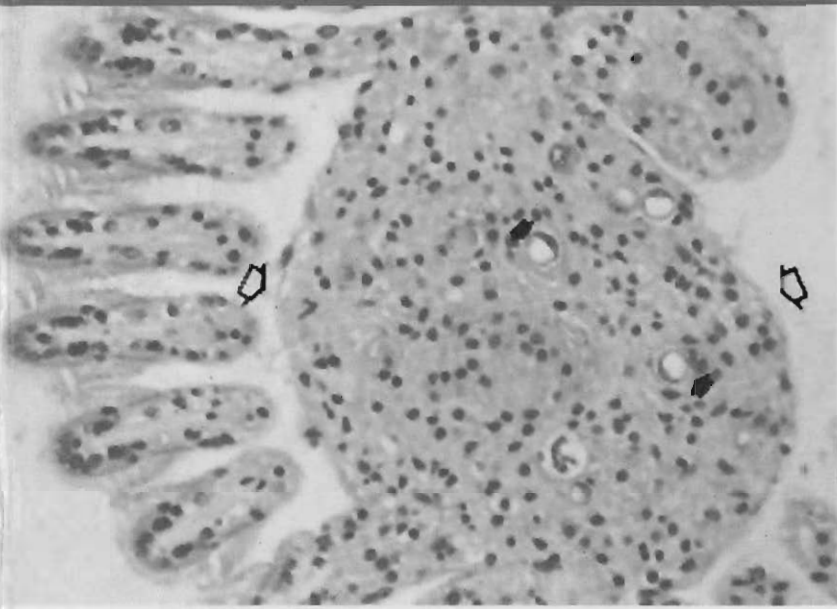


La detección de *Perkinsus atlanticus* en la almeja fina mediante técnicas moleculares



Consejería de Agricultura y Pesca



LA DETECCIÓN DE *Perkinsus atlanticus*
EN LA ALMEJA FINA MEDIANTE TÉCNICAS
MOLECULARES

Título: LA DETECCIÓN DE *Perkinsus atlanticus* EN LA ALMEJA FINA MEDIANTE TÉCNICAS MOLECULARES

© **Edita:** JUNTA DE ANDALUCÍA. Consejería de Agricultura y Pesca.

Publica: VICECONSEJERÍA. Servicio de Publicaciones y Divulgación.

Colección: Pesca y Acuicultura.

Serie: Acuicultura.

Autores: José I. Navas, Roberto de la Herrán, Manuel A. Garrido-Ramos, Carmelo Ruiz Rejón,
Manuel Ruiz Rejón.

Fotografía: Autores

Depósito Legal: SE-110-2001

Maquetación e Impresión: Gráficas Gilmo, S.L. (Sevilla)

José I. Navas**, **Roberto de la Herrán***,
Manuel A. Garrido-Ramos*, **Carmelo Ruiz Rejón***,
Manuel Ruiz Rejón*

**C.I.C.E.M. "Agua del Pino" Consejería de Agricultura y Pesca,
Junta de Andalucía, Apto. 104, 21071 Huelva.

*Departamento de Genética; Facultad de Ciencias;
Universidad de Granada; 18071 Granada.

LA DETECCIÓN DE *Perkinsus atlanticus* EN LA ALMEJA FINA MEDIANTE TÉCNICAS MOLECULARES

La investigación original que se menciona en esta publicación ha sido desarrollada gracias a la financiación de la Consejería de Agricultura y Pesca de la Junta de Andalucía, mediante asignación económica de los Planes Nacionales de Cultivos Marinos, a través del desarrollo de un convenio de colaboración entre la citada Consejería y la Universidad de Granada. Asimismo, el Grupo de Investigación de la Universidad de Granada participante en este estudio técnico tiene financiación por parte de la Consejería de Educación y Ciencia de la Junta de Andalucía (Grupo Genética Molecular -CVI0200- del Plan Andaluz de Investigación -P.A.I.-).

Los resultados que se presentan en esta monografía divulgativa están recogidos en un artículo publicado en la revista científica *Parasitology*, cuya referencia es:

De la Herrán, R., Garrido-Ramos M. A., Navas J.I., Ruiz Rejón C., & Ruiz Rejón, M. 2000. Molecular characterization of the ribosomal RNA genes of *Perkinsus atlanticus*: its use in phylogenetic analysis and as a target for a molecular diagnosis. *Parasitology* 120: 345-353.

Igualmente, estos resultados o parte de ellos han sido presentados en los siguientes Congresos y Reuniones Científicas:

De la Herrán R, Garrido-Ramos MA, Navas JI, Ruiz Rejón C, Ruiz Rejón M. Caracterización de los genes ribosómicos de *Perkinsus atlanticus*. II Congreso de la Sociedad Española de Genética. A Coruña, Septiembre 1999.

Navas JI, de la Herrán R, Garrido-Ramos MA, Ruiz Rejón C, Ruiz Rejón M. Molecular diagnosis of *Perkinsus atlanticus* in *Ruditapes decussatus*. EAFP Ninth International Conference on Diseases of Fish and Shellfish. Rodas (Grecia), Septiembre 1999.

Por último, el método de diagnóstico molecular para *Perkinsus atlanticus* que se propone en esta Monografía está protegido bajo Patente ("Kit para diagnóstico de *Perkinsus atlanticus* en cultivos de almeja". Número de Solicitud: P9801511).

1. Introducción general	9
2. Una breve introducción sobre Genética Molecular	11
3. Antecedentes sobre la detección de parásitos de moluscos mediante las técnicas de Genética Molecular	19
4. El caso de <i>Perkinsus atlanticus</i> como parásito de almejas . . .	21
5. Un método molecular de diagnóstico de <i>Perkinsus atlanticus</i> .	25
6. La taxonomía y la filogenia de <i>Perkinsus</i>	31
7. Utilidad de las sondas moleculares en el análisis de los ciclos de vida de los parásitos	35
8. Bibliografía relacionada con el tema	37
9. APÉNDICE I. Glosario de términos	39
10. APÉNDICE II. Técnicas de detección de <i>Perkinsus atlanticus</i>	45

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

Uno de los problemas más importantes con los que se enfrenta la acuicultura es la existencia de enfermedades o agentes patógenos que afectan a los organismos que se pretenden cultivar. La excelente capacidad del agua para transportar y difundir sustancias, ya sean nutrientes, productos de excreción, contaminantes o agentes infecciosos hacen de la acuicultura una actividad estrechamente ligada al medio ambiente y más difícil de controlar sanitariamente que la agricultura o la ganadería. La historia de la acuicultura está ligada desde sus orígenes a la aparición de numerosos fenómenos patológicos ya sean infecciosos o no. El número de enfermedades descritas para cada especie es proporcional al desarrollo e importancia económica de su cultivo.

Concretamente, son numerosas las enfermedades conocidas que afectan a los moluscos bivalvos (ostras y almejas) cultivados en nuestro país. De todas ellas destacan, por su incidencia e importancia, las provocadas por los protozoos *Marteilia refringens*, *Bonamia ostrea* y *Perkinsus atlanticus* y la bacteria *Vibrio tapetis*.

Marteilia refringens es un protozoo parásito de la glándula digestiva de la ostra plana (*Ostrea edulis*) y el mejillón (*Mytilus galloprovincialis*) y se le considera el principal responsable del descenso de la producción de ostra plana durante la década de los setenta. *Bonamia ostrea* es un protozoo parásito de las células sanguíneas de la ostra plana y fue el causante del declive del cultivo de esta especie durante la década de los ochenta, siendo sustituido su cultivo por el de la ostra japonesa (*Crassostrea gigas*). *Vibrio tapetis* es una bacteria que coloniza el perióstraco de la almeja (preferentemente de la almeja japonesa) impidiendo su correcta calcificación y provocando el síndrome conocido como "anillo marrón". Esta enfermedad puede provocar mortalidades masivas, en especial, durante las primeras fase del cultivo en el medio natural (semilla). *Perkinsus* es un protozoo de posición taxonómica incierta e históricamente asociado a mortalidades masivas de moluscos bivalvos. La especie *Perkinsus atlanticus* puede considerarse como el principal patógeno conocido en las almejas del litoral andaluz.

Según el Borrador del Libro Blanco de la Acuicultura en España (1999), *Perkinsus* se introdujo en España a través de almejas importadas de Italia y, posiblemente, de Portugal. Este parásito "aparece asociado a fenómenos de mortalidad detectados en depuradoras de moluscos y parques de cultivo, casi siempre

cuando la densidad de individuos es alta, las temperaturas elevadas o se producen desequilibrios bruscos en los factores ambientales". Por otro parte, no se conoce en la actualidad ningún tratamiento que permita atajar los brotes de *Perkinsus*.

A la vista de todas estas enfermedades causadas por parásitos de moluscos y de sus efectos negativos sobre la acuicultura, se hace necesario disponer de técnicas adecuadas que permitan detectar e identificar a los agentes patógenos de forma fiable y rápida. Tradicionalmente, estas enfermedades se han diagnosticado mediante técnicas histológicas en las que se trataba de observar las estructuras propias de los parásitos. Posteriormente, se ha pasado a diagnosticarlas mediante técnicas inmunológicas, en las que se pone de manifiesto la presencia de los parásitos mediante proteínas antigénicas. En los últimos años se están utilizando cada vez más técnicas moleculares basadas directamente en el material hereditario de los parásitos. Estas técnicas son más sensibles, específicas y rápidas.

En esta publicación se detallan los resultados obtenidos por un equipo integrado por investigadores del Departamento de Genética de la Universidad de Granada y de la Consejería de Agricultura y Pesca de la Junta de Andalucía (CICEM "Aguas del Pino" de Huelva) para caracterizar molecularmente a *Perkinsus atlanticus*, el principal parásito conocido de las almejas de nuestro litoral. Esta investigación se ha llevado dentro del marco de un proyecto de investigación subvencionado por la Junta Asesora de Cultivos Marinos (JACUMAR) que ha permitido establecer un convenio de colaboración entre los dos organismos mencionados. En esta memoria se explican las bases conceptuales y técnicas de los procedimientos utilizados, así como las aplicaciones de esta investigación a la hora de establecer el estatus taxonómico de estos parásitos y, sobre todo, a la hora de poner a punto un método eficaz de detección de este parásito en cultivos de almejas.

Debido al carácter divulgativo de esta obra, numerosos aspectos teóricos y técnicos han sido simplificados en aras de una más fácil comprensión. En el Apéndice I el lector encontrará un breve glosario con los términos más utilizados, ordenados y numerados conforme aparecen en el texto. El apéndice II muestra un resumen de las diferentes técnicas de detección de *Perkinsus*. Los autores invitan al lector a consultar la bibliografía especializada que se cita.

2. UNA BREVE INTRODUCCIÓN SOBRE GENÉTICA MOLECULAR

2.1. Conceptos y técnicas

La Genética es la ciencia que estudia el material hereditario de todos los seres vivos a todos los niveles. Concretando más, sería la ciencia que trata de estudiar los genes (1) de todos los seres vivos a todos los niveles. Ante estos objetivos tan amplios, es lógico aceptar la existencia de distintas ramas dentro de ella según el tipo de organismo analizado o el nivel al que se estudia el material hereditario (2).

En concreto, la Genética Molecular es la rama de la Genética que trata de analizar la naturaleza y el funcionamiento del material hereditario utilizando sobre todo técnicas químicas, físicas y bioquímicas, fundamentalmente, pero también otros tipos de técnicas como las citoquímicas, las microbiológicas y las netamente genéticas. La Genética Molecular, por lo tanto, tendría su nacimiento en los estudios que ponen de manifiesto que el material hereditario de los seres vivos está formado por unas grandes moléculas con propiedades ácidas que se encuentran en los núcleos de las células, a las que por ello se les llamó ácidos nucleicos, o también ácidos desoxirribonucleicos -ADN ó DNA (2)- por el azúcar desoxirribosa- que entra a formar parte de ellos. Posteriormente, se descubriría que estos ácidos ejercen su control sobre las características de los seres vivos mediante la síntesis de proteínas (3). Quedó así completado el edificio conceptual que relaciona el genotipo (4) con los caracteres de los seres vivos, es decir con lo que se llama el fenotipo (5). Esta idea central de la biología y de la ciencia en general se plasma en el dogma central de la biología molecular: los genes - es decir, las unidades funcionales en las que se dividen las grandes moléculas del ADN- expresan su información inicialmente en forma de ARN mensajeros (6), los cuales posteriormente se traducen a proteínas (véase la Figura 1). Son estas proteínas las que o bien por ser estructurales o bien por ser catalizadores de reacciones bioquímicas (enzimas) determinan, en interacción con el medio ambiente, las características de los seres vivos.

El desarrollo de la Genética Molecular y de la Biología Molecular, en general, se puede considerar dividido en dos etapas, marcadas por el antes y el después

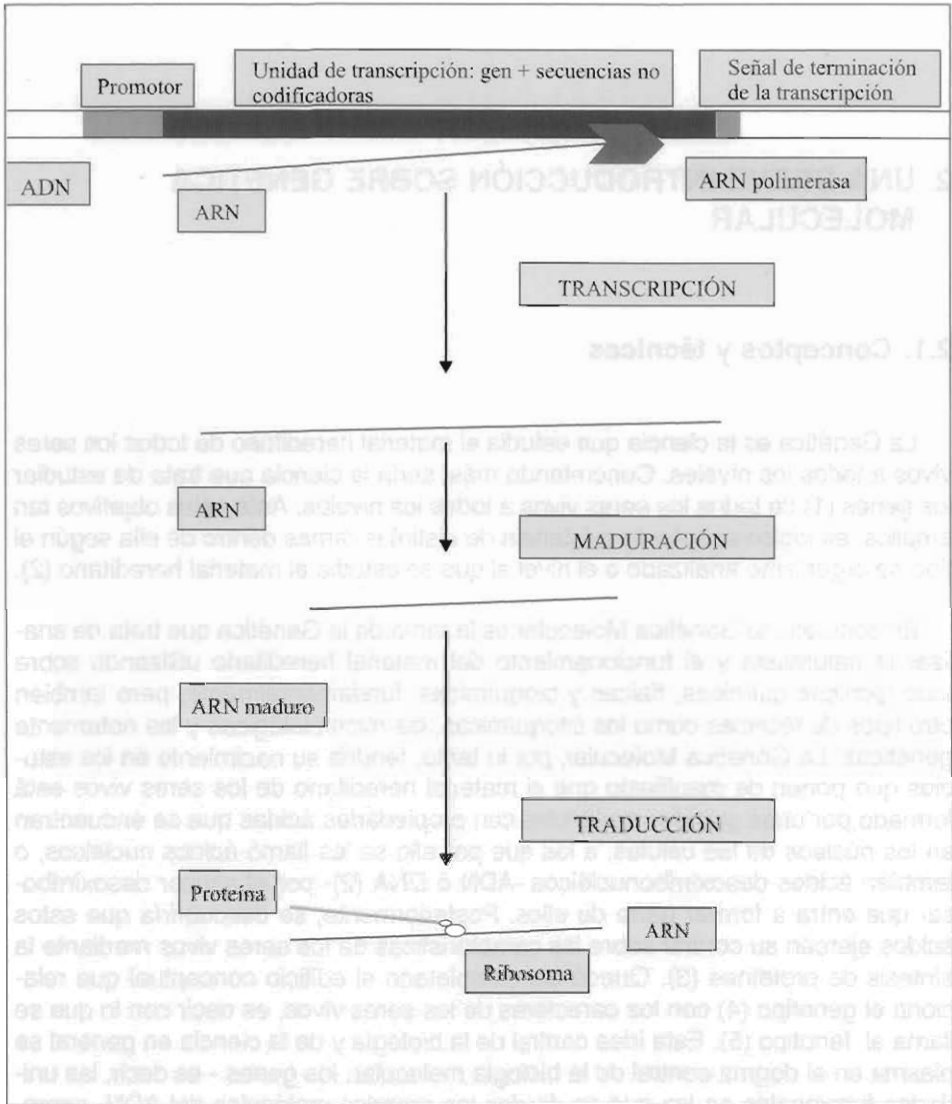


FIGURA 1. Flujo de la información genética. La enzima ARN polimerasa es la encargada de copiar la secuencia de nucleótidos de un gen (ADN) en una molécula de ARN (transcripción), la cual, tras sufrir un proceso de maduración en el que se eliminan secuencias intercaladas entre la secuencia codificadora (intrones), sale del núcleo celular al citoplasma y, en los ribosomas, es traducida a una proteína cuya secuencia de aminoácidos está determinada, en forma de código, en la secuencia del ARN mensajero.

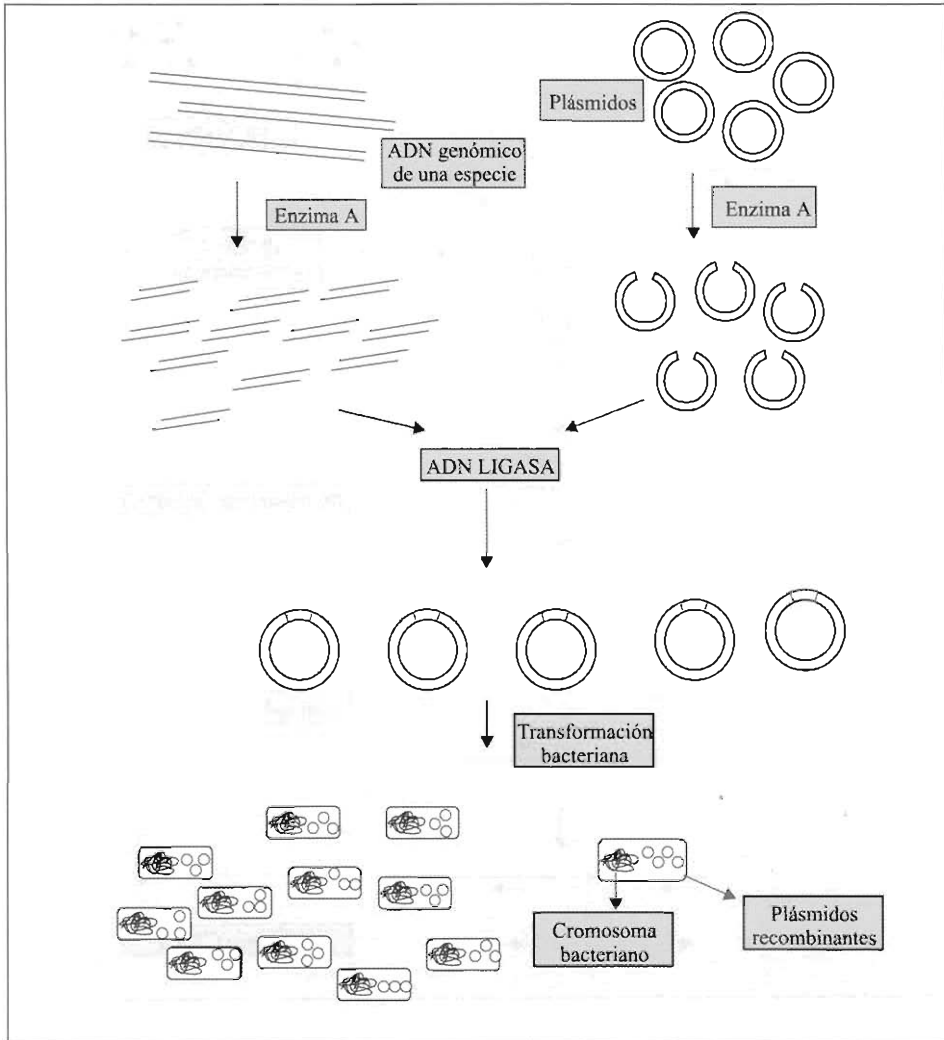


FIGURA 2. Clonación de ADN. La clonación de diferentes fragmentos de ADN del genoma de una especie puede realizarse mediante la ligación (para lo que se utiliza la enzima ADN ligasa) de dichos fragmentos a una molécula de ADN con capacidad para replicarse autónomamente y que sirve como vector (un plásmido bacteriano en el ejemplo que aquí se ilustra). Una vez construidas las moléculas híbridas (ADN recombinante), se introducen en células bacterianas. En cada célula, existe un plásmido con un fragmento único del genoma de la especie analizada, el cual se replica numerosas veces, existiendo así múltiples copias del mismo plásmido por célula bacteriana. Cuando se cultiva una de estas bacterias, crecerá originando un clon de células iguales.

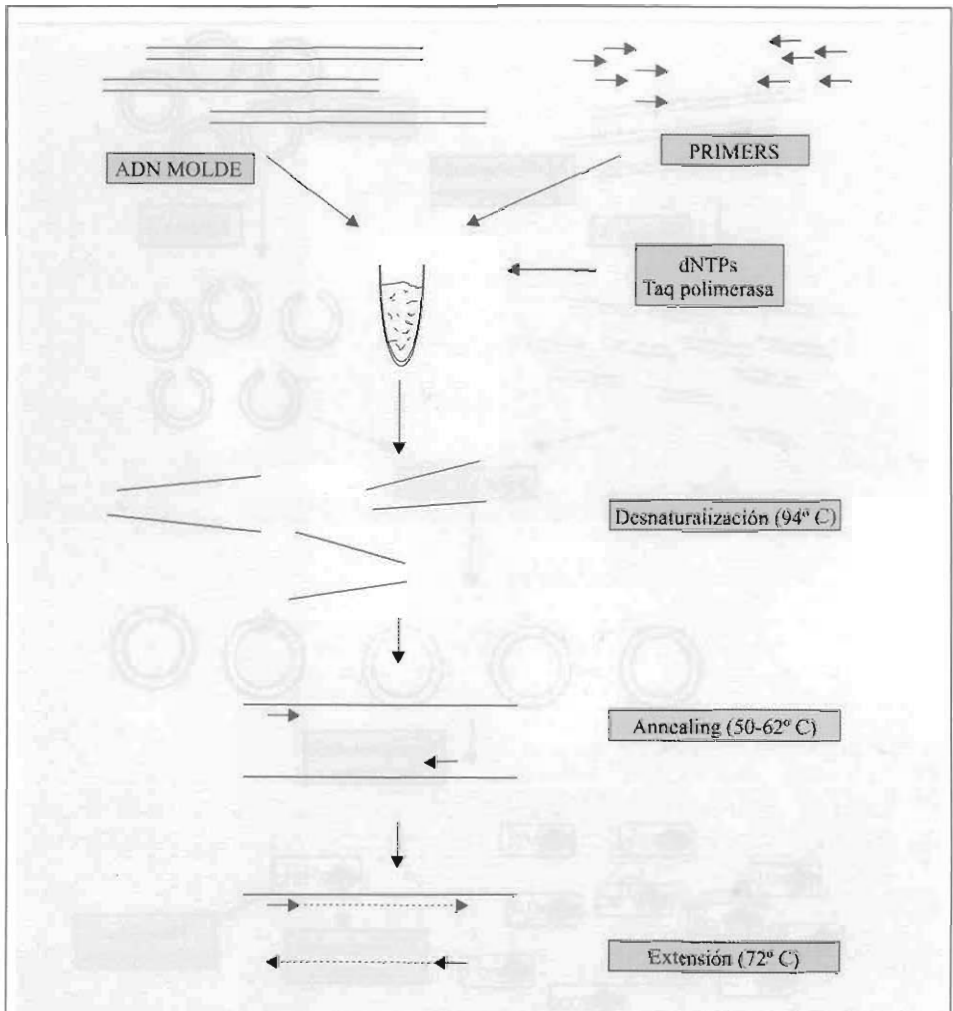


FIGURA 3. PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa). Para llevar a cabo la ampliación de una región concreta del genoma de una especie, a un tubo de ensayo conteniendo el ADN de esa especie, se le añaden unos *primers* adecuados que se corresponden con una corta secuencia de nucleótidos que flanquean la región a amplificar, los diferentes nucleótidos componentes del ADN (dNTPs) y Taq polimerasa. El tubo de ensayo se somete a continuación a varios ciclos (unos 35-40) de tres etapas cada uno: a) Desnaturalización, en la que se separan las dos cadenas de las moléculas del ADN de la especie; b) Annealing, que permite que los *primers* se "peguen" a los flancos de la región a amplificar; c) Extensión, que permite a la Taq polimerasa sintetizar ADN a partir de los *primers*.

del descubrimiento de las enzimas de restricción (7). Se trata de una especie de tijeras moleculares que permiten cortar de forma específica las grandes moléculas de ADN, con lo que, posteriormente, se puede disponer de dichos fragmentos para diversas aplicaciones. De hecho, el disponer de estas tijeras moleculares específicas ha abierto la vía a todo tipo de manipulaciones del ADN, entre las que se cuentan como más interesantes las de la clonación y la de la amplificación selectiva de determinados fragmentos que interesan para determinados objetivos y que, en el caso que nos ocupa en esta monografía, procederían de los parásitos de los organismos acuáticos.

En la clonación (Figura 2), se parte en primer lugar de un fragmento de ADN que, previamente, se ha obtenido por la acción de enzimas de restricción específicas. Posteriormente, se inserta dicho fragmento en un vector de clonación adecuado; generalmente este vector suele ser un plásmido bacteriano (8). A continuación este ADN híbrido -vector más fragmento- se introduce en células receptoras, que en este caso suelen ser bacterias. Finalmente, se han de seleccionar aquellas células que han incorporado el vector híbrido de interés y que, tras cultivarlas, constituirían un clon (9) celular que lleva incorporado el fragmento de interés.

En los últimos años, se ha hecho posible la amplificación de los fragmentos del ADN sin necesidad de clonarlos, merced a una técnica que ha revolucionado toda la Biología Molecular. Esta técnica es la conocida como PCR, de las iniciales de su denominación en inglés, Polimerase Chain Reaction (Reacción en Cadena de la Polimerasa). Con la técnica de la PCR se pretende copiar una y otra vez un fragmento de ADN (gen) a partir de una muestra pequeña de ADN de la especie que estamos estudiando. Es decir que, al igual que en el caso de la clonación, la amplificación por PCR tiene como objeto obtener millones de copias de un gen para su estudio pero, en este caso, no se obtienen tales copias en bacterias (*in vivo*) sino directamente a partir del ADN (*in vitro*).

La técnica de la PCR (véase Figura 3) se basa en el procedimiento habitual que tiene el ADN en las células para copiarse a sí mismo y originar dos copias completas de una molécula de ADN. Para ello, el ADN se desnaturaliza (se separan las dos cadenas de nucleótidos que constituyen la molécula) y cada cadena sirve de molde para copiar otra cadena complementaria mediante la acción de una enzima llamada ADN polimerasa que añade nucleótidos a una pequeña cadena monocatenaria de nucleótidos (cebador o primer) (10). La PCR, en el laboratorio, sigue el mismo procedimiento, pero en lugar de copiar una sola vez moléculas completas de ADN, copia múltiples veces un pequeño fragmento de una molécula (el gen que queremos amplificar). Para ello, el ADN aislado de la especie objeto de estudio se dispone en una solución adecuada combinado con dos primers (uno para cada extremo del gen), los cuatro nucleótidos que forman parte del ADN y una polimerasa especial termoestable (Taq polimerasa) que resiste las temperaturas elevadas. La amplificación tiene lugar como consecuen-

cia de la acción de una serie de ciclos que se repiten una y otra vez. Cada ciclo consta de tres pasos en los que, secuencialmente, se separan las dos cadenas del ADN (por calor), se reduce la temperatura para permitir que los primers se peguen a los extremos del gen a amplificar y se vuelve a elevar la temperatura para que la Taq polimerasa copie las dos cadenas del ADN entre los primers. Repitiendo este ciclo unas 35 a 40 veces se obtienen millones de copias del gen dado que los productos de un ciclo sirven de molde para el siguiente ciclo y, así, el aumento del número de copias es exponencial en vez de lineal.

Por supuesto, para llevar a cabo el proceso de amplificación de un determinado gen o secuencia mediante PCR, uno de los estudios preliminares que hay que hacer es conocer la secuencia de nucleótidos del gen que se quiere amplificar, para lo cual hay que clonar el gen por el método tradicional. Conocida la secuencia del gen es cuando el investigador puede diseñar la secuencia que tendrán los primers flanqueantes del gen a amplificar.

Aunque la técnica de la PCR es muy útil en los laboratorios de investigación por diversos motivos, la popularidad de esta técnica se ha hecho enorme gracias a su aplicación en el diagnóstico genético y en la genética forense, ya que esta técnica es capaz de detectar la presencia de una anomalía genética, de una particularidad genética de un individuo o de un agente infeccioso entre muestras de ADN de un individuo. En este último caso, la técnica de la PCR, nos permite obtener una sonda molecular capaz de detectar la presencia de un parásito, por ejemplo, entre las muestras de tejidos de un organismo hospedador.

En el caso que nos ocupa en esta monografía, que es el desarrollo de un test de diagnóstico para *Perkinsus atlanticus*, cuando se pretende detectar la presencia de ADN del parásito entre los tejidos de almejas, podemos recurrir a la técnica de la PCR. Cuando se extrae ADN de almejas, junto con su ADN, se obtiene ADN del parásito si éstas se encuentran infectadas. Detectar la presencia del parásito requiere, por tanto, conocer su genoma (11) y diseñar un experimento que permita amplificar una región propia del parásito y que no esté presente en el genoma de la almeja.

2.2. Sobre genes y genomas. Los genes que sintetizan los ARN ribosómicos.

El genoma de los seres vivos eucariotas (12) está compuesto por genes y, en su mayor parte, por secuencias que se disponen entre los genes y que no tienen información genética. Con el paso de las generaciones, los genes sufren alteraciones en su secuencia (mutaciones) que pueden ser o no ser seleccionadas

según las ventajas o desventajas que les confieran a los individuos que las portan. Es lo que se conoce como Evolución.

Resulta fácil comprender que genes que portan información fundamental para la viabilidad y supervivencia del individuo hayan experimentado pocas variaciones en su secuencia a lo largo de la evolución. Es lo que se conoce como secuencias conservadas. Del mismo modo, es fácil deducir que aquellas secuencias con información menos crucial para la supervivencia o sin información genética han podido alterarse con mayor facilidad sin que por ello se comprometa la supervivencia del individuo. Estas se conocen como secuencias poco conservadas.

Todos los seres vivos comparten numerosas secuencias conservadas. Entre estas se encuentran los genes ribosómicos. Estos genes son los que tienen la información para producir ARN ribosómicos (13). Estas moléculas están empaquetadas con el ADN y forman parte de los ribosomas (14), unos orgánulos de las células que intervienen en la traducción de la información genética codificada por los genes (Figura 1) y por tanto esenciales para la célula. Los genes ribosómicos son cuatro genes que codifican para cuatro ARN ribosómicos diferentes denominados 5S, 5.8S, 18S y 28S, de acuerdo a su peso molecular.

Tres de estos genes ribosómicos (18S, 5.8S y 28S) forman lo que se denomina una unidad ribosómica (Figura 4a). Estos genes se disponen uno a continuación de otro separados por secuencias espaciadoras aparentemente no funcionales (denominadas ITS-1 e ITS-2). Además, cientos de unidades ribosómicas se disponen una a continuación de otra en la región ribosómica, separadas por otra secuencia espaciadora denominada IGS. Como hemos comentado anteriormente, los genes ribosómicos están muy conservados entre especies. Sin embargo, no ocurre lo mismo para las secuencias espaciadoras (ITS-1, ITS-2 e IGS). Las secuencias de nucleótidos de los espaciadores son muy dispares entre especies, sobre todo las del espaciador IGS. Esto hace que este tipo de secuencias permita distinguir unas especies de otras. Diseñando unos primers adecuados (tras conocer la secuencia de los espaciadores), se puede conseguir amplificar por PCR un fragmento del espaciador de una especie determinada y, aunque exista en nuestra muestra una mezcla de ADN de diferentes especies, sólo se amplificará por PCR el fragmento del espaciador de la especie para la que se diseñaron los primers.

Por otro lado, en la mayoría de las especies eucariotas, el cuarto gen del ARN ribosómico, el gen 5S, se encuentra en otra región del genoma diferente a la que se encuentran los genes mencionados. Es decir, el gen 5S, del que también existen varias copias que se repiten una a continuación de otra en el genoma de cualquier especie eucariota, suele localizarse en otro cromosoma diferente al cromosoma portador de la región donde están los genes 18S, 5.8S y 28S, o en el mismo cromosoma pero separados físicamente.

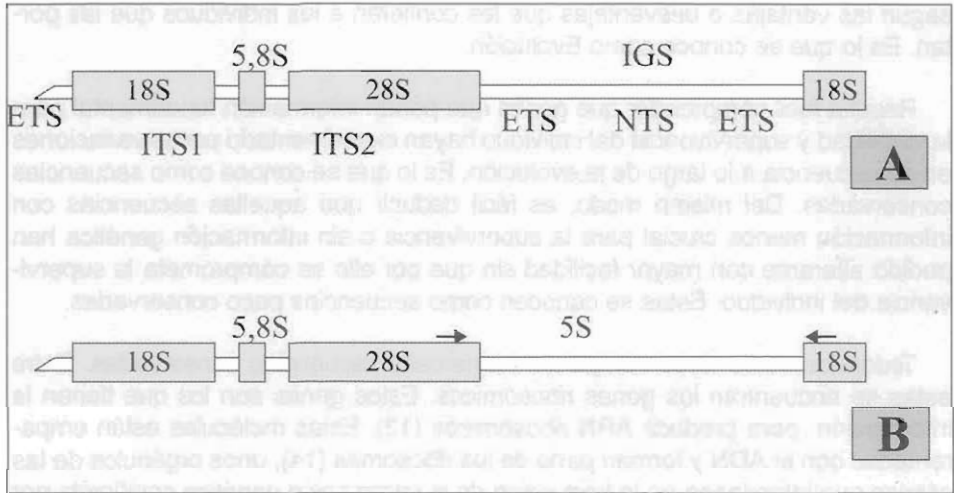


FIGURA 4. Representación esquemática de la unidad repetitiva de los genes ribosómicos. La figura muestra la organización habitual de estos genes en la mayoría de eucariotas (A) y la organización, menos frecuente, observada en *Perkinsus atlanticus*, en la que el gen 5S está ligado a los genes 18S-5.8S-28S (B). IGS = Espaciador intergénico; ETS = Espaciador transcrito externo; NTS = Espaciador no transcrito; ITS = Espaciador transcrito interno. Las flechas indican la región que amplifican los *primers* diseñados para la obtención de la secuencia completa del IGS de *Perkinsus atlanticus*.

Sin embargo, en bacterias y, excepcionalmente, en algunos eucariotas inferiores (ciertas especies de hongos, algas y protozoos), el gen 5S está unido a los otros genes ribosómicos, concretamente suele estar situado entre el gen 28S de una unidad y el 18S de la siguiente (Figura 4b). Como veremos más adelante, las diferentes especies de *Perkinsus* se encuentran entre estos organismos excepcionales.

Tal como se explica en los apartados siguientes, nosotros hemos clonado y caracterizado una parte de la unidad donde están los genes ribosómicos de *Perkinsus atlanticus*. Concretamente, hemos analizado la región IGS existente entre el gen 28S de una unidad y el 18S de la siguiente. Esto se ha hecho con el fin de conocer la secuencia de nucleótidos del IGS y, basándonos en dicha información y viendo que es específica para *P. atlanticus*, hemos diseñado la secuencia de nucleótidos de los *primers* a utilizar en el desarrollo de un test de diagnóstico para este parásito.

3. ANTECEDENTES SOBRE LA DETECCIÓN DE PARÁSITOS DE MOLUSCOS MEDIANTE TÉCNICAS DE GENÉTICA MOLECULAR

En general, los organismos infecciosos se diagnostican fundamentalmente mediante cuatro tipos de técnicas.

En primer lugar están las técnicas microbiológicas clásicas encaminadas a aislar y cultivar el agente infeccioso y así evidenciar su presencia. Estos métodos son lentos y no todos los agentes infecciosos pueden ser aislados y cultivados con facilidad.

En segundo lugar, están las técnicas histológicas tradicionales que tratan de visualizar la presencia del agente patógeno en los tejidos del hospedador. Estas técnicas consisten en incluir los tejidos en parafina para poder ser seccionados en lonchas muy finas que posteriormente son teñidas y observadas al microscopio. Este método permite no sólo observar el parásito sino también los daños asociados. Sin embargo, exige la formación de observadores experimentados y el estudio previo de la histología normal del hospedador.

Recientemente, estas técnicas están siendo sustituidas por otras en las que no se trata de visualizar directamente al parásito, sino de ponerlo de manifiesto por sus proteínas o su ADN. En el primer caso, se trata de las técnicas inmunológicas, en las que se diagnostican los organismos patógenos utilizando anticuerpos (15) específicos de las proteínas (antígenos) (16) del agente infeccioso. Por último, en el caso de las técnicas moleculares, se utilizan fragmentos o primers de ADN específicos del parásito ("sondas moleculares") que ponen de manifiesto su presencia incluso en fases muy iniciales de la infección.

Dentro de las técnicas moleculares, la aplicación de las técnicas de amplificación de ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) está revolucionando actualmente el diagnóstico de enfermedades infecciosas en acuicultura. La sensibilidad y rapidez son las cualidades más notables de estas nuevas técnicas.

Concretamente, en moluscos existen una serie de enfermedades entre las que figuran las infecciones por rickettsias, distintas haplosporidiosis y marteliosis,

para las que se dispone de sondas y primers obtenidos del ADN de los agentes patógenos que las causan , siendo estos primers capaces de detectar específicamente el parásito en cada caso.

En el caso de *Perkinsus*, un grupo americano de la Universidad de Maryland (Marsh et al., 1995) ha desarrollado una técnica para la detección de *Perkinsus marinus* en cultivos de ostras americanas. Estos autores clonaron un fragmento de ADN del genoma de esta especie de un tamaño de 3.2 Kb (3200 pares de bases) correspondiente a la secuencia comprendida entre el gen 28S y el gen 18S (Figura 4b), incluyendo los espaciadores intergénicos entre estos genes y el gen 5S, que en esta especie se halla intercalado entre los genes 28S y 18S. A partir de esta secuencia, diseñaron unos primers para ser utilizados en la amplificación específica de un fragmento de 307 pb (pares de bases) del IGS entre los genes 5S y 18S a partir de tejidos específicos de la ostra americana. Con estos primers diseñaron un test de diagnóstico consistente en la detección de *Perkinsus marinus* en las ostras. El procedimiento a seguir es extraer ADN de ostras. Si éstas están infectadas, junto con el ADN de las ostras, se obtiene ADN de *P. marinus*. La detección de la presencia de este ADN contaminante entre el ADN de las ostras es mediante amplificación por PCR del fragmento de 307 pb específico del parásito. El método sigue un procedimiento semicuantitativo por el cual se puede determinar el grado de infección de las ostras (cantidad relativa de parásitos por ostra).

Con el fin de averiguar la especificidad de los primers obtenidos por Marsch y col. para *P. marinus* y ver si podían ser de utilidad en el diagnóstico de cualquier especie de *Perkinsus*, nuestro grupo inició la investigación sobre *Perkinsus atlanticus*, especie que parasita los bivalvos en las costas europeas, comprobando que los primers de *P. marinus* no son capaces de amplificar ningún fragmento de ADN de *P. atlanticus*. Es decir, tales primers no son útiles en el diagnóstico de la especie europea de *Perkinsus*. Así las cosas, nos vimos abocados a iniciar la investigación desde el principio y a buscar una secuencia específica de *P. atlanticus*.

4. EL CASO DE *Perkinsus atlanticus*.

Desde que en 1950, Mackin y colaboradores describieran el protozoo *Dermocystidium marinum* (más tarde conocido como *Perkinsus marinus*) como causante de elevadas mortalidades de *Crassostrea virginica* en la costa Este de EE.UU., se han descubierto diferentes especies de *Perkinsus* (*P. marinus*, *P. olse- ni*, *P. atlanticus* y *P. qugwadi*) en al menos 67 especies de moluscos, todas ellas bivalvos salvo cuatro gasterópodos (Perkins 1993). La presencia de *Perkinsus spp.* es conocida prácticamente en todas las aguas cálidas del mundo y sus diferentes especies han sido históricamente asociadas a mortalidades masivas de moluscos bivalvos.

Perkinsus atlanticus, uno de los principales parásitos de almejas, fue descrito inicialmente en la almeja fina del Algarve portugués por Azevedo en 1989. Posteriormente, un parásito similar se ha detectado en la almeja fina (*Ruditapes decussatus*), en la japonesa (*Ruditapes philippinarum*), en la madreameja (*Venerupis pullastra*), en el pirulo (*Venerupis aurea*) y en la almeja rubia (*Venerupis rhomboides*) del litoral onubense. La posibilidad de infecciones cruzadas entre las almejas finas, japonesas y madreamejas (Navas et al., 1990; Rodríguez et al., 1994) le hace especialmente interesante desde un punto de vista epizootológico. De hecho, *Perkinsus atlanticus* puede considerarse en la actualidad como uno de los principales problemas patológicos para el cultivo de las almejas en aguas cálidas.

El ciclo de *Perkinsus atlanticus* no es bien conocido. Sin embargo, se sabe que sus esporas (17) biflageladas infectan a través del agua a nuevas almejas. Una vez penetran a través de los epitelios en el tejido conectivo, se transforman en otro tipo celular (trofozoito) (18) que se divide y dispersa por los diferentes tejidos. El mecanismo de defensa que desencadena la almeja provoca la formación de granulocitomas (19) que, a su vez, pueden acarrear la disfunción del órgano afectado (Figura 5). Estas aglomeraciones de células sanguíneas alrededor del parásito son, en las infecciones más intensas, visibles a simple vista como pequeñas pústulas sobre las branquias, palpos labiales y manto de las almejas. Estas lesiones, asociadas a otras situaciones de estrés como son las altas temperaturas y los períodos tras la puesta, pueden desencadenar la muerte de la almeja. Bajo determinadas condiciones (p. e. : muerte de la almeja), los trofozoitos engordan hasta multiplicar su diámetro entre cinco y veinte veces transformándose en preesporangios (20) (Figura 6). Los preesporangios pasan a espo-

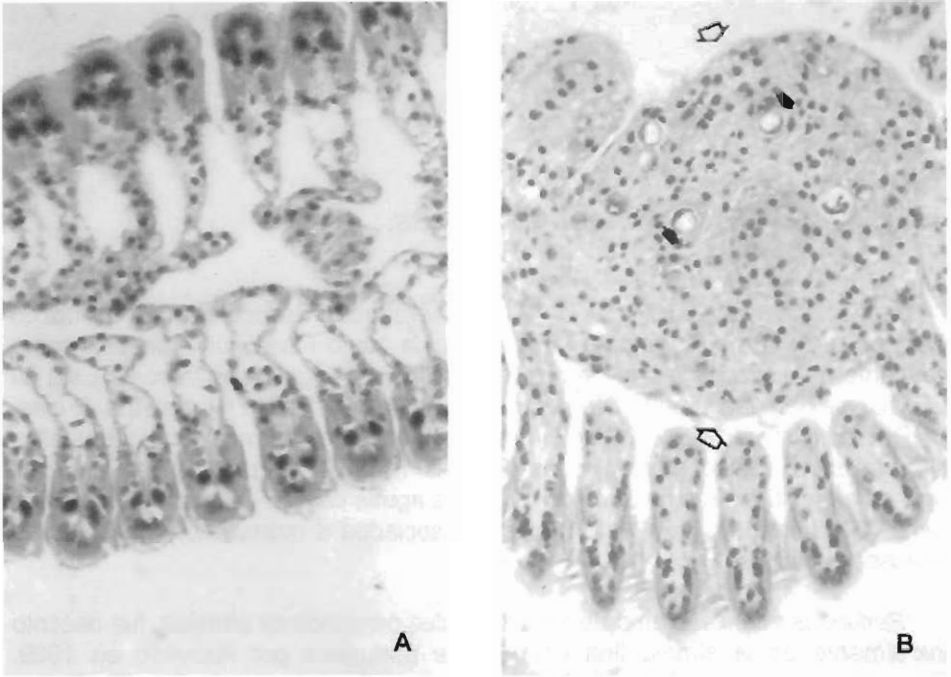


FIGURA 5. A) Aspecto normal de una branquia de almeja fina sana y B) Lesión en la branquia de una almeja fina causada por *Perkinsus atlanticus*. Obsérvese los trofozoitos de *Perkinsus* (flechas negras) inmersos en el granulocitoma (flecha blanca) generado por la reacción de defensa. Tinción hematoxilina-eosina.

rangios (21) tras múltiples divisiones internas que generan cientos de esporas biflageladas que son liberadas por un tubo de expulsión característico (Figura 7). Estas esporas infectarán a nuevas almejas. Se desconoce si existen otras formas infectivas de *Perkinsus atlanticus* e igualmente no se conoce fase sexual en este parásito.

En la actualidad, existen dos tipos de técnicas de diagnóstico de infecciones causadas por *Perkinsus*. La primera es la técnica histológica convencional basada en la inclusión de la almeja en parafina, corte, tinción y observación de secciones al microscopio óptico (Figura 5).

La segunda consiste en la incubación de un trozo de tejido de la almeja (generalmente branquia) en un medio nutritivo y ligeramente anaeróbico como es el medio fluido de tioglucolato (FTM). Este medio es suplementado con cloruro sódico para simular un medio más salino. Igualmente se le añade antibiótico para inhi-

bir el crecimiento de bacterias. Pasados entre tres y cinco días de incubación en oscuridad a 25-28°C el tejido es retirado del medio, teñido con lugol y observado al microscopio. Los preesporangios formados durante la incubación son visibles gracias a que su envuelta se tiñe de azul-negro con el lugol (Figura 6).

A pesar de que la eficacia media del método de cultivo en FTM es del 91%, muy superior al 61% de la técnica tradicional de análisis de cortes histológicos, las infecciones iniciales y leves suelen, generalmente, pasar desapercibidas. Por otra parte, ambos métodos exigen sacrificar el molusco y precisan varios días para obtener resultados (Rodríguez y Navas, 1995).

El desarrollo de nuevas técnicas de detección de *P. atlanticus* que sean más sensibles, rápidas y que no exijan el sacrificio de la muestra, constituye un objetivo primordial para el control, ordenación y protección de las poblaciones de almejas. Por ello, nuestro grupo se propuso encontrar un marcador genético que pudiese detectar de una forma rápida, económica, fiable y no destructiva las infecciones de *P. atlanticus* en almejas.

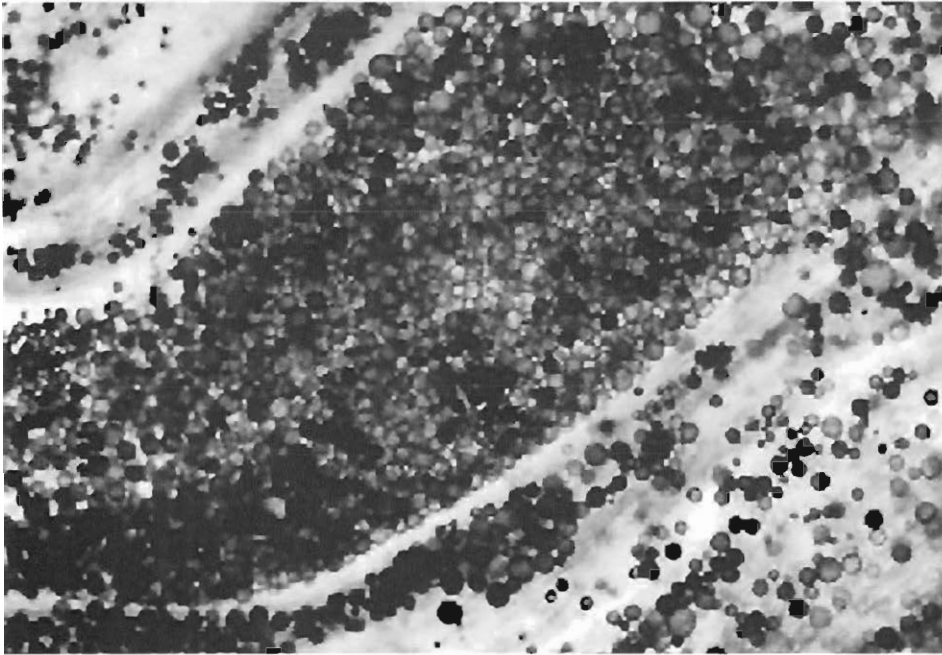


FIGURA 6. *Perkinsus atlanticus* en la branquia de una almeja fina tras su incubación en FTM y tinción con lugol. Los preesporangios son claramente visibles de color azul-negro, sobre la branquia (amarillo). El grado de infección corresponde a un nivel 5 (infección intensa) en la escala de Mackin.

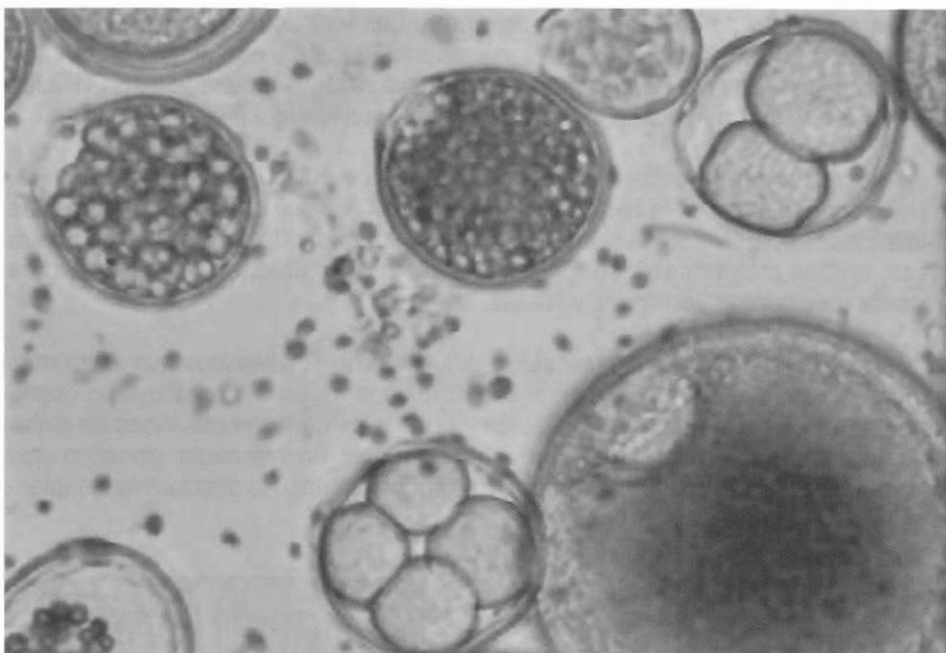


FIGURA 7. Distintas fases de división del esporangio de *Perkinsus atlanticus* para la formación de esporas. Obsérvese la formación del tubo de expulsión y las esporas libres que nadan en el medio.

5. UN METODO MOLECULAR DE DIAGNOSTICO DE *Perkinsus atlanticus*

5.1. La búsqueda de un marcador molecular específico de *Perkinsus*.

Para poner a punto un método molecular de detección de *Perkinsus atlanticus*, hemos tratado de caracterizar una secuencia repetida específica del parásito, con el fin de diseñar un método de diagnóstico basado en la amplificación mediante PCR de tal secuencia. A continuación se describen todos los pasos seguidos.

Para obtener ADN purificado de *P. atlanticus* partimos de almejas finas infectadas con dicho parásito. Tras la incubación en FTM, los tejidos de dichas almejas fueron macerados en presencia de tripsina. Los preesporangios fueron aislados por filtración y cultivados en agua de mar estéril con antibióticos. Las esporas obtenidas tras el cultivo fueron usadas para la obtención del ADN.

El ADN se sometió posteriormente a digestión con una batería de 7 enzimas de restricción diferentes: las llamadas BamHI, HaeIII, HinfI, EcoRI, SacI, HindIII y DraI. Tras cortar el ADN genómico de *P. atlanticus* con la última enzima de restricción mencionada, es decir, con DraI, y separar lo resultante de dicha digestión por electroforesis (22) en un gel de agarosa se observó una banda intensa que tenía aproximadamente unos 730 pares de bases (pb).

El análisis posterior de dicha banda puso de manifiesto que era una secuencia muy repetida, relacionada con el ADN ribosómico. A esta conclusión se llega, aparte de por evidencias indirectas que no mencionaremos aquí, mediante la obtención de su secuencia nucleotídica. Para obtener la secuencia de bases de dicha banda tuvimos que clonarla previamente. Para ello se escindió la banda de los geles y se transfirió al plásmido pUC19 que actúa de vector de clonación. Los plásmidos con el ADN de la banda de *P. atlanticus* de 730 pb se introdujeron en células de la bacteria *Escherichia coli* de la cepa DH5 α , que son capaces de "acoger" a dichos plásmidos. Por último se seleccionaron las bacterias que contenían la información de *P. atlanticus* mediante la técnica de hibridación en dot-blot (23) utilizando como sonda de hibridación la propia banda de 730 pb, y de

28S 5'-GTAAGTATGA GAGTAGGCTT ACGATCCACT GAGATTCAIC ACGTGTGGC CCGATTTC TCCTCCGTCT CTACTCCCAT CTACGGACTT CCAAAGAAG 100
 ATGGATACT CCGCACTCAG GAGACTTGA GCGCAGCGAT GCGGTGTGG GCGAGTGTG ACTGCCCCAG AGGTCCTAC TAGTGAGCAG AAGTGAGATG 200
 GAAAGCTTG ACTTGTGGC GAAATTGGTC CGACTTGGTC GATTTGATG TCCCGAGGTC CGTGATGAGG TTGCATTTTG GACAACCTCA GAGTGCACAG 300
 CGGCCATACT GCGTCGAATA CACCGGATCC CAFCCGAICT CCGAAGTTAA GCGCGGAAG GCCCGGATAG TACTGGGGTG GGGGACC GCC 400
5S TTAGGTGCT GCTGGCTTCT TTTTAAATCG CACTCATGCC TTGTGCATGC GTGCAAGCCC CCGGAGCCCC CTTGGACAAT GTTATCCAG CTCACACAG 500
 AGCAACAGTG CTATGGCAAG TAGTCCACTA GAGAGCCAAAG TCGACAATCT CTACAACATTT GTCCRAGGGG GAHAGGGGG GCCCTTGGCG AAGTTGACTT 600
 GCAGCGGAGG GTAAAAGATG CTATGGTTGG TTGCGGACCA AGTTCCGCT GTGGGTCAIC ATTAICGAGG TCTGTGCTGA CGATGGACTA GTTTTTAGGG 700
 ATTTTCCGGA GGTGTCACCA CGRACCCCCC AACTTTGGCG ACGRAGGTTA CTCRAATTTA AGTGRAMATTT AAGTRAAAT TACTTAAAT TCAGGTTTTT 800
 GGGTGGCAA AGTTGAGGTG GTGACTGGTG ACACGAAAT TTTAAAAAAG AGAGATATTA AAAAAATATT TATATTTTCT GTGTACCCTG GTC 900
 ACCRAGGGC GTPAATTTTCC GGGAAATTTT CAGATTTTCC GGAATAATTTG CATTTTGGG TAAATAGTGT CCGTCAGMAT TTGCGCAAG GACTGTCTGT 1000
 ATGTCGAGT TCCCAAATTTG AGGGTTTTTG GACATCGCTC TGAATCGCT AACGCCCTT CAGTTTTCCG ACTTTTGGC AFATTTCTGG TATTTGATAG 1100
 CTGCCAATC GGTACGGCTC GAATTTCCA ATATTTCCGA TATCGCGAGA TATCATTTGA TTTCATGGG TTTTGTATTA GTACCCGCTC 1200
 ATCGTGGAA AGTCGGGTGA ATTTATTCAA CCGCAAAATC TAATCAAGAT TTGCATGATG CAGCGACTGA CCGGGGTGAG TGTAGCAGCT GTTCTACGGC 1300
 TTGTACCGCA GACCTATCCT GTTASTAGTT GCGACTCTTG GCGTGAACCG GAAGACCGGA CCTCCGTTTC GACTATTCT TCCGATGAAT ATGAGATTGC 1400
 AAGGTATCG CTTCTGGCA TATTTAGTGA TCATCAGAGC ACGCTAGAC TTCAGTAT CCTCGGATAC ACAGAAGCTC GCAAGCATTTG CATGATGAA 1500
18S TCACCTGGTT GATCCTGCCA GTAGTCATAT GCTTGTCTCA AAGATTAAAG CATGCATGTC TAAGTATAAG CTT -3' 1573

FIGURA 8. Secuencia nucleotídica de la región intergénica de los genes ribosómicos de *Perkinsus atlanticus* obtenida por PCR, usando como *primers* las secuencias conservadas de los genes 18S y 28S tal como se indican en la Figura 4. El extremo 3' del gen 28S (posición 1 a 57), el gen 5S (posición 295 a 419) y el extremo 5' del gen 18S (posición 1503 a 1573) aparecen en recuadros azules. La secuencia subrayada en negro corresponde a la secuencia de 730 pb inicialmente obtenida mediante clonación convencional. Las secuencias en rojo corresponden a las secuencias de los *primers* PK1 y PK2.

ellas se escogieron 4 clones positivos para posteriores análisis. En concreto, para este punto, fue el análisis de la secuencia de los fragmentos de *P. atlanticus* contenidos en los plásmidos que llevaban esos 4 clones bacterianos, lo que permitió poner de manifiesto que la banda de 750 pb de la que habíamos partido contenía parte del ADN ribosómico de esta especie.

Las secuencias de *P. atlanticus* presentes en los 4 clones tienen una longitud de 730 pb, son prácticamente idénticas entre ellas (salvo diferencias de un nucleótido en un par de clones: una delección (24) en uno y una sustitución (25) en otro), y, lo que es más importante, tras una búsqueda en las bases de datos donde se depositan las secuencias de ADN a nivel mundial (las bases de secuencias del European Molecular Biology Laboratory -EMBL- y del GenBank) se encuentra que la secuencia de 70 pb comprendida entre las posiciones 660 y 730 de la secuencia de *P. atlanticus* obtenida, muestra una homología del 100% con la secuencia de los 70 primeros nucleótidos del gen ribosómico 18S de diferentes protozoos, incluidos *Cryptosporidium* (Apicomplexa), *Acanthamoeba* (Rhizopoda) o el propio *Perkinsus marinus* (Figura 8). Por tanto, los 660 nucleótidos precedentes deben corresponder con la región intergénica (IGS) entre genes ribosómicos.

Para comprobar esta hipótesis y terminar de caracterizar molecularmente esta región intergénica situada entre los genes ribosómicos 18S y 28S, nosotros hemos amplificado mediante PCR dicha región. Para ello, utilizamos primers de secuencias conservadas existentes en los genes 28S (extremo final del gen) y 18S (extremo inicial del gen). Obtuvimos un fragmento amplificado de 1573 pb, que fue clonado en un vector de clonación (plásmido pUC19) y, posteriormente, secuenciado (Figura 8). El fragmento amplificado incluye los últimos 57 pb del gen 28S, un espaciador intergénico de 238 pb, la secuencia completa del gen 5S (124 pb), que se intercala en el espaciador intergénico IGS, el resto del espaciador IGS (1084 pb), y el extremo inicial del gen 18S (70 pb). Como se ha mencionado anteriormente, este producto amplificado incluye, por tanto, al fragmento de 730 pb clonado por el método convencional.

Llegados a este punto, dos aspectos son dignos de mencionar en esta secuencia de 1573 pb del genoma de *P. atlanticus*:

En esta especie, el gen 5S se encuentra intercalado entre los genes de la unidad ribosómica 18S-5.8S-28S. Concretamente, se sitúa inmerso en el espaciador IGS, a continuación del gen 28S. Esta organización es excepcional entre los seres vivos y sólo ocurre en bacterias y en algunas especies de hongos, de algas y de algunos protozoos. Entre los protozoos, se ha encontrado esta organización en un representante del grupo de los Alveolata (al que pertenece *Perkinsus*) como es *Toxoplasma* (Apicomplexa) pero no en otros como *Plasmodium* y *Cryptosporidium* (Apicomplexa) o como *Euplotes* y *Tetrahymena* (Ciliados). Con respecto al género *Perkinsus*, Marsh y col. (1995) determinaron que *P. marinus* tiene, como *P. atlanticus*, el gen 5S ligado a los genes 18S-5.8S-28S. Esta característica nos ha

sido muy útil para llevar a cabo un estudio de las relaciones de parentesco existentes entre *Perkinsus* y otros protozoos, relaciones que no estaban nada claras anteriormente. Sobre esta cuestión se tratará en el apartado 6 de esta monografía.

Analizada la secuencia del espaciador intergénico IGS, hemos comprobado que la secuencia de este espaciador de *Perkinsus atlanticus* es muy diferente a la de los espaciadores IGS de otras especies. Esto se ha comprobado mediante una búsqueda en las bases de datos donde se depositan las secuencias de ADN a nivel mundial (las bases del EMBL y del GenBank). De hecho, hemos comprobado que incluso se diferencia mucho de la secuencia IGS de una especie emparentada con *P. atlanticus* como es *Perkinsus marinus*. La zona del IGS de 307 pb utilizada como sonda molecular de diagnóstico de *P. marinus* diseñada por Marsh y col. (1995) se corresponde con las posiciones 431 a la 888 del IGS entre el gen 5S y el gen 18S. El porcentaje de similitud existente en esta región entre *P. marinus* y *P. atlanticus* es sólo del 45%. Por lo tanto, la secuencia intergénica de *P. atlanticus* constituye un buen marcador taxonómico y, por ello, se puede utilizar para el diagnóstico específico de la enfermedad.

Basándonos en la especificidad de las secuencias intergénicas del ADN ribosómico que clonamos, hemos diseñado unos primers de esa región para amplificar específicamente un fragmento de ADN de 554 pb del IGS de *P. atlanticus*. Estos primers (a los que hemos llamado PK1 y PK2 de *Perkinsus*) se han diseñado para una región de la secuencia clonada que está alejada de los genes 18S y 5S, puesto que las zonas del IGS que están próximas a dichos genes suelen, al igual que los genes, estar más conservadas entre especies. De hecho, para ello, se han escogido primers que amplifican la región comprendida entre las posiciones 894 y 1446 del IGS (véase de nuevo, Figura 8). El resultado de una amplificación por PCR utilizando estos primers debe ser un producto de 554 pb cuando está presente el parásito.

2. Utilidad de los primers PK1 y PK2 como marcadores diagnósticos de *P. atlanticus*

El diseño de una pareja de primers que amplificaran una región específica de *P. atlanticus*, tenía como principal objetivo su utilidad en el diagnóstico de infecciones parasitarias de almejas. Para comprobar la especificidad de los primers, en primer lugar tratamos de averiguar si amplificaban sólo y exclusivamente la región de 554 pb para la que fueron diseñados a partir de ADN purificado de *Perkinsus atlanticus*. Nuestros resultados demuestran que los primers diseñados amplifican con éxito dicha región de 554 pb. Esto nos permitió comprobar la efi-

cacia de los primers propuestos. Y ello, además, porque comprobamos que el ADN amplificado de 554 pb que obteníamos mediante PCR usando dichos primers, una vez secuenciado, se correspondía con el fragmento de ADN que se quería amplificar.

Posteriormente, nos propusimos determinar que el producto de PCR de *P. atlanticus* era específico del parásito y que no mostraba hibridación cruzada con ADN de hospedadores potenciales de este parásito (las almejas *Ruditapes decussatus*, *R. philippinarum*, *Venerupis pullastra*, *V. aurea* y *V. rhomboides*), incluso en condiciones de hibridación muy relajadas (astringencia muy baja). Para ello mediante hibridación sobre membranas de nylon conteniendo ADN de almejas digerido con diferentes enzimas de restricción y transferido mediante la técnica de Southern-blot (26), hemos demostrado que efectivamente no se produce hibridación cruzada entre la sonda del parásito y el ADN de ninguno de sus hospedadores, bajo ninguna condición de hibridación.

A continuación, para conocer la efectividad de los primers como marcadores diagnósticos en experimentos de PCR, se realizó un experimento en el que se analizaron diferentes individuos de almeja fina (*R. decussatus*) tanto sanos como infectados. En el caso de individuos infectados, éstos tenían diferentes grados de infección (niveles de infección 1 al 5 de la escala de Mackin (27); Mackin, 1962). Con este análisis se demostraría tanto la efectividad del test de diagnóstico molecular como su sensibilidad.

Tras este análisis, se concluye que el método tiene una efectividad elevada pues sólo se obtienen productos de amplificación de 554 pb cuando se trata de ADN obtenido a partir de almejas infectadas, pero no sanas. Además, dado que hemos utilizado ADN genómico de almejas que presentaban diferentes niveles de infección hemos intentando cuantificar parcialmente la sensibilidad de nuestros primers (Figura 9). Así, hemos observado una gradación en la cantidad del producto amplificado según el nivel de infección de las almejas: las almejas fuertemente infectadas (nivel 5 en la escala de Mackin), mostraron una mayor cantidad de producto amplificado, mientras que la cantidad de producto amplificado decrecía conforme el nivel de infección de las almejas analizadas también se iba reduciendo (niveles 3 y 1, respectivamente, de la escala de Mackin). Es importante destacar que infecciones del nivel 1 se corresponden con niveles difícilmente detectables por métodos histológicos tradicionales.

Por todo esto, el test de PCR para *Perkinsus atlanticus* demuestra ser un método fácil, rápido, sensible y no lesivo, de diagnóstico para infecciones producidas por *Perkinsus atlanticus* en diferentes almejas, infecciones que no son detectadas por los métodos tradicionales. Estos resultados y conclusiones son comparables a los obtenidos en trabajos encaminados a obtener tests de PCR para el diagnóstico de otras enfermedades parasitarias como las ocasionadas por *P. marinus* (Marsh et al., 1995).

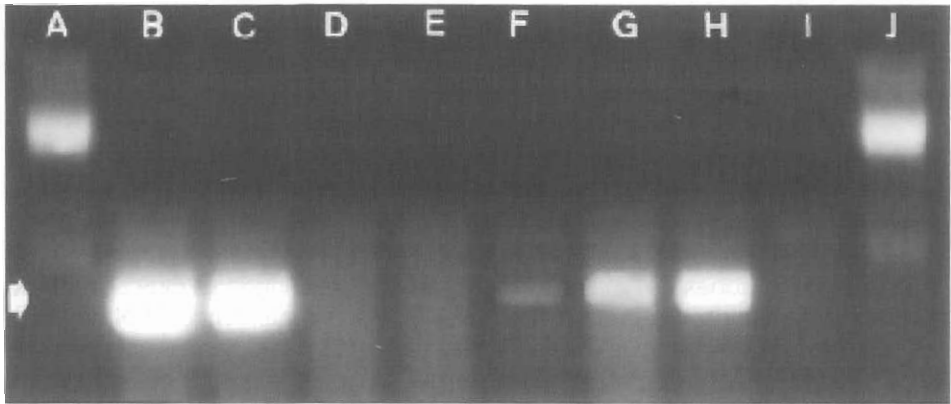


FIGURA 9. Resultado del test de diagnóstico para *Perkinsus*. Se muestra un gel de electroforesis en el que se cargaron diferentes muestras con el contenido de la reacción de amplificación:

- A y J. Marcadores de ADN para determinación del tamaño del fragmento amplificado.
- B. Amplificación de producto a partir de una muestra utilizada como control positivo (ADN de *Perkinsus*).
- C. Amplificación de producto a partir de una muestra utilizada como control positivo (ADN clonado a partir del que se diseñaron los primers).
- D-E. Ausencia de amplificación del producto en muestras de tejidos de almejas procedentes de cultivos no infectados.
- F-H. Amplificación del producto en muestras de tejidos de almejas procedentes de cultivos infectados.
- I. Ausencia de amplificación del producto en muestras carentes de material biológico (prueba de control negativo).

En esta Figura, la flecha señala los fragmentos amplificados de ADN (550 pb). Se demuestra la eficacia del método de diagnóstico para *Perkinsus atlanticus* en cultivos de almejas dado que los primers de que disponemos detectan la presencia del parásito en almejas infectadas, y no ocasiona problemas de falsos positivos puesto que cultivos no infectados no mostraron amplificación. Además, se demuestra la gran sensibilidad del método, puesto que detecta la presencia del parásito en cultivos aún cuando el nivel de infección es mínimo. Así, en los productos de amplificación que se observan en las calles F a H del gel, se puede observar una gradación de menor a mayor en cuanto a la cantidad de producto amplificado, gradación que se corresponde con los niveles de infección de cada uno de los tres cultivos de donde procedían las tres muestras.

6. LA TAXONOMÍA Y LA FILOGENIA DE *Perkinsus*

Tal como se ha mencionado anteriormente, los resultados obtenidos por nosotros tienen un interés desde el punto de vista taxonómico porque permiten poner de manifiesto que el *Perkinsus europeo* (*P. atlanticus*) es diferente desde el punto de vista genético al *Perkinsus americano* (*P. marinus*). Adicionalmente, los datos de las secuencias que nosotros hemos obtenido son útiles para realizar un análisis comparativo con otras especies de protozoos permitiendo así aclarar las relaciones filogenéticas (28) de este género.

La clasificación de las especies de *Perkinsus* ha estado continuamente sujeta a diferentes cambios y alguna que otra discusión. En un principio, estos parásitos fueron clasificados como hongos pertenecientes al género *Dermocystidium* y, más tarde, incluidos en diferentes grupos de hongos como los Ascomycetales, los Entomorphorales y los Saprolegniales. Actualmente, se tiene la certeza de que estamos ante un protozoo. Dentro de los protozoos existen diferentes grupos entre los que se encuentra el grupo de los Alveolata. Sin embargo, dentro de los Alveolata, ha existido también, en los últimos años, una gran controversia sobre si *Perkinsus* pertenece a los Apicomplexa o si, por el contrario, pertenece a los Dinoflagellata. Los Alveolata están constituidos por tres grandes grupos: Apicomplexa, Dinoflagellata y Ciliata. Inicialmente clasificado como Apicomplexa, en trabajos recientes como el de Sidall y colaboradores (1997) se ponía de manifiesto que *Perkinsus* debía ser incluido entre los Dinoflagellata.

Nosotros hemos tratado de contribuir a aclarar la posición taxonómica de *Perkinsus* utilizando los datos de las secuencias repetidas de los genes ribosómicos 5S y 18S ya mencionados. Este tipo de análisis se realiza comparando la secuencia de nucleótidos de un gen en una especie con las de otras especies. Estimando diferencias entre secuencias (distancia genética) y asumiendo una serie de consideraciones acerca de la evolución del gen utilizado, se puede estimar la historia evolutiva y las relaciones filogenéticas (relaciones de parentesco genético) entre las especies que se comparan. Para saber qué posición ocupa *Perkinsus* dentro de los Alveolata nosotros sumamos los datos obtenidos a partir de la secuencia del gen 5S y de la secuencia parcial que teníamos del gen 18S y los comparamos con los de las secuencias de otros protozoos de los distintos grupos dentro de Alveolata. En concreto, hemos analizado un representante de Dinoflagellata (*Crypthecodinium cohnii*), tres de Apicomplexa (*Cryptosporidium parvum*, *Eimeria tenella* y *Toxoplasma gondii*), dos de Ciliophora (*Paramecium*

tetraurelia y *Tetrahymena thermophila*) y un representante de Euglenozoa (grupo de protozoos diferente a los Alveolata: *Trypanosoma rangeli*).

Las secuencias de los genes 5S y 18S de estas especies fueron obtenidas de las bases de datos del EMBL y del GenBank. Hemos analizado la especie *Trypanosoma rangeli*, como especie de referencia perteneciente a un grupo diferente a Alveolata, para que nuestro análisis genético nos permitiera poner una raíz al árbol filogenético. Esta raíz marcaría el punto de divergencia entre las especies actuales de Alveolata. Nuestro análisis tuvo como resultado el árbol filogenético que se muestra en la Figura 10. Como se observa, la ramificación de los Alveolata determina la existencia de tres grupos compuestos por especies de Dinoflagellata, de Apicomplexa y de Ciliophora. Pero lo más interesante que cabe destacar es que, a diferencia de lo que se aceptaba hasta hace unos años, la

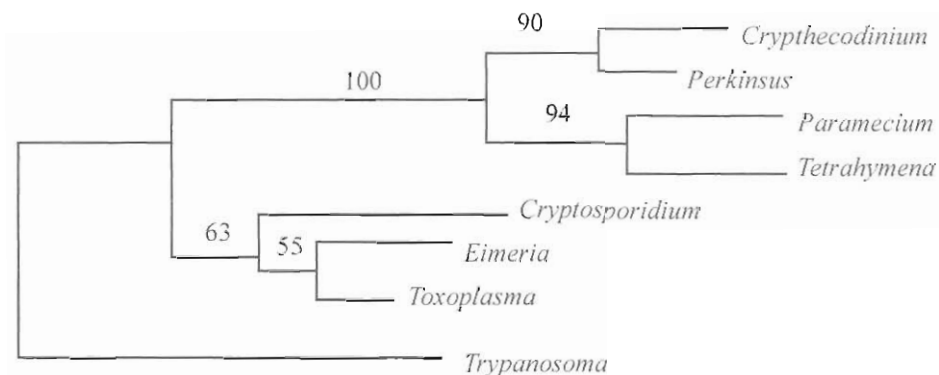


FIGURA 10. Árbol filogenético de las especies de Alveolata mediante el método del vecino más próximo (neighbor-joining method). El árbol fue enraizado utilizando como outgroup (especie de referencia) al protozoo perteneciente a Euglenozoa, *Trypanosoma rangeli*. Los números indican los valores del análisis de bootstrap de significación estadística para cada nodo del árbol (porcentajes). Las secuencias de los genes 5S y 28S fueron obtenidas por nosotros en el caso de *P. atlanticus* y por otros autores en el caso de las demás especies. Dichas secuencias se encuentran depositadas en las bases de datos del EMBL y del GenBank bajo los números de referencia siguientes: *Cryptosporidium parvum* (L20049 y X64341), *Eimeria tenella* (M86547 y U67121), *Toxoplasma gondii* (M63161 y L24381), (Apicomplexa), *Crypthecodinium cohnii* (M25115 y M64245) (Dinophyceae), *Paramecium tetraurelia* (JQ1872 y X03772), y *Tetrahymena thermophila* (JQ1893 y AF060822) (Ciliophora) y *Trypanosoma rangeli* (X62675 y AJ009160).

especie con la que *Perkinsus* aparece emparentada es *Cryptothecodinium cohnii*, un Dinoflagellata. Todo ello, viene a decir, en definitiva, que el análisis filogenético realizado por nosotros apoya los últimos datos obtenidos por Siddall y col. (1997), según los cuales, *Perkinsus* pertenece al grupo de los Dinoflagellata y no al de los Apicomplexa.

Esto es algo que ya pudimos intuir también desde los primeros momentos de nuestra investigación. Y es que de acuerdo a los datos que se tienen, se sabe que los Apicomplexa se caracterizan porque en su genoma existen muy pocas copias de genes ribosómicos (4 o 5, según la especie). Sin embargo, *Perkinsus atlanticus* y *Perkinsus marinus* se caracterizan por presentar numerosas copias de estos genes, tal como comprobamos durante el aislamiento de estos genes para su clonación y análisis.

El análisis filogenético de *Perkinsus* no solo tiene utilidad taxonómica. Este tipo de análisis permite establecer similitudes y diferencias con otros parásitos con los que se encuentre más relacionados, conocimientos que pueden ser muy útiles para la prevención y lucha contra la enfermedad. El análisis genético entre distintas especies de *Perkinsus* permitirá, en gran medida, reconstruir su secuencia evolutiva y conocer la relación histórica con sus distintos hospedadores. La comparación de secuencias entre *Perkinsus atlanticus* procedentes de lugares y hospedadores distintos facilitará el estudio de la dispersión geográfica del parásito. Este último aspecto es esencial para comprender y evitar la introducción de enfermedades exóticas a nuestras aguas.

7. UTILIDAD DE LAS SONDAS MOLECULARES EN EL ANÁLISIS DE LOS CICLOS DE VIDA DE LOS PARÁSITOS

El análisis del ADN de un parásito no sólo es útil para el diagnóstico o para dilucidar su posición taxonómica. El disponer de una secuencia específica del parásito permite detectar dicho parásito mediante la aplicación de técnicas de hibridación *in situ*. Estas técnicas se basan en la capacidad que tienen las dos cadenas complementarias de una molécula de ADN de volver a unirse (hibridar) tras haber sido separadas (desnaturalización, por ejemplo, mediante calor). Al desaparecer las condiciones de desnaturalización (descenso de la temperatura) las cadenas vuelven a unirse (hibridar) preferentemente con su homóloga. Esto permite localizar un parásito directamente sobre el tejido del huésped si se utiliza una secuencia de ADN específica del parásito y convenientemente marcada. Es lo que se conoce como sonda molecular.

El primer paso consiste en obtener la sonda específica y marcada. Para ello, utilizando los primeros específicos diseñados para el diagnóstico del parásito, se sintetiza en el laboratorio la sonda marcada con un compuesto determinado. En nuestro caso este compuesto es la digoxigenina: un molécula de origen vegetal de la que se disponen anticuerpos muy específicos.

Posteriormente se deposita la sonda marcada sobre el corte histológico donde se desea localizar el parásito y se les somete a un proceso de desnaturalización e hibridación. Durante este proceso la sonda marcada localiza al parásito e hibrida con su ADN.

Por último, tras el lavado del corte, se desarrolla el revelado. Mediante técnicas inmunohistoquímicas se pone en evidencia, por un precipitado pardo-azulado, la localización de las moléculas de digoxigenina que determinan la posición de la sonda y del ADN con el que hibridó y que no es otro que el del parásito en cuestión. De esta manera es posible localizar físicamente el parásito en los diferentes tejidos del hospedador.

Esta técnica de hibridación *in situ* es especialmente útil para localizar el parásito en fases muy iniciales de infección, o cuando, por su morfología, es difícilmente detectable entre los tejidos del hospedador. Esto permite estudiar con precisión el ciclo de vida del parásito, estudiar el avance de la infección por los tejidos, buscar otros posibles hospedadores (vectores de transmisión) y diferenciar si hay más de una especie del parásito afectando a un mismo individuo (infecciones mixtas).

En este trabajo, gracias al desarrollo de la sonda de diagnóstico descrita en el apartado 5.2, ha sido posible desarrollar la técnica de hibridación in situ para la detección de *Perkinsus atlanticus* en los tejidos de almeja. Como puede observarse en la Figura 11, *Perkinsus atlanticus* es claramente detectado, diferenciándose del resto del tejido de la almeja por el precipitado pardo-azulado formado tras el revelado de la hibridación in situ.

En la actualidad se desarrollan estudios encaminados a dilucidar la progresión de la infección en los tejidos de almeja y a poner en evidencia la presencia de *Perkinsus atlanticus* en otras especies de almejas. De hecho, se ha demostrado por hibridación in situ la presencia de *P. atlanticus* en los tejidos de almeja japonesa (*Ruditapes philippinarum*), madreameja (*Venerupis pullastra*) y pirulo (*Venerupis aurea*) del litoral onubense, confirmando que *P. atlanticus* es capaz de infectar a diferentes especies de almejas en el medio natural. Este característica fue inicialmente observada en condiciones de laboratorio por Rodríguez et al. (1994) en el CICEM "Agua del Pino". Igualmente se ha demostrado que esta sonda hibrida con *P. atlanticus* en tejidos de almejas (fina y japonesa) procedentes de otras costas, concretamente Galicia.

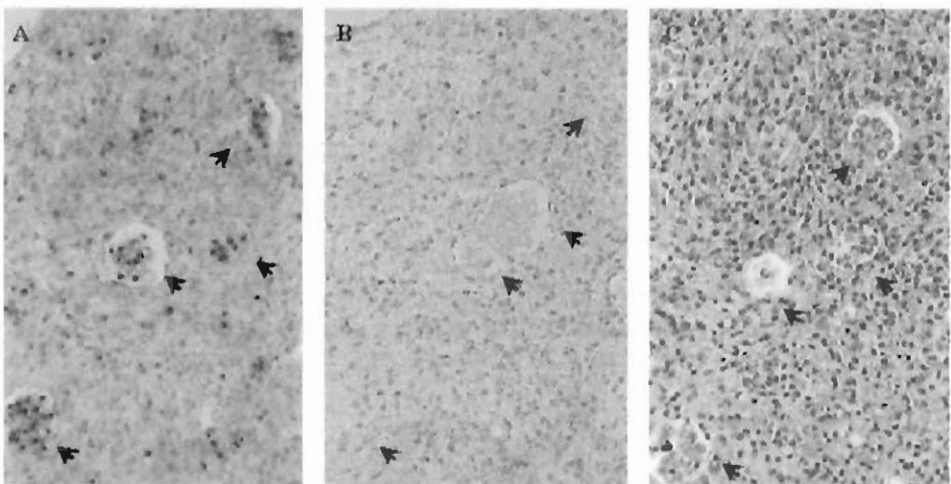


FIGURA 11. Hibridación in situ sobre tejido conectivo del digestivo de una almeja fina infectada por *Perkinsus atlanticus*. Las imágenes corresponden a tres cortes seriados del mismo tejido: A) Sección hibridada con la sonda, *Perkinsus* es claramente detectable por el precipitado azul-negro generado en su núcleo tras el revelado de la sonda. B) Control negativo, sección hibridada con una sonda humana, se observan los trofozoitos de *Perkinsus* sin reacción positiva alguna. C) Control histológico, sección teñida con hematoxilina-eosina donde se observan las células típicas de *Perkinsus* rodeadas de granulocitos de la almeja.

8. BIBLIOGRAFÍA RELACIONADA CON EL TEMA

AZEVEDO, C. (1989). Fine structure of *Perkinsus atlanticus* n. sp. (Apicomplexa, Perkinsea) parasite of the clam *Ruditapes decussatus* from Portugal. *Journal of Parasitology* 75, 627-635.

CAVALIER-SMITH, T. (1993). Kingdom protozoa and its 18 phyla. *Microbiological Reviews* 57, 953-994.

DE LA HERRÁN, R. GARRIDO-RAMOS M. A., NAVAS J.I., RUIZ REJÓN C., RUIZ REJÓN, M. (2000). Molecular characterization of the ribosomal RNA genes of *Perkinsus atlanticus*: its use in phylogenetic analysis and as a target for a molecular diagnosis. *Parasitology* 120: 345-353.

MACKIN, J.G. (1962). Oyster disease caused by *Dermocystidium marinum* and other microorganisms in Louisiana. *Publications of the Institute of Marine Science of the University of Texas* 7, 132-229

MARSH, A.G., GAUTHIER, J.D. & VASTA, G.R. (1995). A semiquantitative PCR assay for assessing *Perkinsus marinus* infections in the eastern oyster, *Crassostrea virginica*. *Journal of Parasitology* 81: 577-583.

MINISTERIO DE AGRICULTURA, PESCA Y ALIMENTACIÓN. (1999). Borrador del libro blanco de la Acuicultura en España. Secretaría General Técnica, Servicio de publicaciones. Madrid.

NAVAS, J.L., CASTILLO, M.C., VERAZ, P. & RUIZ-RICO, M. (1992). Principal parasites observed in clams, *Ruditapes decussatus* (L), *Ruditapes philippinarum* (Adams and Reeve), *Venerupis pullastra* (Montagu) and *Venerupis aureus* (Gmelin), from the Huelva coast (SW Spain). *Aquaculture* 107, 193-199.

PERKINS, F.O. (1993). Infection diseases of molluscs. In *Pathobiology of marine and estuarine organisms* (ed. Couch, J.A. & Fournie, J.W.) *Advances in Fisheries Science*, pp 255-287. CRC Press Inc., Boca Raton, Florida.

RODRÍGUEZ, F., GODOY, T. & NAVAS, J.I. (1994). Cross-infection with *Perkinsus atlanticus* in *Ruditapes decussatus*, *Ruditapes philippinarum* and *Venerupis pullastra*. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* 14, 24-27.

RODRÍGUEZ, F. & NAVAS, J.I. (1995). A comparasion of gill hemolymph assays for the thioglycolate diagnosis of *Perkinsus atlanticus* (Apicomplexa, Perkinsea) in clams *Ruditapes decussatus* (L) and *Ruditapes philippinarum* (Adams et Reeve). *Aquaculture* 132, 145-152.

SIDDALL, M.E., REECE, K.S., GRAVES, J.E. & BURRESON, E.M. (1997). Total evidence refutes the inclusion of *Perkinsus* species in the phylum Apicomplexa. *Parasitology* 115, 165-176.

WINNEPENNINGKX, B., BACKELJAU, T. & DE WACHTER, R. (1993). Extraction of high molecular weight DNA from molluscs. *Trends in Genetics* 9, 407.

9. APÉNDICE I. GLOSARIO DE TÉRMINOS

(1) GEN

Una molécula de ADN está constituida por múltiples genes. Un gen, por tanto, es una parte de una molécula de ADN caracterizada por poseer una secuencia de bases propia y diferente a la de otros genes. El gen es la unidad de función genética. Es decir, cada gen tiene la información genética, codificada en forma de secuencia de bases, para una función determinada de la célula. Los genes se transmiten de padres a hijos siguiendo las llamadas Leyes de Mendel. Como postuló Mendel, cada individuo posee dos copias de cada gen (es diploide) en sus células ya que existen dos copias de cada cromosoma por célula de un individuo. Para la reproducción sexual cada individuo produce gametos caracterizados porque sólo presentan una copia de cada gen (un gameto es haploide). Es decir, se produce la segregación (separación) de las dos copias (alelos) del gen. Además, la segregación de los alelos es independiente entre genes situados en cromosomas diferentes. Con lo cual un gameto de un individuo puede tener copias heredadas de su padre para unos genes (y cromosomas) y copias heredadas de su madre para otros genes (y cromosomas). Este es el principio de la recombinación genética que se ve incrementado por el hecho de que los cromosomas paterno y materno que un individuo posee pueden intercambiar partes y construirse así cromosomas mosaicos compuestos por genes paternos y maternos. Todo esto permite el que la descendencia sea única en su apariencia final pero presente características heredadas a través de su línea materna y a través de su línea paterna. Esto es posible a través del proceso de la fecundación por el que un gameto materno y un gameto paterno se fusionan y originan un nuevo individuo diploide.

(2) MATERIAL HEREDITARIO DE LOS SERES VIVOS.

El material hereditario está constituido por moléculas de ácido desoxirribonucleico (ADN, también está admitido por la Academia el uso del término DNA). Estas moléculas están formadas por dos cadenas de polinucleótidos, apareadas entre sí formando una doble hélice. Una cadena polinucleotídica consta de múltiples nucleótidos enlazados uno a continuación de otro. Cada nucleótido está formado por un azúcar (una pentosa, la desoxirribosa), un grupo fosfato y una base. Mientras el azúcar y el fosfato son comunes a cualquier nucleótido, cada nucleótido puede diferir en la base. Así, existen cuatro tipos de bases componentes del ADN: adenina, timina, guanina y citosina. Cada una de estas bases constituye una de las cuatro "letras" (A, T, G, C) del "lenguaje" o código genético. En la doble

hélice de una molécula de ADN, el apareamiento entre las dos cadenas polinucleotídicas es entre las bases. La característica principal de este apareamiento es que siempre es específico entre A y T o entre G y C. Es decir, A y T por un lado, y, G y C por otro, son complementarias. Es decir, la secuencia de bases de una cadena es complementaria de la secuencia de la otra cadena.

En cualquier especie, existe un número determinado de largas moléculas de ADN, cada una con secuencias de bases diferentes. Cada larga molécula de ADN se pliega y repliega múltiples veces asociándose con proteínas y formando lo que se denomina cromosoma. Varias moléculas de ADN forman así varios cromosomas que se encuentran en el núcleo de las células que componen cada organismo. En todas las células de un individuo existe un complemento idéntico de cromosomas.

(3) PROTEÍNAS

Compuestos poliméricos hechos de unidades que son los aminoácidos. Las proteínas se sintetizan en los ribosomas a partir de los ARN mensajeros que se han transcrito a partir del ADN. Existen dos tipos principales de proteínas: enzimas y proteínas estructurales.

(4) GENOTIPO

Descripción de la composición genética de un organismo.

(5) FENOTIPO

Las características que se pueden observar de una célula o de un organismo.

(6) ARN MENSAJERO

Son las moléculas de ARN que se transcriben a partir de los genes que tienen la información para la síntesis de proteínas. Los ARN mensajeros se traducen a proteínas en los ribosomas.

(7) ENZIMA DE RESTRICCIÓN

Enzimas que cortan las moléculas de ADN un número limitado de veces dependiendo de la existencia en el interior de dichas moléculas de las secuencias diana específicas de cada enzima de restricción. Así, la llamada enzima de restricción EcoRI, por ejemplo, corta las moléculas de ADN allá donde existe la secuencia GAATTC. La denominación que se da a las enzimas de restricción sigue unas claves adoptadas por la comunidad científica: las iniciales del nombre científico de la especie bacteriana de la que la enzima fue aislada, seguido del nombre de la cepa utilizada de esa especie y un número romano que indica el orden de aislamiento. Así, por ejemplo, en el caso de la enzima EcoRI: Eco, de la especie *Escherichia coli*; R de la cepa de laboratorio R de *E. coli*; I, por ser la primera enzima que se aisló de esta especie.

(8) PLÁSMIDO

Pequeña molécula de ADN circular autónoma del cromosoma que se encuentra en el citoplasma de las bacterias y, excepcionalmente, en algunos organismos eucariotas como las levaduras.

(9) CLON

Actualmente, este término se utiliza en Biología en varios sentidos. Aquí se usa para denominar a un grupo de células -bacterias- que contienen la misma molécula de ADN recombinante.

(10) PRIMER

Una cadena nucleotídica corta que se “pega” a una cadena sencilla de ADN para proporcionar un punto de inicio en el proceso de síntesis de la cadena complementaria. La traducción al Castellano es “cebador”, si bien el anglicismo está ampliamente extendido.

(11) GENOMA

El conjunto de los genes que caracterizan a una especie. Normalmente el término hace referencia a los genes que están presentes en los cromosomas del núcleo celular. Pero hay que tener en cuenta que en todos los organismos eucariotas también existen orgánulos citoplasmáticos (como las mitocondrias o los cloroplastos) que tienen su propio material genético.

(12) EUCARIOTA

Se dice de los organismos que tienen su material hereditario en un núcleo separado por una membrana del citoplasma (Eu=verdadero; karion=núcleo). Esta característica la tienen todos los seres vivos (incluidos los protozoos como *Perkinsus* y obviamente los moluscos que aquí se tratan) excepto las bacterias (a estas últimas se les llama procariotas, al no tener membrana nuclear)

(13) ARN RIBOSÓMICO

Las moléculas de ARN que forman parte de los ribosomas. Están codificadas por los genes ribosómicos.

(14) RIBOSOMA

Orgánulo de las células constituido por diferentes tipos de ARN ribosómico y de proteínas en el que tiene lugar la síntesis de las proteínas a partir de la “lectura” de los ARN mensajeros transcritos a partir de los genes.

(15) ANTICUERPOS

Las proteínas que producen los organismos como respuesta a la invasión por parte de proteínas antigénicas extrañas. Se producen en células especializadas en donde reside la respuesta inmune. La producción de anticuerpos es típica de

vertebrados y está especialmente estudiada en mamíferos. No se conoce la producción de anticuerpos en los invertebrados. Sin embargo, anticuerpos obtenidos de mamíferos suelen ser utilizados para detectar parásitos en tejidos de invertebrados.

(16) ANTÍGENOS

Cualquier molécula biológica presente en un organismo infeccioso o parasitario extraño al organismo capaz de estimular su respuesta inmunitaria (producción de anticuerpos, entre otras cosas).

(17) ESPORA

Forma reproductiva sexual o asexual de hongos y algunos protozoos. También se dice de algunas formas de resistencia de ciertas bacterias. En nuestro contexto, son las células infectivas de *Perkinsus* que tras ser liberadas penetran en el tejido de otras almejas y desarrollan un nuevo trofozoito. A las esporas de *Perkinsus* también se las denomina ZOOSPORAS ya que son esporas no encerradas en quistes y que poseen órganos filiformes para nadar (en este caso dos flagelos – esporas biflageladas-).

(18) TROFOZOITO

Es la célula vegetativa y asexual de ciertos protozoos. En nuestro contexto, es la célula típica observable de *Perkinsus* en los tejidos de la almeja. El trofozoito de *Perkinsus* se caracteriza por ser una célula más o menos esférica de 4 a 8 micras de diámetro, con una enorme vacuola, un núcleo excéntrico y un nucleolo patente.

(19) GRANULOCITOMA

Lesión inflamatoria causada por la acumulación de granulocitos (un tipo de células de defensa) generalmente rodeando a un agente infeccioso.

(20) PREESPORANGIO

Célula precursora del esporangio. Se caracteriza por su elevado tamaño (de 20 a 100 micras) y por no haber iniciado aún las divisiones internas que darán lugar a las esporas.

(21) ESPORANGIO

Célula que tras múltiples divisiones internas genera y engloba a las esporas hasta su liberación.

(22) ELECTROFORESIS

Separación de las moléculas biológicas en función de sus cargas eléctricas. Cuando el ADN de una especie es digerido con enzimas de restricción, la forma de analizar los fragmentos generados en esa digestión es mediante esta técnica.

Para ello, se disponen las muestras de ADN digerido en pocillos preparados en un gel de agarosa. A continuación se hace pasar una corriente eléctrica a través del gel, el cual está sumergido en una cubeta de electroforesis que contiene un tampón que aporta las condiciones iónicas adecuadas para que se produzca el paso de la corriente eléctrica. Los diferentes fragmentos de ADN de cada muestra se desplazan a lo largo del gel con una velocidad que es inversamente proporcional al tamaño del fragmento, con lo cual, los fragmentos más pequeños tienen mayor movilidad electrofórica y se alejan más del punto de partida del gel, mientras que los más grandes, más pesados, se alejan menos del pocillo.

(23) DOT-BLOT

Técnica que consiste en disponer el ADN genómico total de una especie en forma de gota sobre una membrana de nylon. Esta membrana conteniendo diferentes gotas (muestras de ADN de diferentes especies), puede utilizarse como soporte para llevar a cabo una hibridación con una secuencia particular de ADN (sonda) del genoma de una especie concreta. Aquellas especies que poseen en su genoma esta secuencia mostrarán hibridación con la sonda, mientras que las que carecen de esta secuencia de ADN, no mostrarán hibridación con la sonda. También es una técnica que se utiliza en el análisis de clones bacterianos. El objetivo en este caso es averiguar cuál de los clones bacterianos de los que disponemos posee la molécula de ADN recombinante de interés.

(24) DELECCIÓN

Mutación génica consistente en la pérdida por eliminación de uno o unos pocos nucleótidos de la secuencia de un gen. Por el contrario, una adición, consiste en la incorporación de uno o unos pocos nucleótidos dentro de una secuencia de un gen.

(25) SUBSTITUCIÓN

Mutación génica consistente en el cambio de un nucleótido por otro diferente en la secuencia de nucleótidos de un gen.

(26) SOUTHERN-BLOT

Nombre de la técnica que permite la detección de genes o fragmentos de genes concretos de una especie sobre un fondo de todo el ADN de la misma. El ADN de una especie digerido con enzimas de restricción genera un gran número de fragmentos que se observan en un gel de agarosa tras su electroforesis como un rastro de fragmentos de ADN indiferenciables unos de otros. Si un investigador quiere analizar los fragmentos de restricción de un gen o una zona concreta del genoma de una especie, tiene que realizar una hibridación sobre ese rastro de ADN. Para ello, el gen (sonda), previamente aislado, se marca de forma adecuada y se utiliza para ser hibridado sobre el rastro de ADN esperando que detecte los fragmentos de ese gen generados por la digestión con enzimas de restricción. Dado que el gel de agarosa no es un soporte adecuado para llevar a cabo la téc-

nica, el ADN debe ser transferido a un soporte sólido, una membrana de nylon a la que se "pega" el ADN del gel. La técnica para esta transferencia se denomina técnica de Southern-blot.

(27) ESCALA DE MACKIN

Es una escala subjetiva que da idea de la intensidad de la infección por *Perkinsus*. Se basa en el número de preesporangios observados después de incubar un trozo de tejido en medio de tioglicolato. Desarrollada inicialmente para la ostra, se ha aplicado también en almeja. Consta de cuatro niveles: 0 (sana), 1 (infección leve), 3 (infección moderada) y 5 (infección intensa). Algunos autores establecen niveles intermedios (2 y 4). La relación entre esta escala y el número de parásitos en el molusco es exponencial y ha sido estudiada por diferentes autores.

(28) FILOGENIA

Clasificación de los seres vivos que atiende a las relaciones evolutivas existentes entre ellos.

10. APÉNDICE II. TÉCNICAS DE DETECCIÓN DE *Perkinsus atlanticus*

1.- TÉCNICAS HISTOLÓGICAS:

Estas técnicas se basan en la observación al microscopio óptico de secciones teñidas del individuo entero o de alguno de sus tejidos. Requieren familiarizarse primero con la anatomía e histología normal del molusco. Si bien las infecciones iniciales suelen pasar desapercibidas, estas técnicas suelen dar muy buena información del estado general de los tejidos y de los daños asociados al parásito.

Procedimiento:

1.- Fijar tejido vivo (el molusco entero sin concha o una sección de éste) 2 –3 días en fijador Davidson:

Glicerina	100 ml
Formaldehido (35-40%)	200 ml
Etanol absoluto	300 ml
Agua de mar filtrada 1 μ m	100 ml
Añadir antes de usar:	
Ac. Acético glacial.....	100 ml

2.- Pasar y conservar hasta su procesamiento en etanol 70% v/v. Aprovechar este paso para tallar adecuadamente la muestra

3.- Procesar para su inclusión en parafina siguiendo protocolos estándares. Por ejemplo:

- 3.1.- 30 min etanol 70% v/v
- 3.2.- 1h etanol absoluto
- 3.3.- 2h etanol absoluto
- 3.4.- 3h etanol absoluto
- 3.5.- 3h xileno
- 3.6.- 3h xileno
- 3.7.- 4h xileno-parafina (9:1)
- 3.8.- 4h parafina 65°C
- 3.9.- 4h parafina 65°C
- 3.10.- Montar en molde adecuado

4.- Cortar con un microtomo secciones de 4 μm , recoger en portas y dejar secar al menos 24h en lugar limpio y seco

5.- Desparafinar, hidratar, teñir con hematoxilina-eosina, deshidratar y montar, utilizando procedimientos tradicionales. Por ejemplo:

- 5.1.- Tres baños de xileno de 10 min cada uno
- 5.2.- Tres baños de etanol absoluto 10 min cada uno
- 5.3.- Hidratar progresivamente con baños de 10 min en etanol 90% v/v, 70% v/v, 50% v/v y H₂O destilada (H₂O d)
- 5.4.- Teñir con Hematoxilina (de Ehrlich o de Mayer) 20 min
- 5.5.- Virar en agua del grifo 20 min
- 5.6.- H₂O destilada 10 min
- 5.7.- Teñir con eosina (o eosina -floxina) 2 min
- 5.8.- Etanol 90% v/v 10 min
- 5.9.- Deshidratar con tres baños de 10 min en etanol absoluto
- 5.10.- Tres baños de xileno de 10 min cada uno
- 5.11.- Montar en DPX u otra resina.
- 5.12.- Dejar secar y observar al microscopio óptico, intentando localizar las formas típicas del parásito (trofozoitos) en el tejido conectivo de los diferentes órganos. (ver figura 5)

2.- DETECCIÓN MEDIANTE CULTIVO DEL PARÁSITO

Esta técnica se basa en cultivar un trozo de tejido del molusco en un medio nutritivo al que se le añaden antibióticos para inhibir el crecimiento de hongos y bacterias . En estas condiciones, los trofozoitos de Perkinsus engordan pudiendo multiplicar su diámetro por veinte transformándose en preesporangios. Estos tienen la particularidad de presentar una cubierta positiva a la reacción con lugol. Tras 3-5 días de incubación el tejido es retirado del medio, colocado sobre un porta donde es teñido con lugol y observado con lupa esteroscópica (x10 -x40) y microscopio óptico (x40-x400). La sensibilidad del método depende de la cantidad y tipo de tejido seleccionado, generalmente branquia, manto, palpos labiales o, en el caso de la ostra americana (*Crassostrea virginica*), recto. Para evitar falsos positivos es fundamental:

- a) no usar guantes empolvados (en especial con almidón)
- b) trabajar en ambiente libre de polvo y familiarizarse con el polen de las plantas próximas al laboratorio y con los precipitados que en ocasiones se producen en el lugar.

Procedimiento:

- 1.- Diseñar las dos hemibranquias de un lateral de la almeja y añadirlas a un tubo que contenga **medio fluido de tioglicolato estéril (FTM)**: triptona 15 g/l, glucosa 5.5 g/l, extracto de levadura 5 g/l, NaCl 2.5 g/l, L-cisteína 0.5 g/l, tioglicolato sódico 0.5 g/l, agar bacteriológico 0.75 g/l y resazurina 0.001 g/l) suplementado con 20 g/l de NaCl y antibióticos (penicilina G 20 U.I./ml + sulfato de estreptomina 40g / ml o cloranfenicol 50 g/ml + nistatina 200 USP/ml).
- 2.- Incubar el tejido de 3 a 5 días en oscuridad a temperatura ambiente (mejor 27°C).
- 3.- Sacar el tejido con un asa estéril, extenderlo sobre un porta y teñirlo con lugol filtrado.
- 4.- Observar con lupa estereoscópica (x10 a x40) y microscopio óptico (x40 a x400) buscando formas esféricas azul-negro de 20-100 micras, generalmente distribuidas de forma contagiosa (en grupos separados). (ver figura 6)

3. DETECCIÓN MEDIANTE PCR

Esta técnica es la que hemos desarrollado a partir de nuestras investigaciones y está basada en la amplificación mediante PCR de una secuencia de ADN que es específica del parásito *Perkinsus atlanticus*. Este procedimiento permite detectar la presencia del parásito en almejas en las etapas iniciales de la infección y lo hace de una forma rápida y fiable. Para llevar a cabo el análisis, se extrae ADN a partir de una muestra significativa de un cultivo de almejas. En un microtubo se deposita una alícuota de dicho ADN junto con los primers diseñados por nosotros, desoxirribonucleótidos trifosfato y Taq polimerasa. Dicho microtubo se introduce en un termociclador para PCR. Tras cuatro horas, se demuestra si la reacción es positiva o negativa, mediante electroforesis en gel de agarosa del contenido del tubo. Tras teñir con bromuro de etidio el gel, el resultado positivo consiste en la visualización de una banda de ADN de 550 pares de bases de longitud, mientras que el resultado negativo consiste en la no visualización de ADN en el gel. Adicionalmente al tubo problema, en el proceso se utilizan tanto un control positivo (tubo que contiene ADN purificado de *Perkinsus atlanticus*) como un control negativo (sin ADN).

Procedimiento:

1. Se extrae ADN de una muestra significativa de almejas del cultivo.
2. Se disponen 500 nanogramos de ADN cada almeja en un microtubo Eppendorf de 200 microlitros de capacidad, que contiene:
 - A) 2.5 microlitros de una solución tampón apropiada
 - B) 1 microlitro de una solución tamponada de desoxirribonucleótidos trifosfato
 - C) 2 microlitros de cada uno de los primers diseñados por nosotros (PK1 y PK2)
 - D) 0.2 microlitros del enzima Taq polimerasa
 - E) 20 microlitros de agua destilada y esterilizada
3. Los tubos problema (con ADN de almeja) junto con los tubos control (positivo y negativo), se introducen en un termociclador de PCR para llevar a cabo la amplificación de la secuencia específica de *Perkinsus atlanticus*. La reacción de amplificación tiene lugar en un conjunto de 35 ciclos de tres pasos:

	Temperatura	Tiempo
Primer paso:	94°C	2 min
Segundo paso:	58°C	3 min
Tercer paso:	72°C	2 min

Los *primers* amplifican la región del IGS específica del genoma de *P. atlanticus* sólo y exclusivamente cuando se lleva a cabo la reacción de PCR con muestras de ADN de almejas que contienen este parásito o su ADN aislado. Es decir, en aquellas almejas que procedan de cultivos infectados, junto con su propio ADN, en la muestra obtendremos mezclado ADN del parásito. Así, al someter a amplificación por PCR con los *primers* PK1 y PK2 la muestra de ADN de almeja infectada, obtendremos un fragmento de ADN amplificado, específico de *Perkinsus*, cuya longitud es de 550 pb. A partir de muestras de ADN de almejas no infectadas no se obtendrá amplificado. Igualmente, se utilizará un control positivo (en lugar de ADN de almeja se utilizará ADN del propio *Perkinsus*) y un control negativo (no se pondrá ADN en el tubo de reacción).

4. Los resultados, se analizan mediante lectura visual en un gel de agarosa tras electroforesis del contenido de cada microtubo sometido a PCR. Resumiendo, los resultados posibles son:

- A. Resultado positivo (cultivo infectado): visualización de un fragmento de ADN amplificado de 550 pares de bases.
- B. Resultado negativo (cultivo libre de *P. atlanticus*): ausencia de amplificación, no se visualiza dicho fragmento de ADN en el gel.
- C. Por supuesto, el control positivo ofrece un resultado positivo y el negativo ofrece un resultado negativo.

El kit comercial patentado por nuestro grupo de investigación que aquí se describe contiene:

- 1) Solución tampón apropiada para llevar a cabo la reacción de amplificación
- 2) Solución tamponada de desoxirribonucleótidos trifosfato
- 3) Solución de *primer* PK1
- 4) Solución de *primer* PK2
- 5) Solución del enzima *Taq* polimerasa
- 6) Agua destilada y esterilizada
- 7) ADN purificado de *Perkinsus atlanticus*

4. DETECCIÓN DEL PARASITO MEDIANTE HIBRIDACIÓN *IN SITU* SOBRE CORTES HISTOLÓGICOS.

Esta técnica se basa en la localización del parásito sobre un corte histológico utilizando una sonda específica de ADN marcada con una sustancia (digoxigenina) que posteriormente es detectada mediante procedimientos inmunohistoquímicos.

Procedimiento:

Obtención de sonda marcada con DIG-dUTP: por PCR según "PCR DIG Probe Synthesis Kit" Roche ref.:1636090

Purificación de la sonda: según "High Pure PCR Product Purificación Kit" Roche ref.: 1732668. Conservar la sonda en alícuotas de 100 μ l de 50 ng/ μ l a -20°C .

Cortes histológicos:

Realizar tres secciones (4 μ) seriadas del tejido en cuestión y recoger las dos primeras en dos portaobjetos tratados con silano y la tercera en un porta normal. Utilizar las dos primeras para la reacción con y sin sonda (control ciego) y el tercer corte para una tinción histológica clásica con hematoxilina-eosina. Realizar secciones de una almeja muy infectada y de otra sana para usarlas como controles positivos y negativos de la sonda.

Desparafinado, hidratación y desproteinización:

- 1.- Calentar los portaobjetos con las secciones a 65°C 30 min
- 2.- Desparafinar en Xileno 3 x 10min
- 3.- Rehidratar en pasos de 10 min: 2 x etanol absoluto + 2 x etanol 90% v/v + 2 x etanol 70% v/v + 2 x H₂O d estéril
- 4.- Delimitar los cortes con PAN PEN (SIGMA Ref.:Z37,782-1) y volver a sumergir en H₂O d estéril 1h
- 5.- Mientras preparar las soluciones de prehibridación e hibridación para 20 preparaciones (10 positivos y sus controles ciegos sin sonda)

REACTIVO	SOL. PREHIBRIDACION 2 ml (100 l/muestra)	SOL. HIBRID. CON SONDA 600l (60l/muestra)	SOL.HIBRID. SIN SONDA (C.CIEGO) 600l (60l/muestra)
H ₂ O d estéril	50 µl.	15 µl.	15 µl.
Formamida desionizada	1000 µl.	300 µl.	300 µl.
ARNt Levadura 10mg/ml	100 µl.	30 µl.	30 µl.
Esp. Salmón 10 mg/ml	50 µl.	15 µl.	15 µl.
Calentar 10 min a 100°C pasar a hielo y mantener a 0 °C , Mezclar y mantener en frío con:			
20xSSC	400 µl.	120 µl.	120 µl.
50xDenhard Solución	200 µl.	60 µl.	60 µl.
Sonda-DIG 50 ng/µl. ó H ₂ O d	200 µl. H ₂ O d estéril	60 µl. Sonda-DIG	60 µl. H ₂ O d estéril

- 6.- 2 baños de 5 min en tampón PBS 7,4 (137 mM NaCl, 2,8 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄ , 1,8 mM KH₂ PO₄ , pH 7,4)
- 7.- 1 baño a 37°C en Proteinasa K 50 µg/ml en PBS pH 7,4. Este paso es crucial, la duración depende del tipo de molusco y/o tejido y del tiempo que la muestra ha permanecido en fijador. Ajustar empíricamente. Para la almeja fina utilizar 25 min

- 8.- Cortar la reacción en Glicina 0.2% en PBS pH 7,4, temperatura ambiente 5 min
- 9.- 2 baños de 5 min en 2xSSC a temperatura ambiente (20xSSC: 0,3 M $C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$, 3 M NaCl)

Hibridación:

- 10.-Ecurrir y sin dejar secar añadir sobre cada sección 100 μ l de solución de prehibridación y colocar un cubreobjeto de plástico (acetato) desengrasado y seco.
- 11.-En la cámara de hibridación (con papel de filtro empapado con 4xSSC y formamida al 50%) incubar 1 hora a 42°C .
- 12.-Empezando por todos los controles ciegos, levantar el cubreobjeto y, sin dejar secar, añadir 60 μ l de sol. de hibridación a cada corte colocando de nuevo el cubreobjeto.
- 13.-Calentar los portaobjetos sobre placa caliente a 90°-95°C 15 min
- 14.-Enfriarlos 1 min sobre hielo (placa fría)
- 15.-Pasar a cámara de hibridación (con papel saturado con 4xSSC y 50% de formamida) 1 noche en baño a 42°C y agitación muy suave.

Lavado y detección inmunológica:

Las muestras ciegas se lavan en frascos distintos a los de las secciones hibridadas con la sonda. Una vez terminados los lavados pueden volverse a agrupar en un mismo frasco.

- 16.- Sacar las preparaciones de la cámara, quitarles cuidadosamente los cubreobjetos y lavarlas en:

2xSSC 2 veces 5 min a temperatura ambiente
 1xSSC 2 veces 5 min a temperatura ambiente
 0.5xSSC 2 veces 10 min a 42°C

- 17.- 2 baños de 5 min en tampón 1 (100mM Tris-HCl, 150mM NaCl; pH 7,5)
- 18.- 1 baño de 60 min en solución bloqueante.

Solución bloqueante: diluir 50 veces la solución madre de agente bloqueante (Roche ref: 1096176) en tampón 1 con Tritón X-100 al 0.3%.

Solución madre de agente bloqueante: 10 % p/v agente bloqueante (Roche ref 1096 176) en tampón de ácido málico 100mM y NaCl 150 mM pH7.5. Autoclavar y congelar a -20°C.

19.- Mientras preparar la solución de anticuerpo (para 20 portas: 4000 μ l; 200 μ l/porta):

Tampón 1	3840 μ l
Tritón X-100 al 10%	120 μ l
Sol. Madre de agente bloqueante	40 μ l
Anti-Digoxigenina conjugada con fosfatasa alcalina (fragmentos Fab)(Roche ref.: 1093274) 0.75 u / μ l	16 μ l

20.- 200 μ l de sol. de anticuerpo/portaobjeto en cámaras Cover-Well (Sigma Z35,947-5). 3 horas mínimo a temperatura ambiente.

REVELADO

21.- Quitar las cámaras y lavar las preparaciones en tampón 1, 2 baños de 5 min

22.- 2 baños de 5 min en tampón 2 (100 mM Tris, 50 mM MgCl₂, 100mM NaCl, pH 9.5)

23.- Incubar 3 h en vertical , oscuridad y sin agitar en solución color:

Tampón 2.....	78.2 ml
Sol NBT/BCIP (Roche ref: 1681451).....	1.6 ml
Levamisole 24 mg/ml.....	80 μ l

24.- Lavar con H₂O d estéril 5min (2 veces)

25.- Teñir con **Birsmarck Brown Y** (0.5 % p/v en H₂O) durante 1 min

26.- H₂O d estéril 3 baños de 1 min

27.- Montar en **Shandom Aqueous Mounting Media**.

28.- Dejar secar al menos una noche antes de observar. Las células positivas a la hibridación son fácilmente localizables por el precipitado azul-pardo.

AGRICULTURA

GANADERÍA

PESCA Y ACUICULTURA

POLÍTICA, ECONOMÍA Y SOCIOLOGÍA AGRARIAS

FORMACIÓN AGRARIA

CONGRESOS Y JORNADAS

R.A.E.A.



JUNTA DE ANDALUCÍA

Consejería de Agricultura y Pesca