

Desarrollo de un PCR para la Identificación del Parásito *Dawestrema* (Trematoda: Monogenea) en el Pez *Arapaima gigas*

DEVELOPMENT OF A PCR ASSAY FOR THE IDENTIFICATION OF THE PARASITE *DAWESTREMA* (TREMATODA: MONOGENEA) IN *ARAPAIMA GIGAS* FISH

Enrique Serrano-Martínez^{1,3}, Manuel Tantaleán V.¹, Marco Quispe H.¹, Gina Casas V.¹, Pablo Londoño B.^{2,4}

RESUMEN

Estudios realizados en la especie amazónica *Arapaima gigas* («paiche») han demostrado la presencia del parásito monogeneo *Dawestrema cycloancistrum* en altas cargas parasitarias, principalmente en los estadios comprendidos entre los 180 y 365 días de edad. *D. cycloancistrum* se adhiere principalmente a las branquias, ocasionando una disminución del grado de oxigenación y estrés en el pez, predisponiéndolo a la presentación de enfermedades. El presente estudio tuvo por objetivo desarrollar una técnica de diagnóstico molecular frente a *D. cycloancistrum* para su aplicación como medida de control en el manejo de la biodiversidad del paiche. Se recolectaron 200 especímenes de *D. cycloancistrum*, realizándose la extracción de ADN, cuantificación, diseño de cebadores y elaboración del PCR. Se logró la amplificación de la secuencia 236 pb del monogeneo *Dawestrema*.

Palabras clave: PCR, biología molecular, paiche, parásitos, *D. cycloancistrum*, sanidad acuícola, biodiversidad

ABSTRACT

Studies in the Amazonian species *Arapaima gigas* («paiche») have demonstrated the presence of *Dawestrema cycloancistrum* monogenean parasite in high parasite loads, mainly in stages between 180 and 365 days of age. *D. cycloancistrum* adheres to

¹ Grupo SALUVET-UPCH, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima, Perú

² Instituto Tecnológico de la Producción, Lima, Perú

³ E-mail: enrique.serrano@upch.pe

⁴ E-mail: plondone@itp.gob.pe

Recibido: 2 de mayo de 2015

Aceptado para publicación: 29 de enero de 2016

the gills causing a decrease in the degree of oxygenation and stress on the fish predisposing to disease presentation. This study aimed to develop a molecular diagnostic technique for *D. cycloancistrum* in order to apply it in the management of the fish biodiversity. For this purpose, 200 specimens of *D. cycloancistrum* were collected, DNA was extracted and quantified, primers were designed and a PCR was developed. The amplification of a sequence of 236 bp of the *Dawestrema* monogenean was obtained.

Key words: PCR, molecular biology, paiche, parasites, *D. cycloancistrum*, aquatic health, biodiversity

INTRODUCCIÓN

El paiche «*Arapaima gigas*» es una especie de gran importancia para el poblador amazónico, por ser fuente de alimentación y generador de ingresos a través de la comercialización de sus productos. Sin embargo, años atrás, esta condición propició una intensa captura en su medio natural, causando una disminución de las poblaciones naturales, reflejado en menores desembarques en las últimas dos décadas (de 700 a 144 TM) (Alcántara *et al.*, 2006). Esta especie está considerada en peligro de extinción y se encuentra incluida en el Apéndice II de la Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres (CITES). Debido a ello, los gobiernos regionales de la amazonía peruana promueven la investigación en esta especie, a fin de contribuir a mejorar las condiciones de vida de las poblaciones humanas y generar fuentes de trabajo sin mermar el hábitat ni el tamaño poblacional del paiche.

Las medidas de protección y de incentivo a su crianza deben ser complementadas con estudios sanitarios que determinen la presencia de agentes patógenos en esta especie, así como la prevención y control de enfermedades. Por ello, el grupo de investigación SALUVET-UPCH de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, mediante el apoyo del Programa de Ciencia y Tecnología (FINCyT), optó por determinar la presencia de agentes patógenos en paiches cria-

dos en cautiverio que podrían estar afectando su productividad. En estos estudios se encontró la presencia del parásito tremátodo monogeneo *Dawestrema cycloancistrum* en todos los especímenes muestreados (n=30), cuyas edades se encontraban entre los 180 y 365 días (estadio juvenil, principalmente) (E. Serrano-Martínez, Lima, comunicación personal).

D. cycloancistrum se localiza en piel y branquias y ha sido reportado en estadios juveniles de paiches criados en cautiverio (Kritsky *et al.*, 1985; Mathews y Chu, 2007, Araújo *et al.*, 2009), hasta en un 100% de los especímenes estudiados. Al respecto, un estudio asoció su alta carga a la ocurrencia de mortalidad en paiches juveniles, dado que el parásito se adhiere principalmente a las branquias, disminuyendo el grado de oxigenación del hospedero, ocasionando situaciones de estrés con la predisposición a la presentación de enfermedades e incremento de la mortalidad (Buchmann *et al.*, 1994).

La identificación de los monogeneos requiere recuperarlos de las branquias de los peces y evaluar la morfología del parásito, especialmente el tamaño de las estructuras quitinosas del opistohaptor y del complejo genital masculino (Kritsky *et al.*, 1985, Smith *et al.*, 1992). El examen parasitológico es considerado como la prueba «Gold Standard», pero requiere del sacrificio de los peces y de la experiencia de un profesional bien entrenado. Se dispone de pruebas serológicas a base de ELISA que identifican anticuerpos IgM específicos para *Cichlidogyrus* sp

(Sandoval-Gío *et al.*, 2008), monogéneo que infesta a la tilapia (*Oreochromis niloticus*), pero requiere de altos títulos de anticuerpos. y por otro lado no es muy sensible ni específico. En la actualidad, se viene empleando la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, *Polymerase Chain Reaction*), la cual emplea muy poco material parasitario para poder realizar el diagnóstico (Harris *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2005; Collins *et al.*, 2010; Freema y Shinn, 2011; Verma *et al.*, 2012).

Ante esto, el objetivo del presente estudio fue desarrollar una técnica de diagnóstico molecular frente a *D. cycloancistrum*, para su aplicación como medida de control en el manejo de la biodiversidad del paiche.

MATERIALES Y MÉTODOS

Lugar de Estudio y Peces

La fase de campo fue realizada en un centro de cultivo de paiches, localizado en la carretera Iquitos-Nauta, provincia de Maynas, región Loreto. Las muestras obtenidas fueron remitidas al Laboratorio de Parasitología Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FAVEZ) de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (UPCH), en Lima, Perú.

Se trabajó con 10 paiches menores de 180 días de edad y positivos a la presencia de *D. cycloancistrum* mediante el examen directo por raspado de las branquias de paiches. Los peces eran parte de un centro de cultivo y estaban destinados al beneficio para consumo humano

Obtención de Parásitos

Se recolectaron especímenes de *D. cycloancistrum* mediante raspado de las branquias en 10 paiches del centro de cultivo y que estaban destinados al beneficio para

consumo humano. Se recolectaron 200 especímenes que fueron colocados en crioviales de 1.5 ml con cierre hermético conteniendo buffer de lisis (200 ml de buffer ATL del kit DNeasy Tissue®, Qiagen). Los crioviales fueron mantenidos a temperatura ambiente hasta su traslado a los laboratorios de FAVEZ-UPCH.

Del mismo modo, se colocaron 10 especímenes de *D. cycloancistrum* en una luna de reloj conteniendo 1 ml de suero fisiológico estéril. Se dejó reposar por una hora con la finalidad de obtener antígeno de secreción-excreción, el cual fue almacenado en crioviales a -20 °C.

Desarrollo de la Técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Extracción de ADN

El ADN de las muestras se extrajo empleando el DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen), que usa una tecnología avanzada que comprende una membrana de gel de sílice para una rápida y eficiente purificación del ADN celular total sin extracción orgánica o precipitación de etanol. La extracción de ADN se llevó a cabo realizando modificaciones al protocolo del fabricante, empleando 5 min de incubación y 50 µl del buffer AE en dos ocasiones para lograr una mayor concentración de ADN parasitario.

Cuantificación de ADN

El ADN fue cuantificado mediante el uso del equipo Nanodrop 2000. Además, se sembró en geles de agarosa al 1% en buffer TBE 0.5X, con las siguientes condiciones: 150 V, 100 W, 9 A y 45 min. En la corrida se colocó 5 µl de un marcador de peso molecular de 100 pb en un pozo, un control negativo (Agua DEPC [Dietilpirocarbonato]) y un control positivo (ADN de tejido de paiche); estos últimos tres en un volumen de 8 µl. Asimismo, se colocó 8 µl de cada muestra y se les adicionó 2 µl de buffer de corrida.

Cuadro 1. Componentes para elaborar los master mix en ocho ensayos (E) para evaluar los cuatro cebadores en estudio

Componente	Conc. final	E1 (μ l)	E2 (μ l)	E3 (μ l)	E4 (μ l)	E5 (μ l)	E6 (μ l)	E7 (μ l)	E8 (μ l)
Kit ¹	1X	10	10	10	10	10	10	10	10
Buffer (con dNTPs)									
Cebadores F ²	10 μ M	25	3	3	3.5	3.5	3	3	2.5
Cebadores R ³	10 μ M	25	3	3	3.5	3.5	3	3	2.5
MgSO ₄	1.5 mM	0	1	1	1	1	2	2	0
Solución Q		10	0	10	0	10	0	10	0
Kit DNA	2.5 U/ μ l	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4
Polymerase									
Agua libre de ARNasa		19.6	27.6	17.6	26.6	16.6	26.6	16.6	29.6

¹ HotStar HiFidelity PCR kit (Qiagen, Alemania)

² DAW182F/ DAW183F/ DAW184F

³ DAW182R/ DAW183R/ DAW184R

Diseño de cebadores del gen ribosomal 18S de Dawestrema cycloancistrum

Se ubicaron las secuencias presentes en el GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) del gen ribosomal 18S de los monogéneos de la familia Ancyrocephalidae, y se les llevó al formato FASTA, donde se alinearon por intermedio del programa Clustalw2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>).

Una vez obtenida la secuencia consenso se procedió a diseñar los cebadores con la ayuda del programa Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/>). Los cebadores diseñados fueron:

- DAW182F: CAGTCTCCGGGAAACCTGTA
- DAW182R: CAGACAGCTCGTACCACGAA
- DAW183F: CCGTTTGTTGCCTGAAGATT
- DAW183R: GGCAGATGCTTTCGCTTTAG
- DAW184F: CCGTTTGTTGCCTGAAGATT
- DAW184R: GCAGATGCTTTCGCTTTAG

Elaboración del PCR para la detección de Dawestrema y visualización del producto aislado

Se diseñaron ensayos con diferentes concentraciones de los cebadores sintetizados anteriormente, MgSO₄ y solución Q. Se utilizó el «HotStar HiFidelity Polymerase Kit» (Qiagen, Alemania), procediéndose según las indicaciones del fabricante. La disposición de los componentes del master mix para ocho análisis diseñados para cada par de cebadores se presenta en el Cuadro 1, en tanto que las condiciones del PCR se presentan en el Cuadro 2.

Corrida electroforética del producto de PCR

Los productos de PCR fueron corridos en gel de agarosa al 1.0%, con buffer TBE 0.5X a 150 V, 100 A, 150 W y por 45 min. En los pocillos, el marcador de peso molecular

Cuadro 2. Condiciones del PCR para cada grupo de cebadores en estudio

Actividad	Tiempo (min)	Temperatura (°C)		
		DAW182F / DAW182R	DAW183F / DAW183R	DAW184F / DAW184R
Activación de la transcriptasa reversa	30	50	50	50
Activación inicial de la PCR	15	95	95	95
Denaturación	0.5	94	94	94
Alineamiento	0.5	62	58	60
Extensión	1	72	72	72
Número de ciclos		45	45	45
Extensión final	10	72	72	72

de 100 pb se colocó en un volumen de 5 µl y las muestras fueron de 8 µl más 2 µl de buffer de corrida. Al preparar cada gel, se adicionó 0.5 µl de bromuro de etidio por cada 100 µl de agarosa TBE 0.5X. Al finalizar la corrida electroforética los productos de PCR fueron visualizados mediante el sistema de captura de imágenes GelCapture que está integrado al equipo Bio-Imaging Systems MiniBis Pro.

RESULTADOS

Las corridas electroforéticas de los productos de PCR de los cebadores DAW183F/DAW183R y DAW184F/DAW184R no amplificaron productos. Asimismo, las corridas de los productos de PCR de los cebadores DAW182F/DAW182R con temperatura de alineamiento de 60 °C tampoco amplificaron productos, mientras que con la temperatura de alineamiento a 62 °C se logra amplificar un producto de PCR de 236 pb (Figura 1).

Las seis bandas del gel de la Figura 1 se guardaron a -20 °C para su posterior purificación con el QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen), siguiendo las especificaciones del

fabricante y serán remitidas para su secuenciamiento.

Todos los resultados de la PCR positivos de las muestras de raspado de las agallas fueron confirmados por la presencia del parásito en la necropsia.

DISCUSIÓN

El hallazgo del parásito monogeneo *Dawestrema cycloancistrum* en todos los especímenes juveniles muestreados de paiche reiteran los resultados hallados por este grupo de investigación (Serrano-Martínez *et al.*, 2015) y que concuerdan con estudios previos (Cotrina y Rebaza, 2008; Dos Santos *et al.*, 2008; Araújo *et al.*, 2009).

La presencia de monogeneos ha sido un problema recurrente para las granjas de crianza de peces de cultivo como la tilapia (Sandoval-Gío *et al.*, 2008), trucha (Rubio-Godoy *et al.*, 2003; Rubio-Godoy y Tinsley, 2004) y paiche (Cotrina y Rebaza, 2008; Dos Santos *et al.*, 2008; Araújo *et al.*, 2009). El control de *Dawestrema* sp se basa en sus-

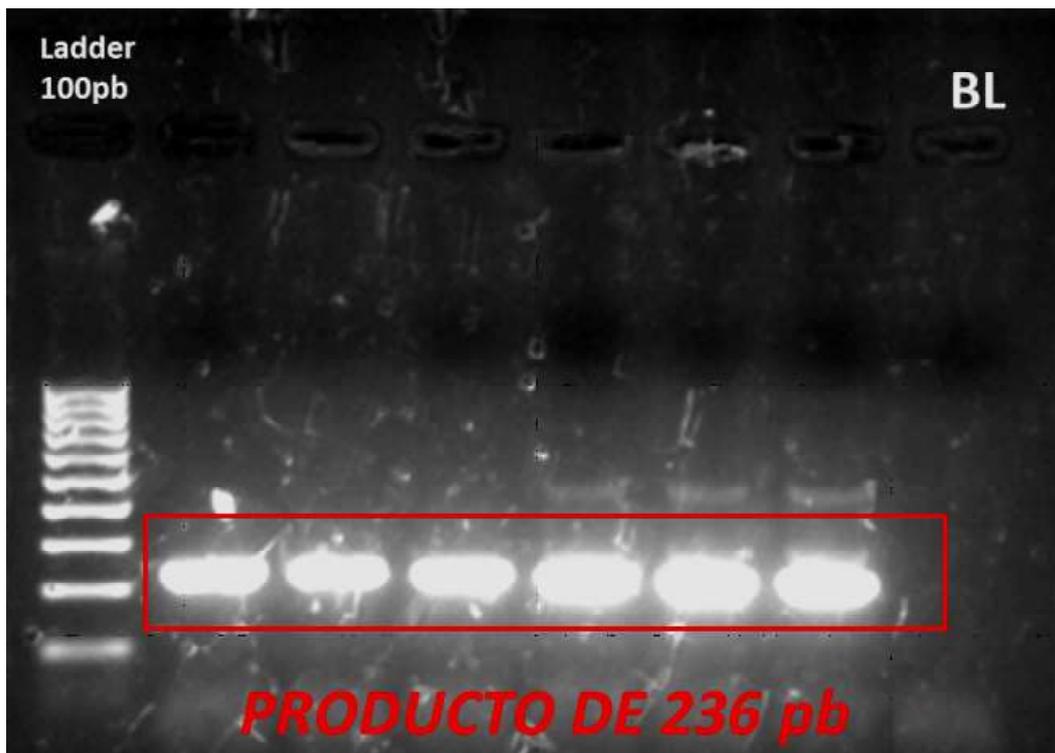


Figura 1. Producto de amplificación de 236 pb obtenido al utilizar el par de cebadores DAW182F/DAW182R. Los pocillos 1, 2 y 3 representan el análisis de tres muestras de monogéneo entero en donde se empleó el análisis 8; el pocillo 4 representa el análisis 2, el pocillo 5 representa el análisis 4 y el pocillo 6 representa el análisis 6. En las bandas de los pocillos 4 a 6 se puede observar fragmentos de amplificación inespecífico, debido al aumento en la concentración de la sal y los cebadores. Por dicha razón el análisis 8 es el más indicado para amplificar de una manera óptima una secuencia de 236 pb de *Dawestrema* sp.

tancias químicas que son ineficientes y los métodos actuales para la detección de este parásito requieren el sacrificio del pez. En este estudio, se ha estandarizado una prueba de PCR que permite detectar ADN aislado directamente de *D. cycloancistrum* de las branquias del paiche. La PCR implementada en el presente documento mostró que el par DAW182F/DAW182R amplificó una región de 236 pb.

Una de las principales ventajas de esta prueba es que permite detectar bajos niveles de infestación de parásitos; es decir, una infestación temprana, sin tener que sacrificar

al pez. Asimismo, no se presentaron falsos positivos ni falsos negativos con la prueba del PCR. El utilizar un gen altamente conservado, gen ribosomal 18S en la PCR, tiene la ventaja que podría ser utilizado en paiches, tanto criado en condiciones naturales como de cultivo, donde las dos especies de *Dawestrema* están siempre presentes y son morfológicamente muy parecidas.

Dada la alta tasa de infestación por *D. cycloancistrum*, el desarrollo de la técnica molecular para su diagnóstico con uso de una secuencia específica del gen 18S ADN_r de *Dawestrema* sp, obtenido en el presente es-

tudio por primera vez en el país, será de gran importancia para el diagnóstico por PCR de este parásito.

CONCLUSIONES

Se logró desarrollar una técnica de diagnóstico molecular (PCR) frente a *D. cycloancistrum* para su posterior aplicación como medida de control en el manejo de la biodiversidad del paiche.

Agradecimientos

Agradecemos al Sr. Wenseslao Solsol, paichicultor de la provincia de Maynas, del departamento de Loreto, Perú, por su apoyo en el presente estudio, y a la Dirección Regional de la Producción de Loreto, por su apoyo en los trabajos de campo. A la doctora Manuela Verástegui, de los Laboratorios de Investigación y Desarrollo (LID), Facultad de Ciencias de la Universidad Peruana Cayetano Heredia por su apoyo con el equipo Nanodrop 2000.

El trabajo fue realizado con el financiamiento del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología – CONCYTEC, mediante contrato N° 314-2011-CONCYTEC-OAJ.

LITERATURA CITADA

1. **Alcántara B, Wust W, Tello M, Rebaza M, Del Castillo D. 2006.** Paiche el gigante del Amazonas. Loreto: Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana. 69 p.
2. **Araújo CSO, Gomes AL, Tavares-Días M, Andrade SMS, Belem-Costa A, Borges JT, et al. 2009.** Parasitic infections in pirarucu fry, *Arapaima gigas* Schinz, 1822 (Arapaimatidae) kept in a semi-intensive fish farm in Central Amazon, Brazil. Veterinarski Archiv 79: 499-507.
3. **Buchmann K, Uldal A, Møllergaard S. 1994.** Mortality of captive *Arapaima gigas* (Osteoglossidae) heavily infected with the gill monogenean *Dawestrema cycloancistrum*. Bull Eur Ass Fish Pathol 14(5): 171-173.
4. **Collins C, Kerr R, McIntosh R, Snow M. 2010.** Development of a real-time PCR assay for the identification of *Gyrodactylus* parasites infecting salmonids in northern Europe. Dis Aquat Organ 90: 135-142. doi: 10.3354/dao02201
5. **Cotrina M, Rebaza C. 2008.** Caracterización de la fauna parasitaria en juveniles de paiche «*Arapaima gigas*» criados en cautiverio. En: Memoria Institucional 2008. Programa de Investigación en Ecosistemas Acuáticos del IIAP. Perú.
6. **Dos Santos S, Ceccarelli P, Luque J. 2008.** Helmintos parasitos do pirarucu, *Arapaima gigas* (Schinz, 1822) (Osteoglossiformes: Arapaimidae), no Rio Araguaia, Estado de Mato Grosso, Brasil. Rev Bras Parasitol Vet 17: 171-173. doi; 10.1590/S1984-29612008-000300012
7. **Freeman M, Shinn A. 2011.** Myxosporean hyperparasites of gill monogeneans are basal to the Multivalvulida. Parasit Vectors 4: 220. doi: 10.1186/1756-3305-4-220
8. **Harris D, Cable J, Tinsley R, Lazarus C. 1999.** Combined ribosomal DNA and morphological analysis of individual Gyrodactylid monogeneans. J Parasitol 85: 188-191.
9. **Kritsky DC, Boeger WA, Thatcher VE. 1985.** Neotropical monogenea. Parasites of the pirarucu, *Arapaima gigas* (Cuvier), with descriptions of two new species and redescriptions of *Dawestrema cycloancistrum* Prince and Nowlin, 1967 (Dactylogyridae: Ancyrocephalinae). Proc Biol Soc Wash 98: 321-331.
10. **Li A, Wu X, Ding X, Lin R, Xie M, Lun Z, Zhu X. 2005.** PCR-SSCP as a molecular tool for the identification of

- Benedeniinae (Monogenea: Capsalidae) from marine fish. *Mol Cell Probes* 19: 35-39.
11. **Mathews P, Chu F. 2007.** Parásitos asociados a alevinos de paiche *Arapaima gigas* en el C.I. de Quistococha. En: Memoria Institucional 2007. Programa de Investigación en Ecosistemas Acuáticos del IIAP. Perú.
 12. **Rubio-Godoy M, Sigh J, Buchmann K, Tinsley R. 2003.** Antibodies against *Discocotyle sagittata* (Monogenea) in farmed trout. *Dis Aquat Org* 56: 181-184. doi: 10.3354/dao056181
 13. **Rubio-Godoy M, Tinsley R. 2004.** Comparative susceptibility of brown trout and rainbow trout to *Discocotyle sagittata* (Monogenea). *J Parasitol* 90: 900-901.
 14. **Sandoval-Gío JJ, Rodríguez-Canul R, Vidal-Martínez VM. 2008.** Humoral antibody response of the tilapia *Oreochromis niloticus* against *Cichlidogyrus* spp. *J Parasitol* 94: 404-409. doi: 10.1645/GE-1382.1
 15. **Serrano-Martínez E, Tantaleán M, Leguía G, Quispe M, Casas G. 2015.** Parásitos em *Arapaima gigas* de la Amazonía Peruana según grupo etario. *Rev Inv Vet Peru* 26: 303-309. doi: 10.15381/rivep.v26i2.11014
 16. **Smith S, Levy M, Noga E. 1992.** Development of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibody to the parasitic dinoflagellate *Amyloodinium ocellatum* in *Oreochromis aureus*. *Vet Parasitol* 42: 145-155.
 17. **Verma C, Chaudhary A, Singh H. 2012.** PCR-based molecular characterization, phylogenetic analysis and secondary structure of the 28S rDNA of *Thaparocleidus wallagonius* (Monogenea: Dactylogyridae) – the most primitive species of this genus from India. *Bioinformation* 8: 816-819. doi: 10.6026/97320630008816