- 20,0 μ l de marcador de peso molecular de 100 pb (0,5 μ g/ μ l) marca Fermentas.
- 20 g de agarosa marca Cleaver
- 2 L de TAE 1X (2 M Tris, 0,1 M EDTA, pH 8,0 ajustado con ácido acético).
- 50,0 μ l de bromuro de etidio (solución acuosa al 1 %) para electroforesis marca Merck.
- 5 ml de TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA).
- 50 ml de tampón CTAB (0,1 M Tris; 1,4 M NaCl; 0,02 M EDTA; 2 % CTAB).
- 150 μ l de tampón de depósito (10 mM Tris-HCl (pH 7,6), 0,03 % azul de bromofenol, 0,03 cianol xileno FF, 60 % glicerol y 60 mM EDTA).

2.2. LUGAR Y PERIODO DE EJECUCIÓN DE LA INVESTIGACIÓN.

La investigación se realizó del 5 de diciembre del 2011 al 20 de marzo del 2012 en el Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ingeniería Pesquera de la Universidad Nacional de Tumbes (figura1), ubicado en la villa de Puerto Pizarro, en el distrito, provincia y región Tumbes, a: 3° 30' 17,31" LS y 80° 23' 35,44" LO.



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

2.3. OBTENCIÓN DE LOS EJEMPLARES DE *C. gigas*.

Los ejemplares de *C. gigas* de 13,30 cm de longitud aproximadamente (figura 2), fueron obtenidos del Centro de Acuicultura La Arena, perteneciente al Fondo Nacional de Desarrollo Pesquero (Fondepes), ubicado en la región Ancash, los ejemplares fueron transportados vía terrestre en cajas de tecnopor con hielo hasta el Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ingeniería pesquera de la Universidad Nacional de Tumbes; luego de su recepción se cepillaron y lavaron con agua

de mar estéril, luego se colocaron en un recipiente plástico para su posterior procesamiento.



Figura 2. Ejemplares de *Crassostrea gigas*, obtenidos del Centro de Acuicultura La Arena-Fondepes

2.4. TAXONOMÍA MOLECULAR

2.4.1. Extracción de ADN de muestras frescas de branquias y masa visceral.

Por cada ejemplar, se colocó 100 mg de branquias y masa visceral en un tubo Eppendorf, por separado; luego se les realizó dos lavados con solución salina al 0,85 % y se congelaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 10 min. Las muestras de branquias y de masa visceral se trituraron con un macerador de metal dentro de su respectivo tubo Eppendorf.

A los tubos Eppendorf conteniendo los macerados de branquias y masa visceral, se les agregó 500 μl de CTAB, y 2 μl de proteinasa K y se incubaron a $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 2 horas; transcurrido el tiempo se incorporó 1 μl de ARNasa y se

incubó a 60 °C durante 10 min. Seguidamente se agregó 300 µl de fenol y 300 µl de cloroformo/alcohol isoamil en una relación 24/1; y se centrifugó a 13 000 rpm durante 10 min, en el tubo Eppendorf se formaron 3 fases, se recuperó la fase superior y se trasladó a un nuevo tubo Eppendorf. Se agregó nuevamente cloroformo/alcohol isoamil en igual proporción que el sobrenadante que se recuperó; e inmediatamente se centrifugó a 13 000 rpm durante 10 min, se recuperó nuevamente la fase superior y se trasladó a otro tubo Eppendorf. Se agregó etanol absoluto helado al 95 % en cantidad equivalente al doble del volumen que se recuperó y se centrifugó a 13000 rpm durante 10 min. Se eliminó el sobrenadante y se adicionó 1 ml de etanol al 75 %, se centrifugó a 10 000 rpm durante 3 min y se descartó el sobrenadante. Se dejó secar el producto sedimentado (ADN) con el tubo destapado durante 10 min y se resuspendió en 50 µl de TE a 60 °C (Tris-EDTA) y se conservó a -20 °C para su posterior amplificación.

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

2.4.2. Amplificación por PCR y nested-PCR.

La mezcla de reactivos se realizó en un tubo Eppendorf de 1,5 ml, y luego se distribuyó en microtubos de 0,2 ml. Para cada muestra, se adicionó en un microtubo, los siguientes reactivos:

- 39,2 µl de agua ultra pura
- 5,0 µl de solución buffer 10X
- 1,5 µl de solución 50 mM de MgCl₂
- 1,0 µl de solución 10 mM de dNTP's
- 1,0 µl de *primer forward*
- 1,0 µl de *primer reverse*
- 0,3 µl taq polimerasa
- 1,0 µl de ADN extraído

Además de utilizar el ADN extraído de las branquias y masa visceral de *C. gigas*, se utilizó un control negativo para descartar contaminación, y por la falta de control positivo se utilizó una muestra de ADN procedente de *Ostrea iridescens* (que fue etiquetada como O5), y que resultó positiva en la fase de amplificación en ensayos anteriores para los *primers* diseñados (CxcFw1/CxcRev3) para rickettsias. Los juegos de *primers*, utilizados se detallan en la tabla 2.

Tabla 2. Lista de *primers* ensayados para la identificación de rickettsias en *C. gigas*.

Tipo de PCR	<i>Primers</i>	Secuencia	Temperatura media (°C)	Tamaño (pb)
PCR simple	CXcFw1	CGGAAGGCAGCAGTAGGG	59	137
	CXcRev3	CCGGGACTTTTTCTGTGGG	60,3	
Nested-PCR (1ra reacción)	CXcFw1	CGGAAGGCAGCAGTAGGG	59	430
	CXcRev4	TATCTAATCCTGTTTGCTCCCC	58,3	
Nested-PCR (2da reacción)	CXcFw1	CGGAAGGCAGCAGTAGGG	59	228
	CXcRev2	ACTTACTAAACCACCTACACACCC	57	

El programa del termociclador para los pares de *primers* de la primera reacción de la nested-PCR comprendió:

- I. Una fase inicial de desnaturalización del ADN de 5 minutos de duración a 95 °C.
- II. 40 ciclos que consistieron en tres etapas: desnaturalización durante 45 s a 95 °C, unión específica de los iniciadores (hibridación) 58 °C durante 30 s y la extensión durante 30 s a 72 °C.
- III. La extensión final de 72 °C durante 6 minutos.

Mientras que para los *primers* de la segunda reacción de la nested-PCR, así como de la PCR simple sólo se modificó la temperatura de hibridación a 58 °C.

2.4.3. Electroforesis.

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

2.4.4. Secuenciación de amplicones.

Para la secuenciación, se tomó 20 µl del producto obtenido por amplificación en la PCR, y fue colocado en un tubo eppendorf de 0,2 ml junto con 15 µl de uno de los *primers* y empacadas en hielo seco para ser enviadas a la empresa MacroGen en la ciudad de New York, Estados Unidos, para obtener la secuencia del producto amplificado.

2.4.5. Análisis de la secuencia de ADN.

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

III. RESULTADOS

3.1. Amplificación del gen constitutivo de actina.

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

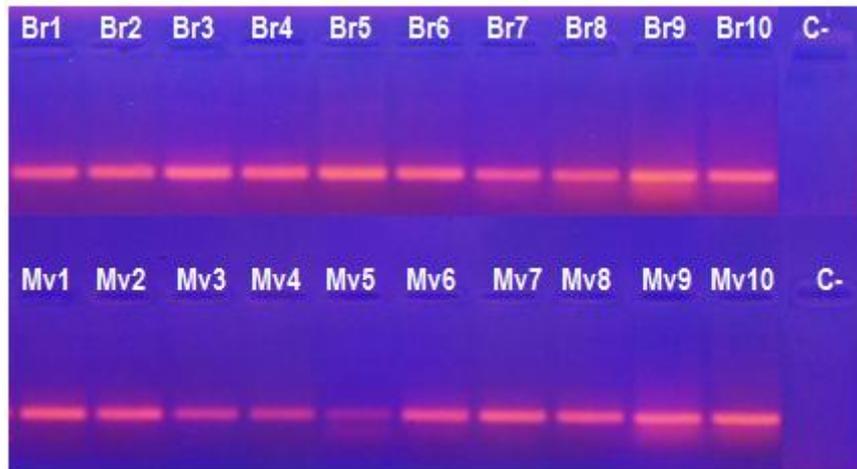


Figura 3. Bandas de ADN teñido con bromuro de etidio sobre gel de agarosa correspondiente a la amplificación de un fragmento del gen de actina en 10 muestras de branquias (Br) y 10 muestras de masa visceral (Mv) de *Crassostrea gigas*

3.2. Detección de rickettsias en *C. gigas* mediante PCR.

En las figuras 4 y 5, se observa la amplificación por PCR con los *primers* CxcFw1/CxcRev3 y la posterior migración electroforética, no se observa la presencia de bandas que evidencien la presencia del ADN de rickettsias en las muestras de 20 ejemplares de *C. gigas*, tanto en branquias (etiquetados como Br1 a Br20 en la figura 4) ni en la masa visceral (etiquetados como Mv1 a Mv20 en la figura 5), sin embargo en la columna correspondiente al ADN de *Ostrea iridescens* (etiquetado como O5 tanto en los geles de branquias y masa visceral) se observa una banda, que posiblemente indique la presencia de una rickettsia, la cual se envió a secuenciar para constatar este evento y así probar la utilidad de estos *primers*. En el control negativo (etiquetado como C- en ambos geles), como era de esperar no se observó la presencia de ninguna banda.

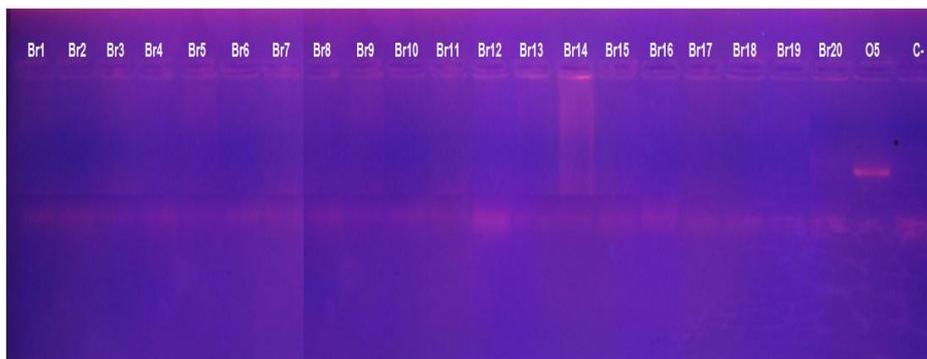


Figura 4. Visualización del gel de agarosa, después de la migración por electroforesis de los productos obtenidos de la amplificación de un fragmento del ADN proveniente de branquias de *C. gigas*. Br1-Br20: Branquias de *C. gigas*, O5: *Ostrea iridescens*, C-: control negativo.



Figura 5. Visualización del gel de agarosa, después de la migración por electroforesis de los productos obtenidos de la amplificación de un fragmento del ADN proveniente de la masa visceral de *C. gigas*. Mv1-Mv20: Masa visceral de *C. gigas*, O5: *Ostrea iridescens*, C-: control negativo.

3.3. Detección de rickettsias en *C. gigas* mediante nested-PCR.

Como se observa en la figura 6, los productos obtenidos de la primera amplificación del ADN de muestras de branquias de *C. gigas* amplificado con los *primers* CxcFw1/CxcRev4, que se muestran en la parte superior de la figura, no se observó amplificación en ninguna de las muestras procesadas, lo mismo ocurrió con la migración de los productos obtenidos en la segunda amplificación con los *primers* CxcFw1/CxcRev2, que se muestran en la parte inferior de la figura.

De igual manera, en la figura 7 se observan los resultados de la nested-PCR del ADN proveniente de las muestras de masa visceral de *C. gigas*, donde también se observa que no hubo amplificación.

Esto indica que ambos juegos de *primers* no permitieron detectar el ADN de rickettsias en ninguna de estas muestras.

Sin embargo el carril de la muestra O5, nuevamente mostró una banda de amplificación, supuestamente indicando la presencia de ADN de una rickettsia.

Los controles negativos (C-) en cada caso no mostraron ninguna banda de amplificación.

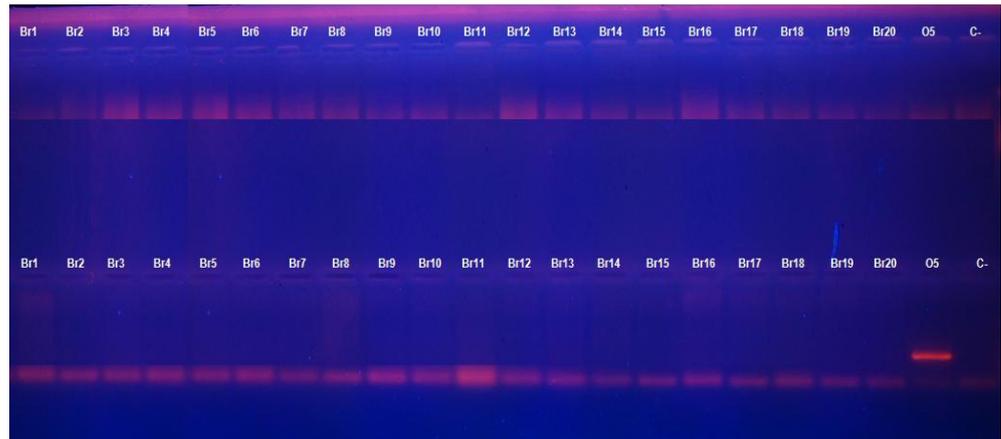


Figura 6. Migración de amplicones de la primera reacción (fila superior) y segunda reacción (fila inferior) de la nested –PCR. Las muestras corresponden al ADN extraído de branquias de *C. gigas*.

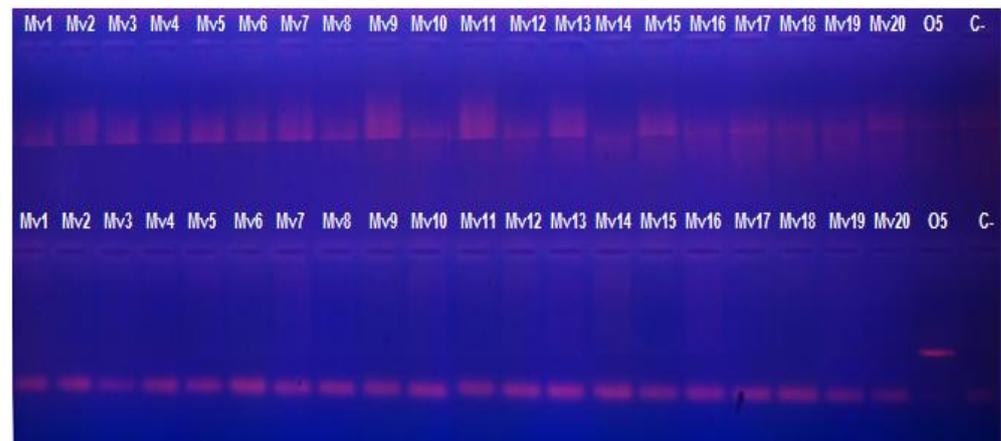


Figura 7. Migración de amplicones de la primera reacción (fila superior) y segunda reacción (fila inferior) de la nested –PCR. Las muestras corresponden al ADN extraído de masa visceral de *C. gigas*.

3.4. Análisis de secuencias de ADN

Para la secuenciación, sólo se consideró el amplicón obtenido de la muestra de *Ostrea iridescens* (etiquetado en todos los ensayos como O5), ya que ninguna de las otras muestras de branquias, ni de masa visceral de *C. gigas* mostró bandas de amplificación.

Este procedimiento se realizó con el fin de determinar al menos la especificidad de los *primers* para reconocer el ADN de rickettsias en otros bivalvos, en cuyo caso se podría utilizar como control positivo en pruebas posteriores. El resultado de la secuenciación,

con el *primer* CxcRev2, originó un fragmento depurado de 208 pb cuya secuencia fue:

ACGCTCGCACCCCTCCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGGAG
 TTAGCCGGTGCTTCTTCTGTAGTTAACGTCAAGACCACGCGC
 TATTAACGCATGGCTTTTCTTCACTGCTGAAAGTGCTTTACAA
 CCCGCAGGCCTTCTTCACACACGCGGCATTGCTGGATCAGG
 GTTGCCCCCATTGTCCAAGATTCCCTACTGCTGCCTTCCGA

Esta secuencia fue analizada con el programa BLAST, obteniéndose que tuvo una similitud de 94 %, con una región del gen 16S ARNr de algunas bacterias no cultivables (figura 8)

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
HO191027.1	Uncultured sediment bacterium clone WS216JS0307 16S ribosomal RI	322	322	99%	6e-85	94%
FN553465.1	Uncultured sediment bacterium 16S rRNA gene, clone 251-25	316	316	99%	3e-83	94%
GU983530.1	Uncultured bacterium clone EP2005-03c1 16S ribosomal RNA gene, p	316	316	99%	3e-83	94%
AM998295.1	Uncultured deep-sea bacterium partial 16S rRNA gene, clone Ulrdd10	316	316	99%	3e-83	94%
AM998068.1	Uncultured deep-sea bacterium partial 16S rRNA gene, clone Ulddp11	316	316	99%	3e-83	94%

Figura 8. Resultados de alineación de la secuencia de ADN aislada de una muestra obtenida de *Ostrea iridescens* (O5) en el programa BLAST. Se observa una similitud del 94 % con secuencias de bacterias no cultivables.

También se analizó la secuencia restringiendo lo resultados de BLAST sólo a secuencias de ADN de bacterias del género *Rickettsia*, observándose que la secuencia mostró una similitud de sólo el 84 % con 2 cepas de *Rickettsia sp.*, valor que es demasiado bajo para declarar que la secuencia problema corresponda efectivamente a una *Rickettsia* (figura 9).

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
EU283842.1	Rickettsia sp. 782d 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	219	219	99%	4e-57	84%
EU283840.1	Rickettsia sp. 774b 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	219	219	99%	4e-57	84%
AB604677.1	Rickettsia secondary endosymbiont of Curculio sp. gene for 16S ribo:	176	176	99%	4e-44	76%
AB604676.1	Rickettsia secondary endosymbiont of Curculio sp. gene for 16S ribo:	176	176	99%	4e-44	76%

Figura 9. Resultados de la alineación de la secuencia de ADN aislada de una muestra obtenida de *Ostrea iridescens* en el programa BLAST con secuencia publicadas de bacterias rickettsias. Se observa una similitud de sólo el 84 % con las secuencias de bacterias rickettsias.

IV. DISCUSIÓN

Las 20 muestras de ADN extraídas de ejemplares de *Crassostrea gigas* no mostraron bandas indicadoras de un fragmento del gen 16S ARNr correspondiente al género *Rickettsia*, cuando fueron sometidas a PCR utilizando los *primers* para identificar rickettsias: CXcFw1/CXcRev3; tampoco se pudo detectar el fragmento del gen 16s ARNr de rickettsia al realizar la nested-PCR utilizando como *primers*: CxcFw1/CXcRev4 y CXcFw1/CXcRev2; por lo que o bien *C. gigas* estaba libre de rickettsias o en todo caso los *primers* no permitieron amplificar el ADN objetivo de la rickettsia.

Se debe señalar que fue difícil diseñar los *primers* utilizados, pues existen pocas secuencias del gen 16S ARNr de rickettsiales depositadas en GenBank, y de aquellas correspondientes a patógenos en moluscos solo se encontraron 3, utilizándose 2 para el diseño de los *primers* que correspondieron al agente del síndrome del marchitamiento del abalón (número de acceso en GenBank AF133090.2 y AF069062), que es un organismo rickettsial, la tercera secuencia que correspondió a *Candidatus Xenohaliothis californiensis* no se pudo alinear adecuadamente con las primeras.

Es probable que los *primers* diseñados no fueran tan específicos para la detección de organismos rickettsiales, debido a que el número de secuencias registradas en GenBank para dichos organismos es bajo, con lo que se pierde especificidad, este problema ha sido reportado también por Drancourt et al. (2000) quienes indican que para algunos géneros hay muy pocas secuencias de especies depositadas en las bases de datos genómicas y que para una búsqueda particular, el nivel de similitud con las secuencias depositadas nunca excede el 97 %, lo que no permite la identificación a nivel de especie. Estos mismos autores tropezaron con la dificultad de no poder identificar especies

de *Bacillus* por la falta de secuencias depositadas en el GenBank, lo que reafirma que las bases de datos son incompletas.

Aparte de ser insuficientes las secuencias depositadas en GenBank, algunas de ellas presentan errores, este hecho ya ha sido señalado por Clarridge (2004), Harmsen and Karch (2004). Los problemas de insuficiente número de secuencias depositadas y de errores en las mismas, ha dificultado el diseño de los *primers* ensayados en este trabajo, lo que podría justificar el hecho de no haber podido identificar Rickettsias en *C. gigas*.

A pesar de no haber amplificado el fragmento del gen 16S ARNr de organismos rickettsiales en *C. gigas*, los *primers*, tanto de la PCR como de la nested PCR si pudieron amplificar este fragmento del gen en una muestra de *Ostrea iridescens*, que se utilizó como control positivo, sin embargo al secuenciar el ADN amplificado se obtuvo una similitud de 84 % para secuencias genéticas del género *Rickettsia* y de 94 % para bacterias no cultivables lo cual fue insuficiente para declarar similitud a nivel de especie o de género ya que según Drancourt et al. (2000), se requiere una similitud de al menos 97 % para declarar el género y 99 % para declarar la especie.

Drancourt et al. (2000) reportaron que de las bacterias que aislaron de medios clínicos y ambientales, el 10 % mostraron una similitud menor al 97 % con la secuencias más cercana de GenBank, no pudiendo ser identificadas a nivel de género debido a que las secuencias depositadas son pocas aún. La secuencia del fragmento del gen 16S ARNr obtenida de muestra de *O. iridescens*, tampoco pudo ser identificadas por su baja similitud con secuencias depositadas, lo que también se puede justificar por la falta de secuencias que han sido depositadas en las bases de datos genómicas.

La baja cantidad de secuencias de fragmentos del gen 16S ARNr de organismos rickettsiales depositadas en las bases genómicas, hace difícil diseñar *primers* adecuados para detectar rickettsias, Clarridge (2004), ha señalado que el gen 16S ARNr no tiene la suficiente variabilidad para identificar especies dentro de un género, por lo que se debe buscar un gen que pueda realizar dicha función, se ha propuesto el gen de la citrato sintasa (*gltA*)(Clarridge 2004; Roux et al. 1997; Fournier et al. 2003) y los genes que codifican a dos proteínas de la membrana externa (*rOmpA* y *rOmpB*) (Roux et al. 1997; Fournier et al. 2003) como una mejor alternativa.

V. CONCLUSIONES

- 1) Los *primers* ensayados para PCR simple: CXcFw1/CXcRev3 no permitieron detectar Rickettsias en *C. gigas*, ya sea porque *C. gigas* no estuviera infectada o porque los *primers* no fueron específicos para Rickettsias.
- 2) Los *primers* ensayados para nested-PCR: CXcFw1/CXcRev4 y CXcFw1/CXcRev2 no permitieron detectar Rickettsias en *C. gigas* debido a que probablemente no estuvieron infectadas o porque carecieron de la especificidad necesaria para detectarlas.
- 3) Los *primers* ensayados para PCR simple y nested-PCR permitieron amplificar ADN bacterial de una muestra de *Ostrea iridescens*, sin embargo este ADN bacterial tuvo un nivel de similitud demasiado bajo (84 %) con secuencias publicadas de bacterias del género *Rickettsia* por lo que no se pudo determinar que fuese una bacteria rickettsial.

VI. RECOMENDACIONES

- Diseñar nuevos *primers*, en base a otros genes presentes en el ADN de *Rickettsia* spp., por ejemplo los que codifican a dos proteínas de la membrana externa (rOmpA y rOmpB), el gen *gltA* que codifica la proteína citrato sintasa, el gen D, entre otros y ensayarlos en la detección de *Rickettsia* spp. en *C. gigas*.
- Contribuir con las bases de datos genómicas aportando nuevas secuencias de fragmentos del gen 16S ARNr de organismos rickettsiales, a fin de incrementar en número de secuencia y poder diseñar *primers* con mayor especificidad para este tipo de bacterias.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguirre, M., R. Sima, M. Román, and J. Guemez. 2007. Parasite Survey of the Eastern Oyster *Crassostrea virginica* in Coastal Lagoons of the Southern Gulf of Mexico. *Journal of Aquatic Animal Health*. 19:270–279. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18333483>
- Andree K., C. Friedman, J. Moore, and R. Hedrick. 2000. Polymerase chain reaction assay for the detection of genomic DNA of a rickettsiales-like prokaryote associated with withering syndrome in California abalone. *Journal of shellfish research*.19: 213-218. <http://www.biodiversitylibrary.org/pdf3/005381200028581.pdf>
- Antonio, D., K. Andree, J. Moore, C. Friedman, and R. Hedrick. 2000. Detection of Rickettsiales-like Prokaryotes by in Situ Hybridization in Black Abalone, *Haliotis cracherodii*, with Withering Syndrome. *Journal of Invertebrate Pathology*. 75: 180–182. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10772333>
- Azevedo, C., R. Conchas, J. Tajdari, and J. Montes. 2006. Ultrastructural description of new Rickettsia-like organisms in the commercial abalone *Haliotis tuberculata* (Gastropoda: Haliotidae) from the NW of Spain. *Diseases of aquatic organisms*. 71: 233-237. <http://www.mendeley.com/research/ultrastructural-description-new-rickettsialike-organisms-commercial-abalone-haliotis-tuberculata-gastropoda-haliotidae-nw-spain/#>

- Bermúdez, P. 2006. *Guía técnica cultivo suspendido de la ostra del Pacífico Crassostrea gigas*. Lima, Perú: Fondo Nacional de Desarrollo Pesquero (Fondepes). <http://www.fondepes.gob.pe/src/acuicultura /SDATTT/MANUALCrassostreasp.pdf>
- Cáceres, J. y R. Vásquez. 2001. Manual de enfermedades de moluscos. *Boletín del programa nacional de sanidad acuícola y la red de diagnóstico* 4(16): 1-10. <http://www.xoc.uam.mx/pronalsa /boletin /Boletin%2016.pdf>
- Campalans, M., P. Rojas, J. Campalans, I. Guerrero, S. bravo, y X. Figueroa. 2001. *Técnicas de diagnóstico de enfermedades de salmónidos, mitílidos, pectínidos y ostreidos*. Valparaíso, Chile: Fondo de Investigación Pesquera (FIP). <http://detenganlavacuna.files.wordpress.com/2011/02/inffinal-2001-09.pdf>
- Clarridge, J. 2004. Impact of 16S rRNA Gene Sequence Analysis for Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious diseases. *Clin Microbiol. Rev.* 17(4): 840. <http://cmr.asm.org/content/17/4/840.full.pdf+html>
- Conde, M., S. Revollo, y A. Espada. 2006. Implementación de la técnica reacción en cadena de la polimerasa en el diagnóstico de *salmonella* y *shigella* directamente de muestras fecales. Instituto seladis. *Biofardo*. 14: 67-72. <http://www.ops.org.bo/textocompleto/rnbiofa20061410.pdf>

- Corral, M., H. Grizel, J. Montes, y E. Polanco. 2000. *La acuicultura: biología, regulación, fomento, nuevas tendencias y estrategia comercial*. Madrid, España: Editorial Aedos S. A. www.fao.org/docs/eims/upload/5069/tomo1.pdf
- Costa, M. 2008. *Estudio de la respuesta inmune y expresión génica del mejillón mediterráneo, Mytilus galloprovincialis*. Tesis de doctorado en Biología, Universidad de Vigo, 26-205. http://digital.csic.es/bitstream/10261/4592/1/Memoria_Mar%C3%A1Da%20del%20Mar%20Costa.pdf
- Cuellar, J. 2008. Métodos de Diagnóstico de Enfermedades en Camarones Marinos de Cultivo. En *Guía Técnica - Patología e Inmunología de Camarones Penaeidos*. Ed. Morales, V., y J. Cuellar. 1 – 52. Panamá, Panamá: Programa CYTED Red II-D Vannamei. http://www.aquafeed.com/documents/1307935450_1.pdf
- Dieffenbach, C., T. Lowe, and G. Dveksler. 1993. General concepts for PCR prime design. *Genome research*. 3: 30-37. <http://genome.cshlp.org/content/3/3/S30.full.pdf>
- Drancourt, M., C. Bollet, A. Carliz, R. Martelin, J.P. Gayral, and D. Raoult. 2000. 16S Ribosomal DNA Sequence Analysis of a Large Collection of Environmental and Clinical Unidentifiable Bacterial Isolates. *Journal of clinical microbiology*, octubre del 2000: 3623-3630. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC87447/pdf/jm003623.pdf>

FAO (Food and Agriculture Organization). 2011. *Cultured aquatic species information programme Crassostrea gigas. Programa de información de especies acuáticas*. Roma, Italia: Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO. http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Crassostrea_sp/es#t cNA00EA

Fournier, P. E. , J. Stephen, G. Greub, J. Zhang, Y. Wu, and D. Raoult. 2003. Gene Sequence-Based Criteria for Identification of New Rickettsia Isolates and Description of Rickettsia heilongjiangensis sp. nov. *Journal of clinical microbiology*, diciembre del 2003: 5456-5465. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC308961/pdf/0309.pdf>

Friedman, C., K. Andree, K. Beauchamp, J. Moore, T. Robbins, J. Shields, and R. Hedrick. 2000. 'Candidatus *Xenohalictis californiensis*', a newly described pathogen of abalone, *Haliotis* spp., along the west coast of North America. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 50: 847–855. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10758896>

Harmsen D., and H. Karch. 2004. 16S rDNA for diagnosing pathogens: a living tree. *ASM News* 70(1): 19-24. <http://www.asm.org/asm/files/ccLibraryFiles/Filename/0000000733/znw001040165p.pdf>

Olmos, J. 2003. *Caracterización molecular e identificación filogenética de microorganismos marinos*. Jalisco, México: Centro de investigación científica y de educación superior de ensenada. <http://www.smbb.com.mx/congresos%20smbb/puertovallarta03/TRABAJOS/CONFERENCIASPLENARIAS/M-9.pdf>

Polanco, E. y M. Corral. 2001. *Impulso, Desarrollo y Potenciación de la Ostricultura en España*. Madrid, España: Fundación Alonso Martín Escudero. <http://www.fao.org/docs/eims/upload /5082 Ostricultura.pdf>

Produce (Ministerio de la Producción). 2005a. Resolución Directoral N° 015-2005-produce/DNA. Lima, Perú: Produce. <http://www.produce.gob.pe/portal/portal/apsportalproduce/dispositivoslegalespopup?id=6826&codigo=10>

Produce (Ministerio de la Producción). 2005b. Resolución Directoral N° 023-2005-produce/DNA. Lima, Perú: Produce. <http://www.produce.gob.pe/portal/portal/apsportalproduce/dispositivoslegales/dispositivoslegalesimprimir?id=7350&codigo=10>

Roux, V., E. Rydkina, M. Eremeeva, and D. Raoult. 1997. Citrate Synthase Gene Comparison, a New Tool for Phylogenetic Analysis, and Its Application for the Rickettsiae. *International journal of systematic bacteriology*, abril de 1997: 252-261. <http://ijs.sgmjournals.org/content/47/2/252.long>

Valles, H. 2000. Análisis histopatológico del abulón negro *Haliotis cracherodii* afectado por el síndrome de deterioro. *Ciencia Pesquera*. 14: 5-18. <http://www.inapesca.gob.mx/portal/documentos/publicaciones/cienciapesquera/CP14/CP14-02.pdf>

Zhu, B. and X. Wu. 2008. Identification of outer membrane protein ompR from rickettsia-like organism and induction of immune response in *Crassostrea ariakensis*. *Molecular Immunology*. 45: 3198–3204. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18395262>

ANEXOS

Anexo 1. Composición del kit de PCR y programación del termociclador usados en la amplificación de un fragmento del gen de actina

Tabla 3. Composición del kit PCR utilizada para la amplificación de un fragmento del gen de actina

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

Tabla 4. Programación de amplificación utilizada para la amplificación de un fragmento del gen de actina

Fase	Temperatura (°C)	Tiempo	Número de ciclos
Pre desnaturalización	95	5 min	1
Amplificación			40
Desnaturalización	94	30 s	
Hibridación	50	45 s	
Polimerización	72	45 s	
Polimerización final	72	5 min	1