



**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA
SEDE QUITO
CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA**

**ESTANDARIZACIÓN DE UN PROTOCOLO DE QPCR PARA LA IDENTIFICACIÓN DE
LA ENFERMEDAD DE LA MANCHA BLANCA EN CAMARONES DE PISCINA DE LAS
PROVINCIAS DEL GUAYAS Y MANABÍ**

**Trabajo de titulación previo a la obtención del título de:
INGENIERAS EN BIOTECNOLOGÍA**

AUTOR:

**ROSETO TAMAYO GREISY CAMILA
ZAMORA COROZO ASLY JACKSINY**

TUTOR:

CERNA CEVALLOS MARCO FERNANDO

Quito-Ecuador

2023

**CERTIFICADO DE RESPONSABILIDAD Y AUTORÍA DEL TRABAJO DE
TITULACIÓN**

Nosotras, Asly Jacksiny Zamora Corozo con documento de identificación N° 1752727410 y Greisy Camila Rosero Tamayo con documento de identificación N° 1752438737; manifestamos que:
Somos los autores y responsables del presente trabajo; y, autorizamos a que sin fines de lucro la Universidad Politécnica Salesiana pueda usar, difundir, reproducir o publicar de manera total o parcial el presente trabajo de titulación.

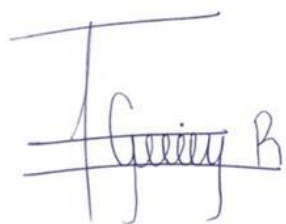
Quito, 8 de agosto del año 2023

Atentamente,



Asly Jacksiny Zamora Corozo

C.I.: 1752727410



Greisy Camila Rosero Tamayo

C.I.: 1752438737

**CERTIFICADO DE CESIÓN DE DERECHOS DE AUTOR DEL TRABAJO DE
TITULACIÓN A LA UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA**

Nosotras, Asly Jacksiny Zamora Corozo con documento de identificación N° 1752727410 y Greisy Camila Rosero Tamayo con documento de identificación N° 1752438737, expresamos nuestra voluntad y por medio del presente documento cedemos a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que somos autores del Trabajo experimental: “Estandarización de un protocolo de qPCR para la identificación de la enfermedad de la mancha blanca en camarones de piscina de las provincias del Guayas y Manabí”, el cual ha sido desarrollado para optar por el título de: Ingenieras en Biotecnología, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En concordancia con lo manifestado, suscribimos este documento en el momento que hacemos la entrega del trabajo final en formato digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.

Quito, 8 de agosto del año 2023

Atentamente,

Asly Jacksiny Zamora Corozo

C.I.: 1752727410

Greisy Camila Rosero Tamayo

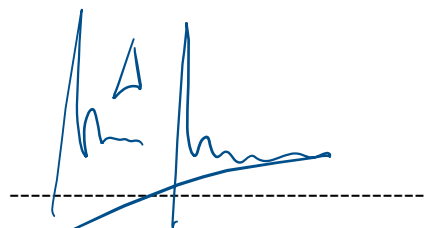
C.I.: 1752438737

CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, Marco Fernando Cerna Cevallos con documento de identificación N° 0501872071, docente de la Universidad Politécnica Salesiana, declaro que bajo mi tutoría fue desarrollado el trabajo de titulación: ESTANDARIZACIÓN DE UN PROTOCOLO DE QPCR PARA LA IDENTIFICACIÓN DE LA ENFERMEDAD DE LA MANCHA BLANCA EN CAMARONES DE PISCINA DE LAS PROVINCIAS DEL GUAYAS Y MANABÍ, realizado por Asly Jacksiny Zamora Corozo con documento de identificación N° 1752727410 y Greisy Camila Rosero Tamayo con documento de identificación N° 1752438737, obteniendo como resultado final el trabajo de titulación bajo la opción Trabajo experimental que cumple con todos los requisitos determinados por la Universidad Politécnica Salesiana.

Quito, 8 de agosto del año 2023

Atentamente,



Ing. Marco Fernando Cerna Cevallos, PhD.

C.I.: 0501872071

DEDICATORIA

A Dios por nunca desampararme en ningún momento de mi vida y carrera universitaria. A mis padres Marleidy Tamayo y Carlos Castillo. A mi familia en general, amigos y novio por el apoyo e impulso para cumplir con todos mis sueños y metas. Al Dr. Galo Leoro, Mcs. Yanira Montalvo, PhD Marco Cerna por estar presentes guiándome de la mejor manera, para culminar este trabajo de titulación.

Greisy Rosero

A Dios por haber guiado el camino de mi vida y carrera con su sabiduría y fortaleza. A mi mami Rosa Corozo, mi papi Elías Zamora y hermano Mike Zamora. A mis amigos y todos aquellos que fueron parte de este gran sueño. Al Dr. Galo Leoro, Mcs. Yanira Montalvo y Marco Cerna PhD por ser la guía indiscutible para que este trabajo finalizara.

Asly Zamora

AGRADECIMIENTOS

Agradezco este trabajo en primer lugar a Dios, por permitirme llegar hasta este momento tan importante de mi vida personal y profesional. A mis padres Marleidy Tamayo y Carlos Castillo que han sido el pilar fundamental de todos mis logros con su apoyo incondicional. A mi abuela Rosalba Barrera por sus cuidados, su amor y su entrega durante toda mi vida. A mis tíos Francely Tamayo y Carlos Gómez por sus consejos y aportes en mi trayecto estudiantil. A mi novio Erick Sambache, por su apoyo durante todos mis años de carrera, por sus consejos y por su amor. A mi mejor amigo Ricky que ha estado acompañándome en todo momento de mi carrera.

Al Dr. Galo Leoro dueño del laboratorio INMUNOLAB, por el apoyo, guía, enseñanzas y consejos en la realización de todo este trabajo de titulación.

A la Mcs. Yanira Montalvo, por su colaboración, paciencia, guía, enseñanzas y consejos durante el transcurso de la realización de dicho trabajo de titulación.

Al PhD. Marco Cerna, por ser mi tutor del trabajo de titulación, enseñanzas, guía y consejos.

A mi amiga y compañera Asly Zamora, por ser una excelente pareja de trabajo, por su apoyo incondicional y todos sus aportes para poder culminar este trabajo de titulación.

A mi amigo y compañero Thomas Leoro, por ser el amparo de este trabajo de titulación, ya que sus aportes fueron fundamentales para poder culminarlo.

A mis amigas y compañeras Pamela Padilla y Karen Talavera, por su amistad, calidad humana y presencia durante toda mi carrera universitaria.

Finalmente agradezco a todas las personas que brindaron su ayuda en este trabajo de titulación.

Greisy Rosero

Primeramente, un agradecimiento a Dios por ser el motor que me dio la fuerza para poder culminar este camino universitario. A mi mami Rosa la cual siempre ha sido mi ejemplo que seguir, mi paño de lágrimas, una amiga incondicional, y el cofre de secretos que toda hija debería tener. A mi padre por ser el apoyo incondicional en todo momento, velando por mí y todos en el hogar. A mi hermano Mike por ser la persona que me impulsa a ser mejor y por quien doy siempre mi mayor esfuerzo.

Al Dr. Galo Leoro dueño del laboratorio INMUNOLAB, por el apoyo desinteresado, guía, enseñanzas y consejos en la realización de todo este trabajo. A la Mcs. Yanira Montalvo, por su colaboración, paciencia, guía, enseñanzas y consejos que fueron de suma importancia durante todo el desarrollo experimental. Al PhD. Marco Cerna, por ser mi tutor y docente por toda esta carrera, del cual he aprendido muchas cosas que me sirven y servirán a lo largo de mi vida profesional.

A mi amiga y compañera Greisy Rosero, por ser una gran compañera de tesis y una amiga con la cual a pesar de las diferencias hemos logrado sacar adelante este trabajo y nuestra amistad.

A mi amigo y compañero Thomas Leoro, por ser uno de los que hizo posible la realización de este trabajo, además de ser una de las personas con las cuales inicié este sueño de ser ingeniera.

A mi amiga y compañera Pamela Padilla, la cual con sus consejos ha logrado sacar la mejor versión de mí, y como siempre le he dicho ella es una luz en la vida de la persona a la cual llegue.

A mi amiga y compañera Karen Talavera, con la cual he compartido un sin fin de experiencias y tus abrazos desde primer semestre. Gracias por darme la confianza de ser tu vicepresidenta.

A mis amigos del baloncesto Thais, Abner, Giss, Diana y tantos más que hicieron de mis tiempos libres algo excepcional e imposible de olvidar. También a mis amigos de carrera como Cristina, Anita, Jorge, Israel, Andrea y muchos más que hicieron parte de todo este proceso.

Finalmente agradezco a todos los docentes que cruzaron por mi camino y aportaron con todo su conocimiento.

Asly Zamora

Resumen

El presente trabajo de titulación tuvo el propósito de realizar la estandarización de un protocolo de qPCR para la identificación de la enfermedad de la mancha blanca en camarones de piscina de las provincias del Guayas y Manabí, se emplearon muestras positivas de camarón que presentaban signos y síntomas característicos de la enfermedad de interés, a su vez se tomaron muestras directamente de las piscinas de las provincias mencionadas. Los procedimientos que se realizaron fueron la extracción del ADN de cada individuo por diferentes métodos; la cuantificación de ADN por *Qubit* y *NanoDrop*; la evaluación de la integridad del ADN mediante electroforesis en gel de agarosa; evaluación y selección de *primers*; la amplificación por qPCR y la evaluación del protocolo. Los resultados obtenidos indican que, se logró estandarizar adecuadamente el protocolo para la identificación de la enfermedad de la mancha blanca, el cual se evaluó con una prueba de diluciones para conocer la sensibilidad del protocolo en el análisis de esta enfermedad que presentan los camarones de piscinas. Por lo tanto, se concluye que es posible la detección de mancha blanca haciendo uso de un protocolo de qPCR.

Palabras clave: ADN, amplificación, extracción, mancha blanca, análisis.

Abstract

The present thesis work had the purpose of carrying out the standardization of a qPCR protocol for the identification of white spot disease in shrimp farms in the provinces of Guayas and Manabi. Positive samples of shrimp exhibiting characteristic signs and symptoms of the disease of interest were used, along with samples taken directly from the pools of the mentioned provinces. The procedures that were carried out were the extraction of the DNA of each sample by different methods; DNA quantification by Qubit and NanoDrop; evaluation of DNA integrity by agarose gel electrophoresis; evaluation and selection of primers; qPCR amplification and protocol evaluation. The results obtained indicate that it was possible to adequately standardize the protocol for the identification of the white spot disease, which was evaluated with a dilution test to know the sensitivity of the protocol in the analysis of this disease presented by pool shrimp. Therefore, it is concluded that White spot detection is possible using a qPCR protocol.

Keywords: *DNA, amplification, extraction, white spot, analysis.*

Índice de contenidos

1	Introducción.....	1
2	Fundamentación teórica.....	2
2.1	Camarón	2
2.1.1	Taxonomía del camarón.....	2
2.1.2	Morfología	2
2.1.3	Ciclo de vida y condiciones del hábitat	4
2.1.4	Ciclo de cultivo	6
2.1.5	Enfermedades que afectan a los camarones	9
2.1.6	Importancia en el Ecuador (especies cultivadas)	11
2.2	Mancha Blanca	12
2.2.1	Taxonomía de WSSV.....	12
2.2.2	Generalidades de la mancha blanca	13
2.2.3	Morfología y morfogénesis.....	13
2.2.4	Mecanismos de transmisión y órganos de destino	15
2.2.5	Signos y síntomas de la mancha blanca	16
2.2.6	Registro de mancha blanca en Ecuador	17
2.3	Métodos de diagnóstico.....	18
2.3.1	Diagnóstico clínico	18
2.3.2	Diagnóstico histopatológico.....	18
2.3.3	Técnicas inmunológicas	19
2.3.4	Técnicas moleculares	19

3	Materiales y métodos	22
3.1	Obtención de muestras	22
3.1.1	Delimitación de las zonas de estudio	22
3.2	Extracción de ADN	23
3.2.1	Bio Basic kit de mini preparación de ADN de suelo con columna giratoria EZ-10....	23
3.2.2	<i>One-Tube Tissue DNA Extraction Kit</i>	25
3.2.3	<i>Viasure RNA-DNA Extraction Kit</i>	26
3.2.4	Método in house.....	28
3.2.5	Método de la OIE.....	29
3.2.6	Cuantificación de ADN.....	31
3.2.7	Evaluación de la integridad del ADN	33
3.3	Evaluación de <i>primers</i>	34
3.3.1	Selección de <i>primers</i>	34
3.3.2	Análisis de <i>primers</i>	35
3.4	Amplificación por qPCR.....	35
3.4.1	Primer método.....	36
3.4.2	Segundo método.....	37
3.4.3	Tercer método	38
3.5	Evaluación del protocolo qPCR	38
4	Resultados esperados y discusión.....	40
4.1	Obtención de muestras	40
4.2	Extracción de ADN	41

4.2.1	Cuantificación de ADN.....	41
4.2.2	Evaluación de la integridad del ADN	44
4.3	Evaluación de <i>primers</i>	45
4.3.1	Análisis de <i>primers</i>	45
4.4	Amplificación por qPCR.....	47
4.5	Evaluación del protocolo qPCR	49
5	Conclusiones y recomendaciones	53
6	Bibliografía.....	55

Índice de figura

Figura 1. Anatomía externa del camarón	3
Figura 2. Ciclo de vida del camarón	6
Figura 3. Ciclo de cultivo del camarón	9
Figura 4. Estructura de WSSV	14
Figura 5. Infección de WSSV	17
Figura 6. Proceso de Bio Basic kit de mini preparación de ADN de suelo con columna giratoria EZ-10.....	24
Figura 7. Proceso de One-Tube Tissue DNA Extraction Kit.....	26
Figura 8. Proceso de Viasure RNA-DNA Extracción Kit	28
Figura 9. Método in house	29
Figura 10. Método de la OIE	31
Figura 11. Secuencias de primers del gen VP664.....	34
Figura 12. Secuencias de primers del genoma completo	35
Figura 13. Diluciones realizadas de la muestra positiva.....	39
Figura 14. Muestras obtenidas con rotulación respectiva	40
Figura 15. Visualización de la integridad por electroforesis.	45
Figura 16. Resultados de la amplificación por qPCR con el protocolo in house.....	49
Figura 17. Resultados del protocolo de qPCR sin pre-amplificación.....	50
Figura 18. Resultados del protocolo de qPCR con pre-amplificación.....	51
Figura 19. Electroforesis de las diluciones del control positivo	52

Índice de tablas

Tabla 1. Resumen de los métodos para la amplificación por qPCR	36
Tabla 2. Cuantificación por <i>Qubit</i>	43
Tabla 3. Cuantificación por <i>Nanodrop</i>	44

Índice de anexos

Anexo 1. Convenio específico entre Laboratorio Clínico e Inmunológico Inmunolab y la Universidad Politécnica Salesiana para favorecer el desarrollo de trabajos de titulación por parte de estudiantes del nivel de grado de la UPS.	66
Anexo 2. Resultados obtenidos de F del análisis en <i>OligoAnalyzer</i>	74
Anexo 3. Resultados obtenidos de R del análisis en <i>OligoAnalyzer</i>	75
Anexo 4. Resultados obtenidos de 2F del análisis en <i>OligoAnalyzer</i>	76
Anexo 5. Resultados obtenidos de 2R del análisis en <i>OligoAnalyzer</i>	77

1 Introducción

Ecuador es un país que cuenta con una gran variedad de riquezas naturales y de industrias, enfocadas en el sector agrícola, acuícola, ganadero y más (Arias & Torres, 2019). Uno de los sectores más importantes para el país es el camaronero que representa el 40% de las exportaciones, al ser el camarón ecuatoriano considerado uno de los mejores por su buena calidad, generando así una economía estable para el país (Gonzabay et al., 2021).

Una de las mayores problemáticas que presenta el cultivo de camarón son las enfermedades como mancha blanca (WSSV), necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa (IHHNV), síndrome de Taura (TSV-), entre otros (Gonzabay et al., 2021). Siendo el Virus del Síndrome de la Mancha Blanca perteneciente a la familia Nimaviridae, uno de los de mayor interés dentro de la industria camaronera, debido a la una gran facilidad de dispersión y contagio (Hernández, 2012; Mejías & Navarro, 2010). La llegada de este virus a Ecuador fue reportada en 1999, afectando la producción de camarón hasta en un 20% de las producciones totales (Gonzabay et al., 2021).

Para la identificación de la mancha blanca se ha usado diferentes análisis y/o diagnósticos clínicos, de laboratorio, histopatológico, inmunocromatográfica y técnicas moleculares como es la qPCR, la cual ha sido de gran importancia para detección de este y otros virus, ayudando en el ahorro de tiempo y dinero (Cuéllar, 2013; Fadilah & Fasya, 2022).

Es así como el siguiente trabajo de titulación estuvo enfocado a la estandarización de un protocolo de qPCR para la identificación de la enfermedad de la mancha blanca en camarones de piscina de las provincias de Guayas y Manabí. Para la realización de este protocolo primero fue necesario la obtención de muestras de camarones de dos piscinas de la provincia del Guayas y dos de Manabí, para posteriormente realizar la extracción de ADN que sirvió para la técnica molecular qPCR. Además, se realizó una evaluación los *primers* que permitió la correcta identificación de la mancha blanca, para finalmente hacer una evaluación final del protocolo donde se comprobó su viabilidad como una prueba de identificación de nuestro del virus de interés.

2 Fundamentación teórica

2.1 Camarón

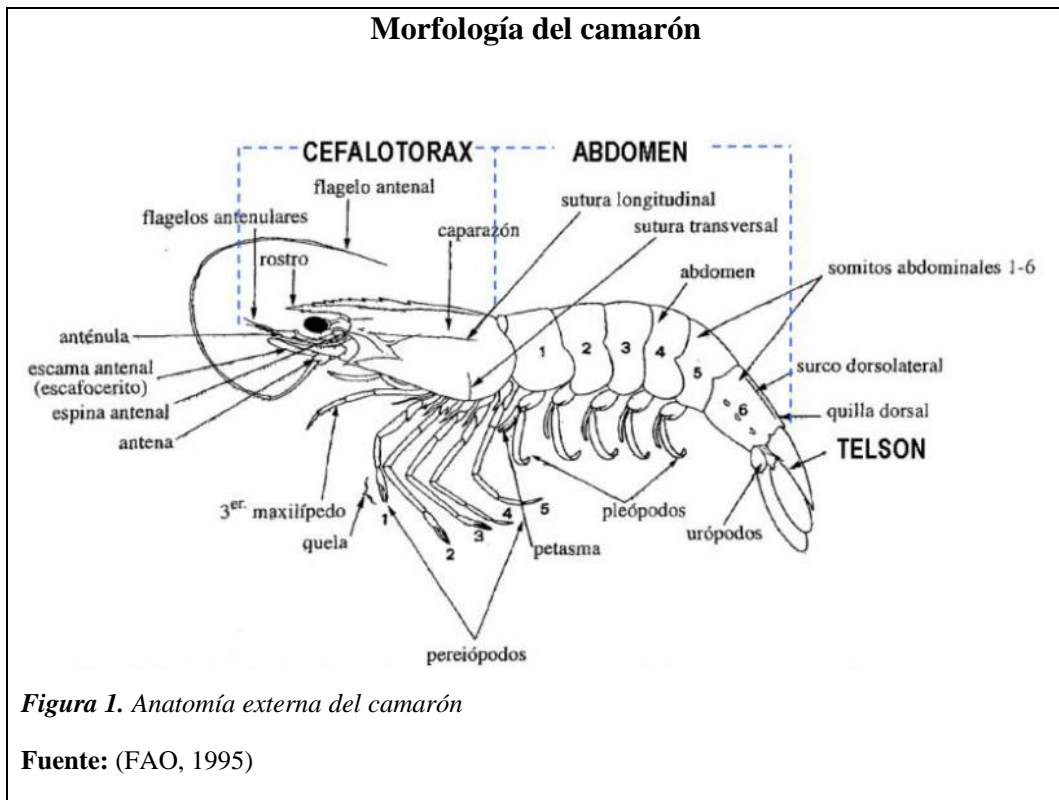
El camarón es un crustáceo decápodo que cuenta con aproximadamente 240 especies diferentes en los océanos, así como una gran variedad en agua dulce, además, son considerados como cucarachas marinas al ser su alimentación a partir de la basura del mar (López, 2018).

2.1.1 Taxonomía del camarón

Según Gutiérrez, (2004) y Rudolph, (2002) el camarón pertenece al reino Animalia; phylum Arthropoda; clase Crustácea; orden Decápoda y familia *Penaeidae*.

2.1.2 Morfología

La morfología del camarón puede variar dependiendo de cada especie, debido a que tienen algunas particularidades como el color o tamaño, sin embargo, todas las especies van a contar con una misma estructura en donde su cuerpo está dividido en 2 partes como se observa en la **Figura 1**. Según Boschi & Angelescu, (1982) y García et al., (2012) una de las partes es el cefalotórax que es donde se ubican una gran parte de los órganos como las branquias, el sistema digestivo y el corazón, además, se encuentran 2 pares de antenas o también conocidas como anténulas que son largas, llegando a sobrepasar la longitud del cuerpo del camarón y cumplen una función sensorial y en este mismo lugar se encuentran las mandíbulas maxilas que ayudan a recoger el alimento que van a ingerir **Figura 1**. Según los mismos autores la otra parte que compone al camarón es el abdomen que es una parte muscular donde se ubican 5 pares de patas o pleópodos que ayudan en la natación de los camarones, y un último par de estos pleópodos que tiene una característica aplanada que son denominados urópodos **Figura 1**.



Por cómo están distribuidas las patas de los camarones se considera que los decápodos, en general poseen 10 pares de patas que son especializadas para cumplir con diferentes funciones (Jiang & Chan, 2021).

De acuerdo con las características que presentan los crustáceos decápodos, los 6 segmentos cefálicos y los 8 torácico se unen en una sola sección, en donde también se ubican los 13 pares de apéndices, es decir, los 5 cefálicos que constan de 2 antenas y 3 mandíbulas y los 8 torácicos que constan de 3 maxilípedos y 5 pereiópodos; el abdomen tiene 6 segmentos en donde cada uno consta de un par de apéndices; los apéndices se pueden dividir en 4 tipos dependiendo su morfología que son: simples, subquelados, quelados y carpoquelados (Boschi & Angelescu, 1982; García et al., 2012).

Los camarones a su vez cuentan con un caparazón que es articulado de quitina, que también es considerado como una cáscara gruesa la cual provee protección a las branquias que tiene la función de obtener oxígeno, como su exoesqueleto es duro y resistente, esto le ayuda en la protección de la parte interna en donde se encuentra la carne (Moore, 2023).

Por otro lado, es importante destacar el tamaño de los camarones, ya que estos son pequeños, pero pueden llegar a medir hasta 20cm de longitud según la especie, además, sus colores pueden variar entre morado, rosado, blanco o semitransparentes (Ibrahim et al., 2023).

2.1.3 Ciclo de vida y condiciones del hábitat

Dentro de la descripción del camarón es de gran importancia tomar en cuenta el ciclo biológico del mismo en donde influye la luz, la temperatura y la salinidad para su desarrollo, por lo cual son parámetros de gran relevancia para la producción de este. Según Conde, (2019) y Saúl, (2021) el ciclo de vida se divide en varias etapas, iniciando con la etapa larval que empieza desde que los huevos eclosionan y pasa por los diferentes estadios de las larvas, empezando con el nauplio que es donde las larvas miden aproximadamente 0,3 milímetros siendo estas periformes, que constan de penachos que les ayuda a nadar, dando lugar a que luego se formen los apéndices, además en este estadio también se pueden apreciar 2 furcas que dan origen a la cola; proseguimos con zoea en donde las larvas tienen una característica alargada y su rostro es inclinado hacia abajo, un tamaño de 1 milímetro aproximadamente y poseen la capacidad de alimentarse de algas que están presente en el plancton que flota en el mar, por otro lado, en este estadio en su estructura física se pueden apreciar los 5 pares de apéndices, los cuales a partir de los 2 primeros pares se desarrollarán pinzas, que de a poco van a ir creciendo; finalmente está *mysis* donde la larva crece tomando un tamaño de hasta 4 milímetros y aquí empieza a tomar una forma curva, por otra parte, empiezan a buscar la luminosidad dentro del agua por instinto para su desarrollo y su forma de nadar empieza a ser muy particular, debido a que contraen su cuerpo para poder tomar impulso y avanzar **Figura 2**.

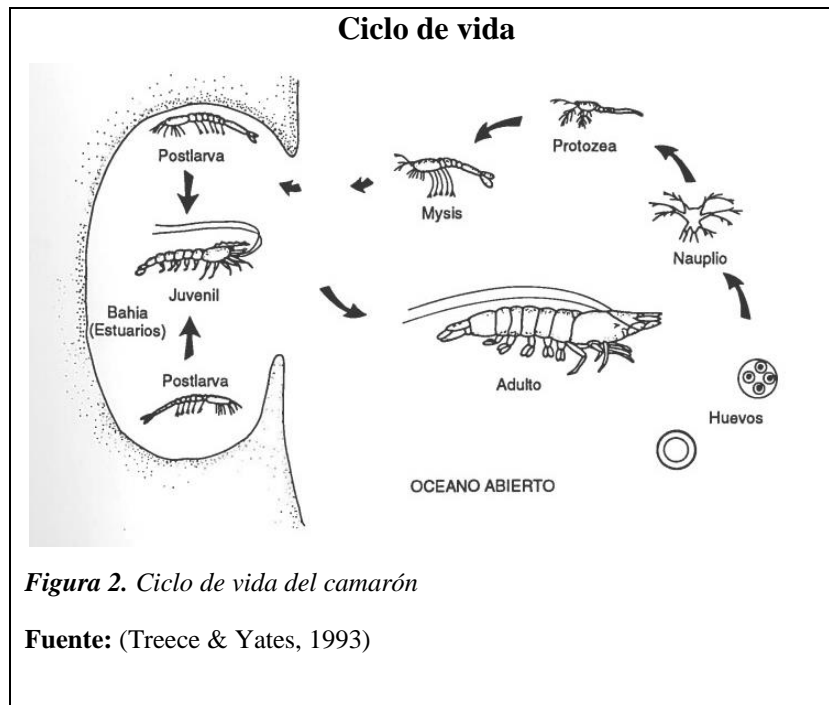
Continuamos con la etapa postlarva **Figura 2**, en donde la larva tiene una apariencia física es muy parecida a un camarón adulto y se pueden observar que las pinzas han sido desarrolladas para la toma del alimento y para culminar con la etapa adulta en donde el camarón ha culminado completamente

su desarrollo, y se pueden diferenciar los 5 pares de apéndices, el caparazón, la cola, el flagelo, las anténulas y antenas (Rajesh, 2021).

En cuanto a las condiciones, para que el desarrollo de los camarones sea bueno, se debe tomar en consideración los requerimientos ambientales de su hábitat natural, dependiendo de las diferentes etapas del ciclo de vida, por lo cual es importante tener en cuenta factores como la temperatura, salinidad, sustrato y oxígeno (Rajesh, 2021)

Dentro de la temperatura y la salinidad los camarones se pueden dividir en dos grupos: Los camarones de aguas tropicales requieren temperaturas mayores a 20°C, teniendo un correcto desarrollo entre 26-32°C, pero esto va a ir en relación con la etapa de desarrollo en la que se encuentre, debido a que las larvas tienen un óptimo desarrollo entre 25-30°C y una salinidad del 28-25%, por otro lado, las post larvas pueden soportar cambios a estos rangos de temperatura en un rango de 18-35°C y una salinidad de hasta el 40%; los camarones de aguas templadas sobreviven en temperatura de agua entre 18-22°C, en donde las larvas deben desarrollarse a temperaturas menores a 20°C y las post larvas sobreviven a una temperatura de hasta 26°C y la salinidad debe ser menor al 16% en todo su proceso, ya que en caso contrario podría llegar a ser letal (Fenucci, 1988).

El sustrato se refiere al tipo de material por el cual está constituido el medio ambiente de su hábitat, por lo cual los camarones suelen vivir en fondos blancos de fango, que está compuesto por distintos fragmentos de arena, limo y arcilla, siendo la concentración que está presente en el agua es de gran importancia, ya que cuando existe una concentración por debajo de los 0,3mg/L se puede ocasionar una alta mortalidad de la población de los cultivos, siendo su concentración óptima para un crecimiento normal de 4.0mg/L (Flowen, 2020).



2.1.4 Ciclo de cultivo

El cultivo de camarón o producción de este para la comercialización y exportación se da en ambientes naturales o seminaturales y tiene tres fases principales, las cuales son: maduración y reproducción, desove y cría desde huevo a post larva y el engorde de las post larvas hasta llegar a tener un tamaño comercial (Montgomery, 2010).

Empezando con la maduración y reproducción **Figura 3**, en esta fase se da el proceso por el cual las hembras y los machos generan sus órganos genitales, siendo en el caso de las hembras que cuando los ovarios ya están maduros estos son desovados y se pueden observar de un color verde rojizo con una característica flácida y cremosa, mientras que, en los machos cuando los espermatóforos están maduros las coxas del 5to par de pereiópodos llegan a tener una coloración verde (Beijnen, 2009).

Esta fase va a estar regulada por algunos factores ambientales en donde se toma en cuenta la temperatura y la luz del fotoperiodo, por otro lado, también es importante la alimentación y los factores hormonales; iniciando con que la temperatura para la maduración y reproducción debe estar entre 18-28°C, aunque este rango puede llegar a variar dependiendo de las especies que se encuentren en producción, y en el caso de la luz que se le debe proporcionar a las hembras maduras es entre 10-

40% de luz natural tenue o brillante, con un fotoperiodo de 8-13 horas de luz; en cuanto a la alimentación que le es proporcionada a los camarones, debe contar principalmente con ácidos grasos derivados de la linolénica, colesterol y sus derivados, que les va a permitir tener una maduración gonadal con mayor éxito, las raciones que se les debe suministrar por día son entre 2-4 dependiendo del 3-17% de la biomasa del estanque; los factores hormonales de los crustáceos dependen de los pedúnculos oculares del cerebro que produce hormonas, a partir de células nerviosas que ayudan en el correcto funcionamiento y desarrollo del crecimiento, metabolismo en general, muda, equilibrio osmótico, entre otros (Fenucci, 1988).

Se prosigue con la etapa de desove y cría desde huevo a post larva como se muestra en la **Figura 3**, donde es necesario tener una cantidad significativa de hembras maduras que hayan sido impregnadas de la naturaleza, para que posteriormente desoven entre 18-48 horas después de su captura; los huevos que son obtenidos son trasladados a tanques, donde un ves que estos eclosionan, las larvas deben tener una alimentación con fitoplancton y posterior con zooplancton; cuando las larvas alcanzan los estadios de post larva, se trasladan a otros estanques que son denominados precriaderos o versarios, teniendo en cuenta una densidad de 150 animales/m² y son alimentados con alimentos preparados o molidos (Sun et al., 2023).

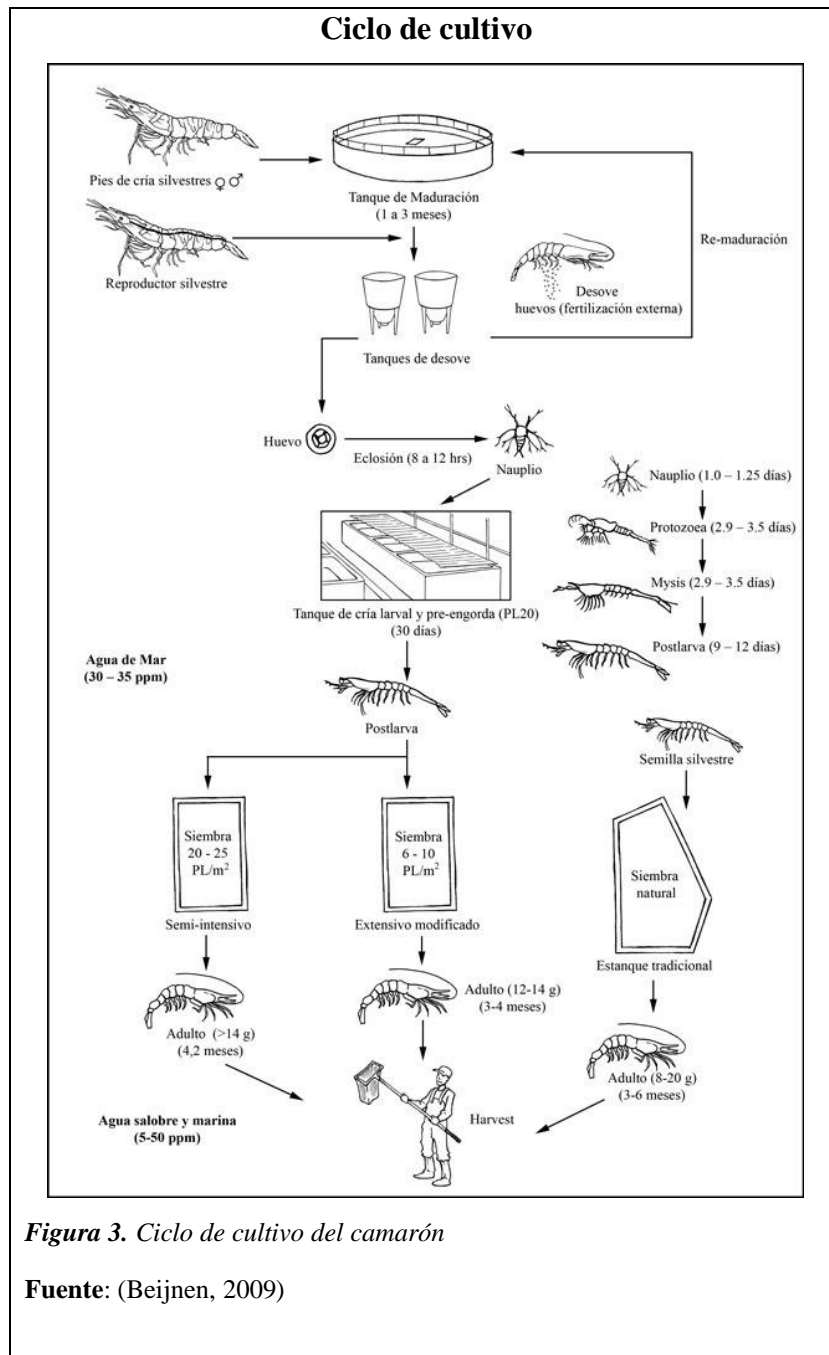
Dentro de esta fase los estanques son abonados y fertilizados, se deben realizar cambios del cambio a partir de combas y se debe llevar el control de variables ambientales como son la temperatura, salinidad, oxígeno disuelto, pH, entre otros (Fenucci, 1988).

Finalmente está la etapa de engorde de las post larvas **Figura 3**, que cuando pesan entre 1-3g son transferidas a tanques de engorde que cuentan con una mayor dimensión, en donde pueden alcanzar el tamaño deseado entre 18-25g y dentro de los estanques de engorde es importante el análisis del bombeo de agua, el oxígeno disuelto, la temperatura, salinidad, pH, entre otros (Bertsch, 2023).

Para que el ciclo de cultivo tenga una buena eficiencia se deben tener en cuenta las condiciones que debe tener el área establecida para la producción de camarón; es indispensable tener agua dulce y

salada que no estén contaminadas con patógenos externos, las temperaturas deben ser adecuadas dependiendo si se trata de especies tropicales que no debe descender de los 20°C y el agua de las especies de agua templada puede llegar a variar entre 7-24°C; por otro lado, es importante mencionar factores que sirven para dar una buena calidad al suelo en donde se van a desarrollar los camarones, tomando en consideración la permeabilidad del suelo que debe tener una proporción del 70% de arena, 25% de arcilla en relación con el escurrimiento del agua que debe ser menor al 5% diario y no llegando a superar el 15%; el pH del suelo debe ser de 4, debido a que si este llega a ser inferior se presentara la muerte de camarones por estos y poca productividad (Fenucci, 1988).

Con respecto al llenado de los estanques estos deben tener una provisión de agua por bombeo o por diferencia de mareas, teniendo un reservorio; los estanques deben tener entre 1,5-2 metros de profundidad dependiendo el ancho con respecto al flujo de agua (Benchmark, 2022).



2.1.5 Enfermedades que afectan a los camarones

El cultivo en donde se da la producción de camarón puede verse seriamente afectado por diversas amenazas como lo son las infecciones que se presenta en su ecosistema, en donde se debe destacar la presencia de enfermedades que deben tener una mayor atención por parte del personal encargado de su producción y mantenimiento; las propagaciones virales pueden llegar a ocasionar desastres innumerables como la pérdida de negocios y su vez pérdidas económicas por la mortalidad que llegan

a causar las enfermedades, debido a que las infecciones pueden llegar a variar en gran escala en su propagación dentro de las piscinas y contaminar regiones enteras; dentro de las enfermedades que existen actualmente son 9, que han sido declaradas con notificación obligatoria por la Organización Mundial de Sanidad animal (OIE), de las cuales 8 pertenecen al código acuático (Saúl, 2019).

Las enfermedades generan complejas problemáticas en el cultivo de camarones, ya que aún se desconocen detalles de estas, por lo cual se debe verificar constantemente la calidad en la que se encuentra las piscinas de producción de camarón, aquí es clave el manejo y la nutrición que es empleada en su desarrollo, ya que es importante para el control de enfermedades (Hays, 2020; Lee et al., 2022).

De dichas enfermedades se deben destacar las que mayor tienen incidencia dentro de la producción de camarón a nivel mundial, como son: virus de la mancha blanca o también conocido como white spot syndrome virus (WSSV), virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa (IHHNV), virus de la cabeza amarilla (YHV), virus de la mionecrosis infecciosa (IMNV) y el virus del síndrome de Taura (TSV) (Lee et al., 2022; Ramraj, 2019).

Resaltando que la mancha blanca (WSSV), es la enfermedad del camarón que ha tenido mayor incidencia dentro de las camaroneas de Ecuador principalmente en la zona costera, por lo cual dicha enfermedad tiene gran interés por parte de la acuicultura, en donde se han visto obligados a buscar alternativas para su control y manejo, evitando la mortalidad en gran masa y así mismo las pérdidas económicas que le podrían generar al país, ya que cuando los camarones presentan alguna enfermedad no son aptos para la comercialización, ni para su exportación al no cumplir con los parámetros de calidad y sanidad que debería tener el producto, debido a esto se estima que es necesario el análisis y detección temprana de la enfermedad de la mancha blanca (WSSV) para poder tomar las medidas correspondientes y no causar mayores pérdidas (Dey et al., 2019; Saúl, 2019).

Gracias a los avances tecnológicos los cultivadores de camarón han tenido un gran avance en casi todos los aspectos de la producción, como por ejemplo en el control de calidad del agua, en la

eliminación de patógenos y en la mejora de los balanceados para la nutrición, ya que en los últimos años este presenta una buena calidad, por lo cual la producción de post larvas ha sido exitosa, aunque la supervivencia de estas no quiere decir que llegue a tener una excelente calidad, es por ello que los criaderos deben asegurarse de cumplir con los correctos protocolos de crianza (Held, 2022; Lee et al., 2022).

2.1.6 Importancia en el Ecuador (especies cultivadas)

La producción de camarón es de gran importancia para Ecuador, debido a que representa uno de los más rentables ingresos económicos para el país, teniendo sus inicios en 1968 y alcanzando una expansión industrial en 1970, por lo cual es una actividad que lleva más de 50 años aproximadamente, que con el pasar de los años ha logrado tener un gran avance en el desarrollo técnico productivo enfocado a las áreas de cultivo, comercio y en la exportación de camarón (Kim, 2022; Piedrahita, 2018).

Por otro lado, la producción de camarón en Ecuador es importante, debido a que la zona costera cuenta con las condiciones necesarias para permitir el óptimo desarrollo de algunas especies de camarón blanco, rojo y café; destacando que las especies que se encuentran en cultivo son las siguientes *Protrachypene precicua* (Camarón pomada), *Litopenaeus vannamei* (Camarón blanco tipo langostino), *Litopenaeus stylirostris* (Camarón blanco tipo langostino), *Litopenaeus occidentalis* (Camarón blanco tipo langostino), *Farfantepenaeus californiensis* (Camarón café tipo langostino) y *Farfantepenaeus brevirostris* (Camarón rojo); estas especies son de gran relevancia para su producción, ya que al tener un buen desarrollo alcanzan a poseer características integrales para su comercialización y exportación; las características que son tomadas en cuenta son el tamaño, el color, el olor, entre otras (Macusi et al., 2022; Varela et al., 2017)

2.2 Mancha Blanca

La mancha blanca es una enfermedad que está producida por el virus de la mancha blanca o white spot syndrome virus, con sus siglas WSSV, la cual produce una alta mortalidad en un corto periodo de tiempo de camarones juveniles o que se encuentren en la etapa de postlarvas (Cuéllar, 2013). Es un virus de gran interés en la industria camaronera por las grandes pérdidas que puede ocasionar dentro de la misma, en periodos de tiempo que comprenden entre los 3 a 7 días una vez que hayan aparecido los primeros síntomas (Mejías & Navarro, 2010).

Por otra parte, es importante mencionar que la primera infección documentada de este virus fue reportada en 1966 en una especie de cangrejo, sin embargo, el primer diagnóstico en cultivo de camarón fue en China y Japón durante el año de 1992, y ya para 1995 llega al continente americano como resultado de un mal manejo de estas especies acuáticas, para finalmente en 1999 ser reportada por primera vez en Sudamérica y Centroamérica (Instituto Nacional de Pesca, 2018).

2.2.1 Taxonomía de WSSV

Este es un virus que ha sido descrito con una variedad de nombres, siendo algunos de ellos; virus de la necrosis baculoviralhipodérmica y hematopoyética con las siglas HHNBV, baculovirus asociado al virus de la mancha blanca con las siglas WSBV, y más (Del Rosario, 2004). Siendo este último ejemplo el cual fue tomado como referencia para asignar al virus dentro de la subfamilia Nudibaculoviridae, la cual acoge a los baculovirus que no han sido ocluidos en la familia Baculoviridae (Del Rosario, 2004). Sin embargo, ICTV canceló esta clasificación dejando al virus sin asignación, para posteriormente basándose en el genoma del virus proponer una nueva familia llamada Nimaviridae, para finalmente, en reportes del 2002 de ICTV incluir al virus dentro del género de Whispovirus, basándose nuevamente en la información recabada del genoma, estructura, morfología y más (López, 2020). Siendo así que la clasificación del virus queda de la siguiente manera basándose en lo propuesto por Del Rosario, (2004) y López, (2020) tomando en cuenta que hay

ubicaciones inciertas (*incertae sedis*) dentro de algunas partes de la clasificación, empezando así con el reino Virus; grupo *incertae sedis*; clase Naldaviricetes; subclase *incertae sedis*; superorden *incertae sedis*; orden *incertae sedis*; familia Nimaviridae y género Whispovirus.

Otro dato para mencionar dentro de la categorización taxonómica del virus de la mancha blanca es el hecho de que puede ser determinada caracterizando la secuencia genética y las proteínas estructurales de la cepa de estudio (Islam et al., 2022).

2.2.2 Generalidades de la mancha blanca

El virus de la mancha blanca es un virus de ADN que presenta doble cadena de forma elíptica, una forma bacilar y una membrana de características trilaminar, además, los viriones presentan un tamaño que va de 80 a 120 nm por 250 a 380 nm (Del Rosario, 2004; López, 2020).

Además, es importante mencionar que este virus no tiene la capacidad de infectar a los humanos, ya que, encuentra las marcadas diferencias presentes entre los tejidos de los camarones y humanos, por lo cual no representa un mayor riesgo (Mejías & Navarro, 2010).

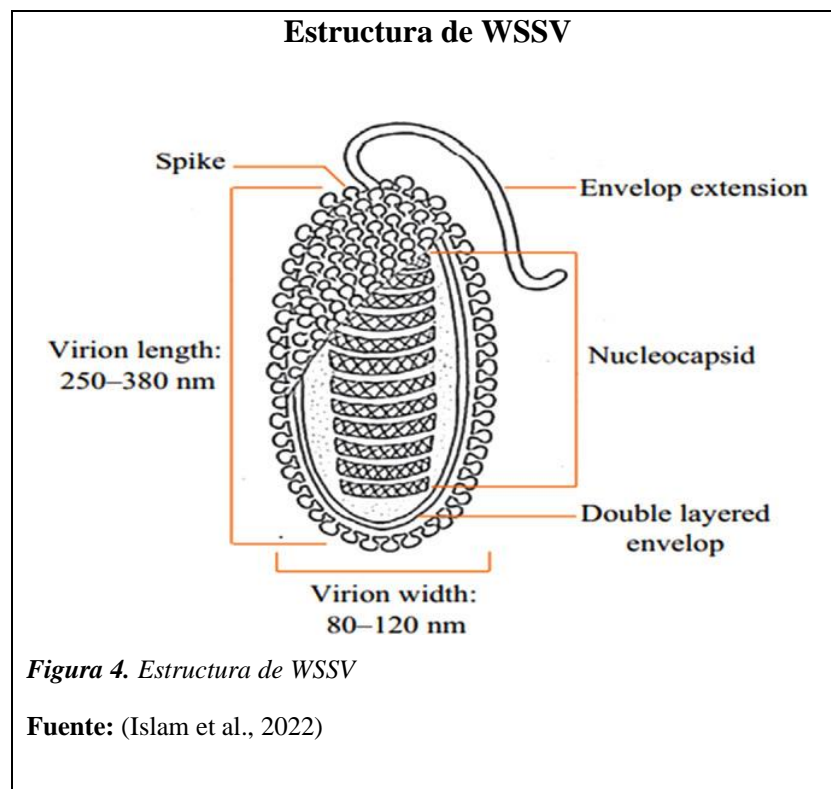
Este virus puede sobrevivir fuera de su hospedador por un tiempo de 30 días a 30°C en el agua marina, y hay viabilidad en estanques de cultivo solo por 3 a 4 días, además, otro dato a mencionar es el hecho de que para que el virus tenga una mayor capacidad infectiva necesitan de los factores de estrés del hospedador, como lo son una temperatura de 27°C, niveles bajos de oxígeno disuelto, un pH elevado, sustancias de origen tóxico en el agua, entre otros (Cuéllar, 2013).

2.2.3 Morfología y morfogénesis

El virus de la mancha blanca tiene un diámetro que va desde los 80 a los 120 nm, con una longitud de 250 a 380 nm (Islam et al., 2022). Los viriones de la mancha blanca presentan una forma ovoide a bacilariforme junto a un apéndice con forma de flagelo en parte terminal, además, presentan una

nucleocápside que está envuelta por diferentes proteínas (López, 2020). El virión está compuesto por una envoltura que tiene un grosor de 6-7 nm, un tegumento de bicapalipídica, nucleocápside que presenta una forma de rodillo y por último material genético de *dsDNA* de 300 Kpb (Islam et al., 2022; Solis, 2016). En cuanto a la nucleocápside, esta contiene un núcleo delimitado por una cápside que tiene un aspecto rayado, además, está compuesta por 15 hélices, de las cuales cada una está formada por una cantidad de 13 a 15 capsómeros (Sánchez, 2010).

En cuanto a la morfogénesis tiene su inicio con la formación en el nucleoplasma de una membrana de novo, además, la formación de largos túbulos que se rompen en fragmentos para dar paso a la formación de nucleocápsides vacías, luego de esta las membranas envuelven las cápsides dejando extremos abiertos por donde se darán paso las nucleoproteínas, finalizando con el cierre de la envoltura que permite la formación de un flagelo que se denota cuando el virión se encuentra en su etapa madura (Solis, 2016).



2.2.3.1. *Proteínas*

Dentro de la estructura del virus de la mancha blanca hay una gran variedad de proteínas, entre las cuales están las no estructurales que tienen una participación en el proceso de regulación transcripcional y de replicación de ADN, así como en el proceso de multiplicación viral, además, hay otras proteínas las cuales son parte de la envoltura y están involucradas en los procesos de ensamblaje de entrada, por medio de la unión celular y de gemación del virus (Islam et al., 2022).

Este virus consta con alrededor de 35 proteínas en la estructura de su envoltura de las cuales VP28 y VP26 están presentes en la envoltura de la partícula viral representando un 60% de la misma (Del Rosario, 2004; Sánchez, 2010). Estas proteínas estructurales son de suma importancia, debido a que son partículas primarias presentes en la interfaz que tiene con el huésped, estimulando gran parte de las defensas de este, como es el caso de la proteína VP28 que al unirse a las células de camarón facilita en ingreso al citoplasma (Islam et al., 2022; Sánchez, 2010).

Por otra parte, están las proteínas presentes en la nucleocápside en las cuales destacan la VP24, VP19 y VP15 que están integradas en la misma, siendo el caso de VP15 una proteína con la función de empaquetar el genoma del virus dentro de la nucleocápside, mientras que, dentro de esta nucleocápside también se encuentra la proteína VP664 que es considerada una de las proteínas más grandes presente en cualquier virus (Hernández et al., 2022).

2.2.4 **Mecanismos de transmisión y órganos de destino**

Durante la infección los órganos que normalmente el virus de la mancha blanca ataca son la piel, glándulas antenal, intestino, gónadas, células pertenecientes al sistema nervioso y más, siendo el epitelio que recubre el estómago, el tegumento y las branquias donde existe un mayor daño visible en las últimas etapas del ciclo del virus (De Gryse et al., 2020; Islam et al., 2022). Durante diversos estudios se ha descubierto que para su reproducción tiene como destino las células epiteliales del

estómago, así como las células de tegumento, branquias y tejido conjuntivo de especímenes jóvenes (Islam et al., 2022).

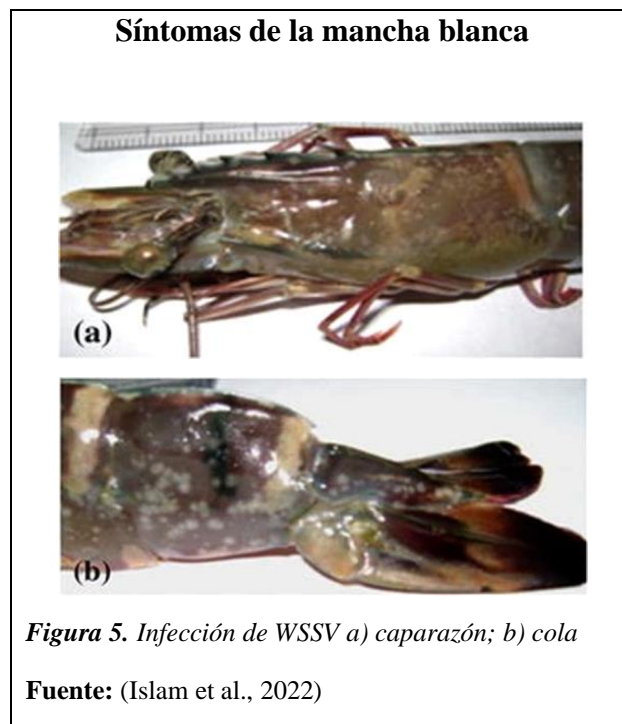
La propagación del virus se puede dar de forma horizontal ya sea una transmisión oral, cutánea, por el agua ingresando a través de branquias y por medio del aire a través de los pulmones en el caso de ser de forma horizontal, y de forma vertical que se da a través de la descendencia (por medio de ovocitos) donde hay una transmisión directa de la progenitora a la progenie en F1 (Islam et al., 2022). Dentro de la transmisión por medio de la descendencia se ha descubierto que no hay presencia de la enfermedad en óvulos maduros, lo que significa que los ovocitos que previamente han sido infectados no llegan a su etapa de folículos ováricos (Wang et al., 1999). Por otra parte, mediante estudios se ha determinado que hay una mayor probabilidad de infección por la ingesta de tejido infectado, en comparación de una transmisión por el proceso de cohabitación (Lotz & Soto, 2002).

Otro dato a mencionar es sobre la influencia que tienen los factores ambientales dentro del mecanismo de transmisión, ya que, los cambios de pH, salinidad del agua y la temperatura generan un estrés en el camarón que conviene al virus para poder tener más efectividad durante su transmisión e infección (Van Thuong et al., 2016).

2.2.5 Signos y síntomas de la mancha blanca

Primero hablando de los signos clínicos reportados en el campo, son mortalidades rápidas y masivas en camarones de estado juvenil, pero que también puede afectar a los camarones adultos en un periodo de 3 a 8 días una vez que la infección se haya dado (Del Rosario, 2004; Islam et al., 2022). Los camarones que han sido infectados por el virus muestran unas manchas blancas que es la acumulación de carbonato de calcio, que tendrá una forma circular o de parche en la zona del cefalotórax y una parte de la cola, también se puede presentar una coloración rojiza por toda la superficie del cuerpo (Alfaro et al., 2021; Del Rosario, 2004; Solis, 2016).

Los efectos de infección se van dividiendo en diferentes etapas, iniciando con un periodo asintomático que es el punto donde el virus se comienza a multiplicar en el tejido blanco, lo que posteriormente causará una infección sintomática, que puede seguir progresando hasta causar la muerte del hospedador, sin embargo, se han reportado casos en los cuales se logra que los especímenes se logran recuperar por completo de la infección (Mejías & Navarro, 2010). De forma clínica los camarones enfermos llegan a presentar pérdida de apetito, afectación en el sistema nervioso, cromatóforos expandidos, un exoesqueleto blando, urópodos rojos, letargia, pérdida de la capacidad de respuesta ante un estímulo visual, y más (Molinos Champion, 2021).



2.2.6 Registro de Mancha Blanca en Ecuador

El virus de la mancha blanca tuvo sus primeros registros el 28 de mayo de 1999, en donde se vieron las principales provincias que producen camarón afectadas, en las cuales se puede mencionar Esmeraldas, Guayas, Manabí y El Oro, en donde en un primer estudio realizado se registraron un total de 228 camaronas con el 46% de positividad mediante análisis de PCR, mientras que, en un segundo estudio del mismo año se emplearon 79 camaronas, de las cuales el 70% dieron positivo al análisis

de PCR, para finalmente en el año 2000 tener una incidencia de esta enfermedad abarcando el 85% de positividad (Gonzabay et al., 2021).

2.3 Métodos de diagnóstico

En la actualidad se han hecho uso de diferentes técnicas para la determinación de la presencia o ausencia de algún virus, siendo las pruebas de biología molecular una de las que presentan mayor especificidad y sensibilidad, por otro lado, también están las pruebas histológicas que permita la observación de los cambios patológicos que se pueden dar a nivel celular, sin embargo, este tipo de técnicas pueden llegar a tomar mucho tiempo al ser necesaria la examinación bajo microscopía de cada lámina histológica (Del Rosario, 2004).

2.3.1 Diagnóstico clínico

El diagnóstico clínico se trata de un estudio de los especímenes en cuanto a las observaciones de la sintomatología presente, ya sea esto en cuanto al comportamiento, coloración de la estructura del camarón, pérdida de reflejo y más sintomatologías que previamente ya fueron mencionadas (Cuéllar, 2013).

2.3.2 Diagnóstico histopatológico

Es un tipo de diagnóstico en el cual se requiere que los ejemplares de camarones que se usan dentro de la misma presenten sintomatología visible, además de encontrarse vivos para ser fijados con etanol, ácido acético, formaldehído y agua destilada, para luego sumergirlos en *Davidson-AFA* que tendrá como función facilitar el procesamiento al descalcificar el tejido, esto por diferentes horas dependiendo la etapa de vida en la que se encuentra el camarón (Cuéllar, 2013). El proceso de la técnica de histología puede durar de 5 a 7 días en condiciones normal, teniendo su inicio con una etapa de

deshidratación por un tiempo de 12 horas que posteriormente será teñida con eosina y hematoxilina, lo que ayudará en la observación bajo microscopía (Cuéllar, 2013; Islam et al., 2022).

2.3.3 Técnicas inmunológicas

Son técnicas que ayudan a evitar reacciones cruzadas con diferentes proteínas virales existentes de otros virus o del mismo camarón, al hacer uso de anticuerpos monoclonales (Islam et al., 2022). Por ejemplo, hay un anticuerpo monoclonal que es específico para la proteína VP28, entonces solo tendrá la capacidad de unirse a esa y a ningún otro tipo de antígeno (Makesh et al., 2006). Se puede aumentar la especificidad de estas técnicas haciendo uso de un coctel de anticuerpos monoclonales dirigidas a unirse a varias proteínas del virus (Chaivisuthangkura et al., 2010).

Sin embargo, a pesar de las diversas ventajas que pueden presentar estas técnicas, tienen varias desventajas como es el hecho de su alto costo, además, que necesitan mucho tiempo para llevarse a cabo y la necesidad de personal especializado y expertos en el tema (Islam et al., 2022).

2.3.4 Técnicas moleculares

Estas son técnicas muy sensibles y específicas cuando son basadas en ADN, las cuales pueden servir para el diagnóstico de la enfermedad cuando esta no presenta síntomas visibles, además, son técnicas más accesibles en cuanto a costos y recursos (Del Rosario, 2004). La técnica más representativa de estas es la PCR la cual ayuda en la amplificación de partes específicas con el uso de los *primers*, sin embargo, hay diferentes variaciones de la PCR que mejoran aún más la detección, las cuales serán presentadas a continuación (Medina, 2020).

2.3.4.1 PCR anidada

Este tipo de PCR busca mayor precisión al dar un segundo ciclo anidado al producto de la PCR obtenido en el primer ciclo (Peinado & López, 2006). Este es un método en el cual se sigue un primer paso que es la PCR tradicional, para luego seguir un segundo paso que está basado en el uso de 2 nuevos cebadores para finalmente hacer una lectura por medio de una electroforesis en gel de agarosa en el caso del ADN. Los resultados obtenidos en el primer paso, en el caso de ser positivos significa que hay una infección del virus considerada grave, mientras que los resultados positivos en la segunda amplificación indica que hay una infección latente o que el ejemplar es portador de la misma (Islam et al., 2022).

2.3.4.2 qPCR

Esta es una técnica cuantitativa que mide la cantidad del material genético del virus a partir de la fluorescencia que este emite, usando sondas (Islam et al., 2022). La sonda lleva consigo una molécula fluorescente y otra molécula denominada “*quencher*” la cual será la encargada de inhibir la fluorescencia en el caso de que no exista presencia del ADN que se busca, presentando así varias ventajas como es el hecho de que evita la contaminación ya que hay poca manipulación del producto amplificado al tener una lectura automatizada dada directamente por el tubo de reacción, esto conjuntamente con que los resultados obtenidos son objetivos, adicionalmente, está el hecho de que hace uso de un menor tiempo (Morales & Cuéllar, 2014).

2.3.4.3 LAMP

Esta es una amplificación isotérmica mediado por bucle usada ampliamente para el diagnóstico de enfermedades en acuicultura, sobre todo en la mancha blanca donde se ha registrada una alta especificidad y sensibilidad, donde se hace uso de 2 cebadores internos y dos externos construidos a partir del genoma del virus (Islam et al., 2022). Este proceso se trata de una síntesis de las cadenas de

ADN que tiene un alto desplazamiento de las mismas junto con cebadores especializados que reconocerán 6 patrones diversos, para al final de la amplificación, ser observada por medio de la electroforesis donde se verán varias bandas con diferente grosor, lo que representa las diversas longitudes del ADN amplificado (Notomi et al., 2000).

3 Materiales y métodos

3.1 Obtención de muestras

La obtención de muestras fue guiada de dos maneras diferentes, ya que, primero era necesario la obtención de una muestra positiva para la estandarización, para lo cual los ejemplares que fueron escogidos presentaban los síntomas visibles mencionados anteriormente como son las manchas blancas en el cefalotórax, el color rojizo y más (Del Rosario, 2004; Islam et al., 2022). Otro aspecto importante a tomar en cuenta es el hecho de que los camarones que se usaron para el control positivo estaban moribundos y presentaban cambios de comportamiento (OIE, 2021). Por otro lado, las demás muestras fueron escogidas al azar para su posterior evaluación.

Los órganos y tejidos que se escogieron para la estandarización del protocolo fueron aquellos donde hay mayor prevalencia del virus de la mancha blanca, por lo cual se usó las branquias, hemolinfa, estómago, pleópodos y músculo de la zona abdominal (Lo et al., 1997).

Estas muestras fueron adecuadamente conservadas para que no haya ningún tipo de daño del ácido nucleico, para lo cual los ejemplares enteros se mantuvieron a una temperatura de menos -20°C con su respectiva etiqueta. También se hizo uso de tejido de camarón el cual fue conservado en etanol al 90-95% para su posterior uso (OIE, 2006).

3.1.1 Delimitación de las zonas de estudio

Las muestras de camarones fueron obtenidas de 2 piscinas de las provincias del Guayas y Manabí. Se escogieron estas dos provincias debido a que son grandes productoras de camarones para exportación, siendo Guayas la mayor exportadora con un 43% de la producción y Manabí con 14% (Gonzabay et al., 2021). Las dos piscinas escogidas por parte de la provincia de Guayaquil se encontraban ubicadas en el cantón Durán, mientras que las dos piscinas escogidas en la provincia de Manabí se encontraban ubicadas en el cantón Pedernales.

3.2 Extracción de ADN

La extracción de ADN para el diagnóstico de la enfermedad de mancha blanca se debe realizar a partir de individuos que presenten signos y síntomas, quiere decir que se deben elegir camarones enfermos que sean capturados en piscinas o estanques de cultivo, para así contar con una muestra positiva de la enfermedad.

Por dichas razones en primera instancia se realizó la extracción de ADN a partir de una muestra de camarón positiva con la enfermedad de la mancha blanca mediante diferentes kits de extracción que se describirán a continuación. De estos mismos protocolos luego se ocupó el más beneficioso para la extracción de las demás muestras.

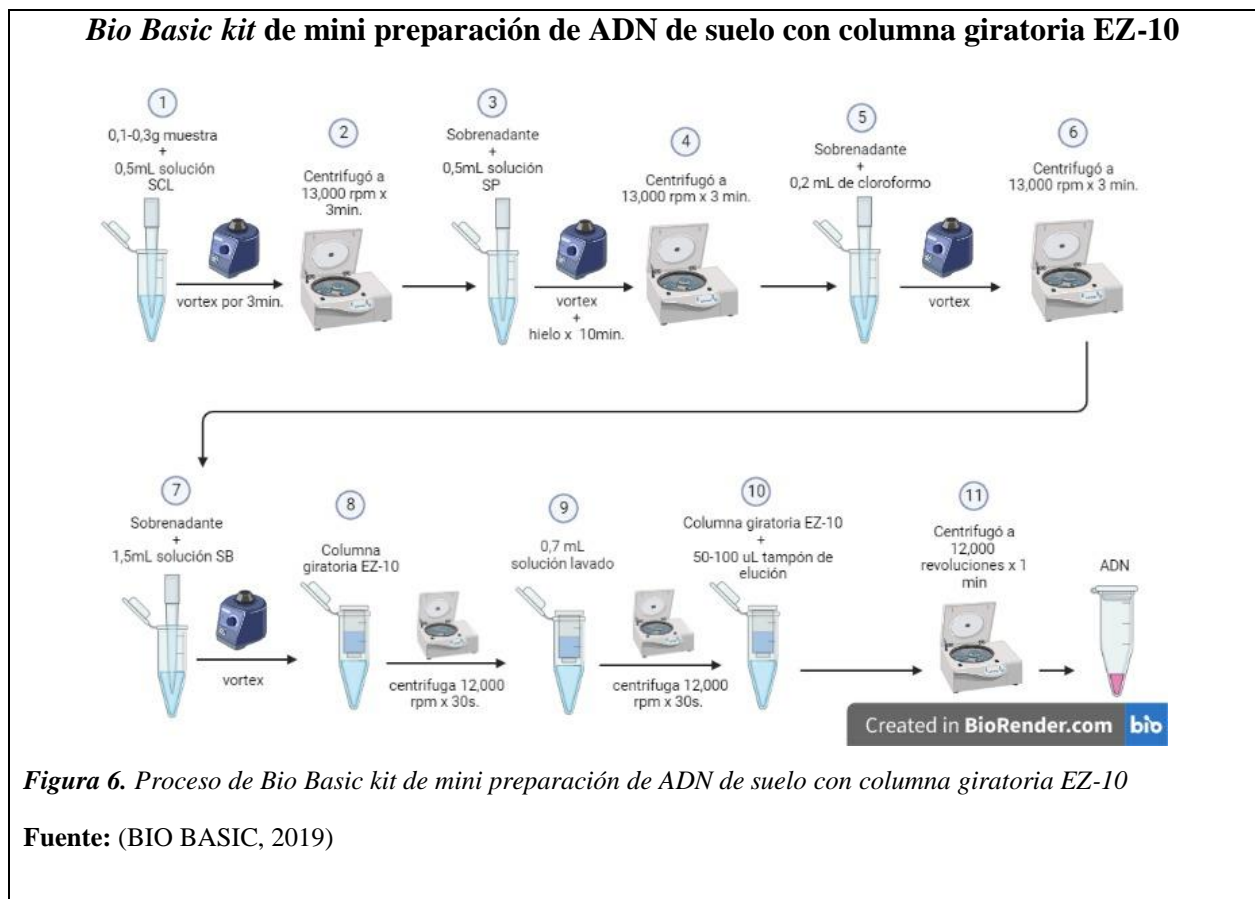
3.2.1 *Bio Basic kit* de mini preparación de ADN de suelo con columna giratoria EZ-10

Según *Bio Basic*, (2019) es un kit de mini preparación de ADN de suelo con columna giratoria EZ-10. Dicho kit está diseñado para preparar ADN con una buena y alta calidad, debido a que proporciona un aislamiento simple y rápido del ADN que queda listo para posteriormente ser empleado a PCR y aplicaciones posteriores. El tamaño molecular del ADN purificado es de alrededor de 20-50 kb y sus rendimientos medios son de 5-50 ug de muestra **Figura 6**.

Los componentes de *Bio Basic* con respecto al manual que viene dentro de la caja son los siguientes: Solución SCL (a) 25 mL, solución SP 25 mL, solución SB 40 mL, solución de lavado (b) 12 mL, tampón de elución 5 mL, columna giratoria EZ-10 x 50, tubo de recogida de 2,0 mL x 50 **Figura 6**.

El procedimiento que se siguió del *kit* de *Bio Basic* inició con el precalentamiento de la solución SCL a 65°C para luego agregar 0,1-0,3 g de la muestra en un tubo de centrifuga de 1,5 ml, en el cual también se empleó 0,5 mL de la solución SCL, se llevó al vortex por 3 minutos y se incubó a 65°C por 5 minutos. Después se centrifugó a 13,000 rpm por 3 minutos a temperatura ambiente y se traspasó el sobrenadante a un microtubo nuevo, y luego se usó 0,5 mL de solución SP, se llevó al vortex y se mantuvo en hielo durante 10 minutos. Proseguimos con centrifuga a 13,000 rpm por 3

minutos a temperatura ambiente y traspaso del sobrenadante a un nuevo microtubo, para luego agregar 0,2 mL de cloroformo que se mezcló bien mediante el vortex. Se centrifugó a 13,000 rpm por 3 minutos a temperatura ambiente y se traspasó el sobrenadante a un microtubo nuevo, donde luego se agregó 1,5 del volumen de la solución SB y se llevó al vortex para mezclar bien. Se traspasó la mezcla a una columna giratoria EZ-10 y se centrifugó a 12,000 rpm por 30 segundos, y se agregó 0,7 mL de solución de lavado y se centrifugó a 12,000 rpm por 30 segundos. El siguiente paso es opcional y se agregó 0,3 mL de solución de lavado y se centrifugó a 12,000 rpm por 30 segundos para luego centrifugar a 12,000 rpm por 30 segundos, para eliminar los residuos de la solución de lavado. Se cambió la columna giratoria EZ-10 a u nuevo tubo de centrifuga de 1,5 ml, se agregó 50-100 uL de tampón de elución a la columna y se incubó a temperatura ambiente por 2 minutos, para finalmente centrifugar a 12,000 revoluciones por 1 minuto a temperatura ambiente y obtener el ADN que se deseaba y se almaceno a -20°C **Figura 6.**



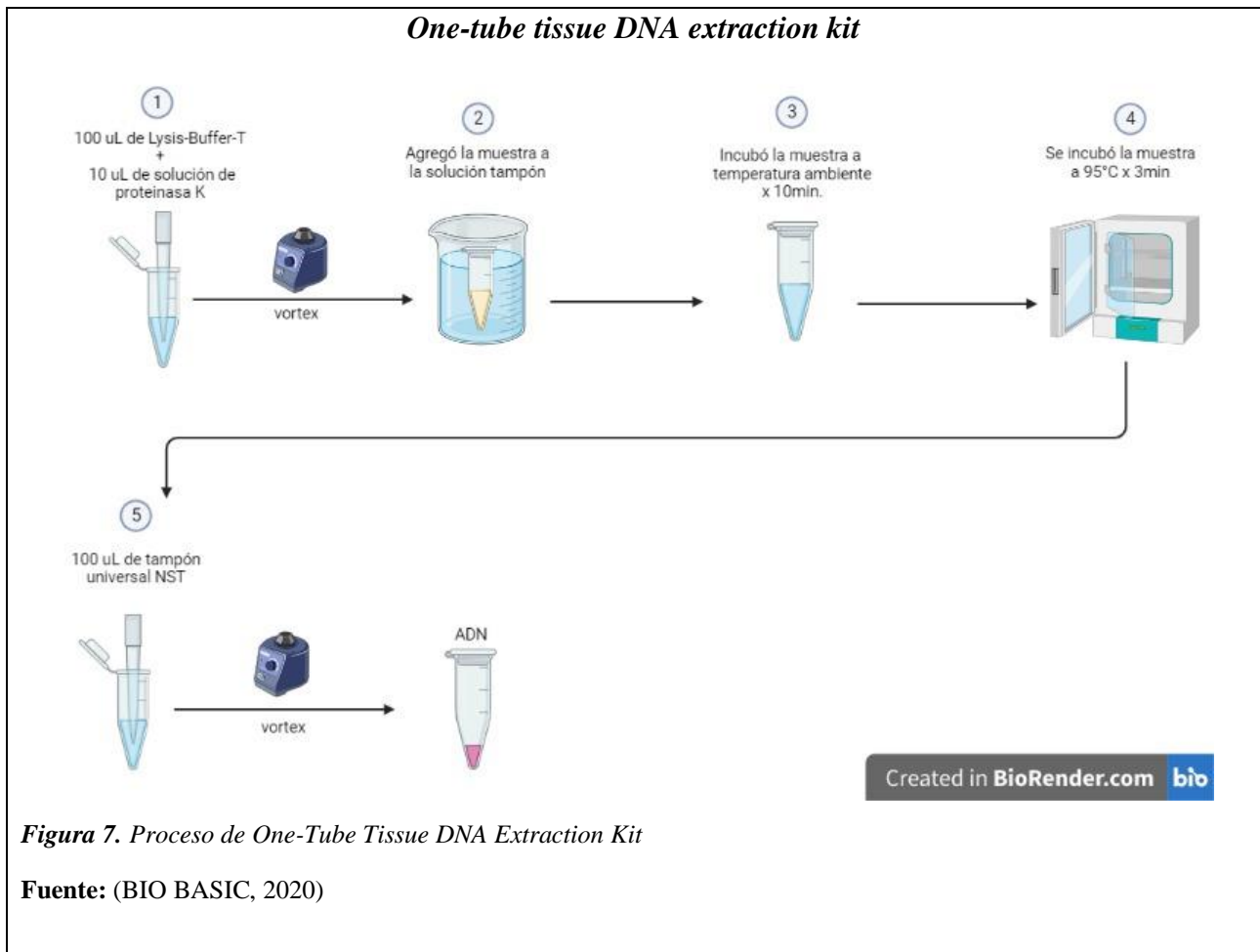
Con el *kit Bio Basic* se realizaron varias extracciones de ADN de las diferentes partes del camarón de las cuales se tomaron en cuenta las siguientes: la cáscara, tejido (en donde se cortó una parte de la parte superior del camarón con un *kit* de disección) y también se realizó del raspado de la cáscara.

3.2.2 *One-Tube Tissue DNA Extraction Kit*

Otro método de extracción que se empleó fue *One-Tube Tissue DNA Extraction Kit*, que según el manual de *Bio Basic*, (2020) está diseñado para el aislamiento rápido y eficaz de ADN genómico a partir de tejido animal, que al tratarse de un protocolo rápido ayuda a minimizar la posibilidad de la contaminación cruzada y toma un tiempo de 15 minutos aproximadamente. Además, dicho *kit* está compuesto por *Lysis-Buffer-T* 200 mL, proteinasa K 10 mL y tampón universal NST 100 mL **Figura 7.**

Con este protocolo se inició añadiendo 100 uL de *Lysis-Buffer-T*, 10 uL de solución de proteinasa K en un tubo de 0,5 ml y se mezcló con la ayuda de un vortex. Se agregó la muestra al tampón, asegurándose de que la muestra este totalmente sumergida en la solución y se incubó a temperatura ambiente por 10 minutos, pero fue importante tomar en cuenta que en este paso la incubación a 56°C puede llegar a mejorar la lisis y la amplificación de los tejidos. Luego la misma muestra se incubó a 95°C por 3 minutos y se añadió 100 uL de tampón universal NST y se mezcló con la ayuda del vortex. La muestra obtenida se utiliza directamente como plantilla de PCR y el volumen de esta plantilla no debería exceder 1/10 del volumen total de la reacción de PCR **Figura 7.**

Con el *kit One-Tube Tissue DNA Extraction Kit*, se realizó extracción de ADN únicamente del tejido del camarón.



3.2.3 Viasure RNA-DNA Extraction Kit

El siguiente protocolo que se emplea es denominado *Viasure RNA-DNA Extraction Kit*, el cual es un protocolo que se emplea para el aislamiento de ácidos nucleicos a partir de muestras de biopsias y tejidos (CerTest BIOTEC, 2022).

A partir de dicho *kit* se siguieron los pasos que establece el manual *CerTest BIOTEC*, (2022) iniciando con el lisado de las muestras donde se agregó 1-10 mg de tejido o muestra de biopsia a un tubo de 2 mL, se añadió 200 uL de agua destilada o PBS, 200 uL de *Lysis Buffer*, 20 uL de *Carrier RNA* y 20 uL de proteinasa K. Es importante tomar en cuenta que cuando se trabaja con más de 5 muestras, se recomienda realizar una *master mix* como el paso anterior, pero en este caso se añade 240 uL de *master mix* a cada muestra en lugar de todos los reactivos mencionados anteriormente. La mezcla se colocó en un termobloque y se incubó por 10 minutos a 65°C en agitación y posteriormente se incubó

a 95°C por 10 minutos. A continuación de la lisis la muestra se centrifugó a velocidad máxima por 1 minuto, para que todo el contenido baje al fondo del microtubo y así se obtuvo el material no lisado y luego el sobrenadante se traspasó a un microtubo de 1,5 mL **Figura 8.**

Luego se agregó 260 uL de *Binding Buffer* a la muestra y esto se mezcló bien con la ayuda de un vortex. Luego se traspasó la totalidad de la muestra a una columna *Mini Spin Column* en la cual previamente se colocó en un *RTA Collection Tube*. Se cerró la tapa y se llevó a la centrifuga por 2 minutos a 11,000 rpm, y a continuación, se descartó el sobrenadante con el tubo colector y se transfirió la columna a un nuevo *RTA Collection Tube* **Figura 8.**

Se prosigue con los lavados, iniciando con el primer lavado de la columna *Mini Spin Column* donde se agregó 600 uL de *Wash Buffer I* al interior de la columna *Mini Spin Column* y se centrifugó a 11,000 rpm por 1 minuto. Se descartó el sobrenadante y el *RTA Collection Tube*. Luego se colocó la columna *Mini Spin Column* en un nuevo *RTA Collection Tube*, y se siguió con el segundo lavado de *Mini Spin Column* donde agregó 700 uL de *Wash Buffer II* al interior de la columna *Mini Spin Column* y se centrifugó a 11,000 rpm por 1 minuto. Se descartó el sobrenadante y el tubo colector. Se colocó la columna *Mini Spin Column* en un nuevo *RTA Collection Tube* **Figura 8.**

Después se dio la eliminación de las trazas de etanol, donde se centrifugó la columna por 5 minutos a velocidad máxima para la eliminación de los residuos de etanol. Se descartó el *RTA Collection Tube* con el sobrenadante residual. Para finalmente concluir con la elución de los ácidos nucleicos que inició colocando la columna *Mini Spin Column* en un tubo de 1,5 mL donde agregó 60 uL de *Elution Buffer* que previamente se precalentó a 65°C y se colocó directamente en la superficie de la membrana de la columna. Se incubó por 3 minutos a una temperatura ambiente y luego se llevó a la centrifuga por 1 minuto a 11,000 rpm. Y, para terminar, se descartó la columna *Mini Spin Column*, se cerró el tubo de 1,5 mL y se conservó el material extraído a -20°C o -80°C **Figura 8.**

El protocolo *Viasure RNA-DNA Extraction Kit* se empleó solo para la extracción de ADN a partir de muestra de tejido de camarón.

Viasure RNA-DNA extraction kit

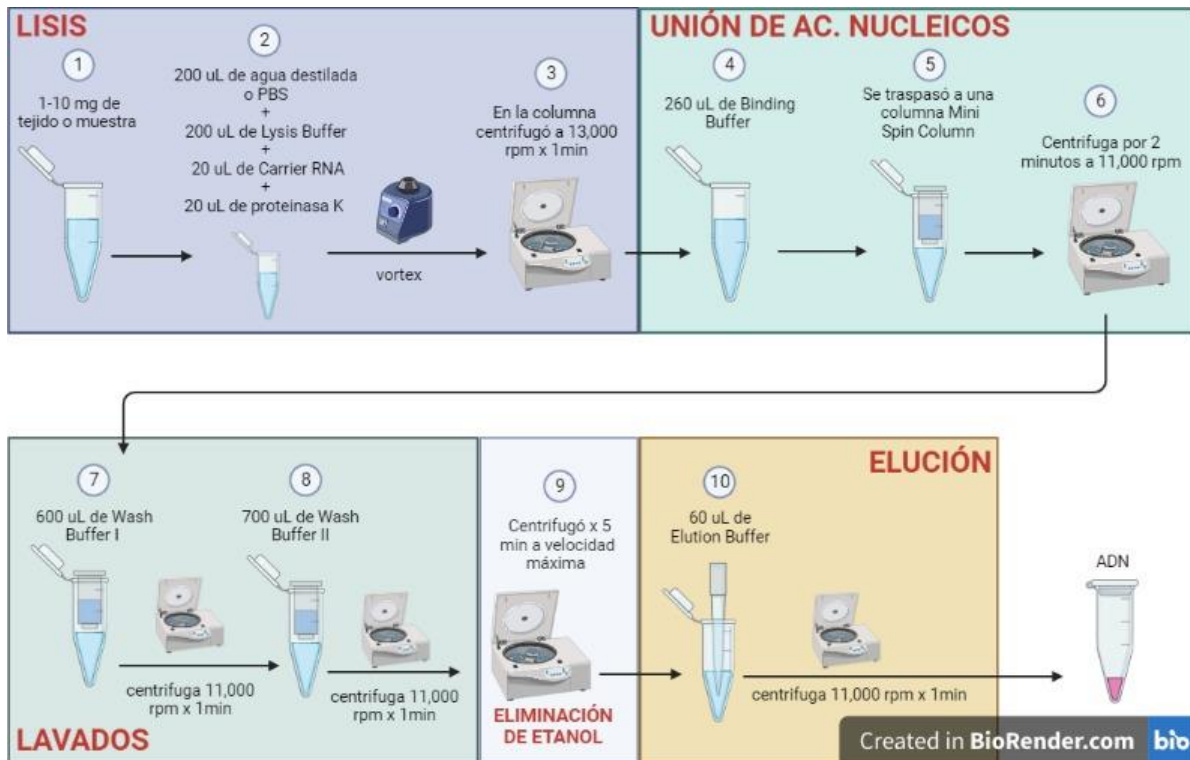


Figura 8. Proceso de Viasure RNA-DNA Extracción Kit

Fuente: (CerTest BIOTEC, 2022)

3.2.4 Método *in house*

Otro de los protocolos empleados para la extracción de ADN fue a partir de un *kit* casero realizado por el laboratorio Inmunolab, (2023) este *kit* es indicado para la extracción de ADN a partir de líquido, del cual también se siguieron los pasos establecidos por el mismo.

El procedimiento por seguir con este *kit* inicia añadiendo 300 uL de solución VB que se trata del *buffer* lisis, más 200 uL del líquido de la muestra y se mezcló con la ayuda de un vortex. Todo el líquido mezclado se traspasó a una columna y se centrifugó a 13,000 rpm por 3 minutos, para luego desechar el sobrenadante. Se añadió 400 uL de solución PD que se trata del lavado 1 para luego centrifugar a 13,000 rpm por 1 minuto, y desechar el líquido sobrenadante. Se añadió 400 uL de solución PW que es el lavado 2, otra vez se centrifugó a 13,000 rpm por 1 minuto y se desechó el líquido sobrenadante. Se centrifugó la columna a 13,000 rpm por 1 min para que esta se seque, para

luego traspasar la columna a un tubo *Eppendorf* y se descartó la parte de abajo. Se añadió 30 uL de *Elution Buffer*, y se aplicó centrifuga a 13,000 rpm por 2 minutos para finalmente quedar con el ADN extraído en el tubo *Eppendorf* que posteriormente se incubó a -50°C **Figura 9**.

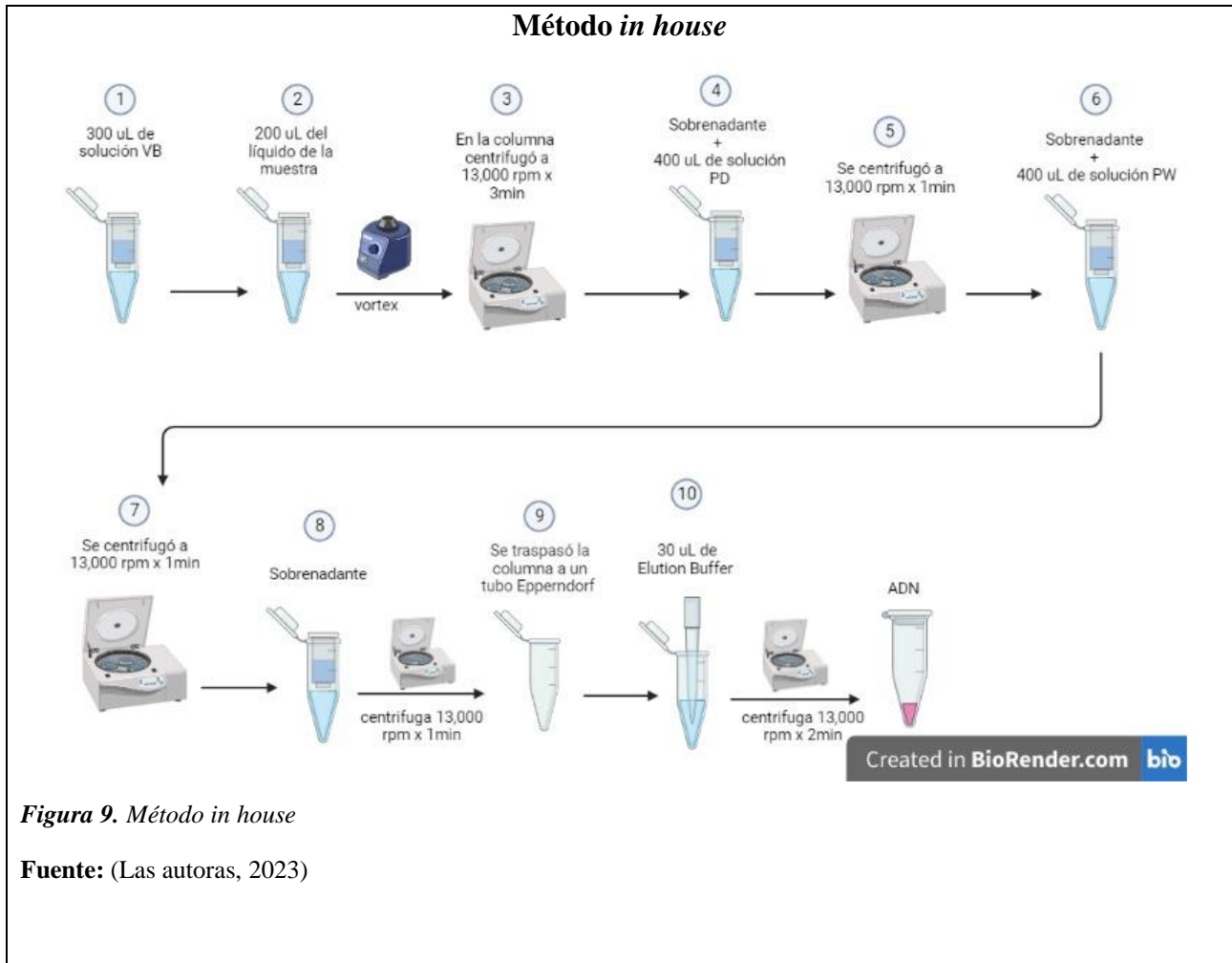


Figura 9. Método in house

Fuente: (Las autoras, 2023)

Mediante el protocolo de extracción de ADN casero implementado por el laboratorio Inmunolab, se utilizaron muestras de líquido, tejido, cáscara y raspados provenientes del camarón infectado con la enfermedad de la mancha blanca.

3.2.5 Método de la OIE

Como último protocolo se extracción de ADN se utilizó el descrito por la OIE (2019), se obtuvo de 100-200 mg de tejido de camarón y se colocó en un microtubo de centrifuga de 1,5 mL con 600 uL

de la solución de lisis al 0,5% o SDS. Con la ayuda de un palillo desechable, se homogenizó correctamente el tejido que se encontraba dentro del tubo, y se llevó a incubar a 65°C por 1 hora. Posteriormente se añadió NaCl 5 M para poder alcanzar una concentración final de 0,7 M, se agregó lentamente 1/20 de solución de bromuro de N-cetil-N, N, N-trimetilamonio y se mezcló con la ayuda de un vortex. Se incubó a 65°C por 10 minutos, luego a temperatura ambiente se agregó el volumen igual de cloroformo/alcohol isoamílico y se mezcló con la ayuda de un vortex, para luego llevar a centrifugar a 13,000 rpm por 5 minutos. Se traspasó la solución acuosa a un tubo limpio de 1,5 mL y se agregó fenol y mezcló con la ayuda de un vortex y se centrifugó a 13,000 rpm por 5 minutos. Luego se recogió la solución o también conocido como sobrenadante de la parte superior y se repitió el proceso de extracción con fenol una vez más. Se traspasó la capa superior a un nuevo tubo, se añadió dos volúmenes de cloroformo/alcohol isoamílico, se mezcló bien con la ayuda de un vortex y posteriormente se llevó a centrifugar a 13,000 rpm por 5 minutos. Se traspasó la capa superior a un nuevo tubo y se precipitó el ADN agregando dos volúmenes de etanol al 95% o absoluto, luego se dejó reposar en forma vertical a -20°C por 30 minutos. Se centrifugó a 13,000 rpm por 30 minutos y se descartó el etanol, luego se lavó el sedimento de ADN con etanol al 70%, se dejó secar y se resuspendió en 100 uL de agua bidestilada esterilizada a 65°C por 15 minutos. Finalmente, se obtuvo el ADN requerido del cual se utilizó 1 uL de la solución para la realización de una PCR **Figura 10**.

Con el protocolo de extracción de ADN planteado por la OIE, se realizó la extracción de ADN del tejido del camarón.

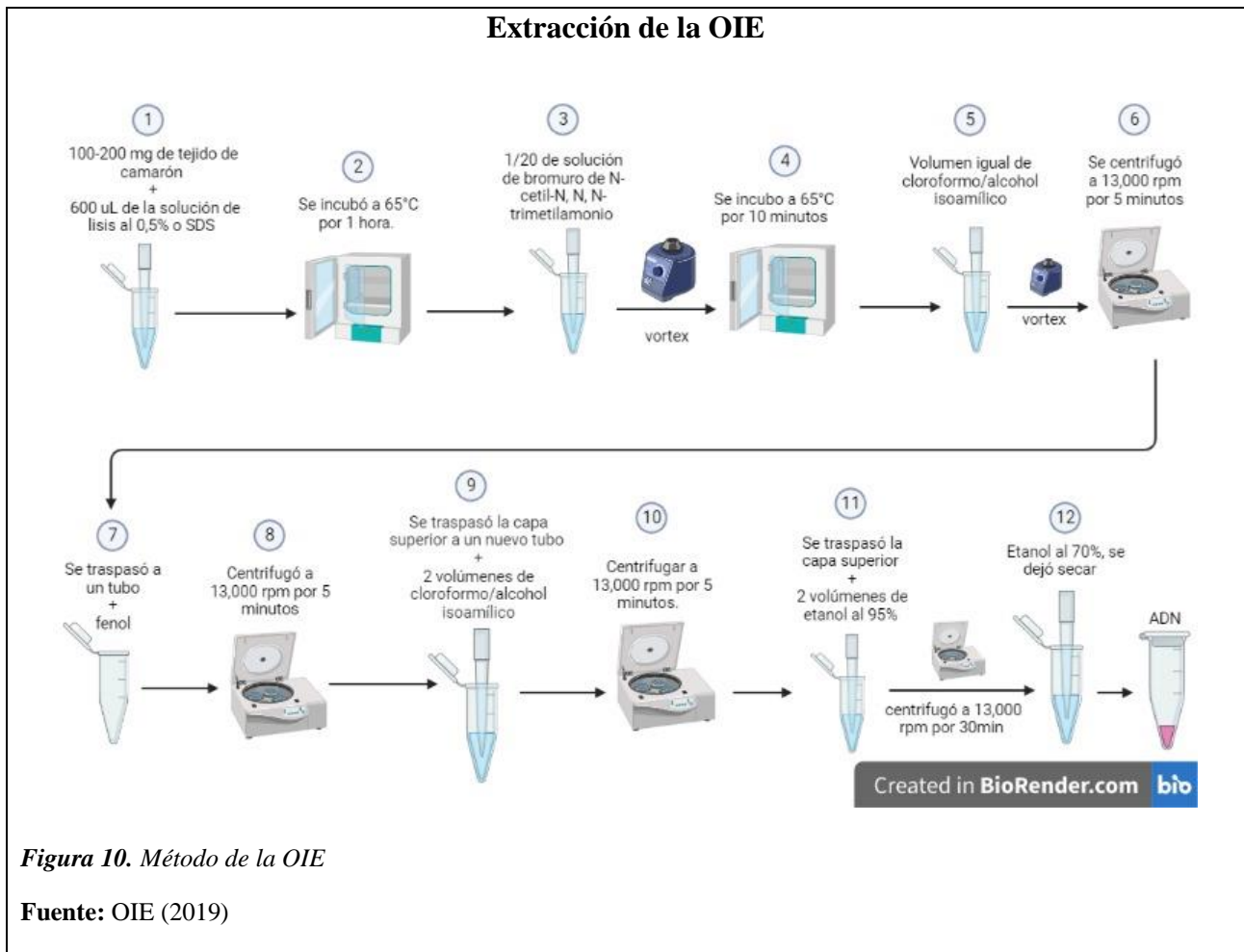


Figura 10. Método de la OIE

Fuente: OIE (2019)

3.2.6 Cuantificación de ADN

Para la cuantificación de ADN a partir de las muestras extraídas de camarón se emplearon dos métodos para conocer precisamente y con una alta sensibilidad la cantidad de ADN que teníamos en nuestras muestras extraídas previamente con los diferentes protocolos de extracción y así poder identificar cuál sería el mejor.

El primer método que se empleó fue por medio de *Qubit*, en el cual se utilizó un *kit* de ensayo específico denominado *Qubit 1X dsDNA HS Assay Kit*, el cual proporciona una alta sensibilidad, debido a que cuando se utiliza el fluorómetro *Qubit*, arroja resultado más precisos y selectivos para la cuantificación de muestras sensibles de ADN. Este *kit* incluye un tampón de ensayo listo para usar y su vez también cuenta con estándares de ADN. Para la utilización del *kit* y realizar los ensayos, se

empezó por una simple dilución de la muestra en la solución de trabajo 1X provista, luego se procedió a la lectura de la concentración utilizando un fluorómetro *Quibit*. En este caso empleamos todas las muestras que contenían la extracción de ADN posiblemente de la enfermedad de la mancha blanca para su posterior lectura.

Este ensayo Invitrogen, (2020) recomienda que las muestras tengan una concentración inicial desde 10 ng/uL a 100 ng/uL, proporcionando un rango de detección central de 0,2-100 ng de ADN. Por otro lado, es importante tomar en cuenta que el ensayo se debe llevar a cabo a una temperatura ambiente. También se empleó otro método para la determinación de la concentración y pureza de nuestras muestras extraídas de ADN a partir del camarón conocida como espectrofotometría por medio de *NanoDrop*, que es el dispositivo que nos ayudó a conocer algunos de los parámetros de la cuantificación de ADN.

El proceso que se siguió con esta técnica fue el indicado por los técnicos de los laboratorios de ciencias de la vida de la Universidad Politécnica Salesiana, iniciando con el encendido del equipo y esperando el tiempo necesario a que se cargue el software para poder utilizarlo correctamente. Primero se colocó una solución como estándar blanco que en este caso fue agua que viene en los kits de extracción de ADN, que nos ayudó a que el equipo reconozca efectivamente las muestras que fuerpn analizadas después. Después se fueron colocando las muestras una por una en una cantidad de 1 uL, para que el equipo realice la lectura correspondiente y así poder conocer la calidad del ADN y la cantidad de contaminantes que pueden estar presentes. Luego al finalizar el uso del equipo a este se le limpiaron los dos brazos y gracias al sistema operativo que tiene el dispositivo procedió a descargar los resultados obtenidos en una *Flash Memory*.

En este protocolo se emplearon todas las muestras de ADN extraído con los diferentes *kits*.

3.2.7 Evaluación de la integridad del ADN

La evaluación de la integridad se realizó por medio de una electroforesis empleada en gel de agarosa, y nos sirvió para poder conocer si la muestra de ADN es integra al presentarse una banda discreta.

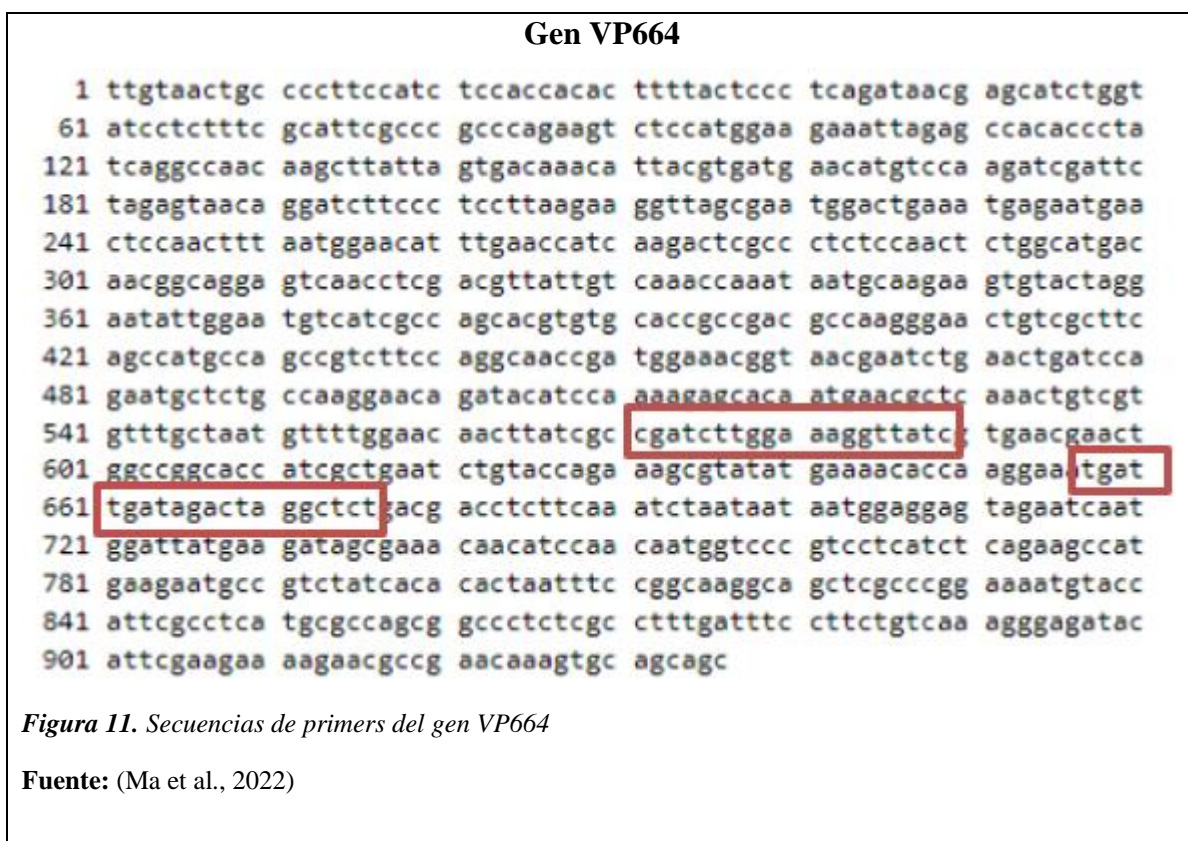
Los componentes que se utilizaron para el gel de agarosa fueron: agarosa en polvo, tampón TBE, fuente de calor, *Sybr-Safe* y el molde para solidificar el gel. En esta parte de la metodología se preparó el tampón TBE y en conjunto con el polvo de agarosa se mezclaron en un matraz. Luego este matraz fue colocado en una estufa de calor para disolver el polvo de agarosa con el tampón TBE, y una vez que estuviera totalmente diluido se dejó enfriar para poder colocar 5uL de *Sybe-Safe*. Posteriormente se vertió la mezcla de los componentes en el molde que previamente fue adecuado con cintas adhesivas a los extremos para que el gel se moldee bien y evitar que se riegue la mezcla u ocasionar desperdicios, además, se colocó la peinilla que ayuda a moldear los pocillos donde se cargaron las muestras y se esperó alrededor de ½ hora para la gelificación del gel. Se preparó la cubeta con tampón TBE, para posteriormente colocar el gel ya gelificado dentro de la misma (Peña, 2013; Woods, 2021).

Por otro lado, para esta técnica de la evaluación de la integridad se colocaron las muestras en los pocillos empezando por 5uL de *Ladder* y secuencialmente 5uL de las demás muestras de ADN mezcladas con 1uL de azul de bromofenol a una concentración de 2X. Se colocó la tapa de la cubeta y se conectaron los electrodos a la fuente de alimentación estableciendo las condiciones de 110 Voltios por 45 minutos. Luego de pasado ese tiempo se sacó el gel para poder observar las bandas mediante una cámara de luz UV o también conocido como transiluminador.

3.3 Evaluación de primers

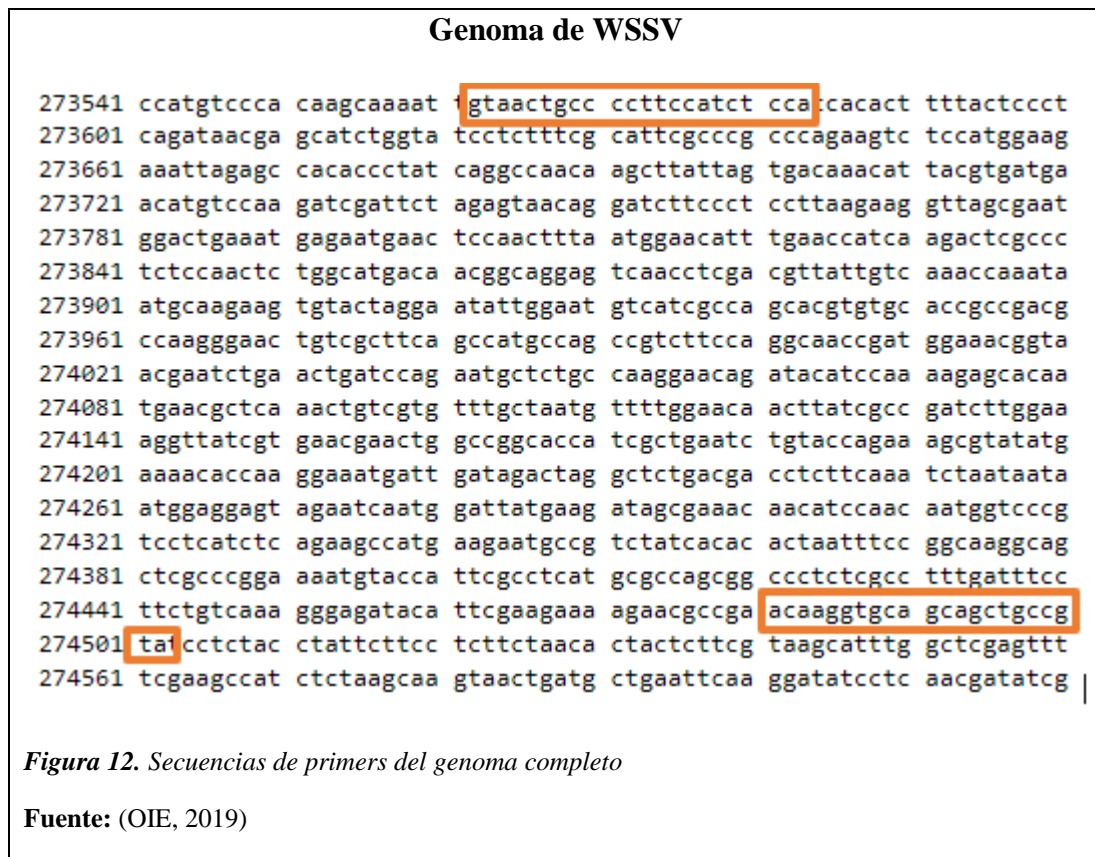
3.3.1 Selección de primers

Uno de los set de *primers* escogidos fue en base a la propuesta de Ma et al., (2022) que hace uso de una secuencia *forward*, 5'-CGATCTTGGAAAGGTTATC-3' y una *reverse*, 5'-GAGCCTAGTCTATCAATCA-3', que están dentro del gen de VP664 como muestra la **Figura 11**. Estas secuencias buscan la amplificación de regiones conservadas del gen VP664 (*GenBank accession* no. MN481520.1), el cual está presente en gran parte de la nucleocápside del virus. Para la selección de estos *primers* se hizo uso de la plataforma *Primer Express software 5.0* el cual permite el diseño de cebadores y sondas para su aplicación en qPCR (OIE, 2021).



Otro par de secuencias de *primers* usados dentro de la metodología fueron el segundo set de *primers* propuesto por la OIE, (2019) dentro de la metodología de la PCR anidada, siendo la secuencia *forward* 146F2 (5'-GTA-ACT-GCC-CCT-TCC-ATC-TCC-A-3') y la secuencia *reverse* 146R2 (5'-TAC-

GGC-AGC-TGC-TGC-ACC-TTG-T-3’) como muestra la **Figura 12**, presentes dentro del genoma completo del virus (*GenBank accession* no. AF369029.2).



3.3.2 Análisis de primers

Para el análisis de los *primers* se hizo uso de la herramienta *OligoAnalyzer* la cual puede servir como calculadora del contenido de guaninas y citosinas, peso molecular y otras propiedades. Además, es una plataforma en la cual se puede observar la formación de dímeros, horquillas, así como identificar el potencial de la estructura secundaria.

3.4 Amplificación por qPCR

Para la metodología de la qPCR nos basamos en lo propuesto por Ma et al., (2022), así como en la información obtenida a partir del inserto de la *master mix* usada y en ensayos modificados a partir de

protocolos obtenidos de *kits* comerciales o algún otro estudio. Para la estandarización de cada uno de estos protocolos y comprobación de su efectividad se hizo uso de un control positivo de mancha blanca, además, se hizo uso de un control negativo que nos sirvió como guía para asegurarnos que no haya la presencia de ningún tipo de contaminante que no fuera el virus. Dentro de cada ensayo probado se hicieron corridas de la muestra positiva, muestra negativa y muestras de camarón obtenidas al azar de las piscinas de cada una de las provincias elegidas.

A partir de esto, el primer set de *primers* fue probado únicamente con el primer protocolo, mientras que el segundo set de *primers* que se trata de los propuestos por la OIE fueron probados con el segundo y tercer método.

		Primer método		Segundo método		Tercer método	
Pre-amplificación	Pre-desnaturalización	95°C x 1 min		No hubo		94°C x 4 min	
	Desnaturalización	95°C x 10 seg	35 ciclos			94°C x 30 seg	30 ciclos
	Alineamiento	55°C x 30 seg				54°C x 45 seg	
	Extensión					72°C x 4 min	
Amplificación	Pre-desnaturalización	95°C x 30 seg		95°C x 1 min		94°C x 4 min	
	Desnaturalización	95°C x 5 seg	40 ciclos	95°C x 15 seg	40 ciclos	94°C x 30 seg	40 ciclos
	Alineamiento y extensión	60°C x 30 seg		60°C x 30 seg		54°C x 45 seg	

Tabla 1. Resumen de los métodos para la amplificación por qPCR

Fuente: (Las autoras, 2023)

3.4.1 Primer método

Es el método propuesto por Ma et al., (2022), en el cual realizamos una reacción de 10 uL, de los cuales 5 uL fueron de la máster “*Luna® Universal qPCR Master Mix*” de la marca *New England BioLabs* en una concentración de 1X, esto junto a 0.2 uL de cada par de *primers* escogidos con anterioridad, los cuales se usaron en una concentración de 0,2 uM. Por otro lado, dentro de la qPCR

es necesario el uso de una sonda, sin embargo, dentro de este ensayo se hizo uso del reactivo Eva Green en una cantidad de 0,4 uL a una concentración de 2X, lo que nos ayudó para emitir la fluorescencia en el caso de resultados positivos. Por último, se agregó 0,8 uL de las muestras de ADN extraídas previamente, y se completó el volumen con 3,4 uL de agua libre de nucleasas.

Para este método el protocolo de qPCR se comenzó con un proceso de pre-amplificación con el objetivo de llegar a obtener resultados más específicos en relación a las gráficas arrojadas, lo cual empezó con una pre-desnaturalización inicial de un ciclo de un minuto a 95°C, para luego por 35 ciclos realizar la desnaturalización de 10 segundos a 95°C y la extensión a 55°C por 30 segundos. Hay que recalcar que la señal estaba destinada para ser recolectada en el paso de hibridación y extensión.

Una vez realizada esta etapa se volvió a realizar una reacción con las mismas especificaciones antes dadas, pero con la diferencia que la muestra que sirvió de ADN fue el producto obtenido de la pre-amplificación. Para luego meterla en el equipo con un protocolo de qPCR Universal que igual contó con una pre-desnaturalización inicial a 95°C por 30 segundos, para luego tener 40 ciclos con una desnaturalización a 95°C por 5 segundos y una extensión por 30 segundos a 60°C. En este punto hubo una recolección de la señal a los 60°C.

3.4.2 Segundo método

Este segundo método se hizo basándose en lo propuesto por el inserto de la “*Luna® Universal qPCR Máster Mix*”, con ciertas modificaciones en cuanto a las cantidades de cada componente dentro de la reacción. La mezcla de la reacción de 10 uL propuesta por nosotras fue de 5 uL de máster, 0.8 uL de cada uno de los *primers* anteriormente propuestos, 0.6 uL de *eva green*, 2.5 uL de ADN y el resto se completó con agua libre de nucleasas. Dentro de esta reacción todos los componentes se encontraron en una concentración de 1X a diferencia de lo propuesto por parte del inserto de máster.

En cuanto al protocolo usado se siguió tal cual lo propuesto por el inserto de “*Luna® Universal qPCR Máster Mix*” con una pre-desnaturalización inicial a 95°C por 1 minuto, para posteriormente llevar a cabo 40 ciclos compuestos por una desnaturalización a 95°C por 15 segundos junto a una extensión a 60°C por 30 segundos.

3.4.3 Tercer método

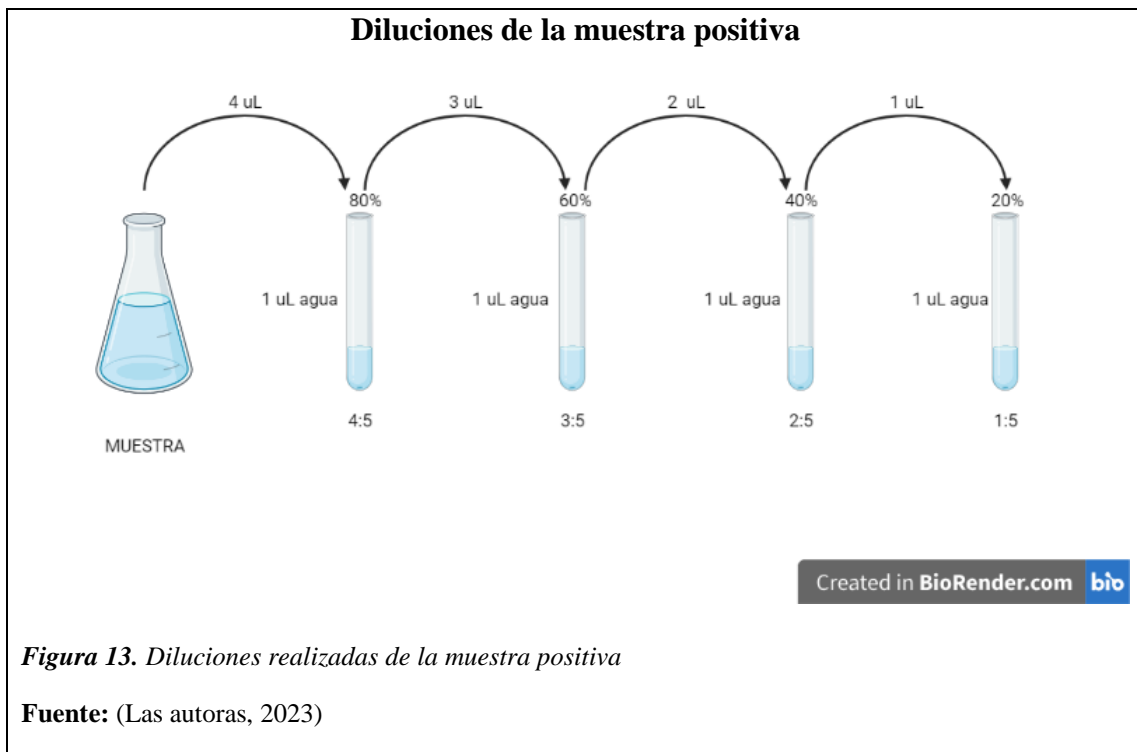
El tercer método nos basamos para las cantidades de los compuestos en lo propuesto por la OIE, mientras que el protocolo fue algo realizado por Inmunolab, (2023) de forma *in house* tomando de referencia otros protocolos usados en otras detecciones. Primero se inició con una pre-amplificación que contenía 12.5 uL de máster, 0.6 uL de cada par de primers, 2 uL de muestra y 8.5 uL de agua, con una concentración de 1x para todos los componentes usados. Dentro de la misma se propone una pre-desnaturalización inicial de 94°C por 4 minutos, para luego realizar 30 ciclos compuestos por una desnaturalización a 94°C por 30 segundos junto a una hibridación a 54°C por 45 segundos, para finalmente tener una extensión de 1 ciclo de 72°C por 4 minutos.

Para la posterior amplificación se usó 6.25 uL de máster, 4 uL de agua, 0.6 uL de cada uno de los *primers*, 0.6 uL de *eva green* y 1uL del producto de la pre-amplificación que será usado como muestra. En esta amplificación se aplicó una pre-desnaturalización inicial a 94°C por 4 minutos, luego 40 ciclos compuestos por una desnaturalización a 94°C por 30 segundos junto a una hibridación a 54°C por 45 segundos.

3.5 Evaluación del protocolo qPCR

Una vez escogido o estandarizado el protocolo, fue necesario analizar el nivel de detección de este haciendo uso de diferentes diluciones del control positivo. Para este punto se realizaron diluciones de las muestras positivas que se obtuvieron previamente, y posteriormente se hizo una extracción de ADN puro haciendo uso de la metodología *in house*. Una vez hecha la extracción, se hicieron 4

diluciones con agua libre de nucleasas de este control positivo con los factores de diluciones como muestra la **Figura 13**. Estas diluciones fueron después corridas con el protocolo de qPCR del que se obtuvo mejores resultados, y finalmente se le realizó una electroforesis por 45 minutos a 110 V (esto para corroborar la presencia del virus en las muestras empleadas). Este proceso es realizado con la finalidad de ver la sensibilidad que tendrá el protocolo mientras más baja es la concentración de ADN evaluado.



4 Resultados esperados y discusión

4.1 Obtención de muestras

Las muestras se obtuvieron directamente de diferentes piscinas de Guayas y Manabí, y posteriormente estas fueron rotuladas para poder identificar cada individuo como se muestra en la **Figura 14**. De cada provincia se seleccionaron dos piscinas y de cada una de estas se recolectaron de 5 a 10 muestras de camarón aproximadamente. Estas muestras de camarón obtenidas fueron seleccionadas al azar, siendo que en algunos de los casos presentaban ligeramente ciertas características referentes a la mancha blanca.

Dentro de las muestras se logró obtener una muestra positiva, la cual presentaba todos los signos y síntomas visiblemente como son manchas blancas en la zona del cefalotórax, los urópodos y las antenas de color rojizo, por lo cual fue tomada como el control positivo dentro de la estandarización (Wang et al., 2000).

Muestras obtenidas de las piscinas



Figura 14. Muestras obtenidas con rotulación respectiva (número de individuo, provincia y número de piscina)

Fuente: (Las autoras, 2023)

4.2 Extracción de ADN

4.2.1 Cuantificación de ADN

Para hacer la cuantificación de ADN se emplearon dos métodos con diferentes equipos, siendo uno por *Qubit* y otro con *NanoDrop*. En el caso de la cuantificación por *Qubit* se obtuvo que la mayor cantidad de ADN extraída fue del tejido por medio del método *Viasure*, el cual es un *kit* comercial que tiene bien distinguida una metodología en la parte del lisado que se diferencia a las demás metodologías **Tabla 2**. Dentro de este método se hace uso de una serie de soluciones y reactivos, empezando con una solución PBS que mantendrá un pH estable, además, de que ayuda en la expresión normal de las células (Laboratorio de Genómica Viral y Humana, 2008). Otro compuesto que no está dentro de los demás *kits*, es el “*Carrier DNA-RNA*” que se trata de un compuesto que busca reducir el riesgo de que el ADN o ARN del virus se degrade, con lo cual dentro de esta parte se justifica el hecho de que conserve una mayor cantidad de ADN (Macherey, 2014). Por otra parte, también se usó proteinasa K que colabora en la lisis de proteínas para así poder liberar al ADN que hay dentro de las mismas (Cariaga & Zapata, 2007). Basado en todo lo anteriormente expuesto se puede denotar que una de las razones para que este método extraiga tanta cantidad de ADN es el uso de una combinación de compuestos que no solo ayudan en el lisado, sino también en la estabilización de las condiciones del proceso, sin embargo, presenta una desventaja que es el alto costo.

Siguiendo con la cuantificación por *Qubit*, obtuvimos en segundo lugar los resultados por medio del *kit* comercial “*One step*”, en donde lo diferente que tiene en comparación a los otros métodos es el uso de una solución tampón NST la cual ayuda en la estabilización del pH. Sin embargo, se logró notar que al final el ADN extraído tenía un color amarillento lo que podría tratarse de contaminantes, además, lo extraído tiene una textura líquida que al voltear el *eppendorf* se movía con toda facilidad, y no como normalmente debe ser una buena extracción en donde el ADN no se mueve al girar el *eppendorf*.

También está el método recomendado por la OIE en el cual algo a destacar es la incubación, la cual ayuda a mejorar el proceso de extracción y concentración del ADN, esto junto a la mejora en cuanto a la pureza de la extracción (Sancho et al., 2022). Sin embargo, es un método que conlleva gran cantidad de tiempo para su realización, lo que resulta en que la estandarización al final sea más larga, además, de que se ocupa una diversidad de productos que aumentan el costo del método **Tabla 2**.

Por otro lado, también se obtuvo buenos resultados por medio de la extracción de ADN del raspado haciendo uso del método *in house*, el cual tiene una muy buena capacidad de extracción, además, que es un método menos costoso que por *kit* comercial, lo que le confiere una gran ventaja **Tabla 2**.

La extracción con la que se obtuvo menos cantidad de producto de ADN fue la del líquido por medio del método *in house*, ya que el líquido al que se buscaba realizar la extracción era etanol, en el cual se suelen conservar las muestras de tejido **Tabla 2** (Rojas et al., 2005). Lo que sugiere que la poca cantidad de ADN no es por el método usado, sino por la muestra que no contenía ADN suficiente como para ser extraído y posteriormente analizado.

Tipo de extracción de ADN	Tipo de muestra	ng/mL	ug/mL
<i>In house</i>	Líquido	<0.50	<0.50
<i>In house</i>	Cáscara	5.92	1.18
<i>In house</i>	Tejido	5.42	1.08
<i>In house</i>	Raspado	14.2	2.85
<i>Viasure</i>	Tejido	222	44.3
<i>One Step</i>	Tejido	42.2	8.45
<i>BioBasic</i>	Branquias 1	<0.50	<0.50
<i>BioBasic</i>	Branquias 2	<0.50	<0.50

OIE Kit <i>Com</i>	Tejido + branquias	-	-
OIE Kit <i>Com</i>	Tejido	-	-

Tabla 2. Cuantificación por *Qubit*

Fuente: (Las autoras, 2023)

En cuanto a la cuantificación por *NanoDrop* vimos que los resultados son muy parecidos a los obtenidos por la cuantificación por *Qubit*, sin embargo, algo a destacar dentro de esta cuantificación es el hecho de que se puede hacer una observación de la pureza de las muestras mediante el factor A260/280, el cual si los valores están dentro del rango de 1,7 a 2, se trata de un ADN ideal **Tabla 3** (Banco ADN, 2020). Dentro de estos valores los métodos con mejor calidad basándose en este factor sería el método *in house* del tejido lo que sugiere que este es un buen método de extracción que evita contaminación externa **Tabla 3**. Luego está el método *Viasure* que como se vio hace uso de diferentes compuestos en la parte del lisado de proteínas, además, que hace uso de dos buffers para lavados lo cual mejora la eliminación de polisacáridos y proteínas con lo cual se asegura una mejor calidad del ADN y una dilución más sencilla **Tabla 3** (Cerde & Díaz, 2013). En el caso de método *One-step* y *BioBasic* hacen uso de un solo *buffer* de lavado lo que sugiere, con lo cual igual se mantiene una buena calidad, sin embargo, para mejorarla es necesario hacer dos lavados. Otra recomendación que se hace dentro de los protocolos de extracción es el uso de ARNsa para así lograr una mayor purificación del ADN y evitar falsos positivos durante la amplificación (Lopera et al., 2008).

Nombre de muestra	Ácido nucleico(ng/uL)	A260/A280	A260/A230
<i>In house</i> - Cáscara	343.887	2.010	2.009
<i>In house</i> –Tejido	17.358	1.875	0.327
<i>In house</i> - Raspado	13.316	1.685	0.430
<i>Viasure</i> - Tejido	12.880	1.815	0.409
<i>One Step</i> - Tejido	39.911	1.919	0.451
<i>BioBasic</i> – Branquias 1	18.712	2.264	0.271
<i>BioBasic</i> Branquias 2	36.626	1.966	0.254

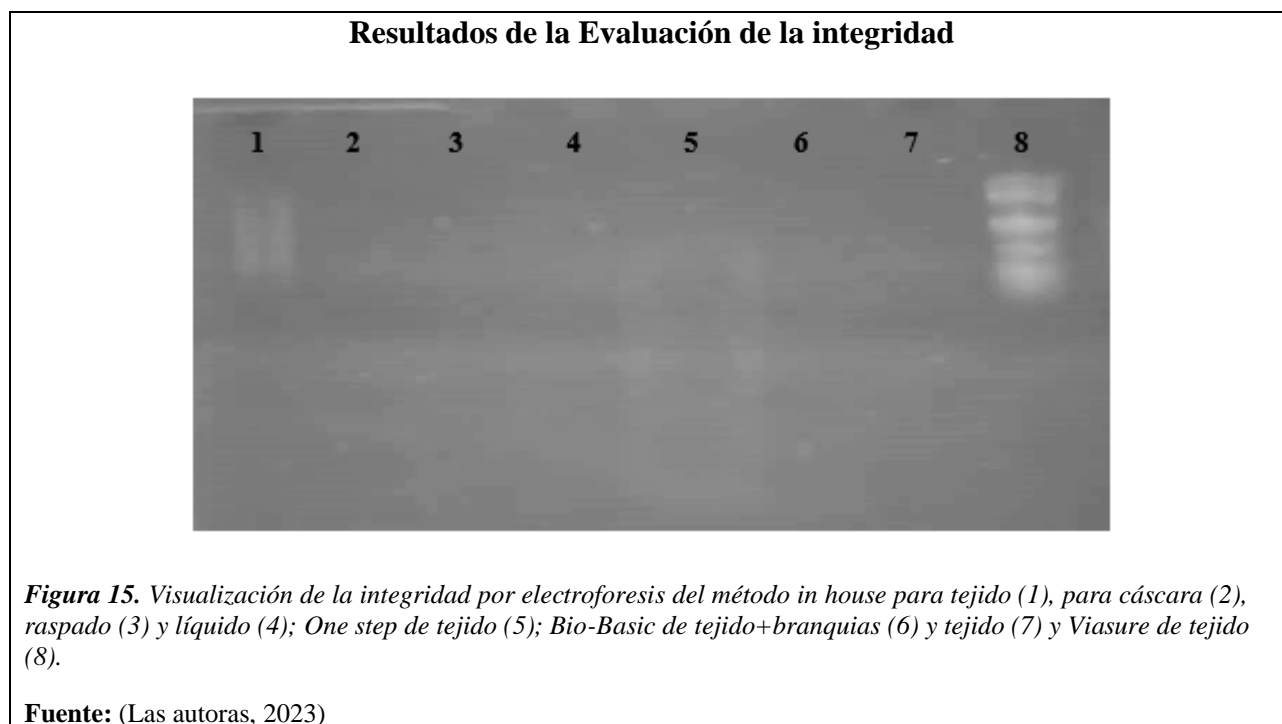
Tabla 3. Cuantificación por NanoDrop

Fuente: (Las autoras, 2023)

4.2.2 Evaluación de la integridad del ADN

Para la evaluación de la integridad se emplearon las diferentes extracciones de ADN previamente realizadas con las diferentes metodologías de extracción, dichas muestras fueron empleadas como lo muestra la **Figura 15**. En la cual es posible observar que los métodos de extracción demuestran una mejor calidad en el *Viasure* y la *in house*, en ambos casos de la extracción de tejido se visualizaron bandas. Mediante la visualización es posible destacar que por el método de *Viasure* las bandas son más claras en comparación al método *in house*, sin embargo, la disposición de las mismas son similares lo que significa que ambos métodos logran obtener ADN con una similitud de integridad, a pesar de que, en el caso de *Viasure* se trata de un *kit* comercial que suelen tener un mejor rendimiento y el método *in house* es algo casero (Alejos et al., 2019). Por otro lado, la integridad no tan buena del ADN en el caso del método *Viasure* podría ser por haber tantos compuestos dentro del lisado, lo que llegaría a sobresaturar el sistema y de esa manera afectar el rendimiento del proceso de extracción, además de obtener un producto con bastantes impurezas (Alejos et al., 2019). Sin embargo, a pesar

de todo lo expuesto con anterioridad el hecho de una baja integridad del ADN no significa que no pueda ser usado dentro de los procesos que posteriormente se vayan a realizar.



4.3 Evaluación de *primers*

4.3.1 Análisis de *primers*

4.3.1.1 Primer set de *primers*

Para el análisis de *primers* se usó *OligoAnalyzer* donde para la secuencia *foward* 5'-CGATCTTGAAAGGTTATC-3' se obtuvieron los resultados que muestra el **Anexo 2**. Dentro de los mismos podemos observar que la longitud del primer es de 19 nucleótidos en donde el porcentaje de GC es de un 42.1% y en el caso de la temperatura de *melting* esta es de 47.8°C. Por otro lado, se puede llegar a dar una sola horquilla durante una temperatura de 33.2°C que es una temperatura que no se usa dentro del protocolo, o no está cercana a ninguna de estas. También se tomó en cuenta los auto dímeros, donde en un primer caso hay la posibilidad que la cadena del cebador se una entre sí en 8 pares de bases.

En el caso del primer *reverse*, 5'-GAGCCTAGT CTATCAATCA-3' los resultados son los mostrados en el **Anexo 3**. Donde se puede observar que tiene una longitud de 19 nucleótidos igual a *forward*, esto con un contenido de GC de 42.1%, junto con una temperatura de *melting* de 47.9°C, siendo algo a destacar que la diferencia de Tm entre ambas no es significativa. Además, en esta vemos mayor cantidad de posibilidades en la formación de horquillas siendo el primer caso a una temperatura de 5.9 °C, y en el caso de auto dímeros hay la posibilidad que el cebador se una entre sí en 4 pares de bases.

En este par de *primers* es posible observar que la longitud de ambos está dentro de lo ideal que es entre los 18 y 24 nucleótidos, y en el caso de porcentaje GC también están dentro del rango recomendado que es entre 40-60% para que exista una buena unión de los *primers* (Sharma, 2021).

En el caso del Tm ninguno de los dos está dentro de la temperatura en la que se obtienen mejores resultados que es entre 52 y 65°C lo que implicaría que podría llegar a existir problemas al momento de la unión de los *primers* con la cadena de ADN. Sin embargo, algo importante a destacar es el hecho de que la diferencia de Tm entre ambos es mucho menor a los 5°C recomendados (Pinzón, 2007).

En el caso de la formación de horquillas, no hay una cantidad significativa de posibilidades de se formen, además, que las temperaturas en las cuales se podrían llegar a formar no están dentro del proceso de la qPCR que tiene temperaturas de 95°C, 55-65°C y 72°C (Adams, 2020).

4.3.1.2 Segundo set de primers

Para este segundo set de *primers* tenemos la secuencia *forward* 146F2 (5'-GTAAGTGGCCCTTCCATCTCCA-3') la cual se obtuvieron los resultados mostrados en el **Anexo 4**. Dentro del análisis se tiene un contenido de GC de 54.5 % y una temperatura de *melting* de 58.8°C. En cuanto a la formación de horquillas hay la posibilidad de formarse a una temperatura de -13.9 y otras, por otro lado, hay la posibilidad de formación de auto dímeros en 2 pares de bases de los cebadores.

En el caso de la secuencia *reverse* 146R2 (5'-TACGGCAGCTGCTGCACCTTGT-3') hay un porcentaje GC de 59.1% y una temperatura de *melting* de 63.9°C. La diferencia de temperatura de *melting* entre *forward* y *reverse* es de 5.1°C. En el caso de la formación de horquillas se puede formar a una temperatura de 50.1°C y hay la posibilidad de formación de auto dímeros de los cebadores en 8 pares de bases.

Dentro de este set de *primers* la T_m está entre 52 y 65°C que es ideal y no generará ruido durante el proceso, sin embargo, la diferencia de T_m entre *forward* y *reverse* es mayor a 5°C (5.1°C específicamente) lo que puede generar que haya problemas en el rendimiento de la reacción y generar ineficiencia durante el proceso (Judelson, 2017).

En cuanto al contenido de guaninas y citosinas, en ambos casos están dentro del porcentaje ideal, siendo esto importante por el hecho de que hay un aumento de estabilidad y especificidad al brindar una unión fuerte y específica entre *primers* y la cadenas de ADN (Kechin et al., 2020).

Por otro lado, se observa la formación de horquillas en ambos casos, sin embargo, es más preocupante la formación de horquillas que se da en el caso de *reverse* ya que las temperaturas en las cuales se puede llegar a dar son relativamente cercanas a las temperaturas usadas durante el protocolo de qPCR (Arya et al., 2005).

4.4 Amplificación por qPCR

Una vez realizados todos los protocolos, con el único protocolo que se obtuvo resultados fue con el desarrollado de forma *in house* con el segundo set de *primers*. Dentro de este protocolo se plantean diferencias en comparación a los otros protocolos, siendo en el caso de la comparación con el protocolo propuesto por la “Luna® Universal qPCR Máster Mix” el hecho de la realización de una pre-amplificación, mientras que en el caso del primer protocolo propuesto por “Ma et al., (2022)” la diferencia está en las temperaturas y en el hecho de que en el método *in house* se aumentó un ciclo de extensión de 72°C por 4 minutos como muestran **Tabla 1** mostrada en la metodología.

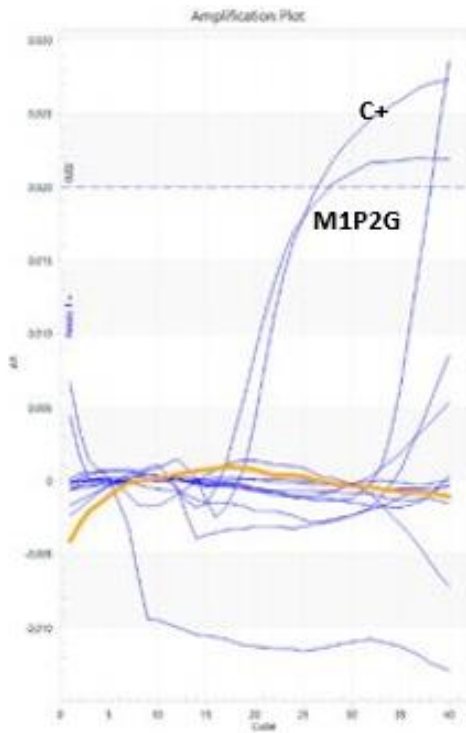
Con esto se puede decir que hay ciertas ventajas al hacer uso de una pre-amplificación, esto debido a que por un lado aumenta la concentración del ADN objetivo hasta en 1000 veces o más en solo 10-14 ciclos, sin llegar a comprometer la sensibilidad que tendrá el protocolo de qPCR posteriormente. Hay que recalcar el hecho de que la sensibilidad se mantendrá, no empeorará ni mejorará con el uso de una pre-amplificación, sin embargo, si puede llegar a producir valor de Ct más tempranos al haber mayor cantidad del ADN objetivo (Fenrich, 2018). Por otra parte, el hecho de que se haya hecho uso de un ciclo con la temperatura exclusiva para extensión durante la pre-amplificación, aumenta la sensibilidad y especificidad durante la síntesis de las nuevas cadenas, al tener la posibilidad de unirse los nucleótidos y extender (Checa, 2016).

En cuanto al proceso de amplificación ya como tal las temperaturas no presentan mayor diferencia, sin embargo, en el alineamiento y extensión hay una temperatura de *melting* de 60°C en el caso de “Ma et al., (2022)” y en el protocolo que logramos la amplificación es de 54°C. En este caso la temperatura de alineamiento en ambos está dentro de lo recomendado e ideal, sin embargo, se puede llegar a tomar en cuenta que una buena temperatura de alineamiento es la Tm restado 5°C (Méndez & Pérez, 2004). En el caso del tercer método esto se puede cumplir en uno de los *primers*, mientras que en el otro caso se le acerca.

En la **Figura 16** es posible observar que hay una buena amplificación del control positivo, además, se logró encontrar una muestra que también es positiva ya que tiene un crecimiento de la curva en un ciclo muy cercano al control, además, en la curva de melting es posible denotar que ambos presentan la misma fluorescencia.

Resultados de amplificación por qPCR

A)



B)

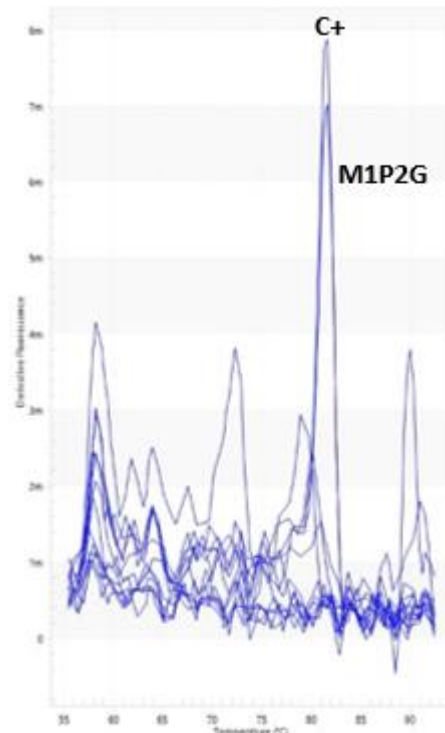


Figura 16. Resultados de la amplificación por qPCR con el protocolo in house A) Gráfica de los resultados B) Curva de melting

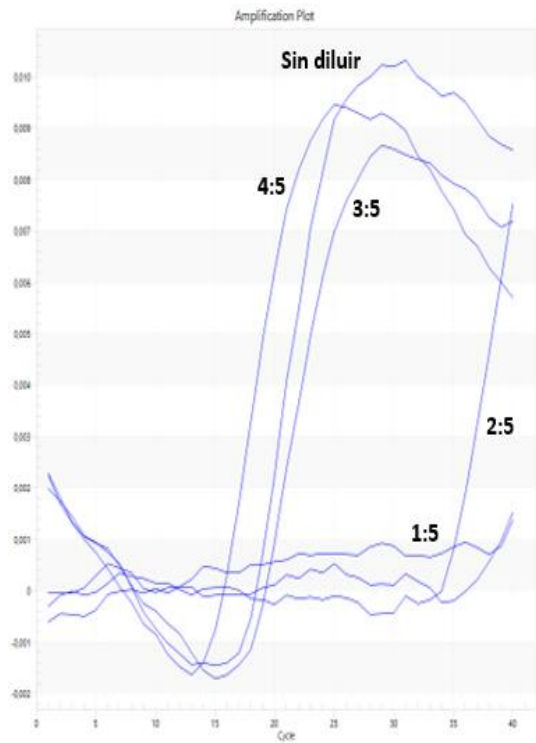
Fuente: (Las autoras, 2023)

4.5 Evaluación del protocolo qPCR

Una vez que se estableció el protocolo se procedió a correr las diluciones previamente hechas, probando dos formas del protocolo, una con la pre-amplificación y otra realizando únicamente el proceso de amplificación para ver cuál sería la diferencia que existe, obteniendo así que mientras más baja es la concentración de la muestra, habrá una emisión más baja de fluorescencia. En el caso de la evaluación realizada sin pre-amplificación tenemos los resultados obtenidos que presenta la **Figura 17**. donde podemos ver que las curvas presentan ciertas irregularidades, y en el caso de la curva de *melting* no emiten la fluorescencia exactamente en el mismo punto.

Evaluación del protocolo de qPCR sin pre-amplificación

A)



B)

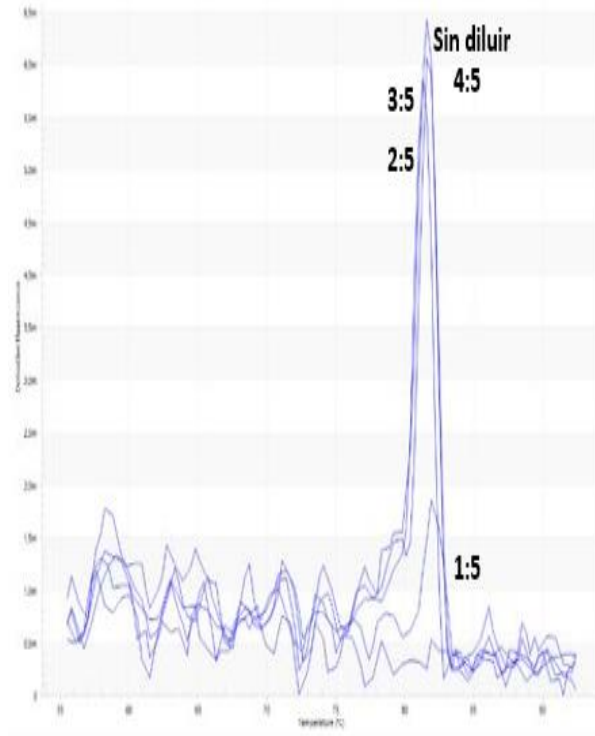


Figura 17. Resultados del protocolo de qPCR sin pre-amplificación

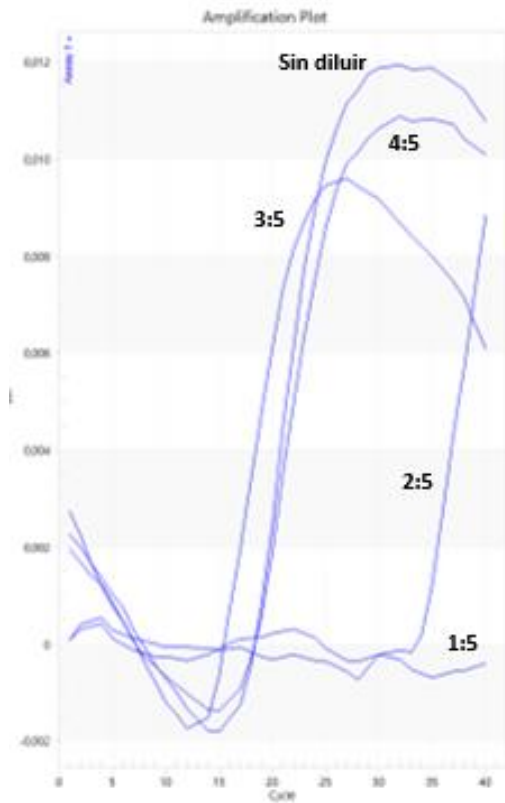
A) gráfica de la amplificación B) curva de melting

Fuente: (Las autoras, 2023)

Para los resultados obtenidos haciendo la pre-amplificación tenemos los observados en la **Figura 18.** donde es posible observar que los resultados recogidos por la fluorescencia arrojan que las diluciones han ido emitiendo diferentes intensidades de fluorescencia, ya que, en la amplificación se nota que la curva se da en ciclos similares, pero la mismas el de diferentes alturas, y en el caso de la curva de melting los picos son más bajos a medida que se baja la concentración.

Evaluación del protocolo de qPCR con pre-amplificación

A)



B)

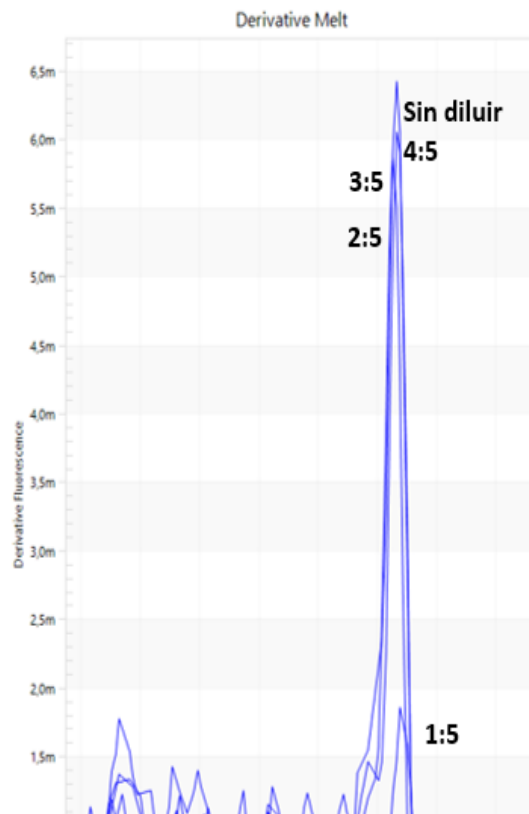


Figura 18. Resultados del protocolo de qPCR con pre-amplificación

A) gráfica de la amplificación B) curva de melting

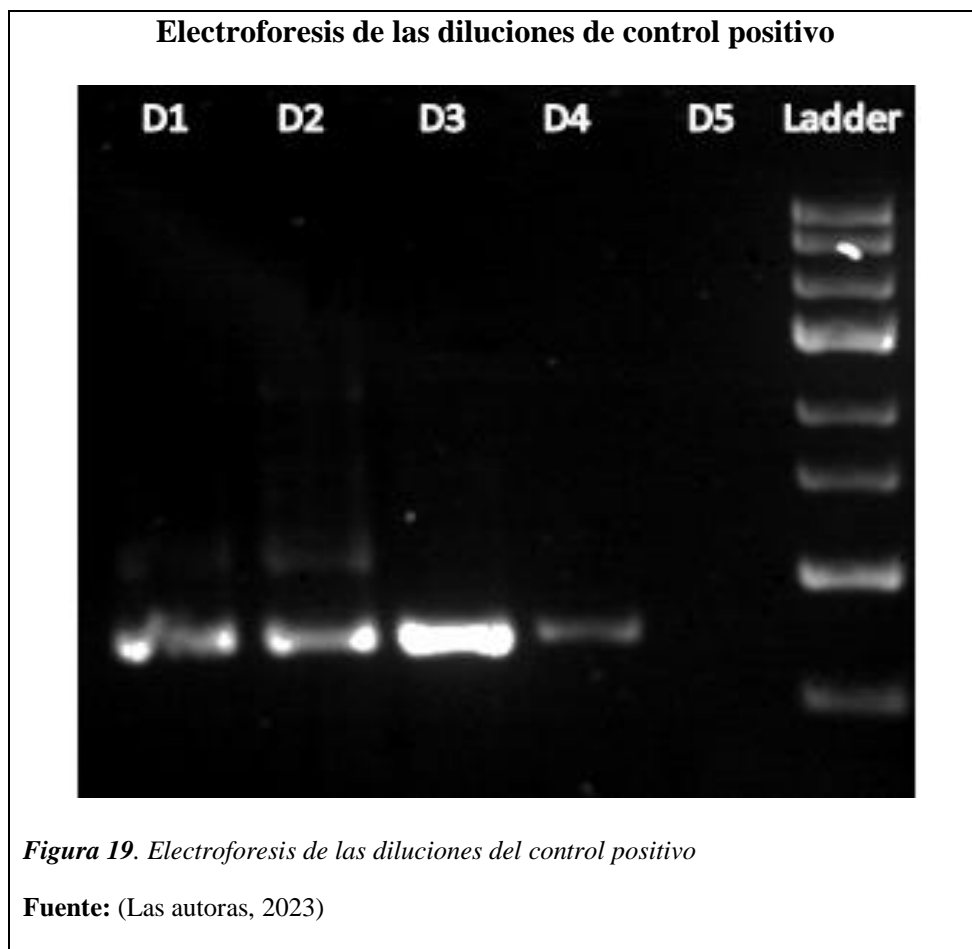
Fuente: (Las autoras, 2023)

Para sintetizar los resultados obtenidos en ambos casos, se determina que mientras mayor dilución hay de las muestras, asciende la posibilidad de no tener resultados ya que una muestra muy diluida es igual a tener menos ADN para amplificar y detectar, afectando así la eficacia del protocolo (Applied Biosystems, 2005).

En el caso de la diferencia que hay entre las gráficas mostradas está el hecho de la precisión de las curvas, tomando en cuenta que el Ct es similar en ambos casos. Esto se puede dar por diversas razones, siendo una de estas la mencionada con anterioridad en el hecho de que la pre-amplificación brinda mayor cantidad de copias de ADN objetivo, lo que le da al protocolo más posibilidad de tener

resultados claros (Fenrich, 2018). Por otro lado, algo más que puede influir en los resultados o más bien en la emisión de la fluorescencia, son los factores ambientales tales como el pH de la solución y las concentraciones de sales y más del mismo, ya que, se puede tener mismas concentraciones de todos los componentes y aun así obtener resultados diferentes (Applied Biosystems, 2016).

Dentro de este ensayo, se procedió también a realizar una electroforesis confirmatoria que es la presentada en la **Figura 19**. En la que es posible definir que pasa lo mismo que en el caso de la qPCR, donde mientras más diluida se encuentra la muestra, el protocolo ya no genera ninguna reacción y no se observa fluorescencia alguna, sin embargo, es posible notar que hay una banda más clara en la dilución 3, lo que significa que para una electroforesis cumple con la concentración ideal.



5 Conclusiones y recomendaciones

En conclusión, se colectaron 5 muestras de camarón por piscina de las provincias de Guayas y Manabí, cabe resaltar que por provincia se muestrearon dos piscinas; dichas muestras se mantuvieron en condiciones de temperatura óptimas y recipientes adecuados para evitar inconvenientes. Se recomienda mantener una buena cadena de frío, además, de recolectar las muestras en sus primeros estadios.

En el caso de los protocolos de extracción de ADN se probaron 5 metodologías de las cuales la mejor fue *in house*, ya que, brinda mayor cantidad de ADN de buena calidad y libre de contaminantes, además, es un protocolo de bajo costo. Se recomienda el uso de la metodología *in house* por los buenos resultados que presenta, además de ser sencillo de realizar y por su bajo costo.

Por otro lado, se analizaron dos sets de *primers*, de los cuales el que mejor respuesta tuvo fueron los propuestos por la OIE; además se constató que estos *primers* que están recomendados para realizar la PCR anidada también pueden ser usados para realizar la qPCR, obteniendo buenos resultados. Se recomienda el uso de los *primers* sugeridos por la OIE, por su gran factibilidad en conjunto con el protocolo propuesto.

En cuanto a la estandarización del protocolo, se determina que es posible la detección del virus de la mancha blanca haciendo uso de la técnica de qPCR, lo que trae consigo la obtención de resultados concretos en un menor tiempo. Además, se pudo determinar la necesidad de una pre-amplificación para obtener resultados más claros. Entre las recomendaciones que se pueden realizar es el uso de los dos sets de *primers* siendo *forward* 5'-GTA-ACT-GCC-CCT-TCC-ATC-TCC-A-3' y *reverse* 5'-TAC-GGC-AGC-TGC-TGC-ACC-TTG-T-3, con todos los protocolos, ya que, se pudo observar que no hay mayores diferencias entre el primer y tercer protocolo desarrollado de forma *in house*, por lo cual hay la posibilidad de que se pueda obtener resultados en ambos casos.

Finalmente, se logró la estandarización del protocolo con la técnica molecular de qPCR para la identificación de la enfermedad de la mancha blanca en camarones de piscina, además, se logró

establecer las especificaciones necesarias a tomar en cuenta durante este procesamiento. Por otro lado, para lograr una buena viabilidad del protocolo se recomienda que los establecimientos que lo lleven a cabo sigan todos los pasos correspondientes a la metodología, para llegar a obtener buenos resultados.

6 Bibliografía

- Adams, G. (2020). A beginner's guide to RT- PCR, qPCR and RT- qPCR. *Portland press*, 1–6. <https://portlandpress.com/biochemist/article-pdf/doi/10.1042/BIO20200034/884464/bio20200034.pdf>
- Alejos, L., Aragón, M., & Cornejo, A. (2019). Extracción y purificación de ADN. In *Herramientas moleculares aplicadas en ecología* (p. 26). Universidad Santo Tomás Chile.
- Alfaro, A. C., Nguyen, T. V., Bayot, B., Rodriguez Leon, J. A., Domínguez-Borbor, C., & Sonnenholzner, S. (2021). Metabolic responses of whiteleg shrimp to white spot syndrome virus (WSSV). *Journal of Invertebrate Pathology*, *180*, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2021.107545>
- Applied Biosystems. (2005). *Essentials of real time PCR about sequence detection chemistries taqman chemistry. ReVision*, 1–8.
- Applied Biosystems. (2016). *Real-time PCR: understanding Ct. ThermoFisher*. <https://www.thermofisher.com/ec/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center/real-time-pcr-basics/real-time-pcr-understanding-ct.html>
- Arias, E. C., & Torres, K. E. (2019). Análisis de las exportaciones de camarón antes y después de la firma del acuerdo multipartes entre Ecuador y la Unión Europea. *Revista Observatorio de La Economía Latinoamericana*, 1–10. <https://www.eumed.net/rev/oel/2019/03/exportaciones-camaron.html>
- Arya, M., Shergill, I. S., Williamson, M., Gommersall, L., Arya, N., & Patel, H. R. H. (2005). Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, *5*(2), 209–219. <https://doi.org/10.1586/14737159.5.2.209>
- Banco ADN. (2020). Programa de control de calidad de ácidos nucleicos. Banco nacional de ADN. *Banco ADN*, 1–10. www.bancoadn.org
- Beijnen, J. (2009). *Production methods for the whiteleg shrimp*. <https://thefishsite.com/articles/production-methods-for-the-whiteleg-shrimp>

- Benchmark. (2022). *Shrimp larvae management guide*. https://wp-bmkgenetics-2022.s3.eu-west-2.amazonaws.com/media/2021/05/01133136/Benchmark-Genetics_Shrimp-Larvae-Feeding-Guide_DIGITAL_ENG.pdf
- Bertsch, G. (2023). Camaronicultura en México. <https://www.veterinariadigital.com/en/articulos/shrimp-farming-in-mexico/>
- BIO BASIC. (2019). *BIO BASIC* kit de mini preparación de ADN de suelo con columna giratoria EZ-10.
- BIO BASIC. (2020). *One-Tube Tissue DNA Extraction Kit*.
- Boschi, E. E., & Angelescu, V. A. (1982). Descripción de la morfología externa e interna del langostino con algunas aplicaciones de índole taxonómica y biológica. https://aquadocs.org/bitstream/handle/1834/21978/BolIBM_1.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Cariaga, A., & Zapata, P. (2007). El laboratorio de biología molecular. In universidad nacional de misiones (Editorial). https://editorial.unam.edu.ar/images/documentos_digitales/El_laboratorio_de_biologia_molecular-Ariel_Ernesto_Cariaga_Martinez__Pedro_Dario_Zapata.pdf
- CerTest. (2022). *Viasure RNA-DNA Extraction Kit*
- Cerda, D. A., & Díaz, V. (2013). Optimización de un protocolo de extracción de ADN genómico para *Pinus tecunumanii*.
- Chaivisuthangkura, P., Longyant, S., Rukpratanporn, S., Srisuk, C., Sridulyakul, P., & Sithigorngul, P. (2010). *Enhanced white spot syndrome virus (WSSV) detection sensitivity using monoclonal antibody specific to heterologously expressed VP19 envelope protein*. *Aquaculture*, 299(1–4), 15–20. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.12.005>
- Checa, A. (2016). PCR: Reacción en cadena de la polimerasa. *Conogasi, Conocimiento Para La Vuda*.
- Conde, S. (2019). Ciclo de vida del camarón. <https://misanimales.com/ciclo-de-vida-del-camaron/>

- Cuéllar, J. (2013). *Enfermedad de las manchas blancas*.
<https://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/white-spot-disease-es.pdf>
- De Gryse, G. M. A., Van Khuong, T., Descamps, B., Broeck, W. Van Den, Vanhove, C., Cornillie, P., Sorgeloos, P., Bossier, P., & Nauwynck, H. J. (2020). The shrimp nephrocomplex serves as a major portal of pathogen entry and is involved in the molting process. *proceedings of the national academy of sciences of the United States of America*, 117(45), 28374–28383.
<https://doi.org/10.1073/pnas.2013518117>
- Del Rosario, M. (2004). Procesamiento de imágenes policromáticas como método de diagnósticos del virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV) en camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) [Tesis de maestría]. Centro de investigación en alimentación y desarrollo, A.C.
- Dey, B. K., Dugassa, G. H., Hinzano, S. M., & Bossier, P. (2019). Causative agent, diagnosis and management of white spot disease in shrimp: a review. in reviews in aquaculture (Vol. 12, Issue 2, pp. 822–865). Wiley-Blackwell. <https://doi.org/10.1111/raq.12352>
- Edwards, M. (1837). *Penaeus indicus* (H. Milne Edwards, 1837) [*Penaeidae*].
https://www.fao.org/fishery/docs/DOCUMENT/aquaculture/CulturedSpecies/file/es/es_indian_whiteprawn.htm
- Fadilah, A. N., & Fasya, A. H. (2022). Examination of white spot syndrome virus (WSSV) in white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) and tiger prawn (*Penaeus monodon*) with polymerase chain reaction (PCR) method. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 1036(1).
<https://doi.org/10.1088/1755-1315/1036/1/012083>
- FAO. (1995). *Guía FAO para la identificación de especies para los fines de pesca. 1*, 541–563.
<https://decapoda.nhm.org/pdfs/29676/29676.pdf>
- Fenucci, J. L. (1988). Manual para la cría de camarones Peneidos índice programa cooperativo gubernamental FAO-ITALIA por. <https://www.fao.org/3/AB466S/AB466S00.htm#TOC>
- Flowen. (2020). Control de pH y oxígeno disuelto en la acuicultura. <https://flowen.com.pe/control-de-ph-y-oxigeno-disuelto-en-la-acuicultura/>

- Fenrich, J. (2018). Preamplification and how it can be used to maximize qpcr data generation from limited samples. *Bioradiations*, 1–6.
- Flowen. (2020). Control de pH y oxígeno disuelto en la acuicultura. <https://flowen.com.pe/control-de-ph-y-oxigeno-disuelto-en-la-acuicultura/>
- García, A., Outerelo, R., Ruiz, E., Aguirre, J., Alonso, J., Benito, J., Arillo, A., Berzosa, J., Buencuerpo, V., Cabrero, F., Días, E., Fernández, G., García, I., Gómez, J., Gonzales, D., Gutiérrez, M., Martínez, D., Mínguez, E., Monserrat, V., & Muños, B. (2012). prácticas de zoología estudio y diversidad de los artrópodos crustáceos. *Reduca*, 17–27. <https://www.ucm.es/data/cont/docs/568-2013-12-16-06-Crustaceos.pdf>
- Gonzabay, Á., Vite, H., Garzón, V., & Quizhpe, P. (2021). Análisis de la producción de camarón en el Ecuador para su exportación a la Unión Europea en el período 2015-2020. *Polo Del Conocimiento*, 6(9), 1040–1058.
- Gutiérrez, R. (2004). *Centro de investigaciones pesqueras y acuícolas (CIPA) camarones costeros del pacifico nicaragüense, ciclo de vida y distribución.*
- Hays, L. (2020). Aquaculture in the Philippines: the top 10 diseases shrimp farmers should be aware of. <https://www.qb-labs.com/blog/2020/05/25/top-10-diseases-shrimp-farmers-should-be-aware-of>
- Held. (2022). What you need to know about wild and farmed shrimp. <https://foodprint.org/blog/wild-and-farmed-shrimp/>
- Hernández, A. (2012). *Dinámica de infección del virus del Síndrome de la Mancha Blanca (WSSV), en hemocitos de camarón blanco (Litopenaeus vannamei).* Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.
- Hernández, P., Timaná, M., Robles Maricruz, Peraza, V., Ascencio, F., & Jiménez, E. (2022). Incremento de la supervivencia de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) infectado con el virus de la mancha blanca y alimentado con una dieta suplementada con aceite de coco (*Cocos nucifera*). *Abanico Veterinario*, 12. <https://doi.org/10.21929/abavet2022.2>

- Ibrahim, S., Zhong, Z., Lan, X., Luo, J., Tang, Q., Xia, Z., Yi, S., & Yang, G. (2023). Morphological diversity of different male morphotypes of giant freshwater prawn *macrobrachium rosenbergii* (de man, 1879). *Aquaculture Journal*, 3(2), 133–148. <https://doi.org/10.3390/aquacj3020012>
- Inmunolab, (2023). Protocolo de extracción de ADN. Laboratorio médico. Av. Gran Colombia N13-18 y, Quito 170136
- Inmunolab, (2023). Protocolo de qPCR. Laboratorio médico. Av. Gran Colombia N13-18 y, Quito 170136
- Instituto Nacional de Pesca. (2018). Acuicultura camarón blanco del Pacífico. <https://www.gob.mx/inapesca/acciones-y-programas/acuicultura-camaron-blanco-del-pacifico>
- Invitrogen. (2020). *Qubit™ 1X dsDNA HS Assay Kits Product information* (pp. 1–10).
- Islam, S. I., Mou, M. J., Sanjida, S., & Mahfuj, S. (2022). A review on molecular detection techniques of white spot syndrome virus: Perspectives of problems and solutions in shrimp farming. *Veterinary Medicine and Science*, 9, 778–801. <https://doi.org/10.1002/vms3.979>
- Jiang, G. C., & Chan, T. Y. (2021). Morphology of the first three zoeal stages of the deep-sea caridean shrimp *heterocarpus fascirostratus* yang, chan & kumar, 2018 (Crustacea, decapoda, pandalidae). *ZooKeys*, 1042, 23–34. <https://doi.org/10.3897/zookeys.1042.64407>
- Judelson, H. (2017). Guidelines for designing primers. *Microbiological Analysis of Commercially Prepared Yoghurt*, 1–5.
- Kechin, A., Borobova, V., Boyarskikh, U., Khrapov, E., Subbotin, S., & Filipenko, M. (2020). NGS-PrimerPlex: High-throughput primer design for multiplex polymerase chain reactions. *PLoS Computational Biology*. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1008468>
- Kim, H. (2022). *Shrimp farming: is farm-raised shrimp bad for you? coastal research library; springer*. https://doi.org/10.1007/978-3-030-22240-6_2
- Laboratorio de Genomica Viral y Humana. (2008). Preparación de *phosphate buffered saline* (PBS). *Facultad de Medicina UASLP*, 9–10. http://www.genomica.uaslp.mx/Protocolos/Cell_Buffer_PBS.pdf

- Lee, D., Yu, Y. Bin, Choi, J. H., Jo, A. H., Hong, S. M., Kang, J. C., & Kim, J. H. (2022). Viral shrimp diseases listed by the OIE: a review. In *Viruses* (Vol. 14, Issue 3). MDPI. <https://doi.org/10.3390/v14030585>
- Laboratorio de Genomica Viral y Humana. (2008). Preparación de Phosphate Buffered Saline (PBS). Facultad de Medicina UASLP, 9–10. http://www.genomica.uaslp.mx/Protocolos/Cell_Buffer_PBS.pdf
- Lee, D., Yu, Y. Bin, Choi, J. H., Jo, A. H., Hong, S. M., Kang, J. C., & Kim, J. H. (2022). Viral shrimp diseases listed by the OIE: a review. In *Viruses* (Vol. 14, Issue 3). MDPI. <https://doi.org/10.3390/v14030585>
- Lo, C. F., Ho, C. H., Chen, C. H., Liu, K. F., Chiu, Y. L., Yeh, P. Y., Peng, S. E., Hsu, H. C., Liu, H. C., Chang, C. F., Su, M. Sen, Wang, C. H., & Kou, G. H. (1997). Detection and tissue tropism of white spot syndrome baculovirus (WSBV) in captured brooders of *Penaeus monodon* with a special emphasis on reproductive organs. *Disease of aquatic organisms*, 30(1), 53–72. <https://doi.org/https://doi.org/10.3354/dao030053>
- Lopera, N. M., Povh, J. A., Ribeiro, R. P., Gomes, P. C., Jacometo, C. B., & Da Silva, T. (2008). Comparación de protocolos de extracción de ADN con muestras de aleta y larva de peces: extracción modificada con cloruro de sodio. *Ciencia e investigación agraria*, 35(1), 77–86. <https://doi.org/10.4067/s0718-16202008000100008>
- López, C. (2018). *Las cucarachas y los camarones son prácticamente lo mismo*. <https://www.infobae.com/america/vice/2018/03/31/las-cucarachas-y-los-camarones-son-practicamente-lo-mismo/>
- López, N. (2020). Variación espacio-temporal de la parasitofauna de camarones silvestres y cultivos en el sur del Golfo de México [Tesis de doctorado]. Centro de investigación y de estudios avanzados del instituto politécnico nacional.
- Lotz, J. M., & Soto, M. A. (2002). Model of white spot syndrome virus (WSSV) epidemics in *Litopenaeus vannamei*. *Diseases of aquatic organisms*, 50(3), 199–209.

<https://doi.org/10.3354/dao050199>

Ma, C., Tian, Z., Yang, L., & Cao, J. (2022). Validation of qPCR from a crude extract for the rapid detection of white spot syndrome virus. *Aquaculture international*, 30(5), 2679–2690.

<https://doi.org/10.1007/s10499-022-00920-9>

Macherey, N. (2014). *Viral RNA and DNA User manual*. 1–21.

Macusi, E. D., Estor, D. E. P., Borazon, E. Q., Clapano, M. B., & Santos, M. D. (2022).

Environmental and socioeconomic impacts of shrimp farming in the Philippines. In *Sustainability (Switzerland)* (Vol. 14, Issue 5). MDPI. <https://doi.org/10.3390/su14052977>

Makesh, M., Koteeswaran, A., Chandran, N. D. J., Murali Manohar, B., & Ramasamy, V. (2006).

Development of monoclonal antibodies against VP28 of WSSV and its application to detect WSSV using immunocomb. *Aquaculture*, 261(1), 64–71.

<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.08.034>

Medina, C. (2020). ¿Qué es la técnica PCR (Reacción en cadena de la polimerasa)? *Microbacterium*.

<https://microbacterium.es/que-es-la-pcr-reaccion-en-cadena-de-la-polimerasa>

Mejías, A. V., & Navarro, N. P. (2010). The white spot syndrome virus (WSSV): a review and its impact on Costa Rican shrimp production. *Rev. Ciencias Veterinarias*, 28(2), 51–69.

Méndez, S., & Pérez, E. (2004). La PCR múltiple en microbiología clínica. *Enferm infecc microbiol Clin*, 22(3), 183–192.

Molinos Champion. (2021). ¿Cómo tratar la mancha blanca en los camarones?

<https://www.molinoschampion.com/como-tratar-la-mancha-blanca-en-los-camarones/#:~:text=Si%20bien%20no%20existe%20un%20tratamiento%20para%20recuperar,calidad%20del%20agua%2C%20mediante%20m%C3%A9todos%20como%20la%20cloraci%C3%B3n.>

Montgomery, S. (2010). *Biology and life cycles of prawns*. www.industry.nsw.gov.au/publications

Moore, M. (2023). *Shrimp anatomy, morphology and scientific name*.

<https://goodandgreenguides.com/shrimp-anatomy-morphology-and-scientific-name>

- Moore, M. (2023). Shrimp anatomy, morphology and scientific name. <https://goodandgreenguides.com/shrimp-anatomy-morphology-and-scientific-name>
- Morales, V., Cuéllar-Anjel, Q. J., Cuéllar-Anjel, J., Pantoja, C., Lightner, D. V, Moura, A., Pereira, L., Mendes, E. S., Cristina, T., Gesteira, V., Arns, V., Silva, D., Benedita, A., María, P., Morales-Covarrubias, S., Gómez, B., Margherita, G. R., Luciane, A. B., Perazzolo, M., ... Suárez, G. (2014). *Guía técnica patología e inmunología de camarones penaeidos*. [https://utm.edu.ec/fcv/acuicultura/images/acuicultura/pdf_revistas/Guia Tecnica Patologia Inmunologia de Camarones Penaeidos.pdf](https://utm.edu.ec/fcv/acuicultura/images/acuicultura/pdf_revistas/Guia_Tecnica_Patologia_Inmunologia_de_Camarones_Penaeidos.pdf)
- Morales, V., & Cuéllar, J. (2014). Parásitos en camarones. In *guía técnica -patología e inmunología de camarones Penaeidos* (OIRSA). OIRSA. https://utm.edu.ec/fcv/acuicultura/images/acuicultura/pdf_revistas/Guia_Tecnica_Patologia_Inmunologia_de_Camarones_Penaeidos.pdf
- Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N., & Hase, T. (2000). Notomi et al LAMP.pdf. *Nucleic Acids Research*, 28(12). https://watermark.silverchair.com/2800e63.pdf?token=AQECAHi208BE49Ooan9kxhW_Ercy7Dm3ZL_9Cf3qfKAc485ysgAAAmYwggJiBgkqhkiG9w0BBwagggJTMIICTwIBADCCAkgGCSqGSIB3DQEHATAeBgIghkgBZQMEAS4wEQQMy3AQPdcwVpshAVuIAgEQgIICGSfU5ehJRqbIy2A_4pd12_oNbrQem7FM_kTE9ZYQL40XC4I
- OIE. (2006). Protocolo de muestreo de los crustáceos. In *manual de animales acuáticos*. www.mapa.esdgganade@mapya.esC/AlfonsoXII,62
- OIE. (2021). Infección por el virus del Síndrome de las manchas blancas. In *manual de las pruebas de diagnóstico para los animales acuáticos*.
- OIE. (2019). Infección por el virus del síndrome de las manchas blancas. In *manual de las pruebas de diagnóstico para los animales acuáticos*. https://www.woah.org/fileadmin/Home/esp/Health_standards/aahm/current/chapitre_wsd.pdf
- Peinado, L. I., & López, M. (2006). Detailed monitoring of white spot syndrome virus (WSSV) in

- shrimp commercial ponds in Sinaloa, Mexico by nested PCR. *Aquaculture*, 251(1), 33–45.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.05.022>
- Peña, J. (2013). Electroforesis de calidad del ADN. ZTF-FCT.
<https://www.ehu.es/~ggppegaj/antropogenetica/Practicas/PracticaL5/agenetPractL5.htm>
- Pinzón, A. (2007). *Introducción al Diseño “in silico” de primers*.
- Piedrahita, Y. (2018). *Shrimp farming industry in Ecuador, part 1*. <https://www.globalseafood.org>
- Ramraj, D. (2019). Diseases in Indian shrimp farming-prevention and challenges.
https://www.globalseafood.org/wp-content/uploads/2019/10/Day1_Ramraj_Dahmodar.pdf
- Rajesh, D. P. |. (2021). *Life cycle of shirmp / prawn*. <https://blueseadynasty.com/?p=687>
- Rojas, A. A., Haws, M. C., & Cabanillas, J. A. (2005). *Buenas Prácticas de manejo para el cultivo de Camarón* (A. A. Rojas, M. C. Haws, & J. . Cabanillas (eds.); The David). United States Agency for International Development (Cooperative Agreement No. PCE-A-00-95- 0030-05).
- Rudolph, E. H. (2002). Sobre la biología del camarón de río *Samastacus spinifrons* (philippi 1882) (decapoda, parastacidae). *Scielo* , 66(2). <https://doi.org/10.4067/s0717-65382002000200009>
- Sánchez, A. (2010). White spot syndrome virus: An overview on an emergent concern. *Veterinary Research*, 41(6). <https://doi.org/10.1051/vetres/2010015>
- Sancho, C., Jiménez, E. J., Molina, R., & Umaña, R. (2022). Incubación, pre-lisis y post-purificación en el rendimiento y pureza de ácidos nucleicos extraídos de sangre de cabras domésticas contenida en tarjetas FTA. *Revista Mexicana de ciencias pecuarias*, 13(1), 311–322.
<https://doi.org/10.22319/rmcp.v13i1.5890>
- Saúl, A. (2021). ¿Cómo es el ciclo de vida de los camarones? Molinos Champion .
<https://www.molinoschampion.com/como-es-el-ciclo-de-vida-de-los-camarones/>
- Sharma, M. (2021). Basic Concepts of Primer Designing: a Minireview. *International Journal of Latest Trends in Engineering and Technology*, 17(4), 10–12. <https://doi.org/10.21172/1.174.03>
- Solis, M. (2016). Estrategia bionanotecnológica para el combate del síndrome de la mancha blanca basada en la técnica de phage display [tesis de doctorado]. Centro de Investigaciones biológicas

del noroeste.



- Sun, Y., Hou, H., Dong, D., Zhang, J., Yang, X., Li, X., & Song, X. (2023). Comparative life cycle assessment of whiteleg shrimp (*Penaeus vannamei*) cultured in recirculating aquaculture systems (RAS), biofloc technology (BFT) and higher-place ponds (HPP) farming systems in China. *Aquaculture*, 574, 739625. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2023.739625>
- Van Thuong, K., Van Tuan, V., Li, W., Sorgeloos, P., Bossier, P., & Nauwynck, H. (2016). Per os infectivity of white spot syndrome virus (WSSV) in white-legged shrimp (*Litopenaeus vannamei*) and role of peritrophic membrane. *Veterinary Research*, 47(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s13567-016-0321-5>
- Varela, H., Elizalde, B., Solórzano, S., & Varela, G. (2017). Exportación de camarón de la provincia de El Oro en el contexto del Tratado Comercial con la Unión Europea Shrimp exports in the province of El Oro in the context of the trade agreement with the European Union. In *Revista ESPACIOS* (Vol. 38). <https://www.revistaespacios.com/a17v38n61/17386124.html>
- Wang, Y. G., Hassan, M. D., Shariff, M., Zamri, S. M., & Chen, X. (1999). Histopathology and cytopathology of white spot syndrome virus (WSSV) in cultured *Penaeus monodon* from peninsular Malaysia with emphasis on pathogenesis and the mechanism of white spot formation. *Diseases of Aquatic Organisms*, 39(1), 1–11. <https://doi.org/10.3354/dao039001>
- Wang, Y. G., Lee, K. L., Najiah, M., Shariff, M., & Hassan, M. D. (2000). A new bacterial white spot syndrome (BWSS) in cultured tiger shrimp *Penaeus monodon* and its comparison with white spot syndrome (WSS) caused by virus. *Diseases of Aquatic Organisms*, 41, 9–18.
- Wiradana, P. A., Mahasri, G., Sari, R. E. R., Marwiyah, U. C., & Prihadhana, R. (2019). Identification of white spot syndrome virus (WSSV) in pacific white shrimps (*Litopenaeus vannamei*) from ponds postexposure to immunogenic membrane proteins (*Zoothamnium penaei*). *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 236(1). <https://doi.org/10.1088/1755-1315/236/1/012085>

Woods, A. (2021). Preparación del gel de agarosa 1 %.

https://www.claht.org/web/images/2021/04/Preparaci%C3%B3n_del_gel_de_agarosa_1.pdf

Anexos

Anexo 1. Convenio específico entre Laboratorio Clínico e Inmunológico Inmunolab y la Universidad Politécnica Salesiana para favorecer el desarrollo de trabajos de titulación por parte de estudiantes del nivel de grado de la UPS.



CONVENIO ESPECÍFICO ENTRE LABORATORIO CLÍNICO E INMUNOLÓGICO INMUNOLAB Y LA UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA PARA FAVORECER EL DESARROLLO DE TRABAJOS DE TITULACIÓN POR PARTE DE ESTUDIANTES DEL NIVEL DE GRADO DE LA UPS.

Concurren a la celebración del presente Convenio, por una parte, LABORATORIO CLÍNICO E INMUNOLÓGICO INMUNOLAB, representada legalmente por Dr. Galo Leoro Monroy, a quien en adelante se le denominará INMUNOLAB y, por otra parte, la UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA, representada por María Sol Villagómez, PhD. en su calidad de Vicerrectora de la Sede Quito y la Dra. Ana Reino Molina, en calidad de Procuradora, quienes en adelante se le denominará como LA UNIVERSIDAD. Las partes libre y voluntariamente convienen en celebrar el presente convenio interinstitucional con sujeción a las siguientes cláusulas:

PRIMERA: ANTECEDENTES. -

1. El Laboratorio Clínico Inmunológico INMUNOLAB, fue fundado el 11 de octubre de 1987 en la ciudad de Quito, tuvo su inicio como compañía limitada, actualmente es empresa bajo R.U.C. otorgado a la persona natural Galo Leoro M. con número 0601287006001. Desde su inicio INMUNOLAB ha tenido como objetivo brindar a los habitantes de la Ciudad de Quito el servicio de diagnóstico de laboratorio de alta complejidad teniendo en consideración las limitadas posibilidades económicas de las clases menos favorecidas de esta Ciudad.
Adicionalmente, INMUNOLAB se ha caracterizado por una política de puertas abiertas a estudiantes y profesionales de la rama para la realización de prácticas, pasantías y trabajos de investigación.
2. La Universidad Politécnica Salesiana del Ecuador creada mediante Ley N° 63, publicada en el Registro Oficial N° 499 de 5 de agosto del 1994, es una Institución de Educación Superior particular cofinanciada, católica. Es una persona jurídica de derecho privado, con finalidad social, sin fines de lucro. Acreditada por el Consejo de Acreditación y Aseguramiento de la Calidad (CACES) mediante resolución No. 161-SE-33-CACES-2020.
Su Sede Matriz y domicilio principal se halla en la ciudad de Cuenca, con sedes en las ciudades de Quito y Guayaquil, y con una extensión en el cantón Cayambe dependiente de la Sede Quito en lo académico y administrativo.
Entre otros, su fin es formar personas con madurez humana que sepan hacer coherentemente la síntesis de ética, vida y cultura, para que actúen en la historia en la línea de la justicia, solidaridad y fraternidad, testimoniando los valores éticos más altos del ser humano.

SEGUNDA: OBJETO. -

Con los antecedentes señalados, INMUNOLAB y la UNIVERSIDAD acuerdan celebrar el presente Convenio de Cooperación, mediante el cual, las partes suscriptoras se comprometen y se obligan recíprocamente a colaborar y cooperar conjuntamente para generar el proyecto de titulación propuesto, considerando el mutuo beneficio para las partes interesadas.

DIRECCIÓN TÉCNICA DE VINCULACIÓN CON LA SOCIEDAD Página 1 de 8

Sede Quito, Campus El Girón. Av. 12 de Octubre N24-22 y Wilson. Bloque A, primer piso. Teléfono directo: 3962 811. Teléfonos: 3962 800 / 3962 900 ext.: 2167 - 2113. Correo electrónico: nbastidas@ups.edu.ec

A favor de las estudiantes: Asly Jacksiny Zamora Corozo con C.I. 1752727410 y Greisy Camila Rosero Tamayo con C.I. 1752438737, estudiantes de la Universidad Politécnica Salesiana. Bajo la dirección del tutor Marco Cerna PhD., proponen la realización de la investigación titulada “Estandarización de un protocolo de qPCR para la identificación de la enfermedad de la mancha blanca en camarones de piscina del Guayas y Manabí”.

TERCERA: RESPONSABILIDADES. -

RESPONSABILIDADES DE INMUNOLAB:

Sin perjuicio de las obligaciones establecidas en la normativa que regula lo relativo a trabajos de grado, INMUNOLAB se compromete a:

1. Cumplir y hacer cumplir todas las Cláusulas del Convenio.
2. Designar al administrador del convenio que intervendrá en la supervisión seguimiento y evaluación del Convenio.
3. INMUNILAB se compromete a Facilitar, a las estudiantes de la UPS la información, así como el apoyo técnico-profesional para la estructuración de la investigación y desarrollo de esta.
4. El tiempo a realizarse la investigación, los horarios, actividades, serán determinadas por INMUNOLAB y las estudiantes según sus capacidades, necesidades y políticas internas, al tiempo de iniciación.
5. INMUNOLAB facilitará el acceso a la información y autorizará el uso de aquella que se genere como fruto de la investigación y procesos desarrollados de manera conjunta, con fines académicos y de divulgación científica con el respectivo reconocimiento de autorías.

RESPONSABILIDAD DE LA UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA. -

1. Cumplir y hacer cumplir todas las Cláusulas del Convenio.
2. Designar al administrador del convenio que intervendrá en la supervisión seguimiento y evaluación del Convenio.
3. La UPS se compromete, conforme a su propio reglamento de proyectos de titulación, a hacer un seguimiento de cada uno de los estudiantes.
4. Para la realización de cada proyecto se establecerá una propuesta del proyecto bajo el formato institucional avalado y aprobado por el tutor asignado y por el Consejo de Carrera por cada alumno, en el cual se regularán las relaciones entre el Laboratorio clínico e inmunológico INMUNOLAB y las alumnas, de conformidad a los requerimientos institucionales.
5. Al finalizar el plazo del presente documento, el administrador del convenio deberá entregar un informe de las actividades realizadas con la institución contra parte.
6. Todos los proyectos de grado enmarcados bajo este convenio deberán determinar los derechos de autor establecidos en el Código Orgánico de la Economía Social y de los Conocimientos, según se registra en el anexo A, adjunto a este convenio.

CUARTA: PLAZO. -

El plazo de duración del presente Convenio, es de **UN (1) AÑO** a partir de la suscripción del mismo; pudiendo prorrogar por igual periodo, a menos que una de las partes notifique a la otra, por escrito y con 90 días de anticipación, su intención de no renovarlo.

QUINTA: COORDINACIÓN DEL CONVENIO. -

INMUNOLAB designará un Coordinador del convenio, funcionario que tendrá la obligación de velar por el cabal y oportuno cumplimiento de todas y cada una de las obligaciones derivadas del mismo. El coordinador del Convenio deberá realizar el seguimiento, control y supervisión del convenio, para tales efectos se asignará al Dr. Galo Leoro Monroy con número de teléfono 0969630314 / 02 2239379 y dirección de correo electrónico gleoro@hotmail.com.

La Universidad a través de la carrera de Biotecnología designará al responsable del convenio, persona con quien INMUNOLAB, mantendrá contacto para ejecutar adecuadamente el convenio, para tales efectos el coordinador designado será la docente de la carrera de Biotecnología, BQ. Tatiana Mosquera con número de teléfono 0995400925 y correo electrónico tmosquera@ups.edu.ec.

SEXTA: FINANCIAMIENTO

El presente convenio de carácter general no implica, por sí solo, compromisos presupuestarios para ninguna de las partes.

El financiamiento del trabajo de titulación será asumido de la siguiente manera: el proyecto de titulación será financiado en su totalidad por el Laboratorio INMUNOLAB a cargo del Dr. Galo Leoro Monroy, quien facilitará los insumos técnicos, insumos administrativos, equipos, reactivos e instalaciones para llevar a cabo la investigación. Por parte de las estudiantes no correrá ningún costo de funcionamiento de la investigación más que su trabajo y ejecución del proyecto de titulación.

SÉPTIMA: TERMINACIÓN DEL CONVENIO. -

Las partes darán por terminado el Convenio, de las siguientes formas:

- POR INCUMPLIMIENTO del objeto materia del convenio
- POR MUTUO ACUERDO, en cualquier momento, previo acuerdo de las partes.
- Por causa de fuerza mayor

TERMINACIÓN UNILATERAL, Inmunolab, en cualquier momento dará por terminado, siempre que convenga a sus intereses, en tal caso se comunicará con 15 días de anticipación.

OCTAVA: PROPIEDAD INTELECTUAL Y CONFIDENCIALIDAD

Los descubrimientos e invenciones, las mejoras en los procedimientos, así como los trabajos y resultados de las actividades del practicante, se sujetarán a lo establecido Código Orgánico de

la Economía Social de los Conocimientos, Creatividad e Innovación y la normativa a nivel internacional en materia de propiedad intelectual.

Las Partes se comprometen a guardar y cuidar que se mantenga absoluta confidencialidad de toda la información de la contraparte que llegue a su conocimiento sin limitarse a información verbal, escrita, o por cualquier otro medio, sea o no protegida por derechos de propiedad intelectual, en especial la relacionada con datos personales, los procedimientos, modelos de gestión y negocio, secretos comerciales y políticas internas, que por motivo del presente convenio lleguen a su conocimiento y que no se encuentren catalogados como información pública de acuerdo a la LOTAIP.

La Información Confidencial, así como los materiales de investigaciones utilizados, no podrán bajo ninguna circunstancia ser revelada a terceros, excepto que existiere autorización expresa y por escrito de la parte propietaria de la Información Confidencial, ni podrán realizar las Partes actos de disposición sobre la misma sea con fines comerciales o científicos con la excepción de las autorizaciones expresamente previstas en el presente artículo.

Las Partes se obligan a sí mismos a comprometer al personal que tuviera acceso a la Información Confidencial, a no revelarla a terceros y mantenerla estrictamente confidencial, asumiendo en forma personal quien así obrare, la responsabilidad civil y/o penal que le fuera aplicable. A fin de dar cumplimiento a lo anterior, los profesionales y/o el personal técnico y/o asistentes que deban intervenir total o parcialmente de las tareas relacionadas con la investigación objeto del presente, deberán suscribir Acuerdos de Confidencialidad.

NOVENA: DOMICILIO. –

• **LABORATORIO CLÍNICO E INMUNOLÓGICO INMUNOLAB:**

Dirección: Av. Gran Colombia N13-18 y Julio Castro,
Teléfono: (02) 223-9379 / (02) 252-5254 / 0959268726
Correo Electrónico: consulta@inmunolab.med.ec

• **UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA:**

Dirección: Av. 12 de octubre 2422 y Presidente Wilson
Teléfono: 39628000 y 3962900
Correo Electrónico: tmosquera@ups.edu.ec

Cualquier cambio de dirección deberá ser notificado por escrito a las otras Partes para que surta sus efectos legales; de lo contrario tendrán validez los avisos efectuados a las direcciones antes indicadas.

Se deja expresa constancia que cualquier notificación se realizará a los correos antes mencionados.

DÉCIMA: CONTROVERSIAS. -

En caso de controversias que se deriven de la aplicación de los términos del presente convenio, las partes agotarán todos los mecanismos amigables pertinentes para la solución de éstas; y, solo en el caso que no sea posible solucionarlos, podrán recurrir al procedimiento de mediación, en el Centro de Mediación de la Cámara de Comercio de Quito, de no alcanzar acuerdo de dichas instancias, las partes someterán sus controversias a los Jueces competentes de Quito.

DÉCIMA PRIMERA: DOCUMENTOS HABILITANTES

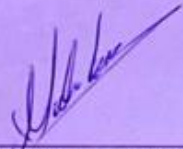
Forman parte integrante del presente Convenio, los siguientes documentos habilitantes:

- a) Copia del nombramiento de Gerente General de INMUNOLAB
- b) Copia del nombramiento de la Vicerrectora de Sede de la UPS.
- c) Copia del nombramiento de la Procuradora de la UPS.

DÉCIMA SEGUNDA: ACEPTACIÓN Y RATIFICACIÓN. -

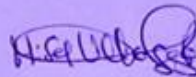
Las partes declaran expresamente su aceptación de todo el contenido del presente Convenio, por haber sido elaborado en seguridad de sus respectivos intereses. Para constancia de las declaraciones presentes y ratificándose en todo su contenido y fiel cumplimiento de lo estipulado, firman tres ejemplares de igual valor y tenor, en la ciudad de Quito, a los 10 días del mes de marzo del 2023.

**POR: LABORATORIO CLÍNICO
E INMUNOLÓGICO INMUNOLAB**

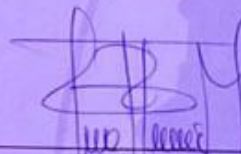


Dr. Galo Leoro Monroy
**GERENTE GENERAL
LABORATORIO CLÍNICO E
INMUNOLÓGICO
INMUNOLAB**

**POR: LA UNIVERSIDAD
POLITÉCNICA SALESIANA**



María Sol Villagómez PhD.
**VICERRECTORA
UNIVERSIDAD POLITÉCNICA
SALESIANA
SEDE QUITO**



Dra. Ana Reino Molina
**PROCURADORA
UNIVERSIDAD POLITÉCNICA
SALESIANA**

RESOLUCIÓN DE DERECHOS DE AUTOR

Gestionado por:	Mgr. Tatiana Mosquera	22-02-2023
Realizado por:	Lcdo. Darwin Cáceres	22-02-2023
Revisado por:	Mgr. Nancy Bastidas	22-02-2023
Aprobación de Sede:	Maria Sol Villagómez R. Ph.D.	22-02-2023
Revisión Legal:	Procuraduría	28-02-2023

de la marcha blanca en versiones de postres del "Chayno y Mameo", a título gratuito.

ANEXO A El suscrito asume toda la responsabilidad frente a terceros y la Universidad, en caso de presentarse cualquier reclamación de parte de terceros respecto de los derechos por suscitados.

En virtud de la presente cesión de derechos la UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA queda facultada para ejercer sin limitación alguna, todos o cualquiera de los derechos patrimoniales mencionados.

En caso de explotación, la Universidad participará al tanto de los regalías, sin perjuicio de las condiciones especiales señaladas en el referido cuerpo legal.

En el supuesto de no explotarse los derechos morales de la obra citada.

Para constancia y de conformidad con lo expuesto, suscribe en unidad de acto en el momento que llega a esta de la obra en formato impreso, electrónico o digital a la Universidad Politécnica Salesiana.

Fecha en Quito, a los 10 días de marzo del 2023.

(Firma)

(Firma)

Maria Sol Villagómez R. Ph.D.

Celular: 0997228465

Fecha: 10 de marzo del 2023

CESIÓN DE DERECHOS DE AUTOR

Yo Zamora Corozo Asly Jacksiny, con cédula de ciudadanía Nro 1752727410, comparezco y expreso mi voluntad de ceder a la UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA, la totalidad de los derechos patrimoniales consagrados en el Código Orgánico de la Economía Social de los Conocimientos, Creatividad e Innovación en calidad de autor/a de la obra intitulada: "Estandarización de un protocolo de qPCR para la identificación de la enfermedad de la mancha blanca en camarones de piscina del Guayas y Manabí", a título gratuito.

Declaro que asumiré toda la responsabilidad frente a terceros y la Universidad, en caso de presentarse cualquier reclamación de parte de terceros respecto de los derechos patrimoniales.

En virtud de la presente cesión de derechos la UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA queda facultada para ejercer sin limitación alguna, todos o cualquiera de los derechos patrimoniales establecidos.

En casos de explotación, la Universidad participará al autor/a de las regalías, sin perjuicio de las condiciones especiales señaladas en el referido cuerpo legal.

En mi condición de autor/a me reservo los derechos morales de la obra citada.

Para constancia y de conformidad con lo expuesto, suscribo en unidad de acto en el momento que hago entrega de la obra en formato impreso, electrónico o digital, a la Universidad Politécnica Salesiana.

Dado en Quito, a los 10 días de marzo del 2023.



Nombre: Asly Jacksiny Zamora Corozo

Cédula: 1752727410

Fecha: 10 de marzo del 2023

CESIÓN DE DERECHOS DE AUTOR

Yo Rosero Tamayo Greisy Camila, con cédula de ciudadanía Nro. 1752438737, comparezco y expreso mi voluntad de ceder a la UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA, la totalidad de los derechos patrimoniales consagrados en el Código Orgánico de la Economía Social de los Conocimientos, Creatividad e Innovación en calidad de autor/a de la obra intitulada: "Estandarización de un protocolo de qPCR para la identificación de la enfermedad de la mancha blanca en camarones de piscina del Guayas y Manabí", a título gratuito.

Declaro que asumiré toda la responsabilidad frente a terceros y la Universidad, en caso de presentarse cualquier reclamación de parte de terceros respecto de los derechos patrimoniales.

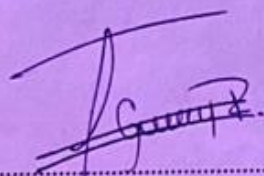
En virtud de la presente cesión de derechos la UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA queda facultada para ejercer sin limitación alguna, todos o cualquiera de los derechos patrimoniales establecidos.

En casos de explotación, la Universidad participará al autor/a de las regalías, sin perjuicio de las condiciones especiales señaladas en el referido cuerpo legal.

En mi condición de autor/a me reservo los derechos morales de la obra citada.

Para constancia y de conformidad con lo expuesto, suscribo en unidad de acto en el momento que hago entrega de la obra en formato impreso, electrónico o digital, a la Universidad Politécnica Salesiana.

Dado en Quito, a los 10 días de marzo del 2023.



Nombre: Greisy Camila Rosero Tamayo

Cédula: 1752438737

Fecha: 10 de marzo del 2023

FIN DEL ANEXO

Resultados de OligoAnalyzer de Foward

A)

Results


RESUSPENSION

DILUTION

SEQUENCE	5'- CGA TCT TGG AAA GGT TAT C -3'
COMPLEMENT	5'- GAT AAC CTT TCC AAG ATC G -3'
LENGTH	19
GC CONTENT	42.1%
MELT TEMP	47.8 °C
MOLECULAR WEIGHT	5842.8 g/mole
EXTINCTION COEFFICIENT	186500 L/(mole·cm)
nmole/OD ₂₆₀ :	5.36
µg/OD ₂₆₀ :	31.33

B) Hairpin

Structures

structure	Image	ΔG (kcal.mole ⁻¹)	T _m (°C)	ΔH (kcal.mole ⁻¹)	ΔS (cal.K ⁻¹ .mole ⁻¹)	Output
1		-0.6	33.2	-22.4	-73.11	<input type="checkbox"/> Ct <input type="checkbox"/> Det

Anexo 2. Resultados obtenidos de F del análisis en OligoAnalyzer

Fuente: (Las autoras, 2023)

Resultados de OligoAnalyzer de Reverse

A)

Results






RESUSPENSION

DILUTION

SEQUENCE	5'- TGA TTG ATA GAC TAG GCT C -3'
COMPLEMENT	5'- GAG CCT AGT CTA TCA ATC A -3'
LENGTH	19
GC CONTENT	42.1 %
MELT TEMP	47.9 °C
MOLECULAR WEIGHT	5842.8 g/mole
EXTINCTION COEFFICIENT	187000 L/(mole-cm)
nmole/OD ₂₆₀	5.35
µg/OD ₂₆₀	31.25

B) Hairpin

Structures

structure	Image	ΔG (kcal.mole ⁻¹)	T _m (°C)	ΔH (kcal.mole ⁻¹)	ΔS (cal.K ⁻¹ mole ⁻¹)	Output
1		1.09	5.9	-15.9	-56.98	<input type="checkbox"/> Ct <input type="checkbox"/> Det
2		1.48	-425.1	0.5	-3.29	<input type="checkbox"/> Ct <input type="checkbox"/> Det
3		1.69	-72.2	-3.5	-17.42	<input type="checkbox"/> Ct <input type="checkbox"/> Det
4		1.86	-13.9	-12.4	-47.82	<input type="checkbox"/> Ct <input type="checkbox"/> Det
5		1.89	-6.6	-15.9	-59.66	<input type="checkbox"/> Ct <input type="checkbox"/> Det

Anexo 3. Resultados obtenidos de R del análisis en OligoAnalyzer

Fuente: (Las autoras, 2023)

Resultados de OligoAnalyzer de Foward (146F)

A)

Results







RESUSPENSION

DILUTION

SEQUENCE	5'- GTA ACT GCC CCT TCC ATC TCC A -3'
COMPLEMENT	5'- TGG AGA TGG AAG GGG CAG TTA C -3'
LENGTH	22
GC CONTENT	54.5 %
MELT TEMP	58.8 °C
MOLECULAR WEIGHT	6566.3 g/mole
EXTINCTION COEFFICIENT	193900 L/(mole-cm)
nmole/OD ₂₆₀ :	5.16
µg/OD ₂₆₀ :	33.86

B) Hairpin

Structures

structure	Image	ΔG (kcal.mole ⁻¹)	T _m (°C)	ΔH (kcal.mole ⁻¹)	ΔS (cal.K ⁻¹ .mole ⁻¹)	Output
1		2	-13.9	-13.3	-51.3	Ct Det
2		2.15	-31	-9.3	-38.41	Ct Det
3		2.19	-18.2	-12.9	-50.6	Ct Det
4		2.28	-18.7	-13.3	-52.27	Ct Det
5		2.33	-20	-13.1	-51.76	Ct Det
6		2.47	-23	-12.9	-51.56	Ct Det

Anexo 4. Resultados obtenidos de 2F del análisis en OligoAnalyzer

Fuente: (Las autoras, 2023)

Resultados de OligoAnalyzer de Reverse (146R)

A)

Results




RESUSPENSION

DILUTION

SEQUENCE	5'- ACA AGG TGC AGC AGC TGC CGT A -3'
COMPLEMENT	5'- TAC GGC AGC TGC TGC ACC TTG T -3'
LENGTH	22
GC CONTENT	59.1 %
MELT TEMP	63.9 °C
MOLECULAR WEIGHT	6769.4 g/mole
EXTINCTION COEFFICIENT	215800 L/(mole-cm)
nmole/OD ₂₆₀	4.63
µg/OD ₂₆₀	31.37

B) Hairpin

Structures

structure	Image	ΔG (kcal.mole ⁻¹)	T _m (°C)	ΔH (kcal.mole ⁻¹)	ΔS (cal.K ⁻¹ .mole ⁻¹)	Output
1		-2.47	50.1	-31.8	-98.39	<input type="checkbox"/> Ct <input type="checkbox"/> Det
2		-2.28	46.7	-33.6	-105.03	<input type="checkbox"/> Ct <input type="checkbox"/> Det
3		-1.66	47.8	-23.3	-72.59	<input type="checkbox"/> Ct <input type="checkbox"/> Det

Anexo 5. Resultados obtenidos de 2R del análisis en OligoAnalyzer

Fuente: (Las autoras, 2023)