



# UTMACH

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

CARRERA DE INGENIERÍA ACUÍCOLA

IMPORTANCIA DE LA TÉCNICA PCR PARA EL DIAGNÓSTICO DE  
ENFERMEDADES DEL CAMARÓN *LITOPENAEUS VANNAMEI*

CHAMBA ELIZALDE ROBERTO ANDRES  
INGENIERO ACUÍCULTOR

MACHALA  
2022



**UTMACH**

**FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS**

**CARRERA DE INGENIERÍA ACUÍCOLA**

**IMPORTANCIA DE LA TÉCNICA PCR PARA EL DIAGNÓSTICO  
DE ENFERMEDADES DEL CAMARÓN *LITOPENAEUS*  
*VANNAMEI***

**CHAMBA ELIZALDE ROBERTO ANDRES  
INGENIERO ACUÍCULTOR**

**MACHALA  
2022**



# UTMACH

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

CARRERA DE INGENIERÍA ACUÍCOLA

EXAMEN COMPLEXIVO

IMPORTANCIA DE LA TÉCNICA PCR PARA EL DIAGNÓSTICO DE  
ENFERMEDADES DEL CAMARÓN *LITOPENAEUS VANNAMEI*

CHAMBA ELIZALDE ROBERTO ANDRES  
INGENIERO ACUÍCULTOR

RIVERA INTRIAGO LEONOR MARGARITA

MACHALA, 29 DE AGOSTO DE 2022

MACHALA  
29 de agosto de 2022

# Importancia de la Técnica PCR para el diagnóstico de enfermedades del camarón *Litopenaeus vannamei*

*por* Roberto Chamba

---

**Fecha de entrega:** 11-ago-2022 06:02p.m. (UTC-0500)

**Identificador de la entrega:** 1881510204

**Nombre del archivo:** iagn\_stico\_de\_enfermedades\_del\_camar\_n\_Litopenaeus\_vannamei.docx (116.19K)

**Total de palabras:** 4067

**Total de caracteres:** 21575

## CLÁUSULA DE CESIÓN DE DERECHO DE PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO DIGITAL INSTITUCIONAL

El que suscribe, CHAMBA ELIZALDE ROBERTO ANDRES, en calidad de autor del siguiente trabajo escrito titulado Importancia de la Técnica PCR para el diagnóstico de enfermedades del camarón <i>Litopenaeus vannamei</i>, otorga a la Universidad Técnica de Machala, de forma gratuita y no exclusiva, los derechos de reproducción, distribución y comunicación pública de la obra, que constituye un trabajo de autoría propia, sobre la cual tiene potestad para otorgar los derechos contenidos en esta licencia.

El autor declara que el contenido que se publicará es de carácter académico y se enmarca en las disposiciones definidas por la Universidad Técnica de Machala.

Se autoriza a transformar la obra, únicamente cuando sea necesario, y a realizar las adaptaciones pertinentes para permitir su preservación, distribución y publicación en el Repositorio Digital Institucional de la Universidad Técnica de Machala.

El autor como garante de la autoría de la obra y en relación a la misma, declara que la universidad se encuentra libre de todo tipo de responsabilidad sobre el contenido de la obra y que asume la responsabilidad frente a cualquier reclamo o demanda por parte de terceros de manera exclusiva.

Aceptando esta licencia, se cede a la Universidad Técnica de Machala el derecho exclusivo de archivar, reproducir, convertir, comunicar y/o distribuir la obra mundialmente en formato electrónico y digital a través de su Repositorio Digital Institucional, siempre y cuando no se lo haga para obtener beneficio económico.

Machala, 29 de agosto de 2022



CHAMBA ELIZALDE ROBERTO ANDRES  
0705623437

## RESUMEN

Se estudió los diferentes orígenes de las principales enfermedades que afectan a los cultivos de camarón. El efecto que estas pueden causar sobre los cultivos y una de las técnicas que hace posible un confiable diagnóstico de estas patologías.

Las enfermedades bacterianas con especificidad en la contaminación por bacterias intracelulares y enfermedades virales son las que requieren mayor empleo de esta técnica para su diagnóstico. El estudio demostró que es necesario el empleo de la PCR para la detección de enfermedades virales tales como Mancha Blanca “WSSV”, Necrosis Hipodérmica Y Hematopoyética Infecciosa “IHHNV”, Síndrome de Taura “TSV”, Parvovirus Hepatopancreático (HPV). Así como las enfermedades de origen bacteriano principalmente del género *Vibrio*.

Se pudo determinar que la técnica molecular PCR es de gran importancia para la detección precisa de los patógenos antes mencionados, demostró un 99,99% de certeza a la hora de arrojar resultados en identificación de virus y bacterias tales como WSSV y *Vibriosis*.

**Palabras clave:** PCR – VIRUS – BACTERIAS – ENFERMEDADES –  
*LITOPENAEUS VANNAMEI*

## **ABSTRACT**

The study of different origins of the main diseases that affect shrimp farms. The effect that these can cause on crops and one of the techniques that makes possible a reliable diagnosis of these pathologies.

Bacterial diseases and viral diseases are the ones that require the greatest use of this technique for their diagnosis. The study showed that the use of PCR is necessary for the detection of viral diseases such as White Spot "WSSV", Infectious Hypodermal and Hematopoietic Necrosis "IHHNV", Taura Syndrome "TSV", Hepatopancreatic Parvovirus (HPV). As well as diseases of bacterial origin, mainly of the *Vibrio* genus.

It was possible to determine that the PCR molecular technique is of great importance for the precise detection of the aforementioned pathogens, it demonstrated 99.99% certainty when it comes to yielding results in the identification of viruses and bacteria such as WSSV and Vibriosis.

**Keywords:** PCR – VIRUS – BACTERIA – DISEASES – *LITOPENAEUS VANNAMEI*

<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>5</b>
<b>2. RESUMEN</b> .....	<b>1</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>1</b>
<b>3. DESARROLLO</b> .....	<b>6</b>
<b>3.1. Actividad camaronera en el mundo</b> .....	<b>6</b>
<b>3.2. Enfermedades que afectan al camarón</b> .....	<b>6</b>
<b>3.3. Principales patologías en el camarón</b> .....	<b>7</b>
<b>3.3.1. Virus</b> .....	<b>7</b>
<b>3.3.1.1. Necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa (IHHNV)</b> .....	<b>7</b>
<b>3.3.1.1.1. Sintomatología</b> .....	<b>7</b>
<b>3.3.1.2. Virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV)</b> .....	<b>8</b>
<b>3.3.1.2.1. Sintomatología</b> .....	<b>8</b>
<b>3.3.1.3. Síndrome de taura (TSV)</b> .....	<b>8</b>
<b>3.3.1.4. Parvovirus hepatopancreático (HPV)</b> .....	<b>9</b>
<b>3.3.1.4.1. Sintomatología</b> .....	<b>9</b>
<b>3.3.2. Bacterias</b> .....	<b>9</b>
<b>3.3.2.1. Vibriosis sistémica</b> .....	<b>10</b>
<b>3.3.2.2. Vibrio parahaemolyticus</b> .....	<b>10</b>
<b>3.3.2.3. Infección por pseudomonas</b> .....	<b>11</b>
<b>3.3.2.4. Hepatopancreatitis necrotizante (NHP)</b> .....	<b>11</b>
<b>3.3.2.4.1. Sintomatología.</b> .....	<b>11</b>
<b>3.3.4. Patologías por hongos en camarón</b> .....	<b>12</b>
<b>3.3.4.1. Infección por Fusarium</b> .....	<b>12</b>
<b>3.3.4.2. Micosis larval</b> .....	<b>12</b>
<b>3.3.4.3. Fusariosis</b> .....	<b>12</b>
<b>3.4. Técnica PCR</b> .....	<b>13</b>
<b>3.4.1. ¿Qué es la PCR?</b> .....	<b>13</b>
<b>3.4.2. Técnica PCR de forma específica</b> .....	<b>13</b>
<b>3.4.3. Elementos empleados en la PCR</b> .....	<b>14</b>
<b>3.4.4. Formas de detección</b> .....	<b>14</b>
<b>3.4.5. ¿Por qué la PCR?</b> .....	<b>14</b>
<b>3.4.6. ¿En qué situaciones se prefiere usar la técnica PCR?</b> .....	<b>15</b>
<b>3.4.7. Uso en acuicultura</b> .....	<b>15</b>
<b>3.4.8. WSSV y la PCR</b> .....	<b>16</b>
<b>3.4.9. Estudio realizado por PCR en detección de Vibrio</b> .....	<b>17</b>

3.4.10. Estudio realizado por PCR en detección de IHHNV.....	17
4. CONCLUSIONES.....	19
5. BIBLIOGRAFÍA.....	20

## 1. INTRODUCCIÓN

La acuicultura ha tenido un crecimiento amplio en territorio, producción e intensificación, con ello, los problemas relacionados con la salud del animal se empiezan a notar. Las patologías de origen viral, bacteriano, fúngico y parasitario, son las que afectan a los cultivos.

Es necesario evaluar y tomar acciones para que este tipo de problemas de salud no terminen por perjudicar a los estanques. Para el diagnóstico de estas enfermedades tenemos varias técnicas de las que se puede hacer uso tales como la microscopía, microbiología, técnicas moleculares.

En mayor proporción, la técnica PCR se emplea con mayor frecuencia en el diagnóstico de enfermedades de origen viral y bacteriano específico en bacterias intracelulares. Dentro del primer caso, existe sintomatología diferenciada para cada una de las enfermedades, aunque varias de ellas pueden presentar similar sintomatología haciendo difícil que se pueda diagnosticar sin la ayuda de esta herramienta.

Es de importancia también en la diferenciación de enfermedades de uso bacteriano, dado es el caso de las bacterias de género *Vibrio* que afectan a los cultivos de agua dulce, así como salada, mediante la siguiente revisión bibliográfica se pretende identificar la importancia de la técnica PCR para el diagnóstico de enfermedades del camarón *Litopenaeus vannamei*.

## **2. DESARROLLO**

El cultivo de crustáceos como el camarón, trae consigo un sin número de enfermedades que ocasionan impacto negativo en el sistema productivo. Existen numerosas patologías producidas por bacterias, virus, hongos o parásitos. El impacto más notorio dentro de la producción es la pérdida de poblaciones en producción y la afección a la economía del sector (Montero, 2017).

### **2.1. Actividad camaronera en el mundo**

La industria de producción camaronera nace en el Ecuador a finales de los años 70s, en esos años, el temporal de la época ayudó a que pudieran formarse pozos en los que entraron larvas silvestres donde pudieron criarse más los habitantes de la zona pudieron darse cuenta cuando dichos pozos llegaron a secarse dejando los organismos a la vista (Saltos, 2020).

El crecimiento del cultivo de camarón comenzó a aumentar rápidamente, así como se incrementó el crecimiento del cultivo de peces sin embargo, la acuicultura como tal suministró tan solo el 7% del pescado que se va destinado al consumo humano Alvarado (2017). La producción acuícola en el Ecuador está mayormente representada por el sector camaronero, el mismo que ha crecido un 17% en el año 2018, año en el que el país comercializó 343 millones de libras superando en los años anteriores (Saltos, 2020).

Dentro del sistema de negocio de la acuicultura, el aumento de mano de obra se dio en 17% dentro del periodo de 1990 y 2014 (Alvarado, 2017).

### **2.2. Enfermedades que afectan al camarón**

Las infecciones patológicas es uno de los factores que impacta de manera negativa a la industria, así, la intensificación de los cultivos lleva a que los organismos se estresen puesto que la calidad del agua se ve afectada haciendo que los animales sean susceptibles a enfermedades, provocadas por bacterias, hongos, virus y parásitos (Alvarado, 2017).

## **2.3. Principales patologías en el camarón**

### **2.3.1. Virus**

Estos agentes submicroscópicos distribuidos por toda la naturaleza infectando a un sin número de especies y causando muchas más patologías siendo difíciles o imposibles de tratar (Montero, 2017).

Estos organismos presentan diferentes formas y tamaños que van desde los 20 a 30 nm. Estructuralmente, estos organismos están formados por DNA o RNA, rodeados por una cápside que a su vez está compuesta por una proteína (Montero, 2017).

#### **2.3.1.1. Necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa (IHHNV)**

El primer reporte de la presencia de la enfermedad fue registrada en Costa Rica en el año 2016 en una granja de producción (Parajeles, 2019).

El IHHNV es el virus que produce la patología de la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa por sus siglas en inglés, a la fecha, es el virus de menor tamaño conocido que afecta a los camarones peneidos. Dentro de su composición posee viriones de 22 nm de tamaño. Estudios varios demuestran que este virus forma parte de la familia *Parvoviridae* (Castro, 2018).

Según Morán (2021 ) a la fecha se tiene reporte de 4 genotipos de IHHNV. Mencionan también que, una teoría sugiere que una parte del genoma del virus hace parte del genoma de *L. vannamei* lo que demuestra que existe una forma infecciosa y una forma no infecciosa del virus, adicional mente que los más altos niveles de los más altos niveles de amplificación es mediante el uso de la PCR, sobre todo para evaluar y reconocer infecciones virulentas.

##### **2.3.1.1.1. Sintomatología**

Esta enfermedad se ve manifestada por reducido crecimiento de entre el 10 al 50% lo que lleva a menor peso de crecimiento y por ende menor peso de cosecha, además de

deformaciones a nivel de cutícula dando paso al síndrome de rostro deforme (Sánchez, 2022).

### **2.3.1.2. Virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV)**

El virus de la mancha blanca anteriormente era conocido como parte de la familia de los baculovirus más, el estudio de ADN, dio a conocer que el WSSV hace parte del género de *Whispovirus* de la familia *Nimaviridae*. Es un virus con diversas formas y de promedio tamaño a de 70 a 350 nm, además que es un virus de doble cadena (Taylor, 2018).

Taylor (2018) Rescata que WSSV es un patógeno que puede presentar una de las más altas virulencias y de amplio espectro de transmisión vertical principalmente, a la fecha, se conoce que la enfermedad puede presentarse en todas las especies de camarones marinos, cangrejos o langostas.

#### **2.3.1.2.1. Sintomatología**

Tal como mencionan en su estudio Jurquiza et al., (2019) la enfermedad puede presentarse desde huevos hasta la etapa de engorde de los animales. La forma más sencilla y común de detectar la enfermedad es visualizar los signos clínicos visibles en el análisis en fresco, se caracteriza por tener manchas circulares de color blanco en el exoesqueleto, dichas manchas pueden tener tamaños que van entre los 2 mm de diámetro, pudiendo causar hasta un 90% de mortalidad en los estanques infectados.

### **2.3.1.3. Síndrome de Taura (TSV)**

El agente viral del TSV posee estructura icosaédrica con aproximadamente 32 nm y no posee una envoltura, caracterizado por su ARN monocatenario positivo teniendo aproximadamente 10.21kb. Cápside de proteína que recubre al virus compuesta por 3 polipéptidos principales, 1 polipéptido menor.

Esta patología fue reportada por vez primera en Ecuador en el año de 1992, principalmente en las granjas productoras ubicadas en la cercanía del río Taura, de ahí su nombre. La enfermedad en su momento, ocasionó cuantiosas pérdidas dando como

resultado, mortalidades cercanas al 90% sin tener en cuenta la talla de los animales (Rubio *et al.*, 2020).

Dentro de las especies más afectadas tenemos a *L. vannamei* y *L. stylirostris*, siendo estas dos especies las mayormente afectadas en etapas juveniles.

Esta enfermedad puede ser transmitida por dos vías, transmisión vertical y horizontal. El virus se presenta como asintomático durante los primeros 5 días, ya que es el tiempo que necesita para incubarse y posterior a esto, las mortalidades pueden ser de hasta el 90% durante los primeros 10 días así, el animal que sobrevive poco a poco mejora su condición y la necrosis presente en su cuerpo termina por desaparecer con la ecdisis (Rubio *et al.*, 2020).

#### **2.3.1.4. Parvovirus hepatopancreático (HPV)**

Virus perteneciente a la familia parvoviridae, es un virus de forma icosaédrica, pequeñas dimensiones (22-24nm). Virus causante de enfermedad del hepatopáncreas en camarón, los organismos infestados presentan atrofia en el órgano mencionado. Organismo afecta principalmente a animales juveniles (Varela, 2018).

##### **2.3.1.4.1. Sintomatología**

El organismo contagiado presenta cuerpos basofílicos, cerca de los túbulos del hepatopáncreas, afectan a las células embrionarias (Varela, 2018).

#### **2.3.2. Bacterias**

Las bacterias desempeñan un gran rol en el medio ambiente, las mismas en grandes cantidades pueden favorecer o perjudicar a los organismos en cultivo (Reyes, 2021).

Tal como menciona Aspiazu *et al.* (2017), La exportación de camarón se ha vuelto un negocio rentable que cada vez va en crecimiento así, los requisitos y las imposiciones puestas por los países de destino son cada vez más estrictas con el fin de que los

organismos cuenten con la higiene adecuada y evitar contaminación de las más comunes bacterias como: *Salmonella spp*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*.

Aspiazu et al. (2017) mencionan que la técnica PCR, es de utilidad fundamental en la detección de vibrios en la calidad del camarón producto de exportación. Comenta que, dentro de la técnica existen protocolos de probada eficiencia usados para extraer el ADN de algunas bacterias que son objeto de estudio.

Así también, dentro de su investigación, sostiene que el protocolo basado en CTAB abre las puertas a la obtención de muestras y de ADN con eficiencia lo que permite la identificación y amplificación de varios genes virulentos de *V. cholerae*. La técnica permite la extracción de ADN suficiente para determinar la presencia del patógeno (Miranda et al., 2017).

#### **2.3.2.1. Vibriosis sistémica**

Es considerada una de las primeras enfermedades en Latinoamérica reportadas en el camarón, causando mortalidad del 90 % en los cultivos, se han reportado varias especies del género *Vibrio* como el *V. harveyi*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. penaeicida*, *V. nigripulchritudo*, *V. alginolyticus*, *V. owensii* y *V. campbellii*. El virus presenta signos clínicos como nado errático en superficie y a los bordes de la piscina, el consumo de alimento es bajo y en algunos casos se tiene brote de bioluminiscencia; sin embargo, esto va a depender de la cepa que lo causa (Varela & Martínez, 2020).

Se puede realizar un análisis en fresco para el diagnóstico de esta enfermedad, otras observaciones a tomar en cuenta son las de campo, así como también las macros y microscópicas del organismo en análisis (Varela et al., 2020).

#### **2.3.2.2. Vibrio parahaemolyticus**

Es un organismo gram-negativo con su característica forma de bastón, es un organismo que no presenta esporas, con un tamaño estimado de este 0.5 a 0.8 um de diámetro (Samuel, 2020).

Este organismo presenta un antígeno O, se ha comprobado que el organismo en cuestión, es el causante de una de las enfermedades principales gastroenteríticas que son transmitidas por mariscos en general (Samuel, 2020).

### **2.3.2.3. Infección por pseudomonas**

Este género bacteriano posee forma de bastoncillo siendo visibles con el uso del microscopio. Este género se puede identificarse en el suelo y agua mediante análisis científico. En el caso del cultivo de camarón, estas bacterias pueden estar presentes en ambientes marinos como agua dulce, en el último caso, presentan conducta oportunista y, generalmente pueden afectar a los animales que presentan bajas defensas (Reyes, 2021).

Es importante tener en cuenta que estas bacterias son productoras de exotoxinas. Estos microorganismos son la causa de la necrosis tisular y alteración del epitelio de varios órganos tales como los túbulos hepatopancreáticos, además de la mucosa del epitelio del intestino (Reyes, 2021).

### **2.3.2.4. Hepatopancreatitis necrotizante (NHP)**

Esta patología es causada por bacterias intracelulares tipo Rickettsias, son bacterias gram negativas con movilidad mediante flagelos.

#### **2.3.2.4.1. Sintomatología.**

Este tipo de bacterias infectan y se multiplican llegando a acumularse en el citoplasma de las células del epitelio de los túbulos del HP. Esta patología puede ser aguda o grave, presentándose generalmente en estadios de juveniles y adultos (Varela, 2018).

Esta patología no presenta un patrón definido de síntomas en el animal infectado, los túbulos del HP pueden verse aparentemente sanos, además que puede existir una notable reducción del tamaño del órgano (Varela, 2018)

### **2.3.3. Patologías por hongos en camarón**

#### **2.3.3.1. Infección por *Fusarium***

La infección por *fusarium* llamada fusariosis, es una enfermedad de origen fúngico que afecta a gran cantidad de especies dulceacuícolas y especies marinas. Estos agentes patógenos oportunistas llegan a causar alta mortalidad en todas las etapas del cultivo de peneidos (Bernal *et al.*, 2021).

#### **2.3.3.2. Micosis larval**

Esta enfermedad afecta a las etapas larvarias del camarón, siendo los géneros *Lagenidium* y *Sirolopidium* los que causan la enfermedad principalmente, otros géneros que se presentan ocasionalmente son *Phytium spp.*, *Leptolegnia marina* y *Haliphthoros milfordensis*. La micosis es cosmopolita; sin embargo, para los géneros *Lagenidium spp* y *Sirolopidium spp* la información no es precisa, todas las especies peneidos son susceptibles a dicha enfermedad (Morales *et al.*, 2008).

El género *Lagenidium* ocurre en los estadios de huevo, nauplio, protozoa y mysis y para *Sirolopidium spp*. Ocurren con más frecuencia en los estadios de mysis y postlarvas tempranas, las infecciones que presentan estas dos especies es una respuesta inflamatoria total o parcial, son letales y están acompañadas de vibriosis en los estadios terminales (Morales *et al.*, 2008).

#### **2.3.3.3. Fusariosis**

Es una enfermedad de las branquias negras en *japonicu*, su agente causal es *Fusarium spp*. Está presente en etapas larvales, sus principales géneros son *Lagenidium callinectes*, *L. marina*, *Sirolopidium spp.*, *Phytium spp.*, *Leptolegnia marina*, *Haliphthoros milfordensis*, *Fusarium solani*, entre otros. En etapa larval y postlarval se presentan altas mortalidades y los estadios sub-adulto y adulto son los más afectados con mayor frecuencia, en las cuales se observan inflamaciones marcadas y melanización, afectando a los apéndices, en periopodos, branquias y exoesqueleto (Bernal *et al.*, 2021).

## **2.4. Técnica PCR**

### **2.4.1. ¿Qué es la PCR?**

La técnica PCR la realizó Kary Mullis basándose al replicar al ADN en organismos eucariotas, a partir de la región doble cadena las enzimas efectúan la síntesis de la cadena complementaria DNA en el sentido 5' → 3' para ello se utilizó una cadena sencilla. Usando cebadores se crea la región doble cadena, un par de oligonucleótidos son sintetizados para de esta manera sean complementarios a cada extremo 3' del fragmento de DNA que se amplifique, esta técnica es sensible por lo cual se debe evitar contaminar debido a que una pequeña parte de ADN no requerido se logre amplificar y el resultado se sea real (Mas, et al, 2016).

La técnica de la PCR cuyo significado es reacción en cadena de la polimerasa, responde a una reacción de enzimas, ya que amplía la secuencia del ADN en varios ciclos que se repiten donde la secuencia que funciona como blanco, se copia de manera totalmente idéntica (Tamay *et al.*, 2013).

Las técnicas moleculares para detectar patógenos en crustáceos son utilizadas de forma eficaz para las enfermedades importantes como la Mancha Blanca y el síndrome del Taura, donde la PCR y RT-PCR demostraron tener una buena especificidad y sensibilidad para técnicas de diagnóstico y según la Organización Internacional de Epizootias (OIE) son técnicas de gran referencia para las enfermedades del camarón (García *et al.*, 2009).

### **2.4.2. Técnica PCR de forma específica**

Su diseño y construcción están basados en fragmentos de secuencias del mismo genoma viral, puede reconocer presencia de virus en determinados tejidos del camarón, esta afirmación se basa debido a que es el genoma particular de cada virus donde se encuentran instrucciones específicas para el funcionamiento bioquímico y fisiológico; sin embargo, se debe elegir de forma cuidadosa la región del genoma debido a que va a servir como molde para la construcción de la herramienta molecular y de esta manera no

seleccionar regiones conservadas en el nivel de familia que den falsos positivos (De la Rosa *et al.*, 2007).

La técnica de PCR es eficaz puesto que la interpretación de los resultados no tiene ambigüedades y es sencilla si se logra tener los controles adecuados, por lo tanto, los métodos no necesitan de observación y reconocimiento de síntomas variables, ni de extensa experiencia en identificación de subestructura celular y tisular como las técnicas histopatológicas (De la Rosa *et al.*, 2007).

#### **2.4.3. Elementos empleados en la PCR**

Lo primordial en la técnica es el ADN. La molécula de ADN está formada por 3 componentes, azúcar “desoxirribosa”, un grupo fosfato y como parte final una base nitrogenada que se compone de (adenina, timina, citosina y guanina) así, la molécula de ADN es una estructura de doble hélice (Tamay *et al.*, 2013).

#### **2.4.4. Formas de detección**

Con el fin de reconocer los tipos de patógenos causantes de enfermedades, el uso de la microbiología es esencial para dicho trabajo. Dentro de los tipos de técnicas, existen, medios de cultivo compuestos por agar, además métodos moleculares cuyo resultado más específico y preciso para la recepción de muestras y resultados, dentro de estos métodos tenemos la PCR.

#### **2.4.5. ¿Por qué la PCR?**

El uso de las técnicas moleculares en el sector acuícola, se dio para el diagnóstico de enfermedades al igual que para obtener un tratamiento de las especies en cultivo, por lo cual es de gran ayuda en la industria de la acuicultura debido a brotes de diversas enfermedades provocando pérdidas económicas, una de las diferencias entre otras técnicas es su sensibilidad y tiempo que tiene para poder proporcionar resultados, la PCR garantiza una buena sensibilidad en detección de patógenos porque logra identificar cantidades pequeñas infecciosas en la unidad de análisis (Rodulfo *et al.*, 2012).

#### 2.4.6. ¿En qué situaciones se prefiere usar la técnica PCR?

La técnica del PCR y RT-PCR se aplican para el diagnóstico de agentes patógenos que causan enfermedades de la lista de la OIE tales como virus del síndrome de Taura (VST), virus del síndrome de las manchas blancas (VSMB), virus de la enfermedad de la cabeza amarilla (VECA/VAB), *Baculovirus penaei* (BP), el virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa (VNHHI) y el virus de la mionecrosis infecciosa (IMNV), los cuales son usados de manera sistemática en ciertos sectores acuícolas (OIE, 2021).

La técnica descrita presenta ventajas y desventajas que son presentadas a continuación.

El uso de PCR detecta patógenos de crecimiento lento e incultivables en determinadas especies acuícolas, a continuación, se muestra las ventajas y desventajas de PCR en la siguiente tabla.

**Tabla 1**

Ventajas y desventajas de usar la técnica PCR

<b>VENTAJAS</b>	<b>DESVENTAJAS</b>
Simplicidad y rapidez	Tiene altos costos
Especificidad	Revela resultados falsos positivos por contaminación del ADN
Sensibilidad	Detección limitada para la identificación simultánea de múltiples muestras
Amplifica secuencias de una amplia variedad de muestras	

**Elaborado por:** Autor

#### 2.4.7. Uso en acuicultura

La técnica de PCR es de gran ayuda para casos con sensibilidad, como las infecciones incipientes, en que unos pocos virus se encuentran presentes en tejidos de camarón con infecciones, para lo cual basta una sola molécula de ADN presente en la muestra para que

pueda ser amplificada, a partir de ahí genera señal visible como una banda en electroforesis en gel (Figueredo, et al, 2020).

#### 2.4.8. WSSV y la PCR

Como menciona Calle (2021) habiendo evaluado muestras de camarón en la provincia del Guayas-Ecuador, tomaron muestras de camarón *L vannamei* para extraer ADN de pleópodos y periópodos.

Este estudio demostró que las poblaciones estudiadas presentaron infección viral por WSSV, no obstante, el mismo estudio sostuvo que el 80 % de los organismos no presento el virus dentro de sí (Calle, 2021).

El estudio consistió en selección y desinfección de especímenes con una mezcla de agua destilada juntos con metanol al 70%, luego se extrajo tejido de pleópodos y tejido branquial. Las muestras extraídas fueron conservadas a -20 centígrados para acto seguido realizar extracción de ADN.

Fue preparado gel de agarosa al 1% con tinción de Sybr® Safe DNA; posterior a esto se realizó la migración por electroforesis a 55V por treinta minutos.

En la detección de WSSV se trabajó con muestras, las mismas que fueron 120 reacciones PCR punto final. Obteniendo positivo para mancha blanca (Calle, 2021).

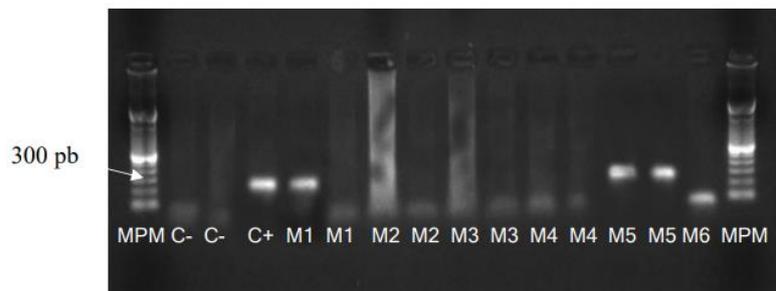


Ilustración 1: ELECTROFORESIS EN AGAROSA 1.5 %; POSITIVO WSSV. (Calle, 2021)

#### **2.4.9. Estudio realizado por PCR en detección de Vibrio**

Almada et al., (2017) realizaron un estudio para la detección de vibrio mediante la amplificación de genes de patogenicidad en camarón *L. vannamei*, para lo cual utilizaron un estanque tipo invernadero de 50 x 8 x 1.2 m (largo, ancho, profundidad) y densidad de siembra de 126 organismos juveniles/m<sup>2</sup>, el peso inicial fue de 13.64, en una producción intensiva del *Vannamei* localizada en Sonora, México con una duración de 59 días.

Utilizaron 64 aislados de tejidos de camarón para el análisis de PCR, luego de identificar las cepas del género *Vibrio spp* se realizó la amplificación con los oligonucleótidos iniciadores específicos para *V. cholerae* (*V. chol*), *V. vulnificus* (*Vvh-785*), *V. harveyi* (*LuxN*), *V. harveyi* gen de hemolisina (*v+hh*) y *V. harveyi* (*toxR*) y se utilizó el kit comercial GoTaq PCR Core Systems con una concentración de 100 ng de ADN en todas las muestras con volumen final de 25 µl.

Como resultado se obtuvieron los siguientes datos 12 pertenecieron a *Vibrio spp*. (5 de branquias, 5 de hemolinfa y 2 de hepatopáncreas). El fragmento amplificado de ADN del gen 16s presentó 663 pb, correspondiente a *Vibrio spp*, luego de ello los 12 aislados de *Vibrio spp* fueron analizados por segunda vez por PCR donde emplearon oligonucleótidos iniciadores específicos de genes de virulencia de hemolisina y *toxR* y para otras especies de *Vibrio* y como resultado de los aislados, 4 presentaron los dos genes de virulencia, 3 a hemolinfa ,1 a branquias, acto seguido se obtuvo la amplificación de fragmentos de ADN para el *V. harveyi* para 6 de los aislados del *Vibrio spp*, donde 5 de hemolinfa y 1 de branquias.

#### **2.4.10. Estudio realizado por PCR en detección de IHHNV**

Este estudio fue realizado en las fincas ubicadas alrededor del Golfo de Nicoya de Costa Rica, de la cual se eligieron 15 fincas y se tomaron 10 ml de agua, donde se recogió 100 postlarvas en acondicionamiento, luego de 7 semanas de siembra, visitaron la finca para tomar 10 camarones de 3 diversos sitios para extraer el estómago y hepatopáncreas, las muestras fueron almacenadas en alcohol a 95% y -80°C en congelación hasta su respectiva utilización.

Se utilizó PCR para amplificar una secuencia parcial del gen  $\beta$ -actina y así poder descartar inhibiciones de la misma, para ello se hizo uso de iniciadores Actin-F y Actin-R3, el fragmento amplificado fue de 339 pb y mediante la electroforesis en gel agarosa al 1% en amortiguador TBE 0.5x se visualizó. Las muestras fueron sometidas al análisis molecular de secuencias de la región codificante para una porción de la proteína no estructural (ORF1) de IHHNV, utilizando iniciadores de 389F y 389-R, dando un tamaño amplificado de 389 pb y se observó por electroforesis.

Los productos del 389 pb-PCR se los envió a Macrogen (Seoul, Korea), para su purificación y secuenciación, donde las muestras que dieron positivas se les realizó análisis molecular de secuencias de una región codificante más pequeña de la proteína no-estructural (ORF1) de IHHNV, a través de un PCR (309 pb-PCR), que detecta solo los linajes patógenos y de igual forma los segmentos de tamaño 309 pb los enviaron a Macrogen para su purificación y secuenciación.

Dando como resultado que las dos pruebas moleculares ajustaron un total de 113 muestras (94,1 % de concordancia); sin embargo, el 389 pb-PCR fue el más sensible, porque precisó la amplificación secuencial de IHHNV en siete muestras adicionales. Trece fincas resultaron positivas a IHHNV con un porcentaje de (86,7 %), en dos fincas no hubo presencia del virus tanto en las muestras de agua, como en postlarvas, hepatopáncreas y estómagos de los camarones juveniles recolectados al inicio, mitad y final del estanque (Mora *et al.*, 2021).

### 3. CONCLUSIONES

Se pudo estudiar las diferentes patologías que afectan al cultivo del camarón *Litopenaeus vannamei* así como la técnica molecular que es de vital importancia para el diagnóstico de estas patologías, principalmente virales y bacterianas.

Dentro del estudio se pudo determinar que la técnica PCR es muy importante para el diagnóstico de enfermedades puesto que el nivel de certeza es del 99.99%.

#### 4. BIBLIOGRAFÍA

- Alvarado, M. V. (2017). *Diseño de un método MPN-PCR para monitoreo de vibrio parahaemolyticus en los sistemas de Litopenaeus vannamei* (Bachelor's thesis, Espol). Obtenido de tesis <https://www.dspace.espol.edu.ec/retrieve/bb470ac5-ebc6-42bf-95d2-c32c1f27b07e/D-CD108683.pdf>
- Bernal, F., Yangüés, L., de Von Chong, M., & Muñoz, M. I. (2021). Hongos patógenos en la producción de camarón marino, *Litopenaeus vannamei* (BOONE), Panamá. *Tecnociencia*, 23, 315-331. Obtenido de <https://revistas.up.ac.pa/index.php/tecnociencia/article/view/1863>
- Calle, B. A. (2021). *Incidencia viral de White Spot Syndrome en Penaeus vannamei en dos muestras poblacionales de camarón en la Provincia del Guayas* (Bachelor's thesis, Facultad de Ciencias Naturales. Universidad de Guayaquil). Obtenido de Tesis [http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/redug/57271/1/Calle%20Carpio%20Tesis\\_Final\\_BIOL%20%281%29-signed-signed%20%282%29.pdf](http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/redug/57271/1/Calle%20Carpio%20Tesis_Final_BIOL%20%281%29-signed-signed%20%282%29.pdf)
- Castro, W. A. (2018). *Cinética de la infección natural del Virus de la Necrosis Infecciosa Hematopoyética e Hipodérmica (IHHNV) modulada por hipertermia ( $\geq 32^\circ \text{C}$ ) en camarón blanco Litopenaeus vannamei*. Obtenido de tesis <http://cienciasinaloa.ipn.mx/jspui/bitstream/123456789/305/1/18%20Tesis%20WENCESLAO%20ABOITE%20CASTRO.pdf>
- García, N., Boada, M., & De Donato, M. (2009). Detección del síndrome del virus del Taura (TSV) en *Litopenaeus vannamei* (BOONE) del occidente de Venezuela. *Revista Científica*, 18(2), 134-141. Obtenido de [http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0798-22592008000200003](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-22592008000200003)
- Jaime, H., & Jesús, R. (2020). *Descripción de la infestación intestinal por gregarinas de camarón blanco Litopenaeus vannamei cultivado en San Blas, Nayarit*. Obtenido de Tesis [http://dspace.uan.mx:8080/bitstream/123456789/2361/1/Descripci%c3%b3n%20de%20la%20infestaci%c3%b3n%20intestinal%20por%20gregarinas%20de%20camar%c3%b3n%20blanco%20Litopenaeus%20vannamei%20cultivado%20en%20San%20Blas%2c%20Nayarit\\_compressed.pdf](http://dspace.uan.mx:8080/bitstream/123456789/2361/1/Descripci%c3%b3n%20de%20la%20infestaci%c3%b3n%20intestinal%20por%20gregarinas%20de%20camar%c3%b3n%20blanco%20Litopenaeus%20vannamei%20cultivado%20en%20San%20Blas%2c%20Nayarit_compressed.pdf)
- Jurquiza, V., De la Garza, J., Andreoli, G., & Moriondo, P. (2019). Monitoreo del virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV) en muestras de langostino (*Pleoticus muelleri*) durante los años 2010 a 2014 en la Argentina. *Monitoreo del virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV) en muestras de langostino (Pleoticus muelleri) durante los años 2010 a 2014 en la Argentina*, 32(1), Monitoreo del virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV) en muestras de langostino (*Pleoticus muelleri*) durante los años 2010 a 2014 en la Argentina. Obtenido de [https://aquadocs.org/bitstream/handle/1834/41299/MAFISINIDEP\\_32\\_1\\_19.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://aquadocs.org/bitstream/handle/1834/41299/MAFISINIDEP_32_1_19.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- Miranda, E. P., Barba, Y. D., & Herrera, C. M. (2017). Implementación de un múltiplex PCR para el diagnóstico del vibrio cholera, en el control de calidad de camarón de exportación. *Dominio de las Ciencias*, 3(4), 369-380. Obtenido de <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=6325513>

- Montero, W. J. (2017). *Principales enfermedades virales que afectan la Producción de camarón Blanco del Pacífico <L>Litopenaeus Vannamei</L> En Ecuador*. Obtenido de Examen Complexivo [http://repositorio.utmachala.edu.ec/bitstream/48000/11354/1/DE00016\\_EXAMENCOMPLEXIVO.pdf](http://repositorio.utmachala.edu.ec/bitstream/48000/11354/1/DE00016_EXAMENCOMPLEXIVO.pdf)
- Mora, J. F., Navarro, N. P., Morales, A. S., & Dolz, G. (2021). Detection of IHHNV in *Litopenaeus vannamei* farms in Costa Rica. *Agronomy Mesoamerican*, 32(2), 587-598. Obtenido de <https://revistas.ucr.ac.cr/index.php/agromeso/article/view/43179>
- Morán, G. J. (2021). *Detección del virus de la Necrosis Hipodérmica y Hematopoyética Infecciosa (IHHNV) mediante análisis de PCR en Penaeus vannamei*. Obtenido de Tesis [http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/redug/57042/1/Mor%c3%a1n%20Jonathan\\_Tesis%202021-2022%20Ti1%20-%20CORREGIDA.pdf](http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/redug/57042/1/Mor%c3%a1n%20Jonathan_Tesis%202021-2022%20Ti1%20-%20CORREGIDA.pdf)
- OIE. (2021). Manual de las Pruebas de Diagnóstico para los Animales Acuático. Obtenido de <https://www.woah.org/es/que-hacemos/normas/codigos-y-manuales/acceso-en-linea-al-manual-acuatico/>
- Parajales, M. J. (2019). *Presencia y genotipos del virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa (IHHNV) en fincas de cultivo de camarón blanco (Litopenaeus oannamei) en Costa Rica*. Obtenido de Tesis <https://repositorio.una.ac.cr/handle/11056/17231>
- Reyes, M. A. (2021). *Principales agentes infecciosos asociados al cultivo del camarón blanco Penaeus vannamei reportados en Ecuador durante el periodo 2010-2021*. Obtenido de Tesis <https://repositorio.upse.edu.ec/bitstream/46000/6640/1/UPSE-TBI-2021-0016.pdf>
- Rodulfo, H., De Donato, M., Rodríguez, M. E., & Boada, M. (2012). Alta sensibilidad de RT-PCR anidada para la detección del virus del síndrome del Ta ura en camarones peneidos. *SABER. Revista Multidisciplinaria del Consejo de Investigación de la Universidad de Oriente*, 23(1), 18-22. Obtenido de <https://www.redalyc.org/pdf/4277/427739445004.pdf>
- Rubio, M., Silveira, R., Hernández, D. A., Pérez, A., & Pozo, M. (2020). Prevalencia de enfermedades en el camarón de cultivo *L. vannamei* en Cuba. *Revista Cubana de Investigaciones Pesqueras*, 37(2), 57-65. Obtenido de <https://aquadocs.org/bitstream/handle/1834/41620/Prevalencia%20de%20enfermedades%20en%20el%20camar%C3%B3n.pdf.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Saltos, C. J. (2020). *El sector camaronero y su incidencia en el crecimiento económico de la provincia del Guayas durante el periodo 2013-2018*. Obtenido de Tesis <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/19058/4/UPS-GT002972.pdf>
- Samuel, S. M. (2020). *Identificación de vibrio parahaemolyticus por PCR en productos pesqueros secos-salados expendidos en el Mercado Municipal del Cantón La Libertad*. Obtenido de Tesis <https://cia.uagraria.edu.ec/Archivos/SANTISTEVAN%20MAGALLAN%20ANTHONY%20SAMUEL.pdf>

- Sánchez, M. D. (2022). *Enfermedades que afectaron la producción de camarón y análisis de las exportaciones de camarón en el Ecuador*. Obtenido de Tesis <https://repositorio.upse.edu.ec/bitstream/46000/8084/4/UPSE-TBI-2022-0024.pdf>
- 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(2), 70-78. Obtenido de <https://www.medigraphic.com/pdfs/invdiss/ir-2013/ir132d.pdf>
- Taylor, D. P. (2018). *Caracterización genómica del virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV) en camarón blanco del Pacífico (Litopenaeus vannamei) del noroeste de México*. Obtenido de Tesis [http://dspace.cibnor.mx:8080/bitstream/handle/123456789/2745/parrilla\\_d%20TESIS.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://dspace.cibnor.mx:8080/bitstream/handle/123456789/2745/parrilla_d%20TESIS.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- Varela, A., & Martínez, L. F. (2020). Técnicas diagnósticas para enfermedades bacterianas en camarones. Usos, alcances y limitaciones. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 31(3). Obtenido de [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1609-91172020000300002&script=sci\\_arttext&lng=pt](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1609-91172020000300002&script=sci_arttext&lng=pt)
- Varela, M. A. (2018). Patologías del hepatopáncreas en camarones marinos cultivados en América y su diagnóstico diferencial mediante histopatología. *AquaTIC*(50), 13-30. Obtenido de <https://www.redalyc.org/journal/494/49460101003/49460101003.pdf>