



# UTMACH

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

CARRERA DE INGENIERÍA ACUÍCOLA

UTILIZACIÓN DE PCR PARA LA DETECCIÓN DE ENFERMEDADES  
QUE AFECTAN A LA LARVA DE CAMARÓN BLANCO ( *LITOPENAEUS*  
*VANNAMEI* )

ARROBO MOREIRA ALEX FERNANDO  
INGENIERO ACUÍCULTOR

MACHALA  
2022



# UTMACH

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

CARRERA DE INGENIERÍA ACUÍCOLA

UTILIZACIÓN DE PCR PARA LA DETECCIÓN DE  
ENFERMEDADES QUE AFECTAN A LA LARVA DE CAMARÓN  
BLANCO ( *LITOPENAEUS VANNAMEI* )

ARROBO MOREIRA ALEX FERNANDO  
INGENIERO ACUÍCULTOR

MACHALA  
2022



# UTMACH

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

CARRERA DE INGENIERÍA ACUÍCOLA

EXAMEN COMPLEXIVO

UTILIZACIÓN DE PCR PARA LA DETECCIÓN DE ENFERMEDADES QUE  
AFECTAN A LA LARVA DE CAMARÓN BLANCO ( *LITOPENAEUS VANNAMEI* )

ARROBO MOREIRA ALEX FERNANDO  
INGENIERO ACUÍCULTOR

GALARZA MORA WILMER GONZALO

MACHALA, 29 DE AGOSTO DE 2022

MACHALA  
29 de agosto de 2022

# DOC\_2

*por* Fernando Arrobo\_moreira

---

**Fecha de entrega:** 18-ago-2022 01:03p.m. (UTC-0500)

**Identificador de la entrega:** 1884028186

**Nombre del archivo:** Complexivo\_Final-\_Arrobo\_Alex.pdf (515.69K)

**Total de palabras:** 4415

**Total de caracteres:** 23533



## RESUMEN

La camaricultura, es una actividad con alto rendimiento económico, por lo cual ha logrado desarrollarse mucho en un muy corto periodo, las tecnologías que se han desarrollado dan paso a que esta actividad crezca día a día. Pero en cambio existen algunas delimitaciones que frenan un poco esta evolución, así como la tecnificación nos deja tener mucha más capacidad de producción, las enfermedades que se presentan durante el desarrollo del camarón son múltiples, y algunas con una gran devastación en los cultivos.

Son varios los agentes infecciosos que hasta la actualidad han provocado un gran decaimiento en la economía de las granjas. Existen múltiples tecnologías para la detección de estas enfermedades, unas más efectivas que otras, ya que se podrían cuestionar su efectividad, sensibilidad, especificidad y eficiencia. Por lo tanto, se explica la alternativa de emplear mecanismos moleculares como la solución más conveniente para poder detectar oportunamente y tener una valoración más específica, con un alto índice de susceptibilidad y facilidad de interpretación.

En el presente trabajo se explica la manera en que se desarrollan y diseñan las sondas moleculares y los iniciadores específicos. Así mismo, se explican los procedimientos que utilizan los referidos métodos con el propósito de identificar y percibir la disposición de agentes infecciosos en los diferentes órganos de las larvas del *Penaeus*: El desarrollo de porciones del genoma elegido, los cuales son por medio de la utilización de oligonucleótidos promotores concreto para la reacción de la polimerasa en cadena (PCR) o la PCR en tiempo real (qPCR).

**Palabras claves:** Patógenos, camaricultura, larvas, PCR, sondas moleculares.

## **ABSTRACT**

Shrimp farming is an activity with high economic performance, for which it has managed to develop a lot in a very short period, the technologies that have been developed give way to this activity growing day by day. But instead there are some delimitations that slow down this evolution a bit, just as modernization allows us to have much more production capacity, the diseases that occur during the development of shrimp are multiple, and some with great devastation in crops.

There are several infectious agents that to date have caused a great decline in the economy of farms. There are multiple technologies for the detection of these diseases, some more effective than others, since their efficacy, sensitivity, specificity and efficiency could be questioned. Therefore, the alternative of using molecular mechanisms is explained as the most convenient solution to be able to locate in a timely manner and have a more specific assessment, with a high index of susceptibility and ease of interpretation.

This paper explains how molecular tests and specific primers are developed and designed. Likewise, the procedures used by the reference methods with the purpose of identifying and perceiving the disposition of infectious agents in the different organs of the *Penaeus* larvae are explained: The development of portions of the chosen genome, which are by means of the use of specific promoter oligonucleotides for polymerase chain reaction (PCR) or real-time PCR (qPCR).

**Key words:** Pathogens, shrimp farming, larvae, PCR, molecular tests

## ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN.....	8
2.	DESARROLLO.....	9
2.1	<b>Antecedentes</b> .....	9
2.1.1	<b>Taxonomía</b> .....	9
2.2	Ciclo de vida del camarón ( <i>L. vannamei</i> ) .....	9
2.3	Estado actual de la larvicultura en Ecuador .....	10
2.4	Principales patógenos asociados al cultivo de camarón en el Ecuador .....	11
2.4.1	Vibrios en larvicultura .....	12
2.4.2	White Spot Syndrome Virus .....	12
2.4.3	Necrosis Infecciosa Hipodérmica y Hematopoyética (IHHN) .....	12
2.4.4	Hepatopancreatitis Necrotizante.....	12
2.4.5	Síndrome de la Mortalidad Temprana .....	13
2.4.6	Bolitas Blancas .....	13
2.4.7	Epibiontes bacterianos.....	14
2.4.8	Bacterias Luminiscentes .....	14
2.4.9	<i>Baculovirus penaei</i> (BP).....	14
2.5	DETECCIÓN DE ENFERMEDADES MEDIANTE PCR.....	14
2.5.1	Ventajas y Desventajas de la PCR .....	15
2.5.2	Etapas del proceso de la técnica PCR.....	15
2.6	Detección de enfermedades en la larvicultura por el uso de PCR .....	16
2.6.1	Enfermedad de la Mancha Blanca y EPH diagnostico por PCR.....	17
2.6.2	<i>Vibriosis</i> diagnosticada por PCR.....	18
2.6.3	Detección del virus de la Necrosis Infecciosa Hipodérmica y Hemapoyética mediante PCR.....	18
2.6.4	Detección de IHHNV por PCR .....	19
3.	CONCLUSIÓN.....	20
2.	BIBLIOGRAFÍA.....	21

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1:</b> <i>Litopenaeus vannamei</i> .....	9
<b>Tabla 2:</b> Impacto específico de la mancha Blanca en las Exportaciones de Camarón de Ecuador, periodo 1998-2000(en miles de libras).....	11
<b>Tabla 3:</b> Impacto específico de la Mancha Blanca en las Exportaciones de Camarón de Ecuador, periodo 1998-2000 (en miles de dólares). ....	11

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Ciclo de vida del camarón blanco.....	10
<b>Figura 2:</b> Etapas de la PCR .....	16

## 1. INTRODUCCIÓN

Las múltiples enfermedades que se presentan durante la vida del camarón blanco, ya sean en estadios larvales o en engorde, son consideradas como un gran freno para el desarrollo productivo de camarón en cautiverio a nivel mundial, ya que estas llevan consigo un gran riesgo y pérdidas económicas. Para el continente americano, siendo más específicos el área de Latinoamérica, este factor se lo evidencio con mayor fuerza durante el brote de la patología conocida como la Mancha Blanca, la misma que causo un impacto muy alto y negativo en el cultivo del camarón dentro de la región; así mismo como otras enfermedades que se presentan durante los ciclos de producción entre las cuales tenemos: IHNV (virus de la Necrosis Hipodérmica y Hematopoyética Infecciosa), TSV (virus del Síndrome de Taura), YHV (virus de la Cabeza Amarilla) entre otras (Castro, 2020).

Debido a que múltiples enfermedades se propagaron, los eventos de contaminación hacia cultivos se han vuelto exponencial, y múltiples patógenos se reportan en América.

En el caso de agentes infecciosos de muy pequeño tamaño, la realización por medio de microscopios ópticos resulta imposible, por lo cual se tiene que ver mucho más allá y es donde se busca la detección de las alteraciones que sufren las células que han sido infectadas (Silva, 2021).

Frente a este problema, la eficiencia en cuanto a la detección oportuna de las enfermedades juega un papel fundamental, por lo cual es una prioridad el desarrollo de una técnica que permita realizar lo anteriormente dicho, la misma que nos provea de una detección y diagnóstico, especificidad y sensibilidad y así tomar las medidas preventivas necesarias y correspondientes. En los laboratorios de larvicultura de peneidos, los métodos moleculares son los más prácticos y efectivos, dentro del cual tenemos al PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa), tecnología molecular, que da a conocer con una gran exactitud y son un tanto más estandarizable para la buena detección de enfermedades y patógenos, resaltando las causadas por virus (Silva, 2021).

## 2. DESARROLLO

### 2.1 Antecedentes

La explotación de los recursos acuáticos, son equiparables a una gran fuente de nutrientes y proteínas naturales para una dieta equilibrada, de la misma forma genera múltiples fuentes laborales. La camaronicultura ha logrado tener un gran crecimiento en los diferentes continentes donde es explotado (Chalán, 2022).

#### 2.1.1 Taxonomía

**Tabla 1:** *Litopenaeus vannamei*

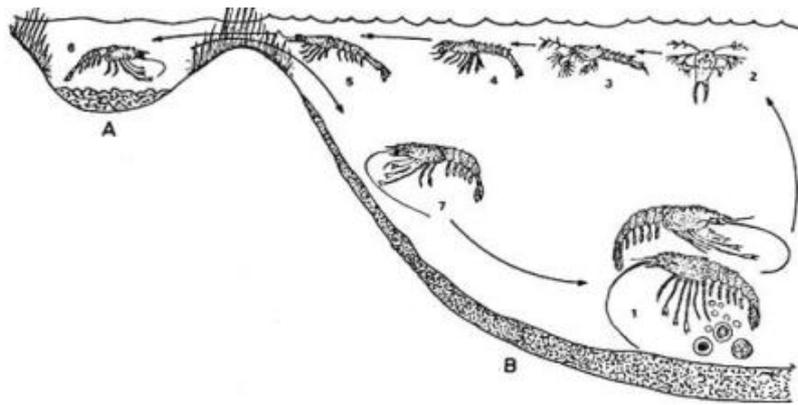
<b>Reino</b>	Metazoa
<b>Phylum</b>	Arthropoda
<b>Clase</b>	Crustacea
<b>Orden</b>	Decapoda
<b>Familia</b>	Penaeidae
<b>Género</b>	<i>Penaeus</i>
<b>Especie</b>	<i>P. vannamei</i>

Fuente: (Neira Gonzabay, 2022)

#### 2.2 Ciclo de vida del camarón (*L. vannamei*)

Esta especie como otros crustáceos comprenden diferentes estadios empezando por el huevo, seguidamente pasan a nauplio, zoea, mysis y postlarvas, y ya al finalizar están la etapa de juveniles y adultos (Chalán, 2022).

Esta especie es muy reconocida por lograr un mayor crecimiento en un lapso de tiempo muy corto, y que son una especie eurihalina (Chalán, 2022).



**Figura 1:** Ciclo de vida del camarón blanco del Pacífico

**Fuente:** (Morán Romero, 2022)

### 2.3 Estado actual de la larvicultura en Ecuador

La acuicultura, es un proceso por el cual se obtiene camarón en un medio acuático, industrializada mediante la tecnología, teniendo como objetivo la explotación y comercialización, el consumo del camarón se ha logrado expandir por el gran pedido de países automatizados. Los crustáceos tienen una buena adaptación a las diferentes alteraciones en su hábitat, como las alteraciones tanto en la temperatura y salinidad (Skretting, 2018).

El fenómeno del Niño tuvo gran incidencia para el desarrollo de laboratorios, aunque al principio tuvieron dificultades debido a la abundancia de las larvas silvestres, sin embargo, tiempo después las semillas silvestres empezaron a escasear y a presentar enfermedades, a finales de los 90 apareció el Síndrome de la Mancha Blanca (WSSV), donde los laboratorios sometieron a examen sus operaciones, mejorando la bioseguridad y el manejo sanitario de su producción (Tabla I y II).

Hoy en día, la gran parte de los países productores de Latinoamérica tienen planificaciones de selección genética y domesticación, siendo así que utilizan un sistema de maduración, reproductores domésticos en depósitos, con la finalidad de fortalecerlos frente a enfermedades y tener una buena tasa de desarrollo en las poblaciones de camarón (FAO, 2014).

**Tabla 2:** Impacto específico de la Mancha Blanca en las exportaciones de camarón de Ecuador, periodo 1998-2000 (en miles de libras)

	<b>1.998</b>	<b>1.999</b>	<b>2.000</b>	<b>Variación 1.998-2.000</b>
<b>TOTAL</b>	252,985	209,040	83,513	-66.99%
<b>USA</b>	140,852	106,281	42,305	-69.96%
<b>Europa</b>	76,717	62,184	24,520	-68.04%
<b>Asia</b>	29,808	35,821	13,385	-55.10%
<b>Canadá</b>	2,552	3,077	820	-67.87%

**Fuente:** (Marcillo del Castillo, 2010)

**Tabla 3:** Impacto específico de la Mancha Blanca en las exportaciones de camarón de Ecuador, periodo 1998-2000 (en miles de dólares).

	<b>1.998</b>	<b>1.999</b>	<b>2.000</b>	<b>Variación 1.998 - 2.000</b>
<b>TOTAL</b>	875,050	616,942	301,000	-65.60%
<b>USA</b>	520,897	317,152	146,141	-71.94%
<b>Europa</b>	241,131	171,762	87,219	-63.83%
<b>Asia</b>	99,730	112,660	57,219	-42.63%
<b>Canadá</b>	9,021	9,285	2,886	-68.01%
<b>Pérdidas de la industria</b>			<b>US\$600 millones</b>	
<b>Pérdidas en la exportación</b>			<b>US\$900 millones</b>	

**Fuente:** (Marcillo del Castillo, 2010)

#### **2.4 Principales patógenos asociados al cultivo de camarón en el Ecuador**

Los principales patógenos son bacterias del género *Vibrio*, las cuales se las encuentra en la mayoría de los lugares de cultivos de larvas (Almada, Plascencia, & Espinoza, 2018).. Las afecciones que se presentan en los estadios larvarios son propiciadas por bacterias oportunistas, las cuales contagian en etapa larvaria cuando estas están débiles o por un factor tanto biótico como abiótico, siendo así que se pueden

distinguir dos afecciones causadas por el género *Vibrio*: la enfermedad de "Bolitas Blancas" y bacterias luminiscentes.

#### **2.4.1 Vibrios en larvicultura**

Aunque las bacterias del género *Vibrio* pueden afectar las fases larvales de *L. vannamei*, *Penaeus monodon* y *Penaeus japonicus* provocadas por el género *Vibrio*, afectando a la fase larval, también, consiguen afectar otros periodos de su vida. Su propagación es de forma horizontal. Las larvas y animales en engorde pueden ser invadidos por *Vibrios* en el sector de boca y apéndices. Además, presentan un color rojizo, cromatóforos expandidos, abdomen un tanto opaco, acalambramiento y melanización (Almada, Plascencia, & Espinoza, 2018).

#### **2.4.2 White Spot Syndrome Virus**

La enfermedad de la Mancha Blanca afecta a los cultivos de camarón, y puede ocasionar grandes mortalidades. El agente etiológico es un virus doble cadena con un tamaño alrededor de 300 Kb, se transmite de forma horizontal. Puede aparecer entre los 30 y 50 días de cultivo ocasionando un estrés oxidativo, de esta manera la enfermedad se desarrolla debido a que el oxígeno baja sus niveles y también el pH, lo cual hace que produzca daños a nivel de tejidos por lo tanto si sus signos clínicos continúan ocasionan la muerte (Parrilla Taylor, 2018).

#### **2.4.3 Necrosis Infecciosa Hipodérmica y Hematopoyética (IHHNV)**

Esta enfermedad afecta al crecimiento de los camarones y por ende a la productividad. El IHHNV está formado por una cadena sencilla de ADN y es el virus más pequeño en los peneidos, el tamaño del virión es de 20 a 22 nm, con forma icosaédrica y sin envoltura. Los camarones afectados presentan reducción del consumo del alimento, crecimiento lento y nado hacia la superficie, también presentan deformidad en el rostro, cefalotórax y telson (Nicovita, 2021).

#### **2.4.4 Hepatopancreatitis Necrotizante**

Esta enfermedad fue denominada al principio como Hepatopáncreas Granulomatoso, debido a formación de granulomas, causando infección de gran impacto en América. Es provocada por bacterias intracelulares obligadas, pleomórficas. Sus signos clínicos son intestinos vacíos o con contenidos entrecortados, hepatopáncreas

pálidas, letargia y cutícula áspera, la cual en brotes severos causa mortalidades superiores a 90% en los cultivos de *L. vannamei* y *stylirostris* (Mejías & Navarro, 2015).

#### **2.4.5 Síndrome de la Mortalidad Temprana**

También conocida por sus siglas en inglés como EMS (Early Mortality Syndrome) o AHPNS (Acute Hepatopancreatic Necrosis Syndrome), se puede observar en los primeros 30 a 40 días de cultivo, con un porcentaje de mortalidad del 100% de la población. Se origina cuando una cepa patogénica de *Vibrio parahaemolyticus* coloniza el tracto digestivo de los crustáceos, donde se liberan toxinas afectando el hepatopáncreas. Se transmite por canibalismo o cohabitación entre animales enfermos y sanos (Mejías & Navarro, 2014).

Los camarones infectados presentan nado errático, textura blanda del exoesqueleto, crecimiento reducido, anorexia y contenido intestinal interrumpido, palidez y fuerte atrofia del hepatopáncreas, durante el transcurso de la enfermedad presenta 3 fases: aguda, intermedia y terminal, una de las formas de diagnóstico al principio fue la histopatología, sin embargo, hoy en día se utiliza la PCR, la cual ha demostrado su idoneidad para detectar la presencia de la cepa específica de *V. parahaemolyticus* causante de la enfermedad (Mejías & Navarro, 2014).

#### **2.4.6 Bolitas Blancas**

Esta enfermedad presenta pequeñas formaciones blancas en el camarón, las cuales son conocidas como “Bolitas Blancas”, las cuales son células del hepatopáncreas que son vistas en el tracto digestivo, debido a la reacción por la presencia de toxinas bacterianas del género *Vibrio* spp. En los laboratorios se ha detectado al *Vibrio alginolyticus* en larvas las cuales presentan el síndrome de Zoea II, mientras el *V. alginolyticus* y *Vibrio harveyi* están asociados al Síndrome de “Bolitas Blancas” (Kumar, Vidya, Kumar, Alavandi, & Vijayan, 2017).

El síndrome de Zoea II provoca que el camarones no se alimenten, atrofia del hepatopáncreas, nado lento, inflamación del tracto digestivo, reducción de escape baja y porcentajes altos de mortalidad (Aquahoy, 2017).

#### **2.4.7 Epibiontes bacterianos**

El *Leucothrix mucor* es de origen bacteriano, el cual se localiza en una diversidad de crustáceos bentónicos como en larvas y huevos. Esta bacteria es filamentosa y su largo es variable (2µm), siendo peligrosa para estadios larvales y postlarvales, y causando mortalidades debido a que se enredan las larvas en los filamentos, impidiendo su movimiento y crecimiento. El epibionte se registra en casi todas las especies del *Litopenaeus* (Bruno, Ana, & Flores, 2001).

#### **2.4.8 Bacterias Luminiscentes**

Cuando las bacterias del tipo *V. harveyi* predominan en los tanques de larvicultura, causan altas mortalidades (80%). Los animales en la fase inicial no presentan signos clínicos, pero en la fase aguda se observa reducción de alimento, camarones moribundos cerca de la superficie y muchas veces se encuentran en el fondo del estanque, los cuales muestran palidez, branquias de tono amarillo pálido a café, hepatopáncreas atrofiado y su tonalidad es café claro a oscuro, de la misma forma en horas de la noche presenta una luminosidad, lo cual provoca que se confunda con enfermedades virales y en esta fase se visualiza grandes mortalidades (Latam Food News, 2015).

#### **2.4.9 *Baculovirus penaei* (BP)**

El BP causa epizootias graves en etapa larval, postlarval y en algunas especies de crustáceos (*Penaeus duorarum*, *Penaeus aztecus*, *Penaeus setiferus*, *Penaeus marginatus*, *L. vannamei*, *Penaeus schmittii*, *Penaeus paulensis* y *Penaeus subtilis*). Aparece en las etapas de protozoa y mysis, presentando su mayor índice de mortalidad. Su mecanismo de transmisión es de forma horizontal, a través de heces, detritos contaminados con el virus y cuerpos de oclusión, no presentan signos clínicos específicos, su tasa de crecimiento y alimentación es reducido, los organismos muy afectados presentan coloración pálida en su tracto digestivo (Varela & Valverde, 2019).

### **2.5 DETECCIÓN DE ENFERMEDADES MEDIANTE PCR**

Para esta técnica se usa primers universales, para poder realizar la respectiva amplificación e interpretación de la secuencia genética que se obtuvo del “Gene Bank” por medio del “blasting”. Siendo así que el proceso permite que se obtenga identificación

molecular tanto del género como la especie de una determinada cepa específica (Cuéllar, 2013).

### **2.5.1 Ventajas y Desventajas de la PCR**

Esta técnica ofrece ventajas como alta sensibilidad, especificidad, rapidez para obtener los resultados, mayor automatización y una buena gestión de actividad en el laboratorio (Mellado, 2020).

Son sensibles porque el descubrimiento de manifestación viral se lo realiza en el grado molecular y solamente una cantidad limitada del virus, su genoma puede ser incrementado mediante PCR o mezclado con una sonda molecular tardado (Díaz, Rentería, Cortez, & Palacios, 2008).

Las herramientas moleculares debido a su sensibilidad logran ser oportunas para la detección de la presencia de virus de la infección en etapas tempranas. Asimismo, los métodos de PCR y Dot-Blot, son de muy breve permanencia (12 y 24 horas), si se las compara con las tradicionales. Además, los métodos no son destructivos y es suficiente con tener unos  $\mu\text{L}$  de hemolinfa o una pareja de pleópodos, para llevarse a cabo tardado (Díaz, Rentería, Cortez, & Palacios, 2008).

La PCR es eficaz debido a la interpretación de resultados, no detecta ambigüedades, es sencilla cuando logra tener los controles adecuados, por lo tanto, los métodos no necesitan de control de síntomas variables, ni de vasto conocimiento en reconocimiento de subestructura celular y tisular como las técnicas histopatológicas tardado (Díaz, Rentería, Cortez, & Palacios, 2008).

Su desventaja se centra en la estandarización de la técnica para el individuo o la técnica que se requiera, siendo así costoso y tardado (Díaz, Rentería, Cortez, & Palacios, 2008).

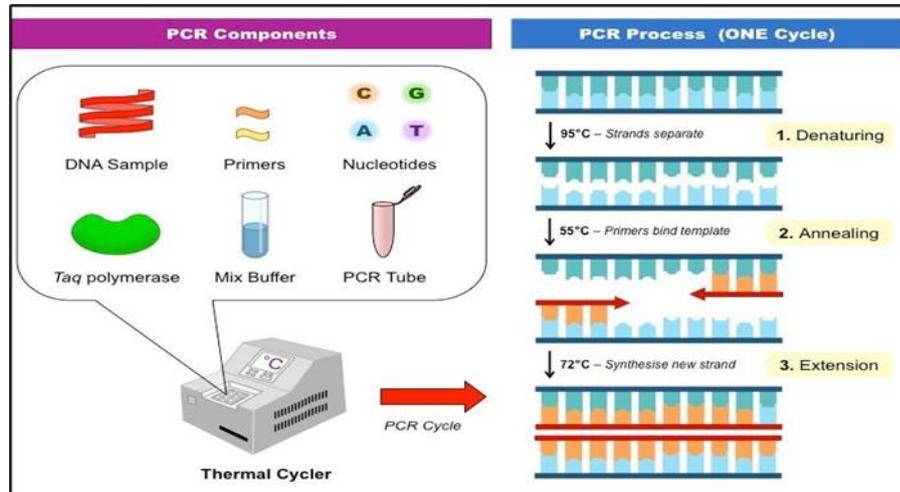
### **2.5.2 Etapas del proceso de la técnica PCR**

Para realizar la técnica de PCR se necesita el molde de ADN, oligonucleótidos, enzimas, desorribonucleicos trifosfatados (dNTPs: timina, citosina, adenina y guanina), buffer, ion magnesio y agua los cuales hacen que interactúen en las 3 etapas del PCR, desnaturalización, hibridación y elongación (Tamay de Dios, Ibarra, & Velasquillo, 2013). A continuación, se detalla cada etapa:

**Desnaturalización:** Para esta fase, las sucesiones de ácido desoxirribonucleico se dividen a T° de 95°C por 20-30 segundos; sin embargo, el periodo depende del templado secuenciado, en otras palabras, es cuando la porción de G-C es elevada se necesita mayor tiempo para que se puedan romper las uniones, también dependerá de la velocidad del termociclador que aumente la temperatura y a la guía del equipo. Al finalizar el periodo se tiene las cadenas aisladas, las cuales sirven como templado para la próxima etapa.

**Hibridación:** En esta fase, los primers se alinean al extremo 3' del templado separa con anterioridad, luego hibridan con secuencia adicional, la temperatura debe oscilar entre 50-60°C y si estos parámetros son correctos, la especificidad y estabilidad del complejo serán eficientes.

**Elongación:** Aquí, la Taq polimerasa trabaja encima del primers, donde empieza la función catalítica a gran rapidez, después de ello se añaden dNTP's adicionales para producir las secuencias exactas de ácido desoxirribonucleico, la elongación de las secuencias va en curso de la asimilación del ácido desoxirribonucleico (5' a 3'), ahora bien, para que haya reacción su temperatura óptima debe ser de 72°C. Al concluir el proceso se construyen los amplificones con una magnitud calificado por la cifra conjunta de pareja de bases.



**Figura 2:** Etapas de la PCR

**Fuente:** (Sánchez Méndez, 2022)

## 2.6 Detección de enfermedades en la larvicultura por el uso de PCR

El uso del PCR es una herramienta con grandes bondades de la biología molecular alcanzando versatilidad al momento de analizar. Los diversos componentes que tiene como la mezcla de reacción, régimen de ciclaje y la ADN polimerasa hacen que esta

técnica tenga especificidad, rendimiento y fidelidad, debido a que permite ampliar de manera selectiva cualquier fragmento de ADN. Asimismo, la cadena flanquea para obtener la serie concreta de ADN sin la necesidad de la replicación de un organismo huésped (Angarita, Torres, & Díaz, 2018).

La reacción en cadena permite identificar bacterias y microorganismos. La secuenciación del ARN ribosomal detecta e identifica microorganismos no cultivados o microorganismos con complicaciones de crecimiento, siendo específico en cada bacteria lo cual hace que sea buena diana para poder identificar microorganismos.

### **2.6.1 Enfermedad de la Mancha Blanca y EPH diagnóstico por PCR**

Peña, Castro & Dolz, 2020, realizaron este estudio se lo ubico en las fincas ubicadas alrededor del Golfo de Nicoya de Costa Rica, donde tomaron muestras de 15 fincas, hubo dos visitas, la primera fue al inicio del ciclo para tomar 10 ml de agua y se almacenó en tubos vacutainer, también se recogió 100 postlarvas antes de la siembra, las cuales fueron almacenadas en tubos estériles con alcohol al 70 %, la segunda visita fue al transcurrir 6-7 semanas de la siembra y tomaron 5 camarones juveniles (5-10 g) en horas de la mañana en 3 lugares diferentes, a los organismos se les extrajo el hepatopáncreas y el estómago, fijados en alcohol al 70 %, las muestras fueron transportadas hacia el laboratorio en refrigeración (4-8 °C) y a -80°C se almacenó hasta su utilización (Peña, Castro & Dolz, 2020).

Se utilizaron 3 protocolos de PCR para analizar las muestras de agua, postlarvas, hepatopáncreas y estómago, para el primer protocolo de PCR se amplificó el gen  $\beta$ -actina de los camarones, para el segunda PCR un segmento del gen VP41B de WSSV fue amplificado, en el tercera PCR se amplificó un segmento del gen SSU rRNA de EHP.

Los productos se visualizaron por electroforesis en gel agarosa a 1% en TBE 1X (base Tris, ácido bórico, EDTA, pH 8, 0,5 M). Los fragmentos de amplificados a un tamaño de 306 pb (WSSV) y 500 pb (EHP) se consideraron positivos y todos menos los de actina se enviaron a Macrogen para su secuenciación, se utilizó el programa BioEdit Sequence Alignment Editor® para la secuencia parcial y fue comparado mediante el algoritmo BLASTn (Peña, Castro & Dolz, 2020).

Las muestras de agua que se obtuvieron en el proceso de llenado del estanque dieron negativo para WSSV, al igual que los estómagos de postlarvas y camarones juveniles, solo las muestras del hepatopáncreas que fueron recolectadas de la parte media

del estanque dio positivo para la mancha blanca, es decir que solo una de las quince fincas se detectó la existencia del virus (6,7 %) (Peña, Castro & Dolz, 2020).

### **2.6.2 Vibriosis diagnosticada por PCR**

Almeda y colaboradores realizaron este estudio, en el cual utilizaron 126 juveniles/m<sup>2</sup> de *L. vannamei* el cultivo era intensivo localizada en Sonora, México, el estudio tuvo una duración de 59 días, para la prueba de PCR se usaron 64 separados de tejidos de camarón para identificar las cepas del género *Vibrio spp* luego de ello se amplificaron los iniciadores específicos para *V. cholerae*, *vulnificus* y *harveyi*, utilizaron un kit comercial GoTaq PCR, cuya concentración de ADN fue de 100 ng, se utilizó un volumen final de 25 µl para todas las muestras (Almada et al, 2017).

Los datos finales del proceso fueron que 12 pertenecieron a *Vibrio spp.*, de los cuales 5 fueron de branquias y hemolinfa y el hepatopáncreas fueron 2. La parte amplificada del gen 16s expuso 663 pares de bases, semejante al género *Vibrio spp*, siendo así que 12 aislados fueron analizados por segunda vez con la técnica PCR para lo cual emplearon iniciadores específicos de genes de virulencia, dando así como resultado de los aislados, 4 presentaron los genes de virulencia, 3 para hemolinfa y 1 a branquias (Almada, et al, 2017).

### **2.6.3 Detección del virus de la Necrosis Infeciosa Hipodérmica y Hemapoyética mediante PCR**

El estudio se realizó por Boada, De Donato, & Rodulfo, 2008, al Occidente y Oriente de Venezuela, las muestras de *L. vannamei* fueron tomadas de 5 camaroneras de 2 a 10 ha., su densidad de siembra fue de 10 a 30 ind/m<sup>2</sup>, luego se hizo uso del PCR para lo cual se tomó oligonucleótidos con el kit ShrimPCaRe Simplex. La amplificación se la realizó con un volumen de 50 µL en el termociclador Techne y se agregó 5 µL de ADN de la muestra inicial .

La desnaturalización inicial tuvo un ciclo de 94 °C con una duración de 5 minutos, en la desnaturalización su ciclo fue de 45 a 94 °C con un tiempo de 1 minuto, la hibridación fue a 45 °C por un minuto y medio, por último, la extensión fue a 72 °C por dos minutos y medios, los resultados se visualizaron con ayuda de un transluminador LUV en electroforesis con gel agarosa de 2 % de bromuro de etidio, las cuales mostraron que en 4 camaroneras dieron positivo al IHHNV, dichas muestras las repitieron individualmente, logrando obtener los siguientes porcentajes; la segunda camaronera tuvo

1,1 %, para la tercera y quinta fue de 2,2 % y la cuarta 3,3 %, estos porcentajes se dieron en camarones de 5-6 gramos (Boada, De Donato, & Rodulfo, 2008).

#### **2.6.4 Detección de IHHNV por PCR**

Parajeles, Peña, Solorzano, & Dolz (2021), realizaron un estudio donde tomaron muestras de las fincas alrededor del Golfo de Nicoya de Costa Rica, eligieron 15 camarónicas y tomaron 10 ml de agua antes de la siembra, recolectando 100 postlarvas en acondicionamiento, en la séptima semana de siembra escogieron 10 camarones de 3 sitios, para luego extraer el hepatopáncreas y estómago, fueron almacenados en alcohol a 95 % y a -80 °C en congelación hasta su utilización.

Se amplificó una secuencia del gen  $\beta$ -actina, se hizo uso de iniciadores Actin-F y Actin-R3, para empezar la desnaturalización tiene que estar a 94 °C a 2 minutos, alineación debe estar a una temperatura de 55 °C en 10 segundos, para la extensión su temperatura es de 72 °C en 30 segundos y la última etapa de extensión a 72 °C en 5 minutos.

El fragmento amplificado tuvo un tamaño de 339 pb, fue visualizado por electroforesis a 1 % de gel agarosa, luego las muestras fueron sometidas al análisis molecular para la porción de proteína no- estructural (ORF1), por medio de (389 pb-PCR) y el tamaño amplificado fue de 389 pb y se observó por electroforesis, después los enviaron a Macrogen para su secuenciación y purificación. Siendo así que las muestras que mostraron positivos se las sometió a otro análisis molecular para codificar una región más pequeña y se lo realizó a través de (309 pb-PCR) y se realizó el mismo proceso, pero con iniciadores 309F y 309-R y aumentando el tiempo a la extensión final en 7 minutos.

El resultado final muestra que las dos pruebas concuerdan con un total de 113 muestras; sin embargo, el más sensible para la detección de IHHNV fue el 389 pb-PCR, determinando así que 13 fincas con 86,7 % dieron positivas para el virus mientras que en las 2 fincas mostraron presencia del virus en muestras de agua, hepatopáncreas y estómagos.

### **3. CONCLUSIÓN**

Los principales agentes infecciosos son los virus, los mismos que al no poder ser curados logran tener una amplia distribución y colonización en los organismos. Durante los primeros días del ciclo de la vida de los camarones es donde se logra observar una susceptibilidad mucho mayor y un alto porcentaje de mortalidad, por ende, la mejor solución es la prevención por medio de un buen manejo del laboratorio y de la misma forma implementar las pruebas moleculares, puesto que estas nos permiten obtener una mayor información de las infecciones que pueden estar contrayendo los organismos en el laboratorio.

De la misma forma las pruebas PCR nos ayudan a obtener una información veras y mucho más rápido, la misma que es muy confiable y no se presta a muchas interpretaciones ya que no es necesario tener una gran experiencia para poder leer los resultados. Estos análisis de larvas son una buena forma de dar confianza a los compradores sobre la buena calidad de las mismas.

Las enfermedades nunca van a terminar por lo cual mantenernos prestos a siempre estar un paso delante nos ayudaran a mitigar las enfermedades que puedan afectar a nuestras larvas dentro del laboratorio.

## 2. BIBLIOGRAFÍA

- Almada, M. D., Plascencia, A. E., & Espinoza. (2018). Detección de vibrio mediante la amplificación de genes de patogenicidad en camarón *Litopenaeus vannamei* cultivado en un sistema tipo invernadero. *Investigación y Ciencia de la Universidad Autónoma de Aguascalientes*(72), 20-29. doi:<https://doi.org/10.33064/iycuaa201772218>
- Almada, M. D., Plascencia, A. E., Espinoza, C. L., Domínguez, M. R., Cienfuegos, K. R., & Canchola, E. V. (2017). Detección de Vibrio mediante la amplificación de genes de patogenicidad en camarón *Litopenaeus vannamei* cultivado en un sistema tipo invernadero. *Investigación y Ciencia de la Universidad Autónoma de Aguascalientes*(72), 20-29. Obtenido de <https://revistas.uaa.mx/index.php/investycien/article/view/218>
- Angarita, M., Torres, M. I., & Díaz, A. K. (2018). Técnicas de Biología Molecular en el desarrollo de la investigación. Revisión de la literatura. *Revista Habanera de Ciencias Médicas*, 16(5), 796-807. Obtenido de [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1729-519X2017000500012](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1729-519X2017000500012)
- Boada, M., De Donato, M., & Rodulfo, H. (2008). Detección del virus de la Necrosis Infecciosa Hipodérmica y Hematopoyética (IHHNV) en camarones blancos cultivados asintomáticos, *Litopenaeus vannamei* (BOONE), en Venezuela. *Revista Científica*, 18(1), 07-11. Obtenido de [http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0798-22592008000100002](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-22592008000100002)
- Aquahoy. (20 de julio de 2017). *Síndrome de la Zoa 2 en los hatcheries de camarón blanco*. Obtenido de <https://aquahoy.com/sindrome-de-la-zoa-2-en-los-hatcheries-de-camaron-blanco/#:~:text=El%20s%C3%ADndrome%20de%20la%20zoa%2D2%20se%20caracteriza%20por%20la,metamorfosis%20seguido%20de%20altas%20mortalidades.>
- Bruno, G. G., Ana, R., & Flores, G. (2001). Enfermedades Infecciosas más Comunes en la Camaronicultura en México y el Impacto del Uso de Antimicrobianos. Mexico. Obtenido de <http://cesaibc.org/pdf/infointeres/crustaceos/enfermedadesmexico.pdf>
- Bruno, G. G., Ana, R., & Flores, G. (2001). Enfermedades Infecciosas más Comunes en la Camaronicultura en México y el Impacto del Uso de Antimicrobianos. Mexico. Obtenido de <http://cesaibc.org/pdf/infointeres/crustaceos/enfermedadesmexico.pdf>
- Castro Rivera, D. M. (2020). Prevalencia del Virus de la Necrosis Hipodérmica y Hematopoyética Infecciosa (IHHNV) en *Litopenaeus vannamei* de producción comercial mediante PCR en “Empagran” en la provincia del Guayas. 2-3.
- Chalán, M. G. (2022). Evaluación de la uniformidad de postlarvas de camarón *Litopenaeus vannamei*, en el laboratorio Ecufriendly SA, en los meses de abril a julio de 2021. *Bachelor's thesis, La Libertad: Universidad Estatal Península de Santa Elena*. 2022, 7-11.
- Cuéllar, J. (2013). Vibriosis. En *Vibriosis* (págs. 1-5). Obtenido de <https://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/vibriosis-in-shrimp-es.pdf>
- Díaz, A. S., Rentería, L. F., Cortez, J. A., & Palacios, E. S. (2008). PCR: reacción en cadena de la polimerasa. *Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y*

- prácticos*, 53. Obtenido de [https://www.researchgate.net/profile/Jorge-Ramirez-Salcedo/publication/296695965\\_Microarreglos\\_de\\_DNA\\_Fabricacion\\_Proceso\\_y\\_Analisis/links/56d88bc408aee73df6ccfd74/Microarreglos-de-DNA-Fabricacion-Proceso-y-Analisis.pdf#page=69](https://www.researchgate.net/profile/Jorge-Ramirez-Salcedo/publication/296695965_Microarreglos_de_DNA_Fabricacion_Proceso_y_Analisis/links/56d88bc408aee73df6ccfd74/Microarreglos-de-DNA-Fabricacion-Proceso-y-Analisis.pdf#page=69)
- FAO. (2014). Manejo sanitario y mantenimiento de la bioseguridad de los laboratorios de postlarvas de camarón blanco (*Penaeus vannamei*) en América Latina. *Granja Piscis y Ana Bertha Montero Rocha*, 450, 79. Obtenido de <https://www.academia.edu/25374055/Larvicultura>
- Kumar, T. S., Vidya, R., Kumar, S., Alavandi, S. V., & Vijayan, K. K. (2017). Zoea-2 syndrome of *Penaeus vannamei* in shrimp hatcheries. *Aquaculture*, 479, 759-767. doi:<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.07.022>
- Latam Food News. (27 de febrero de 2015). *¿Cómo detectar la enfermedad de luminiscencia en camarones?* Obtenido de <https://www.foodnewslatam.com/inocuidad/53-control-calidad/3016-%C2%BFc%C3%B3mo-detectar-la-enfermedad-de-luminiscencia-en-camarones.html#:~:text=La%20bacteria%20m%C3%A1s%20predominante%20que,del%20tanque%20y%20mortalidades%20masivas>.
- Marcillo del Castillo, R. A. (2010). Estudio de la presencia de IHHNV en post-larva de *Penaeus vannamei* bajo dos sistemas de producción con estatus identificado de sus progenitores. *Bachelor's thesis*, 8.
- Mejías, A. V., & Navarro, N. P. (2014). Síndrome de la Mortalidad Temprana (EMS/AHPNS) en camarones cultivados: Una revisión. *Repertorio Científico*, 17(1), 25-30. Obtenido de <https://revistas.uned.ac.cr/index.php/repertorio/article/view/2563>
- Mejías, A. V., & Navarro, N. P. (2015). Hepatopancreatitis necrotizante asociada al Fenómeno del Niño, en cultivos de camarones del Golfo de Nicoya. *Repertorio Científico*, 18(1), 9-34. Obtenido de <https://revistas.uned.ac.cr/index.php/repertorio/article/view/2553>
- Mellado, O. M. (2020). Técnicas de biología molecular en el diagnóstico de enfermedades infecciosas. *NPunto*, 3(30), 88-111. Obtenido de <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=8229973>
- Morán Romero, L. S. (2022). Evaluación del efecto de antioxidante naturales en el tiempo de pardeamiento en camarón (*Litopenaeus vannamei*) crudo. *Universidad de Guayaquil. Facultad de Ingeniería Química*, 18.
- Neira Gonzabay, F. H. (2022). Análisis comparativo entre un monocultivo de camarón *Litopenaeus vannamei*, y un policultivo de camarón blanco *Litopenaeus vannamei* y tilapia roja *Oreochromis sp.* *Bachelor's thesis, La Libertad: Universidad Estatal Península de Santa Elena, 2022.*, 5. Obtenido de <http://riul.unanleon.edu.ni:8080/jspui/handle/123456789/7779>
- Nicovita. (10 de agosto de 2021). *¡Mantén tu cultivo sano! Conoce las principales enfermedades en época de frío.* Obtenido de <https://nicovita.com/noticias/manten-tu-cultivo-sano-conoce-las-principales-enfermedades-en-la-epoca-de-frio/>
- Parrilla 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 <http://dspace.cibnor.mx:8080/handle/123456789/2745>

- Parajeles, M. J., Peña, N., Solorzano, A., & Dolz, G. (2021). Detección de IHNV en el cultivo de *Litopenaeus vannamei* en Costa Rica. *Agronomía Mesoamericana*, 32(2), 587-598. Obtenido de <https://revistas.ucr.ac.cr/index.php/agromeso/article/view/43179>
- Peña, N., Castro, R., & Dolz, G. (2020). Virus del síndrome de la mancha blanca y *Enterocytozoon hepatopenaei* en granjas camaroneras de Costa Rica. *Agronomía Mesoamericana*, 31(2), 479-489. Obtenido de [https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?pid=S1659-13212020000200479&script=sci\\_abstract](https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?pid=S1659-13212020000200479&script=sci_abstract)
- Sánchez Méndez, D. C. (2022). Enfermedades que afectaron la producción de camarón y análisis de las exportaciones de camarón en el Ecuador (Bachelor's thesis, La Libertad: Universidad Estatal Península de Santa Elena. 2022). 13-14.
- Silva, L. G. (2021). Cepas de *Vibrio parahaemolyticus* que causan necrosis hepatopancreática aguda en camarón cultivado de Sonora, México y su resistencia a antibióticos. *Hidrobiológica*, 31(2), 112.
- Skretting. (2018). *Manual de larvicultura*. Obtenido de <https://libreriaskretting.ec/admin/public/uploads/catalogos/manual-larvicultura-skretting.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://d1wqtxts1xzle7.cloudfront.net/52083062/pcr\\_medic\\_graphic-with-cover-page-v2.pdf?Expires=1660265849&Signature=fqyLkdd-4YvDUQZ158QeZP3pYX5C6GVOoRKEp~yAM7PwUFb17vYgBL1tYeXJS5Y1POaUk0j67-57KsajE1aGNHcJ32MKZHlzakWrmeFNkP87Zp9RF0ysGk2vBlzh3np7blxeY2v1Td](https://d1wqtxts1xzle7.cloudfront.net/52083062/pcr_medic_graphic-with-cover-page-v2.pdf?Expires=1660265849&Signature=fqyLkdd-4YvDUQZ158QeZP3pYX5C6GVOoRKEp~yAM7PwUFb17vYgBL1tYeXJS5Y1POaUk0j67-57KsajE1aGNHcJ32MKZHlzakWrmeFNkP87Zp9RF0ysGk2vBlzh3np7blxeY2v1Td)
- Varela, A., & Valverde, J. (2019). Baculovirus penaei como factor de riesgo para infecciones bacterianas en hepatopáncreas de *Penaeus vannamei*. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 30(1), 377-386. doi:<http://dx.doi.org/10.15381/rivep.v30i1.14961>