



Facultad de  
OCEANOGRAFÍA, PESQUERÍA,  
CIENCIAS ALIMENTARIAS Y ACUICULTURA

**IMPLEMENTACIÓN DEL MÉTODO DE DETECCIÓN DE  
ADENOVIRUS EN MOLUSCOS BIVALVOS MEDIANTE LA  
TÉCNICA DE REACCIÓN EN CADENA DE LA  
POLIMERASA (PCR)**

Tesis para optar el Título Profesional de Ingeniero Alimentario

**AUTOR (A)**

Rodríguez Lázaro, Eder Luis Leandro

**ASESOR (A)**

Minaya Agüero, Carmen Del Pilar

**JURADO**

Terry Calderón, Víctor  
Aldave Palacios, Gladis  
Blas Ramos, Walter  
Marín Machuca, Olegario

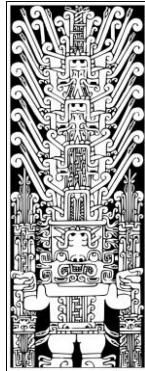
Lima - Perú  
2017

UNIVERSIDAD NACIONAL FEDERICO VILLARREAL

FACULTAD DE OCEANOGRAFÍA, PESQUERÍA, CIENCIAS ALIMENTARIAS Y

ACUICULTURA

ESCUELA DE INGENIERÍA ALIMENTARIA



IMPLEMENTACIÓN DEL MÉTODO DE DETECCIÓN DE ADENOVIRUS EN  
MOLUSCOS BIVALVOS MEDIANTE LA TÉCNICA DE REACCIÓN EN CADENA DE  
LA POLIMERASA (PCR)

TESIS

Para optar al Título Profesional de

INGENIERO ALIMENTARIO

Presentada por

EDER LUIS LEANDRO RODRÍGUEZ LÁZARO

LIMA, PERÚ

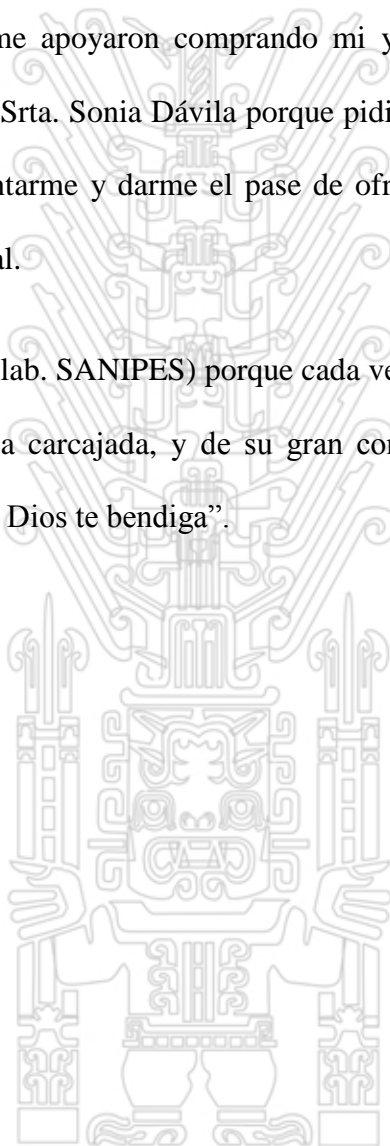
2017

## Dedicatoria

A mi familia, A mis padres porque son mi principal razón y motivación, a mis hermanas Verónica y Lourdes, para ser un ejemplo a seguir.

A mis caseros del barrio que me apoyaron comprando mi yogurt frutado, también a mis caseros del ITP, en especial a la Srta. Sonia Dávila porque pidió la atención de las más de 10 personas de su área, para presentarme y darme el pase de ofrecer mi producto, y a la Srta. Dorita por su apoyo incondicional.

A mi amigo Pablo (seguridad de lab. SANIPES) porque cada vez que me veía preocupado por el largo pasadizo me sacaba una carcajada, y de su gran consejo “deja los problemas del trabajo a Dios”, seguido de “Que Dios te bendiga”.



## Agradecimientos

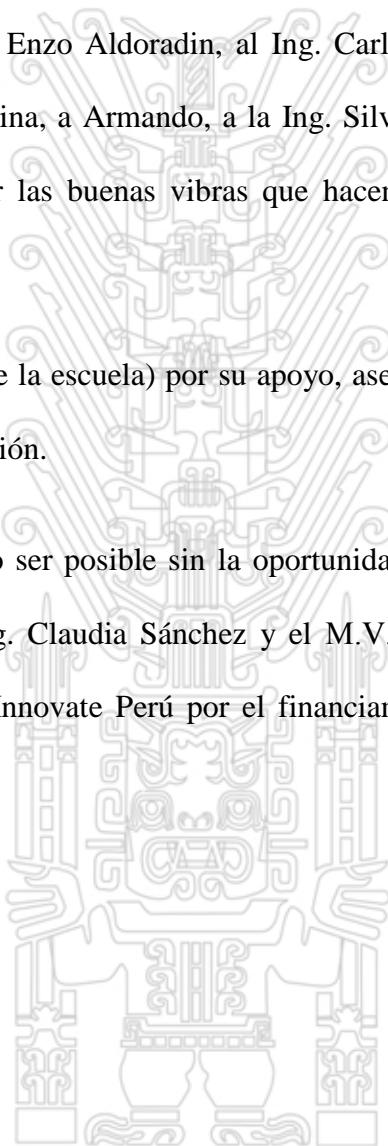
A Dios, a mi santo “Señor de los milagros”, que de vez en cuando me voy a visitarlo a las Nazarenas.

A la gente de Lab. SANIPES, A José Carlos “Pepe”, a Jerson, a Sonia, a la Sra. Susana.

A la gente de Lab. ITP, al Ing. Enzo Aldoradin, al Ing. Carlos Pariona, al Ing. Aleman, a Micky, a Julito, a Dandy, a Yanina, a Armando, a la Ing. Silvia, a Don Sabino, a Magna, a Luchito, a Vanesa, a Katia, por las buenas vibras que hacen del laboratorio un ambiente agradable.

A la Ing. Pilar Minaya (asesor de la escuela) por su apoyo, asesoramiento y consejos; al Ing. Fausto Terrazos por su colaboración.

Y toda esta experiencia no pudo ser posible sin la oportunidad brindada por el M.V. Pablo Londoño (asesor en ITP), la Ing. Claudia Sánchez y el M.V. “Kike” García por su apoyo constante; así como también a Innovate Perú por el financiamiento dado para realizar esta tesis.



## CONTENIDO

<b>DEDICATORIA</b> .....	<b>i</b>
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	<b>ii</b>
<b>CONTENIDO</b> .....	<b>iii</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>xii</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>xiii</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>CAPITULO I</b> .....	<b>3</b>
<b>PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACION</b> .....	<b>3</b>
1.1    Planteamiento del problema.....	3
1.1.1    Problema principal.....	4
1.1.2    Problemas secundarios.....	4
1.2    Objetivos de la investigación.....	4
1.2.1    Objetivo principal.....	4
1.2.2    Objetivos secundarios.....	4
1.3    Formulación de hipótesis.....	4
1.3.1    Hipótesis principal.....	4
1.4    Importancia.....	5
<b>CAPITULO II</b> .....	<b>6</b>
<b>FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA</b> .....	<b>6</b>
1.5    Antecedentes teóricos.....	6
1.6    Marco teórico.....	9

1.6.1	Concha de Abanico ( <i>Argopecten purpuratus</i> ) .....	9
1.6.1.1	Clasificación taxonómica .....	9
1.6.1.2	Aspectos biológicos de la especie .....	10
1.6.1.2.1	Características morfológicas .....	10
1.6.1.2.2	Sistema digestivo.....	11
1.6.1.2.3	Reproducción .....	11
1.6.1.2.4	Alimentación .....	13
1.6.1.2.5	Hábitat.....	13
1.6.1.2.6	Relaciones ecológicas.....	13
1.6.1.2.7	Presencia de predadores.....	13
1.6.1.2.8	Distribución geográfica .....	14
1.6.1.3	Cultivo de la especie.....	14
1.6.1.3.1	Condiciones ambientales .....	14
1.6.1.3.2	Sistema de cultivo .....	15
1.6.1.3.3	Etapas de producción del cultivo de conchas de abanico.....	18
1.6.1.3.4	Problemática del cultivo.....	19
1.6.1.4	Situación actual de la producción de concha de abanico en el Perú .....	22
1.6.1.4.1	Producción nacional.....	22
1.6.1.4.2	Producción mundial .....	22
1.6.2	Almeja ( <i>Gari sólida</i> ) .....	23
1.6.2.1	Clasificación taxonómica .....	23
1.6.2.2	Aspectos biológicos de la especie .....	24
1.6.2.2.1	Características morfológicas .....	24
1.6.2.2.2	Reproducción .....	25

1.6.2.2.3	Alimentación .....	25
1.6.2.2.4	Crecimiento .....	26
1.6.2.2.5	Hábitat.....	26
1.6.2.2.6	Relaciones ecológicas.....	26
1.6.2.2.7	Distribución geográfica .....	26
1.6.2.2.8	Producción mundial .....	27
1.6.3	Navajuela ( <i>Tagelus dombeii</i> ) .....	27
1.6.3.1	Clasificación taxonómica .....	27
1.6.3.2	Aspectos biológicos de la especie .....	28
1.6.3.2.1	Características morfológicas .....	28
1.6.3.2.2	Reproducción .....	28
1.6.3.2.3	Alimentación .....	29
1.6.3.2.4	Hábitat.....	29
1.6.3.2.5	Distribución geográfica .....	29
1.7	Adenovirus (Adv).....	30
1.7.1	Morfología y estructura.....	30
1.7.2	Taxonomía y clasificación .....	31
1.7.3	Replicación viral .....	32
1.7.3.1	Unión a la célula .....	32
1.7.3.2	Internalización .....	32
1.7.3.3	Penetración .....	32
1.7.3.4	Migración.....	33
1.7.3.5	Replicación .....	33
1.7.4	Epidemiología .....	34

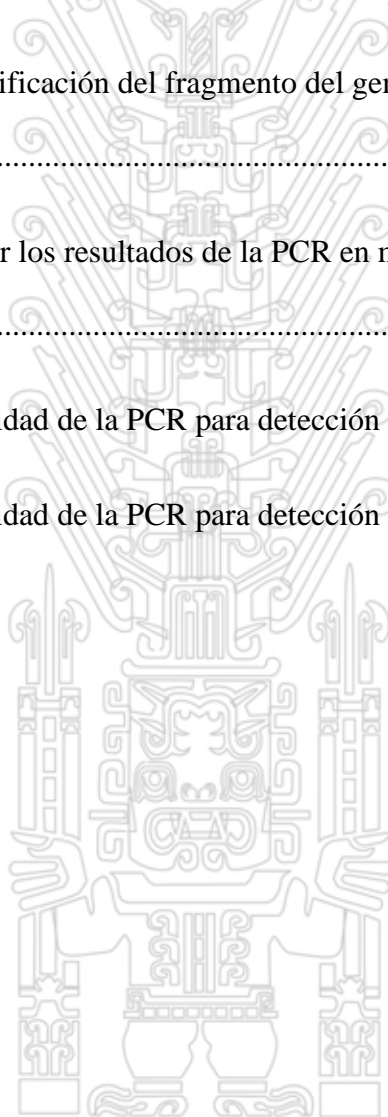
1.7.5	Morbilidad y mortalidad.....	35
1.7.6	Dinámica viral en el medio ambiente.....	35
1.7.7	Efectos de las condiciones medioambientales sobre el adenovirus .....	37
1.8	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	37
1.8.1	Fundamento.....	37
1.8.2	Características de la PCR.....	38
1.8.2.1	Sensibilidad.....	38
1.8.2.2	Especificidad.....	38
1.8.3	Componentes de la PCR.....	39
1.8.3.1	Desnaturalización.....	39
1.8.3.2	Alineamiento.....	39
1.8.3.3	Extensión.....	39
1.8.4	Tipos de PCR.....	40
1.8.4.1	PCR anidada.....	40
1.8.4.2	PCR múltiple.....	40
1.8.4.3	PCR con transcriptasa inversa (RT-PCR).....	41
1.8.4.4	PCR en tiempo real (qPCR).....	41
1.9	Espectrofotometría de ácidos nucleicos.....	42
1.10	Electroforesis de ácidos nucleicos.....	43
<b>CAPITULO III.....</b>		<b>44</b>
<b>METODOLOGÍA DE TRABAJO.....</b>		<b>44</b>
1.11	Materiales, equipos y reactivos.....	44
1.11.1	Materiales.....	44
1.11.1.1	Relativos al procesamiento de la muestra.....	44
1.11.1.2	Relativos a la contaminación viral.....	44

1.11.1.3	Relativos a la extracción de ácidos nucleicos .....	45
1.11.1.4	Relativos a la espectrofotometría .....	45
1.11.1.5	Relativos a la reacción en cadena de la polimerasa .....	45
1.11.1.6	Relativos a la electroforesis.....	45
1.11.2	Equipos.....	46
1.11.2.1	Relativos al procesamiento de la muestra .....	46
1.11.2.2	Relativos a la contaminación viral .....	46
1.11.2.3	Relativos a la extracción de ácidos nucleicos .....	46
1.11.2.4	Relativos a la espectrofotometría .....	46
1.11.2.5	Relativos a la reacción en cadena de la polimerasa .....	46
1.11.2.6	Relativos a la electroforesis.....	46
1.11.3	Reactivos .....	47
1.11.3.1	Relativos a la extracción de ácidos nucleicos .....	47
1.11.3.2	Relativos a la espectrofotometría .....	47
1.11.3.3	Relativos a la reacción en cadena de la polimerasa .....	47
1.11.3.4	Relativos a la electroforesis.....	47
1.12	Procedimiento.....	48
1.12.1	Ubicación .....	48
1.12.2	Muestreo.....	48
1.12.3	Extracción del hepatopáncreas .....	48
1.12.4	Virus control.....	50
1.12.5	Inoculación artificial .....	50
1.12.6	Detección de adenovirus mediante PCR .....	50
1.12.6.1	Extracción de ácidos nucleicos .....	50
1.12.6.2	Iniciadores .....	51
1.12.6.3	Controles .....	51
1.12.6.4	Condiciones de PCR.....	52
1.12.6.5	Mezcla de reacción de la PCR.....	52

1.12.7	Electroforesis en geles de agarosa.....	52
1.12.8	Especificidad y sensibilidad .....	53
1.12.9	Análisis estadístico.....	53
1.12.9.1	Calculo de especificidad y sensibilidad.....	53
1.12.9.2	Incidencia de adenovirus.....	54
<b>CAPITULO IV</b>	.....	<b>54</b>
<b>Resultados</b>	.....	<b>54</b>
1.13	Validación de la técnica de PCR .....	54
1.13.1	Concentración mínima de detección de amplicon para ADV 40.....	54
1.13.2	Especificidad y sensibilidad relativa para ADV 40 .....	56
1.13.3	Concentración mínima de detección de amplicon para ADV 41 .....	57
1.13.4	Especificidad y sensibilidad para ADV 41 .....	59
1.13.5	Incidencia de adenovirus en muestras de moluscos bivalvos .....	60
<b>CAPITULO V</b>	.....	<b>61</b>
<b>Discusión</b>	.....	<b>61</b>
<b>Conclusiones</b>	.....	<b>64</b>
<b>Recomendaciones</b>	.....	<b>64</b>
<b>Referencias bibliográficas</b>	.....	<b>65</b>
<b>ANEXOS</b>	.....	<b>73</b>

## Lista de tablas

Tabla 1. Clasificación del adenovirus humano de acuerdo al tropismo.....	31
Tabla 2. Iniciadores para la amplificación del fragmento del gen que codifica el Hexon de los adenovirus 40 y 41 .....	51
Tabla 3. Tabla 2x2 para comparar los resultados de la PCR en muestras inoculadas y no inoculadas.....	53
Tabla 4. Especificidad y sensibilidad de la PCR para detección de ADV 40 .....	57
Tabla 5. Especificidad y sensibilidad de la PCR para detección de adenovirus 41 .....	60



## Lista de figuras

Figura 1. Concha de abanico <i>Argopecten purpuratus</i> .....	9
Figura 2. Anatomía interna de la concha de abanico .....	10
Figura 3. Espermiación de la concha de abanico .....	12
Figura 4. Desove de la concha de abanico .....	12
Figura 5. Sistema de cultivo Long-Line.....	16
Figura 6. Sistema de cultivo de fondo.....	17
Figura 7. Parásitos en gónadas de <i>Argopecten purpuratus</i> .....	21
Figura 8. Parásitos en branquias de <i>Argopecten purpuratus</i> .....	21
Figura 9. Almeja <i>Gari solida</i> .....	23
Figura 10. Navajuela <i>Tagelus dombeii</i> .....	27
Figura 11. Estructura del adenovirus.....	30
Figura 12. Ingreso del adenovirus al núcleo .....	33
Figura 13. Replicación del adenovirus .....	34
Figura 14. Dinámica viral en el medio ambiente .....	36
Figura 15. Extracción de hepatopáncreas.....	49
Figura 16. Homogenización del hepatopáncreas.....	49
Figura 17. Prueba de detección mínima de DNA por la PCR para el gen Had para la sepa viral Adenovirus 40 .....	55

Figura 18. Prueba de especificidad del iniciador del gen Had para la cepa viral Adenovirus 40 .....	56
Figura 19. Prueba de detección mínima de DNA por la PCR para el gen Had para la cepa viral Adenovirus 41 .....	58
Figura 20. Prueba de especificidad del iniciador del gen Had para la cepa viral Adenovirus 41 .....	59
Figura 21. Balanza electrónica .....	73
Figura 22. Homogeneizador de tejidos .....	73
Figura 23. Vortex .....	74
Figura 24. Centrifugadora .....	74
Figura 25. Espectrofotómetro.....	74
Figura 26. Cabina de flujo laminar.....	75
Figura 27. Termociclador.....	75
Figura 28. Equipo de electroforesis.....	76
Figura 29. Fotodocumentador .....	76



## RESUMEN

El objetivo fue implementar el método de detección de Adenovirus en moluscos bivalvos mediante la técnica de PCR. En esta investigación se trabajó con las especies *Argopecten purpuratus*, *Gari solida* y *Tagelus dobeii*. Para ello se trabajó con muestras donadas por SANIPES, quienes muestrean como parte del control de inocuidad para la exportación. A estas muestras se les extrajo el hepatopáncreas, una parte se destinó para inocularlo artificialmente con Adv 40 ®, Adv 41 ® luego que se confirmara negativo para adenovirus (40, 41) por PCR, la extracción de ácidos nucleicos se realizó en base a la metodología del QIAamp™ mini Kit®, se cuantificó por espectrofotometría, se realizó la detección de adenovirus por PCR, se procedió a una corrida de electroforesis y finalmente se visualizaron las bandas. Se usaron virus control Adv 40, Adv 41, Parvovirus como control negativo, se obtuvo un límite de detección de 70 pb, una especificidad y sensibilidad de 66.6 % para Adv 40 y 41. Por todo ello el método demostró ser rápida y específica para la detección de Adv 40 y 41, por otro lado la incidencia de adenovirus en las muestras proporcionadas por SANIPES fueron nulas es por ello que se recomienda muestrean en zonas que no sea de clasificación A o B.

Palabras clave: *Argopecten purpuratus*, *Gari solida*, *Tagelus dobeii*, Adenovirus, PCR.

## ABSTRACT

The objective was to implement the method of detection of Adenovirus in bivalve molluscs by the technique of PCR. In this research we worked with the species *Argopecten purpuratus*, *Gari solida* and *Tagelus dobeii*. For this purpose we worked with samples donated by SANIPES, who sampled as part of the control of safety for export. These samples were extracted from the hepatopancreas, one part was destined to artificially inoculate it with Adv 40 ®, Adv 41 ® after it was confirmed negative for adenovirus (40, 41) by PCR, nucleic acid extraction was performed based on the Methodology of the QIAamp™ mini Kit®, was quantified by spectrophotometry, the detection of adenovirus was performed by PCR, a run of electrophoresis was performed and the bands were finally visualized. A control virus of Adv 40, Adv 41, Parvovirus was used as a negative control, a detection limit of 70 bp, a specificity and sensitivity of 66.6% was obtained for Adv 40 and 41. Therefore, the method proved to be fast and specific for the Detection of Adv 40 and 41, on the other hand the incidence of adenovirus in the samples provided by SANIPES were null that is why it is recommended to sample in areas other than classification A or B.

Key words: *Argopecten purpuratus*, solid *Gari*, *Tagbeus dobeii*, Adenovirus, PCR.

## INTRODUCCIÓN

En el Perú existen seis géneros y diez especies de pectínidos, de los cuales solo la *Argopecten purpuratus* es de importancia comercial, la cual habita en zonas costeras que se extienden desde Panamá hasta Chile (González, 2010).

En el litoral peruano, las principales áreas de cultivo de concha de abanico se encuentran en las costas de Ancash, en zonas como Samanco y Guaynumá; mientras que en Lima, sobresale la zona de Pucusana. Asimismo, destacan bancos naturales ubicados en Pisco, Paracas, Sechura (Piura), Lobos de Tierra (Lambayeque), Bahía de Independencia e Isla San Lorenzo en Lima (PENX, 2013). Nuestro país, exporta concha de abanico a los cinco continentes, siendo nuestros principales clientes Francia, EE.UU, Australia, Vietnam y Nueva Zelanda (PRODUCE, 2013).

Así mismo cabe recalcar que los bivalvos son bioacumuladores de bacterias y virus (Muniain *et al.*, 2003). Esto se debe a que los moluscos bivalvos se alimentan principalmente de suspensiones, filtrando selectivamente pequeñas partículas de fitoplancton, zooplancton, virus, bacterias y materia inorgánica del agua circundante (Oliveira *et al.*, 2011).

“Muchos de estos patógenos, como los virus que provocan gastroenteritis y hepatitis infecciosa o las bacterias que causan fiebre tifoidea, están relacionados normalmente con una contaminación por aguas fecales humanas” (FAO, 2010); siendo reportados varios incidentes de moluscos asociados a gastroenteritis viral (Umesha, 2008).

Desde el 2011, “la Organización de las Naciones Unidas para la alimentación y la agricultura viene emitiendo la alerta sanitaria para los virus: Rotavirus, Hepatitis E (HEV), Astrovirus, Aichi virus, Sapovirus, Enterovirus, Coronavirus, Parvovirus y Adenovirus que pueden ser transmitidas por alimentos y las evidencias sugieren que la lista de virus transmitidas por

alimentos puede ser aún más grande” (FAO, 2011, p. 72). Según Oliveira *et al.* (2011) el adenovirus es un agente biológico que se encuentra implicado en enfermedades relacionadas con los mariscos.

Por todo lo expuesto anteriormente es de importancia que se tenga de conocimiento la presencia de este agente viral en los moluscos bivalvos porque en los siguientes años los países a los que exportamos nuestros moluscos van a exigir que tengamos un mecanismo de control e identificación de dichos virus. Siendo motivo de esta investigación implementar un método en base a técnicas de diagnóstico molecular que nos permitan detectar la presencia de este virus en muestras de moluscos bivalvos.



# CAPITULO I

## PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACION

### 1.1 Planteamiento del problema

Los moluscos bivalvos representan una fuente importante de alimento para el ser humano y también fuente de recursos económicos. Son animales filtradores y bombean una gran cantidad de agua en poco tiempo, pueden bioacumular diversas partículas y microorganismos presentes en el agua como agentes patógenos para el ser humano por ejemplo los virus entéricos que son muy resistentes al medio ambiente, causando enfermedades de transmisión alimentaria, ya que suelen consumirse crudos o poco cocidos.

En el Perú no hay estudios sobre presencia de Adenovirus en moluscos bivalvos. Desde el 2011 “la Organización de las Naciones Unidas para la alimentación y la agricultura (FAO) viene emitiendo la alerta sanitaria para los virus: Rotavirus, Hepatitis E (HEV), Astrovirus, Aichi virus, Sapovirus, Enterovirus, Coronavirus, Parvovirus y Adenovirus que pueden ser transmitidas por alimentos y las evidencias sugieren que la lista de virus transmitidas por alimentos puede ser aún más grande” (FAO, 2011, p.72).

La propagación del Adenovirus a través del agua y alimentos (moluscos bivalvos), en condiciones higiénicas deficientes, podría desempeñar un papel importante, por tanto es necesario la implementación de un método estandarizado en el país para la detección de Adenovirus en moluscos bivalvos.

### 1.1.1 Problema principal

- ¿Cuál será el método para detectar Adenovirus en moluscos bivalvos mediante la técnica de la PCR?

### 1.1.2 Problemas secundarios

- ¿Cuál será la estandarización del método para la extracción de ADN viral?
- ¿Qué porcentaje de sensibilidad y especificidad se obtendrá del método?
- ¿Cuánto será la incidencia o prevalencia de Adenovirus en las muestras recolectadas?

## 1.2 Objetivos de la investigación

### 1.2.1 Objetivo principal

- Implementar el método de detección de adenovirus en moluscos bivalvos mediante la técnica de PCR.

### 1.2.2 Objetivos secundarios

- Cálculo del límite de detección para Adenovirus 40 y 41
- Cálculo de la sensibilidad y especificidad relativa para Adenovirus 40 y 41
- Cálculo de la prevalencia de Adenovirus en muestras de moluscos bivalvos

## 1.3 Formulación de hipótesis

### 1.3.1 Hipótesis principal

- La implementación del método detecta adenovirus en moluscos bivalvos mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

## 1.4 Importancia

- Al no haber estudios previos en el Perú acerca de la presencia de Adenovirus en moluscos bivalvos, este estudio servirá como referente para estudios posteriores incluso para la normatividad vigente.
- La estandarización del método de PCR para la detección de Adenovirus en moluscos bivalvos de los géneros *Argopecten purpuratus*, *Gari sólida* y *Tagelus Dombeyi* así como de todo el proceso de detección (acondicionamiento, extracción, cuantificación y visualización) servirá como referencia para la detección de Adenovirus en laboratorios certificadoras o plantas pesqueras dedicadas a la exportación de estos moluscos.
- Probablemente los bloques económicos como la Unión Europea y EEUU, consideren requisito para la exportación de moluscos bivalvos, la detección de Adenovirus porque se viene incrementando su prevalencia en la salud, actualmente solo se considera la detección de Hepatitis A (HAV) y Norovirus (NoV), con este estudio se podrá emplear este método estandarizado en la detección de este virus endémico en moluscos bivalvos como método normalizado de detección.
- Al determinar la distribución de Adenovirus en conchas de abanico, se podrá identificar las áreas donde existe una mayor contaminación, lo cual indicaría un deficiente tratamiento de aguas residuales o del estatus sanitario, pudiendo establecer estrategias puntuales para que se pueda mejorar dichas áreas. Esto no solo beneficiaría a la calidad sanitaria de los moluscos bivalvos, ya que estos animales se usan como bioindicadores además servirá para mejorar la calidad sanitaria de los demás productos hidrobiológicos.

## CAPITULO II

### FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA

#### 1.5 Antecedentes teóricos

La concha de abanico o vieira es un molusco filtrador de 2 valvas, cuyo nombre científico es “*Argopecten purpuratus*”, pertenece a la familia Pectinidae. Este molusco bivalvo, habita en zonas costeras que se extienden desde Panamá hasta Coquimbo (Chile), entre profundidades que van desde los 5 m hasta los 30 m, y bajo temperaturas que oscilan entre los 13 °C y 28 °C. (PENX, 2013).

En el Perú, las principales áreas de cultivo de concha de abanico se encuentran en las costas de Ancash, en zonas como Samanco y Guaynumá; mientras que en Lima, sobresale la zona de Pucusana. Asimismo, destacan bancos naturales ubicados en Pisco, Paracas, Sechura (Piura), Lobos de Tierra (Lambayeque), Bahía de Independencia e Isla San Lorenzo, Lima (PENX, 2013).

Los bivalvos son bioacumuladores de bacterias y bacteriófagos. Muniain *et al.* (2003).

La contaminación de los moluscos bivalvos se produce principalmente porque se alimentan de suspensiones filtrando selectivamente pequeñas partículas de fitoplancton, zooplancton, virus, bacterias y materia inorgánica del agua circundante. Burkhardt *et al.* (2000; citado por Oliveira, 2011).

“El adenovirus es un virus ADN de 60-90 nm de diámetro. Se caracteriza por no poseer cubierta externa. El virión tiene forma icosaédrica y se compone de una cápside proteica constituida por 252 capsómeros, que representa el 87 % del peso, además presenta un núcleo que contiene el genoma de ADN viral y 4 proteínas internas” (Bernaola & Luque, 2002, p.41).

“Existen 52 serotipos adenovirus inmunitariamente distintos (7 especies: Adenovirus humano A a G) que pueden causar infecciones en seres humanos desde enfermedad respiratoria

(mayormente especies HAdV-B y C) y conjuntivitis (HAdV-B y D) gastroenteritis (HAdV-F serotipos 40 y 41). La forma más común es una enfermedad respiratoria; sin embargo, también pueden causar otras enfermedades como cistitis, y sarpullido, dependiendo del serotipo de adenovirus que cause la infección” (Rodríguez, 2012, p.60).

Yates *et al.* (2014) menciona que los adenovirus infectan el tracto respiratorio, los ojos y el tracto gastrointestinal. La gastroenteritis en los niños pequeños es causada por adenovirus Grupo F, que comprende serotipos 40 y 41.

La partícula vírica es resistente a pH ácido, a la bilis y enzimas proteolíticos, lo que permite la multiplicación en el intestino humano, Asimismo, la ausencia de membranas o estructuras lipídicas hacen que sean resistentes a disolventes orgánicos. Green *et al.* (1963; citado por Rodríguez, 2012).

Los Adenovirus pueden ser considerados útiles como índice molecular de contaminación viral en los mariscos. Muniain *et al.* (2003).

En 1977, Appleton & Pereira, reportaron en Reino Unido 33 casos de gastroenteritis viral transmitidas por consumo de mariscos afectando a 800 personas. Desde entonces, varios incidentes de moluscos asociados gastroenteritis viral han sido reportados. Lees (2000; citado por Umesha, 2008).

El Adenovirus es un agente biológico que se encuentra implicado en enfermedades relacionadas con el marisco, puede presentar un periodo de incubación que va de 10 a 70 h con una duración que va desde 2 a 9 días. Oliveira *et al.* (2011)

Rigoto (2005) probó tres metodologías para detectar adenovirus de serotipo 5 (Ad5) humano para detectarlos en ostras en Florianópolis (Brasil) durante un periodo de 6 meses

concluyendo que el uso de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) anidada fue crucial para mejorar la sensibilidad de la detección de adenovirus humano en extractos de carne de ostra; el método PCR-convencional y el PCR-cultivo celular integrada (ICC/PCR) no mejoró la detección de adenovirus en las ostras sembradas artificialmente.

La PCR es una reacción enzimática *in vitro*, cuya misión es copiar millones de veces una secuencia específica de ADN blanco mediante una poderosa catálisis llevada a cabo por una enzima conocida como ADN polimerasa, de tal manera que cantidades pequeñas de ADN pueden ser sintetizadas y copiadas fielmente para analizarse con diferentes fines. Tamay de Dios *et al.* (2013).



## 1.6 Marco teórico

### 1.6.1 Concha de Abanico (*Argopecten purpuratus*)

#### 1.6.1.1 Clasificación taxonómica

Phylum: *Molusca*

Clase: *Bivalva*

Sub-clase: *Lamenlinobranchia*

Orden: *Filibranchia*

Súper familia: *Pectinacea*

Familia: *Pectinadae*

Género: *Chlamys*

Especie: *Argopecten purpuratus*.



Figura 1. Concha de abanico *Argopecten purpuratus* (Elaboración propia)

## 1.6.1.2 Aspectos biológicos de la especie

### 1.6.1.2.1 Características morfológicas

Concha sólida, circular, moderadamente convexa, más larga que alta, equivalva, concha simétrica, la valva izquierda algo más abombada que la derecha. Simetría equilátera, orejas casi iguales, contorno circular. Periostraco opaco. Coloración externa blanca con púrpura encima de las costillas, alternativamente rosado y marrón. A veces completamente blanco, crema o naranja moteado de crema o púrpura. Ornamentación externa del disco formado por 23 a 29 costillas radiales, anchas, lisas y almenadas, que se aplastan hacia el margen ventral. Generalmente la valva derecha con una costilla menos que la izquierda. Ornamentación interna formada por placas que se extienden desde el borde hasta un punto situado a nivel de la parte superior de la impresión del abductor (Maeda, 2002).

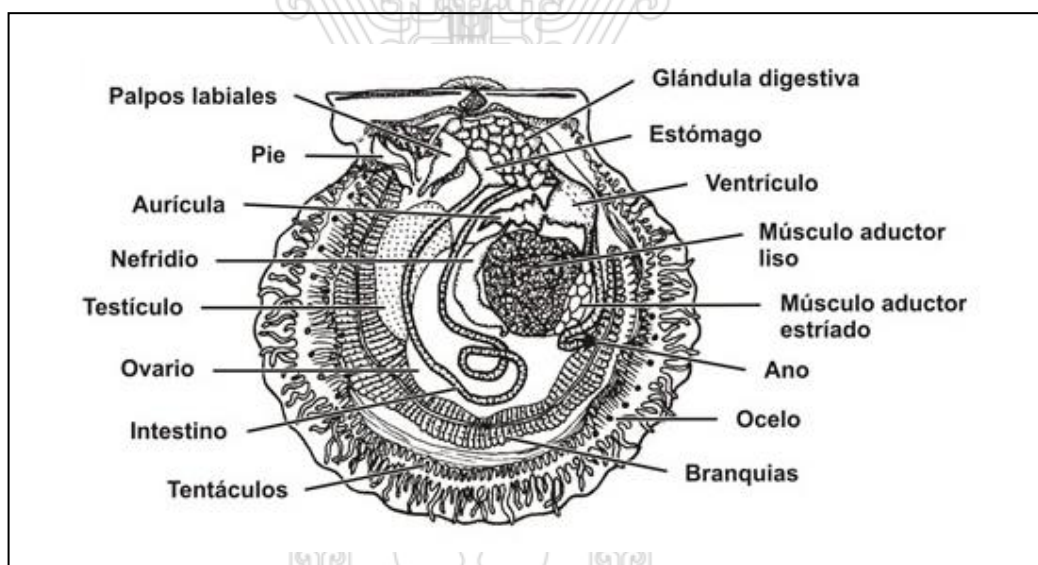


Figura 2. Anatomía interna de la concha de abanico (Asturnatura, 2015)

#### 1.6.1.2.2 Sistema digestivo

El hepatopáncreas es un órgano de enorme importancia para el proceso de digestión en los moluscos, se comunica con la parte anterior del intestino medio a través de conductos. Consiste en una estructura ramificada de tubos de extremo ciego tapizados de epitelio. Una de las diversas funciones de este órgano consiste en la secreción de enzimas digestivas que desembocan a través de conductos en el intestino medio y luego retornan al estómago. Las partículas alimenticias provenientes del intestino medio también ingresan en el hepatopáncreas, y una gran parte de la digestión y de la absorción extracelular tiene lugar en el interior de este órgano (Hill *et al.*, 2006). Además, las células del hepatopáncreas desempeñan funciones importantes de almacenamiento y secuestro, dado que almacenan lípidos y glucógeno y pueden secuestrar toxinas. Los datos disponibles indican que el hepatopáncreas es la fuente más importante de enzimas digestivas y el sitio principal de absorción de nutrientes (Hill *et al.*, 2006).

#### 1.6.1.2.3 Reproducción

La concha de abanico es una especie hermafrodita, que libera gametos al medio acuático (mar), en donde se lleva a cabo la fecundación, proceso embriológico, desarrollo de la larva, asentamiento larval y la metamorfosis; se conoce también las condiciones ambientales y la alimentación, tanto en la etapa larvaria como en los adultos, esto hace posible llevar a cabo la reproducción de desove, fecundación y cultivo larvario. El desove requiere saber identificar bien los animales maduros y en condiciones de desovar, ya sea provenientes del ambiente natural o previamente acondicionados en Hatchery; de tal manera que se encuentren en las mejores condiciones de evacuar gametos viables y en cantidades adecuadas a las necesidades. La fecundación, se hace necesario conocer las condiciones ambientales que requieren los

gametos así como las características de los gametos y sus concentraciones y las proporciones para una buena fecundación (Alvarado *et al*, 1996). En la mayoría de las especies de bivalvos de interés comercial, los gametos se expulsan al medio exterior, donde tiene lugar la fecundación. El espermia es expulsado a través de la abertura o sifón exhalante en un chorro fino y constante. La expulsión de los óvulos es más intermitente y se emiten en nubes desde la abertura exhalante o sifón (Alvarado *et al*, 1996). En las figuras 3 y 4 se observa la liberación de gametos (espermiación) y desove respectivamente.



Figura 3. Espermiación de la Concha de abanico (Alvarado *et al*, 1996)



Figura 4. Desove de la Concha de abanico (Alvarado *et al*, 1996)

#### 1.6.1.2.4 Alimentación

Se alimentan de suspensiones filtrando selectivamente pequeñas partículas de fitoplancton, zooplancton, virus, bacterias y materia inorgánica del agua circundante (Oliveira *et al.*, 2011).

#### 1.6.1.2.5 Hábitat

Habita normalmente en las zonas protegidas en donde hay presencia de conchuelas, fondo rocosos, pedregosos, arenosos, areno-fangosos, limosos y algosos, especialmente en pequeños bosques formados por las macroalgas *Rodhymenia sp.* (Rodríguez, 2012).

#### 1.6.1.2.6 Relaciones ecológicas

*Argopecten purpuratus* es una especie bentónica que habita en bahías someras y de aguas relativamente tranquilas, con temperaturas que varían entre los 13 °C y 28 °C, y niveles de oxígeno entre 0,2 y 9 ml/litro. La especie tiene una dinámica de población irregular, abarcando períodos de gran abundancia hasta períodos de escasez (González, 2010). La especie es afectada positivamente durante eventos como El Niño considerados muy intensos, así como no son afectadas de manera significativa durante eventos El Niño de menor intensidad (González, 2010).

#### 1.6.1.2.7 Presencia de predadores

En el medio ambiente, los pectínidos son presa natural de peces, erizos, caracoles, estrellas de mar, crustáceos y otros organismos. Estas especies poseen diversos mecanismos de defensa, siendo el más común el cierre rápido de sus valvas, así como su capacidad “nadadora” suficiente para escapar de su predador. Otros predadores de los bivalvos son los gusanos perforadores del género *Polydora sp.*, que pueden penetrar en las valvas y debilitar la matriz de éstas, facilitando la depredación por otros organismos. (Bermúdez *et al.*, 2004)

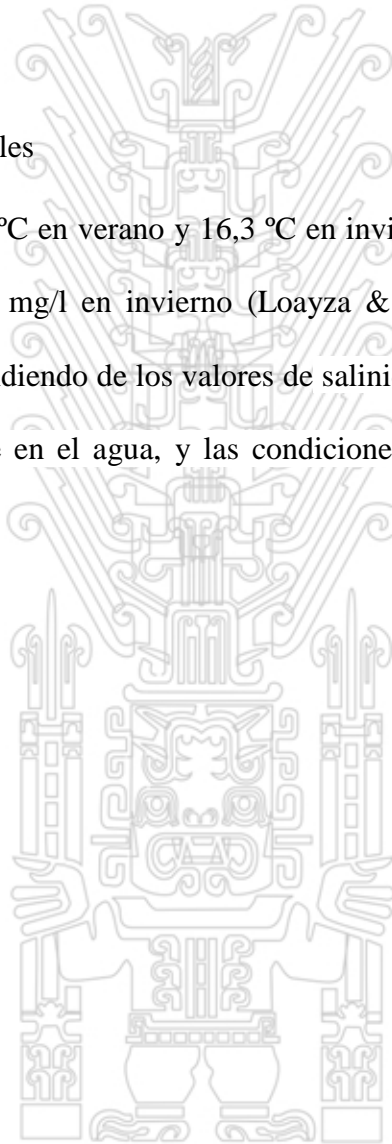
#### 1.6.1.2.8 Distribución geográfica

El área de distribución de la concha de abanico se encuentra entre Paita, Perú ( $5^{\circ}$  S,  $81^{\circ}$  W) y Tongoy, Chile ( $30^{\circ}$  S,  $71^{\circ}$  W), y las poblaciones más productivas se ubican en bahía Independencia, Perú y Tongoy, Chile (González, 2010).

#### 1.6.1.3 Cultivo de la especie

##### 1.6.1.3.1 Condiciones ambientales

La temperatura varía entre  $19,7^{\circ}\text{C}$  en verano y  $16,3^{\circ}\text{C}$  en invierno, el oxígeno disuelto en el agua  $6,1\text{ mg/l}$  en verano y  $3,0\text{ mg/l}$  en invierno (Loayza & Tresierra, 2014). Aunque las condiciones pueden variar dependiendo de los valores de salinidad, aglomeración de ostiones, cantidad de alimento disponible en el agua, y las condiciones adversas como episodios de marea roja (Mendoza, 2011).



### 1.6.1.3.2 Sistema de cultivo

El cultivo se lleva a cabo principalmente en sistemas “suspendido” o denominados “long - line” y en menor medida en sistemas de “fondo” (Mendoza, 2011).

#### Long – Line

Es una estructura flotante de forma trapezoidal, que está formada por la línea madre propiamente dicha, y que viene a ser la parte en la cual se unen todas las unidades de cultivo, esto a través de las orejas que se encuentran en un metro entre sí. Esta línea tiene la capacidad para 100 “orejas” distantes a un metro entre cada una de ellas en el que se unen los sistemas, lo que significa que normalmente se tiene 100 unidades de sistemas de cultivo en un long-line (Mendoza, 2011).



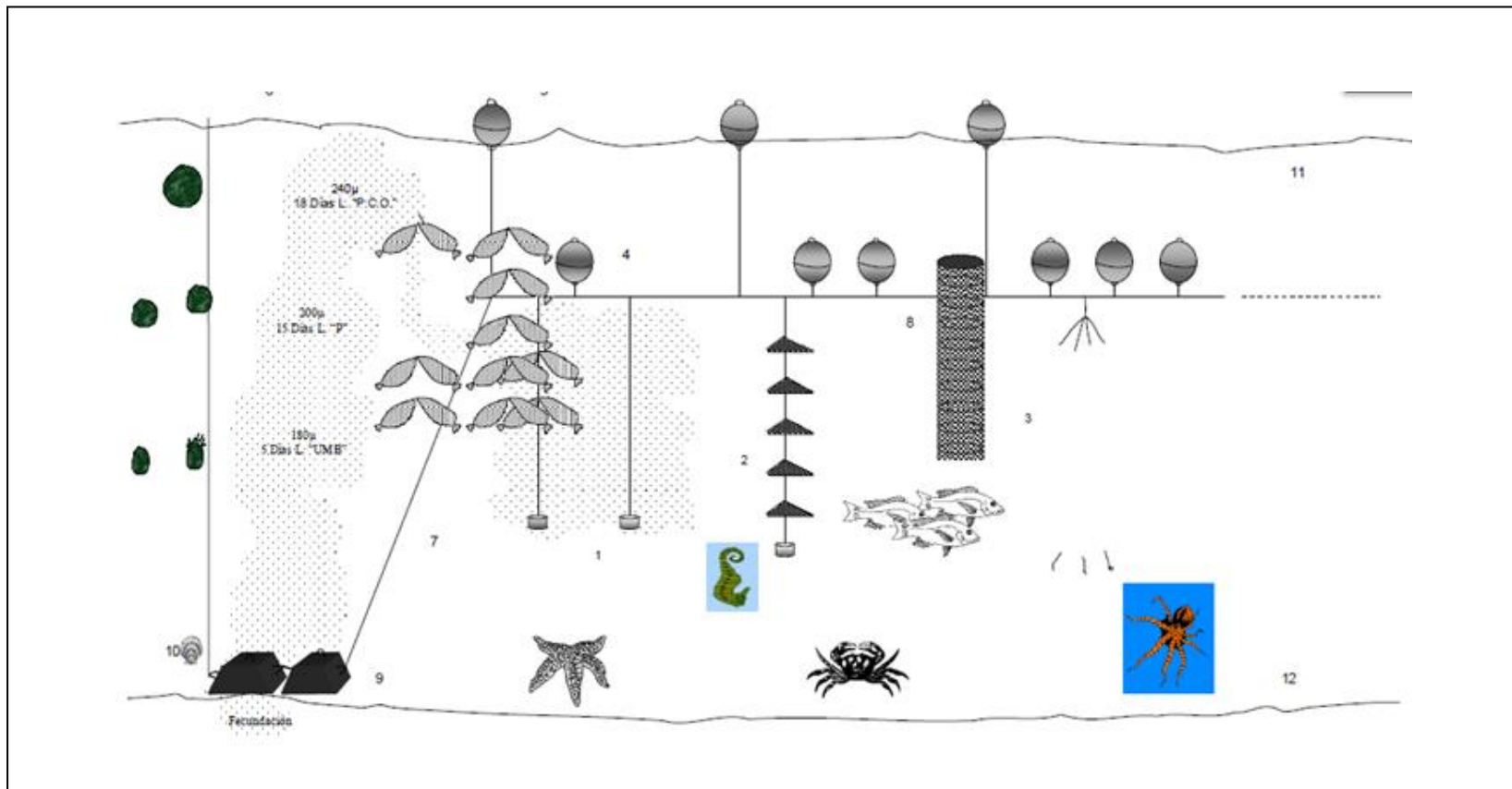


Figura 5. Sistema de cultivo Long-Line (Mendoza, 2011)

## Fondo

Es aquella técnica en la cual los recursos o las estructuras que los sustentan están en directa relación con el sustrato, es decir, que se utiliza los fondos marinos como soporte del cultivo. Se realiza un corral de malla o red de forma circular o rectangular en el fondo, cuya parte basal va pegada al fondo se le hace como una especie de bolsillo donde se colocan piedras para que el corral no se mueva y la parte superior del corral va adheridas botellas descartables, para que ese lado de la red flote. En el interior se colocan las conchitas o el recurso que se quiera cultivar (Maeda, 2002).

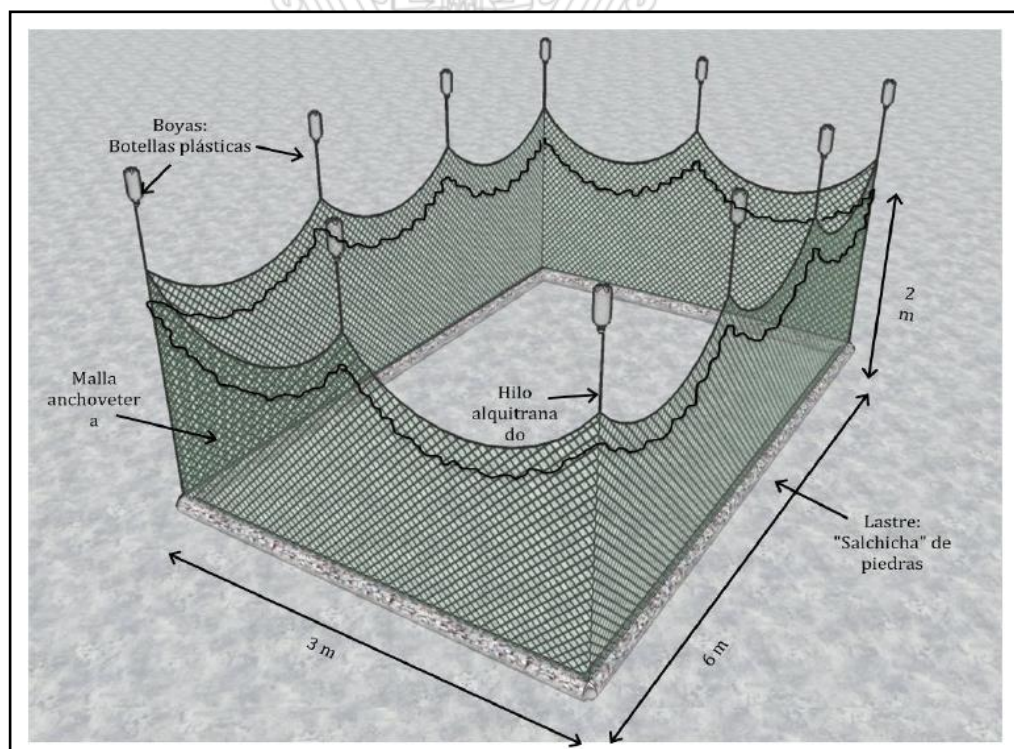


Figura 6. Sistema de cultivo de fondo (Maeda, 2002)

### 1.6.1.3.3 Etapas de producción del cultivo de conchas de abanico

Se inicia con la captación de semilla, cultivo inicial, cultivo intermedio (3 a 6 meses) y engorde (6 meses, hasta que alcancen 5 a 8 cm.), culminando en la cosecha (Mendoza, 2011).

#### Captación de semilla

Mediante el sistema de producción artificial o Hatchery podemos determinar o definir 5 etapas fundamentales:

- a. Selección y acondicionamiento de productores
- b. Desove y fecundación
- c. Cultivo de larva
- d. Metamorfosis y asentamiento larvar
- e. Cultivo de post – larva

Una vez fijadas las larvas en los colectores son llevadas al mar para su crecimiento. Dicho periodo dura aproximadamente 2 a 3 meses. La talla de recolección de las semillas es de 5 a 10 mm. La densidad obtenida procedente de los colectores varía entre 500 a 1000 semillas de concha de abanico (Bermúdez *et al.*, 2004).

#### Cultivo inicial

A partir de esta etapa se inicia con la primera actividad, que es el desprendimiento de las semillas de los colectores, las mismas que son tamizadas por tallas para luego ser cubicadas y contadas, luego sembrarlas en linternas L0 con las mismas densidades por piso dependiendo de las tallas. Con el traslado de semillas al sistema L1 termina la etapa inicial, con siembra de 150 unidades por piso con rango de tallas de 20 – 30 mm (Bermúdez *et al.*, 2004).

### Cultivo intermedio

Después de haber permanecido por espacio de tres meses los moluscos en linterna L1, se realiza el desdoble para pasarlo a L1 y L2, con densidades de 80 y 60 unidades por piso con tallas de 30 – 40 mm y 50 – 55 mm, según el tamaño que han alcanzado los moluscos y el tiempo que el sistema ha sido sembrado, lo cual dependerá de las condiciones ambientales tales como parámetros físicos, químicos y biológicos (Bermúdez *et al.*, 2004).

### Engorde

Después de los 90 días de haber sido sembrado el recurso en linternas L2, estas son llevadas al sistema L2-L3, como resultado del desdoble o desactivación de dicho sistema, con densidades de 30 – 40 unidades por piso con tallas de 60 – 65 mm y 70 – 75 mm, esto dependiendo del tipo de sistema y al tamaño que alcanzaran los bivalvos (Bermúdez *et al.*, 2004).

### Cosecha

Última etapa del cultivo, se realiza después de aproximadamente 90 días de su siembra en el último sistema, es decir, que en esa fecha se extraen todos los individuos con tallas superiores a los 75 mm, alcanzando el recurso su talla y peso comercial, estando lista para su venta y/o procesamiento en planta (Bermúdez *et al.*, 2004).

#### 1.6.1.3.4 Problemática del cultivo

Según Bermúdez *et al.* (2004) el cultivo de concha de abanico en sistemas suspendidos se encuentra afectado por múltiples enfermedades que agravan el desarrollo y supervivencia de la especie, y son una de las causas de pérdidas económicas en los cultivos intensivos. Los

organismos que ocasionan estas enfermedades están dentro de los siguientes grupos: virus, bacterias, hongos, protozoarios y parásitos. En las zonas de Perú y Chile los problemas patológicos más redundantes manifestados en concha de abanico son los siguientes.

#### Castración de las gónadas

Producida por las larvas de parásitos tremátodes digenéos, en donde los individuos presentan extrañas vetas coloreadas en el musculo aductor. Técnicamente se encuentran castrados, se observa una carencia del tejido ovárico. Así mismo hay invasión de las branquias y del interior del musculo aductor. Esto lo vuelven presas fáciles de sus predadores (Bermúdez *et al.*, 2004).

#### Vibriosis

Enfermedad producida por el agente patógeno *Vibrio anguillarum* y otros vibrios. Afecta a los bivalvos en estadio temprano. Es de transmisión directa de “stock” de reproductores a larvas, logrando producir altas tasas de mortalidad (Bermúdez *et al.*, 2004).

#### Parasitosis por gusanos poliquetos

El agente principal de esta parasitosis es el nematodo *Polydora sp.* Las larvas de este se asientan sobre la concha del bivalvo, perforando la parte calcárea de la concha, en forma de U generalmente, lo que la debilita y vuelve quebradiza. Puede afectar el musculo aductor, generando infecciones secundarias (Bermúdez *et al.*, 2004).



Figura 7. Parásitos en gónadas de *Argopecten purpuratus* Bermúdez *et al.* (2004).



Figura 8. Parásitos en branquias de *Argopecten purpuratus* Bermúdez *et al.* (2004).

## Bioincrustantes

También llamados biofouling, son organismos que se adhieren sobre estructuras duras que se sumergen o están en contacto continuo con el agua de mar (Pacheco *et al.*, 2005).

### 1.6.1.4 Situación actual de la producción de concha de abanico en el Perú

#### 1.6.1.4.1 Producción nacional

En el 2015 la cosecha fue de 23 028.58 t y cantidad de las exportaciones a Francia fue en promedio de 4 763.35 t. Mientras que en EE.UU fueron de 2 241.91 t; el valor de las exportaciones para Francia y EEUU fueron de (US\$) 41 856 384 y 10 812 763 respectivamente (PRODUCE, 2015).

#### 1.6.1.4.2 Producción mundial

Los principales países productores de ostiones y vieiras a nivel mundial son en primer lugar China con 3 503 millones de t seguido por Corea con 241 259 t, Japón con 475 847 t, EEUU de Norteamérica con 135 798 t y Francia con 104 640 t, en la Región de América Latina y El Caribe el principal productor es Perú que incluyendo la cosecha de sus áreas de repoblamiento alcanzó las 58 101 t seguido por Chile con 16 861 t; el Perú con sus 58 101 t de concha de abanico se encuentra en el Puesto N° 6 a nivel mundial y en el Puesto N° 1 a nivel de la Regional de producción de ostiones y vieiras. (Mendoza, 2011).

## 1.6.2 Almeja (*Gari sólida*)

### 1.6.2.1 Clasificación taxonómica

Phylum Mollusca

Clase Pelecypoda

Subclase Heteredenta

Orden Veneroida

Super – Familia Tellinacea

Familia: Psammebiidae

Género: *Gari* Schumacher, 1817

Especie: *Gari sólida* (Gray, 1828)

Nombre común: Almeja, concha blanca



Figura 9. Almeja *Gari sólida* (Elaboración propia)

## 1.6.2.2 Aspectos biológicos de la especie

### 1.6.2.2.1 Características morfológicas

#### Externa

La almeja es un molusco de simetría bilateral, protegido por dos valvas achatadas, lateralmente ovoides, de color blanco, que se articulan en la parte dorsal mediante una bisagra que recibe el nombre de charnela.

Las valvas están marcadas exteriormente por una serie de líneas concéntricas paralelas al borde libre, las cuales parten de una pequeña protuberancia llamada umbo o ápica (Pérez, 1987).

#### Interna

Dentro de las valvas, tenemos el cuerpo que consta de un pie muscular de color rosado claro y la masa visceral. El cuerpo de consistencia blanda se halla cubierto por un repliegue de la piel que se llama manto, este consiste en dos mitades o lóbulos paleales que tienen exactamente la misma forma de las valvas de la concha que ellos segregan.

Estos lóbulos circunscriben una cavidad espaciosa y están soldados a lo largo de sus borbes, excepto en dos partes dejando dos aberturas:

Una en la extremidad posterior donde el manto se propaga entre las valvas para formar los sifones y otros en la parte de la que sale el pie. En cada lado entre el pie y el lóbulo del manto se amplifica la cavidad paleal en la que se hallan las branquias que son de forma laminar y filamentosa (Pérez, 1987).

#### 1.6.2.2.2 Reproducción

Presenta sexos separados, sin dimorfismo sexual; en el extremo norte de Chile, presenta en general un ciclo reproductivo continuo con emisiones parciales a lo largo del año, pero con eventos de desove importantes tanto en primavera como en invierno. De manera similar, en la zona sur austral presenta un ciclo reproductivo continuo a través del año, donde la evacuación de gametos se incrementa en los períodos febrero-marzo, mayo-junio y diciembre-enero. En cambio en la zona centro sur ocurre sólo un evento reproductivo importante en el año, con desoves en febrero y un amplio período de reposo reproductivo. La talla de primera madurez sexual para poblaciones del sur fluctúa en el rango de 35,0 a 39,9 mm de longitud en los machos y entre los 40,0 a 44,9 mm de longitud en las hembras. El diámetro de los ovocitos alcanza los  $65 \pm 3 \mu\text{m}$  de diámetro. El estado de larva D se alcanza entre las 36-37 horas post-fertilización, a una temperatura de  $15 \pm 0,8 \text{ }^\circ\text{C}$ . Durante el desarrollo temprano de la especie, destaca la presencia de una amplia cubierta gelatinosa que rodea al ovocito ( $174 \pm 10 \mu\text{m}$  de diámetro) y que se mantiene hasta el estado de larva D. la metamorfosis de las larvas se alcanza a los 38 días de cultivo a una temperatura de  $14 \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$  (Contreras & Puebla, 2013).

#### 1.6.2.2.3 Alimentación

Por un sifón entra el agua para la respiración de las branquias y por el mismo pasan organismos planctónicos para la alimentación; por el otro sifón salen los residuos de la digestión y también el dióxido de carbono formado en el proceso de la respiración (Pérez, 1987).

#### 1.6.2.2.4 Crecimiento

Después de la fecundación pasan por un estado de larva (veliger) que vive a merced de las corrientes, hasta que a los 15 días aproximadamente comienzan a adoptar una vida bentónica y pasan a vivir enterradas. En este momento tiene lugar una metamorfosis en la que pierden el órgano natatorio y desarrollan el pie, las branquias y los sifones; Su crecimiento depende de la temperatura del agua, y de la abundancia de alimento (JACUMAR, 2008).

#### 1.6.2.2.5 Hábitat

*Gari solida* habita tanto en sustratos de arena fina como en sustratos de grava arena gruesa y se alimenta principalmente de plancton y detritus orgánico. Se encuentra principalmente a profundidades de 10-20 m (Contreras & Puebla, 2013).

#### 1.6.2.2.6 Relaciones ecológicas

Se encuentra compartiendo habitat con *Semele sólida*, *Protothaca thaca* y *Venus antiqua* (Contreras & Puebla, 2013). Estando debajo de la arena quedan en comunicación con el agua mediante dos tubos llamados sifones (Pérez, 1987).

#### 1.6.2.2.7 Distribución geográfica

Su distribución latitudinal, según distintos autores, se extiende desde Talara (Perú) a 4° S, hasta el Archipiélago de Los Chonos (Chile) a 45° S mientras que otros autores restringen su distribución desde Callao (Perú) a 12° S hasta el Archipiélago de Los Chonos, Chile a 45° S (Contreras & Puebla, 2013).

#### 1.6.2.2.8 Producción mundial

Durante el año 2000, China encabezó la lista de exportadores con 69 500 t por valor de U\$S 81 millones. Otros grandes participantes fueron Corea del Norte (46 500 t) Corea del Sur, Tailandia y Canadá (Contreras & Puebla, 2013).

#### 1.6.3 Navajuela (*Tagelus dombeii*)

##### 1.6.3.1 Clasificación taxonómica

Phylum Mollusca

Clase Bivalvia

Familia Solecurtidae

Nombre común Navajuela

Especie *Tagelus dombeii*



Figura 10. Navajuela *Tagelus dombeii* (Zúñiga, 2003)

### 1.6.3.2 Aspectos biológicos de la especie

#### 1.6.3.2.1 Características morfológicas

La concha es estrecha, alargada con los bordes dorsal y ventral casi paralelos entre sí y sus extremos redondeados. La escultura externa presenta suaves líneas concéntricas de crecimiento. Las valvas tienen una coloración blanco violáceo, con dos finos rayos blancos que salen desde el umbo hacia el borde ventral posterior. El periostraco es delgado, café amarillento a café oscuro. Las marcas musculares son notorias, el aductor posterior es más redondeado que el anterior. Los umbos son pequeños, casi centrales. La charnela tiene dos dientes cardinales, los de la valva derecha son más grandes y altos, en la valva izquierda, el cardinal posterior es grande y puntiagudo. Es común encontrarla en la bahía de Mejillones, hasta 20 m de profundidad, enterradas en sustratos arenosos (Zúñiga, 2003).

#### 1.6.3.2.2 Reproducción

*Tagelus dombeii* es una especie gonocórica, sin dimorfismo sexual externo. Como estrategia reproductiva, utiliza la fertilización externa. La gónada abarca desde el interior distal del pie hasta la masa visceral o estómago del individuo (Mendis, 2010). La talla de primera madurez sexual se alcanza a los 38 mm de longitud de la concha. El desarrollo embrionario temprano abarca 24 horas, en donde ocurre una serie de cambios sucesivos hasta llegar al estado trocófora, cuyas características principales son el mechón apical y una gran banda ciliada que lo mantiene en la superficie del agua. El estado larval planctotrófico se alcanza 48 horas post-fertilización y dura 22 días a 14-16 °C. La primera larva véliger es del tipo larva D. A este estado le sigue la larva véliger umbonada (10 días post-fertilización) y luego el estado pedivéliger (17 días post-fertilización), alcanzado un tamaño de 200 µm en sentido antero-posterior y 180 µm dorso-ventral. Luego de la metamorfosis, el juvenil forma su primer sifón

(exhalante) 29 días post-fertilización (520  $\mu\text{m}$  antero-posterior y 430  $\mu\text{m}$  dorsoventral), y paralelamente se desarrollan las branquias, el pie y músculo aductor posterior. Treinta y ocho días post-fertilización ocurre la formación del sifón inhalante y músculo aductor anterior; las branquias se sitúan por sobre la glándula digestiva, en la región posterior del animal cercana a los sifones (Mendis, 2010).

#### 1.6.3.2.3 Alimentación

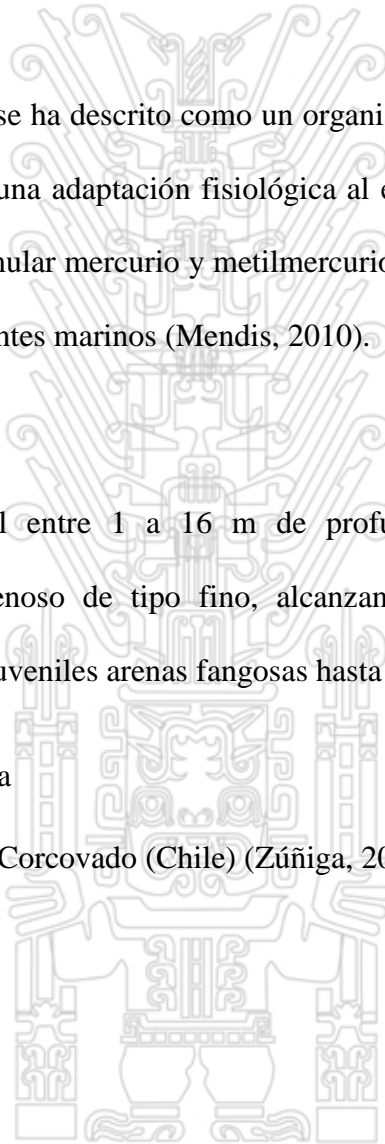
Bajo condiciones de laboratorio se ha descrito como un organismo que presenta metabolismo anaeróbico facultativo debido a una adaptación fisiológica al estrés anóxico (Mendis, 2010). Esta especie es capaz de bioacumular mercurio y metilmercurio por lo que puede ser utilizada como bioindicador de contaminantes marinos (Mendis, 2010).

#### 1.6.3.2.4 Hábitat

Se encuentra en el intermareal entre 1 a 16 m de profundidad. Los adultos habitan preferentemente en sustrato arenoso de tipo fino, alcanzando una profundidad de 5 m aproximadamente, mientras los juveniles arenas fangosas hasta los 16 m (Mendis, 2010).

#### 1.6.3.2.5 Distribución geográfica

Desde Panamá hasta el Golfo de Corcovado (Chile) (Zúñiga, 2003).



## 1.7 Adenovirus (Adv)

### 1.7.1 Morfología y estructura

Los adenovirus son virus icosaedros, desnudos, de aproximadamente 90 nm de diámetro, cuyo virión contiene ADN (13 %), proteínas (87 %) y pequeñas cantidades de carbohidratos (Pina, 2001). La cápside externa está conformada por 252 subunidades de proteínas denominadas capsómeros, de las cuales 240 son hexonas y 12 son pentonas, desde cuya base se proyectan las fibras (ver figura 11) donde se encuentran las glicoproteínas responsables de la adhesión a las células endoteliales y responsables de su capacidad hemaglutinante (Pina, 2001). El genoma de adenovirus es una molécula lineal de ADN de doble cadena y 36 000 pares de bases (pb) aproximadamente (González, 2012).

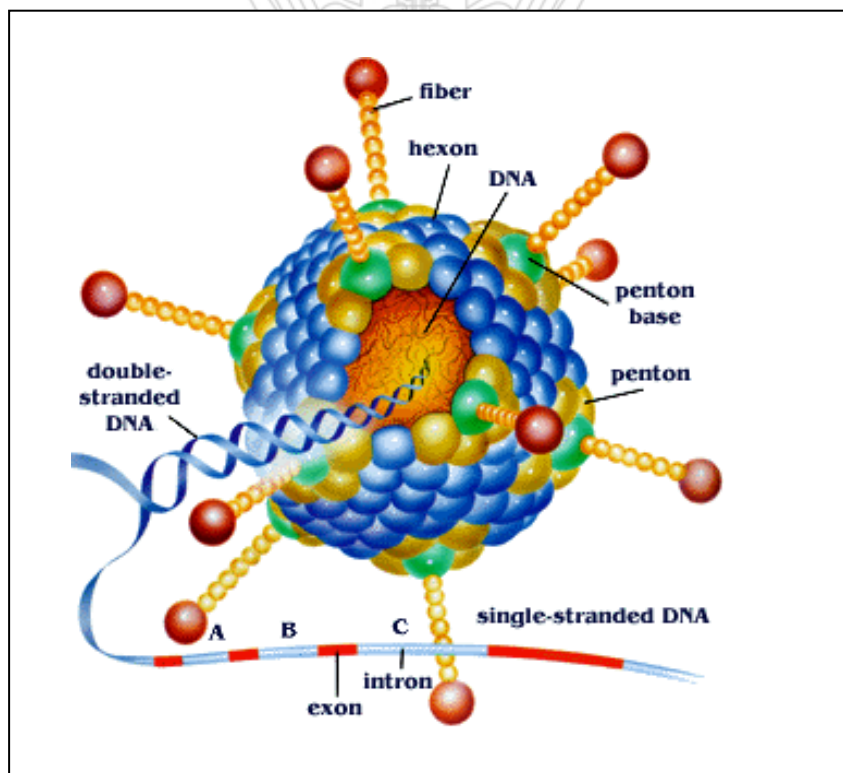


Figura 11. Estructura del adenovirus (González, 2012)

## 1.7.2 Taxonomía y clasificación

Los adenovirus pertenecen a la familia Adenoviridae, que está dividida en cuatro géneros: Aviadenovirus, Mastadenovirus, Siadenovirus y Atadenovirus. (González, 2012). Los adenovirus humanos, se encuentran incluidos dentro del género Mastadenovirus y están subdivididos en 6 especies, de la A – F (Tabla 1), sobre la base de criterios inmunológicos, bioquímicos y de acuerdo a su tropismo, en estas 6 especies están contenidos los 51 serotipos que infectan al hombre.(González, 2012).

Tabla 1. Clasificación del adenovirus humano de acuerdo al tropismo

<b>ESPECIES</b>	<b>SEROTIPOS</b>	<b>TROPISMO</b>
<b>A</b>	12, 18, 31	Intestino
<b>B:1</b>	3, 7, 16, 21	Tracto respiratorio, conjuntiva, tracto intestinal
<b>B:2</b>	11, 14, 34, 35, 50	Tracto urinario, tracto respiratorio
<b>C</b>	1, 2, 5, 6	Tracto respiratorio, tracto intestinal
<b>D</b>	8 – 10, 13, 15, 17, 19, 22 – 30 32, 33, 36 – 39, 42 – 49, 51	Conjuntiva, tracto intestinal
<b>E</b>	4	Tracto respiratorio, conjuntiva
<b>F</b>	40, 41	Intestino

Fuente: González, 2012.

### 1.7.3 Replicación viral

#### 1.7.3.1 Unión a la célula

“Es lento, y toma varias horas. Implica la interacción de la glicoproteína denominada fibra con receptores celulares (moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad clase I y receptores coxsackie – adenovirus)” (Bernaola & Luque, 2002, p.43). Los receptores coxsackie-adenovirus son conocido como CAR por sus siglas en ingles Coxackie and adenovirus receptor (Alba, 2007).

#### 1.7.3.2 Internalización

“Implica la interacción del pentón con las integrinas  $\alpha\beta 3$  y  $\alpha\beta 5$ . La internalización es regulada por segundos mensajeros celulares, que favorecen la progresión del ciclo celular, y la reorganización del citoesqueleto de actina, el cual a su vez jugaría un rol importante en la penetración del virus (endocitosis mediada por clatrina)” (Bernaola & Luque, 2002, p.43).

#### 1.7.3.3 Penetración

“Se da por endocitosis en vesículas revestidas por clatrina. La membrana de la vesícula fagocítica se rompe por acción tóxica del pentón. Se produce entonces la liberación de la partícula viral dentro del citoplasma, con pérdida de proteínas de la cápside y denudamiento del DNA viral” (Bernaola & Luque, 2002, p.43).

#### 1.7.3.4 Migración

“El core migra desde el citoplasma al núcleo vía microtúbulos y el DNA viral entra al núcleo a través de los poros nucleares. Una vez en el núcleo el DNA viral es convertido en un complejo histonas celulares-DNA viral, y pueden iniciar la replicación” (Bernaola & Luque, 2002, p.43). Ver la figura 12.

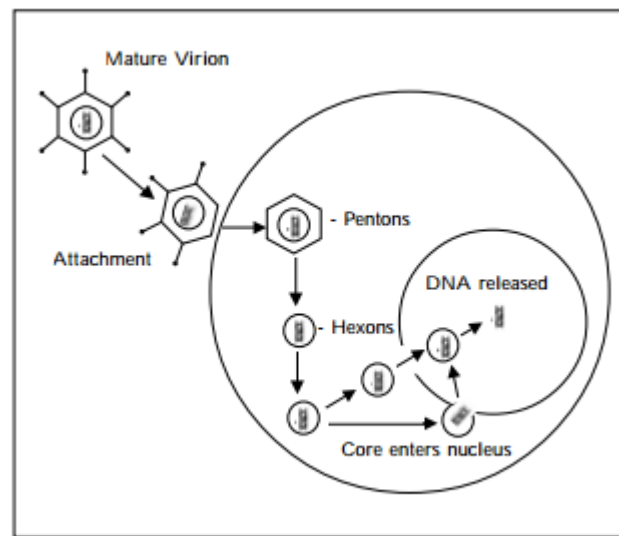


Figura 12. Ingreso del adenovirus al núcleo (Bernaola & Luque, 2002)

#### 1.7.3.5 Replicación

“La replicación del DNA ocurre en el núcleo, la proteína viral (TP) actúa como primer o cebador (Figura 13). Dos proteínas más codificadas por el virus participan en la replicación: Ad DBP y Ad DNA pol. Además tenemos proteínas celulares en el núcleo que participan en la replicación del genoma viral. Se producen además durante la replicación viral las siguientes proteínas: Proteínas tempranas inmediatas: E1A, proteínas tempranas: E1B, E2A, E2B, E3, E4 y proteínas tardías: proteínas virales” (Bernaola & Luque, 2002, p.43). Tal como se observa en la figura 13.

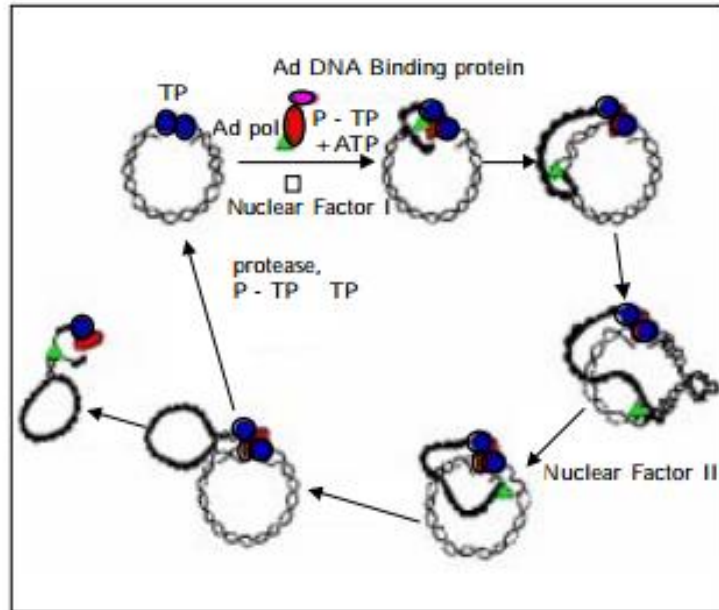


Figura 13. Replicación del adenovirus (Bernaola & Luque, 2002)

#### 1.7.4 Epidemiología

Las infecciones por Adenovirus ocurren a nivel mundial, de forma endémica, esporádica y epidémica. De manera general estos patrones correlacionan bien con el serotipo viral y la edad de la población susceptible, que en el 80 % de los casos suelen ser los niños menores de 4 años (Pina, 2001). Aunque el hospedero tiene la capacidad de eliminar la infección generando una respuesta inmune potente, el hecho de que esta respuesta sea serotipo-específica, hace posible que individuos de todas las edades puedan infectarse con diferentes serotipos de Adenovirus a lo largo de toda la vida (Gonzales, 2012). Los adenovirus serotipos 40 y 41 se han demostrado ser los segundos agentes etiológicos más importantes de gastroenteritis (sólo superada por rotavirus), responsables de 4-20 % de gastroenteritis en los niños menores de 5 años de edad, que pueden excretar  $10^{11}$  partículas de virus por gramo de heces durante la infección (McMinn, 2013). “En países como China, Guatemala y Estados Unidos se han reportado del 5 al 18 % de infecciones causadas por este agente viral y en menor porcentaje (2

%) en Tailandia y Brasil” (García *et al.*, 2015).

### 1.7.5 Morbilidad y mortalidad

Las enfermedades que los adenovirus causan en el humano tienen un variado espectro clínico que depende sustancialmente del serotipo infectante (Stroparo *et al.*, 2010) Este espectro es amplio, con un rango que incluye desde la infección asintomática, infección respiratoria (leve, moderada y severa), conjuntivitis, miocarditis, cistitis hemorrágica, meningoencefalitis, hepatitis y gastroenteritis (González, 2012).

En muchos pacientes la enfermedad es localizada (gastroenteritis, Infecciones del tracto urinario, Infecciones del tracto respiratorio), pero la diseminación ocurre entre el 10 y el 30 % de los casos, con una tasa de mortalidad de hasta un 26 % de forma general, pero que puede ser mucho más elevada en los casos de neumonía (73 %) y de Enfermedad diseminada (61 %) (Weigt *et al.*, 2011). La mortalidad se correlaciona con un aumento en la carga viral en plasma, linfopenia severa, aislamiento viral en más de un sitio y enfermedad severa del injerto contra el huésped (González, 2012).

### 1.7.6 Dinámica viral en el medio ambiente

En las zonas cercanas a grandes núcleos de población, entre ellas lagos, ríos y demás medios acuáticos, se recibe aportes de grandes concentraciones de virus que son excretados por el hombre y otros animales a través de las heces y la orina de individuos infectados (figura 14), incluso sin que presenten signos de enfermedad aparentes. La duración del periodo de excreción fecal depende del virus. Los adenovirus entéricos se encuentran en las heces 7-14 días después del inicio de la sintomatología clínica, entre 3-4 días en el caso de rotavirus pudiendo llegar a excretarse hasta  $10^{11}$  partículas de rotavirus por gramo. En el caso de poliovirus, la excreción comienza a las 24 h del inicio de la infección y se prolonga durante varios meses. La concentración de estos virus en las aguas residuales puede llegar a ser de  $10^5$  UFC/l (Pina, 2001).

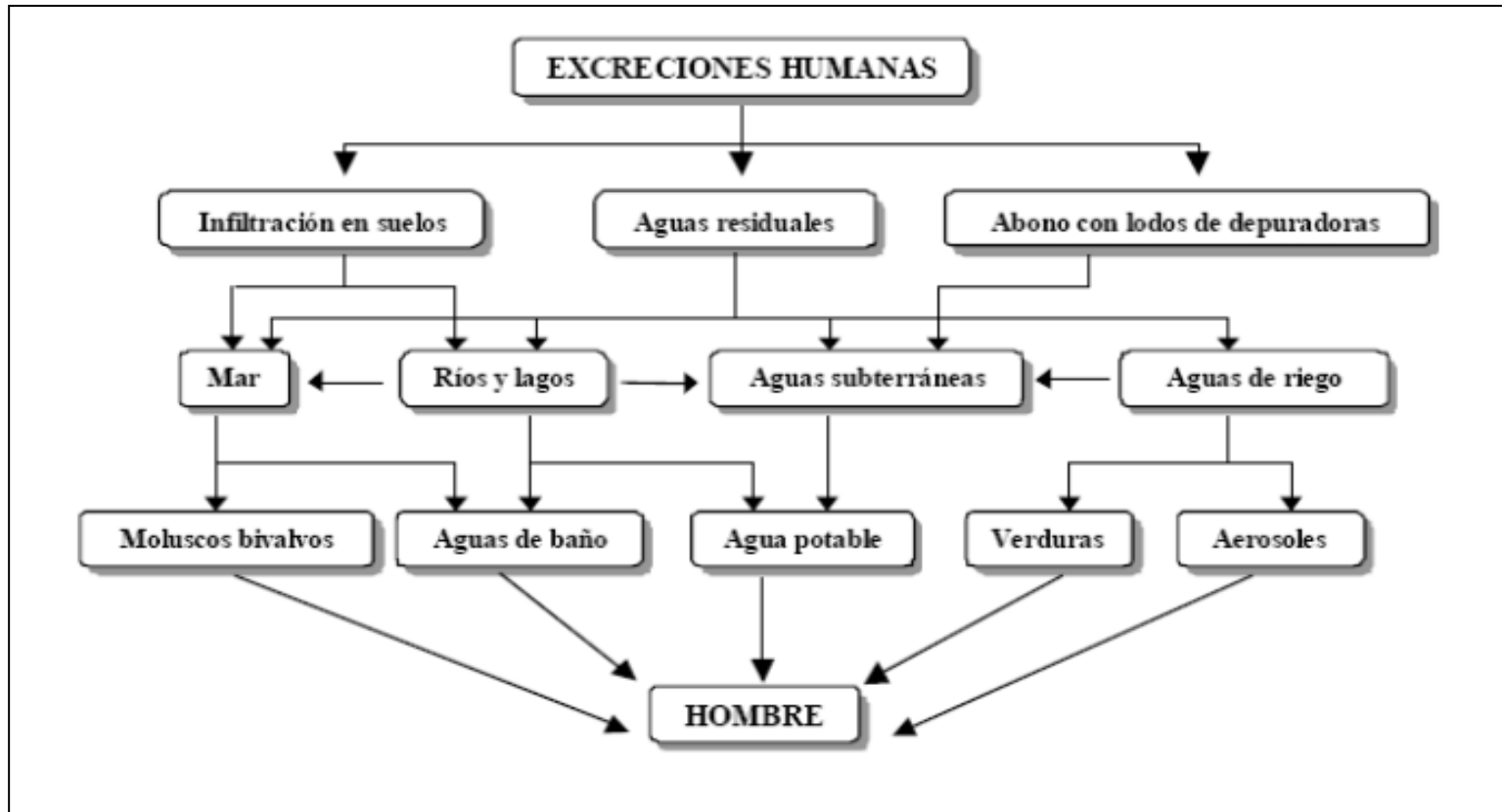


Figura 14. Dinámica viral en el medio ambiente (Pina, 2001)

### 1.7.7 Efectos de las condiciones medioambientales sobre el adenovirus

Los adenovirus por su característica de ser virus desnudos, son resistentes a los solventes orgánicos como el éter y el cloroformo, además son capaces de sobrevivir por largos períodos en medios líquidos o en superficies (Horwitz, 2001). Así mismo son estables a pH 3, resistentes a las enzimas intestinales y se replican en las células epiteliales del intestino (Rodríguez, 2012).

## 1.8 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

### 1.8.1 Fundamento

La técnica se basa en la replicación del ADN en los organismos eucariotas realizada por la ADN polimerasa. Esta enzima realiza la síntesis de una cadena complementaria de ADN en sentido 5`-3` usando un molde de cadena sencilla, pero a partir de una región de doble cadena. Para crear esta región de doble cadena, se utilizan los denominados iniciadores (primers). Estos son una pareja de oligonucleótidos diseñados de tal manera que sean complementarios a cada uno de los extremos del fragmento de ADN que se quiere amplificar. Este proceso se lleva a cabo mediante ciclos alternados de temperaturas altas y bajas, que permiten separar las hebras de ADN formadas entre si tras cada fase de replicación y, la unión nuevamente de estas hebras con la polimerasa para que vuelvan a duplicarse. Todo el proceso de la PCR está automatizado mediante un aparato llamado termociclador, el cual permite calentar y enfriar los tubos de reacción controlando la temperatura necesaria para cada etapa de la reacción. La automatización del proceso se debe al descubrimiento de la enzima Taq polimerasa termoestable, extraída del *Thermus aquaticus*, que eliminó el inconveniente de agregar enzima fresca en cada paso de la reacción. (Rodríguez & Barrios, 2009, p.2)

## 1.8.2 Características de la PCR

Rodríguez & Barrios (2009) afirma: “La Reacción en Cadena de la Polimerasa, conocida como PCR por sus siglas en inglés (Polymerase Chain Reaction), desarrollada en 1983 por Kary Mullis que permite la síntesis (in Vitro) de secuencias específicas de ácido desoxirribonucleico (ADN)” (p.2).

### 1.8.2.1 Sensibilidad

La sensibilidad analítica (o límite de detección) se define como la cantidad más pequeña de copias de genomas de agentes infecciosos que puede detectarse y distinguirse a partir de un resultado cero. Para determinar la sensibilidad analítica se utiliza una dilución de punto final hasta que el ensayo ya no pueda detectar la diana en cuestión en más del 5 % de las réplicas (2 desviaciones estándar). Los fragmentos clonados de los productos de la PCR en estudio se pueden usar como muestras estándar, bien como ADN o para dianas de ARN, transcribiéndose el ARN in vitro a ADN. La especificidad analítica se define como la capacidad de un ensayo para distinguir entre el agente diana y otros agentes infecciosos. Esa capacidad se determina analizando los patógenos estrechamente relacionados mediante la prueba en cuestión (Chapter, 2006).

### 1.8.2.2 Especificidad

“Los productos de la PCR o amplicones están representados mediante bandas de un tamaño específico y se comparan con un marcador de peso molecular conocido para determinar la especificidad de la reacción. Se cuantifica mediante el número de pares de bases (pb)” (Tamay de Dios *et al.*, 2013, p.74).

### 1.8.3 Componentes de la PCR

#### 1.8.3.1 Desnaturalización

“En esta etapa, las cadenas de ADN son calentadas y separadas a una temperatura de 95 °C durante 20-30 segundos; el tiempo depende de la secuencia del templado, es decir, si la cantidad de G-C es alta, será necesario más tiempo para romper sus uniones debido a que el apareamiento de estas bases está formado por tres enlaces, uno más que las bases de A-T. Además, depende de la velocidad en la que el termociclador aumenta la temperatura, esto varía de acuerdo al modelo del equipo. Al final de esta etapa tendremos las cadenas separadas que servirán como templado para el siguiente paso” (Tamay de Dios *et al.*, 2013, p.72).

#### 1.8.3.2 Alineamiento

“En esta etapa, los primers se alinean al extremo 3' del templado previamente separado e hibridan con su secuencia complementaria. Para que se forme el complejo templado-primers, es importante que la temperatura de hibridación o temperatura melting ( $T_m$ ) sea la óptima; ésta generalmente oscila entre 50-60 °C. Si el diseño de los primers es el correcto y la temperatura es la adecuada, la estabilidad y especificidad del complejo será eficiente” (Tamay de Dios *et al.*, 2013, p.72).

#### 1.8.3.3 Extensión

“En esta etapa, la Taq polimerasa actúa sobre el complejo templado-primers y empieza su función catalítica a una velocidad muy rápida; agrega dNTP's complementarios para crear las cadenas completas de ADN. La extensión de las cadenas es en dirección de la síntesis del ADN, es decir, de 5' a 3'. La temperatura óptima para la reacción es de 72 °C, ya que a esa temperatura la enzima es funcional. Al final del ciclo, se habrán formado los amplicones con

un tamaño dictado por el número total de pares de bases (pb) que deberá ser conocido por el investigador” (Tamay de Dios *et al.*, 2013, p.73).

#### 1.8.4 Tipos de PCR

##### 1.8.4.1 PCR anidada

En los ensayos de la PCR anidada se utilizan dos ciclos de amplificación con cuatro cebadores, denominados cebadores externos e internos. En general, si se comparan las pruebas de PCR anidada con las pruebas de PCR simple, las primeras proporcionan una sensibilidad y especificidad analíticas superiores. La sensibilidad analítica típica es  $< 10$  copias de genoma del agente infeccioso, y la especificidad analítica también aumenta porque, en la PCR anidada, cuatro oligonucleótidos tienen que unirse específicamente a las dianas seleccionadas para producir una reacción positiva (Chapter, 2006).

##### 1.8.4.2 PCR múltiple

En la PCR múltiple se pueden detectar y diferenciar de forma simultánea varios agentes infecciosos en un único recipiente de reacción individual. Se ha descrito que la técnica de la PCR “clásica” también es útil para el desarrollo de sistemas múltiples. Sin embargo, el empleo de los métodos de la PCR anidada “clásica” para la construcción de un ensayo múltiple resulta complicado debido al gran número de cebadores que pueden “competir” entre sí en la misma mezcla reactiva. En contraste con lo anterior, el concepto de la PCR en tiempo real (pares de cebadores únicos) proporciona excelentes posibilidades para la construcción de sistemas múltiples muy sensibles (Elnifro *et al.*, 2000).

#### 1.8.4.3 PCR con transcriptasa inversa (RT-PCR)

Los genomas de muchos agentes infecciosos contienen ácido ribonucleico (ARN) que no se puede amplificar directamente mediante PCR. Para la amplificación por PCR, se necesita un ADN diana de doble cadena, pero ésta no está disponible en los virus de ARN. Ese problema puede resolverse mediante la introducción de un estadio previo antes de comenzar la PCR. Mediante la utilización de transcriptasa inversa, es posible transcribir el ARN a ADN complementario (ADNc), que es ADN de doble cadena, y por ello puede utilizarse en ensayos PCR (el procedimiento se denomina RT-PCR). Tradicionalmente, la reacción de la transcripción inversa se realiza en un tubo aparte, y el ADNc producido se transfiere después a un tubo nuevo para la reacción de la PCR. Sin embargo, ya se dispone de ADN - polimerasas termoestables y con actividad de transcriptasa inversa. La utilización de estas enzimas en tampones específicos posibilita que la reacción propia de la RT-PCR tenga lugar en el mismo tubo en secuencia directa, sin manipulación adicional (Chapter, 2006).

#### 1.8.4.4 PCR en tiempo real (qPCR)

La PCR en tiempo real es una amplificación en la que los productos de la PCR se detectan de forma directa durante los ciclos de amplificación utilizando sondas marcadas con fluorescencia. Diversos métodos en tiempo real, tales como los que se realizan con las sondas fluorescentes TaqMan o Molecular Beacon, se han convertido en herramientas populares para la detección de agentes infecciosos. La PCR en tiempo real se ha utilizado para la detección de bacterias, virus o parásitos de una amplia variedad de especies animales. Estos nuevos ensayos tienen varias ventajas sobre los métodos “clásicos” de la PCR simple o anidada. Sólo se utiliza un par de cebadores, aportando una sensibilidad que a menudo está próxima o es igual a la PCR anidada tradicional, pero con un riesgo de contaminación mucho más bajo. La fluorescencia, que indica la presencia del producto amplificado, se mide a través de la tapa o

del lado del recipiente de reacción, de forma que no es necesario el manejo posterior de los productos de la PCR. Estos procedimientos llevan un tiempo considerablemente menor si se compara con la detección tradicional de los productos de la PCR en geles de agarosa, seguidos de la tinción con bromuro de etidio, con lo que, de nuevo, se reduce el riesgo de contaminación. En comparación con los métodos clásicos de amplificación, una ventaja adicional de la técnica de la PCR en tiempo real es que es posible realizar ensayos cuantitativos (Mackay *et al.*, 2002).

### **1.9 Espectrofotometría de ácidos nucleicos**

El ADN puede cuantificarse directamente en forma diluida, midiendo la absorbancia  $A$  (o densidad óptica, DO) de luz ultravioleta. Si la muestra es pura, es decir, no contiene cantidades significativas de contaminantes como proteínas, fenol o agarosa, la medición espectrofotométrica de la irradiación ultravioleta absorbida por las bases es sencilla y exacta. En este método, los tampones acuosos con escasa concentración iónica (por ejemplo, tampón TE) resultan idóneos. La concentración de ácidos nucleicos suele determinarse midiendo a 260 nm y comparando con un blanco. La interferencia de contaminantes puede determinarse calculando un «cociente». Dado que las proteínas absorben a 280 nm, se emplea el cociente  $A_{260}/A_{280}$  para calcular la pureza de los ácidos nucleicos. Los cocientes respectivos del ADN puro es aproximadamente de 1,8 y 2,0. Una absorción a 230 nm significa que la muestra está contaminada con hidratos de carbono, péptidos, fenoles, compuestos aromáticos u otras sustancias. El cociente  $A_{260}/A_{230}$  de las muestras puras es de 2,2 aproximadamente. (Somma *et al.*, 2007)

### 1.10 Electroforesis de ácidos nucleicos

Al final de la PCR, para saber si la reacción transcurrió eficientemente, los amplicones son visualizados a través de una electroforesis en gel de agarosa. La electroforesis consiste en la separación de grandes moléculas como los ácidos nucleicos a través de una matriz sólida que funciona como un filtro para separar las moléculas en un campo eléctrico de acuerdo a su tamaño y carga eléctrica, esta separación se hace bajo un buffer o tampón. En el caso de los ácidos nucleicos, el grupo fosfato les proporciona la carga negativa, por lo que durante la electroforesis migran hacia el polo positivo. Cuando los amplicones son corridos en el gel, éstos deben ser cargados junto con un marcador molecular que contenga un número determinado de segmentos de ADN conocidos, lo que facilita la identificación de los amplicones. El tamaño está dado por el número de pares de bases del amplicón. Posteriormente a la electroforesis se agrega al gel un compuesto conocido como bromuro de etidio, una molécula intercalante capaz de unirse al ADN de doble cadena, para la visualización de los amplicones. Se introduce en una maquina llamada fotodocumentador, el cual toma una foto digital al gel de agarosa expuesto a luz UV. Cuando es excitado con luz UV emite una señal que permite la visualización de los amplicones en forma de bandas. Es importante manipular con mucho cuidado el bromuro de etidio porque se sabe que es mutagénico y teratógeno (Tamay de Dios *et al*, 2013).

## CAPITULO III

### METODOLOGÍA DE TRABAJO

#### 1.11 Materiales, equipos y reactivos

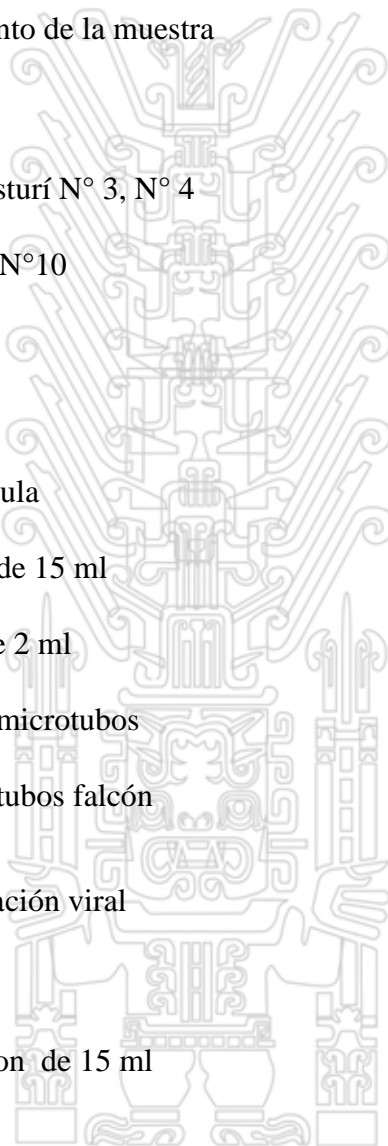
##### 1.11.1 Materiales

##### 1.11.1.1 Relativos al procesamiento de la muestra

- Tijeras
- Mangos de bisturí N° 3, N° 4
- Bisturí N°20, N°10
- Placas Petri
- Pinzas
- Cuchara espátula
- Tubos falcón de 15 ml
- Microtubos de 2 ml
- Gradilla para microtubos
- Gradilla para tubos falcón

##### 1.11.1.2 Relativos a la contaminación viral

- Tips
- Tubos falcon de 15 ml
- Pipetas
- Crioviales



#### 1.11.1.3 Relativos a la extracción de ácidos nucleicos

- Tips de 20  $\mu$ l, 100  $\mu$ l, 1000  $\mu$ l
- Micropipeta de 20  $\mu$ l, 100  $\mu$ l, 1000  $\mu$ l
- Microtubos de 1,5 ml y 2 ml
- Gradilla para microtubos

#### 1.11.1.4 Relativos a la espectrofotometría

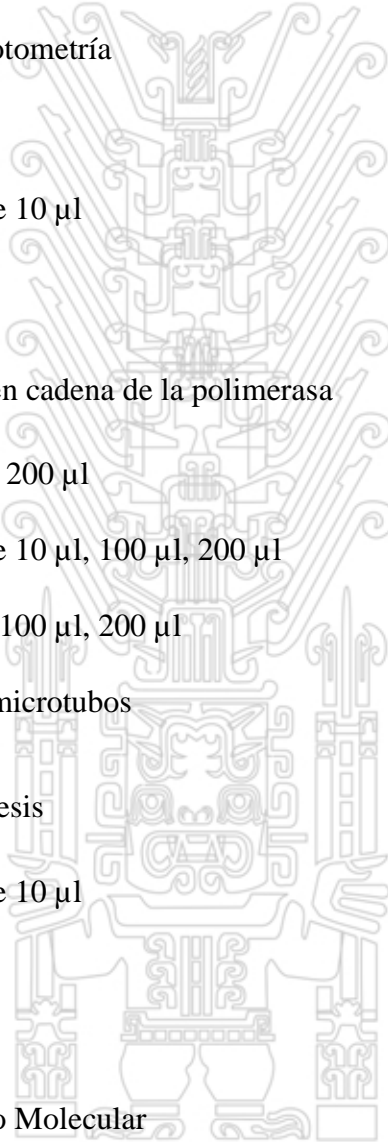
- Papel lente
- Micropipeta de 10  $\mu$ l
- Tips de 10  $\mu$ l

#### 1.11.1.5 Relativos a la reacción en cadena de la polimerasa

- Microtubos de 200  $\mu$ l
- Micropipeta de 10  $\mu$ l, 100  $\mu$ l, 200  $\mu$ l
- Tips de 10  $\mu$ l, 100  $\mu$ l, 200  $\mu$ l
- Gradilla para microtubos

#### 1.11.1.6 Relativos a la electroforesis

- Micropipeta de 10  $\mu$ l
- Tips de 10  $\mu$ l
- Parafilm
- Agarosa Grado Molecular



## 1.11.2 Equipos

### 1.11.2.1 Relativos al procesamiento de la muestra

- Homogeneizador de tejidos TH (Omni International, USA)
- Balanza analítica (Ohaus, USA)

### 1.11.2.2 Relativos a la contaminación viral

- Tanque nitrógeno líquido (Taylor Warton, USA)
- Cabina de flujo laminar (Air Clean, USA)

### 1.11.2.3 Relativos a la extracción de ácidos nucleicos

- Baño maría (Thomas Scientific, USA)
- Centrifugadora Mini Spin (Eppendorf, Alemania)
- Agitador vortex (Thermo scientific, USA)
- Equipo de extracción de ácidos nucleicos MiniMAG (Biomeriux, Francia)

### 1.11.2.4 Relativos a la espectrofotometría

- Espectrofotómetro de microvolúmenes Nanodrop 2000 (Thermo scientific, USA)

### 1.11.2.5 Relativos a la reacción en cadena de la polimerasa

- Termociclador Veriti 96 (Applied Biosystem, USA)

### 1.11.2.6 Relativos a la electroforesis

- Equipo de electroforesis horizontal (BioRad, USA)
- Fotodocumentador Gel Doc XR System (BioRad, USA)

### 1.11.3 Reactivos

#### 1.11.3.1 Relativos a la extracción de ácidos nucleicos

- Proteinasa K
- Buffer de lisis NucliSens (Biomeriux, France)
- Kit de extracción de ácidos nucleicos NucliSens (Biomeriux, France)

#### 1.11.3.2 Relativos a la espectrofotometría

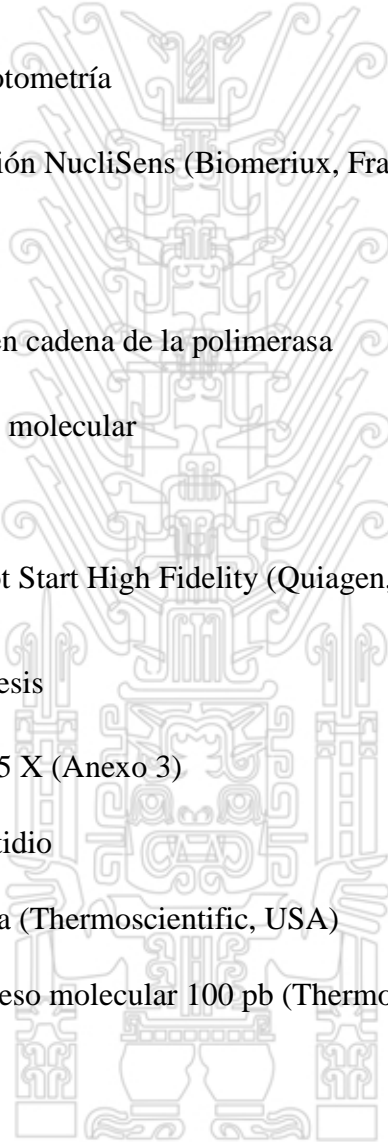
- Buffer de elución NucliSens (Biomeriux, France)

#### 1.11.3.3 Relativos a la reacción en cadena de la polimerasa

- Agua de grado molecular
- Cebadores
- Polimerasa Hot Start High Fidelity (Quiagen, USA)

#### 1.11.3.4 Relativos a la electroforesis

- Buffer TBE 0.5 X (Anexo 3)
- Bromuro de Etidio
- Buffer de carga (Thermoscientific, USA)
- Marcador de peso molecular 100 pb (Thermoscientific, USA)



## 1.12 Procedimiento

### 1.12.1 Ubicación

Los análisis se realizaron en el área de Biología Molecular del Instituto Tecnológico de la Producción (ITP) ubicado en la Carretera a Ventanilla Km. 5.2 en la provincia constitucional del Callao.

### 1.12.2 Muestreo

Las muestras usadas en estas investigación fueron donadas por el Servicio Nacional de Sanidad Pesqueras (SANIPES), las cuales son correspondientes a los muestreos realizados en el litoral peruano como parte del control de inocuidad alimentaria en moluscos bivalvos para exportación según la Norma Sanitaria de Moluscos Bivalvos, aprobada mediante D. S. N°07-2004 PRODUCE.

### 1.12.3 Extracción del hepatopáncreas

Se procedió a extraer manualmente el hepatopáncreas de las muestras de *Argopectum purpuratum*, *Tagelus dombeii* y *Gary sólida* en condiciones de esterilidad (Figura 15), y se homogenizo de forma eléctrica (Figura 16) hasta obtener un pool de todos los individuos. El pool de hepatopancras se conservó a -20 °C hasta su análisis.

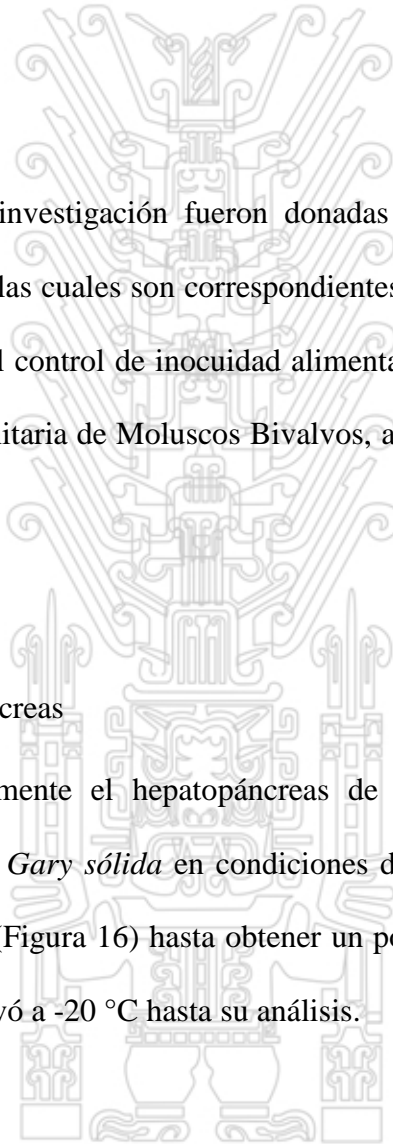




Figura 15. Extracción de hepatopáncreas (elaboración propia)

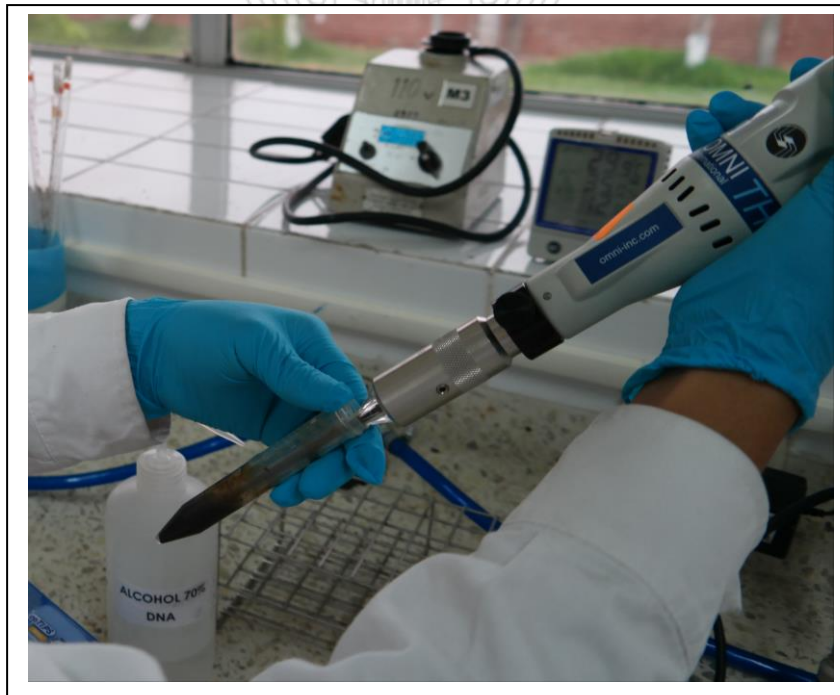


Figura 16. Homogenización del hepatopáncreas (Elaboración propia)

#### 1.12.4 Virus control

Como control de calidad se usó la cepa viral de Adenovirus 40 ATCC® VR-931 y Adenovirus 41 ATCC® VR-930. Estas cepas virales tenían un título de  $5 \times 10^3$  partículas virales/ml cada uno.

#### 1.12.5 Inoculación artificial

El pool de hepatopáncreas procesado de las muestras de *A. purpuratus* se confirmó negativo para adenovirus 40 y 41 por PCR. Este pool se dispuso en microtubos de 2 ml a razón de 25 mg/tubo. Para la inoculación artificial se realizó 3 diluciones logarítmicas de los stocks de adenovirus 40 y 41 en PBS. Se procedió a inocular 100  $\mu$ l de cada dilución viral en los microtubos con el pool de hepatopáncreas y se agitó vigorosamente. Esta inoculación se realizó por quintuplicado, como control negativo se utilizó PBS.

#### 1.12.6 Detección de adenovirus mediante PCR

Para la detección de Adenovirus 40 y 41 en las muestras colectadas se procedió a la extracción del ADN a partir del cual se corrieron muestras para la amplificación de un fragmento del gen que codifica el hexón de los adenovirus 5, 40 y 41.

##### 1.12.6.1 Extracción de ácidos nucleicos

La extracción de ácidos nucleicos se realizó en base a la metodología usada en el QIAamp™ mini kit (Quiagen, Alemania). En resumen, se añadieron proteinasa K y 200  $\mu$ l de tampón AL y la muestra se incubó a 56 °C. Después de la incubación, se añadieron 200  $\mu$ l de etanol al 95 %. La muestra se transfirió a una columna QIAamp y se centrifugó. El filtrado se desechó. La

columna se lavó una vez con tampón AW1 y luego con tampón AW2. El ADN se eluyó en 100 µl de tampón AE. Posteriormente se cuantifico y evaluó la calidad del material genético mediante electroforesis con un gel de calidad (agarosa al 2 %) teñido con bromuro de etidio. Las muestras de ADN se conservaron a -20 °C hasta su análisis. Se cuantifico la concentración de DNA en un Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, USA).

#### 1.12.6.2 Iniciadores

Se utilizaron iniciadores para la amplificación del fragmento del gen que codifica el Hexon de adenovirus 40 y 41; descrito por Hernroth *et al.* (2002) el cual se describe en la tabla 2.

Tabla 2. Iniciadores para la amplificación del fragmento del gen que codifica el Hexon de los adenovirus 40 y 41

Iniciadores	Posición	Secuencia
HAdF	18 868 – 18 887	5´-CWTACATGCACATCKCSGG-3´
HAdR	18 919 - 18 938	5´-CRCGGGCRAAYTGCACCAG-3´

Fuente: Hernroth *et al.*, 2002

#### 1.12.6.3 Controles

Como control positivo se utilizó DNA de la cepa viral de Adenovirus 40 ATCC® VR-931 y Adenovirus 41 ATCC® VR-930, como control negativo DNA de H-1 parvovirus (ATCC® VR-356™). Adicionalmente se utilizó como blanco un tubo sin DNA como control del sistema.

#### 1.12.6.4 Condiciones de PCR

El programa de amplificación consistió en: un ciclo a 95 °C durante 5 min, 35 ciclos de 1 minuto de desnaturalización a 94 °C, 1 min de hibridación-extensión a 60 °C, una extensión de 1 min a 72 °C, finalmente un ciclo a 72 °C durante 1 minuto como previsión y se almacena a 4 °C.

El tiempo total de análisis fue de 2 horas. El programa fue implementado en un termociclador modelo Veriti™ 96-well (Applied Biosystems, USA).

#### 1.12.6.5 Mezcla de reacción de la PCR

Para la reacción de amplificación se utilizaron las siguientes cantidades de reactivos: 5 ul de buffer 5X, 1 ul de primer HAd (Forward + Reverse) a una concentración de 900 nM, 0,2 ul de HotStarTaq DNA polimerasa (Quiagen, Alemania) y 12,8 ul de agua grado molecular. Las reacciones fueron preparadas en tubos Eppendorf libres de nucleasas.

#### 1.12.7 Electroforesis en geles de agarosa

Los productos de la PCR se analizaron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 2,0 %. Se utilizó TBE 0,5X como buffer de corrida, el gel se corrió a 90 V durante 40 min aproximadamente, posteriormente se tiñó con bromuro de etidio a una concentración de 1.0  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  para su observación en el fotodocumentador de geles *Gel Doc XR System* utilizando el sistema de visualización *Image Lab Software*.

### 1.12.8 Especificidad y sensibilidad

Para determinar la especificidad, los iniciadores para la amplificación del gen Hexon para Adenovirus 40 y Adenovirus 41 fue evaluado con DNA proveniente de H-1 parvovirus (ATCC® VR-356™), con el fin de descartar amplificaciones específicas mediante PCR. Para determinar la sensibilidad del método las muestras inoculadas artificialmente con diluciones de Adenovirus 40 y Adenovirus 41, estas fueron analizadas mediante la técnica de PCR.

### 1.12.9 Análisis estadístico

#### 1.12.9.1 Cálculo de especificidad y sensibilidad

El cálculo especificidad (E) y sensibilidad (S) se realizó utilizando la tabla 2x2, que compara los resultados de la prueba en las muestras inoculadas y muestras no inoculadas. En la tabla 3 se detalla el procedimiento seguido para el cálculo.

Tabla 3. Tabla 2x2 para comparar los resultados de la PCR en muestras inoculadas y no inoculadas

		Muestras probadas		
		Inoculada	No inoculada	Total
Resultado de PCR	Positiva	A	b	a + b
	Negativa	C	d	c + d
	Total	a + c	b + d	n

Kolimon (1990)

En donde:

$$E = d / (b + d)$$

$$S = a / (a + c)$$

#### 1.12.9.2 Incidencia de adenovirus

Se realizó mediante el programa STATA 12. Con lo cual se obtuvo la frecuencia y el porcentaje de muestras contaminadas por Adenovirus en relación a la especie de molusco analizada.

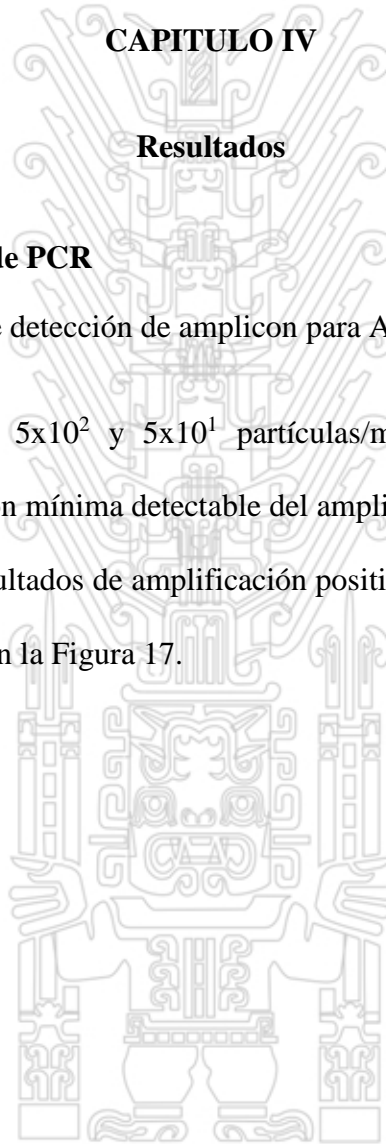
## CAPITULO IV

### Resultados

#### 1.13 Validación de la técnica de PCR

##### 1.13.1 Concentración mínima de detección de amplicon para ADV 40

De las tres diluciones ( $5 \times 10^3$ ,  $5 \times 10^2$  y  $5 \times 10^1$  partículas/ml) que se realizaron para la determinación de la concentración mínima detectable del amplicón por la técnica de PCR para Adenovirus 40, se generaron resultados de amplificación positivos para las diluciones  $5 \times 10^3$  y  $5 \times 10^2$  (70 pb) como se observa en la Figura 17.



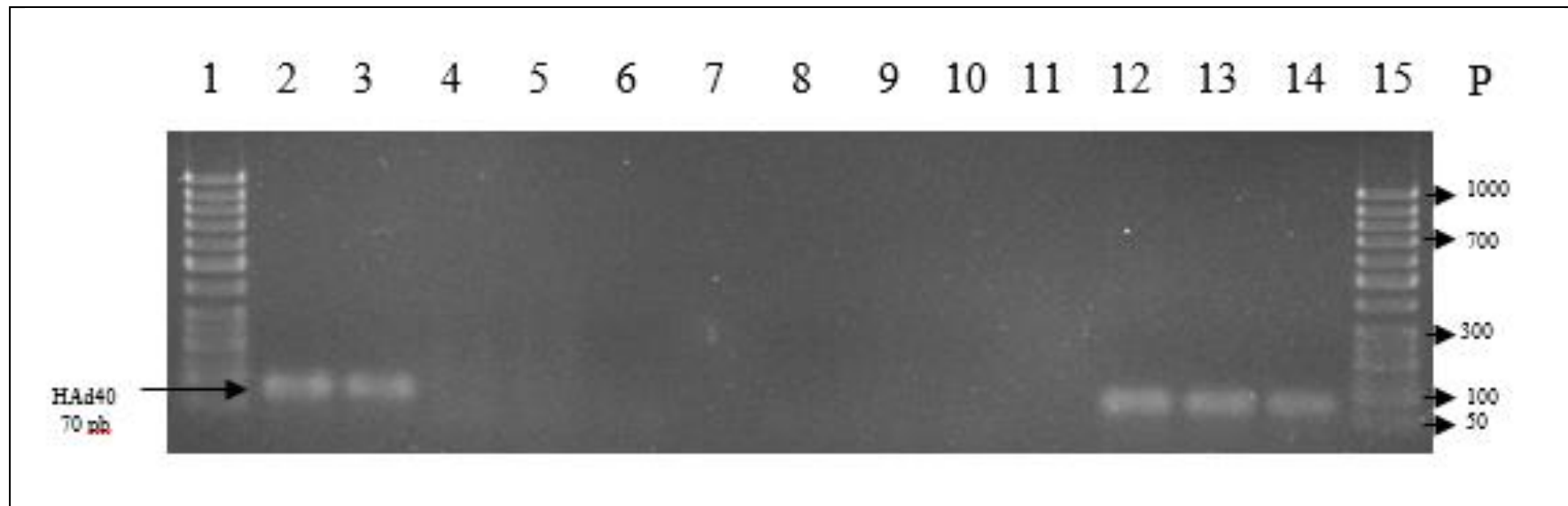


Figura 17. Prueba de detección mínima de DNA por la PCR para el gen Had para la sepa viral Adenovirus 40 (Elaboración propia)

Por electroforesis en gel de agarosa al 2 %. Pozos: 1) Marcador GeneRuler 50 pb (Thermo Scientific, USA), 2) Dilución  $5 \times 10^3$ , 3) Dilución  $5 \times 10^2$ , 4) Dilución  $5 \times 10^1$ , 5) Blanco, 6) H<sub>2</sub>O, 12) Positivo  $5 \times 10^3$ , 13) Positivo  $5 \times 10^2$ , 14) Positivo  $5 \times 10^1$ , 15) Marcador GeneRuler 50 pb. Así mismo, se puede observar una reducción en el tamaño de las bandas de amplificación entre dilución  $5 \times 10^3$  y  $5 \times 10^2$ .

### 1.13.2 Especificidad y sensibilidad relativa para ADV 40

Se obtuvo un 66.6 % en la especificidad del iniciador del (70 pb) en las muestras inoculadas y no inoculadas con Adenovirus 40 ATCC® VR-931 y analizadas mediante PCR (Figura 18).

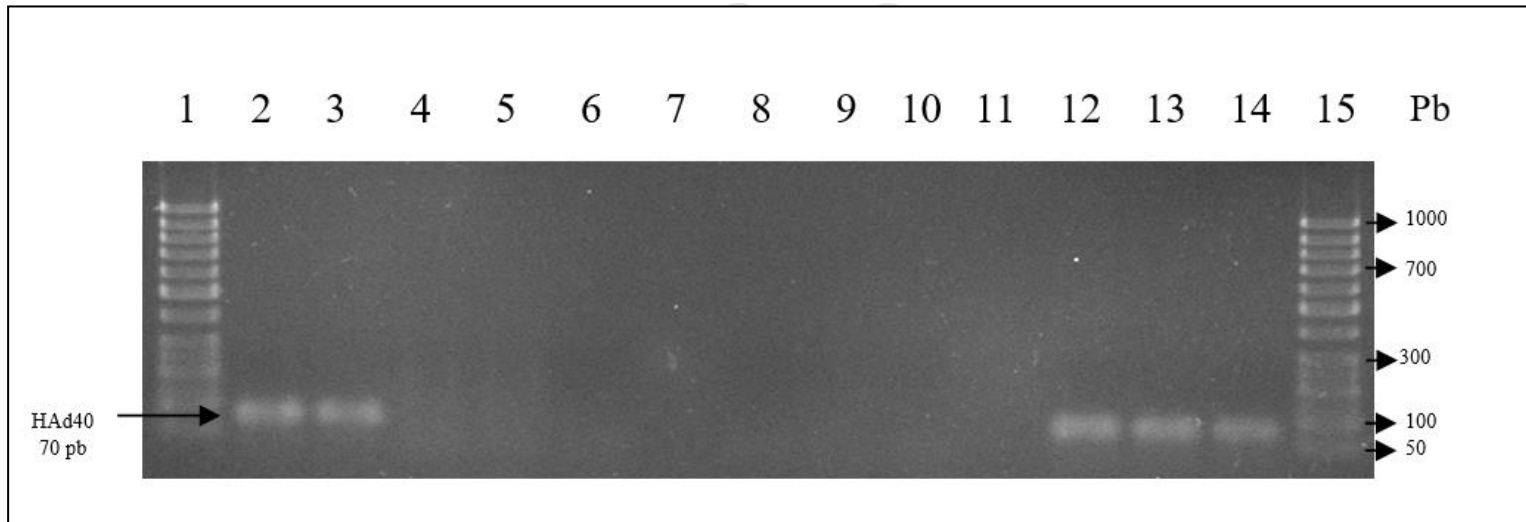


Figura 18. Prueba de especificidad del iniciador del gen HAd para la cepa viral Adenovirus 40 (Elaboración propia)

Por electroforesis en gel de agarosa al 2 %. Pozos: 1) Marcador GeneRuler 50 pb (Thermo Scientific, USA), 2) Dilución  $5 \times 10^3$ , 3) Dilución  $5 \times 10^2$ , 4) Dilución  $5 \times 10^1$ , 5) Blanco, 6)  $H_2O$ , 7-11) DNA de H-1 parvovirus, 12) Positivo  $5 \times 10^3$ , 13) Positivo  $5 \times 10^2$ , 14) Positivo  $5 \times 10^1$ , 15) Marcador GeneRuler 50 pb. En la Figura 18 se puede observar que no hubo amplificación del gen HAd para las muestras de DNA de H-1 parvovirus, lo que prueba la especificidad de estos indicadores.

En la tabla 4 se percibe que de todas las muestras inoculadas a Adenovirus 40 solo 10 fueron positivas y las muestras que no fueros inoculados fueron negativas a la presencia del virus.

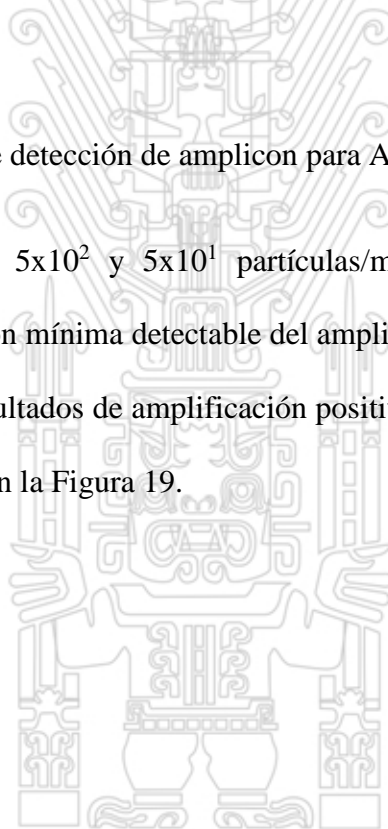
Tabla 4. Especificidad y sensibilidad de la PCR para detección de ADV 40

Muestras probadas				
Resultado de PCR		Inoculada	No inoculada	Total
	Positiva	10	0	10
	Negativa	5	6	11
	Total	15	6	21
E	100 %	S	66,6 %	

E: Especificidad; S: Sensibilidad (Elaboración propia)

### 1.13.3 Concentración mínima de detección de amplicon para ADV 41

De las tres diluciones ( $5 \times 10^3$ ,  $5 \times 10^2$  y  $5 \times 10^1$  partículas/ml) que se realizaron para la determinación de la concentración mínima detectable del amplicón por la técnica de PCR para Adenovirus 41, se generaron resultados de amplificación positivos para las diluciones  $5 \times 10^3$  y  $5 \times 10^2$  (70 pb) como se observa en la Figura 19.



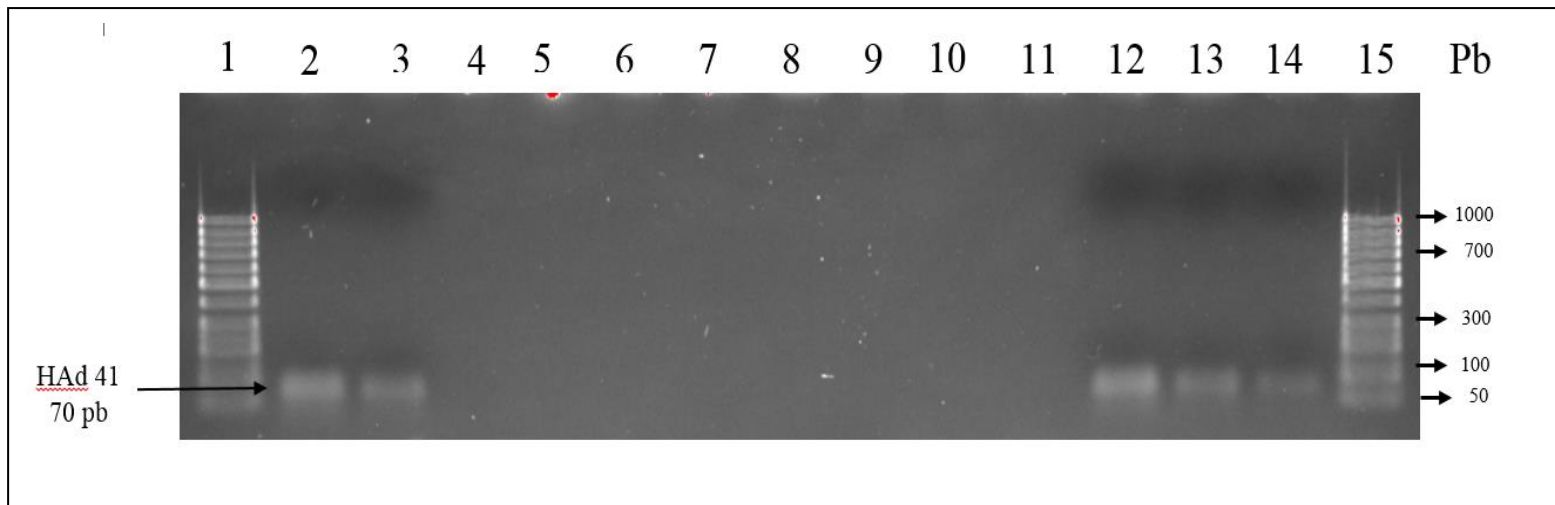


Figura 19. Prueba de detección mínima de DNA por la PCR para el gen Had para la cepa viral Adenovirus 41 (Elaboración propia)

Por electroforesis en gel de agarosa al 2 %. Pozos: 1) Marcador GeneRuler 50 pb (Thermo Scientific, USA), 2) Dilución  $5 \times 10^3$ , 3) Dilución  $5 \times 10^2$ , 4) Dilución  $5 \times 10^1$ , 5) Blanco, 6)  $H_2O$ , 12) Positivo  $5 \times 10^3$ , 13) Positivo  $5 \times 10^2$ , 14) Positivo  $5 \times 10^1$ , 15) Marcador GeneRuler 50 pb

Así mismo, se puede observar una reducción en el tamaño de las bandas de amplificación entre dilución  $5 \times 10^3$  y  $5 \times 10^2$ .

#### 1.13.4 Especificidad y sensibilidad para ADV 41

Se obtuvo un 66.6 % en la especificidad del iniciador de (70 pb) en las muestras inoculadas y no inoculadas con Adenovirus 41 ATCC® VR-930 y analizadas mediante PCR (Figura 20).

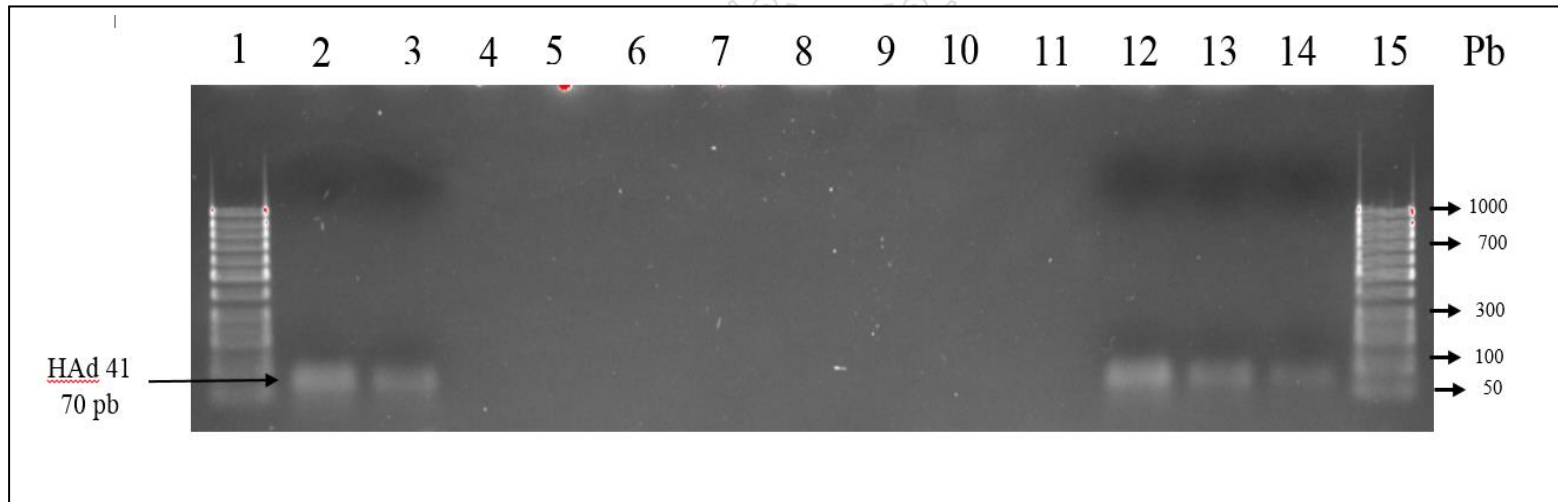


Figura 20. Prueba de especificidad del iniciador del gen Had para la cepa viral Adenovirus 41 (Elaboración propia)

Por electroforesis en gel de agarosa al 2%. Pozos: 1) Marcador GeneRuler 50 pb (Thermo Scientific, USA), 2) Dilución  $5 \times 10^3$ , 3) Dilución  $5 \times 10^2$ , 4) Dilución  $5 \times 10^1$ , 5) Blanco, 6) H<sub>2</sub>O, 7-11) DNA de H-1 parvovirus, 12) Positivo  $5 \times 10^3$ , 13) Positivo  $5 \times 10^2$ , 14) Positivo  $5 \times 10^1$ , 15) Marcador GeneRuler 50 pb. En la Figura 20 se puede observar que no hubo amplificación del gen HAd para las muestras de DNA de H-1 parvovirus, lo que prueba la especificidad de estos indicadores.

En la tabla 5 se percibe que de todas las muestras inoculadas a Adenovirus 41 solo 10 fueron positivas y las muestras que no fueros inoculados fueron negativas a la presencia del virus.

Tabla 5. Especificidad y sensibilidad de la PCR para detección de adenovirus 41

Muestras probadas				
Resultado de PCR		Inoculada	No inoculada	Total
	Positiva	10	0	10
	Negativa	5	6	11
	Total	15	6	21
	E	100 %	S	66,6 %

E: Especificidad; S: Sensibilidad (Elaboración propia)

#### 1.13.5 Incidencia de adenovirus en muestras de moluscos bivalvos

Los resultados obtenidos en el análisis por PCR de las muestras de moluscos bivalvos (concha de abanico, almeja, navajuela) donada por el Servicio Nacional de Sanidad Pesqueras (SANIPES) no demostraron la presencia de adenovirus en estas.

## CAPITULO V

### Discusión

A nivel mundial, las enfermedades transmitidas a través de agua y alimentos contaminados constituyen un problema que en las últimas décadas se ha complicado considerablemente (Koopmans et al., 2002). “Muchos de estos patógenos, están relacionados normalmente con una contaminación por aguas fecales humanas, y entre ellos se encuentran los virus que provocan gastroenteritis o las bacterias que causan fiebre tifoidea” (FAO, 2010). “Se ha emitido una alerta sanitaria por parte de la FAO, desde el 2011, para los virus Rotavirus, Hepatitis E (HEV), Astrovirus, Aichi virus, Sapovirus, Enterovirus, Coronavirus, Parvovirus y Adenovirus y su incidencia en la transmisión por alimentos” (FAO, 2011, p.72). Está bien documentado que Adenovirus 40 y 41 están asociados a cuadros de diarrea aguda (Noel et al., 1994) y que es el segundo agente etiológico de este síndrome en niños (Blacklow et al., 1991). Según Oliveira et al. (2011) el adenovirus es un agente biológico que se encuentra implicado en enfermedades relacionadas con los mariscos, así mismo en el Perú, existen evidencias que el adenovirus se encuentra circulando en la población.

Con el objetivo de contribuir a la implementación de planes de vigilancia sanitaria, en el marco de estas tesis de pregrado, se propuso implementar por primera vez en el Perú, un método de detección del genoma de adenovirus 40 y 41 en muestras de hepatopáncreas de moluscos bivalvos. Esta metodología implica la amplificación en tiempo final de un fragmento conservado de 70 pb del gen HAd, y para el cual usamos los iniciadores propuestos por Hernroth et al. (2002).

En los últimos años el interés por evaluar y controlar la contaminación vírica de los moluscos bivalvos ha conducido al desarrollo y aplicación de diversos métodos de recuperación de las partículas víricas a partir de sus tejidos, y al desarrollo de estrategias para valorar el riesgo

sanitario que representan para la salud. Así mismo el análisis de la contaminación vírica de los moluscos bivalvos requiere en primer lugar de un método de recuperación de virus suficientemente eficiente, lo cual suele ser el paso limitante (Pina, 2001). En este trabajo se ha usado una metodología de gran simplicidad que es el método QIAamp™ mini kit (Quiagen, Germany), el cual permite la extracción y concentración de los virus acumulados por los moluscos bivalvos y está basado en la purificación de ácidos nucleicos a base de membrana de sílice. Estudios posteriores han confirmado que la utilización de esta metodología proporciona buenos resultados frente a otras metodologías (Butot et al., 2007; Beuret et al., 2006; Wei et al., 2010; Al-Mendalawi., 2011).

Así mismo, el mayor obstáculo para la aplicación rutinaria de técnicas de amplificación molecular de ácido nucleicos es la presencia de inhibidores de la reacción (Wilson, 1997), siendo alguno de estos los presentes en los tejidos de los moluscos, como los polisacáridos (Atmar y col., 1993). En nuestro caso, al usar solo el hepatopáncreas de los moluscos, reducimos la concentración de los inhibidores, y concentramos la carga viral, debido a que estos tienden a ser acumulados en el tracto digestivo (Schwab y col., 1998)

La eficiencia del método de extracción y detección molecular aplicada se evaluó a partir de muestras de concha de abanico, almeja, navajuela 25 mg de hepatopáncreas inoculados con 100 ul de Adenovirus 40 o 41. De las tres diluciones que se realizaron para la determinación de la concentración mínima detectable del amplicón por la técnica de PCR para Adenovirus 40 y 41, se generaron resultados de amplificación positivos para las diluciones  $10^3$  y  $10^2$  (70 pb). Siendo la sensibilidad observada de 66,6 %, y detectando un mínimo de 500 partículas virales por muestra. Esta sensibilidad no es similar a la obtenida en otros estudios, en donde oscilaba entre 10 a 100 partículas virales por muestra (Jothikumar et al., 2005; Rigotto et al., 2005). Sin embargo, el nivel mínimo detectable es establecido por el laboratorio en donde se realiza la técnica de PCR, el cual depende de varios factores como son la destreza o

capacitación del analista, el buen funcionamiento de los equipos, calibraciones de equipos, calidad del DNA, calidad de los iniciadores, instalaciones adecuadas, entre otros aspectos (Rosas, 2014).

Así mismo, a pesar de la alta sensibilidad que confiere la técnica de PCR, es su limitación más seria, ya que la amplificación exponencial de DNA puede conseguirse incluso a partir de una sola célula, cualquier resto celular o reactivos contaminados puede presentar un riesgo de resultados falsos (Armedariz y Barreiro, 2013).

Se pudo observar también, que no hubo amplificación del gen HAd para las muestras de DNA de H-1 parvovirus, teniendo este método una especificidad del 100 % para adenovirus, siendo los resultados similares a lo observado en el trabajo realizado por Hernroth et al. (2002).

El método desarrollado constituye una herramienta para evaluar la contaminación vírica de los moluscos bivalvos, a pesar de esto la aplicación de esta metodología en muestras naturales, no dio resultados positivos, debido a que estas provenían de zonas de cultivo de calificación A, lo cual guarda mucha relación con los resultados obtenidos por Serracca et al. (2010), en donde indica que la mayor presencia de estos virus en moluscos se encuentra cerca de zonas con gran afluencia de desechos sanitarios.

Los resultados presentados en este estudio aportan datos sobre la eficiencia superior de las técnicas moleculares frente a otras metodologías, por lo que se debería considerar el test de detección molecular de adenovirus humanos como posible índice de la presencia de virus humanos como contaminantes de los moluscos bivalvos, aunque son necesarios estudios más extensos que se están desarrollando en la actualidad.

## **Conclusiones**

La técnica de PCR desarrollada en el presente estudio demostró ser rápida y específica para la detección de Adenovirus 40 y 41. De manera general, para las muestras de moluscos se obtuvo una sensibilidad medianamente alta (66,6 %) de la técnica de PCR con una concentración mínima detectable de 500 partículas virales y también una especificidad de los iniciadores utilizados que fue del 100%, indicando el potencial de detección de Adenovirus 40 y 41.

La incidencia de Adenovirus 40 y 41, en las muestras proporcionadas por el Servicio Nacional de Sanidad Pesqueras (SANIPES), las cuales son correspondientes a los muestreos realizados en el litoral peruano como parte del control de inocuidad alimentaria en moluscos bivalvos para exportación, fue nula.

## **Recomendaciones**

Realizar análisis de detección de Adenovirus mediante esta metodología, en zonas que no sea de clasificación A o B, debido a que esta se encuentra casi siempre libres de la presencia de virus entéricos y así obtener una prevalencia real de este virus presente en los moluscos bivalvos de mayor consumo en el Perú.

## Referencias bibliográficas

- Alvarado, R.; Gould, M. & Stephano, J. (1996) Spawning, in vitro maturation, and changes in oocyte electrophysiology induced by serotonin in *Trivela stultorum*. *Bio. Bull.*, 190, 322-328.
- Alba, R. (2007) Caracterización del sistema *attB/attP-ΦC31* para la producción de adenovirus *gutless*. Tesis Doctoral. Bellaterra: Universidad Autónoma de Barcelona.
- Al-Mendalawi, M. D. (2011). First description of gastroenteritis viruses in Lebanese children: A pilot study. *Journal of infection and public health*, 4(5), 260.
- Appleton, H. & Pereira, M. (1977) A possible virus aetiology in outbreaks of food poisoning from cockles. *Lancet*, 1, 780–781
- Armendáriz Toral, I. F., & Barreiro Zambrano, P. E. (2013). *Detección de salmonella spp. mediante pcr en muestras de embutidos, cereales y superficies inertes* (Bachelor's thesis, 2013).
- Asturnatura (2015). Moluscos bivalvos.  
En <https://www.asturnatura.com/moluscos/bivalvos.html> Leído el: 10/12/2015.
- Atmar, R. L., Metcalf, T. G., Neill, F. H., & Estes, M. K. (1993). Detection of enteric viruses in oysters by using the polymerase chain reaction. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(2), 631-635.
- Bernaola, G. & Luque, W. (2002) Fisiopatología de las infecciones por adenovirus. *Paediatrica*, 4, 41-47. En [http://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/paediatrica/v04\\_n2/fisiopatolog%C3%ADa.htm](http://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/paediatrica/v04_n2/fisiopatolog%C3%ADa.htm)  
[Leído el 18/01/2016.](http://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/paediatrica/v04_n2/fisiopatolog%C3%ADa.htm)

- Bermúdez, P.; Maidana, J.; Aquino, H. & Palomino, A. (2004) Manual de cultivo suspendido de concha de abanico. Sub-proyecto programa de transferencia de tecnología en acuicultura para pescadores artesanales y comunidades campesinas. Junio.
- Beuret, C. M. (2006). Detection of noroviruses of genogroups I and II in drinking water by real-time one-step RT-PCR. *Food-borne pathogens: methods and protocols*, 135-152.
- Blacklow, N. R., & Greenberg, H. B. (1991). Viral gastroenteritis. *New England Journal of Medicine*, 325(4), 252-264.
- Butot, S., Putallaz, T., & Sanchez, G. (2007). Procedure for rapid concentration and detection of enteric viruses from berries and vegetables. *Applied and environmental microbiology*, 73(1), 186-192.
- Clarke, J (2002) Miniprep de ADN de bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) para el aislamiento del ADN de la planta. En <http://cshprotocols.cshlp.org/content/2009/3/pdb.prot5177.abstract>. C Leído el: 14/12/16
- Contreras, R. & Puebla, C. (2013) Gari solida (Gray, 1828): antecedentes de la especie. *Sociedad Malacológica de Chile (SMACH)*, 21, 19-22.
- Chapter (2006). Validación y control de calidad de los métodos de reacción en cadena de la polimerasa utilizados para el diagnóstico de enfermedades infecciosas. En [http://web.oie.int/esp/normes/fmanual/pdf/es/1.1.3 Validacion y control de calidad.pdf](http://web.oie.int/esp/normes/fmanual/pdf/es/1.1.3%20Validacion%20y%20control%20de%20calidad.pdf). *Manual de pruebas de diagnóstico para los animales acuáticos* (pp. 25-32). Leído el: 30/04/2016

- Domínguez, A.; Godoy, P.; Torner, N.; Cardeñosa, N. & Martínez, A. (2009) Las gastroenteritis víricas: un problema de salud. *Revista Española de Salud Pública*, 83. En [http://scielo.isciii.es/scielo.php?pid=S1135-57272009000500009&script=sci\\_arttext](http://scielo.isciii.es/scielo.php?pid=S1135-57272009000500009&script=sci_arttext) Leído el: 14/01/2016.
- Elnifro E., Ashshi A., Cooper R., & Klapper P. (2000). Multiplex PCR: optimization and application in diagnostic virology. *Clin. Microbiol. rev.*, 13, 559–570.
- (FAO, 2010), <http://www.fao.org/3/a-i0201s.pdf>
- FAO (2011) Proposed draft guidelines on the application of general principles of food hygiene to the control of viruses in food at step 3. Joint FAO/who food standards programme CODEX committee on food hygiene - 43rd session, December.
- García, H. & Uribarren T. (2015) Rotavirus, norovirus, adenovirus y otros virus en tracto digestivo. Depto. de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/virologia/inf-tracto-gastro.html>
- González, R. (2010) Auge y crisis: la pesquería de la concha de abanico (*Argopecten purpuratus*) en la región Pisco-Paracas, costa sur del Perú. *Espacio y Desarrollo*, 22, 25-51.
- González, G. (2012) Infecciones por Adenovirus en Cuba (2000 – 2008). Tesis de Doctor en ciencias de la Salud. La Habana: Instituto de medicina tropical “Pedro Kouri”.
- Hernroth, B. E., Conden-Hansson, A. C., Rehnstam-Holm, A. S., Girones, R., & Allard, A. K. (2002). Environmental factors influencing human viral pathogens and their potential indicator organisms in the blue mussel, *Mytilus edulis*: the first Scandinavian report. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(9), 4523-4533.
- Hill, R.; Wyse, G. & Smith M. (2006) *Fisiología animal*. Ed. Médica Panamericana

- Horwitz (2001) Adenovirus Immunoregulatory Genes and Their Cellular Targets. *Elsevier*, 279, 1-8.
- JACUMAR (2008) Almejas. España. En <http://www.magrama.gob.es/app/jacumar/especies/Documentos/Almejas.pdf>. Leído el 03/05/16.
- Jothikumar, N., Cromeans, T. L., Hill, V. R., Lu, X., Sobsey, M. D., & Erdman, D. D. (2005). Quantitative real-time PCR assays for detection of human adenoviruses and identification of serotypes 40 and 41. *Applied and environmental microbiology*, 71(6), 3131-3136.
- Kolimon, K. (1990) *Fundamentos de la epidemiología*. Madrid: Díaz de Santos.
- Koopmans, M., von Bonsdorff, C. H., Vinjé, J., de Medici, D., & Monroe, S. (2002). Foodborne viruses. *FEMS Microbiology Reviews*, 26(2), 187-205.
- Loaysa, R. & Tresierra, A. (2014) Variación del “biofouling” en linternas de cultivo de “concha de abanico” *Argopecten purpuratus* en bahía Samanco, Ancash, Perú. *Ciencia y Tecnología*, 2, 19 – 34.
- Lovatelli, A. (2003) EL COMERCIO DE BIVALVOS EN EUROPA. *Infopesca Internacional*, 13, 6 - 7.
- Luna, M. M., Leboreiro, J. I., Zapata, I. B., & Rendón-Macías, M. E. (2013). Los adenovirus como causa de gastroenteritis aguda en los niños. *Revista Mexicana de Pediatría*, 80, 98-104.
- Mackay I., Aarde K. & Nitsche A. (2002) Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Res.*, 30, 1292–1305.
- Maeda, A. (2002) *Los moluscos pectínidos de Iberoamérica: Ciencia y acuicultura*. Editorial Limusa.

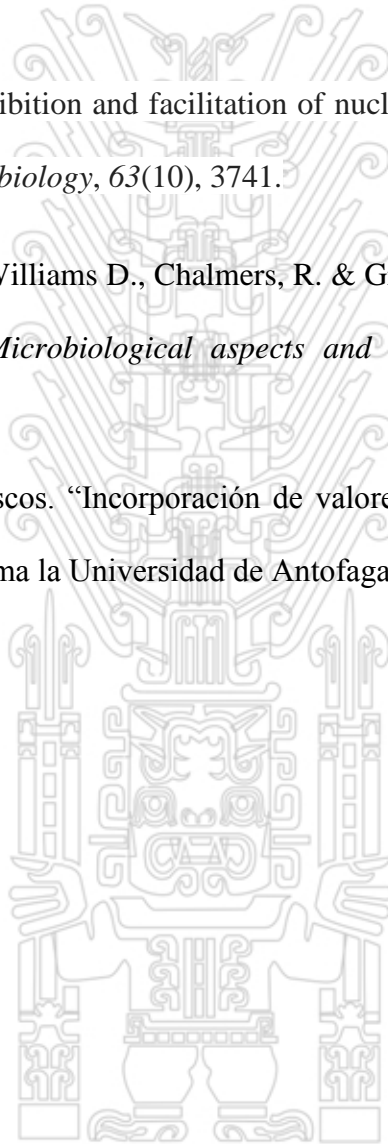
- McMinn, B. R. (2013) Optimization of adenovirus 40 and 41 recovery from tap water using small disk filters. *Journal of virological methods*, 193(2), 284-290.
- Mendis, N. (2010) *Tagelus dombeii* (Lamarck, 1818): antecedentes de la especie. *Amici Molluscarum*, 18, 31-33.
- Mendo, J.; Ysla, L.; Orrego, H.; Miglio, M.; Gil, P. & Escardó A. (2011) Manual técnico para el repoblamiento de concha de abanico en la Bahía de Sechura. Proyecto FINCYT – Contrato Nro. 01 – 2009.
- Mendoza, D. (2011) Informe: Panorama de la acuicultura mundial, américa latina, el caribe y en el Perú. Dirección General de Acuicultura Ministerio de la Producción, agosto.
- Muniain-Mujika; Calvo, M.; Lucena, F. & Girones, R. (2003) Comparative analysis of viral pathogens and potential indicators in shellfish. *International Journal of Food Microbiology*, 83, 75– 85.
- Noel, J., Mansoor, A., Thaker, U., Herrmann, J., Perron-Henry, D., & Cubitt, W. D. (1994). Identification of adenoviruses in faeces from patients with diarrhoea at the Hospitals for Sick Children, London, 1989–1992. *Journal of medical virology*, 43(1), 84-90.
- Oliveira, J., Cunha, A., Castilho, F., Romalde, J. L., & Pereira, M. J. (2011). Microbial contamination and purification of bivalve shellfish: Crucial aspects in monitoring and future perspectives—A mini-review. *Food Control*, 22(6), 805-816.
- Pacheco, A. & Garate, A. (2005). Bioincrustantes en estructuras de cultivo de *Argopecten purpuratus* en Bahía Samanco, Perú. *Ecología Aplicada*, 4(1-2), 150-152.
- PENX (2013) *Perfil del mercado y competitividad exportadora de la Concha de Abanico*. Leído en

[http://www.mincetur.gob.pe/comercio/otros/penx/pdfs/Conchas\\_de\\_Abanico.pdf](http://www.mincetur.gob.pe/comercio/otros/penx/pdfs/Conchas_de_Abanico.pdf) leído el 18/05/2015

- Pérez, T. (1987) Cultivos Marinos: peces, moluscos, crustáceos. Alimentos y fertilizantes. Edit. Acribia. España.
- Pina, S. (2001) *Detección y caracterización de virus patógenos humanos en muestras ambientales y moluscos bivalvos*. Tesis de doctorado en Biología. Barcelona: Universidad de Barcelona.
- PRODUCE (2004) Norma sanitaria de moluscos bivalvos vivos. D.S. N° 007-2004
- PRODUCE (2015) Anuario estadístico pesquero y acuícola. En <http://www.produce.gob.pe/documentos/estadisticas/anuarios/anuario-estadistico-pesca-2015.pdf> Leído el 09/07/2016.
- Rigotto, C., Sincero, T. C. M., Simoes, C. M. O., & Barardi, C. R. M. (2005). Detection of adenoviruses in shellfish by means of conventional-PCR, nested-PCR, and integrated cell culture PCR (ICC/PCR). *Water research*, 39(2), 297-304.
- Romero R. (2007) Microbiología y parasitología humana bases etiológicas de las enfermedades infecciosas y parasitarias. 3<sup>a</sup> Edición. Barcelona: Médica Panamericana.
- Rodríguez, N. & Barrios, M. (2009) Capítulo 85: Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y otras técnicas moleculares en el estudio de afecciones dermatológicas. *Colegio Ibero-Latino Americano de Dermatología*. Rondón et al (Ed.) Venezuela. En <http://www.cilad.org/index.php/component/content/article?id=191> El 15/01/2016.
- Rodríguez, J. (2012) *Detección y caracterización de virus patógenos emergentes de interés general en seguridad alimentaria*. Tesis de doctor en Biología. Barcelona: Universidad de Barcelona.

- Rosas Espejel, M. (2014). Estandarización y validación de la técnica de PCR para el diagnóstico de *Salmonella typhimurium* en carne de cerdo, res y pollo.
- Schwab, K. J., Neill, F. H., Estes, M. K., Metcalf, T. G., & Atmar, R. L. (1998). Distribution of Norwalk virus within shellfish following bioaccumulation and subsequent depuration by detection using RT-PCR. *Journal of food protection*, 61(12), 1674-1680.
- Serracca, L., Verani, M., Battistini, R., Rossini, I., Carducci, A., & Ercolini, C. (2010). Evaluation of Adenovirus and *E. coli* as indicators for human enteric viruses presence in mussels produced in La Spezia Gulf (Italy). *Letters in applied microbiology*, 50(5), 462-467.
- Somma, M., & Querci, M. (2007). Análisis de la presencia de organismos genéticamente modificados en muestras de alimentos. *Extracción y purificación de ADN. European Comission JRC*.
- Stroparo, Cruz, Debur, Vidal, Nogueira & Almeida (2010) Adenovirus respiratory infection: significant increase in diagnosis using PCR comparing with antigen detection and culture methods. *Revista do instituto de medicina tropical de Sao Paulo*, 52, 317-321.
- Tamay de Dios, L.; Ibarra, C. & Velasquillo, C. (2013) Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación en discapacidad*, 2, 70-78.
- Umesha, K. (2008) Prevalence of human pathogenic enteric viruses in bivalve molluscan shellfish and cultured shrimp in south west coast of India. *International Journal of Food Microbiology*, 122, 279 – 286.

- Weigt, Gregson, Deng, Lynch & Belperio (2011) Respiratory viral infections in hematopoietic stem cell and solid organ transplant recipients. *In Seminars in respiratory and critical care medicine*, 32, 471-493.
- Wei, J., Jin, Y., Sims, T., & Kniel, K. E. (2010). Survival of murine norovirus and hepatitis A virus in different types of manure and biosolids. *Foodborne pathogens and disease*, 7(8), 901-906.
- Wilson, I. G. (1997). Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Applied and environmental microbiology*, 63(10), 3741.
- Yates, M.; Percival, S.; Williams D., Chalmers, R. & Gray, N. (2014) *Microbiology of Waterborne Diseases. Microbiological aspects and Risks*. (pp.471-476). London: Copyright material.
- Zuñiga, O. (2003) Moluscos. “Incorporación de valores de desarrollo sustentable en los Profesionales que forma la Universidad de Antofagasta”



## ANEXOS

### Anexo 1 Relación de equipos

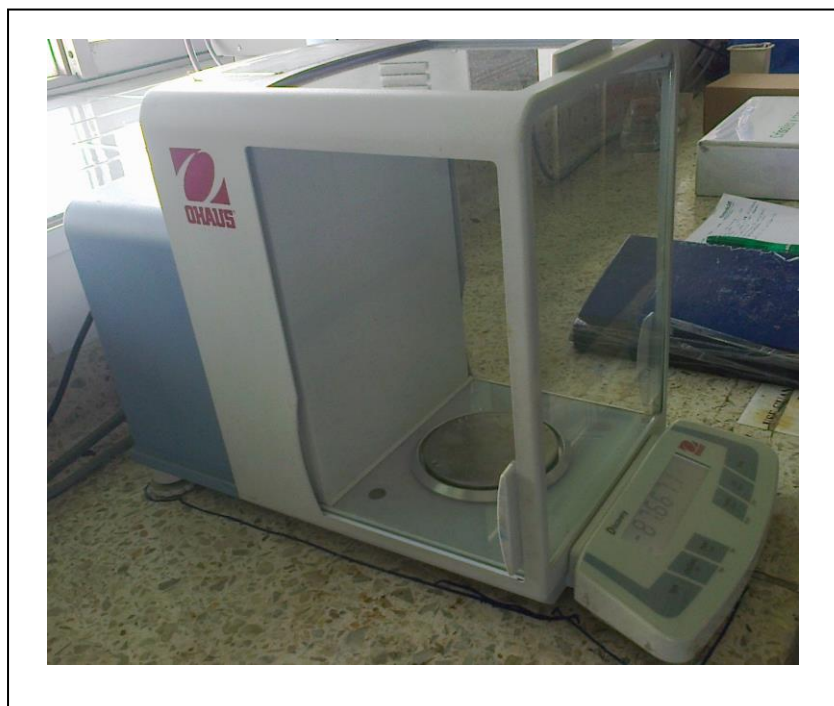


Figura 21. Balanza electrónica



Figura 22. Homogeneizador de tejidos



Figura 23. Vortex



Figura 24. Centrifugadora



Figura 25. Espectrofotómetro



Figura 26. Cabina de flujo laminar

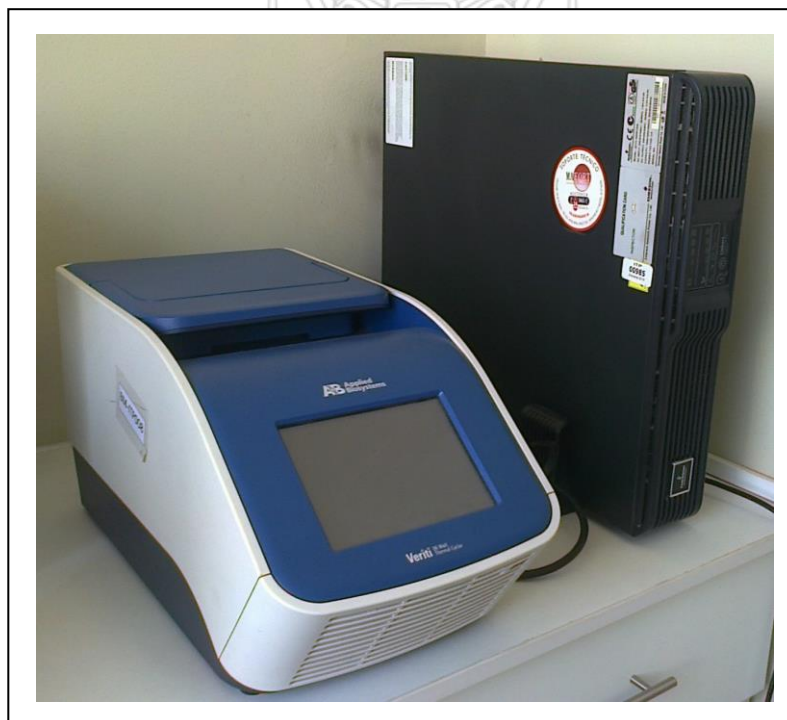


Figura 27. Termociclador



Figura 28. Equipo de electroforesis

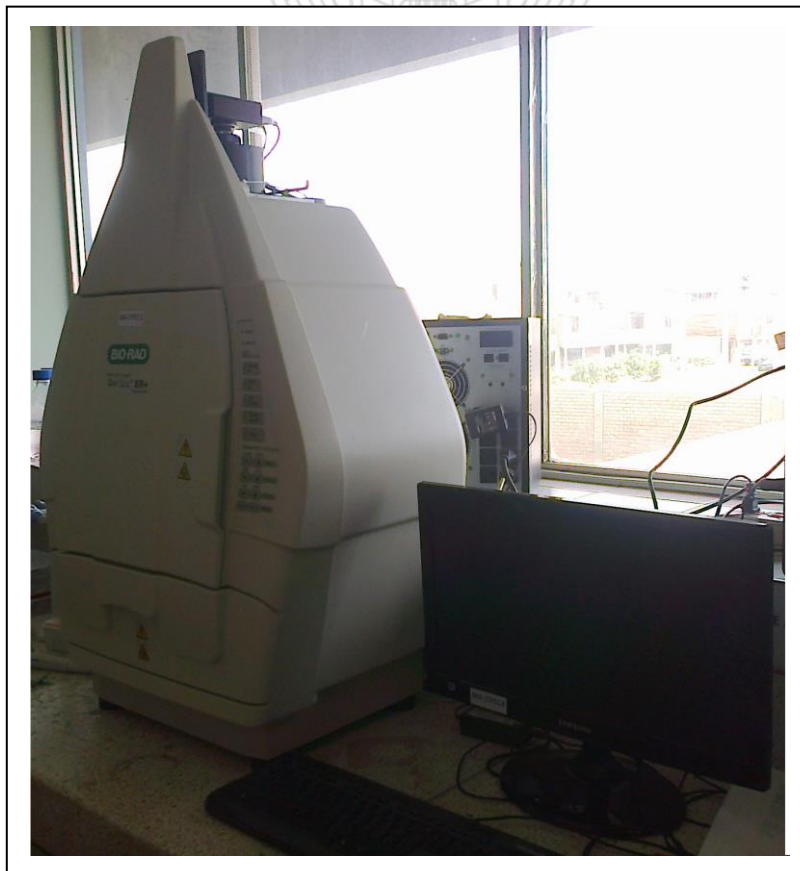


Figura 29. Fotodocumentador

## Anexo 2 Reporte Programa Stata 12

Data Editor (Edit) - [Resultados.dta]

File Edit View Data Tools

var9[16]

	Especie	Ingreso	Extracción	Cuantifica-n	ADN	PCR	Incidencia				
1	Concha de abanico	22/07/2015	04/01/2016	05/01/2016	123	27/01/2016	no				
2	Concha de abanico	12/08/2015	04/01/2016	05/01/2016	103.4	27/01/2016	no				
3	Concha de abanico	14/08/2015	04/01/2016	05/01/2016	127.3	27/01/2016	no				
4	Concha de abanico	18/08/2015	04/01/2016	05/01/2016	127.6	27/01/2016	no				
5	Concha de abanico	26/08/2015	04/01/2016	05/01/2016	118.15	27/01/2016	no				
6	Concha de abanico	26/08/2015	04/01/2016	05/01/2016	112.1	27/01/2016	no				
7	Concha de abanico	01/09/2015	04/01/2016	05/01/2016	131.5	27/01/2016	no				
8	Concha de abanico	11/09/2015	04/01/2016	05/01/2016	131.1	27/01/2016	no				
9	Concha de abanico	14/09/2015	04/01/2016	05/01/2016	101.6	27/01/2016	no				
10	Concha de abanico	14/09/2015	04/01/2016	05/01/2016	114.4	27/01/2016	no				
11	Concha de abanico	16/09/2015	04/01/2016	05/01/2016	133.9	27/01/2016	no				
12	Concha de abanico	18/09/2015	04/01/2016	05/01/2016	125.4	27/01/2016	no				
13	Concha de abanico	18/09/2015	26/01/2016	27/01/2016	119.5	27/01/2016	no				
14	Concha de abanico	22/09/2015	26/01/2016	27/01/2016	127.6	27/01/2016	no				
15	Navajuela	22/09/2015	26/01/2016	27/01/2016	132.2	27/01/2016	no				
16	Navajuela	22/09/2015	26/01/2016	27/01/2016	138.9	27/01/2016	no				
17	Concha de abanico	25/09/2015	26/01/2016	27/01/2016	106.8	27/01/2016	no				
18	Concha de abanico	25/09/2015	26/01/2016	27/01/2016	128.2	27/01/2016	no				
19	Concha de abanico	25/09/2015	26/01/2016	27/01/2016	153	27/01/2016	no				
20	Concha de abanico	25/09/2015	26/01/2016	27/01/2016	136.2	27/01/2016	no				
21	Concha de abanico	05/10/2015	26/01/2016	27/01/2016	122.6	27/01/2016	no				
22	Concha de abanico	05/10/2015	26/01/2016	27/01/2016	128.4	27/01/2016	no				
23	Concha de abanico	14/10/2015	26/01/2016	27/01/2016	118.5	27/01/2016	no				
24	Concha de abanico	16/10/2015	26/01/2016	27/01/2016	117.3	27/01/2016	no				
25	Concha de abanico	06/10/2015	26/01/2016	27/01/2016	133.8	27/01/2016	no				
26	Concha de abanico	14/10/2015	29/01/2016	01/02/2016	176.8	10/02/2016	no				
27	Concha de abanico	16/10/2015	29/01/2016	01/02/2016	183.2	10/02/2016	no				
28	Concha de abanico	16/10/2015	29/01/2016	01/02/2016	145.6	10/02/2016	no				

Variables

Filter variables here

Variable	Label
<input checked="" type="checkbox"/>	Especie Moluscos bivalvos
<input checked="" type="checkbox"/>	Ingreso Fecha de ingreso
<input checked="" type="checkbox"/>	Extracción Fecha extracción ...
<input checked="" type="checkbox"/>	Cuantificación Fecha de cuantific...
<input checked="" type="checkbox"/>	ADN Cantidad de ADN ...
<input checked="" type="checkbox"/>	PCR Amplificacion de ...
<input checked="" type="checkbox"/>	Incidencia Deteccion de ade...

Properties

Variables

Name	Label

Data

Filename	Resultados.dta
Label	
Notes	
Variables	7
Observations	100
Size	5.08K

Ready

Vars: 7 Order: Dataset Obs: 100 Filter: Off Mode: Edit CAP NUM

Data Editor (Edit) - [Resultados.dta]

File Edit View Data Tools

var9[16]

	Especie	Ingreso	Extracción	Cuantifica-n	ADN	PCR	Incidencia				
29	Concha de abanico	05/11/2015	29/01/2016	01/02/2016	139.2	10/02/2016	no				
30	Concha de abanico	05/11/2015	29/01/2016	01/02/2016	138.6	10/02/2016	no				
31	Concha de abanico	05/11/2015	29/01/2016	01/02/2016	144.5	10/02/2016	no				
32	Concha de abanico	05/11/2015	29/01/2016	01/02/2016	121.6	10/02/2016	no				
33	Concha de abanico	07/11/2015	29/01/2016	01/02/2016	142	10/02/2016	no				
34	Concha de abanico	07/11/2015	29/01/2016	01/02/2016	143.4	10/02/2016	no				
35	Concha de abanico	07/11/2015	29/01/2016	01/02/2016	127.8	10/02/2016	no				
36	Concha de abanico	07/11/2015	29/01/2016	01/02/2016	134.5	10/02/2016	no				
37	Concha de abanico	24/11/2015	29/01/2016	01/02/2016	153.3	10/02/2016	no				
38	Concha de abanico	24/11/2015	29/01/2016	01/02/2016	149.5	10/02/2016	no				
39	Concha de abanico	24/11/2015	09/02/2016	10/02/2016	139.4	10/02/2016	no				
40	Concha de abanico	25/11/2015	09/02/2016	10/02/2016	123.8	10/02/2016	no				
41	Navajuela	25/11/2015	09/02/2016	10/02/2016	123.4	10/02/2016	no				
42	Navajuela	25/11/2015	09/02/2016	10/02/2016	134.2	10/02/2016	no				
43	Almeja	25/11/2015	09/02/2016	10/02/2016	136.4	10/02/2016	no				
44	Almeja	26/11/2015	09/02/2016	10/02/2016	156.3	10/02/2016	no				
45	Navajuela	26/11/2015	09/02/2016	10/02/2016	136.7	10/02/2016	no				
46	Concha de abanico	26/11/2015	09/02/2016	10/02/2016	122.4	10/02/2016	no				
47	Concha de abanico	26/11/2015	09/02/2016	10/02/2016	127.8	10/02/2016	no				
48	Concha de abanico	27/11/2015	09/02/2016	10/02/2016	126	10/02/2016	no				
49	Concha de abanico	27/11/2015	09/02/2016	10/02/2016	115.9	10/02/2016	no				
50	Concha de abanico	21/11/2015	09/02/2016	10/02/2016	137.3	10/02/2016	no				
51	Almeja	01/12/2015	26/02/2016	29/02/2016	126.5	03/03/2016	no				
52	Almeja	24/11/2015	26/02/2016	29/02/2016	133.3	03/03/2016	no				
53	Almeja	01/12/2015	26/02/2016	29/02/2016	136.2	03/03/2016	no				
54	Navajuela	24/11/2015	26/02/2016	29/02/2016	137.4	03/03/2016	no				
55	Navajuela	26/11/2015	26/02/2016	29/02/2016	130.1	03/03/2016	no				
56	Navajuela	02/12/2015	26/02/2016	29/02/2016	144.8	03/03/2016	no				

Ready

Vars: 7 Order: Dataset Obs: 100 Filter: Off Mode: Edit CAP NUM

Variables

Filter variables here

Variable	Label
<input checked="" type="checkbox"/>	Especie Moluscos bivalvos
<input checked="" type="checkbox"/>	Ingreso Fecha de ingreso
<input checked="" type="checkbox"/>	Extracción Fecha extracción ...
<input checked="" type="checkbox"/>	Cuantificación Fecha de cuantific...
<input checked="" type="checkbox"/>	ADN Cantidad de ADN ...
<input checked="" type="checkbox"/>	PCR Amplificación de ...
<input checked="" type="checkbox"/>	Incidencia Detección de ade...

Properties

Variables

Name

Label

Type

Format

Value Label

Notes

Data

Filename Resultados.dta

Label

Notes

Variables 7

Observations 100

Size 5.08K

Data Editor (Edit) - [Resultados.dta]

File Edit View Data Tools

var10[36]

	Especie	Ingreso	Extracción	Cuantifica-n	ADN	PCR	Incidencia			
57	Concha de abanico	02/12/2015	26/02/2016	29/02/2016	162.9	03/03/2016	no			
58	Concha de abanico	10/12/2015	26/02/2016	29/02/2016	155.5	03/03/2016	no			
59	Concha de abanico	10/12/2015	26/02/2016	29/02/2016	130.8	03/03/2016	no			
60	Concha de abanico	13/11/2015	26/02/2016	29/02/2016	132.5	03/03/2016	no			
61	Concha de abanico	26/11/2015	26/02/2016	29/02/2016	132.2	03/03/2016	no			
62	Concha de abanico	09/12/2015	26/02/2016	29/02/2016	120.3	03/03/2016	no			
63	Concha de abanico	09/12/2015	02/03/2016	03/03/2016	106.7	03/03/2016	no			
64	Concha de abanico	17/12/2015	02/03/2016	03/03/2016	109.3	03/03/2016	no			
65	Concha de abanico	17/12/2015	02/03/2016	03/03/2016	136.6	03/03/2016	no			
66	Concha de abanico	23/12/2015	02/03/2016	03/03/2016	144	03/03/2016	no			
67	Concha de abanico	19/12/2015	02/03/2016	03/03/2016	134	03/03/2016	no			
68	Concha de abanico	22/12/2015	02/03/2016	03/03/2016	147	03/03/2016	no			
69	Concha de abanico	22/12/2015	02/03/2016	03/03/2016	150.9	03/03/2016	no			
70	Concha de abanico	22/12/2015	02/03/2016	03/03/2016	161.3	03/03/2016	no			
71	Concha de abanico	23/12/2015	02/03/2016	03/03/2016	119.7	03/03/2016	no			
72	Concha de abanico	23/12/2015	02/03/2016	03/03/2016	144.3	03/03/2016	no			
73	Concha de abanico	23/12/2015	02/03/2016	03/03/2016	129.8	03/03/2016	no			
74	Concha de abanico	23/12/2015	02/03/2016	03/03/2016	127.1	03/03/2016	no			
75	Concha de abanico	24/12/2015	14/04/2016	15/04/2016	157.1	28/04/2016	no			
76	Concha de abanico	19/12/2015	14/04/2016	15/04/2016	120.6	28/04/2016	no			
77	Concha de abanico	19/12/2015	14/04/2016	15/04/2016	165.3	28/04/2016	no			
78	Concha de abanico	17/12/2015	14/04/2016	15/04/2016	115.5	28/04/2016	no			
79	Concha de abanico	19/12/2015	14/04/2016	15/04/2016	123.9	28/04/2016	no			
80	Concha de abanico	19/12/2015	14/04/2016	15/04/2016	124.83	28/04/2016	no			
81	Concha de abanico	01/12/2015	14/04/2016	15/04/2016	131.57	28/04/2016	no			
82	Concha de abanico	24/12/2015	14/04/2016	15/04/2016	158.2	28/04/2016	no			
83	Concha de abanico	01/12/2015	14/04/2016	15/04/2016	167.2	28/04/2016	no			
84	Almeja	23/12/2015	14/04/2016	15/04/2016	135.5	28/04/2016	no			

Variables

Variable	Label
<input checked="" type="checkbox"/>	Especie Moluscos bivalvos
<input checked="" type="checkbox"/>	Ingreso Fecha de ingreso
<input checked="" type="checkbox"/>	Extracción Fecha extracción ...
<input checked="" type="checkbox"/>	Cuantificación Fecha de cuantific...
<input checked="" type="checkbox"/>	ADN Cantidad de ADN ...
<input checked="" type="checkbox"/>	PCR Amplificación de ...
<input checked="" type="checkbox"/>	Incidencia Deteccion de ade...

Properties

Variables

Name	
Label	
Type	
Format	
Value Label	
Notes	

Data

Filename	Resultados.dta
Label	
Notes	
Variables	7
Observations	100
Size	5.08K

Ready

Vars: 7 Order: Dataset Obs: 100 Filter: Off Mode: Edit CAP NUM

Data Editor (Edit) - [Resultados.dta]

File Edit View Data Tools

var10[36]

	Especie	Ingreso	Extracción	Cuantifica-n	ADN	PCR	Incidencia			
85	Almeja	08/11/2015	14/04/2016	15/04/2016	143.7	28/04/2016	no			
86	Concha de abanico	19/01/2016	14/04/2016	15/04/2016	147.4	28/04/2016	no			
87	Concha de abanico	19/01/2016	27/04/2016	28/04/2016	123.8	28/04/2016	no			
88	Concha de abanico	19/01/2016	27/04/2016	28/04/2016	118.5	28/04/2016	no			
89	Concha de abanico	19/01/2016	27/04/2016	28/04/2016	188.4	28/04/2016	no			
90	Concha de abanico	19/01/2016	27/04/2016	28/04/2016	107.7	28/04/2016	no			
91	Concha de abanico	19/01/2016	27/04/2016	28/04/2016	120.7	28/04/2016	no			
92	Concha de abanico	26/01/2016	27/04/2016	28/04/2016	130.8	28/04/2016	no			
93	Concha de abanico	27/01/2016	27/04/2016	28/04/2016	142.1	28/04/2016	no			
94	Concha de abanico	27/01/2016	27/04/2016	28/04/2016	144.6	28/04/2016	no			
95	Almeja	27/01/2016	27/04/2016	28/04/2016	147.1	28/04/2016	no			
96	Almeja	27/01/2016	27/04/2016	28/04/2016	128.5	28/04/2016	no			
97	Concha de abanico	03/02/2016	27/04/2016	28/04/2016	130.5	28/04/2016	no			
98	Concha de abanico	03/02/2016	27/04/2016	28/04/2016	142.3	28/04/2016	no			
99	Concha de abanico	03/02/2016	27/04/2016	28/04/2016	185	28/04/2016	no			
100	Almeja	03/02/2016	27/04/2016	28/04/2016	147.7	28/04/2016	no			

Variables

Variable	Label
<input checked="" type="checkbox"/>	Especie Moluscos bivalvos
<input checked="" type="checkbox"/>	Ingreso Fecha de ingreso
<input checked="" type="checkbox"/>	Extracción Fecha extracción ...
<input checked="" type="checkbox"/>	Cuantificación Fecha de cuantific...
<input checked="" type="checkbox"/>	ADN Cantidad de ADN ...
<input checked="" type="checkbox"/>	PCR Amplificación de ...
<input checked="" type="checkbox"/>	Incidencia Deteccion de ade...

Properties

Variables

Name	
Label	
Type	
Format	
Value Label	
Notes	

Data

Filename	Resultados.dta
Label	

Notes

Variables	7
Observations	100
Size	5.08K

Ready

Vars: 7 Order: Dataset Obs: 100 Filter: Off Mode: Edit CAP NUM

Stata/SE 12.0 - C:\Users\Samsung\Desktop\Resultados.dta - [Results]

File Edit Data Graphics Statistics User Window Help

Review

```

. save "C:\Users\Samsung\Desktop\Resultados.dta"
file C:\Users\Samsung\Desktop\Resultados.dta saved

. log using "C:\Users\Samsung\Desktop\Comandos.log"

name: <unnamed>
log: C:\Users\Samsung\Desktop\Comandos.log
log type: text
opened on: 23 May 2017, 14:09:47

. label define Incidencia 0 "no" 1 "si"

. label values Incidencia Incidencia

. tab Especie

Moluscos bivalvos |      Freq.   Percent   Cum.
-----|-----
Concha de abanico |          82    82.00    82.00
  Almeja          |          10    10.00    92.00
  Navajuela        |           8     8.00   100.00
-----|-----
Total             |         100   100.00

```

```

. tab Incidencia

Deteccion de adenovirus |      Freq.   Percent   Cum.
-----|-----
no                       |         100   100.00   100.00
-----|-----
Total                     |         100   100.00

```

log on (text)

Command

C:\Users\Samsung\AppData\Local\Temp\Rar\$EX14.86282\All Stata 12

Variables

Variable	Label
Especie	Moluscos bi
Ingreso	Fecha de ing
Extracción	Fecha extrac
Cuantificación	Fecha de cu
ADN	Cantidad de
PCR	Amplificac
Incidencia	Deteccion d

Properties

Variables

Name	Label	Type	Format	Value Label	Notes

Data

Filename	Resultados.v
Label	
Notes	
Variables	7
Observations	100
Size	5.08K

CAP | NUM | OVR