



**ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DEL LITORAL**

**Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar**

**“DESARROLLO DE UN SISTEMA ANIDADO PARA LA  
DETECCION DEL VIRUS DE LA NECROSIS HIPODERMICA Y  
HEMATOPOYETICA INFECCIOSA (IHHNV)”**

**TESIS DE GRADO**

Previa a la obtención del Título de:

**INGENIERA ACUICULTURA**

Presentado por:

**NATALY VERONICA VELOZ MESTANZA**

**GUAYAQUIL - ECUADOR**

**2008**

## **AGRADECIMIENTO**

A Dios por darme la vida, fortaleza, capacidad y oportunidad para poder realizar mis metas.

A mis padres, Brígida Mestanza A. y Kléver Veloz M., por su ejemplo y apoyo incondicional en cada paso y decisión de mi vida.

A Marcelo Muñoz, Ph.D., por tener la confianza en mí para realizar este trabajo, por la paciencia y acertada dirección del mismo y por su colaboración para poder terminarlo.

A Javier Robalino, Ph.D., por su importante colaboración prestada durante el desarrollo de este trabajo, y haberme dado la oportunidad de aprender un poco más sobre Genética y Biología Molecular.

Quiero expresar un profundo agradecimiento a Biotecnología y Genética Marina (BIOGEMAR S.A.), por darme la oportunidad de realizar esta tesis, financiándola y permitiendo la utilización de materiales e instalaciones; además, de brindarme conocimientos que han fortalecido mi formación como profesional.

A Walter Intriago y Catherine Cáceres, por su apoyo constante y por facilitarme la ayuda necesaria cada vez que la solicité.

A mis queridos hermanos Rubén y Danny Veloz; y a todos mis familiares y amigos, por estar siempre junto a mí, en las buenas y malas, y por su amistad sincera y desinteresada.

Finalmente quiero agradecer a todas aquellas personas que de una u otra manera ayudaron para que este trabajo llegue a su término.

## **DEDICATORIA**

A mis padres:

Para ustedes dedico este trabajo y los años de estudio para llegar a él, por su esfuerzo, dedicación y sacrificio durante todo este tiempo. Sé que debo continuar, pero me siento feliz de haber culminado esta etapa de mi vida.

## TRIBUNAL DE GRADUACION



M.Sc. Jerry Landivar

**PRESIDENTE**



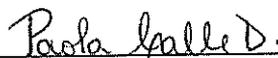
Ph.D. Marcelo Muñoz

**DIRECTOR**



Biol. Marco Álvarez

**VOCAL PRINCIPAL**



Ph.D. Paola Calle

**VOCAL PRINCIPAL**

## DECLARACION EXPRESA

“La responsabilidad por los hechos, ideas y doctrinas expuestas en esta tesis, corresponden exclusivamente a su autor, y el patrimonio intelectual de la misma, a la Escuela Superior Politécnica del Litoral”.

(Reglamento de exámenes y títulos profesionales de la ESPOL).



---

Nataly Verónica Veloz Mestanza

## RESUMEN

El presente trabajo se planteó con el fin de implementar un sistema anidado de PCR, para la detección del Virus de la Necrosis Hipodérmica y Hematopoyética Nerviosa (IHHNV). Se emplearon camarones procedentes de una maduración ubicada en la zona de Ayangue, de los cuales se extrajeron muestras de tejido muscular para realizar la extracción de ADN y subsecuentemente desarrollar un protocolo eficaz para la detección de IHHNV. La especificidad del sistema desarrollado, se debe a sus 2 pares de iniciadores, diseñados a partir del genoma del virus. Las secuencias de los iniciadores externos son: forward 5'-CGACTGGCAACAGATCTTCA -3' (E3) y el reverso 5'-AAGTGACGGCGGACAATATC-3' (E4); y las secuencias de los iniciadores internos son: forward 5'-GAAGTACGACTCCCACCACA-3' (N3) y para el reverso 5'-CTGACGATAGGGATTTTAGTC-3' (N4). Se determinó la temperatura de hibridación para la primera (59°C) y segunda reacción de PCR (62°C), así como también, el número de ciclos empleados en ambas reacciones (30 y 35 ciclos, respectivamente). En base a experimentaciones, se determinó que el sistema anidado pudo detectar una carga viral 10 veces más diluida que el sistema simple de PCR, desarrollado por Robalino (com. per.). Además, se demostró la efectividad del sistema, al ser desafiado por hibridación *Dot-blot*. De esta manera, el sistema desarrollado en el presente trabajo es útil para la detección de IHHNV.

## INDICE GENERAL

RESUMEN.....	vii
INDICE GENERAL.....	viii
INDICE DE ABREVIATURAS.....	xii
INDICE DE FIGURAS.....	xiii
INDICE DE GRAFICOS.....	xiv
INDICE DE FOTOS.....	xv
INDICE DE TABLAS.....	xvi
INDICE DE ANEXOS.....	xvii
CAPITULO I. INTRODUCCION.....	1
CAPITULO II. REVISION DE LITERATURA.....	4
2.1 ASPECTOS GENERALES SOBRE LA PRODUCCION DE CAMARON EN EL ECUADOR.....	4
2.2 ENFERMEDADES VIRALES QUE AFECTAN LOS CULTIVOS.....	6
2.3 VIRUS DE LA NECROSIS HIPODERMICA Y HEMATOPOYETICA INFECCIOSA.....	7
2.3.1 Generalidades del virus.....	7
2.3.1.1 Nombre de la enfermedad.....	7
2.3.1.2 Agente etiológico.....	8

2.3.2	Epidemiología.....	8
2.3.2.1	Especies afectadas.....	8
2.3.2.2	Transmisión.....	9
2.3.2.3	Distribución geográfica.....	10
2.3.3	Síntomas Clínicos.....	10
2.3.3.1	Presencia de IHHNV en <i>P. vannamei</i> .....	10
2.4	METODOS DE DIAGNOSTICO UTILIZADOS PARA LA DETECCION DE IHHNV.....	11
2.4.1	Métodos basados en anticuerpos.....	12
2.4.2	Histopatología directa.....	13
2.4.3	Métodos moleculares basados en sondas genéticas marcadas.....	13
2.4.3.1	Hibridación <i>Dot-Blot</i> .....	14
2.4.3.2	Hibridación <i>In situ</i> .....	15
2.4.4	Métodos moleculares basados en amplificación de ácidos nucleicos.....	16
2.4.4.1	PCR (Polimerase Chain Reaction).....	16
2.4.4.1.1	Componentes de la PCR.....	16
2.4.4.1.2	Pasos de un ciclo de reacción.....	21
2.4.4.1.3	Descripción del proceso de electroforesis.....	23
2.4.4.2	PCR Multiplex.....	24
2.4.4.3	PCR Anidada.....	24
2.4.4.4	Método de Amplificación Isotérmica del Bucle Mediado (LAMP).....	27

CAPITULO III. MATERIALES Y METODOS.....	28
3.1 MATERIAL BIOLÓGICO.....	28
3.2 EXTRACCIÓN DE ADN.....	29
3.3 PREPARACION DE MUESTRA PARA ESTANDARIZACION DEL METODO.....	29
3.4 PREPARACION DEL MARCADOR DE PESO MOLECULAR.....	30
3.5 DISEÑO DE INICIADORES.....	30
3.6 HIBRIDACION <i>DOT-BLOT</i> .....	32
3.6.1 Preparación de la sonda IHHNV E3-E4.....	32
3.6.2 Hibridación en membrana.....	32
3.6.3 Lavado de membrana.....	33
3.6.4 Bloqueo de membrana.....	33
3.6.5 Anticuerpo y revelado.....	33
3.7 SISTEMA DE DETECCION SIMPLE.....	34
3.8 OPTIMIZACION DE LOS PARAMETROS DEL SISTEMA ANIDADO IMPLEMENTADO.....	34
3.9 ELECTROFORESIS.....	35
3.10 SECUENCIACION.....	36
3.11 COMPARACION DE SENSIBILIDAD ENTRE EL SISTEMA ANIDADO Y EL SISTEMA SIMPLE DE PCR.....	36
3.12 VALIDACION.....	36



3.13 DETERMINACIÓN DE LA ESPECIFICIDAD DEL METODO DESARROLLADO.....	37
CAPITULO IV. RESULTADOS.....	39
4.1 OPTIMIZACION DE LOS PARAMETROS DE AMPLIFICACION.....	39
4.1.1 Protocolo optimizado.....	43
4.1.1.1 Primera reacción de amplificación.....	43
4.1.1.2 Segunda reacción de amplificación.....	45
4.2 SECUENCIACION.....	48
4.3 COMPARACION DE SENSIBILIDAD ENTRE EL SISTEMA ANIDADO Y EL SIMPLE.....	48
4.4 VALIDACION.....	52
4.5 ESPECIFICIDAD DEL SISTEMA ANIDADO.....	56
CAPITULO V. DISCUSION.....	58
CONCLUSIONES.....	63
RECOMENDACIONES.....	65
ANEXOS.....	67
BIBLIOGRAFÍA.....	82

## INDICE DE ABREVIATURAS

ADN:	Acido desoxirribonucleico	PA:	Primera reacción de amplificación
B:	Barrido	pb:	par de bases
dNTP:	Deoxinucleótido trifosfato	PCR:	Polymerase Chain Reaction
E:	Escalera	pH:	Potencial de Hidrógeno
EDTA:	Ethylenediamine tetraacetic acid	RDS:	Síndrome del Enanismo y rostro deforme
Enzima Taq:	Enzima de polimerización del ADN ( <i>Thermus aquaticus</i> )	RPM:	Revoluciones por minuto
Exp:	Experimento	C°:	Grados centígrados
IHHNV:	Virus de la Necrosis Hipodérmica y Hematopoyética Infecciosa	SA:	Segunda reacción de amplificación
mM:	milimol	TAE:	Tris Acido Acético EDTA
Mg <sup>+2</sup> :	Ión Magnesio	TC:	Tampón de carga
MgCl <sub>2</sub> :	Cloruro de Magnesio	TH:	Temperatura de Hibridación
MPM:	Marcador de peso molecular	μM:	micromol
		μL:	microlitro

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	Pasos básicos de la PCR.....	22
<b>Figura 2.</b>	Representación esquemática del sistema anidado de PCR.....	26
<b>Figura 3.</b>	Dos formas de analizar los fragmentos de ADN amplificados mediante la técnica de PCR .....	38

## INDICE DE GRAFICOS

<b>Gráfico 1.</b>	Total de muestras analizadas semanalmente por el sistema simple y el sistema anidado de PCR.....	54
<b>Gráfico 2.</b>	Total de muestras analizadas por el Sistema Anidado .....	55
<b>Gráfico 3.</b>	Total de muestras analizadas por el Sistema Simple de PCR .....	55

## INDICE DE FOTOS

<b>Foto 1.</b>	Adultos de <i>P. vannamei</i> que presentan deformidad en el rostrum.....	11
<b>Foto 2.</b>	Adultos de <i>P. vannamei</i> que presentan anormalidades cuticulares en el sexto segmento abdominal y cola .....	11
<b>Foto 3.</b>	Sensibilidad del Sistema Anidado efectuando diluciones en P.A. ....	49
<b>Foto 4.</b>	Sensibilidad del Sistema Simple. ....	50
<b>Foto 5.</b>	Sensibilidad del Sistema Anidado. ....	50
<b>Foto 6.</b>	Amplificación de muestras de animales de camaronera empleando el Sistema anidado desarrollado. ....	57
<b>Foto 7.</b>	Hibridación <i>Dot-Blot</i> de diferentes muestras escogidas en base a los resultados obtenidos por el Sistema Anidado .....	57

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b>	Resultados de los sistemas anidados efectuados .....	46
<b>Tabla 2.</b>	Resultados de comparación del límite de detección entre el sistema anidado y el sistema simple de PCR .....	51
<b>Tabla 3.</b>	Resultados de la validación .....	53



## INDICE DE ANEXOS

<b>Anexo I.</b>	Soluciones utilizados en las diferentes técnicas de Biología molecular y extracción de ADN.....	68
<b>Anexo II.</b>	Protocolo de extracción de ADN en geles de agarosa (QIAquick).....	70
<b>Anexo III.</b>	Representación esquemática de la ubicación de los iniciadores del sistema simple de PCR en el genoma del IHHNV.....	72
<b>Anexo IV.</b>	Representación esquemática de la ubicación de los iniciadores del sistema anidado dentro del genoma del IHHNV.....	73
<b>Anexo V.</b>	Secuencias y tamaños de los amplicones de los iniciadores empleados en la preparación del marcador de peso molecular.....	74
<b>Anexo VI.</b>	Experimentos realizados para la optimización de los parámetros de amplificación.....	75
<b>Anexo VII.</b>	Resultados de los análisis realizados a los animales muestreados durante la primera semana.....	78

<b>Anexo VIII.</b>	Resultados de los análisis realizados a los animales muestreados durante la segunda semana .....	79
<b>Anexo IX.</b>	Resultados de los análisis realizados a los animales muestreados durante la tercera semana .....	80
<b>Anexo X.</b>	Resultados de los análisis realizados a los animales muestreados durante la cuarta semana .....	81

## CAPITULO I. INTRODUCCION

El cultivo de camarón blanco (*P. vannamei*) es una de las principales actividades productivas del Ecuador. Esta industria se ha visto amenazada por la aparición de diversos agentes patógenos y dentro de los más devastadores por su morbilidad se encuentran los virus (Lightner *et al.*, 1996).

Las piscinas de engorde han venido presentando problemas en el crecimiento de los camarones. Estos problemas se han relacionado con la enfermedad producida por el virus de la Necrosis Hipodérmica y Hematopoyética Infecciosa, IHHNV (por sus siglas en inglés).

El IHHNV es uno de los más importantes virus de ADN que infectan camarones peneidos, causando enfermedades letales (más de 90% de mortalidad) en juveniles de *Litopenaeus stylirostris* (Lightner D.V., 1996). En *P. vannamei*, no causa infección letal, sin embargo ocasiona el síndrome del enanismo y rostro deformado

(RDS); el cual, típicamente resultará en deformidades cuticulares (rostros doblado, antenas y otras áreas torácicas y abdominales), crecimiento lento, pobre tasa de conversión alimentaria y mayor variabilidad en tallas, lo que combinado reduce sustancialmente las ganancias (Kalagayan *et al.*, 1991).

Para tratar de controlar esta enfermedad, se han tomado estrictas medidas en cuanto a producción de larvas, desinfección de huevos y nauplios, y chequeo de reproductores. El diagnóstico precoz de la presencia del virus es una buena estrategia para disminuir los embates de esta enfermedad. Varios métodos de detección han sido desarrollados para el monitoreo y control de IHHNV en el cultivo de camarón.

Estos métodos de detección y diagnóstico incluyen hibridación en formato *Dot-blot*, hibridación *In Situ* y técnicas de *PCR* para la amplificación de fragmentos de ADN objetivo (Lightner & Redman, 1998), incluyendo *PCR tiempo real*, (Arun Dhar *et al.*, 2001), *PCR multiplex* (B. Yang *et al.*, 2006), y una nueva técnica basada en amplificación isotérmica del bucle mediado, LAMP por sus siglas en inglés (Zhao-Feng Sun *et al.*, 2006).

La *PCR* ha sido aplicada con bastante frecuencia en la detección del virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa (IHHNV) en la especie *P. vannamei* por su especificidad (Wang *et al.*, 1996; Numan *et al.*, 2000; Lightner, 1999; fide in Lightner y Pantoja, 2001). Sin embargo, un método más sensible como

la PCR anidada que trabaja sobre la base de una simple PCR podría ser la solución para erradicar el IHHNV y obtener poblaciones libres de este virus.

La especificidad de la PCR anidada está dada por sus dos pares de iniciadores, diseñados a partir del genoma del virus. Esto la vuelve una técnica muy sensible al detectar cantidades muy pequeñas de ADN viral, y muy específica al asegurar que no se amplificará secuencias incorrectas.

El presente trabajo tiene como objetivo desarrollar un sistema anidado para la detección de IHHNV, el cual podría ser utilizado para realizar un diagnóstico oportuno, rápido, y confiable en camarones. Este método de detección permitirá a la industria acuícola, contar con herramientas alternativas de diagnóstico. Así, podrá ser utilizada en el análisis individual de reproductores, lo cual permitirá reducir notablemente, la incidencia del virus en nauplios y larvas.

## **CAPITULO II. REVISION DE LITERATURA**

### **2.1 ASPECTOS GENERALES SOBRE LA PRODUCCION DE CAMARON EN EL ECUADOR**

Ante la demanda sostenida en el ámbito mundial, la camaronicultura se ha convertido en la respuesta al mercado creciente y globalizado, contribuyendo en el 2003 con el 30% de la producción mundial de camarón evaluada en 5.2 millones de toneladas (Sabatini y O'Sullivan, 2004 fide in De la Rosa y Bonami, 2006).

Gracias a las condiciones climatológicas, ubicación geográfica y estructura de sus costas, la adaptación de la especie *Penaeus vannamei* en cautiverio ha sido un éxito en Ecuador. Las condiciones climáticas en Ecuador contribuyen al abastecimiento continuo del producto, puesto que Ecuador es el uno de los pocos países en el mundo donde el número de sus cosechas oscila entre 2 a 2,8 por año. Estos factores, sumados a los exigentes controles en la post-cosecha y empaque, han dado como resultado un camarón de excelente sabor, color y textura; que lo hacen

digno de su reconocimiento internacional como el mejor camarón blanco del mundo (CNA, 1998).

El camarón exportado es el producto final de un proceso que se inicia con el suministro de larvas procedentes de laboratorios, se continúa con algunos meses de cultivo en piscinas y se termina con el procesamiento en las empacadoras con destino al mercado internacional. La semilla (postlarvas), utilizada para sembrar las piscinas camaroneras, puede ser de origen silvestre pero en su mayoría es cultivada en laboratorios. Larva criada en laboratorios asegura un suministro constante independientemente de cualquier factor externo (CNA, 1996).

Se estima que existen más de 150 mil hectáreas dedicadas a la producción del camarón (alrededor del 90% de la producción proviene del cultivo en piscinas) y que la industria genera alrededor de 120 mil empleos. Existen alrededor de 2.400 productores que se concentran principalmente en las provincias costeras, alrededor de la mitad de las camaroneras y que el 60% de la superficie sembrada se encuentra en Guayas (Asociación de Bancos Privados del Ecuador ABPE, 2006).

En el 2005 las exportaciones superaron 440 millones de dólares, 35% más que el año anterior. El sector está en franca recuperación en los últimos años. Los principales destinos de las exportaciones de camarón, en ese orden son: EEUU (60%), Italia y España (34%) (ABPE, 2006). La producción de camarón batió el

récord de ventas en noviembre del 2006. Según la Cámara de Acuicultura, se produjeron 24,98 millones de libras con ventas de USD 56 millones (43,7 millones de euros). Es la producción más alta de los últimos siete años.

## **2.2 ENFERMEDADES VIRALES QUE AFECTAN LOS CULTIVOS**

La industria acuícola en el Ecuador se ha venido desarrollando en un ciclo de “auge y fracaso” a pesar que se han logrado importantes avances en cuanto a: 1) conocimiento y manipulación del ciclo biológico del camarón, 2) diseño de sistemas de cultivo más eficientes y eficaces, y 3) requerimientos nutricionales de la especie cultivada.

Las epidemias ocasionadas por los virus de camarones peneidos tales como WSSV (Mancha Blanca) y TSV (Síndrome de Taura), y en menor grado IHHNV (Virus de la Necrosis Hipodérmica y Hematopoyética Infecciosa) y YHV (Cabeza Amarilla) le han ocasionado a la industria acuícola ecuatoriana pérdidas de cultivos, empleos, e ingresos por exportaciones. El impacto social y económico resultado de las pandemias causadas por estos patógenos en países en los que el cultivo del camarón constituye una industria significativa ha sido profundo (Lightner & Redman, 1998).

Actualmente, la incidencia de WSSV ha disminuido casi en su totalidad en piscinas camaroneras, por la estabilidad de las temperaturas que se mantiene (De La

A, J., com. per.). Sin embargo, la propagación de IHHNV no se ha podido detener. Es un virus que a pesar de no causar mortalidad, conlleva a problemas en el crecimiento del animal en piscinas de engorde lo que se traduce en pérdidas económicas.

IHHNV no causó problemas significativos en Ecuador hasta que aguas templadas y abundante semilla natural (actuando como portadores latentes de la enfermedad) asociado con el fuerte efecto de EL Niño de 1987–88 causó una epidemia desde 1987 en adelante (Jiménez *et al.*, 1999). El uso reciente de líneas domesticadas y seleccionadas de *P. vannamei*, en lugar de larvas de origen silvestre, ha reducido en mucho la severa epidemia, lo que indica la utilidad de ésta selección en combatir los patógenos virales como IHHNV.

## **2.3 VIRUS DE LA NECROSIS HIPODERMICA Y HEMATOPOYETICA INFECCIOSA**

### **2.3.1 Generalidades del virus**

#### **2.3.1.1 Nombre de la enfermedad**

Necrosis Hipodérmica y Hematopoyética Infecciosa (IHHN) y “Síndrome del enanismo y rostro deforme” o RDS ha sido ligado a esta enfermedad (Lightner D.V., 1996).

### 2.3.1.2 Agente etiológico

El Virus de la Necrosis Hipodérmica y Hematopoyética Infecciosa, IHHNV por sus siglas en inglés, fue nombrado basado en el tropismo del tejido (Alday de Graindorge y Flegel, 1999). Bonami *et al.* (1990) caracterizaron exitosamente al agente etiológico de IHHN como un pequeño virus de simple cadena de ADN de aproximadamente 1.4 kb de tamaño. Presenta una simetría icosaédrica, carece de envoltura, mide aproximadamente 22 nm, tiene una densidad de 1,40 g/ml en CsCl, y posee una cápside con cuatro polipéptidos de pesos moleculares 74, 47, 39, y 37.5 kD, respectivamente.

El virus del IHHNV ha sido clasificado como miembro de la familia Parvoviridae (Bonami *et al.*, 1990). Basados en las características del genoma del virus, IHHNV ha sido recientemente relacionado al Brevidensovirus (Shike *et al.*, 2000).

## 2.3.2 Epidemiología

### 2.3.2.1 Especies afectadas

El IHHNV es uno de los más importantes virus que afecta camarones peneidos. La susceptibilidad a la infección de IHHNV varía entre los géneros y los subgéneros de los peneidos (Bell y Lightner, 1984; Lightner *et al.*, 1996).

Se han reportado infecciones naturales en las siguientes especies: *L. stylirostris*, *P. vannamei*, *Penaeus occidentalis*, *Penaeus schmitti*, y *Penaeus californiensis*, *Penaeus monodon*, *Penaeus semisulcatus* y *Penaeus japonicus*. Se ha logrado inducir infecciones experimentalmente en *Penaeus setiferus*, *Penaeus aztecus* y *Penaeus duorarum*. Especies como *Penaeus indicus* y *Penaeus merguensis* parecen ser refractarios al virus (Lightner D.V., 1996).

### 2.3.2.2 Transmisión

La transmisión de IHHNV ha sido llevada a cabo experimentalmente por la inyección de suspensión viral, por la ingesta de material infectado y por la inmersión en agua contaminada (Bell y Lightner, 1984 fide in Motte *et al.*, 2003).

Algunos miembros de poblaciones que han sobrevivido a infecciones de IHHN y/o epizootias aparentemente llevan el virus de por vida y lo pasan a su progenie y a otras poblaciones por medio de transmisión vertical (Motte *et al.*, 2003). Se sospecha de transmisión vertical desde que viriones de IHHNV han sido detectados en tejido ovárico y ovocitos (Lotz, 1997 fide in Motte *et al.*, 2003). Este tipo de transmisión puede ser un factor crucial para el incremento de la prevalencia de IHHNV en camarones domesticados de generación en generación. Análisis realizados a ovarios y esperma de animales infectados, demuestran que la transmisión vertical de reproductores a larvas ocurre principalmente a través de las hembras y fortuitamente a través del esperma de los machos (Motte *et al.*, 2003).

### 2.3.2.3 Distribución Geográfica

Este virus fue descubierto primero en *P. vannamei* y *L. stylirostris* en 1981 en América, empezando en Hawai. Sin embargo, probablemente no era un virus nativo, y se pensó que fue introducido junto con camarones vivos de *P. monodon* de Asia. IHNV probablemente había existido en Asia por algún tiempo sin detectarlo, debido al insignificante efecto que tiene sobre *P. monodon*, la especie más cultivada en Asia. Estudios recientes han revelado variaciones geográficas en las cepas aisladas de IHNV, lo cual sugiere que Filipinas fue la fuente de la infección original en Hawai, y subsecuentemente en la mayoría de las áreas de cultivo de Latinoamérica (Tang y Lightner, 2002).

El virus del IHNV se encuentra ampliamente distribuido en las instalaciones de cultivo en América y Asia. En América, podemos encontrarlo en: el sureste de Los Estados Unidos, México, América central, Ecuador, Perú, Brasil y numerosas islas caribeñas. En el Pacífico central podemos encontrarlo en Hawai, Guam, Tahití y Nueva Caledonia; y en Asia e Indo Pacífico, en Singapore, Filipinas, Tailandia, Malasia e Indonesia (Lightner, 1996).

### 2.3.3 Síntomas Clínicos

#### 2.3.3.1 Presencia de IHNV en *Penaeus vannamei*

IHNV es típicamente una enfermedad crónica en *P. vannamei* (Lightner, 1996).

El Síndrome del enanismo y rostro deforme (RDS) en esta especie ha sido ligado a IHHN. Camarones juveniles que se observan con RDS presentan rostrum deforme, antenas arrugadas, aspereza cuticular y otras deformidades cuticulares (Fotos 1 y 2). (Lightner, 1996). Además, presentan crecimiento lento, pobre tasa de conversión alimentaria y una mayor variabilidad de tallas (Kalagayan *et al.*, 1991).

El coeficiente de variación (CV= desviación estándar dividida para la media de diferentes grupos de tamaños dentro de una población) para poblaciones con RDS es generalmente mayor al 30% y puede acercarse al 50%, mientras que poblaciones de juveniles libres de IHNV (y por lo tanto sin RDS) usualmente muestran un CV del 10% al 30% (Lightner D.V., 1996)



**Foto 1.** Adultos de *P. vannamei* que presentan deformidad en el rostrum. Fuente: Lightner, 1996.



**Foto 2.** Adultos de *P. vannamei* que presentan anomalías cuticulares en el sexto segmento abdominal y cola. Fuente: Lightner, 1996.

## 2.4 MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO UTILIZADOS PARA LA DETECCIÓN DE IHNV

En el caso de peneidos cultivados, los métodos de detección usando anticuerpos

y métodos moleculares utilizando sondas genéticas marcadas y Reacción en Cadena de Polimerasa-PCR proveen una mayor exactitud y son más estandarizables para el diagnóstico de enfermedades y detección de patógenos (Lightner, 1996). Sin embargo, la histopatología directa y métodos de amplificación isotérmica (LAMP), son también utilizados como métodos para la detección de IHHNV.

#### **2.4.1 Métodos basados en anticuerpos**

Ensayos inmunológicos como la prueba ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay), ha sido usada para la detección de antígenos virales en fluidos o extractos crudos de tejidos camarón.

ELISA o el ensayo de enlace de enzima inmutosorbente utiliza un anticuerpo marcado con una enzima (fosfatasa alcalina-AP o peroxidasa de rábano-HRP) que reacciona con un sustrato o con un agente cromogénico para producir una reacción de color en el medio de prueba. El producto coloreado (teñido) de la reacción debe ser medido espectrofotométricamente o por evaluación visual directa (B.T. Poulos *et al.*, 1994 fide in Lightner y Pantoja, 2001).

Poulos *et al.* (1994) desarrolló anticuerpos monoclonales MAbs para IHHNV, pero reportó problemas con especificidad que puede que hayan estado relacionados al tipo de anticuerpo de los MAbs desarrollados para IHHNV. Mientras éstos reaccionaron específicamente con muestras de IHHNV inmovilizadas en una membrana ("Western blots"), también reaccionaron no específicamente con tejidos de

camarón no infectadas, resultando en reacciones falso-positivas en ensayos tipo ELISA (Lightner y Pantoja, 2001).

Es probable que la utilización de pruebas usando MAbs se hagan mucho más comunes en los próximos años debido a que son potencialmente útiles como pruebas de diagnóstico de rutina en laboratorios modestamente equipados (Reddington y Lightner, 1994; fide in Lightner y Pantoja, 2001).

#### **2.4.2 Histopatología directa**

La histopatología directa nos permite identificar anomalías a nivel celular en cortes de tejidos de organismos, los mismos que son sometidos a tinciones generales y/o específicas para cada propósito.

Este tipo de análisis se basa en la demostración histológica de cuerpos de inclusión intranucleares tipo Cowdry A (CAIs), en cortes histológicos (3 – 6 micras) de tejidos teñidos con Hematoxilina y Eosina/Floxina. Los tejidos se obtienen a partir de especímenes que hayan sido fijados con soluciones que contengan ácido acético, tales como la solución de Davidson AFA y la solución de Bouin (Lightner D.V., 1996).

#### **2.4.3 Métodos moleculares basados en sondas genéticas marcadas**

Para estos métodos se utilizan sondas moleculares diseñadas a partir del genoma viral. Estas sondas son secuencias generalmente entre 200 y 1000 pb,

correspondientes a una secuencia de ADN del virus. Se deberán marcar las secuencias que serán usadas.

Actualmente se utilizan marcadores no radiactivos como por ejemplo digoxigenina-11-dUTP (DIG) como agente etiquetador de ADN. Las sondas genéticas DIG-etiquetadas pueden ser aplicadas en la detección y diagnóstico de patógenos en varias formas (Lightner D.V., 1996).

#### **2.4.3.1 Hibridación *Dot-Blot***

La hibridación molecular en gota inmovilizada (*Dot-Blot*) ha sido aplicada con éxito en la detección de IHHNV (Lightner D.V. 1996). Así, utilizando muestras de tejido de camarón homogenizados, se extrae el ADN y se aplica una pequeña muestra de esos extractos en una membrana de nylon cargada positivamente. El ácido nucleico es entonces fijado a la membrana mediante radiación UV o calor y es tratado con una solución bloqueadora para evitar reacciones inespecíficas. A continuación a una solución de hibridación se le agrega la sonda marcada y se pone en contacto con la membrana determinada (68°C) y en agitación constante. Después de un tiempo, se detiene la reacción y se hace el lavado de la membrana. Posteriormente se le agrega el anticuerpo (anti DIG), que se adhiere en cualquier lugar donde la sonda esté adherida al ADN del virus; y está unida a la enzima Fosfatasa Alcalina (AP). Finalmente se agrega la solución de revelado, donde la enzima FA reacciona con el sustrato en ésta solución haciendo que se precipite sobre la zona donde se encuentra el ADN viral.

### 2.4.3.2 Hibridación *in Situ*

Este método emplea sondas moleculares específicas, las cuales se aplican directamente sobre cortes histológicos o apéndices cortados fijados en solución Davidson, que se sospecha puedan haber sido infectados por IHHNV.

La técnica empleada sigue un protocolo semejante a la que se utiliza en el *Dot-Blot*, con algunas modificaciones como la digestión parcial del tejido mediante alguna proteasa y el uso de algún detergente que lisan las membranas celulares y cápsides virales para permitir la difusión de la sonda y propiciar la reacción de hibridación. El tamaño adecuado de la sonda se encuentra entre 200 y 500 pb (Boehringer Mannheim, 1996; fide in De la Rosa y Bonami, 2006).

Una vez completo el protocolo, la laminillas son llevadas al microscopio para observar los cúmulos de color azul oscuro que indican la presencia de virus en los tejidos invadidos por IHHNV. Este método ha sido empleado con bastante éxito para el diagnóstico de diversos virus, entre ellos IHHNV (Mari *et al.*, 1993; fide in De la Rosa y Bonami, 2006).

## 2.4.4 Métodos moleculares basados en amplificación de ácidos nucleicos

### 2.4.4.1 PCR (Polimerase Chain Reaction)

La reacción en cadena de la polimerasa, conocida como PCR por sus siglas en inglés, es un método *in vitro* desarrollado en 1983 por el Doctor Kary B. Mullis, cuyo objetivo es amplificar un fragmento de ADN particular (Sánchez y Saldaña, 2004).

### c) Iones de magnesio (Mg)

Toda ADN polimerasa requiere cationes divalentes, usualmente  $Mg^{2+}$ , agregados comúnmente como cloruro de magnesio ( $MgCl_2$ ), componente que más influye en la reacción. En general, concentraciones insuficientes de  $Mg^{2+}$  dan lugar a bajo rendimiento, mientras que en exceso se obtienen amplificaciones inespecíficas (Sánchez y Saldaña, 2004).

Los iones de  $Mg^{2+}$  son necesarios para la eficiente actividad de la Taq polimerasa. La concentración de magnesio usualmente está en un rango de 0.5-2.5 mM y la concentración óptima está en torno a 1.5 mM si se emplean concentraciones de 200  $\mu$ M de cada uno de los dNTPs (Carmen E., 2000).

### d) Desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs)

Los 4 dNTP's (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) son los ladrillos con los que se construyen las nuevas cadenas de ADN. Las concentraciones de dNTPs que suelen usarse están en torno a 200  $\mu$ M para cada uno de ellos y están relacionadas con las concentraciones de  $MgCl_2$ .

Cabe recalcar que concentraciones elevadas de éstos inhiben la reacción, al no tener la Taq polimerasa suficiente  $Mg^{2+}$  para incorporarlos durante la síntesis de ADN. Una menor concentración de dNTPs nos dará mayor especificidad con poco producto final (Sánchez y Saldaña, 2004).

### e) Iniciadores

Los iniciadores o cebadores son cortas secuencias sintéticas de oligonucleótidos utilizadas para iniciar la reacción de síntesis de ADN, los cuales se unen por complementariedad a secuencias blanco en el ADN molde (De la Rosa y Bonami, 2006).

El proceso de amplificación necesita de un par de iniciadores, uno de ellos es el llamado “hacia adelante” (forward) que se une al inicio de la región de interés en sentido 3’-5’ de la hebra de ADN. El otro llamado “hacia atrás” (reverse) que se une a la secuencia final de la región de interés en sentido 5’-3’. Una vez que los iniciadores definen los extremos del producto que se desea amplificar, la ADN polimerasa empezará la polimerización (De la Rosa y Bonami, 2006).

Es muy importante tener en cuenta la temperatura de melting ( $T_m$ ) de los iniciadores, porque si éstos se hibridan erróneamente en términos de  $T_m$ , la amplificación será menos eficiente. Las temperaturas óptimas de melting oscilan generalmente entre 40 y 65°C. Esta temperatura puede ser estimada, para iniciadores de 18 a 24 pares de bases, utilizando la siguiente fórmula:

$$T_m = 2(A+T) + 4(G+C).$$

La concentración óptima de cebadores está entre 0,1 – 0,5 uM. Mayores concentraciones provocan la formación de dímeros de iniciador (Sánchez y Saldaña, 2004).

La eficiencia y especificidad de la PCR depende principalmente del buen diseño de los iniciadores a utilizarse. Al momento de elegirlos, es recomendable tener en cuenta lo siguiente:

- Normalmente deben tener un tamaño de 18 a 30 bases.
- La complementariedad entre ellos debe ser evitada (particularmente en el extremo 3') para reducir la formación de estructuras secundarias y dímeros de primer.
- Las temperaturas de hibridación para ambos iniciadores deben ser similares.
- Seleccionar iniciadores con un contenido de G y C entre el 40 y 60%.
- Procurar que las últimas bases de los extremos sean G y/o C

En la actualidad, existen diferentes programas computacionales (Primer3, PrimerSelection y NetPrimer) que ayudan en el diseño de los iniciadores, siempre que se tenga la información de la secuencia de ADN objetivo (De la Rosa y Bonami, 2006).

#### **f) ADN polimerasa**

Las ADN polimerasas son enzimas que poseen la propiedad natural de replicar hebras de ADN, utilizando dNTPs como bloques para la síntesis (De la Rosa y Bonami, 2006)

La enzima Taq polimerasa (aislada en 1976 de la bacteria *Thermus Aquaticus*), empleada por su característica de resistencia a las altas temperaturas, es la más utilizada en estos procesos. Esta enzima, en presencia de dNTPs, sintetiza cadenas complementarias que siguen la regla de Watson y Crick (una A se complementa con una T y una G con una C), con el resultado final de dos moléculas hijas semiconservativas (Watson, 1978, fide in Sánchez y Saldaña, 2004). Esta enzima empieza la síntesis de la cadena en dirección 5' - 3' y para esto requieren de un iniciador, dNTP's, MgCl<sub>2</sub> y de una molécula de ADN molde.

Concentraciones elevadas de Mg<sup>2+</sup>, dNTP's y ciertos iones monovalentes pueden inhibir la actividad de la enzima. Las cantidades óptimas de Taq polimerasa recomendadas están entre 0.5-2 unidades. La enzima alcanza su máxima actividad a 72°C (Sánchez y Saldaña, 2004).

#### **g) ADN molde o "Template"**

El ADN molde es la muestra de ADN (ssDNA o dsDNA) de la cual se quiere copiar un determinado fragmento durante la PCR. No es necesario que el ADN sea de alta calidad, pero si es importante que no esté degradado y que no contenga inhibidores de la polimerasa.

La cantidad de ADN molde puede ser de tan solo 1 ng en el caso de material genético clonado, o de un mínimo de 20 ng, cuando se utiliza ADN genómico proveniente de células eucariotas (Sánchez y Saldaña, 2004).

#### 2.4.4.1.2 Pasos de un ciclo de reacción

La reacción se lleva a cabo en una serie de ciclos, cada uno de los cuales incluye 3 pasos:

1.- Desnaturalización: la temperatura se incrementa entre 94 y 95 °C por aproximadamente 30-60 segundos para producir la ruptura de los puentes de hidrógeno y desnaturalizar la doble cadena de ADN molde en dos simples hebras.

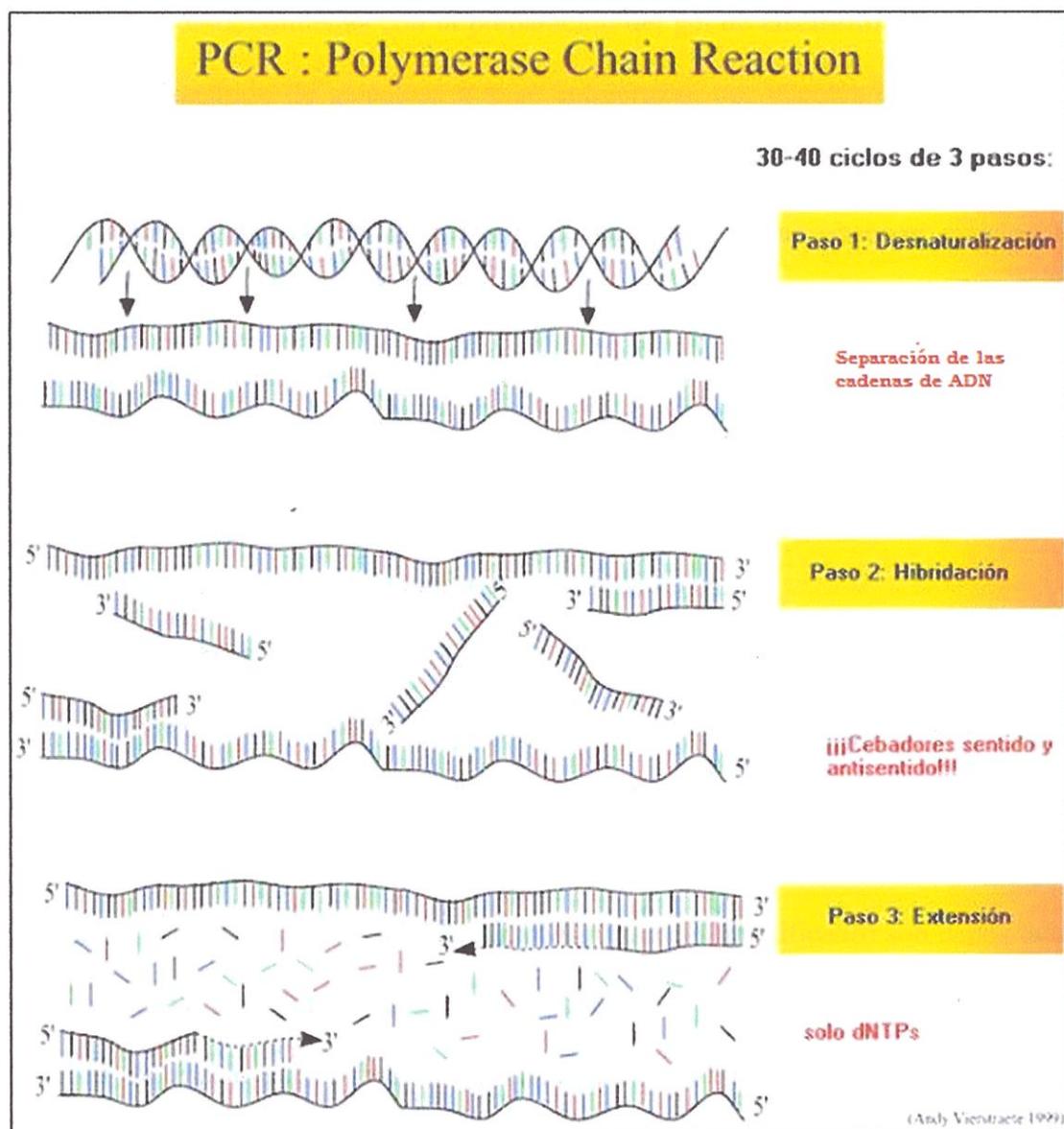
2.- Hibridación: Una vez que el ADN molde se encuentra en forma de cadena sencilla, se disminuye la temperatura al nivel óptimo de hibridación de los iniciadores (dictado por su secuencia) para que éstos puedan unirse a las secuencias blanco del fragmento que se desea amplificar.

3.- Polimerización: Durante este paso la Taq polimerasa incorpora nucleótidos en el extremo 3' del iniciador utilizando como molde la cadena de ADN previamente desnaturalizada. Esto es llevado a cabo a 72°C con un tiempo de extensión máximo de 2 min. (Sánchez y Saldaña, 2004; De la Rosa y Bonami, 2006).

Por lo general, estos pasos (Figura 1) suelen repetirse entre 25 y 30 veces para producir aproximadamente entre uno y mil millones de copias de moléculas molde de ADN. Antes de ejecutar el primer paso, se suele empezar con un periodo de desnaturalización prolongado a 94-95°C durante 5 min para asegurar que la desnaturalización se lleve a cabo a lo largo de toda la molécula. Al igual que una extensión final de 5 min en el paso de polimerización para asegurarse que todos los

productos de amplificación estén terminados y posean la misma longitud (Sánchez y Saldaña, 2004).

**Figura 1.** Pasos básicos de la PCR.



Elaborado: Vierstracte, 1999. (<http://www.monografias.com/trabajos11/>)

#### **2.4.4.1.3 Descripción del proceso de electroforesis**

Una vez que se obtienen los productos de PCR, los fragmentos resultantes son separados por tamaños en un proceso llamado electroforesis, el cual es descrito a continuación.

Este proceso, comienza con la preparación del gel de electroforesis, mezclando agarosa (polisacárido de galactosa que se entrecruzan por puentes de hidrógeno) y TAE 1X mediante calentamiento. La concentración de agarosa depende del tamaño de los fragmentos a separar. Se deja enfriar la mezcla (hasta no observar emisión de vapores), para proceder a colocar el bromuro de etidio (tinte fluorescente que se intercala con el ADN y permite su visualización a través de luz UV). El bromuro es añadido en la siguiente proporción: 5ul/150 ml de TAE-agarosa. El gel es colocado en un molde para su solidificación. Con la ayuda de un peine se formará los pocillos donde se depositará la solución que contiene el ADN.

Una vez que el gel se ha solidificado, es sumergido completamente en la cubeta de electroforesis que contiene TAE 1X (solución amortiguadora que proporciona un medio abundante de iones que permiten la conductividad eléctrica).

Las muestras de ADN previamente mezclado con una cantidad apropiada de tampón de carga (que aumenta la densidad del producto amplificado) son depositadas en los pocillos. Para determinar el tamaño del ADN, se deposita en un pocillo, una solución de escala patrón llamada marcador de peso molecular (nos indicará el tamaño aproximado de las bandas).

Los polos de la fuente de poder son conectados en la cubeta de electroforesis, de tal manera que las muestras de ADN (carga negativa) colocadas en los pocillos del gel, migren hacia el polo positivo. Esta migración producirá la separación de los fragmentos de ADN de diverso tamaño. Finalmente, el gel es colocado en una cámara que emite luz UV donde un patrón de bandas podrá ser visualizado y analizado.

#### **2.4.4.2 PCR Multiplex**

La PCR multiplex es una PCR simple que utiliza múltiples pares de iniciadores dirigidos contra diferentes secuencias objetivo que resultan en una serie de productos que podrán verse como múltiples bandas en un gel de agarosa.

Este método ha sido utilizado para la detección simultánea de IHHNV y el virus del Síndrome de la mancha Blanca, WSSV por sus siglas en inglés. Esta PCR multiplex se basa en la utilización de dos juegos de iniciadores diseñados en base a la secuencia genómica de ambos virus. En un estudio realizado para determinar la sensibilidad de este método, se demostró que la PCR multiplex es 10 veces menos sensible que una PCR simple (Yang *et al.*, 2006).

Este método puede ser especialmente útil a la hora de analizar grandes cantidades de muestras. La sensibilidad del sistema probablemente podría incrementarse si desarrolla un sistema anidado de PCR multiplex (Yang *et al.*, 2006).

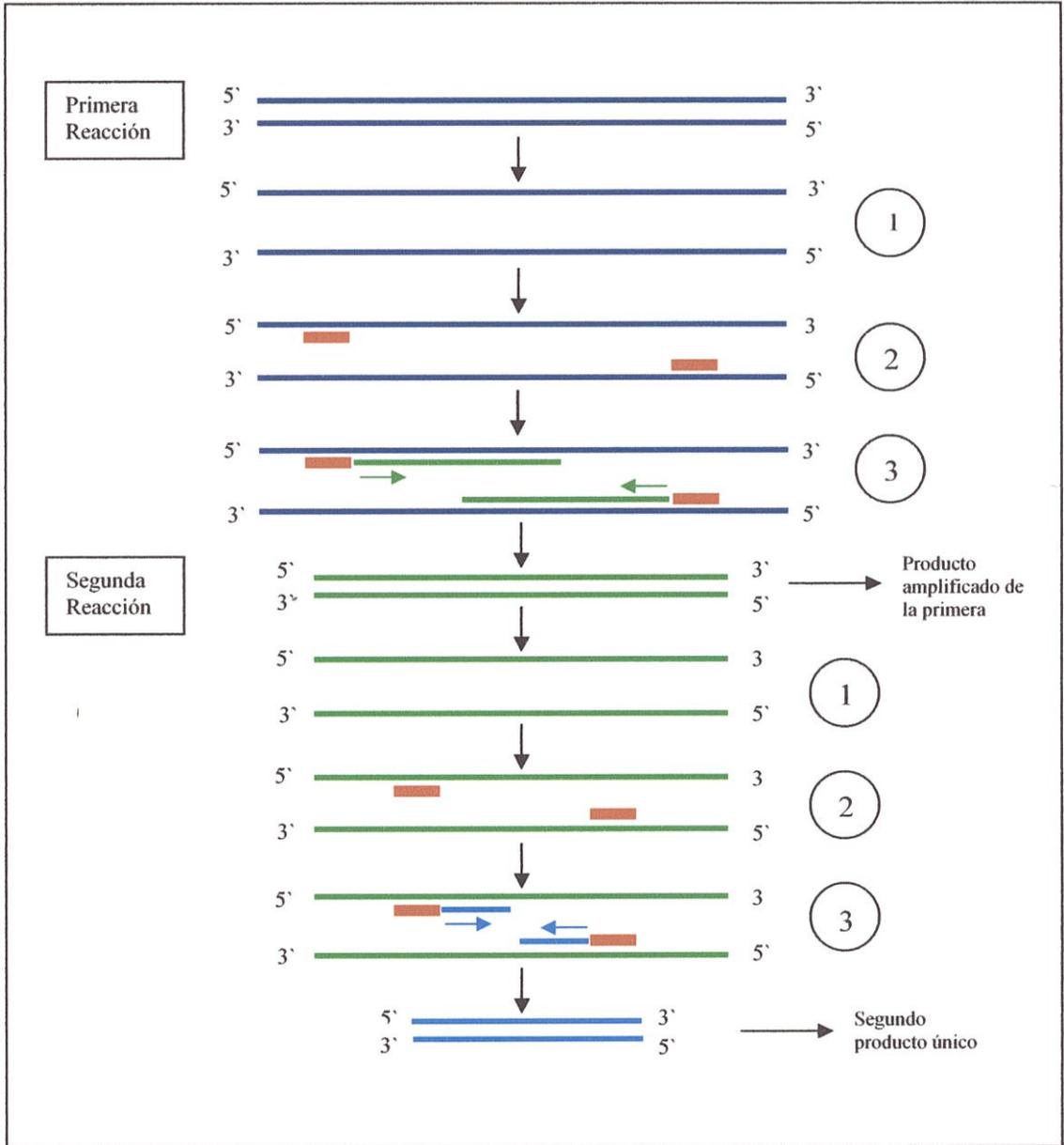
#### **2.4.4.3 PCR Anidada**

El sistema anidado de reacción en cadena de la polimerasa es una modificación

de la PCR convencional que involucra dos juegos de iniciadores utilizados para amplificar un fragmento de ADN objetivo en dos corridas sucesivas de PCR.

El producto amplificado de la primera PCR es utilizado como ADN molde para realizar una segunda PCR. Primero se realiza una reacción utilizando el primer par de iniciadores (externos) para amplificar una región de ADN más extensa, que contiene el segmento diana. Luego, se efectúa una segunda reacción utilizando un segundo par de iniciadores (internos) que se unirán dentro del primer producto de PCR para amplificar la región específica, generando un segundo producto único que será más pequeño que el primero (Figura 2).

**Figura 2.** Representación esquemática del sistema anidado de PCR



**Elaborado:** Veloz N.

#### 2.4.4.4 Método de Amplificación Isotérmica del Bucle Mediado (LAMP)

Este nuevo método de amplificación de ADN fue desarrollado originalmente por Notomi *et al.*, 2000 (fide in Zhao-Feng *et al.*, 2006). Las reacciones LAMP involucran un autodesplazamiento de la hebra en síntesis de ADN por el fragmento largo de la Bst ADN polimerasa con alta actividad de desplazamiento de la banda y un set de iniciadores específicos que reconocen un total de 6 distintas secuencias en el ADN objetivo. Los productos amplificados son bucles contenedores de ADN con varias repeticiones invertidas del objetivo y presentan estructuras con múltiples bucles como coliflores. (Mori *et al.*, 2001 fide in Zhao-Feng *et al.*, 2006).

La reacción LAMP para la detección de IHHNV se realiza bajo condiciones isotérmicas a 64°C. Amplificaciones continuas bajo condiciones isotérmicas producen grandes cantidades de ADN objetivo así como también grandes cantidades del producto, pirofosfato magnésico, después de 60 minutos de iniciada la reacción. Por lo tanto, el método permite visualizar el ADN objetivo amplificado en gel de agarosa. Así como también permite un criterio visual simple de la reacción por el cambio de color de la mezcla con SYBR Green I (de naranja a verde) (Iwamoto *et al.*, 2003 fide in Zhao-Feng *et al.*, 2006) o la turbidez blanca del pirofosfato de magnesio (Mori *et al.*, 2001 fide in Zhao-Feng *et al.*, 2006).

## **CAPITULO III. MATERIALES Y METODOS**

### **3.1 MATERIAL BIOLÓGICO**

Para la realización de la estandarización del método de diagnóstico, se utilizaron 10 camarones *P. vannamei* infectados con IHHNV. Estos animales provenían de una maduración ubicada en la zona de Ayangue. Los pesos promedios de estos camarones oscilaban entre 25 y 30 g.

En lo que concierne a la validación clínica del método, se utilizaron 50 camarones hembras *P. vannamei*. Estos animales provenían de una camaronera ubicada en la zona de Chongón. Los pesos promedios de estos camarones fluctuaban entre 35 y 40 g.

Para la determinación de la especificidad del método desarrollado, se emplearon 50 camarones hembras *P. vannamei*, procedentes de una maduración ubicada en la zona de Ayangue. Los pesos promedios de estos camarones oscilaban entre 29 y 35 g.

### **3.2 EXTRACCION DE ADN**

El ADN genómico de camarón fue extraído de muestras previamente fijadas en etanol 95%. Una vez fijadas las muestras, se procedió a descartar el etanol y colocar 500 ul de solución de cloruro de Sodio (ClNa) 0,85%. La solución anterior fue retirada para luego proceder a colocar 200 ul de Lisis Buffer (anexo I).

Las muestras fueron maceradas e incubadas a Baño María (95°C) por 10 minutos y posteriormente centrifugadas a 13000 RPM por 10 minutos, utilizando una microcentrifugadora (Fisher Scientific). Luego, se procedió a recuperar rápidamente 150 ul de sobrenadante, el cual fue colocado en un nuevo tubo de 1.5 ml que contiene 300 ul de etanol 95% helado y llevado al agitador (Fisher Vortex Genie 2).

Las muestras fueron centrifugadas a 13000 RPM durante 5 minutos para luego, eliminar el sobrenadante y obtener el “pellet” de ADN. Posteriormente, se añadió 100 ul de etanol 70% y se centrifugó nuevamente a 13000 RPM por 5 min. El etanol 70% fue eliminado y los tubos fueron puestos a secar durante 1 hora, aproximadamente.

El ADN fue resuspendido en 70 ul de agua ultra pura y los tubos fueron llevados al agitador durante 20 minutos para ayudar en el proceso. Finalmente, las muestras fueron centrifugadas durante 5 segundos antes de su almacenamiento.

### **3.3 PREPARACION DE MUESTRA PARA ESTANDARIZACION DEL METODO**

En la preparación de la muestra para la estandarización del método anidado, se

utilizó ADN extraído previamente de animales infectados con IHHNV. El estado de infección fue determinado mediante el sistema simple de PCR desarrollado por Robalino (com. per). A partir de estas extracciones de ADN, se generaron 700  $\mu$ l de una solución que contenía ADN viral, el cual fue utilizado como control positivo de reacción de PCR durante el desarrollo de la tesis.

### **3.4 PREPARACIÓN DEL MARCADOR DE PESO MOLECULAR**

El marcador de peso molecular (MPM) utilizado en la prueba de especificidad del sistema anidado, consta de una mezcla de amplicones de diferentes tamaños. Para la preparación del MPM se emplearon las condiciones del sistema de detección simple, descritas en 2.7. Los iniciadores empelados fueron: IHHNV-NSFW-T3 e IHHNV2; IHHNV3 e IHHNV4; IHHNV-NSFWT3 e IHHNV-NSREV-T7; IHHNV5 e IHHNV6; y PEN4-1 y PEN4-2. Los productos amplificados fueron mezclados junto con una pequeña cantidad de tampón de carga y almacenados a 10°C hasta su posterior uso en la electroforesis. Las secuencias, así como el tamaño del amplicón de cada juego de iniciadores, se describen en el anexo VII.

### **3.5 DISEÑO DE INICIADORES**

Los iniciadores del sistema anidado fueron seleccionados a partir de la secuencia genómica de IHHNV con numero de referencia del Gene Bank AF218266. Los cebadores externos fueron diseñados utilizando el programa Primer 3, esperando

encontrar iniciadores de 20 bases, con una temperatura de melting de aproximadamente 60°C. Otra condición requerida para los iniciadores externos fue que debían flanquear una región de aproximadamente 450 y 500 bases

Bajo estos criterios de selección, las secuencias elegidas fueron para el forward 5'-CGACTGGCAACAGATCTTCA -3' (E3) y el reverso 5'-AAGTGACGGCGGACAATATC-3' (E4).

Los iniciadores internos fueron diseñados al interior de la región flanqueada de los iniciadores externos, bajo los mismos criterios de selección en cuanto a la longitud del iniciador (20 bases) y la temperatura de melting (60°C). Este segundo par de iniciadores internos deberían estar separados aproximadamente entre 300 y 350 bases.

Las secuencias escogidas para los iniciadores internos fueron, para el forward 5'-GAAGTACGACTCCACCACA-3' (N3) y para el reverso 5'-CTGACGATAGGGATTTTAGTC-3' (N4).

Todas las secuencias de los iniciadores fueron sometidas a un Blast tn (programa para determinar homologías entre secuencias de nucleótidos que se encuentran en las bases de datos) para determinar si poseían homología con alguna secuencia proveniente del genoma del camarón.

En el anexo IV se describe el posicionamiento de las secuencias de los iniciadores dentro del genoma del IHHNV y el tamaño en bases de nucleótidos que separan tanto a los iniciadores externos e internos entre ellos.

### 3.6 HIBRIDACIÓN *DOT-BLOT*

El protocolo utilizado para la hibridación tipo *dot-blot*, se basó en el protocolo descrito por Sambrook y Russell en el “Manual de Laboratorio de Clonación Molecular”, bajo ciertas modificaciones. A continuación, se describe el protocolo de hibridación tipo *Dot-blot* empleado para el desarrollo del presente trabajo.

#### 3.6.1 Preparación de la sonda IHHNV E3 – E4

La preparación de la sonda marcada se realizó por PCR simple en 20 ul de volumen de reacción final, empleando una mezcla que contenía: Buffer 1 x (10 mM Tris-HCl, 50 Mm KCl, pH 8.3), 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, una mezcla de nucleótidos DIG marcados, 0.5 uM de cada uno de los iniciadores IHHNV E3 y E4, 1 U de Taq ADN polimerasa, 1 ul de ADN objetivo y 13,8 ul de agua ultra pura.

Los parámetros del programa de la reacción de PCR fueron los siguientes: 95°C por 3 min, seguido por 30 s a 95°C, 30 s a 58°C, 1 min a 72°C (35 ciclos), con una extensión de 72°C por 3 min, seguido de una temperatura de incubación de 10°C.

El producto fue revelado en un gel de electroforesis empleándose 1.2 % de agarosa. La banda fue cortada y sometida a purificación utilizando el Kit QIAquick (Anexo II).

#### 3.6.2 Hibridación en membrana

Las muestras de ADN fueron depositadas sobre una membrana de nylon, y puestas a secar durante toda la noche. La membrana fue humedecida con una solución

2x de SSC (anexo I) y luego incubada en la solución de hibridación Church-Gilbert (anexo I) por 1 hora a 65°C. La solución de hibridación fue reemplazada por una nueva, justo antes de añadir la sonda preparada. La sonda fue calentada a 100°C por 5 minutos, añadida rápidamente a la nueva solución de hibridación e incubada a 65°C durante toda la noche.

### **3.6.3 Lavado de membrana**

Los lavados realizados a la membrana fueron los siguientes: 2X SSC por 10 min, seguido de 3 lavados con 0,2 X de SSC suplementado con 0.1% de SDS incubando a 65°C por 20 minutos. Luego se realizan 3 lavados más con 0.1 X SSC complementado con 0.1 % de SDS incubando a 65°C por 20 minutos, y finalmente un lavado de 0.1 X SSC.

### **3.6.4 Bloqueo de membrana**

La membrana fue humedecida en TBS (anexo I) y luego bloqueada, por 30 minutos, en una solución que contenía 5% de leche en polvo descremada diluida en TBS.

### **3.6.5 Anticuerpo y revelado**

La membrana fue rápidamente enjuagada con solución TBS e incubada, a temperatura ambiente por 1 hora, en una solución que contenía 1 ul del anticuerpo  $\alpha$  DIG-AP Fabs (Roche) en 15 ml de solución de TBS suplementada leche al 5%.

Esta membrana fue enjuagada, 5 veces, en solución TBS, y 2 veces, con Buffer B (anexo I). Finalmente, se añadió la solución de revelado BM purple AP Substrate precipitating (MERCK).

### **3.7 SISTEMA DE DETECCIÓN SIMPLE**

Este sistema fue llevado a cabo en 20 ul de mezcla de reacción que contenía Buffer 1x, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM de dNTPs, 0.5 uM de cada uno de los iniciadores IHHNV5 (forward 5'-AATTCGACGCTGCCAATGAT-3') e IHHNV6 (reverso 5'-GCCAATGTTACGTCGGCTTC-3'), 1 ul de ADN objetivo y 13,8 ul de agua ultra pura.

Los parámetros del programa de la reacción de PCR fueron los siguientes: 95°C por 3 min, seguido por 30 s a 95°C, 30 s a 58°C, 1 min a 72°C (40 ciclos), con una extensión de 72°C por 3 min, seguido de una temperatura de incubación de 10°C.

### **3.8 OPTIMIZACIÓN DE LOS PARAMETROS DEL SISTEMA ANIDADO IMPLEMENTADO**

El sistema anidado fue llevado a cabo en un total de 20 ul de volumen de reacción tanto en la primera como en la segunda amplificación. La solución de reacción contenía los siguientes reactivos: Buffer 1x, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM de dNTPs, 0.5 uM de cada uno de los iniciadores (E3-E4 y N3-N4 para la primera y segunda reacción, respectivamente.), 1 ul de ADN objetivo y 13,8 ul de agua ultra

pura. La ejecución de la reacción fue llevada a cabo en un termociclador (PTC-100 Biorad).

Los parámetros de programación del termociclador durante la primera amplificación fueron los siguientes: 95°C por 5 min, seguido de varios ciclos de amplificación de 30 s a 95°C, 45 s para cada temperatura de hibridación probada y 72°C por 45 min. Se concluyó el programa con una extensión de 5 min para la fase de polimerización y, a continuación, un periodo de incubación a 4°C.

Para la optimización de la primera reacción, se probaron 25 y 30 ciclos de amplificación. Dentro del proceso de optimización, también se experimentó con las siguientes temperaturas de hibridación: 58, 59, 60 y 61°C.

Los mismos parámetros de programación de termociclador fueron utilizados durante la segunda amplificación, variando únicamente los ciclos (20, 25, 30 y 35) y las temperaturas de hibridación (60, 61, 62, 63, 64 y 65°C) empleadas. Este programa concluyó con una extensión de 5 min para la fase de polimerización, seguido de un tiempo de incubación a 4°C.

### **3.9 ELECTROFORESIS**

Las reacciones de PCR fueron mezcladas con tampón de carga (TC) y depositadas en los pocillos del gel de agarosa. La electroforesis para ambos sistemas fue llevada a cabo utilizando geles de agarosa al 1.2 % disueltos en TAE. Estos geles fueron revelados empleando bromuro de etidio. La electroforesis fue llevada a cabo con un voltaje de 90 milivoltios durante 45 minutos aproximadamente.

### **3.10 SECUENCIACION**

Un producto de 100  $\mu$ l de reacción del sistema anidado fue sometido a purificación utilizando el Kit QIAquick (anexo III).

Los amplicones de PCR purificados fueron clonados utilizando el Kit TOPO Shotgun Subcloning en el vector pCR®4Blunt-TOPO® vector, acuerdo a las indicaciones del fabricante (INVITROGEN).

La secuenciación fue llevada a cabo en la Medical University of South Carolina.

### **3.11 COMPARACION DE SENSIBILIDAD ENTRE EL SISTEMA ANIDADO Y EL SISTEMA SIMPLE DE PCR**

El control positivo descrito en 2.3 fue utilizado para realizar diluciones seriadas (10Ex-1, 10Ex-2, 10Ex-3, 10Ex-4, 10Ex-5, 10Ex-6, 10Ex-7), necesarias para establecer el límite de detección del sistema anidado en comparación con el sistema simple.

La sensibilidad fue determinada utilizando 1  $\mu$ l de las diluciones seriadas como muestras de ADN objetivo de las reacciones de PCR. Para este ensayo se emplearon las condiciones previamente optimizadas del sistema simple y el sistema anidado.

### **3.12 VALIDACION**

ADN del tejido muscular de pleópodos de 50 animales fue extraído durante la primera semana para la realización del sistema de PCR simple y anidado utilizando

las condiciones optimizadas para la detección de IHHNV.

Esta recolección de muestras de pleópodos fue repetida cada semana durante 4 semanas. Sin embargo, debido a la mortalidad obtenida durante la segunda, tercera y cuarta semana, solo se lograron extraer 48, 48 y 47 pleópodos respectivamente por cada semana.

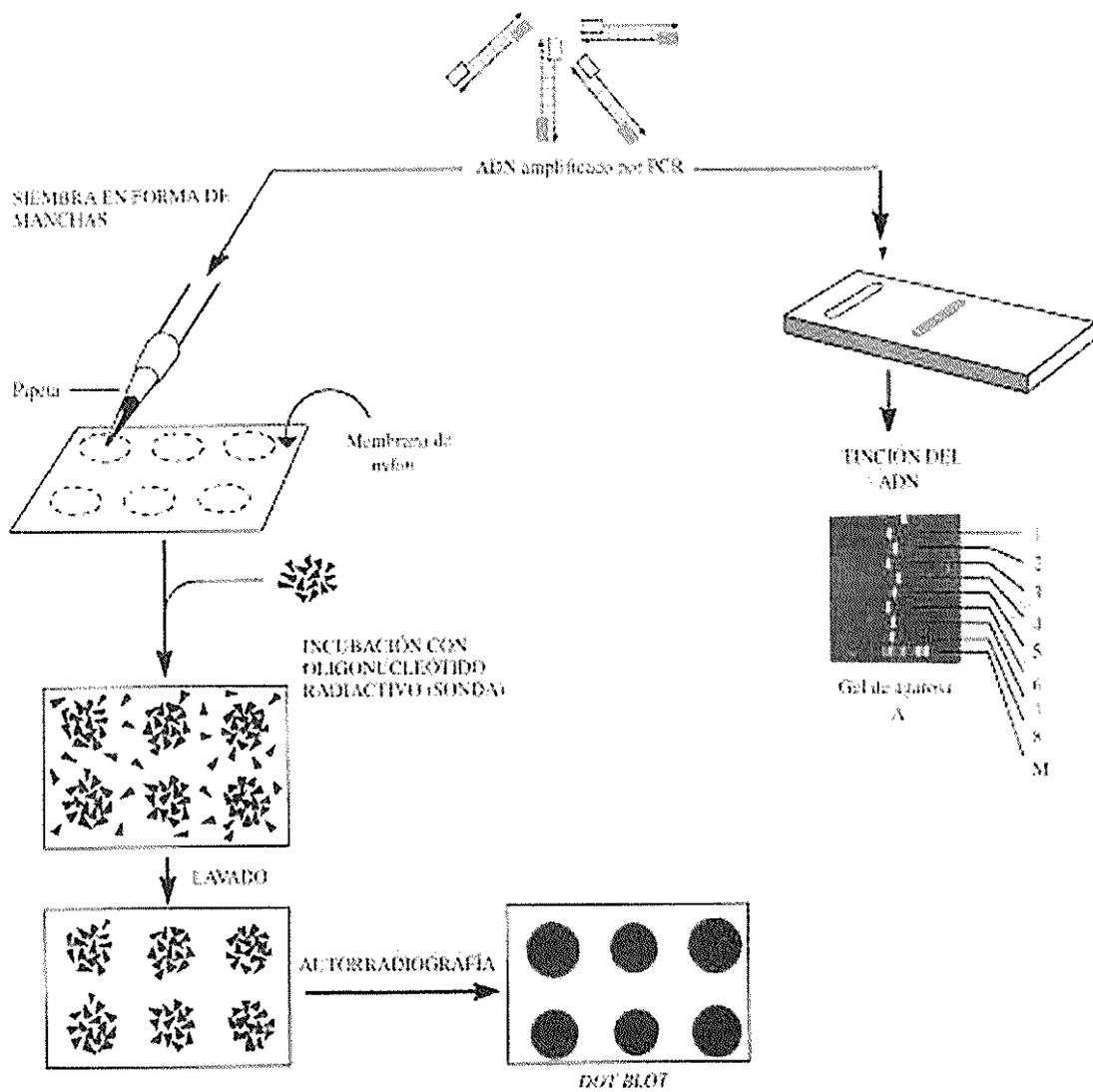
Así, para realizar la validación de este ensayo, se efectuaron 193 reacciones de PCR tanto por el sistema simple como para el anidado. Los resultados de estos análisis fueron recopilados y descritos como porcentajes.

### **3.13 DETERMINACION DE LA ESPECIFICIDAD DEL METODO DESARROLLADO**

El ADN de tejido muscular de pleópodos de 50 animales fue extraído y analizado, empleando las condiciones optimizadas del sistema anidado desarrollado, para establecer la confiabilidad del método anidado implementado.

La especificidad fue determinada por hibridación tipo *dot-blot*, utilizando 16 reacciones de PCR como muestras de ADN objetivo. Estas reacciones fueron seleccionadas en base a los resultados, de 50 muestras luego de la observación en gel de electroforesis.

**Figura 3.** Dos formas de analizar los fragmentos de ADN amplificados mediante la técnica de PCR.



9

Fuente: CIENCIA HOY, 1993. <http://www.cienciahoy.org.ar/hoy23/reaccion1.htm>, con modificaciones realizadas por el autor.

## **CAPITULO IV. RESULTADOS**

### **4.1 OPTIMIZACION DE PARAMETROS DE AMPLIFICACION (Numero de ciclos y temperatura de hibridación)**

Basados en parámetros estándar para la amplificación por PCR (Dieffenbach y Dveksler, 1995), se realizaron una serie de experimentos destinados a optimizar el número de ciclos y la temperatura de hibridación del sistema anidado. En todos los experimentos se utilizó como control positivo, el control descrito en 2.3 y como control negativo, se empleó el ADN de camarones libres de patógenos (Kona) y un control de reacción usando agua ultra pura.

Un resumen de todos los experimentos realizados puede ser observado en la Tabla 1. A continuación, se describen las observaciones más relevantes de los experimentos realizados durante la optimización del sistema anidado.

En el experimento 1, se compararon 4 sistemas anidados diferentes para la detección de IHHNV, utilizando diluciones seriadas de 1/10 y 1/100 del control

descrito en 2.3, y 30 ciclos en ambas reacciones de PCR. En este experimento, se ensayaron dos temperaturas de hibridación (59 y 60°C) para la primera reacción de amplificación (PA). Cada uno de estos productos de amplificación fueron empleados como ADN molde para realizar una segunda amplificación (SA) utilizando temperaturas de hibridación de 60 y 61°C. Bajo estas condiciones, los 4 ensayos mostraron los mismos productos de amplificación (representados como bandas). Así, se observaron dos bandas que corresponden a los amplicones esperados, con una talla de 323 y 466 pares de bases. Además, se observó una tercera banda con una talla aproximada de 800 pares de bases.

Finalmente, en este experimento se determinó que el ensayo empleando 30 ciclos para PA y SA y las temperaturas de hibridación de 59°C en PA y 61°C en SA, mostraron bandas más definidas e intensas. Sin embargo, en todos los ensayos de este experimento, se estableció una definición pobre de la banda de 323 y 800 pb (Anexo VI).

En el experimento 2, se realizaron dos ensayos utilizando diluciones seriadas de 1/10 y 1/100 y 30 ciclos en ambas reacciones de PCR. En este experimento, se probó una temperatura de hibridación de 58°C en PA. El producto de ésta amplificación fue tomado como muestra para realizar una segunda amplificación utilizando las temperaturas de hibridación de 60 y 61°C. Bajo estas condiciones, se observaron las bandas esperadas, además de la presencia de la tercera banda de 800 pb. Este

experimento estableció que ambos ensayos, con temperatura de hibridación de 58°C, mostraron bandas tenues en todas las muestras (Anexo VI).

El experimento 3 fue realizado bajo las mismas condiciones del primer experimento, aumentándose diluciones de 1/1000 y 1/10.000 para determinar si la tercera banda desaparece al aumentar las diluciones de ADN. En este experimento se determinó que el ensayo empleando temperaturas de hibridación de 59°C en PA, y, 60 y 61°C en SA, mostraron similares productos de amplificación.

Los ensayos utilizando temperaturas de hibridación de 60°C en PA y para la segunda reacción de amplificación, temperaturas de 60 y 61°C, no mostraron productos de amplificación.

El ensayo utilizando una temperatura de hibridación de 59°C en PA y 61°C en SA presentó bandas con mayor definición e intensidad, sin observación del efecto de dilución. Además, todas las diluciones presentaron bandas de 323 y 800 pb escasamente definidas (Anexo VI).

Con el fin de incrementar la intensidad de la banda de 323 pb, en el experimento 4 se incrementó el número de ciclos a 35 en la segunda reacción de amplificación, además se adicionó la dilución de 1/100.000. En este experimento, se realizaron dos ensayos, empleando una temperatura de hibridación de 59 °C y 30 ciclos en PA. Utilizando este producto de amplificación, se realizó una segunda reacción con temperaturas de hibridación de 60 y 61°C, empleándose 35 ciclos para

cada ensayo. Bajo estas condiciones, los ensayos mostraron los mismos productos de amplificación, observándose bandas más definidas y con una intensidad más uniforme entre ellas. En este experimento se determinó que el ensayo empleando temperaturas de 59°C en PA y 61°C en SA mostró 3 bandas más definidas e intensas, que presentaron un claro efecto de dilución (Anexo VI).

Se realizó una nueva experimentación (exp. 5), donde se compararon 2 ensayos diferentes, utilizando una temperatura de hibridación de 59°C y 20 ciclos en PA. El producto resultante fue empleado para realizar una segunda amplificación utilizando temperaturas de hibridación de 61 y 62°C con 35 ciclos de amplificación. Bajo estas condiciones, ambos ensayos mostraron resultados similares, observándose bandas correspondientes a los amplicones esperados (323 y 466 pb), así como también, la tercera banda de 800 pb aproximadamente. Sin embargo, en todos los ensayos realizados, las bandas de 466 pb presentaron poca definición. Finalmente, se estableció que el ensayo empleando temperaturas de 59°C en PA y 62°C en SA, mostró bandas con mayor definición e intensidad (Anexo VI).

Con el propósito de excluir la banda de 800 pb, se efectuó un nuevo experimento (Exp. 6), realizando tres diluciones seriadas (10Ex-1, 10Ex-2 y 10Ex-3) del producto del control positivo en PA. En este experimento, se realizaron dos ensayos utilizando una temperatura de hibridación de 59°C y 30 ciclos de amplificación en PA.

En el primer ensayo se probó una temperatura de hibridación de 62°C y 35 ciclos durante la segunda reacción de amplificación. Mientras que el segundo ensayo se manejó con la misma temperatura de hibridación, empleándose 40 ciclos de amplificación.

En este experimento, se determinó que el ensayo empleando 30 en PA y 35 ciclos en SA, mostraron bandas más definidas, con efecto de dilución y completa ausencia de la banda de 800 pb. Mientras que el ensayo empleando 40 ciclos en SA mostró bandas con mayor intensidad, sin efecto de dilución. Además, se observó la tercera banda en la primera dilución de 10Ex-1 (Anexo VI).

Según el análisis del conjunto de estos resultados, se obtiene una definición e intensidad elevada en los productos de amplificación al emplear temperaturas de hibridación de 59°C y 30 ciclos en PA, así como también, 62°C y 35 ciclos en SA. Además, realizando diluciones del primer producto de amplificación, se logra una total ausencia de la tercera banda.

#### **4.1.1 Protocolo optimizado**

##### **4.1.1.1 Primera Reacción de amplificación**

Se generaron diluciones a partir de una solución que contenía ADN genómico de camarón y agua ultra pura, empleándose 1 ul de cada una de estas diluciones para completar el volumen de reacción colocado en los tubos de PCR. Se elaboró el

volumen de reacción necesario para las muestras utilizadas en la primera reacción de amplificación, el cual constó de:

	Concentración en Solución madre	Concentración en solución de reacción
Agua	13,8 ul	
Solución Tampón	10 X	1 x
MgCl <sub>2</sub>	50 mM	1.5 mM
dNTP's	10 mM	0.2 mM
Iniciador E3	10 uM	0.5 uM
Iniciador E4	10 uM	0.5 uM
Taq polimerasa	5 U/uL	1 U/ $\mu$ L

El volumen preparado depende del número de muestras que se van a analizar. El volumen final establecido para cada tubo fue de 20 ul. Se le agregó 1 ul de cada solución (una solución diferente por tubo) a cada tubo. Finalmente, éstos fueron colocados en el termociclador (tipo PTC-100 Peltier Thermal Cycler. Biorad), el cual fue programado con los siguientes parámetros:

<b>Fase</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Tiempo</b>
Desnaturalización	95	30 s
Hibridación	59	45 s
Polimerización	72	45 s

El programa constó de 30 ciclos de amplificación, además de la adición de 2 pasos fundamentales para completar el proceso de amplificación. El programa inició

con un paso de pre-desnaturalización a 95°C durante 5 minutos, finalizando con una extensión de 5 minutos durante la fase de polimerización al final del programa. Luego de esto, la temperatura descendió a 4°C para mantener los productos amplificados a esa temperatura hasta su posterior utilización durante la segunda reacción de amplificación.

#### 4.1.1.2 Segunda reacción de amplificación

Minutos antes de finalizar el programa en el termociclador, fue preparado un volumen de reacción igual al descrito anteriormente, utilizando un segundo juego de iniciadores (internos) y 1 ul del producto amplificado de la primera reacción, como ADN molde. Los tubos fueron insertados en el termociclador, el cual fue nuevamente programado para funcionar con los siguientes parámetros:

<b>Fase</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Tiempo</b>
Desnaturalización	95	30 s
Hibridación	62	45 s
Polimerización	72	45 s

La duración del programa fue de 35 ciclos y al igual que el anterior, se adicionó un paso de pre-desnaturalización (95°C por 5 min) así como también, un paso que contaba con la extensión de 5 minutos durante la fase de elongación. Posteriormente la temperatura descendió a 4°C para mantener los productos amplificados a esa temperatura hasta efectuar la electroforesis.

Tabla 1. Resultados de los sistemas anidados efectuados

Exp.	Origen del ADN	Diluciones	PA				SA				Observaciones
			Iniciador	T.H.	Ciclos		Iniciador	T.H.	Ciclos		
1 (a)	Músculo	ADN 10Ex-1 - 10Ex-2	E3-E4	59°C	30	N3-N4	60°C	30		Bandas en todas las muestras pero más intensas y definidas con TH de 59°C en PA y 61°C en SA. Presencia de una tercera banda de 800 pb aprox. Bandas de 466 pb fueron las más definidas.	
1 (b)	Músculo	ADN 10Ex-1 - 10Ex-2	E3-E4	59°C	30	N3-N4	61°C	30			
1 (c)	Músculo	ADN 10Ex-1 - 10Ex-2	E3-E4	60°C	30	N3-N4	60°C	30			
1 (d)	Músculo	ADN 10Ex-1 - 10Ex-2	E3-E4	60°C	30	N3-N4	61°C	30			
2 (a)	Músculo	ADN 10Ex-1 - 10Ex-2	E3-E4	58°C	30	N3-N4	60°C	30		Bandas tenues en todas las muestras. Presencia de la banda de 800 pb.	
2 (b)	Músculo	ADN 10Ex-1 - 10Ex-2	E3-E4	58°C	30	N3-N4	61°C	30			
3 (a)	Músculo	ADN 10Ex-1 - 10Ex-4	E3-E4	60°C	30	N3-N4	60°C	30		No hubo bandas con TH de 60°C en PA y temp. de 60 y 61°C en SA. Bandas más intensas y definidas con TH de 59°C y 61°C en SA. Presencia de la banda de 800 pb. Bandas de 466 pb fueron las más intensas.	
3 (b)	Músculo	ADN 10Ex-1 - 10Ex-4	E3-E4	59°C	30	N3-N4	60°C	30			
3 (c)	Músculo	ADN 10Ex-1 - 10Ex-4	E3-E4	60°C	30	N3-N4	61°C	30			
3 (d)	Músculo	ADN 10Ex-1 - 10Ex-4	E3-E4	59°C	30	N3-N4	61°C	30			
4 (a)	Músculo	ADN 10Ex-1 - 10Ex-5	E3-E4	59°C	30	N3-N4	60°C	35		Bandas bien definidas en todas las muestras. Bandas de 323 y 800 pb aparecen con mayor intensidad. Se observa efecto de dilución en el	
4 (b)	Músculo	ADN 10Ex-1 - 10Ex-5	E3-E4	59°C	30	N3-N4	61°C	35			

Exp.	Origen del ADN	Diluciones	PA			SA			Observaciones
			Iniciador	T.H.	Ciclos	Iniciador	T.H.	Ciclos	
5 (a)	Músculo	ADN 10Ex-1 - 10Ex-5	E3-E4	59°C	20	N3-N4	61°C	35	ensayo con temperaturas de 59°C en PA y 61°C en SA
5 (b)	Músculo	ADN 10Ex-1 - 10Ex-5	E3-E4	59°C	20	N3-N4	62°C	35	
6 (a)	Músculo	No se realizaron diluciones	E3-E4	59°C	30	N3-N4	62°C	35	Realizando 3 diluciones seriadas del primer producto de amplificación, se logra desaparecer la banda de 800 pb. Efecto de dilución y bandas más definidas en muestras con 35 ciclos en SA.
6 (b)	Músculo	No se realizaron diluciones	E3-E4	59°C	30	N3-N4	62°C	40	

Ex: Exponente

Exp: Experimento

TH: Temperatura de Hibridación

PA: Primera reacción de Amplificación

SA: Segunda reacción de Amplificación

°C: Grados Centígrados

## **4.2 SECUENCIACION**

Una vez concluido el clonaje, las bacterias que poseían el inserto de los amplicones de 323 y 466 pb fueron recuperadas y posteriormente secuenciadas. Dichas secuencias fueron sometidas a un Blast tn, el cual determinó que la secuencia del amplicón de 323 pb presenta un identidad del 98% con la secuencia de ácidos nucleicos de la proteína 2 no-estructural de IHHNV de una secuencia que proviene de camarones infectados en Ecuador. Igualmente, la secuencia correspondiente al amplicón de 466 pb presenta una identidad de secuencia de ácidos nucleicos del 100% en relación a la proteína 2 no-estructural de IHHNV de una secuencia obtenida de camarones infectados en Taiwán. Además, se estableció que la secuencia correspondiente a la banda de 800 pb también corresponde a una secuencia de ácidos nucleicos del IHHNV.

## **4.3 COMPARACION DE SENSIBILIDAD ENTRE EL SISTEMA ANIDADO Y EL SIMPLE**

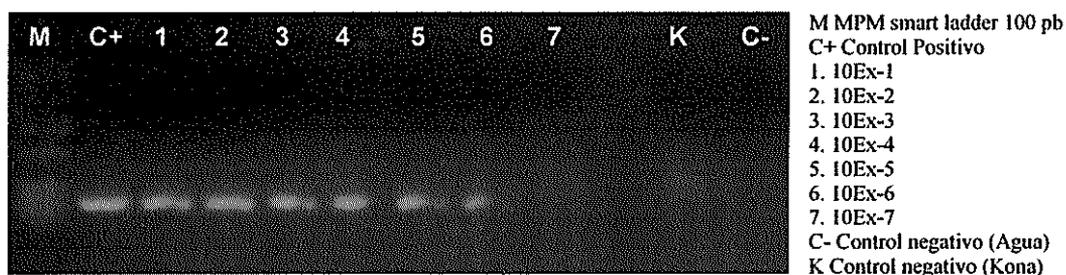
Con la optimización de los parámetros de amplificación, tres ensayos fueron destinados a comparar el límite de detección del sistema anidado y el sistema simple de PCR. En todos los ensayos se incluyeron los mismos controles (un control positivo y dos controles negativos) descritos en 3.1. Un resumen de estos experimentos y sus resultados puede ser observado en la tabla 2. Las diluciones seriadas descritas en 2.9 (de 10Ex-1 hasta 10Ex-7) fueron utilizadas durante el desarrollo de los mismos.

A continuación, se describen los resultados más destacados de los ensayos realizados durante la comparación de sensibilidad entre los dos sistemas de detección.

Basados en los resultados del experimento 6, se realizó un primer ensayo para determinar el límite de detección del sistema anidado, evitando la aparición de la tercera banda.

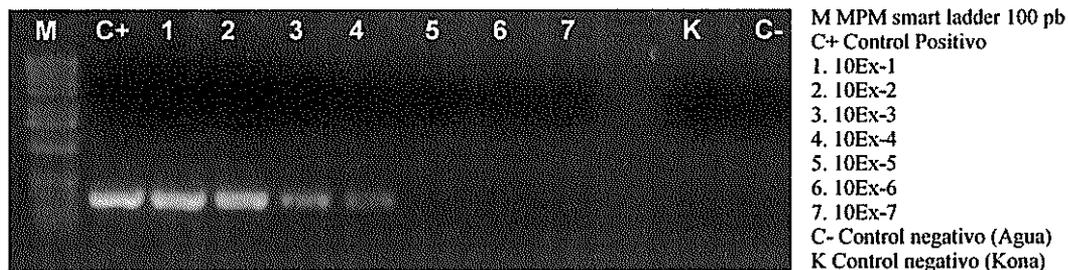
En este ensayo, se realizó una dilución a cada uno de los productos de la primera amplificación. Estas nuevas diluciones fueron tomadas como muestra para realizar una segunda reacción de amplificación. El ensayo, reveló bandas de 323 pb que presentaban una disminución progresiva de su intensidad, siendo visibles hasta la dilución de 10Ex-6 (Foto 3).

**Foto 3.** Sensibilidad del Sistema Anidado efectuando diluciones en PA



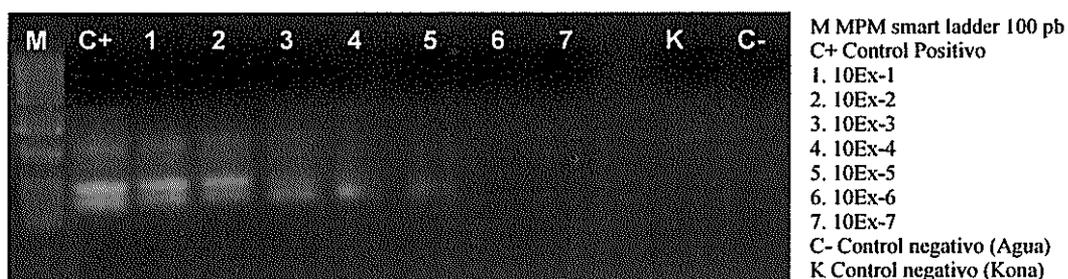
Elaborado: Veloz N.

Un segundo ensayo fue realizado para determinar el límite de detección del sistema simple, empleando los parámetros descritos en 2.6. El resultado mostró que la intensidad de los productos de amplificación disminuía progresivamente hasta la dilución de 10Ex-4 (Foto 4).

**Foto 4.** Sensibilidad del Sistema Simple

Elaborado: Veloz N.

A fin de establecer la sensibilidad del sistema anidado sin realizar diluciones de los productos resultantes de la primera amplificación, se realizó otro ensayo empleando los parámetros optimizados de este sistema, descritos en 3.2. Bajo estas condiciones, se observaron bandas correspondientes a los amplicones esperados (de 323 y 466 pb), además de la tercera banda de 800 pb aproximadamente. Cabe señalar que el ensayo reveló un claro efecto de dilución en todas las muestras, mostrando la pobre definición de la banda de 466 pb en la dilución de 10Ex-4 y la banda de 323 pb en la dilución de 10Ex-5 (Foto 5).

**Foto 5.** Sensibilidad del Sistema Anidado

Elaborado: Veloz N.

**TABLA 2. Resultados de comparación de límite de detección entre el sistema anidado y el sistema de simple PCR.**

Exp.	Origen del ADN	Diluciones	PA		SA		Observaciones
			Iniciador	T.H. Ciclos	Iniciador	T.H. Ciclos	
1	Músculo	Con diluciones del primer producto de amplificación	E3-E4	59°C 30	N3-N4	62°C 35	Realizando una dilución de cada producto de la primera amplificación, se logra obtener banda de 323 pb hasta la dilución de 10Ex-6
2	Músculo	ADN 10Ex-1 - 10Ex-7	IHHNV 5 - 6	58°C 40			Banda en muestras con diluciones de 10Ex-1 hasta 10Ex-4
3	Músculo	ADN 10Ex-1 - 10Ex-7	E3-E4	59°C 30	N3-N4	62°C 35	Bandas bien definidas en diluciones de 10Ex-1 hasta 10Ex-5. Presencia de la tercera banda de 800 pb.

Ex: Exponente

Exp: Experimento

TH: Temperatura de Hibridación

PA: Primera reacción de Amplificación

SA: Segunda reacción de Amplificación

#### 4.4 VALIDACION

El sistema anidado optimizado fue empleado para detectar la presencia de IHHNV en un lote de camarones provenientes de OMARSA. Para efectuar la validación de este ensayo, se realizó un muestreo semanal (durante 4 semanas) a animales aparentemente libres de IHHNV. El ADN extraído de las muestras colectadas fue analizado utilizando el sistema anidado y el sistema simple para la detección del virus.

Un resumen de los resultados de la validación puede ser observado en la Tabla 3. Los detalles de los análisis realizados así como el número de animales muestreados cada semana, se describen a continuación.

En el primer muestreo, 50 hembras fueron analizadas empleando ambos sistemas de detección. El sistema simple detectó 13 muestras positivas para IHHNV, correspondientes al 26%. El sistema anidado detectó 24 muestras positivas que corresponden al 48% (Gráfico 1).

En el segundo muestreo se analizaron 48 muestras, 9 de las cuales resultaron positivas para IHHNV al ser analizadas por el sistema simple de PCR, correspondiente a un 18.75%. Mientras que el sistema anidado detectó 30 positivas que corresponden a un 62.5%.

En el tercer muestreo, 47 muestras fueron analizadas. El sistema simple detectó 18 positivos que corresponde a una 38.3 %. El sistema anidado detectó 39 positivos que corresponden a un 82.98%.

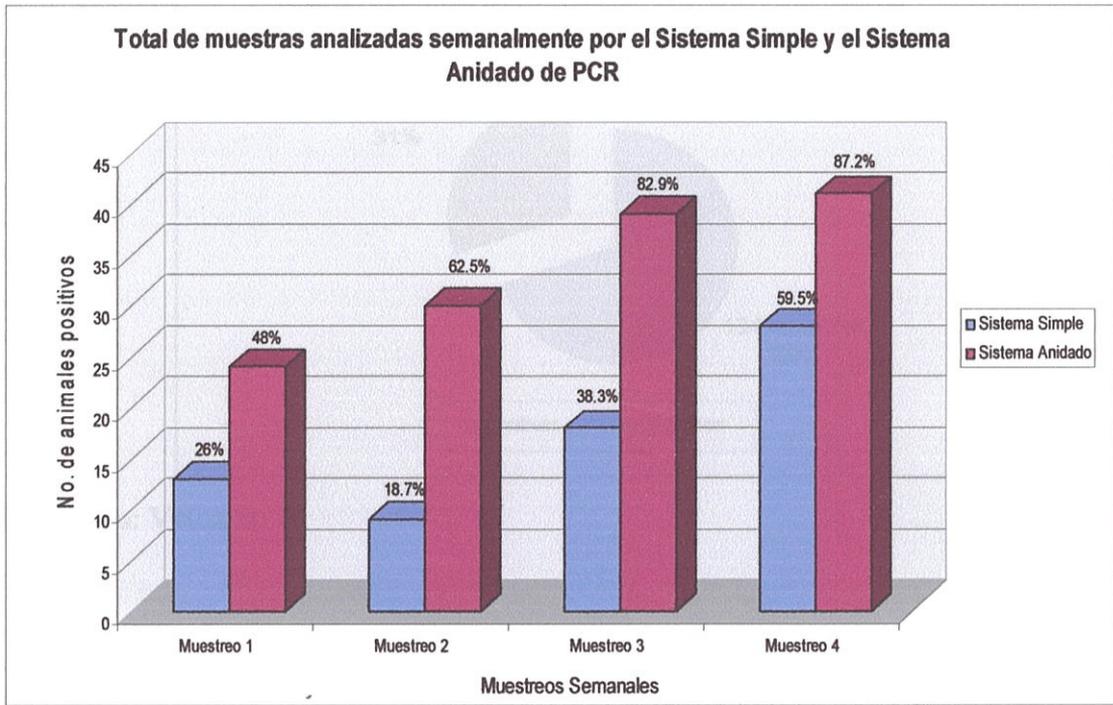
En el cuarto muestreo (cuarta semana), se analizaron 47 muestras para ambos sistemas de detección. El sistema simple detectó 28 hembras positivas que corresponden a un 59.57 %, y el sistema anidado detectó 41 muestras positivas que corresponde a un 87.23%.

**Tabla 3. Resultados de la Validación**

Muestreo Semanal	Animales Muestreados	Sistema Simple		Sistema Anidado	
		(+)	(%)	(+)	(%)
1	50	13	26%	24	48%
2	48	9	18,75%	30	62,5%
3	47	18	38,3%	39	82,98%
4	47	28	59,57%	41	87,23%

+: Positivo

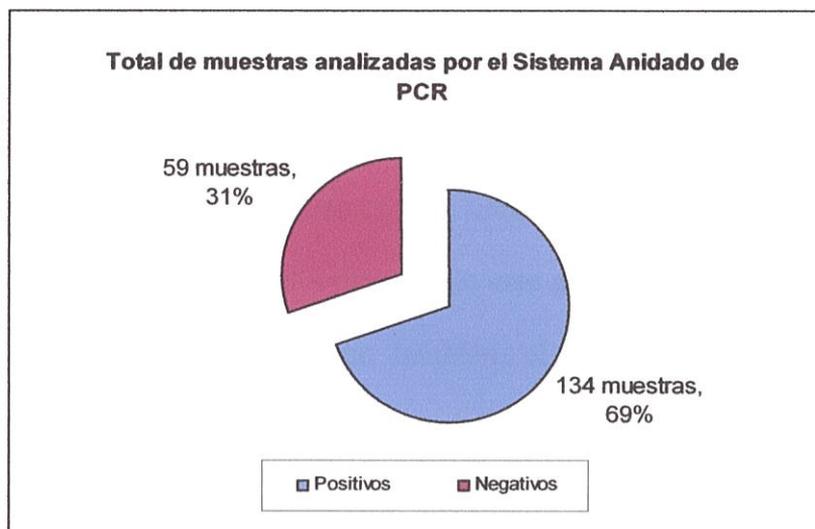
**Gráfico 1.** Total de muestras analizadas semanalmente por el sistema simple y el sistema anidado de PCR



Elaborado: Veloz N.

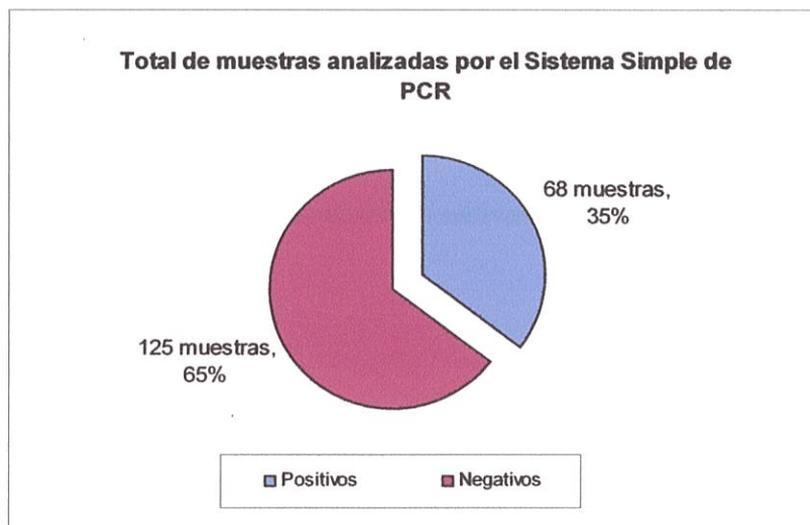
Estos resultados muestran claramente la diferencia de sensibilidad que existe entre el sistema anidado versus el sistema simple de PCR. El total de muestras analizadas fue de 193, para ambos sistemas de detección. El porcentaje final de muestras positivas fue de 35,2% (68 animales) para el sistema simple, mientras que el sistema anidado pudo detectar un 69,4% (134 animales) de muestras positivas del total de muestras analizadas (Gráficos 2 y 3).

**Gráfico 2.** Total de muestras analizadas por el Sistema Anidado desarrollado



Elaborado: Veloz N.

**Gráfico 3.** Total de muestras analizadas por el Sistema Simple de PCR



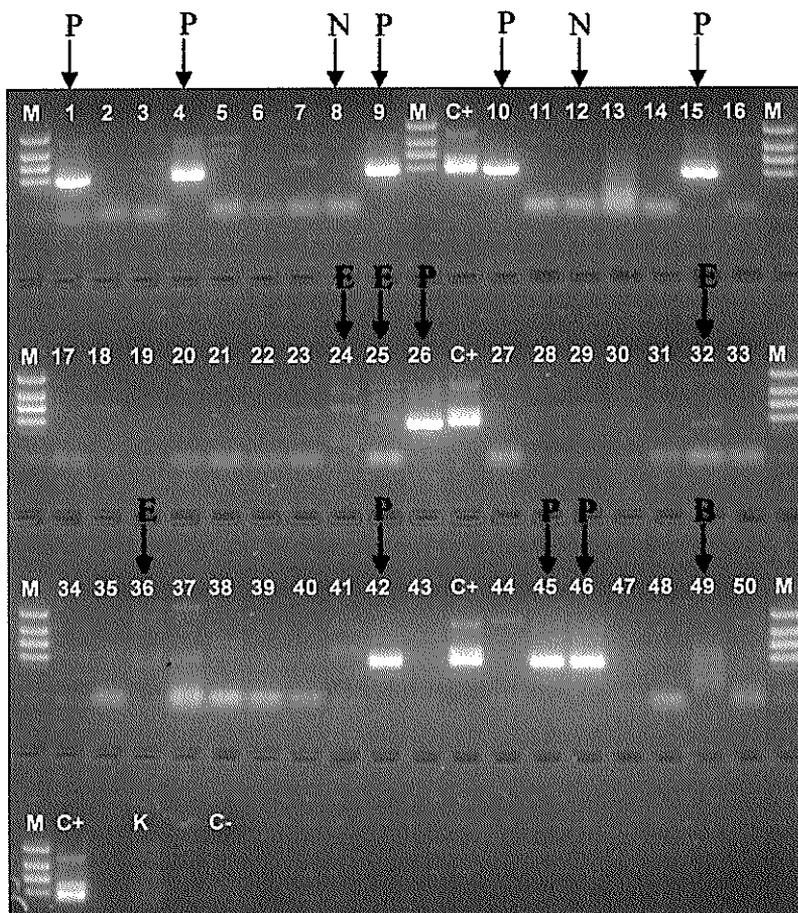
Elaborado: Veloz N.

#### 4.5 ESPECIFICIDAD DEL SISTEMA ANIDADO

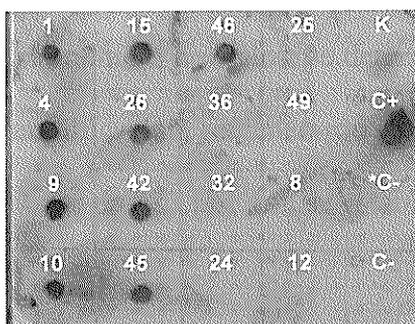
A fin de establecer la especificidad del método anidado desarrollado, se realizó un ensayo empleando hibridación en formato *dot-blot*. Así, el sistema optimizado fue utilizado para analizar animales, aparentemente libres de IHHNV, procedentes de una maduración ubicada en la zona de Ayangue. En este ensayo, se empleó el producto amplificado de 16 muestras, así como también, el producto amplificado de los controles descritos en 2.11. Un tercer control negativo, (producto amplificado de ADN de camarón) fue empleado en esta prueba. A continuación se detallan los resultados del experimento realizado.

El sistema anidado, realizado a las muestras descritas en 2.13, reveló 9 hembras positivas para IHHNV, 22 negativas y 19 amplificaciones presentaron barridos o escaleras (Foto 6). Así, para realizar el *dot-blot*, se tomó los productos de amplificación de las 9 muestras que resultaron positivas, 5 muestras que presentaron barridos y escaleras y 2 muestras negativas. El ensayo, mostró manchones bien definidos que corresponden a las 9 muestras positivas seleccionadas, siendo negativas las 7 muestras restantes (Foto 7).

**Foto 6.** Amplificación de muestras de animales de camaronera empleando el Sistema Anidado desarrollado. Las muestras señaladas con flecha, fueron seleccionadas para el *Dot-Blot*. P (Positivos), N (Negativos), E (Escaleras), B (Barridos). Elaborado por Veloz N.



**Foto 7.** Hibridación *Dot-Blot* de diferentes muestras escogidas en base a los resultados obtenidos por el Sistema Anidado. \*C (muestra amplificada de ADN de camarón que no corresponde a la secuencia de IHHNV). Elaborado: Veloz N.



## **CAPITULO V. DISCUSION**

El presente trabajo se planteó con el fin desarrollar un sistema anidado de PCR para la detección del Virus de la Necrosis Hipodérmica y Hematopoyética Infecciosa (IHHNV).

El primer paso para el desarrollo del trabajo fue la optimización de parámetros de amplificación. Para esto, se evaluaron diferentes temperaturas de hibridación, así como también el número de ciclos empleado en el sistema anidado. De los resultados obtenidos, se determinó que la temperatura de hibridación de 58°C utilizada en PA y de 60°C en SA, mostró bandas tenues en todas las muestras. Sin embargo, la temperatura de hibridación de 59°C utilizada en PA y 62°C en SA, presentaron productos de amplificación con mayor definición e intensidad.

En lo que concierne al número de ciclos, se determinó que empleando 30 ciclos en ambas reacciones de amplificación, se generaron amplicones de 466 pb con mayor intensidad que los amplicones de 323 pb. Así, se estableció 30 ciclos para la primera

reacción de amplificación y 35 ciclos para la segunda reacción de amplificación, dando un equilibrio en la intensidad de ambos productos de amplificación.

Una vez optimizado el protocolo de amplificación del sistema anidado, se decidió evaluar la especificidad del método. Para este efecto, se purificaron los productos de amplificación de 323 y 466 pb, los cuales fueron posteriormente clonados utilizando el vector pCR®4Blunt-TOPO® y transformadas en células competentes. Así, vectores que contenían el inserto de 323 y 466 pb fueron seleccionados y posteriormente secuenciados. Estas secuencias fueron comparadas, utilizando el programa informático Blast tn, con todas las secuencias disponibles en la base de datos de GeneBank. Los resultados de este análisis determinaron que las secuencias de los amplicones de 323 y 466 pb presentan identidades muy cercanas con secuencias de camarones infectados con IHHNV, provenientes de Ecuador y Asia.

Conociendo que los productos amplificados resultantes del sistema anidado corresponden a IHHNV, varios ensayos fueron realizados para determinar la sensibilidad del método desarrollado en comparación con el sistema simple de PCR, utilizado en el transcurso de este trabajo.

En el primer ensayo, se determinó que realizando diluciones a cada uno de los productos de PA y tomando éstos nuevos productos como ADN molde para realizar

la segunda reacción de amplificación, se logra desaparecer los amplicones de 466 y 800 pb. En esta prueba, únicamente se observó el producto de amplificación de 323 pb hasta la dilución de 10Ex-6. Sin embargo, el presente trabajo no fue regido bajo este procedimiento, debido principalmente al aumento de materiales (costo), tiempo y la posibilidad de obtener falsos positivos (contaminación) en el resultado de los análisis. Por lo tanto, fue necesario realizar ensayos adicionales para determinar la sensibilidad del método desarrollado.

En el segundo ensayo, empleando los parámetros descritos en 3.7 (sistema simple), se pudo observar amplicones de 346 pb que disminuían progresivamente hasta la dilución de 10Ex-4.

Finalmente, se realizó un tercer ensayo empleando los parámetros descritos en 4.1 (sistema anidado), donde se observaron amplicones de 323 pb hasta la dilución de 10Ex-5. Cabe señalar que la sensibilidad del sistema anidado presenta una disminución de 10 veces en comparación con los resultados del primer ensayo, debido probablemente a la degradación que ha sufrido en control positivo (descrito en 3.3) por la frecuente descongelación del mismo durante la realización de los ensayos.

Analizando estos resultados en conjunto, se estableció que el sistema simple pudo detectar la presencia del virus hasta diluciones de 10Ex-4, mientras que el sistema anidado fue capaz de amplificar hasta diluciones de 10Ex-5. Por lo tanto, el sistema anidado pudo detectar una carga viral 10 veces más diluida que el sistema simple de PCR.

A fin de poner a prueba el método desarrollado, se realizó la validación del mismo, empleando 50 animales de camaronera los cuales fueron analizados por el sistema simple así como también por el sistema anidado implementado. Los resultados de los ensayos de validación, confirman las observaciones efectuadas en los ensayos de sensibilidad. Así, las muestras analizadas con el sistema simple de PCR que resultaron positivas para IHHNV, también fueron positivas con el sistema anidado. Además, se demostró que algunas muestras que no resultaron positivas con el sistema simple, si fueron positivas con el sistema anidado.

Se debe tomar en cuenta que ciertas muestras, aparentemente negativas en el primer muestreo, resultaron ser positivas en el segundo y negativas en el tercer y cuarto muestreo. La falta de concordancia de estos resultados, probablemente se deba a que los niveles de carga del virus se encontraban en el límite de sensibilidad o por posibles errores de manipulación.

Además, es necesario recalcar que en la prueba de validación, las muestras que resultaron ser positivas por el sistema anidado, presentaron un único producto de amplificación (una banda de 323 pb). Por el contrario, se observaron 2 bandas (de 323 y 466 pb) en la prueba realizada para determinar la sensibilidad del sistema anidado. Este hecho se debe a la elevada cantidad de carga viral presente en el control positivo empleado en los diferentes ensayos de sensibilidad.

En los resultados obtenidos en la validación, se puede apreciar un significativo aumento en la prevalencia del virus, la cual puede verse acelerada por los periodos de

estrés a los que el animal fue sometido durante los muestreos, además del tiempo empleado en la realización de la prueba (4 semanas).

En un último ensayo realizado, se analizaron 50 muestras, en donde se observó la presencia de ciertos artefactos de reacción como son: escaleras y barridos. Este hecho, demandó evaluar la especificidad del sistema anidado. En esta forma, para confirmar la especificidad del método anidado, se realizó una hibridación tipo *dot-blot* a 16 reacciones de PCR, de las 50 previamente analizadas por el sistema anidado. Las muestras para realizar la hibridación *dot-blot*, fueron: 9 reacciones positivas, 1 barrido, 4 escaleras y 2 reacciones negativas. Además, se adicionó como control negativo, una muestra amplificada de ADN de camarón que no corresponde a la secuencia de IHHNV.

Los resultados negativos obtenidos por el *dot-blot* corresponden a las escaleras, barridos y controles negativos generados por el sistema anidado. En el caso de las muestras positivas producidas por el sistema anidado, estas también fueron positivas en los análisis realizados por *dot blot*. Los resultados del *dot blot* y secuenciación, demuestran la especificidad del método desarrollado. La presencia de estos artefactos (barridos y escaleras), hacen necesario que el análisis de los resultados, se realice en una computadora. Así, se deberá tomar una foto del gel y pasarla a Power Point para poder trazar una línea entre el control positivo y el marcador de peso molecular. Las muestras que coincidan con la línea, podrán ser consideradas como positivas.

## CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados de éste trabajo, se determinó que la temperaturas óptimas de hibridación, tanto para la primera como para la segunda reacción de amplificación, fueron de 59 y 62°C, respectivamente. Así mismo, quedó establecido el número de ciclos en ambas reacciones de amplificación, siendo 30 ciclos empleados en PA y 35 ciclos en SA. Bajo estas condiciones, de temperaturas y número de ciclos, se pudo observar bandas que presentaban una mayor definición e intensidad.

En lo que concierne a la sensibilidad del método desarrollado, quedó establecido que el sistema anidado es capaz de detectar una carga viral 10 veces más diluida que el sistema simple de PCR desarrollado por Robalino (com. per.). Con el sistema simple, se pudo observar productos de amplificación, de 346 pb, hasta la dilución de 10Ex-4, mientras que el sistema anidado pudo amplificar secuencias del virus (323 pb) hasta la dilución de 10Ex-5.

La sensibilidad del sistema anidado fue comprobada al realizar la validación del método, empleando animales de camaronera. El total de muestras extraídas fue de 193, las cuales fueron analizadas por ambos sistema, donde se pudo apreciar una clara diferencia entre ellos. Se determinó que el sistema simple pudo detectar un total de 68 animales infectados (35,2%), mientras que el sistema anidado logró detectar 134 animales infectados, que corresponden a un 69,4%. Esto comprueba la utilidad del método desarrollado, al poder detectar una mayor cantidad de animales infectados con el virus que el sistema simple de PCR.

Se puede considerar que el sistema anidado posee una alta especificidad debido a sus iniciadores diseñados a partir del genoma de IHNV (AF218266 del Gene Bank). Esto se encuentra demostrado con los resultados obtenidos por la hibridación tipo *dot-blot* realizada a varias reacciones previamente analizadas por el sistema anidado. Se logró demostrar que el sistema anidado es lo bastante específico al poseer 100 por ciento de similitud con los resultados obtenidos por el *dot-blot*. Esto se encuentra nuevamente demostrado con los análisis de secuenciación que se efectuaron a los clones resultantes de los amplicones de 323 y 466 pb, los cuales presentaron 100 por ciento de identidad con las secuencias provenientes de los iniciadores.



## RECOMENDACIONES

1.- Teniendo en cuenta que las enfermedades virales han sido la causa del deterioro en la producción acuícola, se recomienda desarrollar programas de exclusión de patógenos. De esta manera, se podrá aplicar el sistema desarrollado, en la generación de padrotes libres de IHHNV. Así, los reproductores analizados que resulten negativos, podrán ser empleados en la generación de huevos y nauplios libres del virus. En esta forma, se podría realizar un seguimiento a la descendencia proveniente de reproductores analizados individualmente por el sistema anidado, hasta su madurez sexual.

2.- Para evitar errores de interpretación en el análisis de los resultados del sistema anidado, se recomienda desarrollar un método de detección más sensible y rápido como el *Dot-Blot*, que confirme la presencia de positivos obtenidos por el primer análisis.

3.- Es de consideración la necesidad de utilizar concentraciones conocidas de ADN viral para poder estimar, cuantitativamente, la sensibilidad del sistema anidado.

4.- Basados en los procedimientos empleados para el desarrollo y optimización del presente trabajo, se pueden desarrollar otros sistemas anidados aplicables para el diagnóstico y detección de diferentes virus.

5.- Las investigaciones deberán estar enfocada en el establecimiento de modelos de estudio de los diferentes agentes virales. Esto implica, la conexión con investigadores especializados en virología, invertir en la adquisición de equipos más avanzados, así como también, en el entrenamiento de personal en las diferentes técnicas para la detección e identificación de agentes patógenos.

# ANEXOS

## ANEXO I

### SOLUCIONES UTILIZADAS EN LAS DIFERENTES TECNICAS DE BIOLOGIA MOLECULAR Y EXTRACCION DE ADN

#### Solución 20 x SSC

Cloruro de Sodio 0.75 M

Citrato de Sodio 75 mM

Agua destilada

#### Solución de Hibridación Church – Gilbert (Ph 7)

NaPOH 0.5 M

EDTA 1 mM

SDS 7 %

Agua destilada

#### Solución TBS

NaCl 68 mM

KCl 1,3 mM

Tris-Cl 2 M

Agua destilada

#### Buffer B

Tris-Cl 50 mM (pH 9)

Cl<sub>2</sub>Mg 1 mM

ClNa 100 mM

Agua destilada

**Lysis Buffer**

NaOH            0,05 N

SDS             0,025 %

Agua ultrapura

**Buffer de electroforesis (TAE 50 X)**

Tris Base                      242 g

Acido Acético Glacial        57.1 ml

EDTA                          100 ml (0.5 M) pH 8

Añadir agua destilada hasta 1lt.

## ANEXO II

### PROTOCOLO DE EXTRACCION DE ADN EN GELES DE AGAROSA (QIAquick)

#### Nota antes de usar el kit de purificación

- El color amarillo del buffer QG indica un pH  $\leq 7.5$
- Añadir etanol (96-100%) al Buffer PE antes de usar (ver etiqueta de volúmenes).
- Todas las centrifugaciones son a 10.000 x g en la microcentrífuga convencional.

#### Procedimiento:

- 1.- Cortar el fragmento de ADN del gel de agarosa empleando un escarpelo limpio. Colocar el trozo de gel en un tubo colector de 2 ml.
- 2.- Añadir 3 volúmenes de Buffer QG por cada volumen de gel.
- 3.- Incubar a 50 °C por 10 minutos o hasta que el gel se disuelva completamente. Se puede llevar al vórtex para ayudar a disolver.
- 4.- Chequear el color de las muestras (debe ser amarillo o similar al buffer). Si el color cambia a naranja o violeta, añadir 10 ul de Acetato de Na 3M, pH 5.
- 5.- Añadir 1 volumen de isopropanol (por cada volumen de gel) a la muestra. Este paso incrementa la cosecha de fragmentos de ADN < 500 pb, pero para fragmentos entre 500 pb y 4 kb el isopropanol no tiene efecto.
- 6.- Transferir las muestras a las columnas con membrana QIAquick y centrifugar.

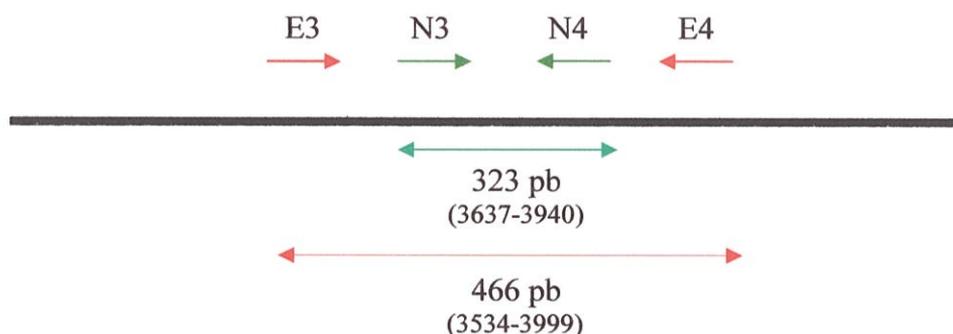
- 7.- Descartar el precipitado y transferir la columna a un nuevo tubo (2 ml).
- 8.- Se recomienda añadir 0,5 ml de Buffer QG a la columna y centrifugar por 1 minuto.
- 9.- Para lavar, agregar 750 ul de Buffer PE (con etanol incluido, 24 ml) y centrifugar por 1 minuto.
- 10.- Descartar el precipitado y centrifugar por 1 minuto porque los residuos de etanol no se pudieron haber removido completamente.
- 11.- Colocar la columna QIAquick en un nuevo tubo de 2 ml.
- 12.- Para precipitar el ADN, agregar 50 ul de Buffer EB 10Mm Tris-Cl, pH 8.5 en el centro de la membrana y centrifugar la muestra.
- 13.- Descartamos las columnas QIAquick. El tubo contiene ADN libre de cebadores, sales, desoxinucleótidos, impurezas, etc.



## ANEXO IV

### REPRESENTACION ESQUEMATICA DE LA UBICACION DE LOS INICIADORES DEL SISTEMA ANIDADO DENTRO DEL GENOMA DEL IHNV (Gene Bank AF218266)

gacgaagaacacgccgaaggatcaagtggaccagaccacacagatgtctacaattcaatactggagactcaatacatat  
tactttccaacaagaagatacttcgaattcgacgctgccaatgatggaaacttcgacggaaaaattatactgcctccac  
tacattggatgaacttatctctatggtctaaagagcagcgacagttcagcaacagaaacacaacgatataagatggtaaa  
atcaatgatgaagacctacggatggaaagtacataaagcaggcgtagtgtgactcgtatggtacccttatgaaagactt  
aaaagtatcaggaggcacatcattgagactctcacattacagacaccccatatttagaaatatttaaggatactactggact  
acataatcaactatcaactaaggaagccgacgtaacattggcaaaatggatacaaaatcccaactgtgaccgtacaatca  
acagcagcaaatatgaagaccaatccaacaattggattcatggaacaaatgcaaccggtgacagaaaagcctatac  
aatccatggtgacactagaaattggtatggcggagaaataccaacaaccggaccacctcatcccaaaatgggggtggtc  
aattaaaatgggacaaccatcccttgaaacctagtctaccagcagaccaccatacaaacgactggcaacagatcttc  
atgagaatgtccaatcaaaggaccaaattggagacgaacttaacttggtgcagagtacaagccgacttctctacac  
ctagaagtaegactcccaccacaaggatgtgtcgaagtttggggatgttacaatatcttcacgcacatgtactggacia  
cttaacaatggtatattatgcataactaactaaatatactgatgtgcaatatataccgattatatccagctttaccaataaacat  
atatagcttattatcatctatacctacccatatacaccagctaccaggcaaggtgggactccggctaccagcgatggt  
gggacacttttcttattgacgacatatttcgtcacttacgtcacttacaaaagactaaaatccctatcgtcagtcagtcattt  
agagtcagggatattgtccgcgctcacttagagcgcgaagcgcgagatccatcatttaaattagtggtatgacgtcacat  
attaagtaacggtttctgcaag.



## ANEXO V

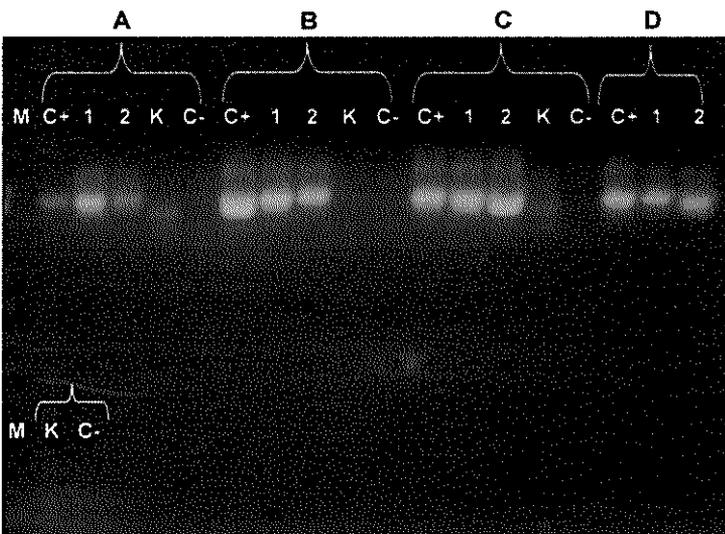
### SECUENCIAS Y TAMAÑO DE LOS AMPLICONES DE LOS INICIADORES EMPLEADOS EN LA PREPARACION DEL MARCADOR DE PESO MOLECULAR.

INICIADOR	SECUENCIA	TAMAÑO
IHHNV-NSFW-T3	5'-GAATTAACCCTCACTAAAGG-3'	1040 pb
IHHNV-2	5'-GGCCAAGACCAAATACGAA-3'	
IHHNV-NSFW-T3	5'-GAATTAACCCTCACTAAAGG-3'	703 pb
IHHNV-NSREV-T7	5'-GTAATACGACTCACTATAGG-3'	
IHHNV-3	5'-TAATGAAGACGAAGAACACG-3'	505 pb
IHHNV-4	5'-TGGGTAGACTAGGTTTCCAA-3'	
IHHNV-5	5'-AATTCGACGCTGCCAATGAT-3'	346 pb
IHHNV-6	5'-GCCAATGTTACGTCGGCTTC-3'	
PEN 4 - 1	5'-ACAACGCTCATCGGGTCATT-3'	255 pb
PEN 4 - 2	5'-TTCTCAGCCTGTCGTTCTGC-3'	

## ANEXO VI

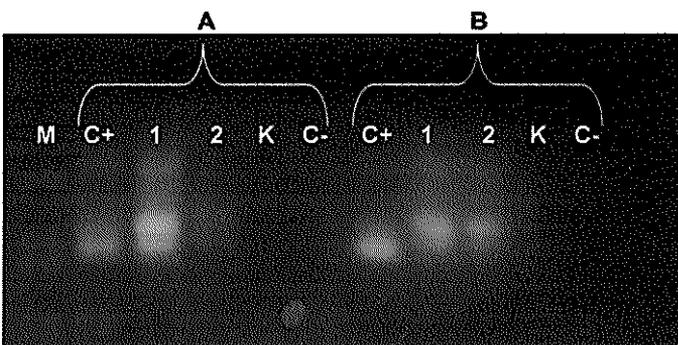
### EXPERIMENTOS REALIZADOS PARA LA OPTIMIZACION DE LOS PARAMETROS DE AMPLIFICACION.

#### EXPERIMENTO 1



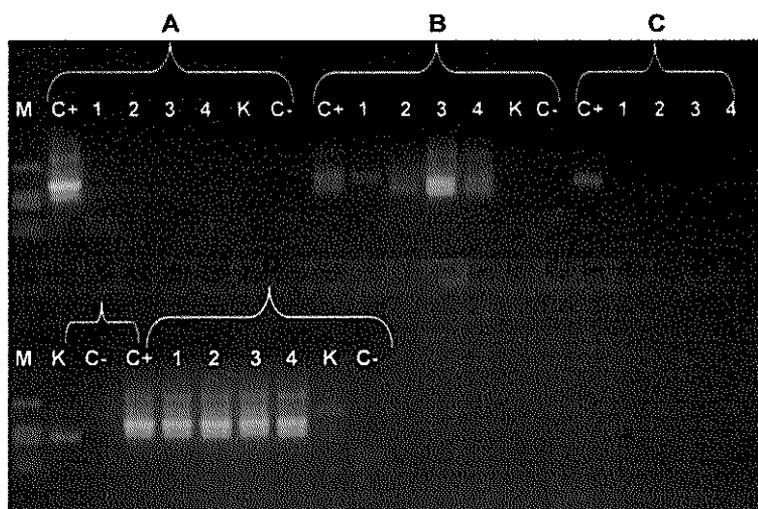
M MPM smart ladder 100 pb  
 A. TH: 60°C (PA) - 61°C (SA)  
 Ciclos: 30 (PA) - 30 (SA)  
 B. TH: 59°C (PA) - 61°C (SA)  
 Ciclos: 30 (PA) - 30 (SA)  
 C. TH: 60°C (PA) - 60°C (SA)  
 Ciclos: 30 (PA) - 30 (SA)  
 D. TH: 59°C (PA) - 60°C (SA)  
 Ciclos: 30 (PA) - 30 (SA)  
 C+ Control Positivo  
 1. 10Ex-1  
 2. 10Ex-2  
 C- Control negativo (Agua)  
 K Control negativo (Kona)

#### EXPERIMENTO 2



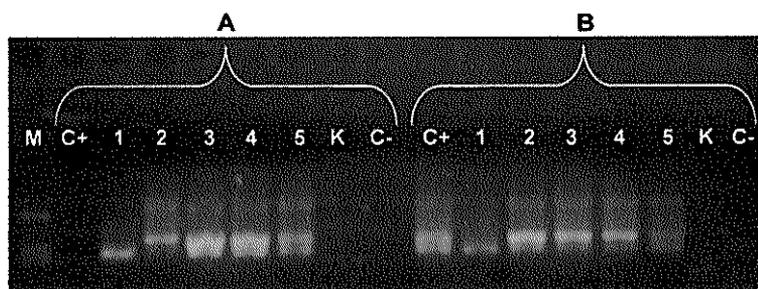
M MPM smart ladder 100 pb  
 A. TH: 58°C (PA) - 60°C (SA)  
 Ciclos: 30 (PA) - 30 (SA)  
 B. TH: 58°C (PA) - 61°C (SA)  
 Ciclos: 30 (PA) - 30 (SA)  
 C+ Control Positivo  
 1. 10Ex-1  
 2. 10Ex-2  
 C- Control negativo (Agua)  
 K Control negativo (Kona)

### EXPERIMENTO 3



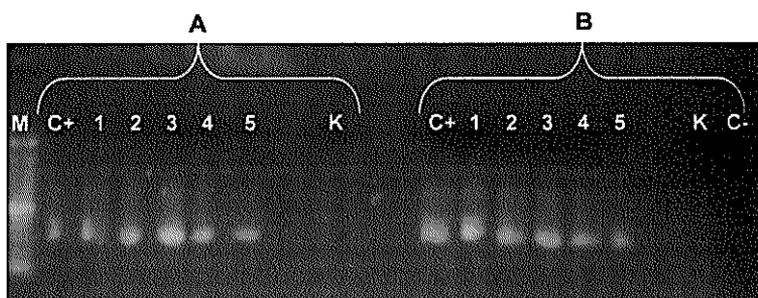
M MPM smart ladder 100 pb  
 A. TH: 60°C (PA) - 60°C (SA)  
 Ciclos: 30 (PA) - 30 (SA)  
 B. TH: 59°C (PA) - 60°C (SA)  
 Ciclos: 30 (PA) - 30 (SA)  
 C. TH: 60°C (PA) - 61°C (SA)  
 Ciclos: 30 (PA) - 30 (SA)  
 D. TH: 59°C (PA) - 61°C (SA)  
 Ciclos: 30 (PA) - 30 (SA)  
 C+ Control Positivo  
 1. 10Ex-1  
 2. 10Ex-2  
 3. 10 Ex-3  
 4. 10 Ex-4  
 C- Control negativo (Agua)  
 K Control negativo (Kona)

### EXPERIMENTO 4



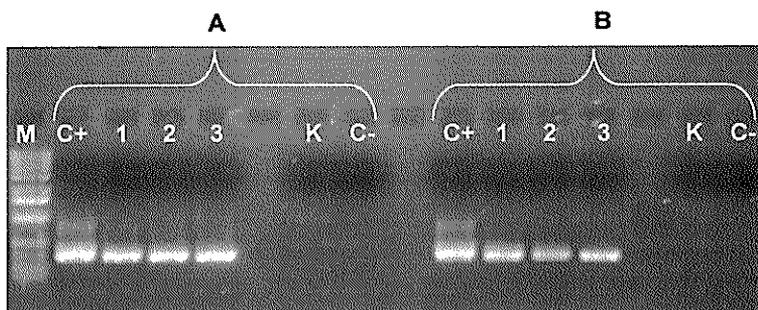
M MPM smart ladder 100 pb  
 A. TH: 59°C (PA) - 60°C (SA)  
 Ciclos: 30 (PA) - 35 (SA)  
 B. TH: 59°C (PA) - 61°C (SA)  
 Ciclos: 30 (PA) - 35 (SA)  
 C+ Control Positivo  
 1. 10Ex-1  
 2. 10Ex-2  
 3. 10 Ex-3  
 4. 10 Ex-4  
 C- Control negativo (Agua)  
 K Control negativo (Kona)

## EXPERIMENTO 5



M MPM smart ladder 100 pb  
 A. TH: 59°C (PA) - 61°C (SA)  
 Ciclos: 20 (PA) - 35 (SA)  
 B. TH: 59°C (PA) - 62°C (SA)  
 Ciclos: 20 (PA) - 35 (SA)  
 C+ Control Positivo  
 1. 10Ex-1  
 2. 10Ex-2  
 3. 10Ex-3  
 4. 10Ex-4  
 5. 10Ex-5  
 C- Control negativo (Agua)  
 K Control negativo (Kona)

## EXPERIMENTO 6



M MPM smart ladder 100 pb  
 A. TH: 59°C (PA) - 62°C (SA)  
 Ciclos: 30 (PA) - 40 (SA)  
 B. TH: 59°C (PA) - 62°C (SA)  
 Ciclos: 30 (PA) - 35 (SA)  
 C+ Control Positivo  
 1. 10Ex-1  
 2. 10Ex-2  
 3. 10Ex-3  
 4. 10Ex-4  
 5. 10Ex-5  
 C- Control negativo (Agua)  
 K Control negativo (Kona)

**ANEXO VII. Resultados de los análisis realizados a los animales muestreados durante la primera semana.**

SISTEMA SIMPLE																			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
Tanque	1	-	-	-	-	+++	+	-	+++	-	-	+	+++	-	-	-	+++	-	-
IHHNV	-	-	-	-	-	+++	+	-	+++	-	-	+	+++	-	-	-	+++	-	-
PEN	+++	+++	+	+++	++	++	+	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+	++	+++	++	++
Tanque	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38
IHHNV	-	++	-	-	+++	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
PEN	++	+++	++	++	+++	+++	+	+	+	+	+	+	++	+++	++	+++	++	+	+
Tanque	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	C+	K					
IHHNV	-	-	+	+++	-	-	-	-	+	-	-	-	+++	-	-	-	-	-	-
PEN	++	+	+++	++	++	++	++	++	++	+	+	++	+++	++					

#Muestras: 50

Positivos: 13 (26%)

Negativos: 37 (74%)

SISTEMA ANIDADADO																			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
Tanque	1	++	+++	-	-	+++	-	+	+++	-	-	+++	++	+++	-	+++	+++	+	+++
IHHNV	++	+	+++	-	-	+++	-	+	+++	-	-	+++	++	+++	-	+++	+++	+	+++
Tanque	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38
IHHNV	+++	-	+++	+++	++	++	+++	-	-	++	-	++	++	-	+	-	-	+	-
Tanque	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	C+	K	C-				
IHHNV	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C+	K	C-				
PEN	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	-	-				

#Muestras: 50

Positivos: 24 (48%)

Negativos: 26 (52%)

**ANEXO VIII. Resultados de los análisis realizados a los animales muestreados durante la segunda semana.**

PSISTEMA SIMPLE																			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
Tanque	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
IHHNV	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	-	++	-	+++	-	-	+++	+++	+	+
PEN	+++	++	++	++	++	+	+++	+	+	+	+	+++	++	++	+	++	+	++	++
Tanque	20	22	23	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
IHHNV	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
PEN	+++	+	+	++	++	+	+	+	++	++	-	+	+	+	+	++	-	+	++
Tanque	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	C+	K							
IHHNV	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+++	-							
PEN	+++	+++	+++	++	++	+	+	+++	+	+	+++	++							

#Muestras: 48

Positivos: 9 (18,7%)

Negativos: 39 (81,3%)

SISTEMA ANIDADADO																			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
Tanque	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
IHHNV	++	+++	-	+++	-	+++	+++	-	+++	-	+++	-	+++	-	-	+++	+++	+++	+++
Tanque	20	22	23	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
IHHNV	+	+++	++	+	+++	++	+	+++	++	++	+	+	+	-	+	-	-	+	-
Tanque	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50		C+		K		C-			
IHHNV	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+++		+++		-		-			

#Muestras: 48

Positivos: 30 (62,5%)

Negativos: 18 (37,5%)

**ANEXO IX. Resultados de los análisis realizados a los animales muestreados durante la tercera semana.**

SISTEMA SIMPLE																			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
Tanque	1	+	-	-	-	+++	+++	-	+++	-	+	+	+++	+	-	+++	+++	-	-
IHHNV	-	+	-	-	+	+++	+++	+++	+++	-	+	+	+++	+	-	+++	+++	-	-
PEN	+++	++	+	++	+++	+++	++	+++	++	++	+++	+++	+++	++	+++	++	++	+	+
Tanque	20	22	23	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	39	40	41
IHHNV	++	+	-	-	-	+	-	++	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+
PEN	+	+	+++	+++	+	+++	++	+	++	++	++	+	+	++	++	+++	+	++	+
Tanque	42	43	44	45	46	47	48	49	50	C+	K								
IHHNV	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	-								
PEN	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++								

#Muestras: 47

Positivos: 18 (38,3%)

Negativos: 29 (61,7%)

SISTEMA ANIDADO																			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
Tanque	1	+++	++	+++	+++	++	+++	++	+++	+++	+++	+++	++	+++	-	++	+++	+++	+++
IHHNV	+++	+++	++	+++	+++	++	+++	++	+++	+++	+++	+++	++	+++	-	++	+++	+++	+++
Tanque	20	22	23	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	39	40	41
IHHNV	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	++	++	++	++	+
Tanque	42	43	44	45	46	47	48	49	50		C+		K		C-				
IHHNV	++	-	-	-	-	-	-	-	++		++		-		-				

#Muestras: 47

Positivos: 39 (82,98%)

Negativos: 8 (17,02%)

**ANEXO X. Resultados de los análisis realizados a los animales muestreados durante la cuarta semana.**

SISTEMA SIMPLE																			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
Tanque	1	++	-	-	-	++	+	-	+++	++	+	+	+++	++	++	++	++	++	+
IHHNV	+	++	-	-	-	++	+	-	+++	++	+	+	+++	++	++	++	++	++	+
PEN	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
Tanque	20	22	23	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	39	40	41
IHHNV	-	+	+	++	+	+	+	+++	++	+	-	-	+	+	-	-	-	+	++
PEN	+++	++	+++	++	++	++	++	+	++	++	++	++	+	++	++	++	++	++	++
Tanque	42	43	44	45	46	47	48	49	50	C+	K	C-							
IHHNV	-	-	-	-	-	-	-	+	-	++	-	-							
PEN	++	++	+++	++	++	++	++	++	++	++	+	-							

#Muestras: 47

Positivos: 28 (59,57%)

Negativos: 19 (40,43%)

SISTEMA ANIDADO																			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
Tanque	1	+++	+++	+	+	++	++	+	+	+++	+++	+++	+++	+	+	+++	+++	+++	+
IHHNV	+++	+++	-	+	+	++	++	+	+	+++	+++	+++	+++	+	+	+++	+++	+++	+
Tanque	20	22	23	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	39	40	41
IHHNV	+	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	++	+++	++	+++	++	+++	+	++	+++
Tanque	42	43	44	45	46	47	48	49	50	C+	K	C-							
IHHNV	+++	-	+	-	-	-	-	++	++	+++	-	-							

#Muestras: 47

Positivos: 41 (87,23%)

Negativos: 6 (12,77%)

## BIBLIOGRAFIA

Alday de Graindorge Victoria. y Flegel T.W., 1999. Diagnosis of Shrimp Diseases: with emphasis on the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). FAO and Multimedia Asia Co., Ltd., all rights reserved.

Bell T.A., and Lightner D.V., 1984. IHHNV virus: Infectivity and Pathogenicity studies in *Penaeus stylirostris* and *Penaeus vannamei*. *Aquaculture* 38, 185-194.

Bonami, J.-R., Trumper, B., Mari, J., Brehelin, M., and Lightner, D. V. 1990. Purification and characterization of the infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus of penaeid shrimps. *J. Gen. Virol.* 71, 2657-2664.

C.W. Dieffenbach, T.M.J. Lowe, and G.S. Dveksler. General concepts for PCR Primer Design. PCR PRIMER. A laboratory manual, p 131-142. Edited by Carl W. Dieffenbach and Gabriela S. Dveksle, 1995.

Cámara Nacional de Acuacultura. 1996. Camarón ecuatoriano: producto de una industria solvente. *Acuacultura del Ecuador* 14: 3-12.

Cámara Nacional de Acuacultura. 1998. *Revista de la Cámara Acuacultura en el Ecuador* 26: 4-10.

De la Rosa Vélez Jorge and Bonami Jean Robert, (2006) Detección molecular de enfermedades virales que afectan el desarrollo del cultivo de camarón. *Hidrobiológica* 3, 275-293.

Dhar Arun K., Roux Michelle M., and Klimpel Kurt R., 2001. Detection and Quantification of Infectious Hypodermal and Hematopoietic Necrosis Virus and White Spot Virus in Shrimp Using Real –Time Quantitative PCR and SYBER Green Chemistry. *Journal of Clinical Microbiology*, 2835-2845.

Jiménez R., Barniol R., de Barniol L. & Machuca M. 1999. Infection of IHHN virus in two species of cultured Penaeid shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone) and *Litopenaeus stylirostris* (Stimpson) in Ecuador during El Niño 1997-98. *Aquaculture Research* 30(9): 695.

Kalagayan, H., Godin, D., Kanna, R., Hagino, G., Sweeney, J., Wyban, J., and Brock, J. (1991). Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus as an etiological factor in runt-deformity syndrome (RDS) of juvenile *Penaeus vannamei* cultured in Hawaii. *J. World Aquacult. Soc.* 22, 235-243.

Lightner D.V. (1996) A Handbook of Shrimp Pathology and Diagnostic Procedures for Diseases of Cultured Penaeid Shrimp. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA.

Lightner D.V. y Pantoja C.R., 2001. Bioseguridad en el cultivo de camarones. Centro Investigación de Ecosistemas Acuáticos (CIDEA).

Lightner, D.V. and R.M. Redman. 1998. Shrimp diseases and current diagnostic methods. *Aquaculture*. 164: 201-220.

Lightner D. V., R.M. Readman, B.T. Poulos, L.M. Nunan, J.L. Mari and K.W. Asno. 1996. *Risk of spread of penaeid shrimp viruses in the Americas by the international movement of live and frozen shrimp*. Review of science and technology of the Office of international Epizootics. 16 (1): 146-160.

M.T. Vahey, M.T.Wong, and N.L. Michael. A standard PCR Protocol: Rapid Isolation of DNA and PCR Assay for  $\beta$ -Globin, p 17-21. PCR PRIMER. A laboratory manual. Edited by Carl W. Dieffenbach and Gabriela S. Dveksler, 1995.

Motte E., Yugcha E., Luzardo J., Castro F., Leclercq G., Rodríguez J., Miranda P., Borja O., Serrano J., Terreros M., Montalvo K., Narváz A., Tenorio N., Cedeño V., Mialhe E., Boulo V., 2003. Prevention of IHNV vertical transmission in the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture* 219, 57-70.

Sambrook J., Fritsch E.F., and Maniatis T., *Molecular cloning. A laboratory manual*. Appendix B: Preparation of Reagents and Buffers Used in Molecular Cloning. Second Edition, p B.9-B.14. Edited by Nina Irwin and Kaaren A. Janssen, 2001.

Sambrook J. and Russell D.W. *Molecular cloning. A laboratory manual*. Dot and Slot Hybridization of Purified RNA. Third Edition. Vol. 1, Chapter 7.46. Edited by Nina Irwin and Kaaren A. Janssen, 2001.

Sánchez Rodríguez I.P. y Saldaña Barrera H.A., 2004. La reacción en cadena de la Polimerasa a dos décadas de su invención. *Ciencia UANL* 3, 323-335.

Shike H., Dhar A.K., Burns J.C., Shimizu C., Jousset F.X., Klimpel K.R. and Bergoin M., 2000. Infectious Hypodermal and Hematopoietic Necrosis Virus of Shrimp is Related to Mosquito Brevidensovirus. *Virology* 277, 167-177.

Tang K.F.J. & Lightner D.V. (2002). Low sequence variation among isolates of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) originating from Hawaii and the Americas. *Diseases of Aquatic Organisms* 49, 93-97.

Yang B., Song X-L., Huang J., Shi C-Y., Liu Q-H. and Liu L., 2006. A single-step multiplex PCR for simultaneous detection of white spot syndrome virus and infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus in penaeid shrimp. *Journal of Diseases* 29, 301-305.

Zhao-Feng Sun, Chao-Qun Hu, Chun-Hua Ren, Qi Shen (2006). Sensitive and rapid detection of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) in shrimps by loop-mediated isothermal amplification. *Journal of Virological Methods* 131, 41-46.

[http://www.asobancos.org.ec/noticias.asp?cod\\_noticia=-1608046808](http://www.asobancos.org.ec/noticias.asp?cod_noticia=-1608046808). Asociación de Bancos Privados del Ecuador (ABPE), 2006. FINANCIAMIENTO AL SECTOR CAMARONERO.

<http://www.ugr.es/~eianez/Biotecnologia/forensetec.htm#21>. Entrala Carmen, 2000.

Técnicas de análisis de ADN en Genética Forense. Laboratorio de ADN forense,

Depto. de Medicina Legal. Universidad de Granada, España.