

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y DESARROLLO TECNOLÓGICO

TEMA DE TESIS:

“DIVERSIDAD GENÉTICA DE IHHNV EN LOS SISTEMAS ECUATORIANOS DE
PRODUCCIÓN DE CAMARÓN (*Litopenaeus vannamei*).”

FINANCIAMIENTO:

SENESCYT – ESPOL.

ÁREA:

BIOLOGÍA MOLECULAR.

BITÁCORA:

IHHNV (Necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa).

TESISTA:

DENISSE NUÑEZ SANTILLÁN. (ESPOL)

2015 – 2016.

Protocolo de Extracción de ADN

- 1.- Limpiar el área de trabajo y la Tabla de muestras con alcohol
- 2.- Tomar una pinza, bisturí y Tijera desinfectarlos con etanol y luego enjuagarlos con Agua Destilada
- 3.- Tomar una porción de cordón umbilical y cerebro, colocar el Tejido en un Tubo Eppendorf de 1.5 ml, previamente rotulados.
- 4.- Lavar el Tejido con 500 μ l de Agua destilada Tres veces, cuidando de tomar Tejido con la punta.
- 5.- Una vez lavado el tejido colocar 500 μ l de buffer 1, 75 μ l de SDS y 20 μ l de Proteinasa K.
- 6.- Buffer 1 contiene:
- 7.- Homogenizar la muestra y dejar el Tubo en baño María por 24 horas a 65 $^{\circ}$ C
- 8.- Homogenizar nuevamente (el Tejido debe verse disgregado)
- 9.- Colocar 100 μ l de fenol y agitar el Tubo con la mano
- 10.- Centrifugar por 10 minutos a 13000 RPM.
- 11.- Tomar 500 μ l del sobrenadante y depositarlo en un nuevo Tubo Eppendorf de 1.5 ml.
- 12.- Colocar 500 μ l de Cloroformo Isoamil y agitar con la mano.
- 13.- Centrifugar por 10 minutos a 13000 RPM
- 14.- Tomar 400 μ l de sobrenadante y depositarlos en un nuevo Tubo Eppendorf de 1.5 ml.
- 15.- Colocar 100 μ l de etanol al 100% frío y colocar 200 μ l de Ácido de Anisio
- 16.- Agitar con la mano y colocar el Tubo al congelador a -20 $^{\circ}$ C por cuatro horas.
- 17.- Centrifugar por 20 minutos a 13000 RPM
- 18.- Decantar el contenido cuidadosamente sin retirar el pellet.

- 19.- Lavar nuevamente con 300 μ l de Etanol al 70%, Tapan los Tubos Eppendorf.
- 20.- Centrifugar por 10 minutos a 13000 RPM.
- 21.- Descartar el contenido, sin retirar el pellet.
- 22.- Destapar los tubos Eppendorf y secarlos en la estufa a 45°C por dos horas.
- 23.- Una vez evaporado todo el residuo del Etanol, colocar 50 μ l de Agua Milli-Q.
- 24.- Corar los tubos, agitarlos suavemente y colocarlos nuevamente en la estufa a 45°C por 30 minutos.
- 25.- Realizar una dilución 1:10 $\rightarrow$ 45 μ l de Agua Milli-Q y 5 μ l de ADN.
- 26.- Almacenarlos al -80°C hasta su posterior uso.

Preparación de Acetato de Amonio

Preparar 25 ml de Acetato de Amonio a 5M.

$$M = \frac{\text{Peso. mol}}{1 \text{ mol}} \rightarrow \text{NH}_4 \text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2 = 77.08 \text{ g/mol}$$

$$77.08 \text{ g/mol} \times \frac{1 \text{ M}}{5 \text{ M}} \Rightarrow 385.40 \text{ g} \times \frac{1000 \text{ ml}}{25 \text{ ml}}$$

$$\begin{aligned} & \times 9635 \text{ g} \\ & V_F = 25 \text{ ml [5M]} \end{aligned}$$

Preparación de dNTPs

$$C_1 = 100 \mu\text{M dNTPs}$$

$$V_2 = 100 \mu\text{l}$$

$$C_2 = 10 \mu\text{M}$$

$$V_1 = ?$$

$$V_1 C_1 = V_2 C_2$$

$$V_1 = \frac{100 \mu\text{l} \times 10 \mu\text{M}}{100 \mu\text{M}}$$

$$V_1 = 10 \mu\text{l}$$

* 10 μl de cada dNTPs para un volumen de 100 μl a 10 μM

Para Tener un Volumen de 1 ml $\rightarrow$ 100 μl de dNTPs $\rightarrow$ 400 μl + 600 μl de Agua Milli-Q

Preparación de Gel de Agarosa PARA ELECTROFORESIS

Gel al 2% en 250 ml para la cámara grande

Para un gel al 2% en 50 ml se pesa 1g

$$\begin{array}{l} 1g \quad \times \quad 50ml \\ \quad \quad \times \quad 250ml \end{array} \Rightarrow 5g + 250ml \text{ TBE} + 25\mu l \text{ SYBR Safe}$$

- Para la cámara pequeña hacerlo con 50 ml de TBE.

Cuando se vaya a colocar la muestra en los pocillos del gel agregar de 5 μ l a 10 μ l de muestra de ADN + 1 μ l o 2 μ l de loading dye respectivamente

Preparación de Tris - Borato / EDTA (5X TBE)

Esta solución estándar se utiliza para electroforesis a una concentración final de 0.5X

1. Combinar los siguientes componentes en un frasco volumétrico de 1L:

- ▷ Tris $\rightarrow$ 54g Tris base ultrapuro, concentración final de Tris borato 45mM
- ▷ Ácido Bórico $\rightarrow$ 27.5g ácido bórico grado proteómico MW 61.83, concentración final Tris-borato 45mM
- ▷ EDTA $\rightarrow$ 20 ml de solución de stock 0.5M, pH 8.0; concentración final 1mM.

2. Disolver en 800 ml, de agua destilada y desionizada.

3. Filtrar con un filtro de 0.2 μ m

4. Ajustar el volumen final a 1L con agua destilada y desionizada

5. El pH debe estar entre 8.0 y 8.4

6. Autoclavar para esterilizar

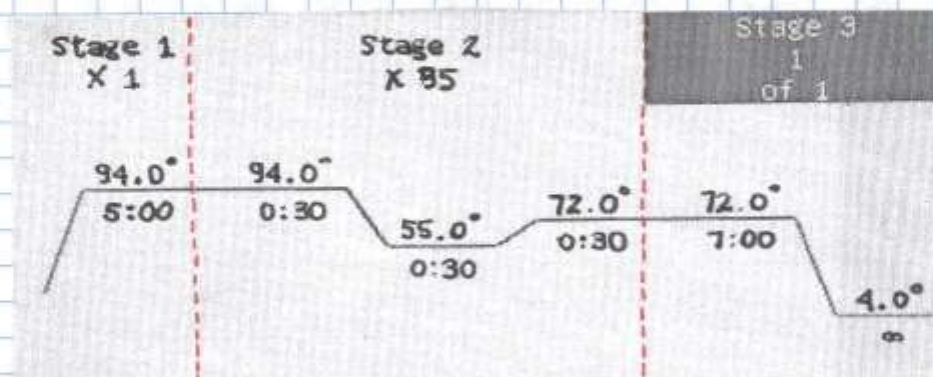
7. Almacenar a temperatura ambiente.

▷ Solución de Tris - Borato / EDTA (0.5X TBE)

Disolver 500 ml de solución de Tris - Borato / EDTA 5X en un bidón de 5 l añadiendo 4.5 l de agua desionizada y almacenar a temperatura ambiente. Concentración final 0.5X

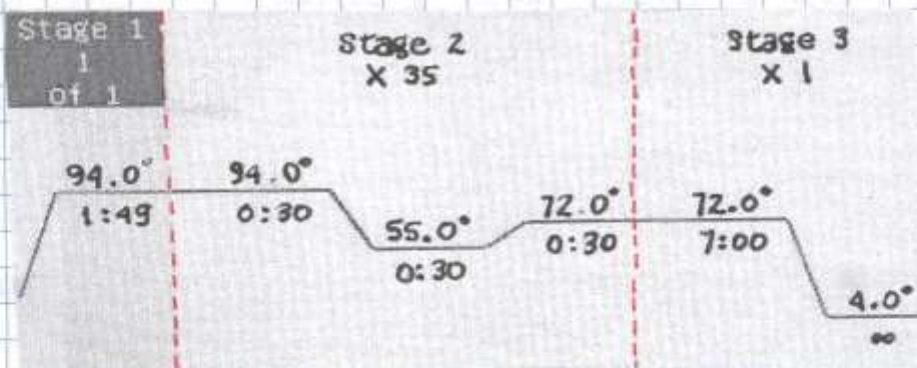
Programa de Termociclador

Método : 309 IHHNV DIAG

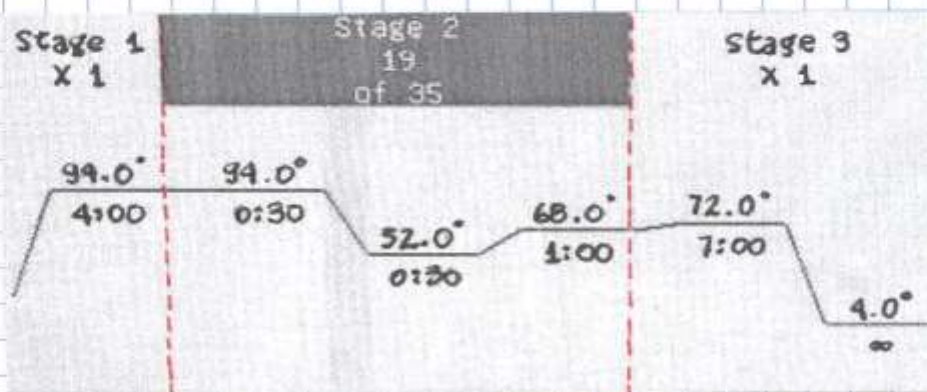


PCR anidada

Método : IHHNV 3a2 Primera.



Método : IHHNV NNS208 Segunda



Geles

▷ Prueba 309 IHHNV DIAG. con controles (+)

27/10/2015

H ₂ O	8.65	x 8	69.2
1x Buffer	1.5		12
1.5mM MgCl ₂	0.45		3.6
0.5 dNTPS	0.75		6
0.5 309 R	0.75		6
0.5 309 F	0.75		6
Tag	0.15		1.2
ADN	1		

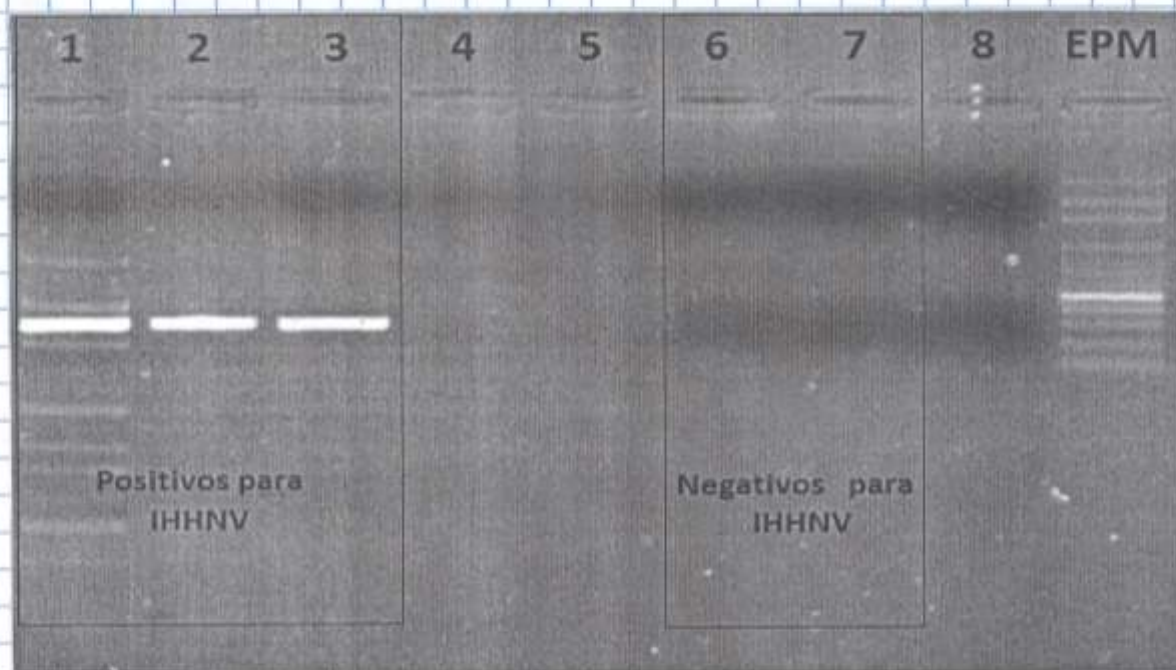


Figura 1. Stock de controles para IHHNV. En el gel se observan: 1 D1, 2 D2, 3 D3, 6 D6, 7 D7 corresponden a muestras donadas por el Doctor Lightner.

TABLA.1

Número	Código	Prueba	Resultado
1	D1	309	✓
2	D2	309	✓
3	D3	309	✓
6	D6	309	X
7	D7	309	X

D Prueba de tejidos de camarón para detectar IHNV

- Se se cerebro ADN extraído.

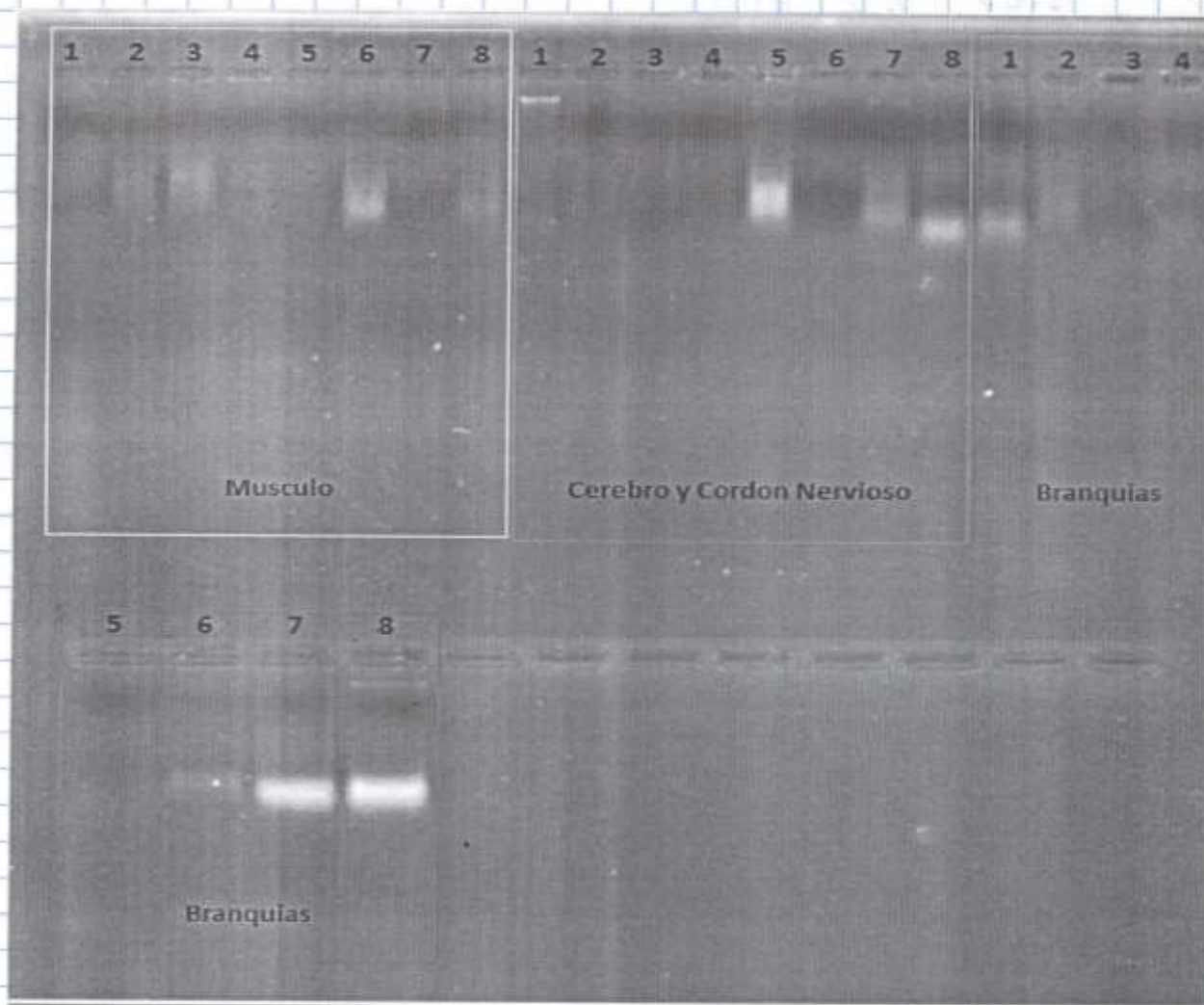


Figura 2. Prueba de diferentes tejidos de camarón para IHNV. En el gel se observan: 1 IH15001, 2 IH15002, 3 IH15003, 4 IH15004, 5 IH15005, corresponden a muestreo de Aquamar S.A; 6 IH15006, corresponde a muestra de Josefina; 7 IH15007, corresponde a muestra de Pez Joya; 8 IH15008, corresponde a muestra de Bonanza Cabac S.A.

Tabla 2.

Número	Código	Provincia	# de Piscina	Órgano		Resultado	
1	IH15001	Guayas	160	Musculo		X	
				Cerebro y cordón nervioso		SI ADN	
				Branquias		TENUE ADN	
2	IH15002	Guayas	160	Musculo		X	
				Cerebro y cordón nervioso		X	
				Branquias			
3	IH15003	Guayas	160	Musculo		X	
				Cerebro y cordón nervioso		SI ADN	
				Branquias			
4	IH15004	Guayas	160	Musculo		X	
				Cerebro y cordón nervioso		X	
				Branquias		X	
5	IH15005	Guayas	160	Musculo		X	
				Cerebro y cordón nervioso		SI ADN	
				Branquias		X	
6	IH15006	Guayas	28	Musculo		X	
				Cerebro y cordón nervioso		X	
				Branquias		X	
7	IH15007	Guayas	40	Musculo		X	
				Cerebro y cordón nervioso		SI ADN	
				Branquias		X	
8	IH15008	Guayas	32	Musculo		X	
				Cerebro y cordón nervioso		X	
				Branquias		SI ADN	

10/11/2015

D Prueba 309 para IHNV con

H ₂ O	8.65	X 46	397.9
Buffer	1.5		6.9
el Hg 2	0.45		20.7
dNTPs	0.75		34.5
309 F	0.75		34.5
309 R	0.75		34.5
Tag	0.15		6.9
ADN	2		

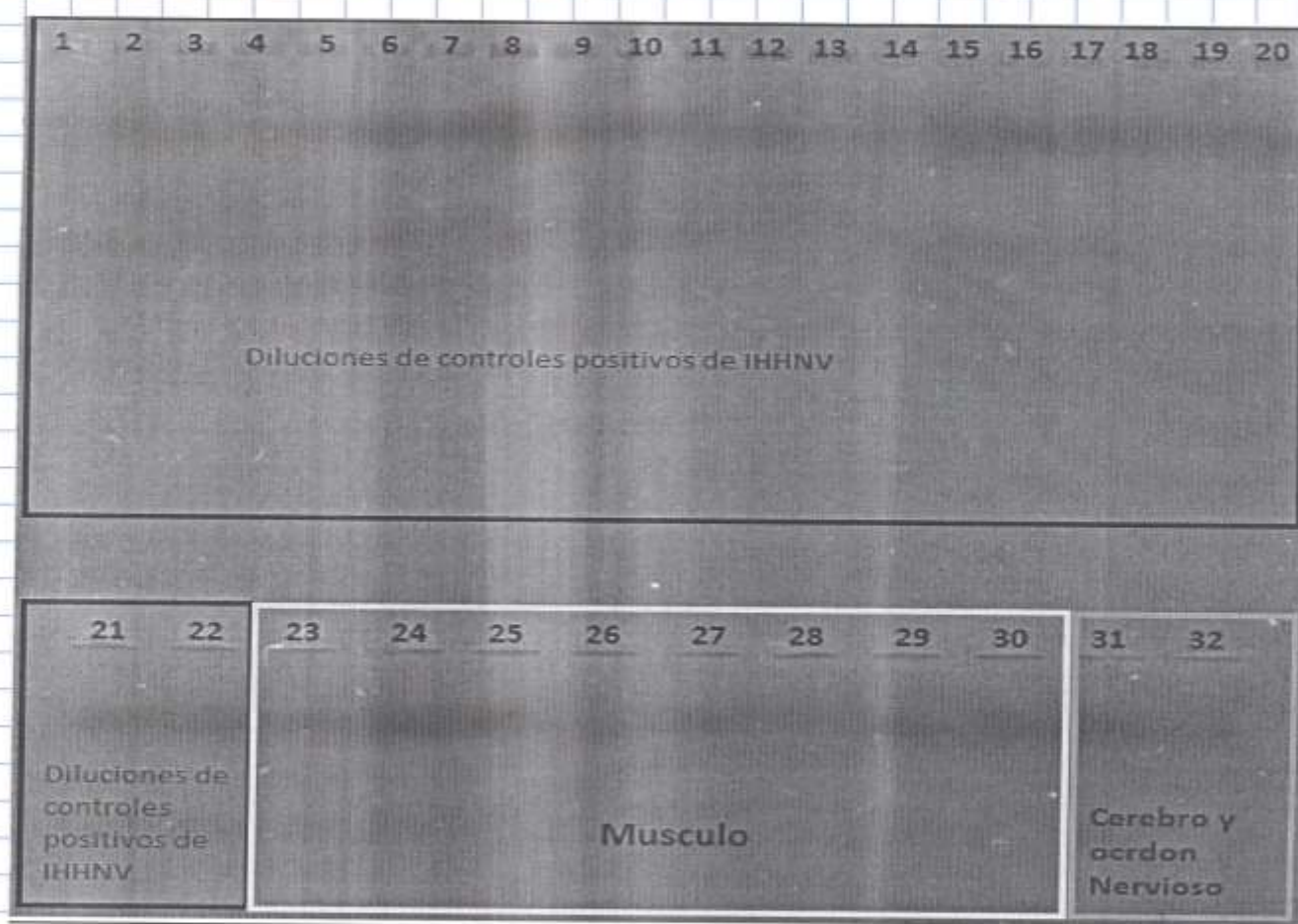


Figura 3. Prueba de diferentes tejidos de camarón para IHNV. En el gel se observan: 1 D₁+, 2 D₁1, 3 D₁2, 4 D₁3, 5 D₁4, 6 D₁5, 7 D₁6, 8 D₁7, 9 D₁8, 10 D₁9 11 D₁10, 12 D₃+, 13 D₃1, 14 D₃2, 15 D₃3, 16 D₃4 17 D₃5 18 D₃6 19 D₃7 20 D₃8 21 D₃9 22 D₃10 corresponden a diluciones de controles positivos de IHNV donadas por el Doctor Lightner; 23 IH15001, 24 IH15002, 25 IH15003, 26 IH15004, 27 IH15005, 28 IH15006, 29 IH15007, 30 IH15008, 31 IH15001, 32 IH15002, corresponden al muestreo de Aquamar S.A, de estas muestras se probaron diferentes tejidos como musculo, cerebro & cordón nervioso y branquias

Tabla 3.

Número	Código	Provincia u Origen	# de Piscina	Órgano	Prueba	Resultado
1	D1+	Lightner	---	---	309	X
2	D ₁ 1	Lightner	---	---	309	X
3	D ₁ 2	Lightner	---	---	309	X
4	D ₁ 3	Lightner	---	---	309	X
5	D ₁ 4	Lightner	---	---	309	x
6	D ₁ 5	Lightner	---	---	309	X
7	D ₁ 6	Lightner	---	---	309	X
8	D ₁ 7	Lightner	---	---	309	X
9	D ₁ 8	Lightner	---	---	309	X
10	D ₁ 9	Lightner	---	---	309	X
11	D ₁ 10	Lightner	---	---	309	X
12	D3+	Lightner	---	---	309	X
13	D ₃ 1	Lightner	---	---	309	X
14	D ₃ 2	Lightner	---	---	309	X
15	D ₃ 3	Lightner	---	---	309	X
16	D ₃ 4	Lightner	---	---	309	X
17	D ₃ 5	Lightner	---	---	309	X
18	D ₃ 6	Lightner	---	---	309	X
19	D ₃ 7	Lightner	---	---	309	X
20	D ₃ 8	Lightner	---	---	309	X
21	D ₃ 9	Lightner	---	---	309	X
22	D ₃ 10	Lightner	---	---	309	X
23	IH15001	Guayas	160	Musculo	309	X
24	IH15002	Guayas	160	Musculo	309	X
25	IH15003	Guayas	160	Musculo	309	X
26	IH15004	Guayas	160	Musculo	309	X
27	IH15005	Guayas	160	Musculo	309	X
28	IH15006	Guayas	28	Musculo	309	X
29	IH15007	Guayas	40	Musculo	309	X
30	IH15008	Guayas	32	Musculo	309	X

31	IH15001	Guayas	160	Cerebro y Cordón Nervioso	309	X
32	IH15002	Guayas	160	Cerebro y Cordón Nervioso	309	X

D Prueba 309 para IHNV con muestras.

10/11/2015

H ₂ O	8.65	x 46	397.9
Bifen	1.5		69
Cl ₂	0.45		20.7
DNTPS	0.75		34.5
309F	0.75		34.5
309R	0.75		34.5
Taq	0.15		6.9
ADN	2		

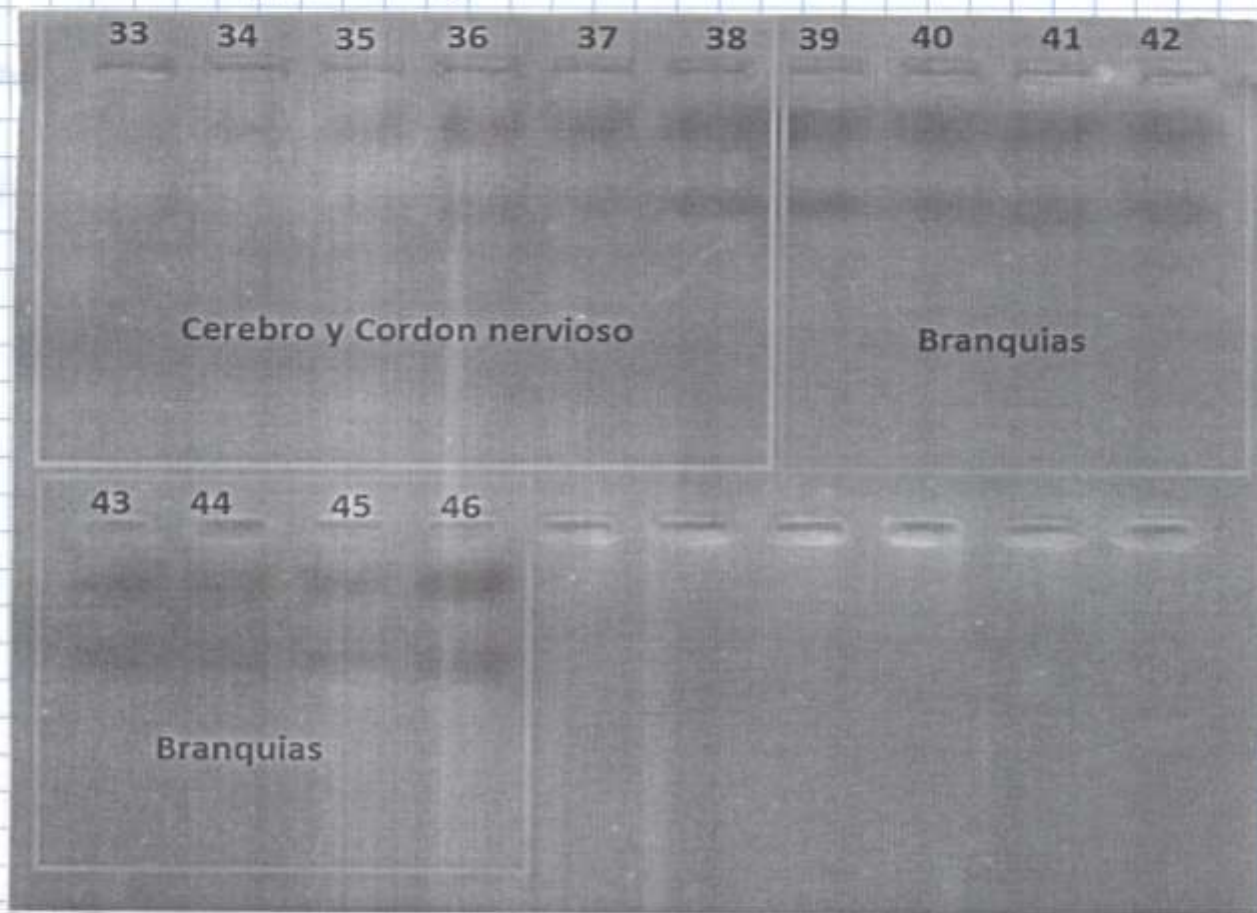


Figura 4. Prueba de diferentes tejidos de camarón para IHNV. En el gel se observan: 33 IH15003, 34 IH15004, 35 IH15005, 36 IH15006, 37 IH15007, 38 IH15008, 39 IH15001, 40 IH15002, 41 IH15003, 42 IH15004, 43 IH15005, 44 IH15006, 45 IH15007, 46 control negativo corresponden al muestreo de Aquamar S.A, de estas muestras se probaron diferentes tejidos como musculo, cerebro & cordón nervioso y branquias.

Tabla 4.

Número	Código	Provincia u Origen	# de Piscina	Órgano	Prueba	Resultado
33	IH15003	Guayas	160	Cerebro y Cordon Nervioso	309	X
34	IH15004	Guayas	160	Cerebro y Cordon Nervioso	309	X
35	IH15005	Guayas	160	Cerebro y Cordon Nervioso	309	X

36	IH15006	Guayas	28	Cerebro y Cordón Nervioso	309	X
37	IH15007	Guayas	40	Cerebro y Cordón Nervioso	309	X
38	IH15008	Guayas	32	Cerebro y Cordón Nervioso	309	X
39	IH15001	Guayas	160	Branquias	309	X
40	IH15002	Guayas	160	Branquias	309	X
41	IH15003	Guayas	160	Branquias	309	X
42	IH15004	Guayas	160	Branquias	309	X
43	IH15005	Guayas	160	Branquias	309	X
44	IH15006	Guayas	28	Branquias	309	X
45	IH15007	Guayas	40	Branquias	309	X
46	Control negativo	----	----	----	309	X

D Prueba de Iniciadores 392-208 (PCR Anidada)

Primera → 392

10X	Buffer 1X	1.5	x5	7.5
50 mM	MgCl ₂ 2 mM	0.6		3
10 mM	dNTP's 0.5 mM	0.75		3.75
10 μM	392 F 0.3 μM	0.45		2.25
10 μM	392 R 0.3 μM	0.45		2.25
	Tag 0.15	0.15		0.75
División	ADN 2 μl			
	H ₂ O	9.1		45.5

Segunda → 208

10X	H ₂ O	8.65	x5	43.25
10X	Buffer 1X	1.5		7.5
50 mM	MgCl ₂ 2 mM	0.6		3
10 mM	dNTP's 0.5 mM	0.75		3.75
10 μM	208 R 0.45 μM	0.675		3.375
10 μM	208 F 0.45 μM	0.675		3.375
	Tag 0.15	0.15		0.75
	ADN 2 μl	2 μl		

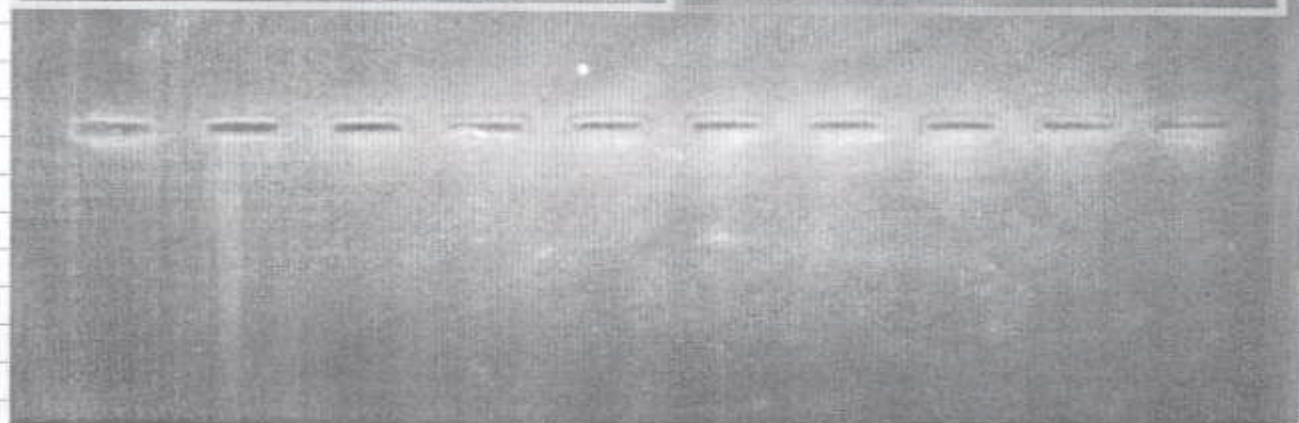
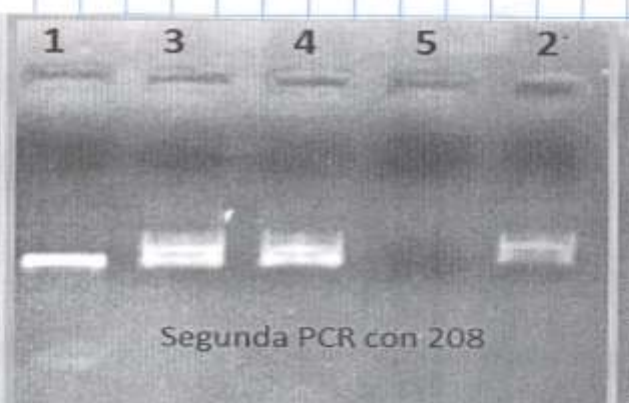
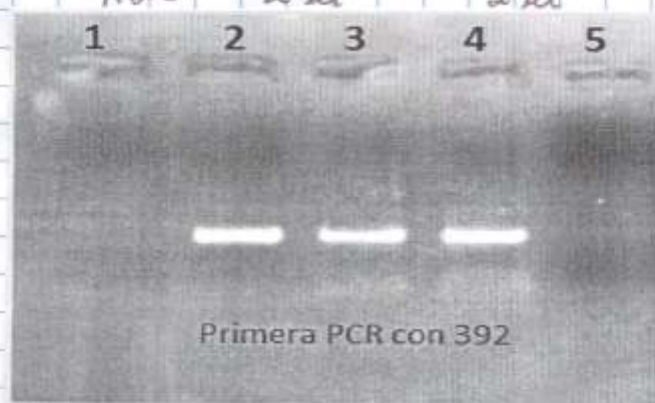


Figura 5. Prueba de los primer 392 y 208 mediante PCR anidada. En el gel se observan: 1 D1+, 2 D₁1, 3 D3+, 4 D2+, 5 control negativo, 1 D1+, 3 D3+, 4 D2+, 5 control negativo, 2 D₁1 corresponden a controles positivos de IHHNV donadas por el Doctor Lightner

Tabla 5.

Número	Código	Origen	Prueba	Resultado
1	D1+	Lightner	392	X
2	D ₁ 1	Lightner	392	✓
3	D3+,	Lightner	309	✓
4	D2+	Lightner	309	✓
5	control negativo		309	X
1	D1+	Lightner	208	✓
2	D ₁ 1	Lightner	208	✓✓
3	D3+	Lightner	208	✓✓
4	D2+	Lightner	208	✓✓
5	Control negativo		208	X

▷ Prueba de Iniciadores 392-208 para IHNV
 -Primera Amplificación con Primer 392.

10/11/2015

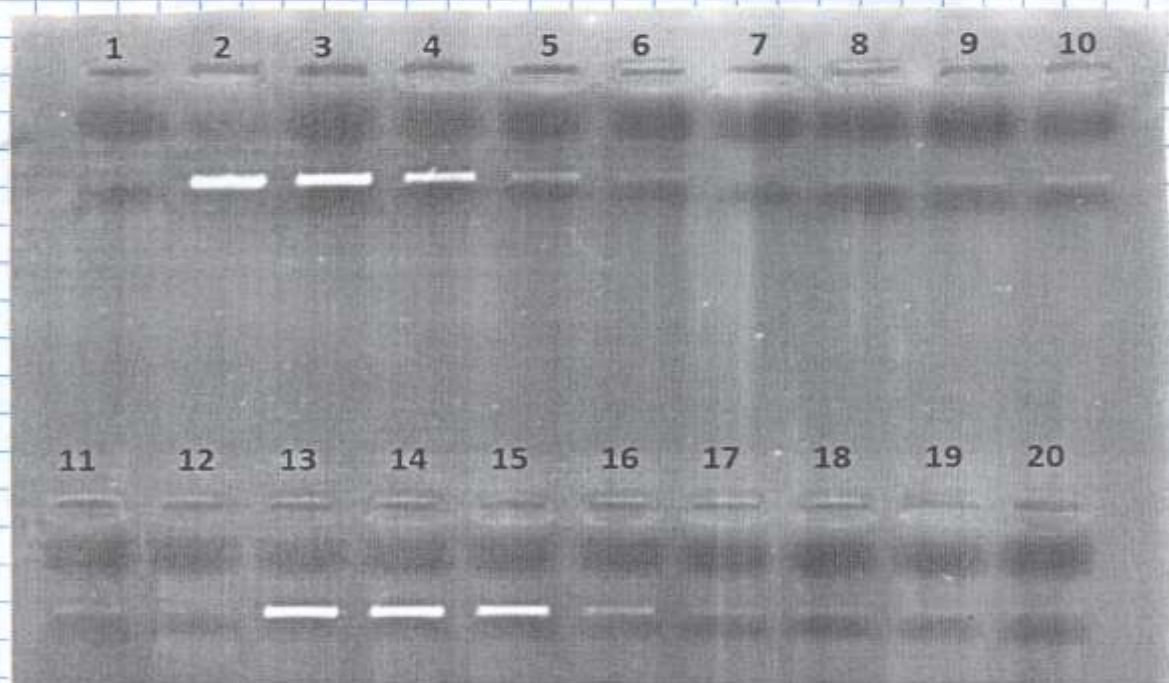


Figura 6. Prueba de los primer 392 y 208 mediante PCR anidada. En el gel se observan: 1 D1+, 2 D₁1, 3 D₁2, 4 D₁3, 5 D₁4, 6 D₁5, 7 D₁6, 8 D₁7, 9 D₁8, 10 D₁9 11 D₁10, 12 D₃+, 13 D₃1, 14 D₃2, 15 D₃3, 16 D₃4 17 D₃5 18 D₃6 19 D₃7 20 D₃8 corresponden a diluciones de controles positivos de IHNV donadas por el Doctor Lightner

Tabla 6.

Número	Código	Origen	Prueba	Resultado
1	D1+	Lightner	392	X
2	D ₁ 1	Lightner	392	✓
3	D ₁ 2	Lightner	392	✓
4	D ₁ 3	Lightner	392	✓
5	D ₁ 4	Lightner	392	✓
6	D ₁ 5	Lightner	392	✓
7	D ₁ 6	Lightner	392	X
8	D ₁ 7	Lightner	392	Tenue
9	D ₁ 8	Lightner	392	✓
10	D ₁ 9	Lightner	392	✓
11	D ₁ 10	Lightner	392	Tenue
12	D3+	Lightner	392	X
13	D ₃ 1	Lightner	392	✓
14	D ₃ 2	Lightner	392	✓
15	D ₃ 3	Lightner	392	✓
16	D ₃ 4	Lightner	392	✓
17	D ₃ 5	Lightner	392	✓
18	D ₃ 6	Lightner	392	✓
19	D ₃ 7	Lightner	392	✓
20	D ₃ 8	Lightner	392	Tenue

Primera → 392

10X	Buffer	1X	1.5	X23	34.5
50 mM	HgCl ₂	2mM	0.6		13.8
10 mM	dNTPS	0.5mM	0.75		17.25
10 mM	392F	0.3 μM	0.45		10.35
10 μM	392R	0.3 μM	0.45		10.35
	H ₂ O		9.1		209.3
	Taq	0.15	0.15		3.45
	ADN		2 μl		

▷ Prueba de iniciadores 392-208 para IHHNV

Segunda amplificación con primer 208

H ₂ O	9.1	X 23	209.3
Buffer	1.5		34.5
HgCl ₂	0.6		13.8
dNTPs	0.75		17.25
208 F	0.45		10.35
208 R	0.45		10.35
Taq	0.15		3.45
ADN			2.00

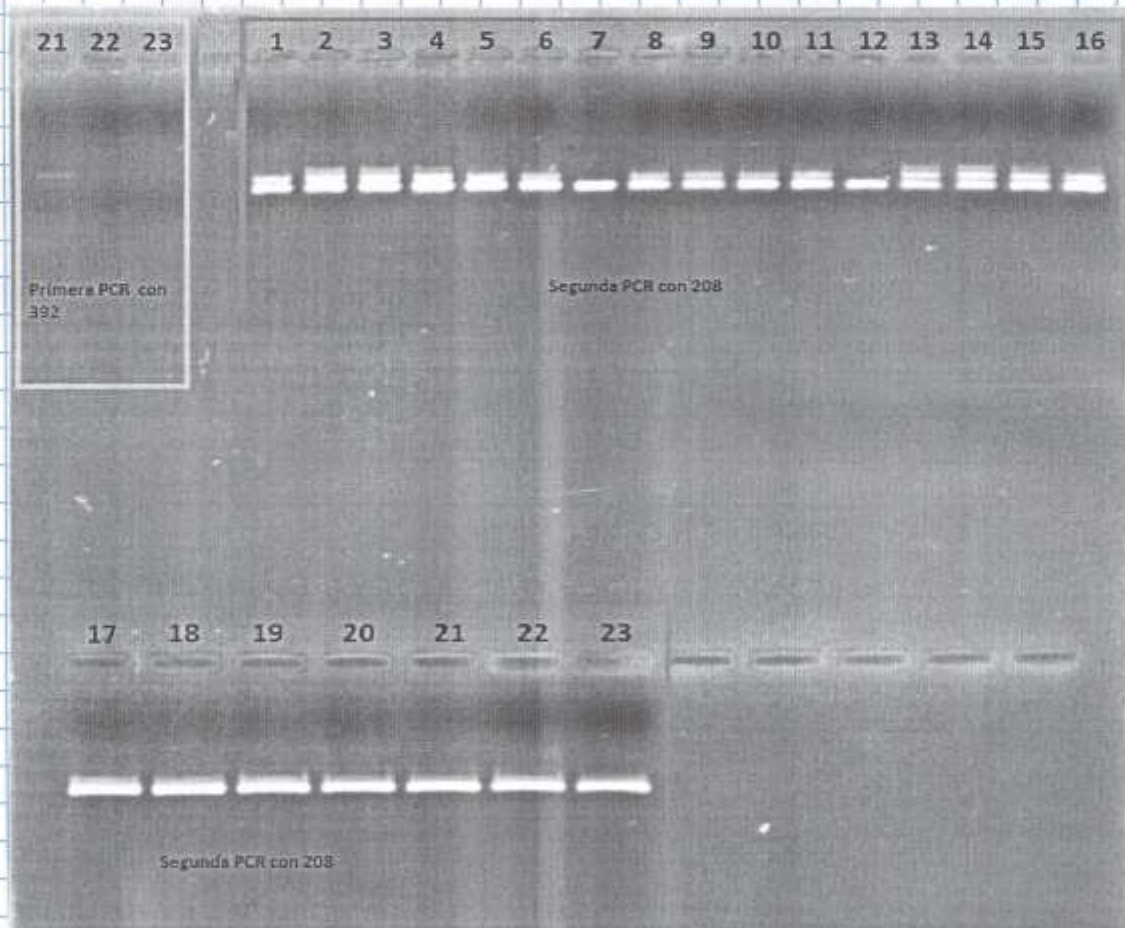


Figura 7. Prueba de los primer 392 y 208 mediante PCR anidada. En el gel se observan: 21 D₃9 22 D₃10, 23 control negativo, 1 D₁+, 2 D₁1, 3 D₁2, 4 D₁3, 5 D₁4, 6 D₁5, 7 D₁6, 8 D₁7, 9 D₁8, 10 D₁9 11 D₁10, 12 D₃+, 13 D₃1, 14 D₃2, 15 D₃3, 16 D₃4 17 D₃5 18 D₃6 19 D₃7 20 D₃8, 21 D₃9 22 D₃10 corresponden a diluciones de controles positivos de IHHNV donadas por el Doctor Lightner

Tabla 7.

Número	Código	Origen	Prueba	Resultado
21	D ₃ 9	Lightner	392	✓
22	D ₃ 10	Lightner	392	Tenue
23	Control negativo	---	392	X
1	D ₁ +	Lightner	208	✓✓
2	D ₁ 1	Lightner	208	✓✓✓
3	D ₁ 2	Lightner	208	✓✓✓
4	D ₁ 3	Lightner	208	✓✓
5	D ₁ 4	Lightner	208	✓✓
6	D ₁ 5	Lightner	208	✓✓
7	D ₁ 6	Lightner	208	✓
8	D ₁ 7	Lightner	208	✓✓
9	D ₁ 8	Lightner	208	✓✓
10	D ₁ 9	Lightner	208	✓✓
11	D ₁ 10	Lightner	208	✓✓
12	D ₃ +	Lightner	208	✓
13	D ₃ 1	Lightner	208	✓✓
14	D ₃ 2	Lightner	208	✓✓
15	D ₃ 3	Lightner	208	✓✓
16	D ₃ 4	Lightner	208	✓✓
17	D ₃ 5	Lightner	208	✓
18	D ₃ 6	Lightner	208	✓
19	D ₃ 7	Lightner	208	✓
20	D ₃ 8	Lightner	208	✓
21	D ₃ 9	Lightner	208	✓
22	D ₃ 10	Lightner	208	✓

▷ Diagnóstico para IHNV con PCR anidada y diferentes Órganos.

Primera → 392

Segunda → 208

13/11/2015

H ₂ O	0.1	X15	136.5
Buffer	1.5		22.5
Hg Cl ₂	0.6		9
dNTPs	0.75		11.25
392 R	0.45		6.75
392 F	0.45		6.75
Taq	0.15		2.25
ADN			

Misma pu mezcla para la Segunda

208 R	6.75
208 F	6.75

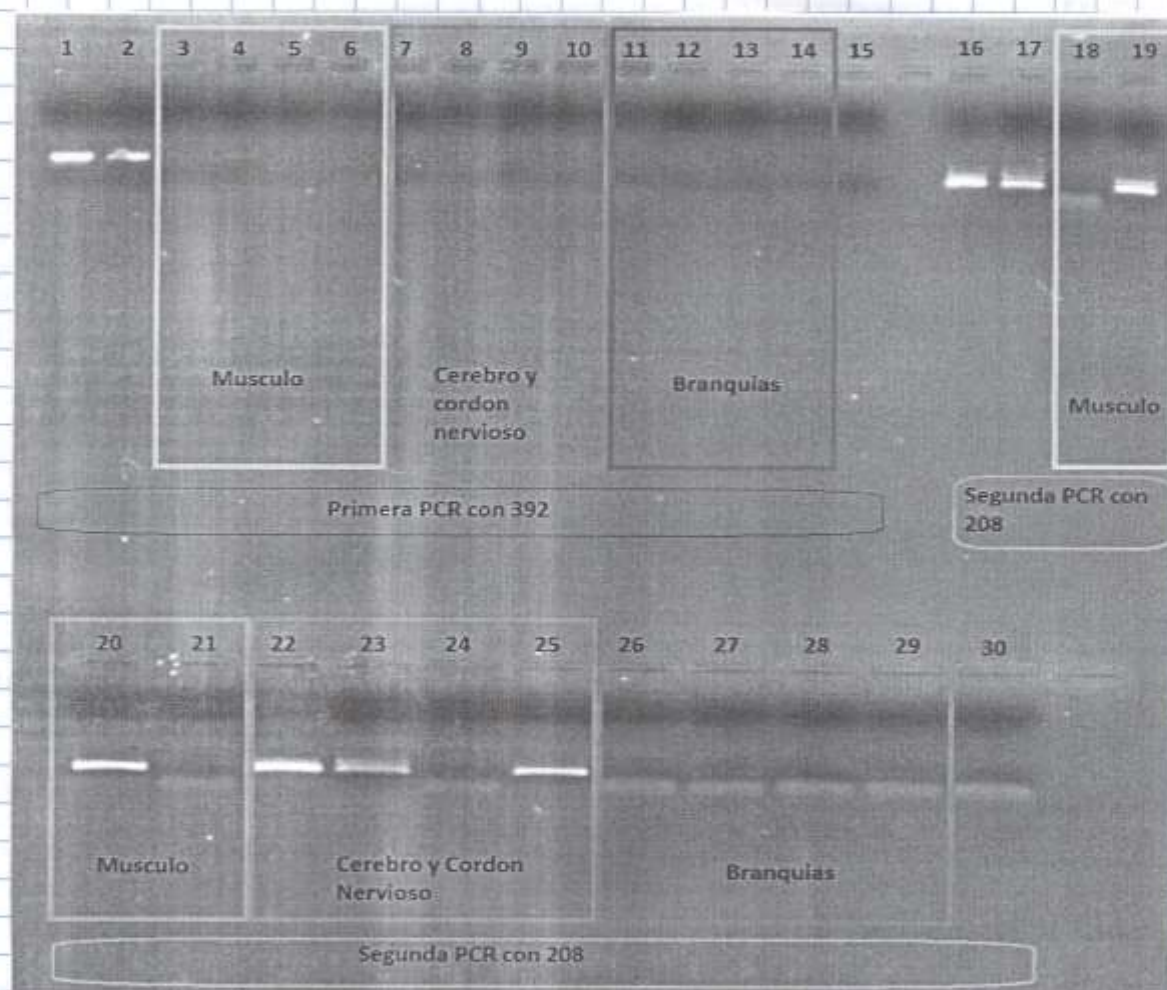


Figura 8. Prueba de los primer 392 y 208 mediante PCR anidada. En el gel se observan:
 1 D₁1+, 2 D₃1+ corresponden a controles positivos de IHNV donadas por el Doctor Lightner
 3 IH15001, 4 IH15002, 5 IH15003, 6 IH15004, 7 IH15001, 8 IH15002, 9 IH15003, 10 IH15004 11
 IH15001, 12 IH15002, 13 IH15003, 14 IH15004, 15 control negativo, 16 D₁1+, 17 D₃1+, 18
 IH15001, 19 IH15002, 20 IH15003, 21 IH15004, 22 IH15001, 23 IH15002, 24 IH15003, 25
 IH15004 26 IH15001, 27 IH15002, 28 IH15003, 29 IH15004, 30 control negativo corresponden
 al muestreo de Aquamar S.A.

Tabla 8.

Número	Código	Provincia	# de Piscina	Órgano	Prueba	Resultado
1	D ₁ 1	Lightner	---	---	392	✓
2	D ₃ 1	Lightner	---	---	392	✓
3	IH15001	Guayas	160	Musculo	392	X
4	IH15002	Guayas	160	Musculo	392	Tenue
5	IH15003	Guayas	160	Musculo	392	X
6	IH15004	Guayas	160	Musculo	392	X
7	IH15001	Guayas	160	Cerebro y Cordón nervioso	392	X
8	IH15002	Guayas	160	Cerebro y Cordón nervioso	392	X
9	IH15003	Guayas	160	Cerebro y Cordón nervioso	392	X
10	IH15004	Guayas	160	Cerebro y Cordón nervioso	392	X
11	IH15001	Guayas	160	Branquias	392	X
12	IH15002	Guayas	160	Branquias	392	X
13	IH15003	Guayas	160	Branquias	392	X
14	IH15004	Guayas	160	Branquias	392	X
15	control negativo	---	---	----	392	X
16	D ₁ 1+	Lightner	----	---	208	✓

17	D ₃ 1+	Lightner	---	---	208	√√
18	IH15001	Guayas	160	Musculo	208	X
19	IH15002	Guayas	160	Musculo	208	√√
20	IH15003	Guayas	160	Musculo	208	√
21	IH15004	Guayas	160	Musculo	208	X
22	IH15001	Guayas	160	Cerebro y Cordón nervioso	208	√
23	IH15002	Guayas	160	Cerebro y Cordón nervioso	208	√√
24	IH15003	Guayas	160	Cerebro y Cordón nervioso	208	X
25	IH15004	Guayas	160	Cerebro y Cordón nervioso	208	√
26	IH15001	Guayas	160	Branquias	208	X
27	IH15002	Guayas	160	Branquias	208	X
28	IH15003	Guayas	160	Branquias	208	X
29	IH15004	Guayas	160	Branquias	208	X
30	Control negativo	Guayas	---	Control Negativo	208	X

▷ Diagnóstico para IHHNV con PCR anidada 392-208

Mezcla de PCR	H ₂ O	9.1	X19	172.9
	Buffer	1.5		28.5
	HgCl ₂	0.6		11.4
	dNTPs	0.75		14.25
	392 R y 208 R	0.45		8.55
	392 F y 208 F	0.45		8.55
	Taq	0.15		2.85
	ADN	2 µl		2 µl

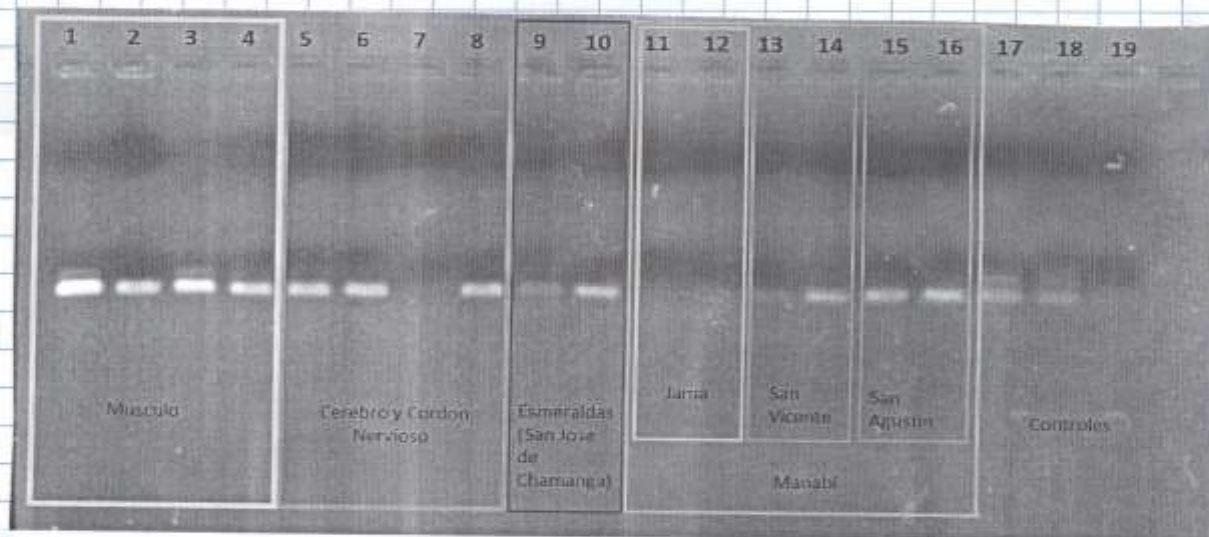


Figura 9. Prueba de los primer 392 y 208 mediante PCR anidada. En el gel se observan: 1 IH15005, 2 IH15006, 3 IH15007, 4 IH15008, 5 IH15005, 6 IH15006, 7 IH15007, 8 IH15008 corresponden al muestreo de Aquamar S.A. 9 IH15031, 10 IH15032, 11 IH15033, 12 IH15034, 13 IH15035, 14 IH15036, 15 IH15037, 16 IH15038, 17 D₁1+, 18 D₃1+, 19 control negativo corresponden al muestreo de Esmeraldas y Manabí.

Tabla 9.

Número	Código	Provincia	# de Piscina	Órgano	Prueba	Resultado
1	IH15005	Guayas	160	Musculo	392-208	✓
2	IH15006	Guayas	28	Musculo	392-208	✓
3	IH15007	Guayas	40	Musculo	392-208	✓
4	IH15008	Guayas	32	Musculo	392-208	✓
5	IH15005	Guayas	160	Cerebro y Cordón nervioso	392-208	✓
6	IH15006	Guayas	28	Cerebro y Cordón nervioso	392-208	✓
7	IH15007	Guayas	40	Cerebro y Cordón nervioso	392-208	X
8	IH15008	Guayas	32	Cerebro y Cordón nervioso	392-208	✓
9	IH15031	Esmeraldas	9	Cerebro y Cordón nervioso	392-208	Tenue
10	IH15032	Esmeraldas	10	Cerebro y Cordón nervioso	392-208	✓
11	IH15033	Manabí	1	Cerebro y Cordón nervioso	392-208	X
12	IH15034	Manabí	9	Cerebro y Cordón nervioso	392-208	X
13	IH15035	Manabí	3	Cerebro y Cordón nervioso	392-208	Tenue
14	IH15036	Manabí	1	Cerebro y Cordón nervioso	392-208	✓
15	IH15037	Manabí	2	Cerebro y Cordón nervioso	392-208	✓
16	IH15038	Manabí	3	Cerebro y Cordón nervioso	392-208	✓
17	D ₁ 1+	Lightner	---	---	392-208	✓✓
18	D ₃ 1	Lightner	---	---	392-208	✓✓
19	control negativo	----	---	----	392-208	X

▷ Diagnóstico para IHNV con PCR anidada 392-208

7/12/2015

Mezcla de PCR	H ₂ O	9.1	x40	36.4
	Buffer	1.5		60
	HgCl ₂	0.6		24
	dNTPS	0.75		30
	392 R y 208 R	0.45		18
	392 F y 208 F	0.45		18
	Tag	0.15		6
	ADN	2 µl		2 µl

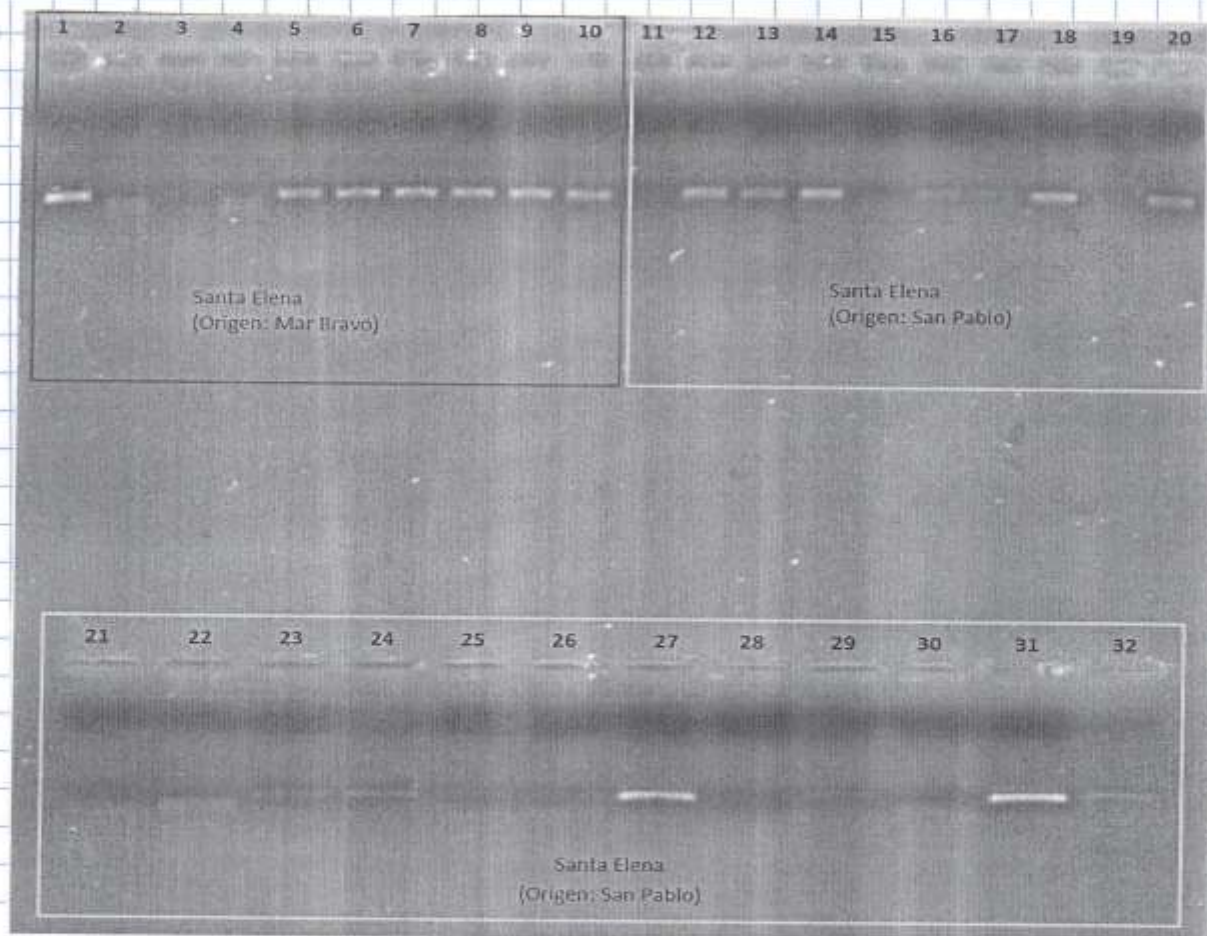


Figura 10. Prueba de los primer 392 y 208 mediante PCR anidada. En el gel se observan:

1 IH15009-1, 2 IH15009-2, 3 IH15009-3, 4 IH15009-4, 5 IH15009-5, 6 IH15009-6, 7 IH15009-7, 8 IH15009-8, 9 IH15009-9, 10 IH15009-10 11 IH15010-1, 12 IH15010-2, 13 IH15010-3, 14 IH15010-4, 15 IH15010-5, 16 IH15010-6, 17 IH15010-7, 18 IH15010-8, 19 IH15010-9 20 IH15010-10 21 IH15011-1, 22 IH15011-2, 23 IH15011-3, 24 IH15011-4, 25 IH15011-5, 26 IH15011-6, 27 IH15011-7, 28 IH15011-8, 29 IH15011-9, 30 IH15011-10, 31 IH15012-1, 32 IH15012-2 corresponden al muestreo de la Estación Experimental del Cenaim "Palmar"

Tabla 10.

Número	Código	Provincia	# Piscina	Órgano	Prueba	Resultado
1	IH15009-1	Santa Elena	B-9	Cerebro y Cordón nervioso	392-208	✓
2	IH15009-2	Santa Elena	B-9	Cerebro y Cordón nervioso	392-208	X
3	IH15009-3	Santa Elena	B-9	Cerebro y Cordón nervioso	392-208	X
4	IH15009-4	Santa Elena	B-9	Cerebro y Cordón nervioso	392-208	X
5	IH15009-5	Santa Elena	B-9	Cerebro y Cordón nervioso	392-208	✓
6	IH15009-6	Santa Elena	B-9	Cerebro y Cordón nervioso	392-208	✓
7	IH15009-7	Santa Elena	B-9	Cerebro y Cordón nervioso	392-208	✓
8	IH15009-8	Santa Elena	B-9	Cerebro y Cordón nervioso	392-208	✓
9	IH15009-9	Santa Elena	B-9	Cerebro y Cordón nervioso	392-208	✓
10	IH15009-10	Santa Elena	B-9	Cerebro y Cordón nervioso	392-208	✓
11	IH15010-1	Santa Elena	B-26	Cerebro y Cordón nervioso	392-208	X
12	IH15010-2	Santa Elena	B-26	Cerebro y Cordón nervioso	392-208	✓
13	IH15010-3	Santa Elena	B-26	Cerebro y Cordón nervioso	392-208	✓
14	IH15010-4	Santa Elena	B-26	Cerebro y Cordón nervioso	392-208	✓
15	IH15010-5	Santa Elena	B-26	Cerebro y Cordón nervioso	392-208	X

16	IH15010-6	Santa Elena	B-26	Cerebro y Cordón nervioso	392-208	Tenue
17	IH15010-7	Santa Elena	B-26	Cerebro y Cordón nervioso	392-208	Tenue
18	IH15010-8	Santa Elena	B-26	Cerebro y Cordón nervioso	392-208	√
19	IH15010-9	Santa Elena	B-26	Cerebro y Cordón nervioso	392-208	X
20	IH15010-10	Santa Elena	B-26	Cerebro y Cordón nervioso	392-208	√
21	IH15011-1	Santa Elena	B-27	Cerebro y Cordón nervioso	392-208	X
22	IH15011-2	Santa Elena	B-27	Cerebro y Cordón nervioso	392-208	X
23	IH15011-3	Santa Elena	B-27	Cerebro y Cordón nervioso	392-208	Tenue
24	IH15011-4	Santa Elena	B-27	Cerebro y Cordón nervioso	392-208	Tenue
25	IH15011-5	Santa Elena	B-27	Cerebro y Cordón nervioso	392-208	Tenue
26	IH15011-6	Santa Elena	B-27	Cerebro y Cordón nervioso	392-208	Tenue
27	IH15011-7	Santa Elena	B-27	Cerebro y Cordón nervioso	392-208	√
28	IH15011-8	Santa Elena	B-27	Cerebro y Cordón nervioso	392-208	X
				nervioso		
29	IH15011-9	Santa Elena	B-27	Cerebro y Cordón nervioso	392-208	Tenue
30	IH15011-10	Santa Elena	B-27	Cerebro y Cordón nervioso	392-208	X
31	IH15012-1	Santa Elena	B-28	Cerebro y Cordón nervioso	392-208	√
32	IH15012-2	Santa Elena	B-28	Cerebro y Cordón nervioso	392-208	√

▷ Diagnóstico para IHHNV con PCR anidada 392-208

7/12/2015

H ₂ O	9.1	X40	36.4
Buffer	1.5		60
HgCl ₂	0.6		24
dNTPs	0.75		30
392 R y 208 R	0.45		18
392 F y 208 F	0.45		18
Taq	0.15		6
ADN	2 μ l		

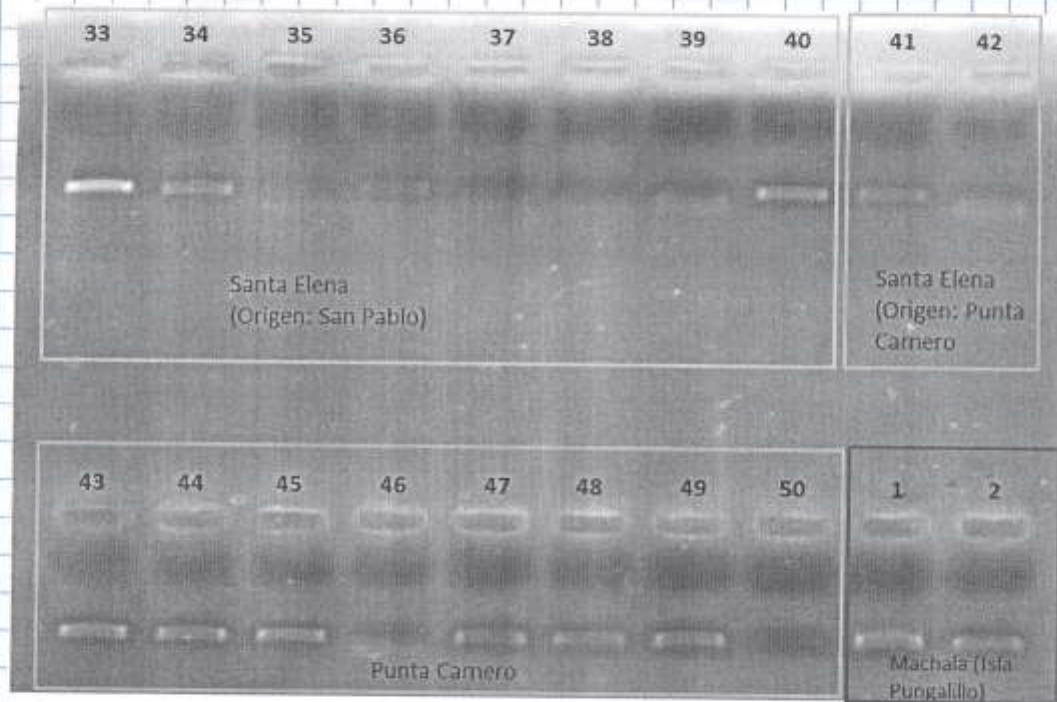


Figura 11. Prueba de los primer 392 y 208 mediante PCR anidada. En el gel se observan: 33 IH15012-3, 34 IH15012-4, 35 IH15012-5, 36 IH15012-6, 37 IH15012-7, 38 IH15012-8, 39 IH15012-9, 40 IH15012-10, 41 IH15013-1, 42 IH15013-2 43 IH15013-3, 44 IH15013-4 , 45 IH15013-5, 46 IH15013-6, 47 IH15013-7, 48 IH15013-8, 49 IH15013-9, 50 IH15013-10 corresponden al muestreo de la Estación Experimental del Cenaim "Palmar". 1 IH15014 2 IH15014-1E corresponden al muestreo de Vivabra S.A.

Número	Código	Provincia	# Piscina	Órgano	Prueba	Resultado
33	IH15012-3	Santa Elena	B-28	Cerebro y Cordón nervioso	392-208	✓
34	IH15012-4	Santa Elena	B-28	Cerebro y Cordón nervioso	392-208	✓
35	IH15012-5	Santa Elena	B-28	Cerebro y Cordón nervioso	392-208	X
36	IH15012-6	Santa Elena	B-28	Cerebro y Cordón nervioso	392-208	Tenue
				nervioso		
37	IH15012-7	Santa Elena	B-28	Cerebro y Cordón nervioso	392-208	X
38	IH15012-8	Santa Elena	B-28	Cerebro y Cordón nervioso	392-208	X
39	IH15012-9	Santa Elena	B-28	Cerebro y Cordón nervioso	392-208	X
40	IH15012-10	Santa Elena	B-28	Cerebro y Cordón nervioso	392-208	✓
41	IH15013-1	Santa Elena	B-29	Cerebro y Cordón nervioso	392-208	✓
42	IH15013-2	Santa Elena	B-29	Cerebro y Cordón nervioso	392-208	X
43	IH15013-3	Santa Elena	B-29	Cerebro y Cordón nervioso	392-208	✓
44	IH15013-4	Santa Elena	B-29	Cerebro y Cordón nervioso	392-208	✓
45	IH15013-5	Santa Elena	B-29	Cerebro y Cordón nervioso	392-208	✓
46	IH15013-6	Santa Elena	B-29	Cerebro y Cordón nervioso	392-208	X

47	IH15013-7	Santa Elena	B-29	Cerebro y Cordón nervioso	392-208	√
48	IH15013-8	Santa Elena	B-29	Cerebro y Cordón nervioso	392-208	√
49	IH15013-9	Santa Elena	B-29	Cerebro y Cordón nervioso	392-208	√
50	IH15013-10	Santa Elena	B-29	Cerebro y Cordón nervioso	392-208	X
1	IH15014	Machala	5	Cerebro y Cordón nervioso	392-208	√
2	IH15014-1E	Machala	5	Cerebro y Cordón nervioso	392-208	√

▷ Diagnóstico para IHNV con PCR anidada 392-208

22/12/2015

Mezcla de PCR	H ₂ O	9.1	X30
	Buffer	1.5	
	MgCl ₂	0.6	
	dNTPs	0.75	
	392 R y 208R	0.45	
	392 F y 208 F	0.45	
	Tag	0.15	
	ADN	2 µl	

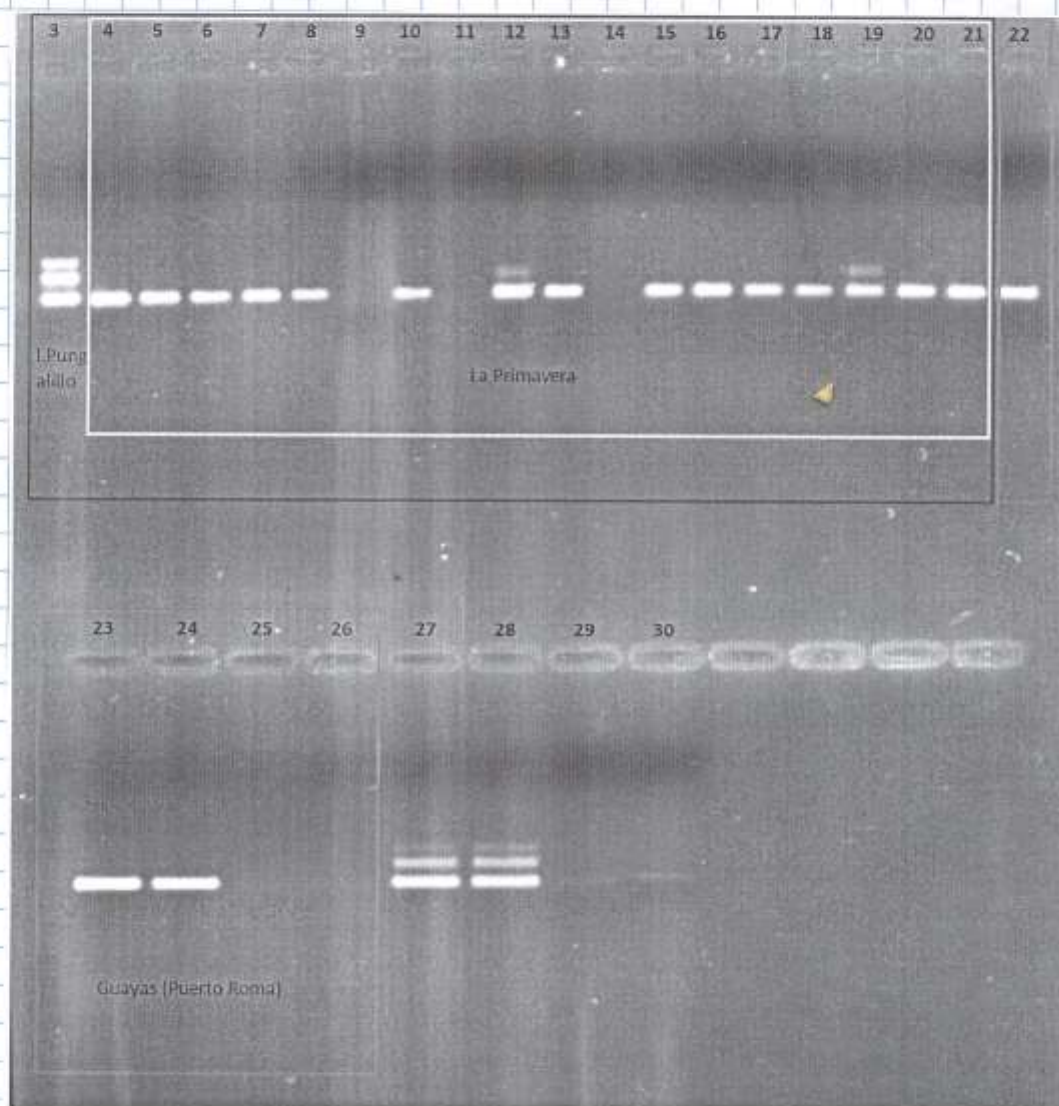


Figura 12. Prueba de los primer 392 y 208 mediante PCR anidada. En el gel se observan: 3 IH15014-2E corresponden al muestreo de Vivabra S.A. 4 IH15015, 5 IH15015-5E, 6 IH15015-6E, 7 IH15016-1, 8 IH15016-2, 9 IH15016-3, 10 IH15016-3E, 11 IH15016-4E corresponden al muestreo de Marest C.A. 12 IH15017-1 13 IH15017-2, 14 IH15017-3, 15 IH15017-7E, 16 IH15017-8E, 17 IH15018-1, 18 IH15018-2, 19 IH15018-3, 20 IH15018-9E, 21 IH15018-10E corresponden al muestreo de Garycam. 22 IH15019-1, 23 IH15019-2, 24 IH15019-3, 25 IH15019-4, 26 IH15019-5 corresponden al muestreo de la camaronera de la comuna de Puerto Roma 27 D₁1+, 28 D₃1 corresponden a controles positivos donados por Lightner 29 y 30 controles negativos.

Tabla 12.-

Número	Código	Provincia	# Piscina	Órgano	Prueba	Resultado
3	IH15014-2E	Machala	5	Cerebro y Cordon nervioso	392-208	√√√
4	IH15015	Machala	5B	Cerebro y Cordon nervioso	392-208	√
5	IH15015-5E	Machala	5B	Cerebro y Cordon nervioso	392-208	√
6	IH15015-6E	Machala	5B	Cerebro y Cordon nervioso	392-208	√
7	IH15016-1	Machala	24	Cerebro y Cordon nervioso	392-208	√
8	IH15016-2	Machala	24	Cerebro y Cordon nervioso	392-208	√
9	IH15016-3	Machala	24	Cerebro y Cordon nervioso	392-208	X
10	IH15016-3E	Machala	24	Cerebro y Cordon nervioso	392-208	√
11	IH15016-4E	Machala	24	Cerebro y Cordon nervioso	392-208	X
12	IH15017-1	Machala	G-10	Cerebro y Cordon nervioso	392-208	√√
13	IH15017-2	Machala	G-10	Cerebro y Cordon nervioso	392-208	√
14	IH15017-3	Machala	G-10	Cerebro y Cordon nervioso	392-208	X
15	IH15017-7E	Machala	G-10	Cerebro y	392-208	√
				Cordon nervioso		
16	IH15017-8E	Machala	G-10	Cerebro y Cordon nervioso	392-208	√
17	IH15018-1	Machala	G-13	Cerebro y Cordon nervioso	392-208	√

18	IH15018-2	Machala	G-13	Cerebro y Cordón nervioso	392-208	✓
19	IH15018-3	Machala	G-13	Cerebro y Cordón nervioso	392-208	✓✓
20	IH15018-9E	Machala	G-13	Cerebro y Cordón nervioso	392-208	✓
21	IH15018-10E	Machala	G-13	Cerebro y Cordón nervioso	392-208	✓
22	IH15019-1	Guayas	1	Cerebro y Cordón nervioso	392-208	✓
23	IH15019-2	Guayas	1	Cerebro y Cordón nervioso	392-208	✓
24	IH15019-3	Guayas	1	Cerebro y Cordón nervioso	392-208	✓
25	IH15019-4	Guayas	1	Cerebro y Cordón nervioso	392-208	X
26	IH15019-5	Guayas	1	Cerebro y Cordón nervioso	392-208	X
27	D ₁ +	Lightner	---	Cerebro y Cordón nervioso	392-208	OK
28	D ₃ 1	Lightner	---	Cerebro y	392-208	OK
				Cordón nervioso		
29	---	Control negativo	---	Cerebro y Cordón nervioso	392-208	OK
30	---	Control negativo	---	Cerebro y Cordón nervioso	392-208	OK

Revisado
02/Mar/2016


D Diagnóstico para IHNV con PCR anidada 392-208

Mezcla de PCR	H ₂ O	9.1 μ l	X 19	172.9
	Buffer	1.5 μ l		28.5
	MgCl ₂	0.6 μ l		11.4
	dNTPs	0.75 μ l		14.25
	392F y 208F	0.45 μ l		8.55
	392R y 208R	0.45 μ l		8.55
	Tag	0.15 μ l		2.85
	ADN	2 μ l		

27/01/2016

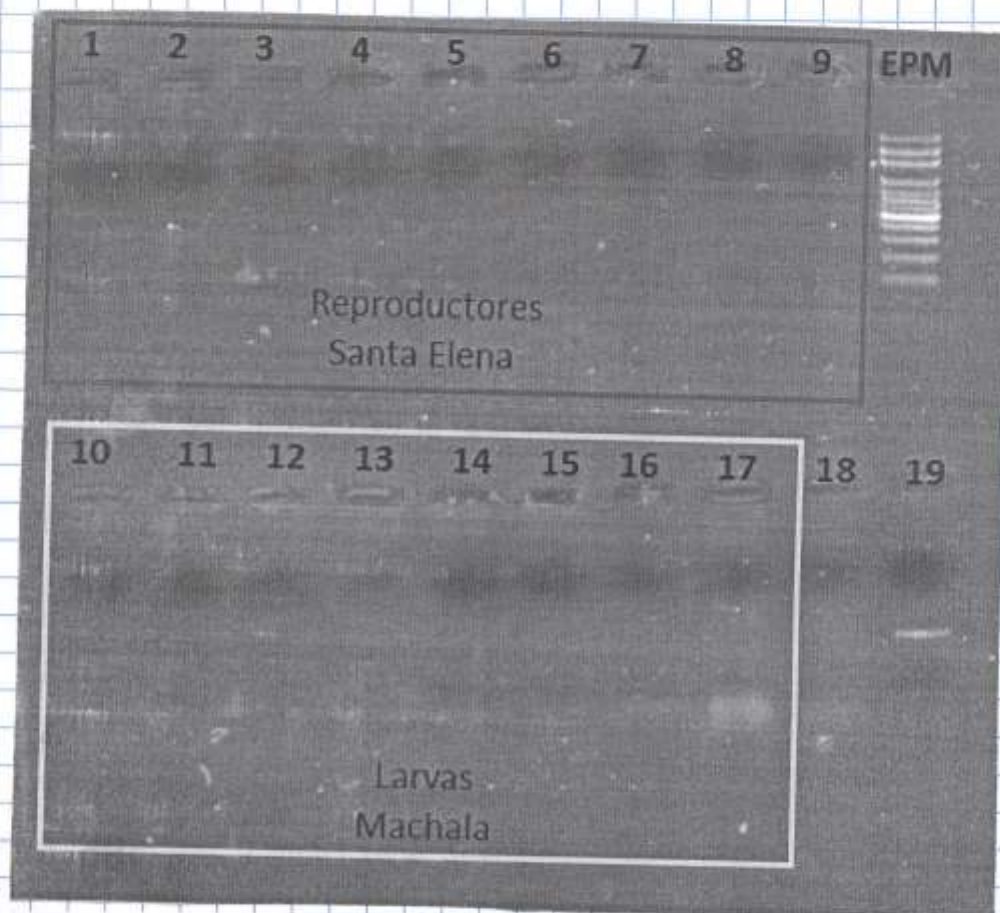


Figura 13. Prueba de los primer 392 y 208 mediante PCR anidada. En el gel se observan: 1 IH15039-1, 2 IH15040, 3 IH15041, 4 IH15042, 5 IH15043, 6 IH15044, 7 IH15045, 8 IH15046, 9 IH15047 corresponden al muestreo de la maduración Promarisco en San Pablo, 10 IH15048-1, 11 IH15048-2, 12 IH15049-1, 13 IH15049-2, 14 IH15050-1, 15 IH15050-2, 16 IH15051-1, 17 IH15051-2, 18 IH15052 corresponden al muestreo de la camaronera Bravito ubicado en la Isla Jambeli 19 D:1+ corresponde al control positivo donado por Lightner

Mezcla de PCR.	H ₂ O	9.1	ul	x 27	245.7
	Buffer	1.5	ul		40.5
	MgCl ₂	0.6	ul		16.2
	dNTPS	0.15	ul		20.25
	392R y 208R	0.45	ul		12.15
	392F y 208F	0.45	ul		12.15
	Tag	0.15	ul		4.05
	ADN	2	ul		

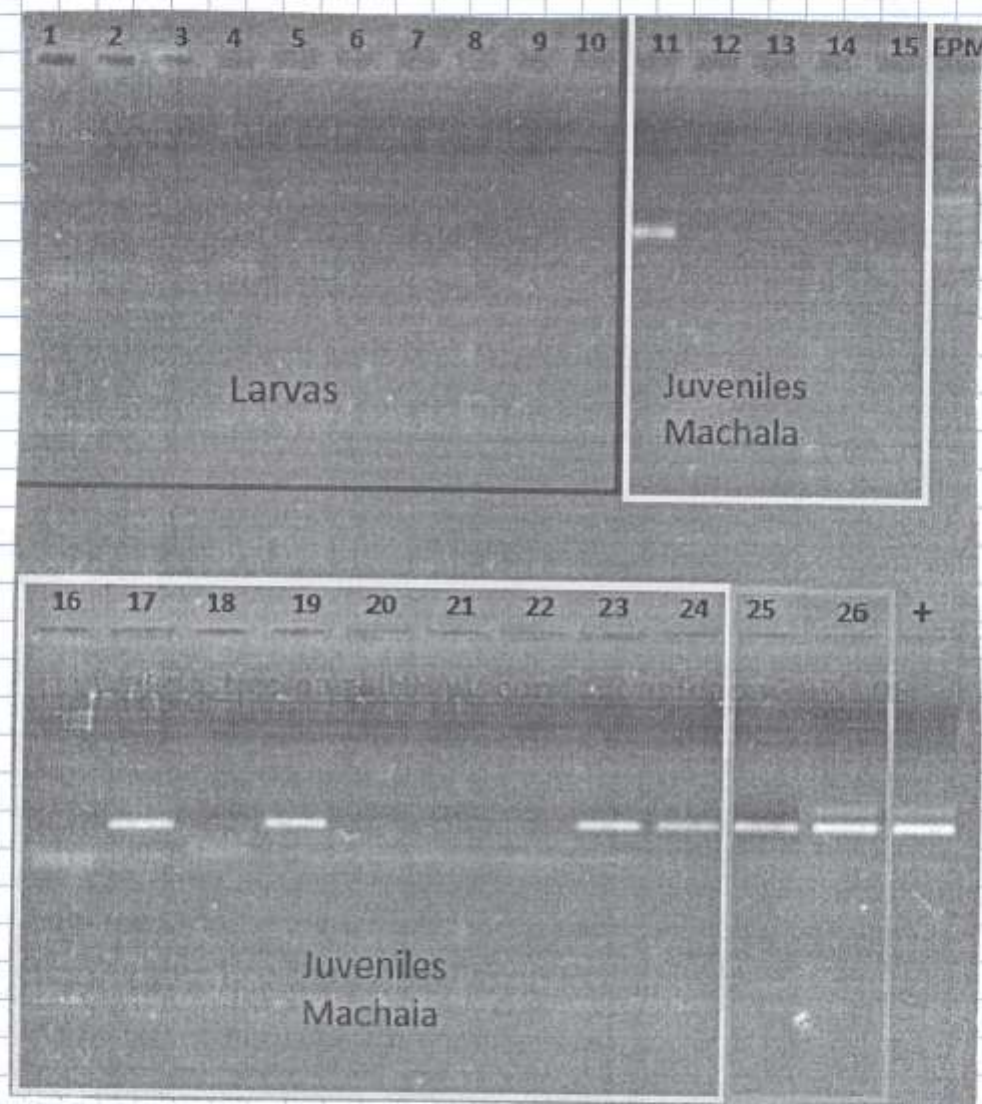


Figura 14. Prueba de los primer 392 y 208 mediante PCR anidada. En el gel se observan:
 1 IH15052, 2 IH15053, 3 IH15054 4 IH15055 5 IH15056, 6 IH15056, 7 IH15057, 8 IH15058, 9
 IH15059, 10 IH15060, 11 IH15061, 12 IH15062-1, 13 IH15062-2, 14 IH15062-3, 15 IH15062-4, 16
 IH15062-5, 17 IH15063-1, 18 IH15063-2, 19 IH15063-3 20 IH15063-4, 21 IH15065-1, 22 IH15065-
 2, 23 IH15065-3, 24 IH15065-4, 25 IH15065-5 26 H15066-1 27 D₃d3.

Tabla 14.

Número	Código	Provincia	# Piscina	Órgano	Prueba	Resultado
1	IH15052	Santa Elena	B-9	Cerebro y Cordón nervioso	392-208	X
2	IH15053	Santa Elena	B-9	Cerebro y Cordón nervioso	392-208	X
3	IH15054	Santa Elena	Rw3	Cerebro y Cordón nervioso	392-208	X
4	IH15055	Santa Elena	Rw13	Cerebro y Cordón nervioso	392-208	X
5	IH15056- Rw17	Santa Elena	Rw17	Cerebro y Cordón nervioso	392-208	X
6	IH15056- Rw1	Santa Elena	Rw1	Cerebro y Cordón nervioso	392-208	X
7	IH15057	Santa Elena	TQ-18	Cerebro y Cordón nervioso	392-208	X
8	IH15058	Santa Elena	TQ-19	Cerebro y Cordón nervioso	392-208	X
9	IH15059	Santa Elena	TQ-20	Cerebro y Cordón nervioso	392-208	X
10	IH15060	Santa Elena	TQ-23	Cerebro y Cordón nervioso	392-208	X
11	IH15061	Santa Elena	TQ-21	Cerebro y Cordón nervioso	392-208	✓
12	IH15062-1	Machala- El coco	2	Cerebro y Cordón nervioso	392-208	X
13	IH15062-2	Machala- El coco	2	Cerebro y Cordón nervioso	392-208	X
14	IH15062-3	Machala- El coco	2	Cerebro y Cordón nervioso	392-208	X
15	IH15062-4	Machala- El coco	2	Cerebro y Cordón nervioso	392-208	X
16	IH15062-5	Machala- El	2	Cerebro y	392-208	X

16	IH15062-5	Machala- El coco	2	Cerebro y Cordón nervioso	392-208	X
17	IH15063-1	Machala- El coco	3	Cerebro y Cordón nervioso	392-208	✓
18	IH15063-2	Machala- El coco	3	Cerebro y Cordón nervioso	392-208	x
19	IH15063-3	Machala- El coco	3	Cerebro y Cordón nervioso	392-208	✓
20	IH15063-4	Machala- El coco	3	Cerebro y Cordón nervioso	392-208	x
21	IH15065-1	Guayas (Balao)	17	Cerebro y Cordón nervioso	392-208	X
22	IH15065-2	Guayas (Balao)	17	Cerebro y Cordón nervioso	392-208	X
23	IH15065-3	Guayas (Balao)	17	Cerebro y Cordón nervioso	392-208	✓
24	IH15065-4	Guayas (Balao)	17	Cerebro y Cordón nervioso	392-208	✓
25	IH15065-5	Guayas (Balao)	17	Cerebro y Cordón nervioso	392-208	✓
26	IH15066-1	Guayas (Balao)	4	Cerebro y Cordón nervioso	392-208	✓
+	D1d3+	Lightner	----	-----	392-208	OK

D Diagnóstico para IHNV con PCR anidada 392-208

27/01/2016

Mezcla de PCR	H ₂ O	9.1	x26
	Buffer	1.6	
	HqCl ₂	0.60	
	dNTPs	0.75	
	392R y 208E	0.45	
	392F y 208F	0.45	
	Tag ADN	0.15	

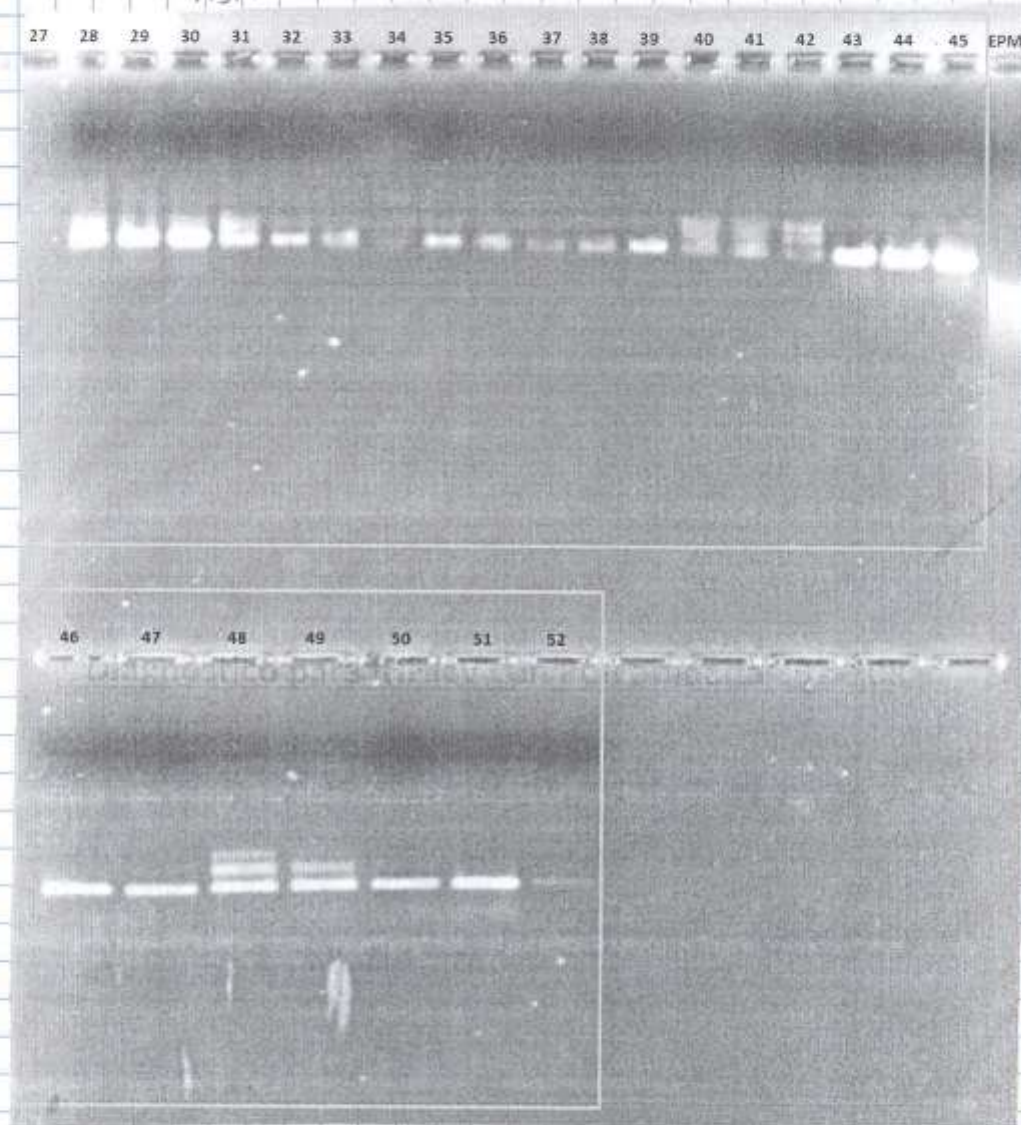


Figura 15. Prueba de los primer 392 y 208 mediante PCR anidada. En el gel se observan: 27 IH15066-2, 28 IH15066-3, 29 IH15066-4 corresponde al muestreo de la camaronera Delai Balao en Balao 30 IH15067-1, 31 IH15067-2, 32 IH15067-3, 33 IH150167-4 34 IH15067-5, 35 IH15068-1, 36 IH15068-2, 37 IH15068-3, 38 IH15068-4, 39 IH15068-5 corresponden al muestreo de la camaronera Pesquera del Sol en Sabana Grande 40 IH15069-1, 41 IH1569-2, 42 IH15069-3, 43 IH15069-4 44 IH15069-5, 45 IH15070-1, 46 IH15070-2, 47 IH15070-3, 48 IH15070-4, 49 IH15070-5 corresponden al muestreo de la camaronera Brumesa S.A. en el sector Engunga 50 control positivo 51 control positivo 52 control negativo.

Tabla 15.

Número	Código	Provincia	# Piscina	Órgano	Prueba	Resultado
27	IH15066-2	Guayas (Balao)	4	Cerebro y Cordón nervioso	392-208	X
28	IH15066-3	Guayas (Balao)	4	Cerebro y Cordón nervioso	392-208	√√
29	IH15066-4	Guayas (Balao)	4	Cerebro y Cordón nervioso	392-208	√
30	IH15067-1	Guayas (Sabana Grande)	2	Cerebro y Cordón nervioso	392-208	√
31	IH15067-2	Guayas (Sabana Grande)	2	Cerebro y Cordón nervioso	392-208	√√
32	IH15067-3	Guayas (Sabana Grande)	2	Cerebro y Cordón nervioso	392-208	√
33	IH15067-4	Guayas (Sabana Grande)	2	Cerebro y Cordón nervioso	392-208	√
34	IH15067-5	Guayas (Sabana Grande)	B-28	Cerebro y Cordón nervioso	392-208	TENUE
35	IH15068-1	Guayas (Sabana Grande)	5	Cerebro y Cordón nervioso	392-208	√
36	IH15068-2	Guayas (Sabana Grande)	5	Cerebro y Cordón nervioso	392-208	√
37	IH15068-3	Guayas (Sabana Grande)	5	Cerebro y Cordón nervioso	392-208	TENUE
38	IH15068-4	Guayas (Sabana Grande)	5	Cerebro y Cordón nervioso	392-208	√
39	IH15068-5	Guayas (Sabana Grande)	5	Cerebro y Cordón nervioso	392-208	√
40	IH15069-1	Guayas (Engunga)	12	Cerebro y Cordón nervioso	392-208	√√√
41	IH15069-2	Guayas (Engunga)	12	Cerebro y Cordón	392-208	√

42	IH15069-3	Guayas (Engunga)	12	Cerebro y Cordón nervioso	392-208	√√√
43	IH15069-4	Guayas (Engunga)	12	Cerebro y Cordón nervioso	392-208	√√√
44	IH15069-5	Guayas (Engunga)	12	Cerebro y Cordón nervioso	392-208	√
45	IH15070-1	Guayas (Engunga)	25	Cerebro y Cordón nervioso	392-208	√
46	IH15070-2	Guayas (Engunga)	25	Cerebro y Cordón nervioso	392-208	√
47	IH15070-3	Guayas (Engunga)	25	Cerebro y Cordón nervioso	392-208	√
48	IH15070-4	Guayas (Engunga)	25	Cerebro y Cordón nervioso	392-208	√√√
49	IH15070-5	Guayas (Engunga)	25	Cerebro y Cordón nervioso	392-208	√√
50	Control Positivo	D ₃ +	Lightner	Cerebro y Cordón nervioso	392-208	√
51	Control Positivo	D ₃ 4+	Lightner	Cerebro y Cordón nervioso	392-208	√
52	Control Negativo	0	----	Cerebro y Cordón nervioso	392-208	ok

D Diagnóstico para IHNV con PCR anidada 392-208

16/02/2016

Mezcla de PCR	H ₂ O	0.1	ul	x 20	182	ul
	Buffer	1.5	ul		30	ul
	MgCl ₂	0.6	ul		12	ul
	dNTPS	0.75	ul		15	ul
	392F y 208F	0.45	ul		9	ul
	392R y 208R	0.45	ul		9	ul
	Taq	0.15	ul		3	ul
	ADAN	2	ul			

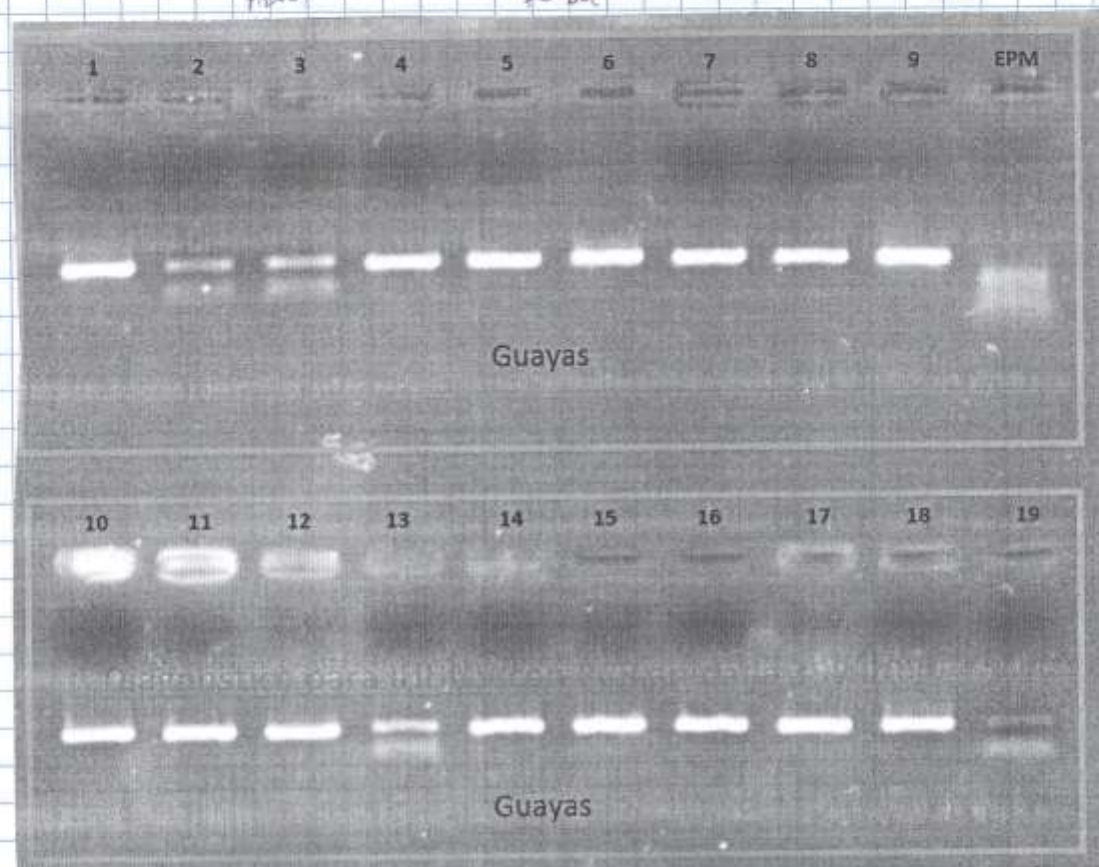


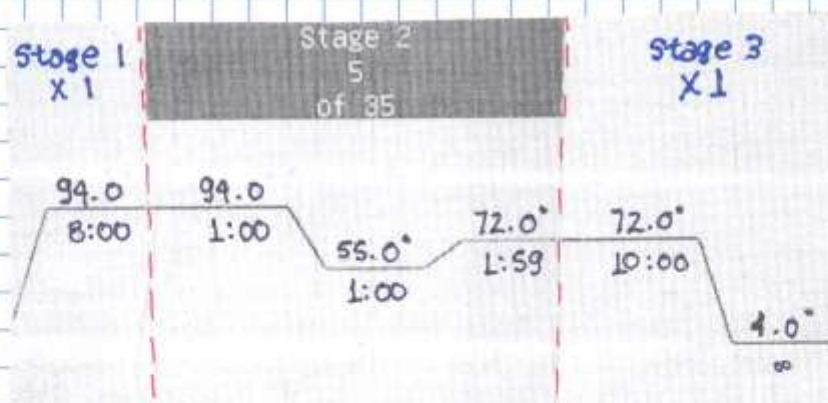
Figura 16. Prueba de los primer 392 y 208 mediante PCR anidada. En el gel se observan: 1 IH15071-1, 2 IH15071-2, 3 IH15071-3 4 IH15071-4 5 IH15072-1, 6 IH15072-2 7 IH15072-3, 8 IH15072-4, 9 IH15073-1, 10 IH15073-2, 11 IH15073-3, 12 IH15073-4, 13 IH15073-5, 14 IH15074-1, 15 IH15074-2, 16 IH15074-3, 17 IH15074-4, 18, D₁d3 19 control negativo.

Tabla 16.

Número	Código	Provincia	# Piscina	Órgano	Prueba	Resultado
1	IH15071-1	Guayas (Tenguel)	48B	Cerebro y Cordón nervioso	392-208	✓
2	IH15071-2	Guayas (Tenguel)	48B	Cerebro y Cordón nervioso	392-208	✓✓
3	IH15071-3	Guayas (Tenguel)	48B	Cerebro y Cordón nervioso	392-208	✓✓
4	IH15071-4	Guayas (Tenguel)	48B	Cerebro y Cordón nervioso	392-208	✓
5	IH15072-1	Guayas (Tenguel)	49B	Cerebro y Cordón nervioso	392-208	✓
6	IH15072-2	Guayas (Tenguel)	49B	Cerebro y Cordón nervioso	392-208	✓
7	IH15072-3	Guayas (Tenguel)	49B	Cerebro y Cordón nervioso	392-208	✓
8	IH15072-4	Guayas (Tenguel)	49B	Cerebro y Cordón nervioso	392-208	✓
9	IH15073-1	Guayas (Tenguel)	52	Cerebro y Cordón nervioso	392-208	✓
10	IH15073-2	Guayas (Tenguel)	52	Cerebro y Cordón nervioso	392-208	✓
11	IH15073-3	Guayas (Tenguel)	52	Cerebro y Cordón nervioso	392-208	✓
12	IH15073-4	Guayas (Tenguel)	52	Cerebro y Cordón nervioso	392-208	✓
13	IH15073-5	Guayas (Tenguel)	52	Cerebro y Cordón nervioso	392-208	✓✓
14	IH15074-1	Guayas (Tenguel)	121	Cerebro y Cordón nervioso	392-208	✓
15	IH15074-2	Guayas (Tenguel)	121	Cerebro y Cordón nervioso	392-208	✓

16	IH15074-3	Guayas (Tenguel)	121	Cerebro y Cordón nervioso392- 208	392-208	✓
17	IH15074-4	Guayas (Tenguel)	121	Cerebro y Cordón nervioso	392-208	✓
18	D ₂ d3	Positivo	Lightner	----		✓
19	Control Negativo	-----	----	---	392-208	ok

• Programa de Termociclador



Mezcla
de
PCR.

H₂O

x 12

111.6 µl

Buffer

18 µl

HgCl₂

7.2 µl

dNTPS

4.8 µl

Primer F: 2.5

5.4 µl

Primer R: 2.5

5.4 µl

Tag

3.6 µl

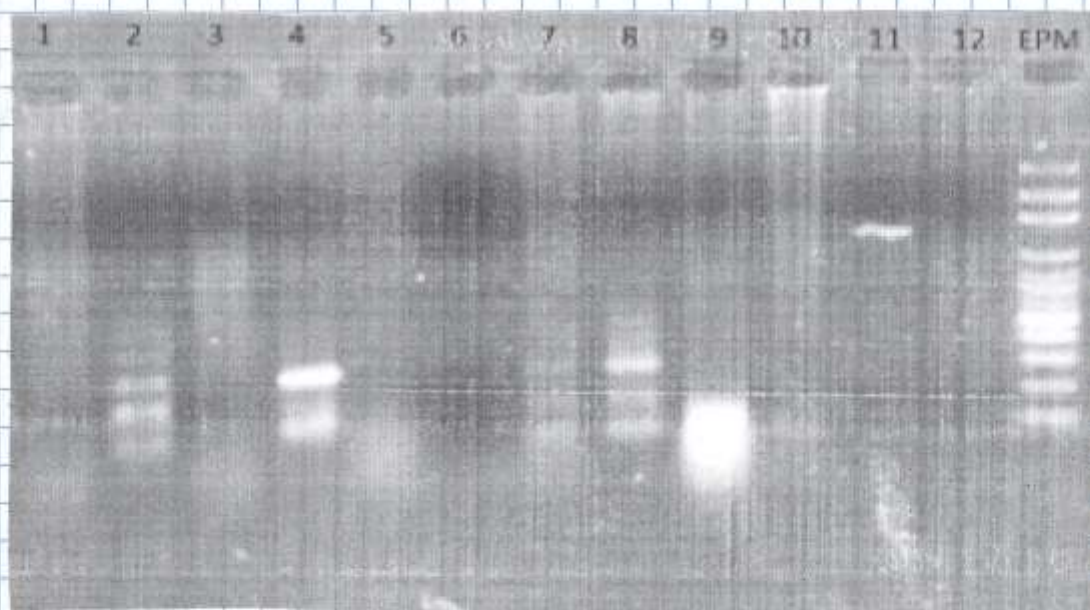


Figura 17. Prueba de los primers HR mediante PCR anidada. En el gel se observan:

1 IH15001 stock, 2 IH15001 dilución (1:10) 3 IH15013 stock 4 IH15013 dilución (1:10), 5 IH15014-stock, 6 IH15014 dilución (1:10), 7 IH15036 stock, 8 IH15036 dilución (1:10), 9 IH15032 stock, 10 IH15032 dilución (1:10), 11 D₃, 12 Control negativo.

Tabla 17.

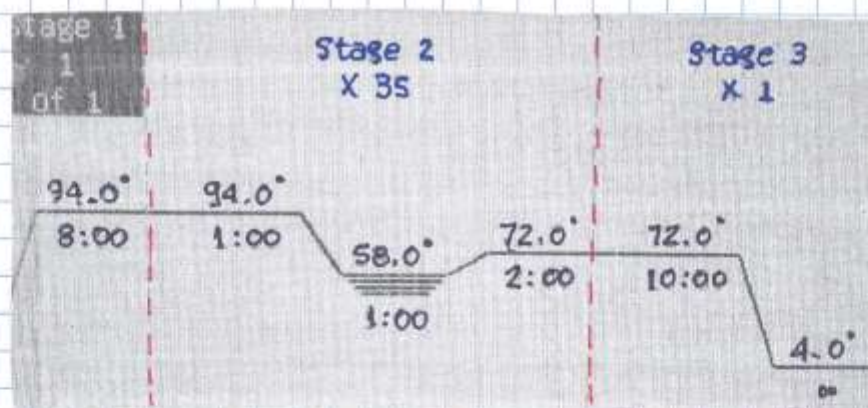
N°	Código	Provincia	# Piscina	Camaronera	Resultado
1	IH15001 stock	Guayas	160	Aquamar S.A	X
2	IH15001 (1:10)	Guayas	160	Aquamar S.A	√
3	IH15013 stock	Santa Elena	B-29	Estación Cernaím "Palmar"	X
4	IH15013 (1:10)	Santa Elena	B-29	Estación Cernaím "Palmar"	√
5	IH15014-stock	Machala	5	Vivabra S.A	X
6	IH15014 (1:10)	Machala	5	Vivabra S.A	X
7	IH15036 stock	Manabí	1	Cuellar	√
8	IH15036 (1:10)	Manabí	1	Cuellar	√
9	IH15032 stock	Esmeraldas	10	N.A.C	X
10	IH15032 (1:10)	Esmeraldas	10	N.A.C	X
11	D ₁₃	Positivo	Lightner	----	√
12	Control negativo	----	----	---	OK

18/02/2016

▷ Prueba de Primer HR IHNV estandarización de Temperaturas

Programa de Termociclado:

Método: IHNV gradiente.



Mixto de PCR.

H ₂ O	X16	148.8	μl
Buffer		24	μl
MgCl ₂		9.6	μl
dNTPs		6.4	μl
IHNV F ₁		7.2	μl
IHNV R ₁		7.2	μl
Tag		4.8	μl
ADN		2	μl

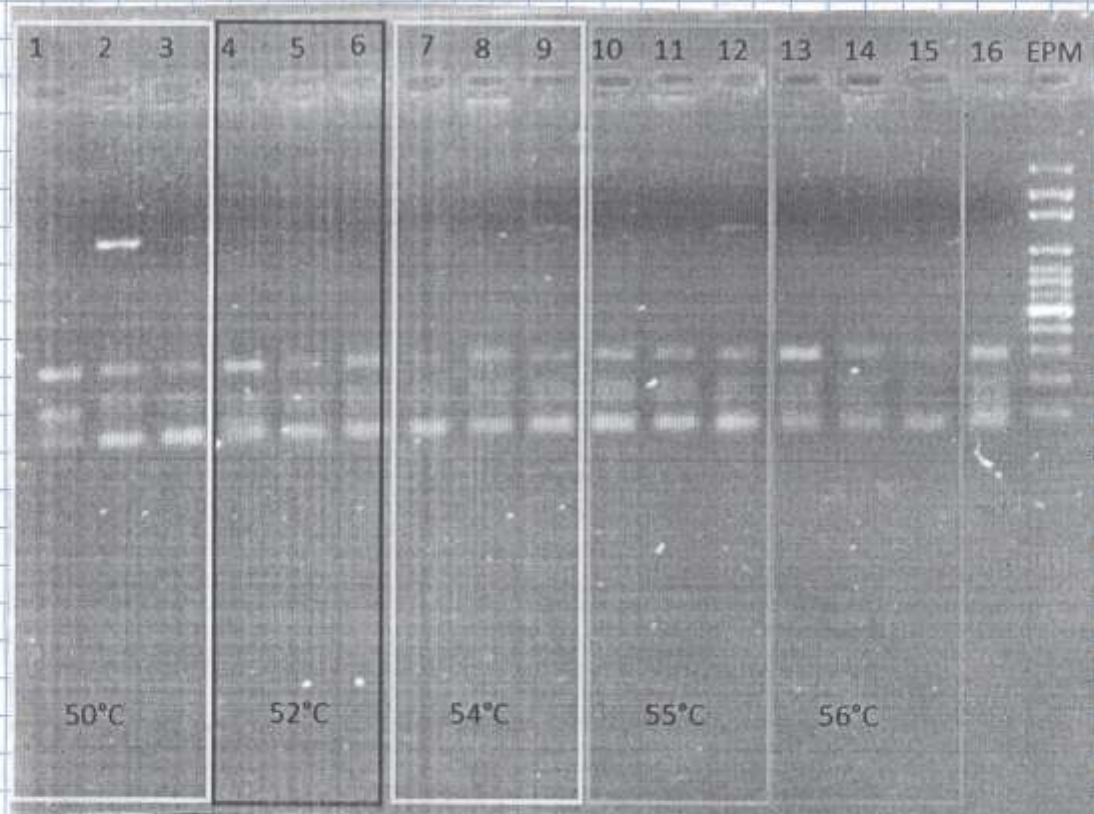


Figura 18. Prueba de los primer HR estandarización de temperaturas. En el gel se observan: 1 IH15013-1, 2 IH15036 3 D₁3, 4 IH15013-1, 5 IH15036, 6 D₁3, 7 IH15013, 8 IH15036 9 D₁3, 10 IH15013, 11 IH15036, 12 D₁3, 13 IH15013, 14 IH15036 15 D₁3, 16 control negativo

Tabla 18.

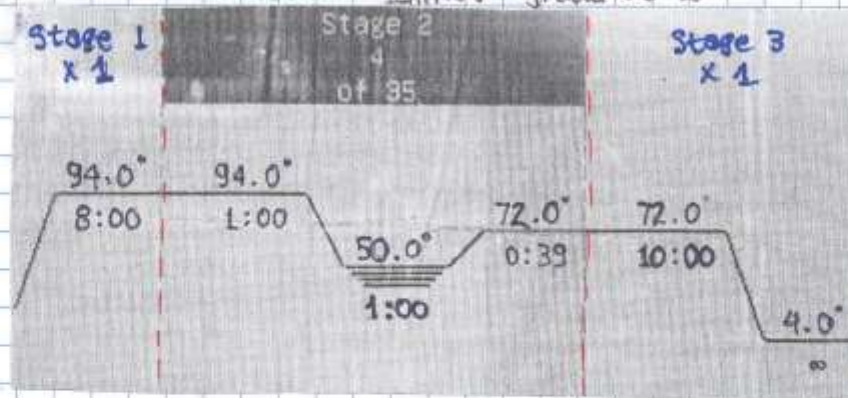
N°	Código	Provincia	# Piscina	Camaronera	Resultado
1	IH15013-1	Santa Elena	B-29	Estación Cenaim "Palmar"	X
2	IH15036	Manabí	1	Cuellar	✓
3	D ₁ 3	Positivo	Lightner	----	Tenue
4	IH15013-1	Santa Elena	B-29	Estación Cenaim "Palmar"	Tenue
5	IH15036	Manabí	1	Cuellar	Tenue
6	D ₁ 3	Positivo	Lightner	----	X
7	IH15013-1	Santa Elena	B-29	Estación Cenaim "Palmar"	Tenue
8	IH15036	Manabí	1	Cuellar	x
9	D ₁ 3	Positivo	Lightner	----	Tenue
10	IH15013-1	Santa Elena	B-29	Estación Cenaim "Palmar"	X
11	IH15036	Manabí	1	Cuellar	x
12	D ₁ 3	Positivo	Lightner	----	Tenue
13	IH15013-1	Santa Elena	B-29	Estación Cenaim "Palmar"	Tenue
14	IH15036	Manabí	1	Cuellar	x
15	D ₁ 3	Positivo	Lightner	----	Tenue
16	Control Negativo	----	----	----	ok

D Prueba de Primer HR IHNV estandarización de Temperaturas

18/02/2

Programa de Termociclador.

Método: IHNV gradiente 2



Mezcla de PCR.

H ₂ O	9.3	x17	149.6	μl
Buffer			25.5	μl
HgCl ₂			15.3	μl
dNTPs			8.5	μl
IHNVF ₁			8.5	μl
IHNVF ₂			8.5	μl
Tag			5.1	μl
ADN			2	μl

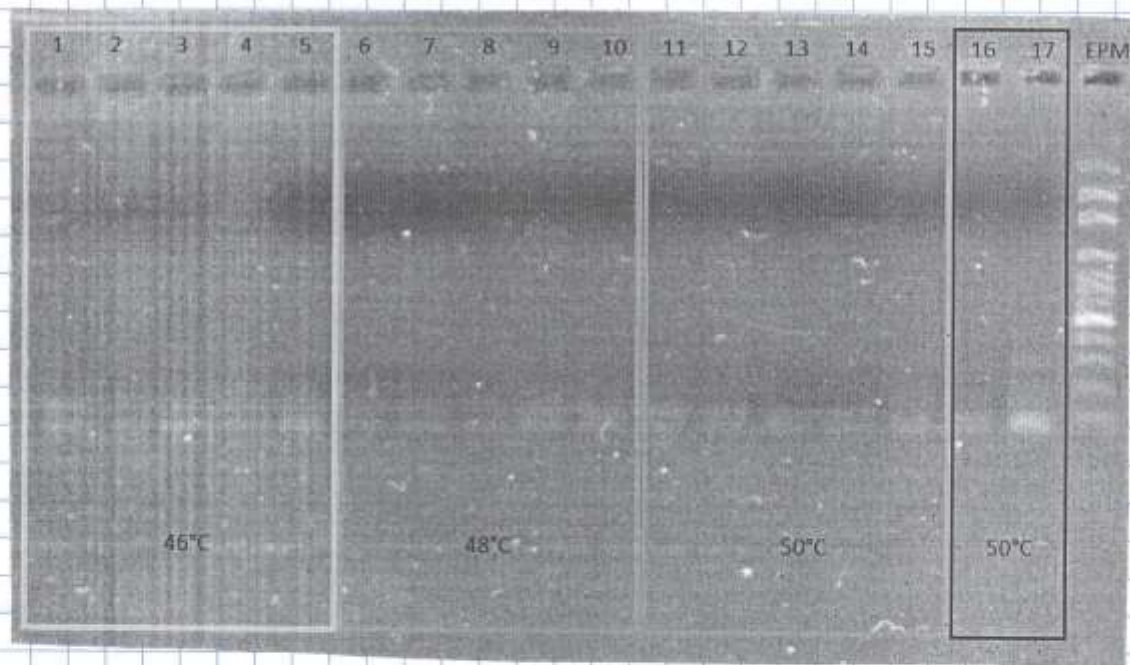


Figura 19.

En el gel se observan:

1 IH15014, 2 IH15032 3 IH15070-4, 4 IH15014-2E, 5 D₃d1, 6 IH15014, 7 IH15032 8 IH15070-4, 9 IH15014-2E, 10 D₃d1, 11 IH15014, 12 IH15032 13 IH15070-4, 14 IH15014-2E, 15 D₃d1, 16 D₃d1, 17 Control negativo.

Tabla 19.

Número	Código	Provincia	Proceso	Temperatura
1	IH15014	Machala	Pool	46°C
2	IH15032	Esmeraldas	Pool	46°C
3	IH15070-4	Guayas	Individual	46°C
4	IH15014-2E	Machala	Individual	46°C
5	D ₃ d1	Positivo	Lightner	46°C
6	IH15014	Machala	Pool	48°C
7	IH15032	Esmeraldas	Pool	48°C
8	IH15070-4	Guayas	Individual	48°C
9	IH15014-2E	Machala	Individual	48°C
10	D ₃ d1	Positivo	Lightner	48°C
11	IH15014	Machala	Pool	50°C
12	IH15032	Esmeraldas	Pool	50°C
13	IH15070-4	Guayas	Individual	50°C
14	IH15014-2E	Machala	Individual	50°C
15	D ₃ d1	Positivo	Lightner	50°C
16	D ₃ d1	Positivo	Lightner	50°C
17	Control Negativo	----		50°C

D Paeoba primun HR Temperatura 48°C

22/02/2016

Programa de Termociclado.

Método EHHNV 48

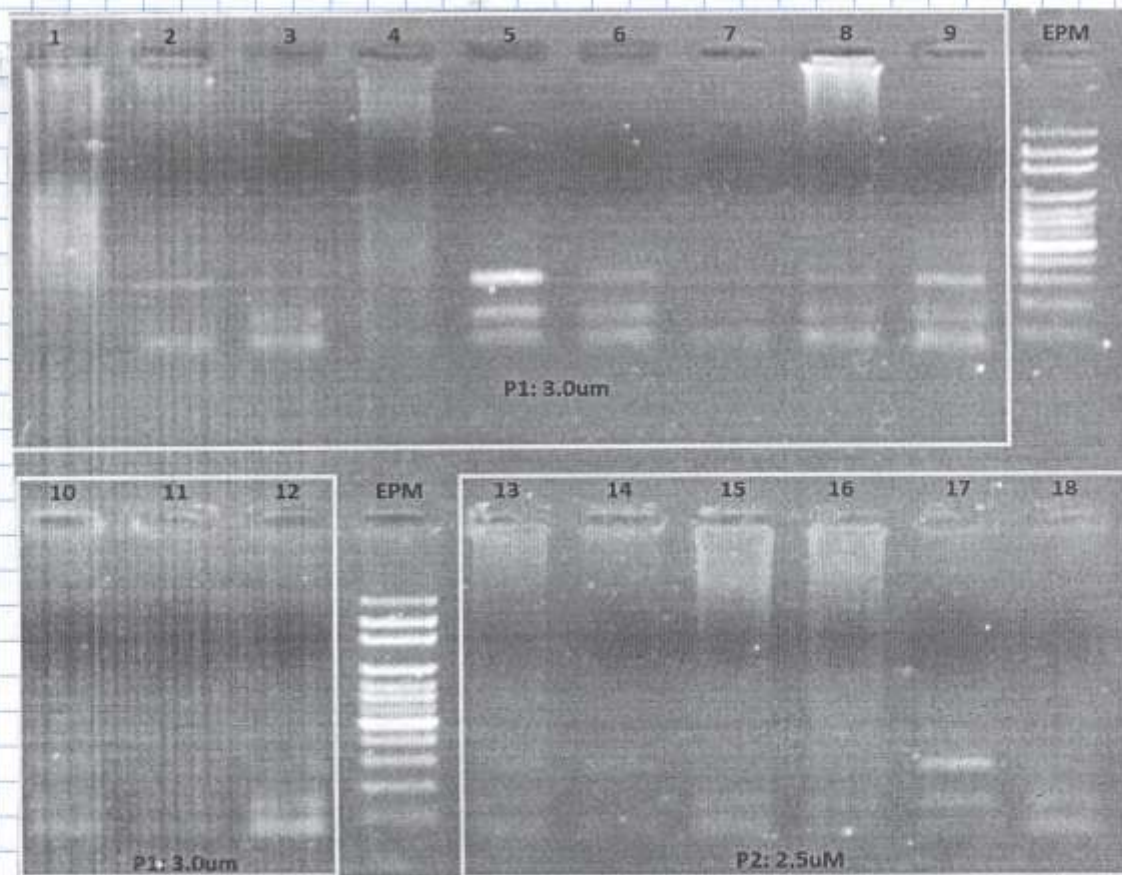
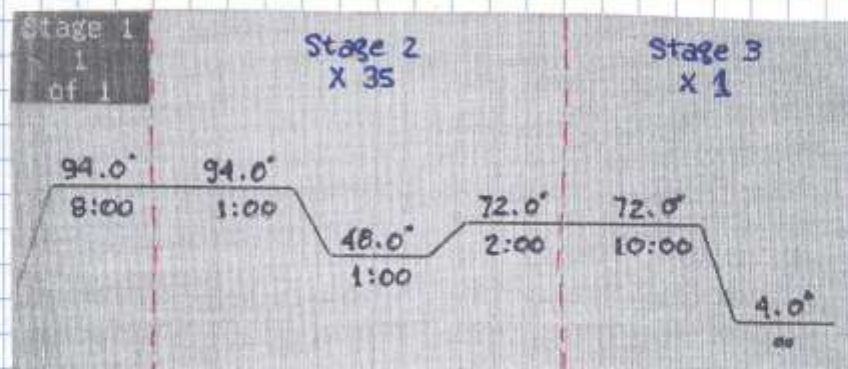


Figura 20.

En el gel se observan 1 IH15012-3 (1:10), 2 IH15015 (1:10), 3 IH15019-2 (1:10), 4 IH15032 (1:10), 5 IH15038 (1:10), 6 IH15012-3 (1:50), 7 IH15015 (1:50), 8 IH15019-2 (1:50), 9 IH15032 (1:50), 10 IH15038 (1:50), 11 D₂O, 12 Control Negativo 13 IH15012-3 (1:10), 14 IH15015 (1:10), 15 IH15019-2 (1:10), 16 IH15032 (1:10) 17 IH15038 (1:10), 18 IH15012-3 (1:50).

Tabla 20.

N°	Código	Provincia	Cantaronera	Dilución
1	IH15012-3	Santa Elena	Estación Cenaim "Palmar"	(1:10)
2	IH15015	Machala (La Primavera)	Marest. C.A	(1:10)
3	IH15019-2	Guayas (Puerto Roma)	Comuna de Puerto Roma	(1:10)
4	IH15032	Esmeraldas (San José de Chamanga)	N.A.C	(1:10)
5	IH15038	Manabí (San Agustín)	Vergel	(1:10)
6	IH15012-3	Santa Elena	Estación Cenaim "Palmar"	(1:50)
7	IH15015	Machala (La Primavera)	Marest. C.A	(1:50)
8	IH15019-2	Guayas (Puerto Roma)	Comuna de Puerto Roma	(1:50)
9	IH15032	Esmeraldas (San José de Chamanga)	N.A.C	(1:50)
10	IH15038	Manabí (San Agustín)	Vergel	(1:50)
11	D ₁ d3	Lightner	---	---
12	Control Negativo	-----	-----	---
13	IH15012-3	Santa Elena	Estación Cenaim "Palmar"	(1:10)
14	IH15015	Machala (La Primavera)	Marest. C.A	(1:10)
15	IH15019-2	Guayas (Puerto Roma)	Comuna de Puerto Roma	(1:10)
16	IH15032	Esmeraldas (San José de Chamanga)	N.A.C	(1:10)
17	IH15038	Manabí (San Agustín)	Vergel	(1:10)
18	IH15012-3	Santa Elena	Estación Cenaim "Palmar"	(1:50)

D Prueba primer HR Temperatura 48°C (continuación)

Mezcla de PCR.

H₂O
Buffer
MgCl₂
dNTPs
TAA
Taq
ADN

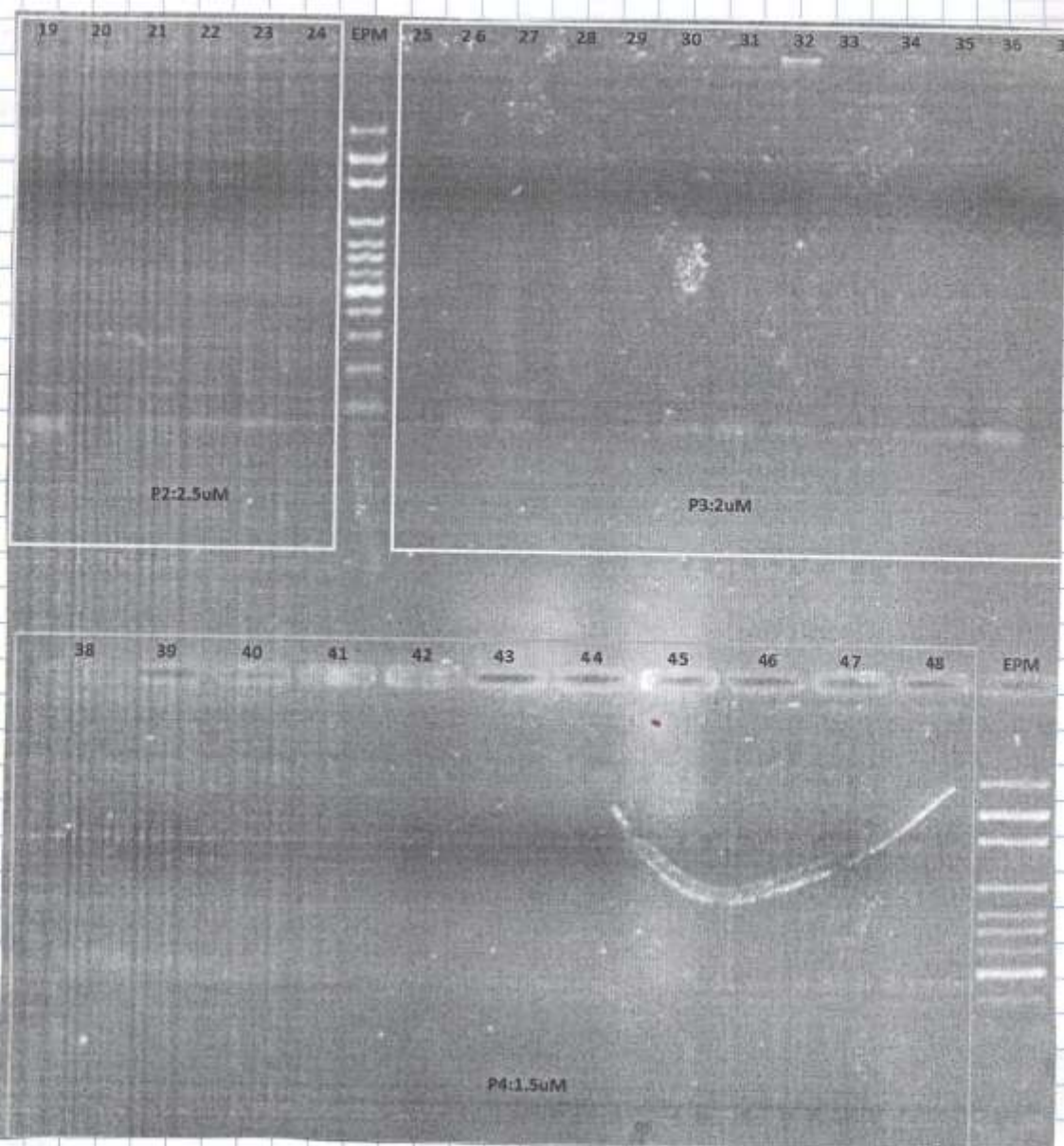


Figura 21.

En el gel se observan 19 IH15015 (1:50), 20 IH15019-2 (1:50), 21 IH15032 (1:50), 22 IH15038 (1:50), 23 D₁d3, 24 Control Negativo 25 IH15012-3 (1:10), 26 IH15015 (1:10), 27 IH15019-2 (1:10), 28 IH15038 (1:10) 29 IH15032 (1:10), 30 IH15015 (1:50), 31 IH15019-2 (1:50), 32 IH15032 (1:50), 33 IH15012-3 (1:50), 34 IH15038 (1:50)), 35 D₁d3, 36 Control Negativo, 37 IH15012-3 (1:10), 38 IH15015 (1:10), 39 IH15019-2 (1:10), 40 IH15038 (1:10) 41 IH15032 (1:10), 42 IH15015 (1:50), 43 IH15019-2 (1:50), 44 IH15032 (1:50), 45 IH15012-3 (1:50), 46 IH15038 (1:50)), 47 D₁d3, 48 Control Negativo.

22/02/2016

Tabla 21.

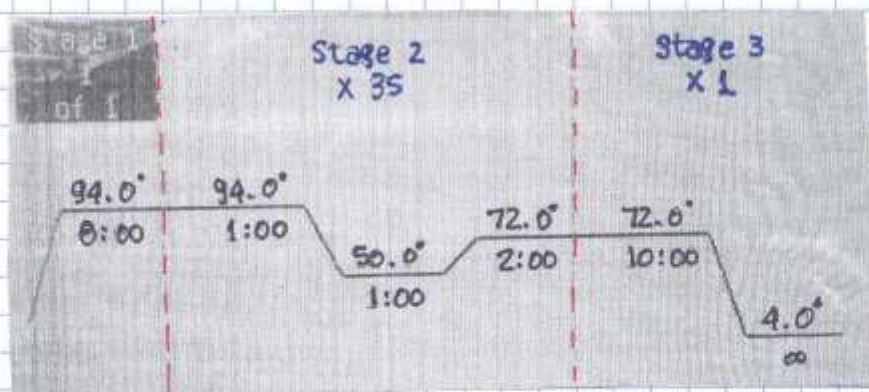
22/02/2016

N°	Código	Provincia	Característica	Dilución
19	IH15015	Machala (La Primavera)	Marest. C.A	(1:50)
20	IH15019-2	Guayas (Puerto Roma)	Comuna de Puerto Roma	(1:50)
21	IH15032	Esmeraldas (San José de Chamanga)	N.A.C	(1:50)
22	IH15038	Manabí (San Agustín)	Vergel	(1:50)
23	D ₁ d3	Lightner	----	----
24	Control Negativo	-----	-----	-----
25	IH15012-3	Santa Elena	Estación Cenaim "Palmar"	(1:10)
26	IH15015	Machala (La Primavera)	Marest. C.A	(1:10)
27	IH15019-2	Guayas (Puerto Roma)	Comuna de Puerto Roma	(1:10)
28	IH15038	Manabí (San Agustín)	Vergel	(1:10)
29	IH15032	Esmeraldas (San José de Chamanga)	N.A.C	(1:10)
30	IH15015	Machala (La Primavera)	Marest. C.A	(1:50)
31	IH15019-2	Guayas (Puerto Roma)	Comuna de Puerto Roma	(1:50)
32	IH15032	Esmeraldas (San José de Chamanga)	N.A.C	(1:50)
33	IH15012-3	Santa Elena	Estación Cenaim "Palmar"	(1:50)
34	IH15038	Manabí (San Agustín)	Vergel	(1:50)
35	D ₁ d3	Lightner	-----	----
36	Control Negativo	-----	-----	----
37	IH15012-3	Santa Elena	Estación Cenaim "Palmar"	(1:10)
38	IH15015	Machala (La Primavera)	Marest. C.A	(1:10)
39	IH15019-2	Guayas (Puerto Roma)	Comuna de Puerto Roma	(1:10)
40	IH15038	Manabí (San Agustín)	Vergel	(1:10)
41	IH15032	Esmeraldas (San José de Chamanga)	N.A.C	(1:10)
42	IH15015	Machala (La Primavera)	Marest. C.A	(1:50)
43	IH15019-2	Guayas (Puerto Roma)	Comuna de Puerto Roma	(1:50)
44	IH15032	Esmeraldas (San José de Chamanga)	N.A.C	(1:50)
45	IH15012-3	Santa Elena	Estación Cenaim "Palmar"	(1:50)
46	IH15038	Manabí (San Agustín)	Vergel	(1:50)
47	D ₁ d3	Lightner	-----	----
48	Control Negativo	-----	-----	----

22/02/2016

▷ Prueba primer HR Temperatura 50°C

IIHNV 50



Programa de Termociclador.

Herda de PCR:

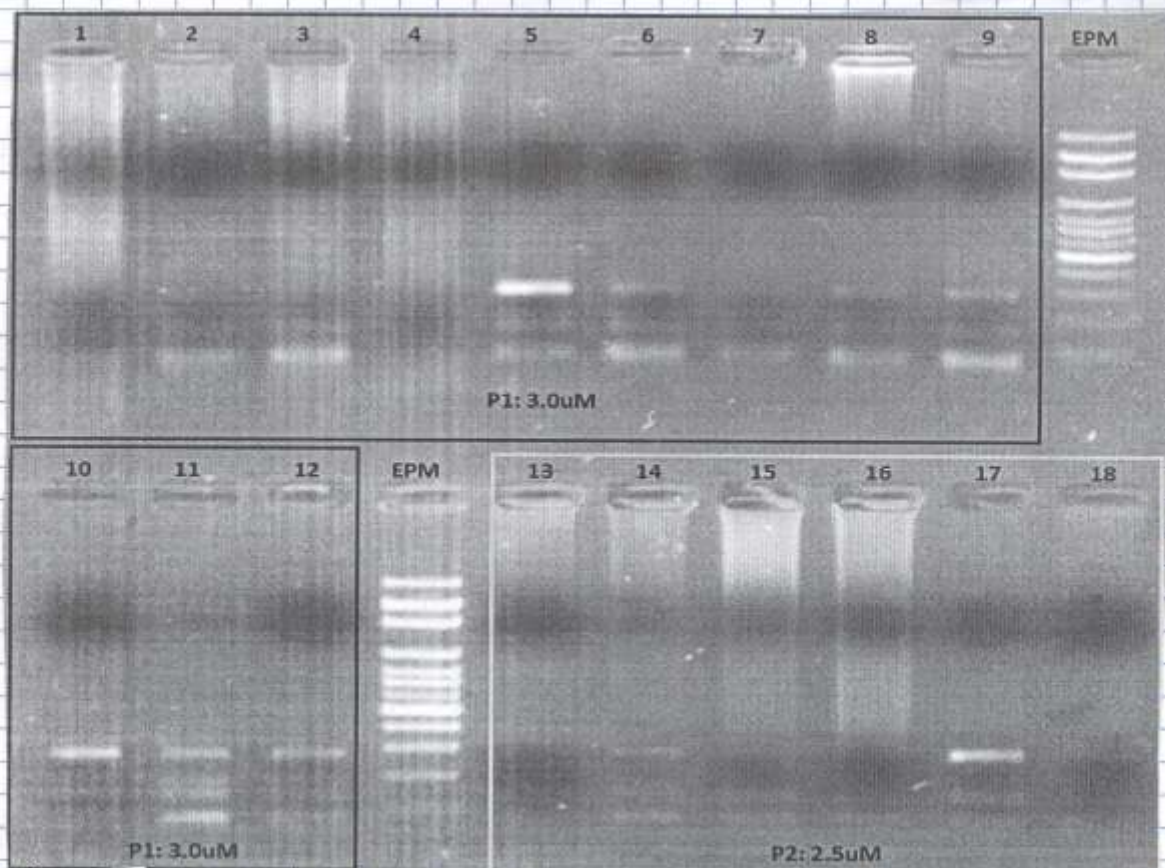


Figura 22.

En el gel se observan 1 IH15012-3 (1:10), 2 IH15015 (1:10), 3 IH15019-2 (1:10), 4 IH15032 (1:10), 5 IH15038 (1:10), 6 IH15012-3 (1:50), 7 IH15015 (1:50), 8 IH15019-2 (1:50), 9 IH15032 (1:50), 10 IH15038 (1:50), 11 D₁d3, 12 Control Negativo 13 IH15012-3 (1:10), 14 IH15015 (1:10), 15 IH15019-2 (1:10), 16 IH15032 (1:10) 17 IH15038 (1:10), 18 IH15012-3 (1:50).

Tabla 22.

N°	Código	Provincia	Camaronera	Dilución
1	IH15012-3	Santa Elena	Estación Cenaím "Palmar"	(1:10)
2	IH15015	Machala (La Primavera)	Marest. C.A	(1:10)
3	IH15019-2	Guayas (Puerto Roma)	Comuna de Puerto Roma	(1:10)
4	IH15032	Esmeraldas (San José de Chamanga)	N.A.C	(1:10)
5	IH15038	Manabí (San Agustín)	Vergel	(1:10)
6	IH15012-3	Santa Elena	Estación Cenaím "Palmar"	(1:50)
7	IH15015	Machala (La Primavera)	Marest. C.A	(1:50)
8	IH15019-2	Guayas (Puerto Roma)	Comuna de Puerto Roma	(1:50)
9	IH15032	Esmeraldas (San José de Chamanga)	N.A.C	(1:50)
10	IH15038	Manabí (San Agustín)	Vergel	(1:50)
11	D ₁ d3	Lightner	----	----
12	Control Negativo	-----	-----	-----
13	IH15012-3	Santa Elena	Estación Cenaím "Palmar"	(1:10)
14	IH15015	Machala (La Primavera)	Marest. C.A	(1:10)
15	IH15019-2	Guayas (Puerto Roma)	Comuna de Puerto Roma	(1:10)

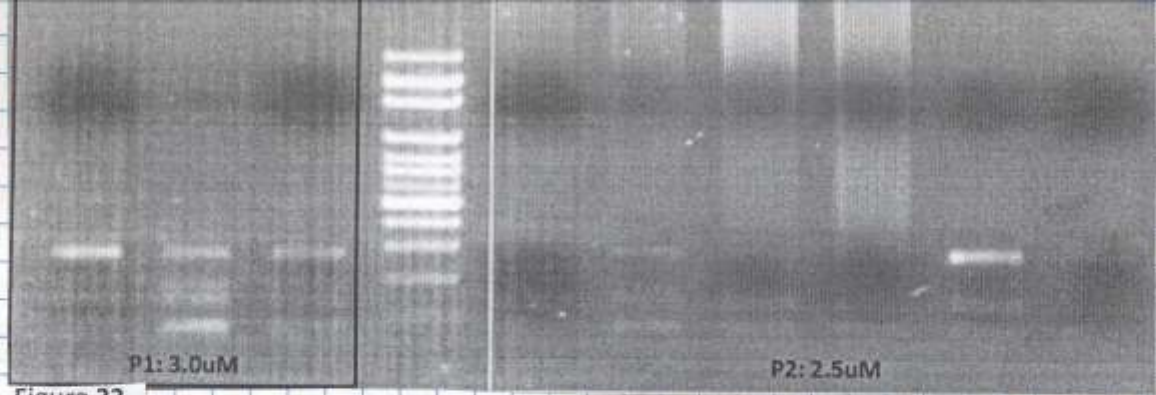


Figura 22.

En el gel se observan 1 IH15012-3 (1:10), 2 IH15015 (1:10), 3 IH15019-2 (1:10), 4 IH15032 (1:10), 5 IH15038 (1:10), 6 IH15012-3 (1:50), 7 IH15015 (1:50), 8 IH15019-2 (1:50), 9 IH15032 (1:50), 10 IH15038 (1:50), 11 D₁d3, 12 Control Negativo 13 IH15012-3 (1:10), 14 IH15015 (1:10), 15 IH15019-2 (1:10), 16 IH15032 (1:10) 17 IH15038 (1:10), 18 IH15012-3 (1:50).

Tabla 22.

N°	Código	Provincia	Camaronera	Dilución
1	IH15012-3	Santa Elena	Estación Cenaím "Palmar"	(1:10)
2	IH15015	Machala (La Primavera)	Marest. C.A	(1:10)
3	IH15019-2	Guayas (Puerto Roma)	Comuna de Puerto Roma	(1:10)
4	IH15032	Esmeraldas (San José de Chamanga)	N.A.C	(1:10)
5	IH15038	Manabí (San Agustín)	Vergel	(1:10)
6	IH15012-3	Santa Elena	Estación Cenaím "Palmar"	(1:50)
7	IH15015	Machala (La Primavera)	Marest. C.A	(1:50)
8	IH15019-2	Guayas (Puerto Roma)	Comuna de Puerto Roma	(1:50)
9	IH15032	Esmeraldas (San José de Chamanga)	N.A.C	(1:50)
10	IH15038	Manabí (San Agustín)	Vergel	(1:50)
11	D ₁ d3	Lightner	----	----
12	Control Negativo	-----	-----	----
13	IH15012-3	Santa Elena	Estación Cenaím "Palmar"	(1:10)
14	IH15015	Machala (La Primavera)	Marest. C.A	(1:10)
15	IH15019-2	Guayas (Puerto Roma)	Comuna de Puerto Roma	(1:10)
16	IH15032	Esmeraldas (San José de Chamanga)	N.A.C	(1:10)
17	IH15038	Manabí (San Agustín)	Vergel	(1:10)
18	IH15012-3	Santa Elena	Estación Cenaím "Palmar"	(1:50)

▷ Prueba de primer HE Temperatura 50°C (continuación)

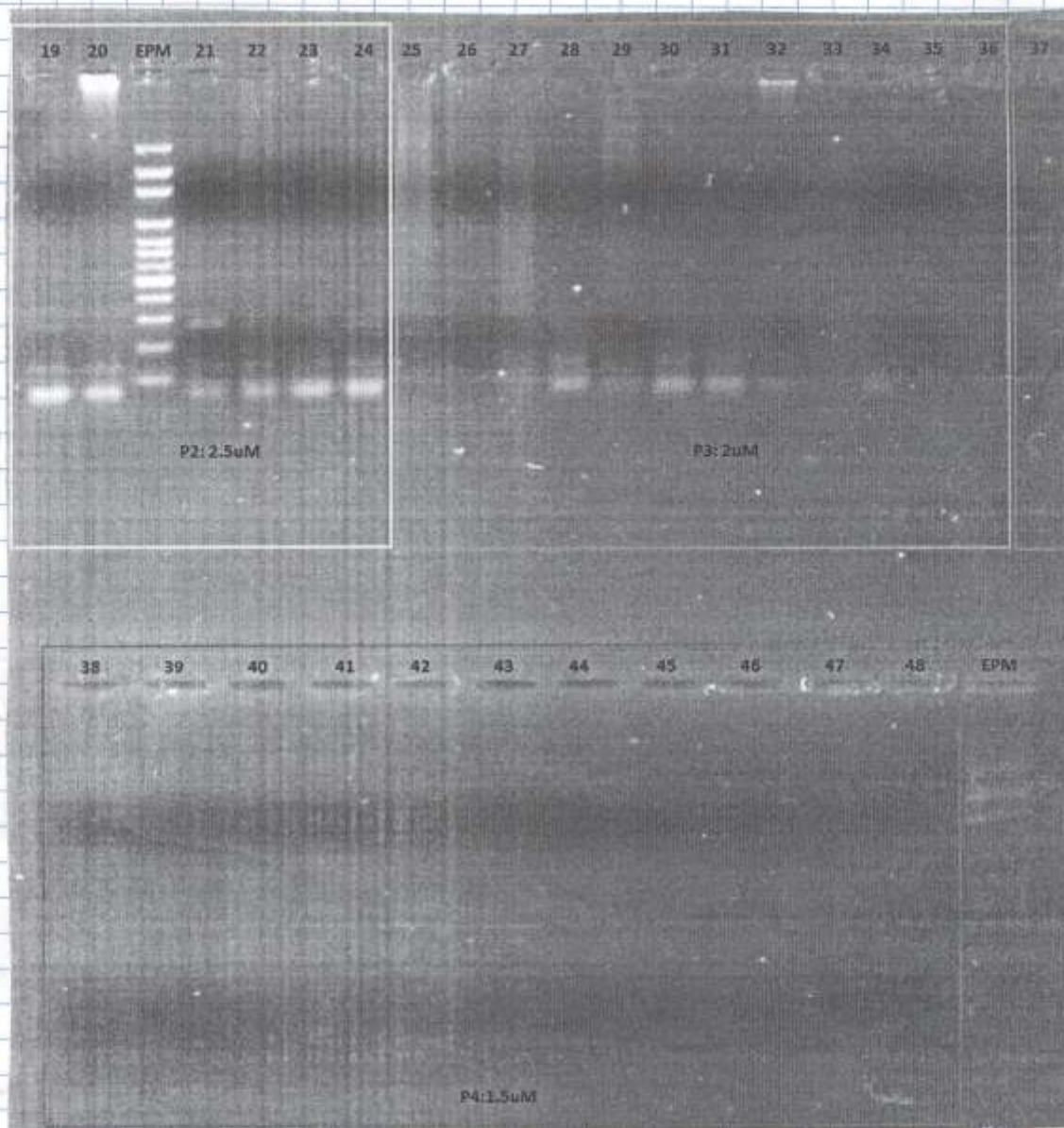


Figura 23.

En el gel se observan 19 IH15015 (1:50), 20 IH15019-2 (1:50), 21 IH15032 (1:50), 22 IH15038 (1:50), 23 D₁d3, 24 Control Negativo 25 IH15012-3 (1:10), 26 IH15015 (1:10), 27 IH15019-2 (1:10), 28 IH15038 (1:10) 29 IH15032 (1:10), 30 IH15015 (1:50), 31 IH15019-2 (1:50), 32 IH15032 (1:50), 33 IH15012-3 (1:50), 34 IH15038 (1:50)), 35 D₁d3, 36 Control Negativo, 37 IH15012-3 (1:10), 38 IH15015 (1:10), 39 IH15019-2 (1:10), 40 IH15038 (1:10) 41 IH15032 (1:10), 42 IH15015 (1:50), 43 IH15019-2 (1:50), 44 IH15032 (1:50), 45 IH15012-3 (1:50), 46 IH15038 (1:50)), 47 D₁d3, 48 Control Negativo

22/04/2016

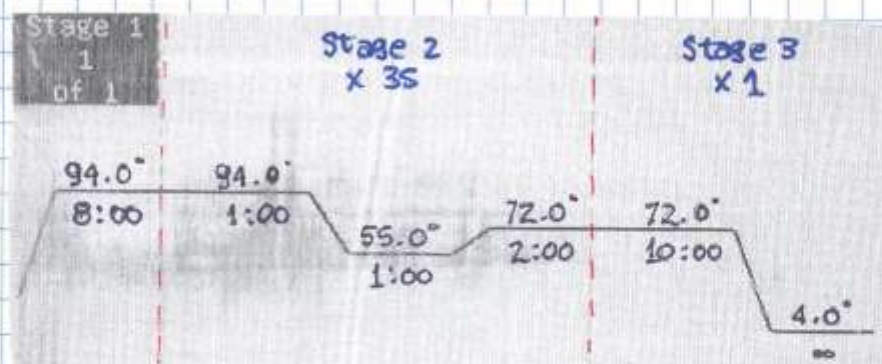
Tabla 23.

N°	Código	Provincia	Camaronera	Dilución
19	IH15015	Machala (La Primavera)	Marest. C.A	(1:50)
20	IH15019-2	Guayas (Puerto Roma)	Comuna de Puerto Roma	(1:50)
21	IH15032	Esmeraldas (San José de Chamanga)	N.A.C	(1:50)
22	IH15038	Manabí (San Agustín)	Vergel	(1:50)
23	D ₁ d3	Lightner	----	----
24	Control Negativo	-----	-----	----
25	IH15012-3	Santa Elena	Estación Cenaim "Palmar"	(1:10)
26	IH15015	Machala (La Primavera)	Marest. C.A	(1:10)
27	IH15019-2	Guayas (Puerto Roma)	Comuna de Puerto Roma	(1:10)
28	IH15038	Manabí (San Agustín)	Vergel	(1:10)
29	IH15032	Esmeraldas (San José de Chamanga)	N.A.C	(1:10)
30	IH15015	Machala (La Primavera)	Marest. C.A	(1:50)
31	IH15019-2	Guayas (Puerto Roma)	Comuna de Puerto Roma	(1:50)
32	IH15032	Esmeraldas (San José de Chamanga)	N.A.C	(1:50)
33	IH15012-3	Santa Elena	Estación Cenaim "Palmar"	(1:50)
34	IH15038	Manabí (San Agustín)	Vergel	(1:50)
35	D ₁ d3	Lightner	-----	----
36	Control Negativo	-----	-----	----
37	IH15012-3	Santa Elena	Estación Cenaim "Palmar"	(1:10)
38	IH15015	Machala (La Primavera)	Marest. C.A	(1:10)
39	IH15019-2	Guayas (Puerto Roma)	Comuna de Puerto Roma	(1:10)
40	IH15038	Manabí (San Agustín)	Vergel	(1:10)
41	IH15032	Esmeraldas (San José de Chamanga)	N.A.C	(1:10)
42	IH15015	Machala (La Primavera)	Marest. C.A	(1:50)
43	IH15019-2	Guayas (Puerto Roma)	Comuna de Puerto Roma	(1:50)
44	IH15032	Esmeraldas (San José de Chamanga)	N.A.C	(1:50)
45	IH15012-3	Santa Elena	Estación Cenaim "Palmar"	(1:50)
46	IH15038	Manabí (San Agustín)	Vergel	(1:50)
47	D ₁ d3	Lightner	----	----
48	Control Negativo	-----	-----	----

D Prueba primer HR Temperatura 55°C

Programa de Termociclado

Método = IHHNV55



Velocidad de PCR:

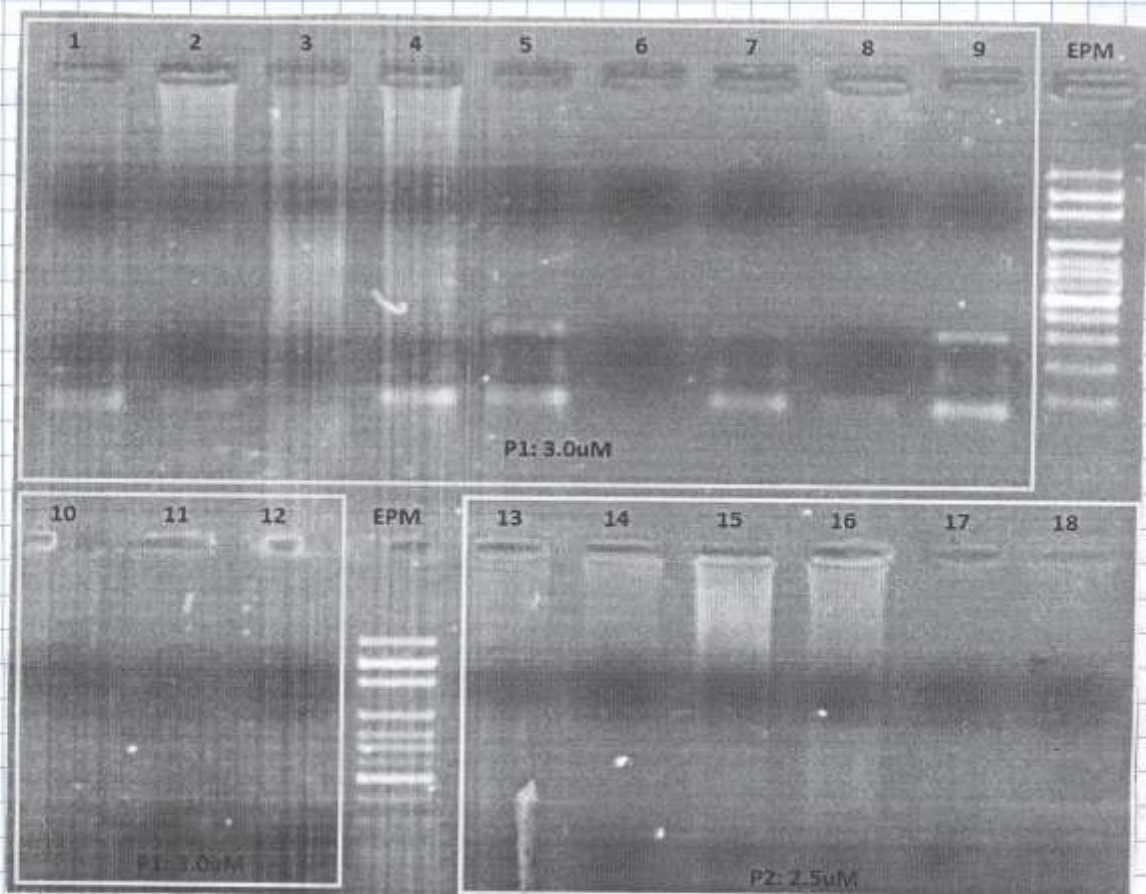


Figura 24.

En el gel se observan 1 IH15012-3 (1:10), 2 IH15015 (1:10), 3 IH15019-2 (1:10), 4 IH15032 (1:10), 5 IH15038 (1:10), 6 IH15012-3 (1:50), 7 IH15015 (1:50), 8 IH15019-2 (1:50), 9 IH15032 (1:50), 10 IH15038 (1:50), 11 D₂O₃, 12 Control Negativo 13 IH15012-3 (1:10), 14 IH15015 (1:10), 15 IH15019-2 (1:10), 16 IH15032 (1:10) 17 IH15038 (1:10), 18 IH15012-3 (1:50).

Tabla 24.

N°	Código	Provincia	Camaronera	Dilución
1	IH15012-3	Santa Elena	Estación Cenaim "Palmar"	(1:10)
2	IH15015	Machala (La Primavera)	Marest. C.A	(1:10)
3	IH15019-2	Guayas (Puerto Roma)	Comuna de Puerto Roma	(1:10)
4	IH15032	Esmeraldas (San José de Chamanga)	N.A.C	(1:10)
5	IH15038	Manabí (San Agustín)	Vergel	(1:10)
6	IH15012-3	Santa Elena	Estación Cenaim "Palmar"	(1:50)
7	IH15015	Machala (La Primavera)	Marest. C.A	(1:50)
8	IH15019-2	Guayas (Puerto Roma)	Comuna de Puerto Roma	(1:50)
9	IH15032	Esmeraldas (San José de Chamanga)	N.A.C	(1:50)
10	IH15038	Manabí (San Agustín)	Vergel	(1:50)
11	D ₁ d3	Lightner	----	----
12	Control Negativo	-----	-----	----
13	IH15012-3	Santa Elena	Estación Cenaim "Palmar"	(1:10)
14	IH15015	Machala (La Primavera)	Marest. C.A	(1:10)
15	IH15019-2	Guayas (Puerto Roma)	Comuna de Puerto Roma	(1:10)
16	IH15032	Esmeraldas (San José de Chamanga)	N.A.C	(1:10)
17	IH15038	Manabí (San Agustín)	Vergel	(1:10)
18	IH15012-3	Santa Elena	Estación Cenaim "Palmar"	(1:50)

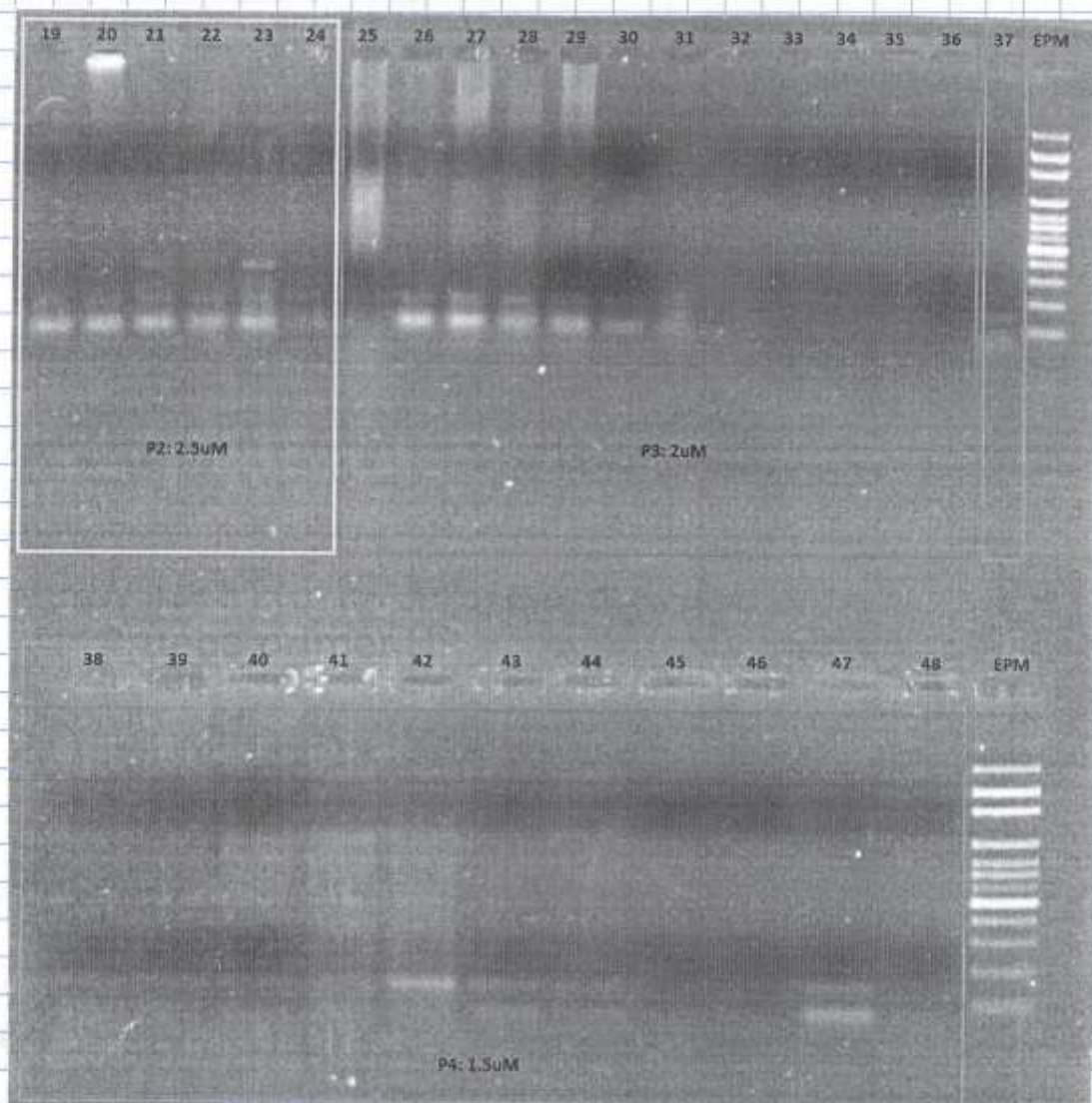


Figura 25.

En el gel se observan 19 IH15015 (1:50), 20 IH15019-2 (1:50), 21 IH15032 (1:50), 22 IH15038 (1:50), 23 D₂d3, 24 Control Negativo 25 IH15012-3 (1:10), 26 IH15015 (1:10), 27 IH15019-2 (1:10), 28 IH15038 (1:10) 29 IH15032 (1:10), 30 IH15015 (1:50), 31 IH15019-2 (1:50), 32 IH15032 (1:50), 33 IH15012-3 (1:50), 34 IH15038 (1:50)), 35 D₂d3, 36 Control Negativo, 37 IH15012-3 (1:10), 38 IH15015 (1:10), 39 IH15019-2 (1:10), 40 IH15038 (1:10) 41 IH15032 (1:10), 42 IH15015 (1:50), 43 IH15019-2 (1:50), 44 IH15032 (1:50), 45 IH15012-3 (1:50), 46 IH15038 (1:50)), 47 D₂d3, 48 Control Negativo.

Nota:

En los pocillos 33, 34, 35, 36 no hay masas mix.

Tabla 25.

N°	Código	Provincia	Camaronera	Dilución
19	IH15015	Machala (La Primavera)	Marest. C.A	(1:50)
20	IH15019-2	Guayas (Puerto Roma)	Comuna de Puerto Roma	(1:50)
21	IH15032	Esmeraldas (San José de Chamanga)	N.A.C	(1:50)
22	D ₁ d3	Lightner	-----	(1:50)
23	Control Negativo	-----	-----	----
24	IH15038	Manabí (San Agustín)	Vergel	----
25	IH15012-3	Santa Elena	Estación Cenaím "Palmar"	(1:10)
26	IH15015	Machala (La Primavera)	Marest. C.A	(1:10)
27	IH15019-2	Guayas (Puerto Roma)	Comuna de Puerto Roma	(1:10)
28	IH15038	Manabí (San Agustín)	Vergel	(1:10)
29	IH15032	Esmeraldas (San José de Chamanga)	N.A.C	(1:10)
30	IH15015	Machala (La Primavera)	Marest. C.A	(1:50)
31	IH15019-2	Guayas (Puerto Roma)	Comuna de Puerto Roma	(1:50)
32	IH15032	Esmeraldas (San José de Chamanga)	N.A.C	(1:50)
33	IH15012-3	Santa Elena	Estación Cenaím "Palmar"	(1:50)
34	IH15038	Manabí (San Agustín)	Vergel	(1:50)
35	D ₁ d3	Lightner	-----	----
36	Control Negativo	-----	-----	----
37	IH15012-3	Santa Elena	Estación Cenaím "Palmar"	(1:10)
38	IH15015	Machala (La Primavera)	Marest. C.A	(1:10)
39	IH15019-2	Guayas (Puerto Roma)	Comuna de Puerto Roma	(1:10)
40	IH15038	Manabí (San Agustín)	Vergel	(1:10)
41	IH15032	Esmeraldas (San José de Chamanga)	N.A.C	(1:10)
42	IH15015	Machala (La Primavera)	Marest. C.A	(1:50)
43	IH15019-2	Guayas (Puerto Roma)	Comuna de Puerto Roma	(1:50)
44	IH15032	Esmeraldas (San José de Chamanga)	N.A.C	(1:50)
45	IH15012-3	Santa Elena	Estación Cenaím "Palmar"	(1:50)
46	IH15038	Manabí (San Agustín)	Vergel	(1:50)
47	D ₁ d1	Lightner	----	----
48	Control Negativo	-----	-----	----

D Prueba 1 y 2 primer HR IHNV

Programa de Termociclador

Método = Prueba 1 IHNV

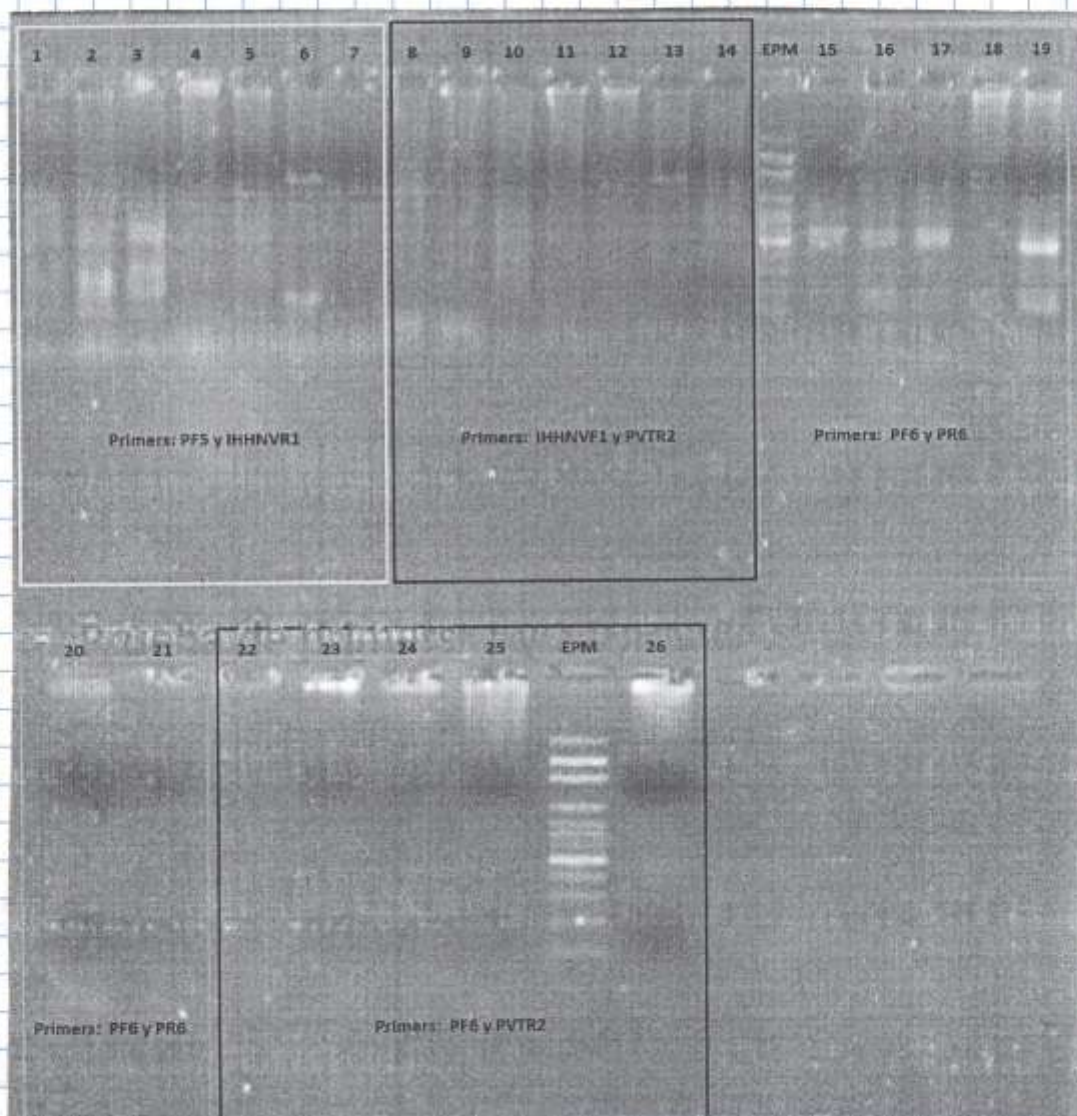
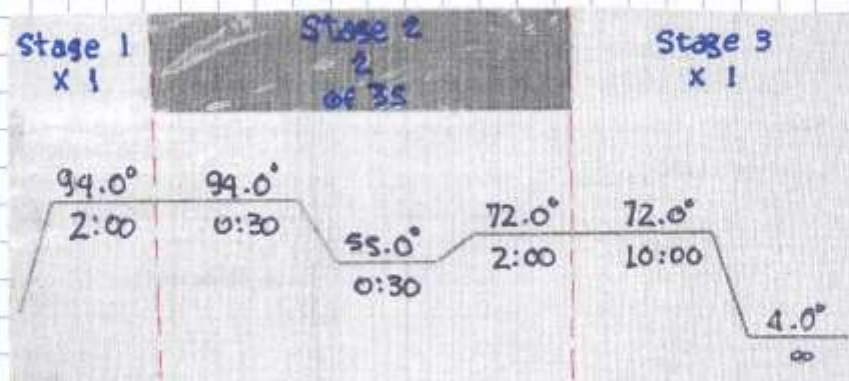


Figura 26.

En el gel se observan 1 IH15012-3, 2 IH15015, 3 IH15019-2, 4 IH15032, 5 IH15038, 6 D₁d1, 7 Control Negativo, 8 IH15012-3, 9 IH15015, 10 IH15019-2, 11 IH15032, 12 IH15038, 13 D₁d1, 14 Control Negativo, 15 IH15012-3, 16 IH15015, 17 IH15019-2, 18 IH15032, 19 IH15038, 20 D₁d1, 21 Control Negativo, 22 IH15012-3, 23 IH15015, 24 IH15019-2, 25 IH15032, 26 IH15038

Mezcla de PCR.

H ₂ O	5.8	XB	40	ul
Buffer	1.0		8	ul
HgCl ₂	0.4		3.2	ul
dNTPs	0.2		1.6	ul
P1	0.5		4	ul
P2	0.5		4	ul
Taq	0.4		3.2	ul
ADN	2ul			

Tabla. 26

Nota:
Hacer cada
Sigo de
Primeras
es la misma
cantidad de
mezcla

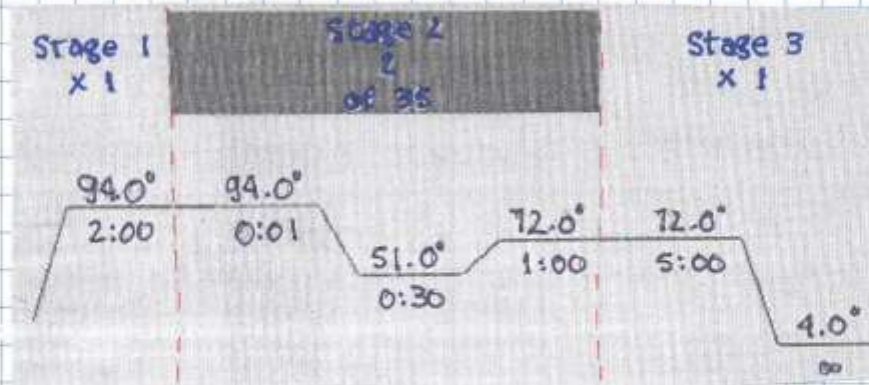
N°	Código	Provincia	Camaronera	Prueba
1	IH15012-3	Santa Elena	Estación Cenaim "Palmar"	PF5 y IHHNVR1
2	IH15015	Machala (La Primavera)	Marest. C.A	PF5 y IHHNVR1
3	IH15019-2	Guayas (Puerto Roma)	Comuna de Puerto Roma	PF5 y IHHNVR1
4	IH15032	Esmeraldas (San José de Chamanga)	N.A.C	PF5 y IHHNVR1
5	IH15038	Manabí (San Agustín)	Vergel	PF5 y IHHNVR1
6	D ₁ d1	Positivo	Lightner	PF5 y IHHNVR1
7	Control Negativo	-----	-----	-----
8	IH15012-3	Santa Elena	Estación Cenaim "Palmar"	IHHNVF1 y PVTR2
9	IH15015	Machala (La Primavera)	Marest. C.A	IHHNVF1 y PVTR2
10	IH15019-2	Guayas (Puerto Roma)	Comuna de Puerto Roma	IHHNVF1 y PVTR2
11	IH15032	Esmeraldas (San José de Chamanga)	N.A.C	IHHNVF1 y PVTR2
12	IH15038	Manabí (San Agustín)	Vergel	IHHNVF1 y PVTR2
13	D ₁ d1	Positivo	Lightner	IHHNVF1 y PVTR2
14	Control Negativo	-----	-----	-----
15	IH15012-3	Santa Elena	Estación Cenaim "Palmar"	PF5 y PR6
16	IH15015	Machala (La Primavera)	Marest. C.A	PF5 y PR6
17	IH15019-2	Guayas (Puerto Roma)	Comuna de Puerto Roma	PF5 y PR6
18	IH15032	Esmeraldas (San José de Chamanga)	N.A.C	PF5 y PR6
19	IH15038	Manabí (San Agustín)	Vergel	PF5 y PR6
20	D ₁ d1	Positivo	Lightner	PF5 y PR6

4	IH15032	Esmeraldas (de Chamanga)			
5	IH15038	Manabí (San Agustín)	Vergel		PF5 y IHHNVR1
6	D ₁ d1	Positivo	Lightner		PF5 y IHHNVR1
7	Control Negativo	-----	-----		-----
8	IH15012-3	Santa Elena	Estación "Palmar"	Cenaim	IHHNVF1 y PVTR2
9	IH15015	Machala (La Primavera)	Marest. C.A		IHHNVF1 y PVTR2
10	IH15019-2	Guayas (Puerto Roma)	Comuna de Puerto Roma		IHHNVF1 y PVTR2
11	IH15032	Esmeraldas (San José de Chamanga)	N.A.C		IHHNVF1 y PVTR2
12	IH15038	Manabí (San Agustín)	Vergel		IHHNVF1 y PVTR2
13	D ₁ d1	Positivo	Lightner		IHHNVF1 y PVTR2
14	Control Negativo	-----	-----		-----
15	IH15012-3	Santa Elena	Estación "Palmar"	Cenaim	PF5 y PR6
16	IH15015	Machala (La Primavera)	Marest. C.A		PF5 y PR6
17	IH15019-2	Guayas (Puerto Roma)	Comuna de Puerto Roma		PF5 y PR6
18	IH15032	Esmeraldas (San José de Chamanga)	N.A.C		PF5 y PR6
19	IH15038	Manabí (San Agustín)	Vergel		PF5 y PR6
20	D ₁ d1	Positivo	Lightner		PF5 y PR6
21	Control Negativo	-----	-----		-----
22	IH15012-3	Santa Elena	Estación "Palmar"	Cenaim	PF6 y PVRT2
23	IH15015	Machala (La Primavera)	Marest. C.A		PF6 y PVRT2
24	IH15019-2	Guayas (Puerto Roma)	Comuna de Puerto Roma		PF6 y PVRT2
25	IH15032	Esmeraldas (San José de Chamanga)	N.A.C		PF6 y PVRT2
26	IH15038	Manabí (San Agustín)	Vergel		PF6 y PVRT2

D Prueba 2 y 3 primer HR IHHNV

Programa de Termociclador

Método = Prueba 2 IHHNV



Método = Prueba 3 IHHNV

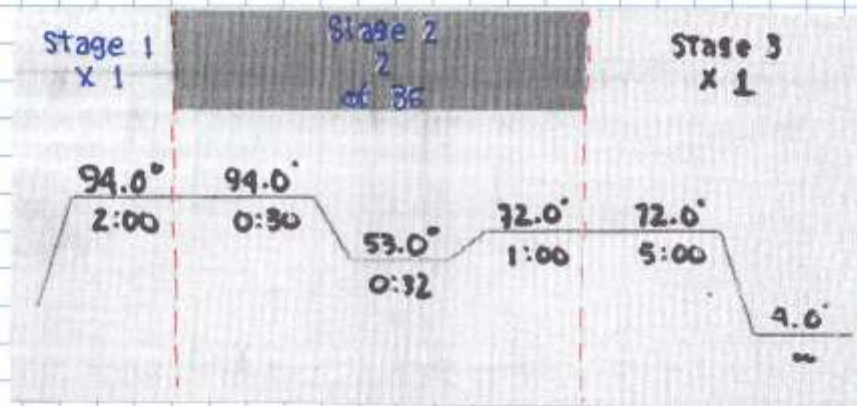


Figura 27.

En el gel se observan 27 D₁d1, 28 Control Negativo, 29 IH15012-3, 30 IH15015, 31 IH15019-2, 32 IH15032, 33 IH15038, 34 D₁d1, 35 Control Negativo.

Mezcla de PCR.

H ₂ O	5.0	x8	40	μl
Buffer	1.0		8	μl
MgCl ₂	0.4		3.2	μl
dNTPs	0.2		1.6	μl
P ₁	0.5		4	μl
P ₂	0.5		4	μl
Tag	0.4		3.2	μl
ADN	2 μl			

Tabla. 27

N°	Código	Provincia	Camaronera	Prueba
27	D ₁ d1	Positivo	Lightner	PF6 y PVRT2
28	Control Negativo	-----	-----	-----
29	IH15012-3	Santa Elena	Estación Cenaim "Palmar"	PF6 y IHNNVR1
30	IH15015	Machala (La Primavera)	Marest. C.A	PF6 y IHNNVR1
31	IH15019-2	Guayas (Puerto Roma)	Comuna de Puerto Roma	PF6 y IHNNVR1
32	IH15032	Esmeraldas (San José de Chamanga)	N.A.C	PF6 y IHNNVR1
33	IH15038	Manabí (San Agustín)	Vergel	PF6 y IHNNVR1
34	D ₁ d1	Positivo	Lightner	PF6 y PVRT2
35	Control Negativo	-----	-----	-----

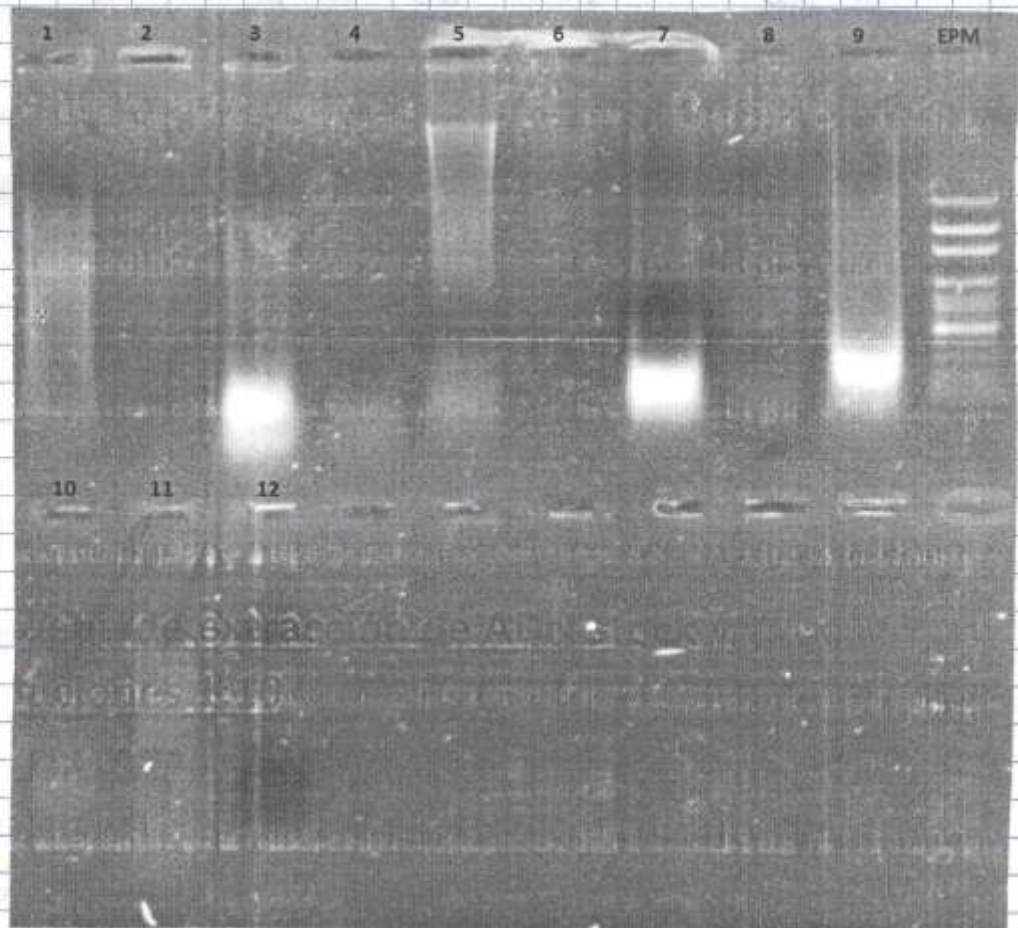


Figura 28. Prueba de los primers HR para secuenciación. En el gel se observan: 1 IH15012-3 stock, 2 IH15012-3 (1:10), 3 IH15015 stock, 4 IH15015 (1:10), 5 IH15019-2 stock, 6 IH15019-2 (1:10), 7 IH15032 stock, 8 IH15032 (1:10), 9 IH15038 stock, 10 IH15038 (1:10), 11 D₂d₁ stock, 12 D₂d₁ (1:10).

Tabla 28.

N°	Código	Provincia	Camaronera
1	IH15012-3 Stock	Santa Elena	Estación Cenaim "Palmar"
2	IH15012-3 (1:10)	Santa Elena	Estación Cenaim "Palmar"
3	IH15015 Stock	Machala (La Primavera)	Marest. C.A
4	IH15015 (1:10)	Machala (La Primavera)	Marest. C.A
5	IH15019-2 Stock	Guayas (Puerto Roma)	Comuna de Puerto Roma
6	IH15019-2 (1:10)	Guayas (Puerto Roma)	Comuna de Puerto Roma
7	IH15032	Esmeraldas (San José de Chamanga)	N.A.C
8	IH15032	Esmeraldas (San José de Chamanga)	N.A.C
9	IH15038	Manabí (San Agustín)	Vergel

11	D ₁ d1	Positivo	Lightner
12	D ₁ d1	Positivo	Lightner

24/02/2016)

IHHNV Primers PFB y IHHNVR1

Utilizando muestras para Secuenciar

Programa de Termociclador.

Mezcla de PCR

Dos veces:

Método = Prueba 3 IHHNV

30 Cycles {
 94°C → 2:00
 94°C → 0:30
 53°C → 0:32
 72°C → 1:00
 72°C → 5:00
 4°C → 00

H ₂ O	6.0	X 53	265
Buffer	1.0		53
2mM MgCl ₂	0.4		21.2
0.2mM dNTPS	0.2		10.6
0.5mM PFB	0.5		26.5
0.5mM IHHNVR1	0.5		26.5
Taq	0.4		21.2
ADN	2		

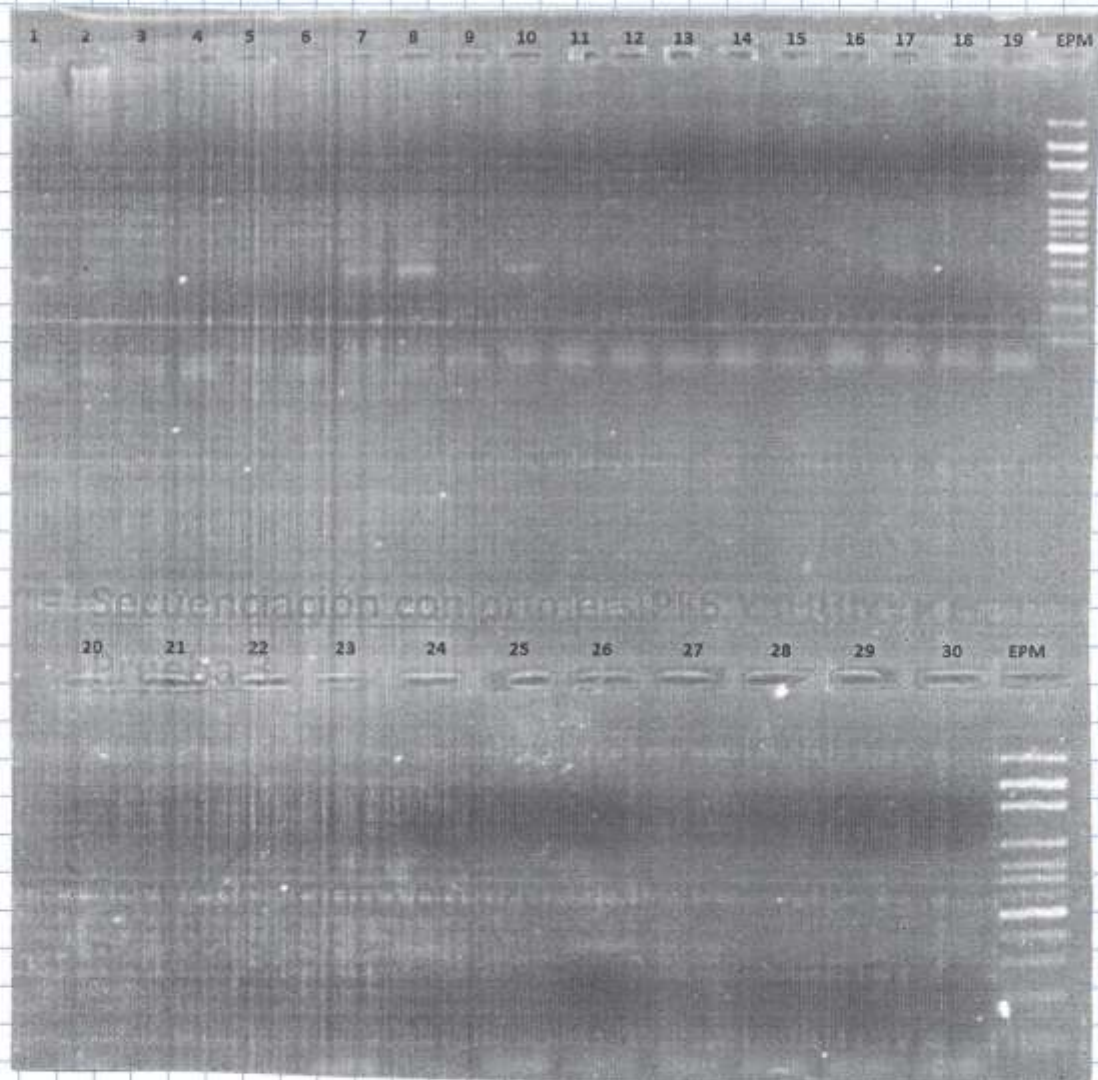


Figura 29. Prueba de los primers HR para secuenciación. En el gel se observan:

1 IH15001, 2 IH15002, 3 IH15003, 4 IH15004, 5 IH15005, 6 IH15006, 7 IH15007, 8 IH15008, 9 IH15009-1, 10 IH15009-5, 11 IH15009-6, 12 IH15009-7, 13 IH15009-8, 14 IH15009-9, 15 IH15009-10, 16 IH15010-2, 17 IH15010-3, 18 IH15010-4, 19 IH15010-8, 20 IH15010-10, 21 IH15011-7, 22 IH15012-1, 23 IH15012-2, 24 IH15012-3, 25 IH15012-4, 26 IH15012-10, 27 IH15013-1, 28 IH15013-3, 29 IH15013-4, 30 IH15013-5.

Tabla 29.

N°	Código	Provincia	Camaronera	# de Piscina	Resultado
1	IH15001	Guayas	Aquamar S.A.	160	✓
2	IH15002	Guayas	Aquamar S.A.	160	✓
3	IH15003	Guayas	Aquamar S.A.	160	✓
4	IH15004	Guayas	Aquamar S.A.	160	X
5	IH15005	Guayas	Aquamar S.A.	160	✓
6	IH15006	Guayas	Josefina (Naturisa)	28	X
7	IH15007	Guayas	Pez Joya (Naturisa)	40	✓ (Cortada)
8	IH15008	Guayas	Bonanza Cabac S.A (Naturisa)	32	✓ (Cortada)
9	IH15009-1	Santa Elena	Estación Cenaím "Palmar"	B-9	X
10	IH15009-5	Santa Elena	Estación Cenaím "Palmar"	B-9	✓
11	IH15009-6	Santa Elena	Estación Cenaím "Palmar"	B-9	X
12	IH15009-7	Santa Elena	Estación Cenaím "Palmar"	B-9	X
13	IH15009-8	Santa Elena	Estación Cenaím "Palmar"	B-9	X
14	IH15009-9	Santa Elena	Estación Cenaím "Palmar"	B-9	X
15	IH15009-10	Santa Elena	Estación Cenaím "Palmar"	B-9	X
16	IH15010-2	Santa Elena	Estación Cenaím "Palmar"	B-26	X
17	IH15010-3	Santa Elena	Estación Cenaím "Palmar"	B-26	✓
18	IH15010-4	Santa Elena	Estación Cenaím "Palmar"	B-26	X
19	IH15010-8	Santa Elena	Estación Cenaím "Palmar"	B-26	X
20	IH15010-10	Santa Elena	Estación Cenaím "Palmar"	B-26	X
21	IH15011-7	Santa Elena	Estación Cenaím "Palmar"	B-27	X
22	IH15012-1	Santa Elena	Estación Cenaím "Palmar"	B-28	X
23	IH15012-2	Santa Elena	Estación Cenaím "Palmar"	B-28	X
24	IH15012-3	Santa Elena	Estación Cenaím "Palmar"	B-28	✓
25	IH15012-4	Santa Elena	Estación Cenaím "Palmar"	B-28	X
26	IH15012-10	Santa Elena	Estación Cenaím "Palmar"	B-28	✓
27	IH15013-1	Santa Elena	Estación Cenaím "Palmar"	B-29	✓
28	IH15013-3	Santa Elena	Estación Cenaím "Palmar"	B-29	X
29	IH15013-4	Santa Elena	Estación Cenaím "Palmar"	B-29	X
30	IH15013-5	Santa Elena	Estación Cenaím "Palmar"	B-29	X

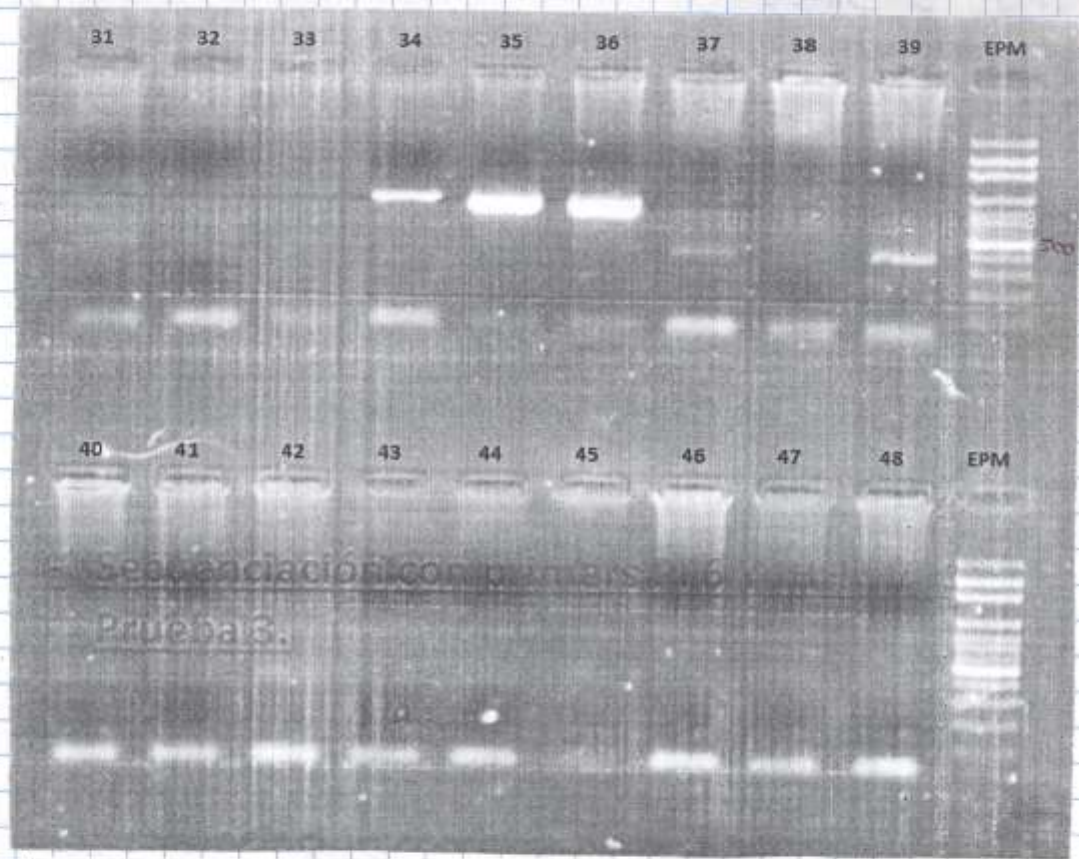


Figura 30. Prueba de los primers HR para secuenciación. En el gel se observan:

31 IH15013-7, 32 IH15013-8, 33 IH15013-9, 34 IH15014, 35 IH15014-1E, 36 IH15014-2E, 37 IH15015, 38 IH15015-5E, 39 IH15015-6E, 40 IH15016-1, 41 IH15016-2, 42 IH15016-3E, 43 IH15017-1, 44 IH15017-2, 45 IH15017-7E, 46 IH15017-8E, 47 IH15018-1, 48 IH15018-2.

Tabla 30.

N°	Código	Provincia	Camaronera	# de piscina	Resultado
31	IH15013-7	Santa Elena	Estación Cernaím "Palmar"	B-29	✓
32	IH15013-8	Santa Elena	Estación Cernaím "Palmar"	B-29	✓
33	IH15013-9	Santa Elena	Estación Cernaím "Palmar"	B-29	X
34	IH15014	Machala	Vivabra S.A.	5	✓ (Cortada)
35	IH15014-1E	Machala	Vivabra S.A.	5	✓ (Cortada)
36	IH15014-2E	Machala	Vivabra S.A.	5	✓ (Cortada)
37	IH15015	Machala	Marest. C.A	5B	✓ (Cortada)
38	IH15015-5E	Machala	Marest. C.A	5B	X
39	IH15015-6E	Machala	Marest. C.A	5B	✓ (Cortada)
40	IH15016-1	Machala	Marest. C.A	24	X
41	IH15016-2	Machala	Marest. C.A	24	✓
42	IH15016-3E	Machala	Marest. C.A	24	✓ (Cortada)
43	IH15017-1	Machala	Garycam	G-10	X
44	IH15017-2	Machala	Garycam	G-10	X
45	IH15017-7E	Machala	Garycam	G-10	X

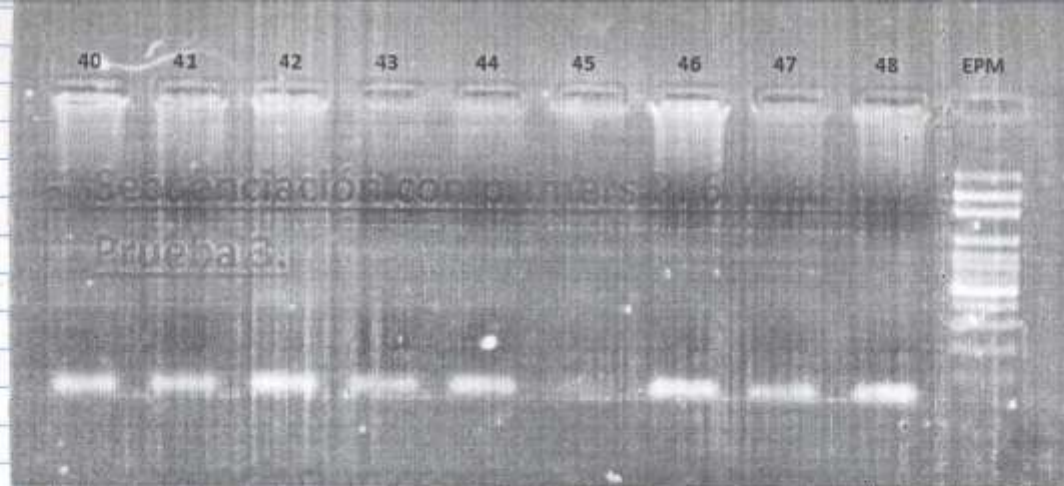


Figura 30. Prueba de los primers HR para secuenciación. En el gel se observan:

31 IH15013-7, 32 IH15013-8, 33 IH15013-9, 34 IH15014, 35 IH15014-1E, 36 IH15014-2E, 37 IH15015, 38 IH15015-5E, 39 IH15015-6E, 40 IH15016-1, 41 IH15016-2, 42 IH15016-3E, 43 IH15017-1, 44 IH15017-2, 45 IH15017-7E, 46 IH15017-8E, 47 IH15018-1, 48 IH15018-2.

Tabla 30.

N°	Código	Provincia	Camaronera	# de piscina	Resultado
31	IH15013-7	Santa Elena	Estación Cenaim "Palmar"	B-29	✓
32	IH15013-8	Santa Elena	Estación Cenaim "Palmar"	B-29	✓
33	IH15013-9	Santa Elena	Estación Cenaim "Palmar"	B-29	X
34	IH15014	Machala	Vivabra S.A.	5	✓ (Cortada)
35	IH15014-1E	Machala	Vivabra S.A.	5	✓ (Cortada)
36	IH15014-2E	Machala	Vivabra S.A.	5	✓ (Cortada)
37	IH15015	Machala	Marest. C.A	5B	✓ (Cortada)
38	IH15015-5E	Machala	Marest. C.A	5B	X
39	IH15015-6E	Machala	Marest. C.A	5B	✓ (Cortada)
40	IH15016-1	Machala	Marest. C.A	24	X
41	IH15016-2	Machala	Marest. C.A	24	✓
42	IH15016-3E	Machala	Marest. C.A	24	✓ (Cortada)
43	IH15017-1	Machala	Garycam	G-10	X
44	IH15017-2	Machala	Garycam	G-10	X
45	IH15017-7E	Machala	Garycam	G-10	X
46	IH15017-8E	Machala	Garycam	G-10	X
47	IH15018-1	Machala	Garycam	G-13	X
48	IH15018-2	Machala	Garycam	G-13	X

D Secuenciación con primers PPG y IHH NVR 1- (continuación)

Prueba 3 IHHNV.

24/02/2016

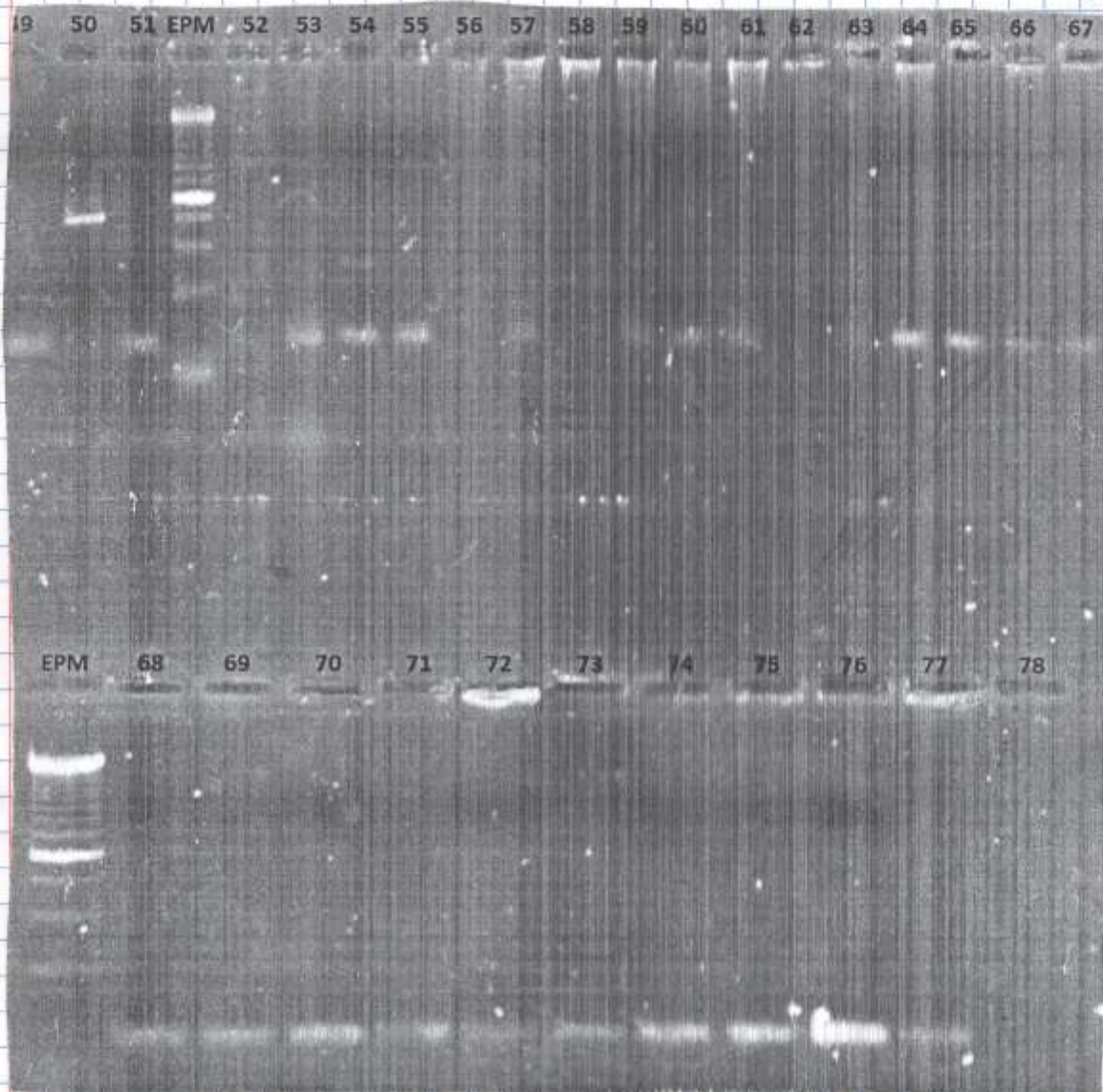


Figura 31. Prueba de los primers HR para secuenciación. En el gel se observan:

49 IH15018-3, 50 D₁d₁, 51 Control Negativo, 52 IH15018-9E, 53 IH15018-10E, 54 IH15019-1, 55 IH15019-2, 56 IH15019-3, 57 IH15031, 58 IH15032, 59 IH15035, 60 IH15036, 61 IH15037, 62 IH15038, 63 IH15061, 64 IH15063-1, 65 IH15063-3, 66 IH15065-3, 67 IH15065-4, 68 IH15066-1, 69 IH15066-3, 70 IH15066-4, 71 IH15067-1, 72 IH15067-2, 73 IH15067-3, 74 IH15067-4, 75 IH15067-5, 76 IH15068-1, 77 IH15068-2, 78 IH15068-3.

Tabla 31.

N°	Código	Provincia	Camaronera	# de piscina	Resultado
49	IH15018-3	Machala	Garycam	G-13	X
50	D ₁ d ₁	Positivo	Lightner	---	✓
51	Control Negativo	---	---	---	ok
52	IH15018-9E	Machala	Garycam	G-13	x
53	IH15018-10E	Machala	Garycam.	G-13	X
54	IH15019-1	Guayas	Comuna de Puerto Roma	1	✓ (Cortada)
55	IH15019-2	Guayas	Comuna de Puerto Roma	1	X
56	IH15019-3	Guayas	Comuna de Puerto Roma	1	X
57	IH15031	Esmeraldas	N.A.C	9	X
58	IH15032	Esmeraldas	N.A.C	10	X
59	IH15035	Manabí	Cuellar	3	X
60	IH15036	Manabí	Cuellar	1	X
61	IH15037	Manabí	Vergel	2	X
62	IH15038	Manabí	Vergel	3	X
63	IH15061	Santa Elena	Langostino S.A	TQ-21	X
64	IH15063-1	Machala	Delai Coco	3	X
65	IH15063-3	Machala	Delai Coco	3	X
66	IH15065-3	Machala	Delai Coco	3	X
67	IH15065-4	Guayas	Delai Balao	17	X
68	IH15066-1	Guayas	Delai Balao	4	X
69	IH15066-3	Guayas	Delai Balao	4	X
70	IH15066-4	Guayas	Delai Balao	4	X
71	IH15067-1	Guayas	Pesquera del Sol	2	X
72	IH15067-2	Guayas	Pesquera del Sol	2	
73	IH15067-3	Guayas	Pesquera del Sol	2	X
74	IH15067-4	Guayas	Pesquera del Sol	2	X
75	IH15067-5	Guayas	Pesquera del Sol	2	X
76	IH15068-1	Guayas	Pesquera del Sol	5	X
77	IH15068-2	Guayas	Pesquera del Sol	5	✓
78	IH15068-3	Guayas	Pesquera del Sol	5	X

D Secuenciación con primers Pp6 y IH1HVR1 (continuación)

Prueba 3 IH1HVR

24/02/201

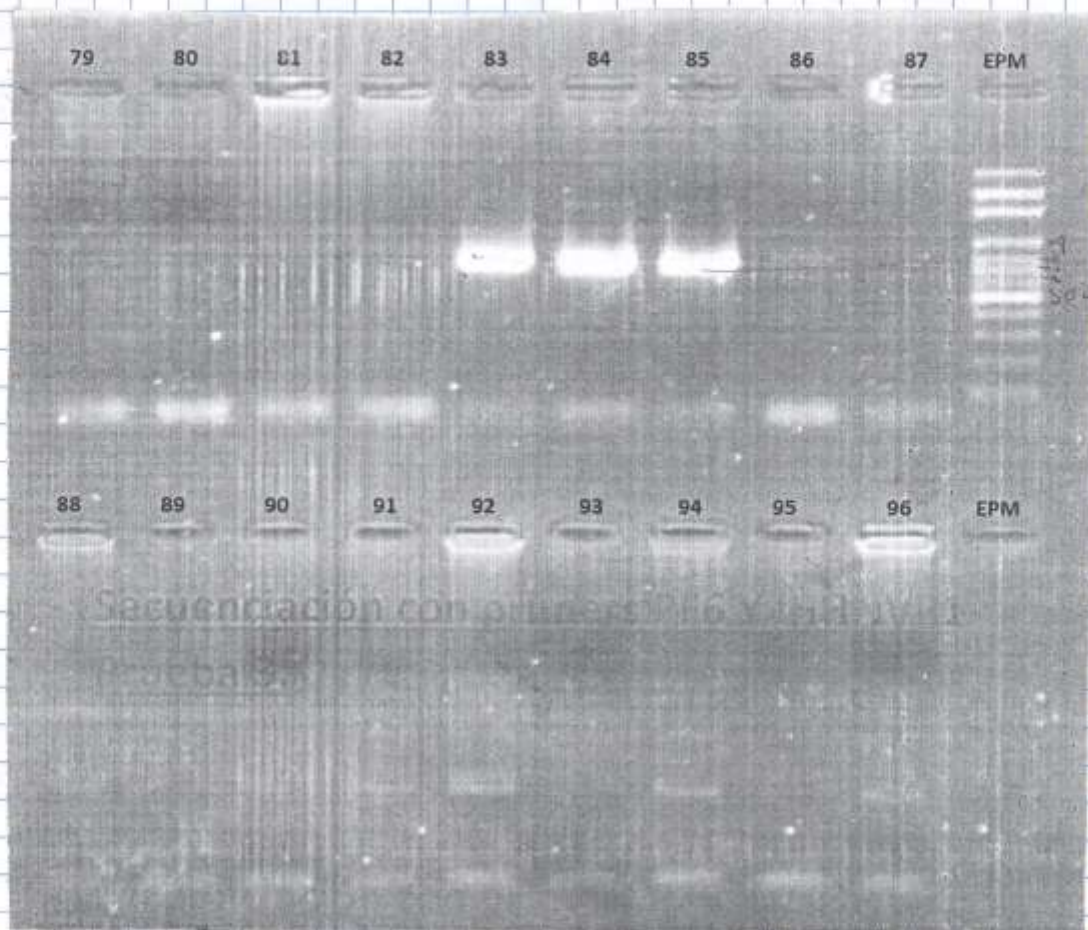


Figura 32. Prueba de los primers HR para secuenciación. En el gel se observan: 79 IH15068-4, 80 IH15068-5, 81 IH15069-1, 82 IH15069-2, 83 IH15069-3, 84 IH15069-4, 85 IH15069-5, 86 IH15070-1, 87 IH15070-2, 88 IH15070-3, 89 IH15070-4, 90 IH15070-5, 91 IH15071-1, 92 IH15071-4, 93 IH15072-1, 94 IH15072-2, 95 IH15072-3, 96 IH15072-4.

Tabla 32.

N°	Código	Provincia	Camaronera	# de piscina	Resultado
79	IH15068-4	Guayas	Pesquera del Sol	5	X
80	IH15068-5	Guayas	Pesquera del Sol	5	X
81	IH15069-1	Guayas	Brumesa S.A	12	X
82	IH15069-2	Guayas	Brumesa S.A	12	X
83	IH15069-3	Guayas	Brumesa S.A	12	√(Cortada)

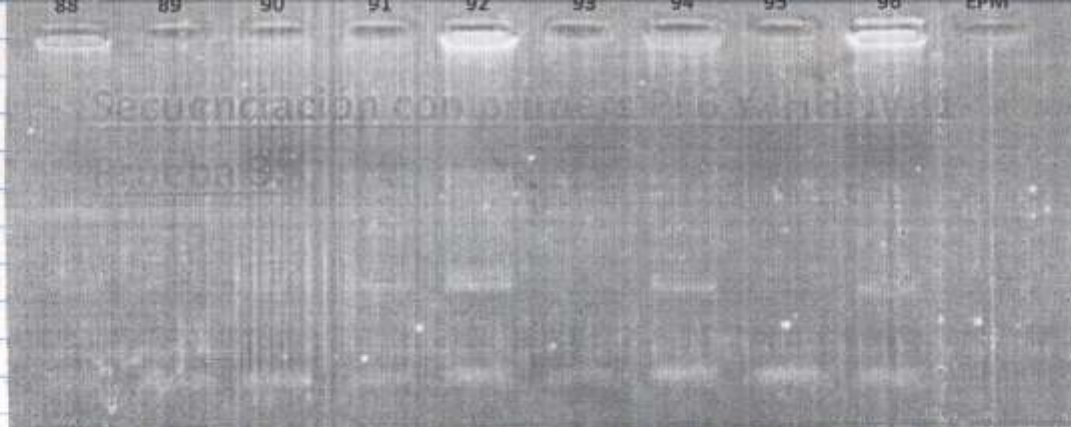


Figura 32. Prueba de los primers HR para secuenciación. En el gel se observan: 79 IH15068-4, 80 IH15068-5, 81 IH15069-1, 82 IH15069-2, 83 IH15069-3, 84 IH15069-4, 85 IH15069-5, 86 IH15070-1, 87 IH15070-2, 88 IH15070-3, 89 IH15070-4, 90 IH15070-5, 91 IH15071-1, 92 IH15071-4, 93 IH15072-1, 94 IH15072-2, 95 IH15072-3, 96 IH15072-4.

Tabla 32.

N°	Código	Provincia	Camaronera	# de piscina	Resultado
79	IH15068-4	Guayas	Pesquera del Sol	5	X
80	IH15068-5	Guayas	Pesquera del Sol	5	X
81	IH15069-1	Guayas	Brumesa S.A	12	X
82	IH15069-2	Guayas	Brumesa S.A	12	X
83	IH15069-3	Guayas	Brumesa S.A	12	√(Cortada)
84	IH15069-4	Guayas	Brumesa S.A	12	√(Cortada)
85	IH15069-5	Guayas	Brumesa S.A	12	√(Cortada)
86	IH15070-1	Guayas	Brumesa S.A	25	√(Cortada)
87	IH15070-2	Guayas	Brumesa S.A	25	X
88	IH15070-3	Guayas	Brumesa S.A	25	X
89	IH15070-4	Guayas	Brumesa S.A	25	X
90	IH15070-5	Guayas	Brumesa S.A	25	√
91	IH15071-1	Guayas	Mar y Cielo	48B	√
92	IH15071-4	Guayas	Mar y Cielo	48B	X
93	IH15072-1	Guayas	Mar y Cielo	49B	√
94	IH15072-2	Guayas	Mar y Cielo	49B	X
95	IH15072-3	Guayas	Mar y Cielo	49B	√
96	IH15072-4	Guayas	Mar y Cielo	49B	X

D. Secuenciación con primers PEG y IHHNVR1 (continuación)

Prueba 3 IHHNVR

24/02/2016

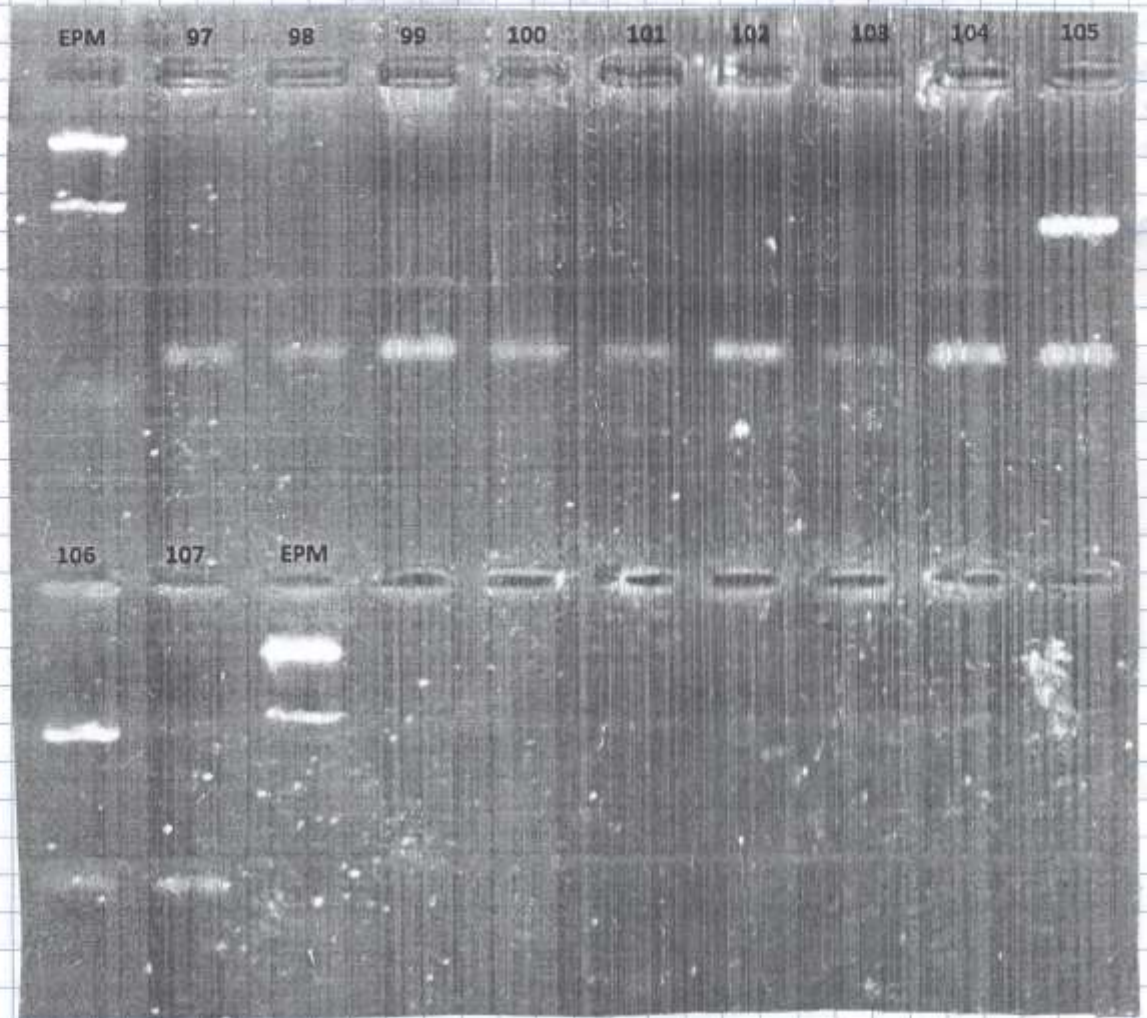


Figura 33. Prueba de los primers HR para secuenciación. En el gel se observan: 97 IH15073-1, 98 IH15073-2, 99 IH15073-3, 100 IH15073-4, 101 IH15074-1, 102 IH15074-2, 103 IH15074-3, 104 IH15074-4, 105 D₁d₁, 106 D₁d₁, 107 Control Negativo.

Tabla 33.

N°	Código	Provincia	Camaronera	# de piscina	Resultado
97	IH15073-1	Guayas	Mar y Cielo	52	X
98	IH15073-2	Guayas	Mar y Cielo	52	X
99	IH15073-3	Guayas	Mar y Cielo	52	√(Cortada)
100	IH15073-4	Guayas	Mar y Cielo	52	√(Cortada)
101	IH15074-1	Guayas	Acumport	121	√(Cortada)
102	IH15074-2	Guayas	Acumport	121	√(Cortada)
103	IH15074-3	Guayas	Acumport	121	√(Cortada)
104	IH15074-4	Guayas	Acumport	121	√(Cortada)
105	D ₁ d ₁	Positivo	Lightner	----	√(Cortada)
106	D ₁ d ₁	Positivo	Lightner	----	√(Cortada)
107	Control	----	----	---	Ok

D Secuenciación con primers ^{Prueba 3} PF6 y IHHNVR1 ; ^{Prueba 1} PF5 y PR6

Prueba 3 IHHNVR

25/02/2

		Mezcla de Reacción							
Para los 19 mestros	H ₂ O	5	X 19	95 µl	H ₂ O	18 µl	X 13	234 µl	Para significar 13 muestras
	Buffer	1		19 µl	Buffer	3		39 µl	
	MgCl ₂	0.4		7.6 µl	MgCl ₂	1.2		15.6 µl	
	dNTPS	0.2		3.8 µl	dNTPS	0.6		7.8 µl	
	PF5	0.5		9.5 µl	PF6	1.5		19.5 µl	
	PR6	0.5		9.5 µl	IHHNVR1	1.5		19.5 µl	
	Taq	0.4		7.6 µl	Taq	1.2		15.6 µl	
	ADN	2 µl			ADN	3		3 µl	

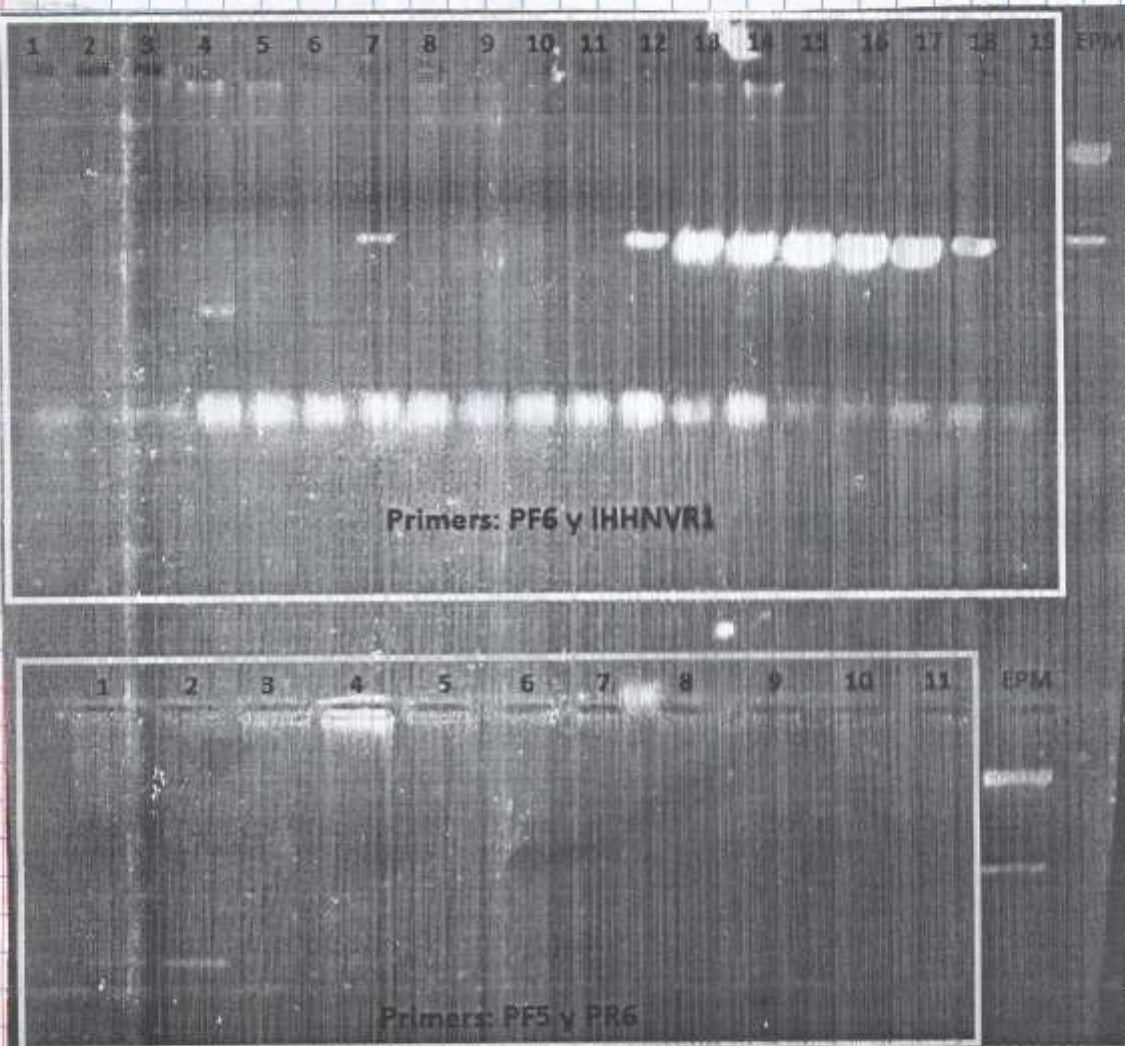


Figura 34. Prueba de los primers HR para secuenciación. En el gel se observan: 1 IH15007, 2 IH15008, 3 IH15015, 4 IH15015-6E, 5 IH15016-3E, 6 IH15019-1, 7 IH15070-1, 8 IH15073-3, 9 IH15074-1, 10 IH15074-2, 11 IH15074-4, 12 IH15014, 13 IH15014-1E, 14 IH15014-2E, 15 IH15069-3, 16 IH15069-4, 17 IH15069-5, 18 D₁d₁, 19 Control Negativo, 1 IH15007, 2 IH15008, 3 IH15015, 4 IH15015-6E, 5 IH15016-3E, 6 IH15019-1, 7 IH15070-1, 8 IH15073-3, 9 IH15074-1, 10 IH15074-2, 11 IH15074-4, 12 D₁d₁.

Tabla 34.

N°	Código	Provincia	Camaronera	# de piscina	Prueba	Resultado
1	IH15007	Guayas	Pez Joya (Naturisa)	40	PF5 y PR6	X
2	IH15008	Guayas	Bonanza Cabac S.A (Naturisa)	32	PF5 y PR6	X
3	IH15015	Machala	Marest C.A	5B	PF5 y PR6	X
4	IH15015-6E	Machala	Marest C.A	5B	PF5 y PR6	X
5	IH15016-3E	Machala	Marest C.A	5B	PF5 y PR6	X
6	IH15019-1	Guayas	Comuna de Puerto Roma	1	PF5 y PR6	X
7	IH15070-1	Guayas	Brumesa S.A	25	PF5 y PR6	√(Cortada)
8	IH15073-3	Guayas	Mar y Cielo	52	PF5 y PR6	X
9	IH15074-1	Guayas	Acumport	121	PF5 y PR6	X
10	IH15074-2	Guayas	Acumport	121	PF5 y PR6	X
11	IH15074-4	Guayas	Acumport	121	PF5 y PR6	X
12	IH15014	Machala	Vivabra S.A	5	PF5 y PR6	√(Cortada)
13	IH15014-1E	Machala	Vivabra S.A	5	PF5 y PR6	√(Cortada)
14	IH15014-2E	Machala	Vivabra S.A	5	PF5 y PR6	√(Cortada)
15	IH15069-3	Guayas	Brumesa S.A	12	PF5 y PR6	√(Cortada)
16	IH15069-4	Guayas	Brumesa S.A	12	PF5 y PR6	√(Cortada)
17	IH15069-5	Guayas	Brumesa S.A	12	PF5 y PR6	√(Cortada)
18	D ₁ d ₁	Positivo	Lightner	---	PF5 y PR6	√(Cortada)
19	Control Negativo	-----	---	----	PF5 y PR6	Ok
1	IH15007	Guayas	Pez Joya (Naturisa)	40	PF6 y IHHNVR1	√
2	IH15008	Guayas	Bonanza Cabac S.A (Naturisa)	32	PF6 y IHHNVR1	√
3	IH15015	Machala	Marest C.A	5B	PF6 y IHHNVR1	X
4	IH15015-6E	Machala	Marest C.A	5B	PF6 y IHHNVR1	√
5	IH15016-3E	Machala	Marest C.A	5B	PF6 y IHHNVR1	X
6	IH15019-1	Guayas	Comuna de Puerto Roma	1	PF6 y IHHNVR1	X
7	IH15070-1	Guayas	Brumesa S.A	25	PF6 y IHHNVR1	X
8	IH15073-3	Guayas	Mar y Cielo	52	PF6 y IHHNVR1	X
9	IH15074-1	Guayas	Acumport	121	PF6 y IHHNVR1	X
10	IH15074-2	Guayas	Acumport	121	PF6 y IHHNVR1	X
11	IH15074-4	Guayas	Acumport	121	PF6 y IHHNVR1	X
12	D ₁ d ₁	Positivo	Lightner	---		X

Lista de Muestras para Secuenciar

Primeros PFG y IHNVR₁ Prueba 3

1	IH15007	Guayas
2	IH15008	Guayas
3	IH15014	Nachala
4	IH15014-1E	Nachala
5	IH15014-2E	Nachala
6	IH15015	Nachala
7	IH15015-6E	Nachala
8	IH15016-3E	Nachala
9	IH15019-1	Guayas
10	IH15036	Marabí
11	IH15069-3	Guayas
12	IH15069-4	Guayas
13	IH15069-5	Guayas
14	IH15070-1	Guayas
15	IH15073-3	Guayas
16	IH15074-1	Guayas
17	IH15074-2	Guayas
18	IH15074-4	Guayas
19	Ddl + (3 bandas)	

Primeros PFS y PRC Prueba 1

1	IH15014	Nachala
2	IH15014-1E	Nachala
3	IH15014-2E	Nachala
4	IH15069-3	Guayas
5	IH15069-4	Guayas
6	IH15069-5	Guayas
7	IH15070-1	Guayas
8	Ddl	

3-4 bandas

Protocolo de Extracción

Kit de extracción de gel Q1 Agilent.

Notas antes de iniciar

- Este protocolo es para purificar hasta 10 μ g de ADN (70pb a 10kb)
- El color amarillo del Buffer Q6 indica un $\text{pH} \leq 7.5$. La adsorción de ADN a la membrana solo es eficaz a $\text{pH} \leq 7.5$
- Añadir etanol (96-100%) para el Buffer PE antes de su uso (Revisar etiqueta del frasco para ajustar volumen)
- Se requiere: Isopropanol (100%) y un Bata Marica a Temperatura de 50°C
- Todas las etapas de centrifugación se realizan 3min a 13000 rpm.

Pasos:

1. Corte el fragmento de ADN del gel de agarosa, con un bisturí afilado y limpio.
2. Pese un tubo eppendorf vacío, anotando el peso
3. Coloque el corte de gel en el tubo eppendorf, péselo nuevamente y anote.
4. Añada 3 volúmenes de Buffer Q6 a 1 volumen de gel (100mg de gel $\sim$ 100 μ l). La máxima cantidad de gel por columna de centrifugación es de 400mg. Por $>2\%$ geles de agarosa, añada 6 volúmenes de Buffer Q6.

Cálculos

Tubo eppendorf vacío	$\Rightarrow$ 1.0074 g
Tubo eppendorf con gel	$\Rightarrow$ 1.1701 g

Cálculos:

- $1.0074 \text{ g} - 1.1701 \text{ g} = 0.1627 \text{ g} \Rightarrow 162.7 \text{ mg} \Rightarrow$ Volumen de gel
 - $162.7 \text{ mg} \times 3 \Rightarrow 488.1 \mu\text{l} \Rightarrow$ 3 volúmenes de Buffer Q6
5. Incube a 50°C durante 10 minutos (o hasta que el corte de gel se haya disuelto completamente)
 6. Realice vortex al tubo cada 2-3 minutos para ayudar a disolver el gel.
 7. Después de que el corte se haya disuelto por completo comprueba que la mezcla sea amarilla (similar a un Buffer Q6 sin agarosa disuelta)
 8. Si el color de la mezcla es naranja o videta, añade 10 μ l de Acetato de Sodio 3M, $\text{pH} 5.0$ y mézclalo. La mezcla se vuelve de color amarillo
 8. Añada 1 volumen de Isopropanol a la muestra y mézclalo

9. Coloque una columna de centrifugación QIAquick en un tubo de recogida de 2 ml proporcionado o en un colector vacío. Para cargar el ADN aplique la muestra a la columna QIAquick y centrifugue durante 3 minutos o aplique vacío al colector hasta que hayan pasado todas las muestras a través de la columna.

10. Descarte el filtrado y coloque la columna QIAquick de nuevo en el mismo tubo. Para volúmenes de $> 200 \mu\text{l}$, cargue y centrifugue nuevamente.

11. Si el ADN posteriormente se utilizará para la secuenciación la Transcripción in vitro o microinyección, añada 500 μl de Buffer QG a la columna QIAquick y centrifugue durante 3 minutos.

Descarte el filtrado y coloque la columna QIAquick de nuevo en el mismo tubo.

12. Lave, añada 750 μl de Buffer PE a la columna QIAquick y centrifugue durante 3 minutos. Descarte el filtrado y coloque la columna QIAquick de nuevo en el mismo tubo.

Nota: Si el ADN se utiliza para aplicaciones sensibles a la sal (por ejemplo, la secuenciación, algunos sondas ligadas) deje la columna de soporte 2-5 min después de la adición de Buffer PE.

Centrifugue la columna de la QIAquick en el tubo de 2 ml de recogida previsto a 3 min para eliminar el Buffer de lavado residual.

13. Coloque la columna QIAquick en un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml limpio.

Lista de Muestras para Secuenciar.

PT6 - IHHNVR1

Prueba 3

1. IH15014 - 1E	1 y 2 Purificación	Hachala
2. IH15014 - 2E	1 y 2 Purificación	Hachala
3. IH15016 - 3E	2 Purificación	Hachala
4. IH15069 - 3	1 y 2 Purificación	Guayas
5. IH15069 - 4	1 y 2 Purificación	Guayas
6. IH15069 - 5	1 y 2 Purificación	Guayas
7. IH15014	Amplificado	Hachala
8. D3d1+	2 y Amplificado	Seco - 100

PT5 y PR6

Prueba 1

9. IH15014	2 Purificación	Hachala
10. IH15014 - 1E	1 y 2 Purificación	Hachala
11. IH15069 - 3	1 y 2 Purificación	Guayas
12. IH15069 - 4	1 Purificación	Guayas
13. IH15069 - 5	1 y 2 Purificación	Guayas
14. IH15070 - 1	2 Purificación	Guayas
15. IH15014 - 2E	Amplificación	Hachala
16. D3d1+	Amplificación	

13/04/2016
▷ Muestras que no se probaron con PF5 y P26

Prueba 1 IHHN

Mezcla de reacción

- H₂O
- Buffer
- MgCl₂
- dNTPs
- PF5
- P26
- Tag
- ADN

13/04/20

▷ Continuación de medidas que no se pudieron con PFS y PRL

Prueba 1 IHHN

Mezcla de reacción

- H₂O
- Buffer
- Hg Cl₂
- DNIPS
- PFS
- PRL
- Tag
- ADN

D Continuation de Muestras que no se probaron con PFS y PRL

Prueba 1 IHHNV

Mezcla de Ración

H₂O
Buffer
H₂Cl₂
d₁TPS
PFS
PRL
Tag
ADW

D Muestras Seleccionados para cortar Bandas y Purificarlas

14/04/2016

Prueba 1 IAHNV

Mezcla de Reacción

H₂O
Buffer
NaCl
dNTPs
PES
Prb
Taq
DDW

* Las Repeticiones no cuentan de buena calidad. Se repite el proceso

D Amplificación de muestras seleccionadas para contar y purificar
Bandas (con Kit de Roche)

19/04/20

Muestreos

◆ Muestreo # 1

Códigos : IH15001

Fecha de muestreo :

IH15002

Provincia : Guayas

IH15003

Lugar de muestreo : Napansal

IH15004

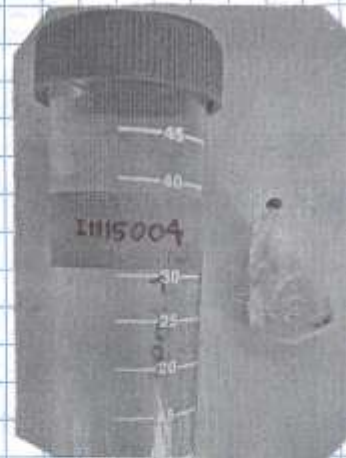
Nombre de Camaronera : "Aqua mar S.A"

IH15005

Número de piscina : 160

Persona que tomo muestra :

Observaciones : Se abarroyó la piscina 160 en varios puntos y se tomaron los camarones que presentaban deformidad y mancha. Se tomo un camarón por muestra y se le asigno un código a cada uno. Se fijaron los camarones en Etanol de 45% y se depositaron cada uno en un recipiente limpio.



◆ Muestreo #2

Código : IH15006

Fecha de muestreo : 28 de Julio 2015

Provincia : Guayas

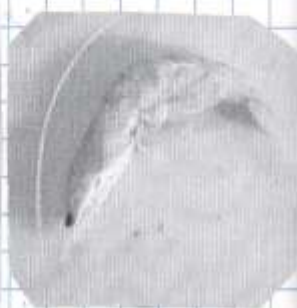
Lugar de muestreo : Isla Josefina

Nombre de Camaronera : "Josefina" (Naturisa)

Número de piscina : 28

Persona que Tomo muestra : Mariuxi Sotomayor / Rosa Malave / Betsy Andrade / Martha

Observaciones : Se atarrayó la piscina en varios puntos. Se Tomo un camachón por la muestra, se depositó en recipiente limpio y se fijo con etanol de 95%. El camachón presentaba síntomas de deformidad y enanismo.



◆ Muestreo #3

Código : IH15007

Fecha de muestreo : 30/07/2015

Provincia : Guayas

Lugar de muestreo : Isla Josefina

Nombre de Camaronera : "Pez Soga" (Naturisa)

Número de piscina : 40

Persona que Tomo muestra : Mariuxi Sotomayor / Rosa Malavé / Betsy Andrade / Martha .H

Observaciones : Se atarrayó la piscina en varios puntos. Se tomaron 5 camachones por la muestra, se depositaron en un recipiente limpio y se fijaron con etanol de 95%. Los camachones presentaban síntomas de enanismo y deformidad.



◆ Muestreo # 4

Código: IH15008

Fecha de muestreo: 05/08/2015

Provincia:

Lugar de muestreo: Isla Purá

Nombre de Camaronera: "Bonanza Cabac S.A."

Número de piscina: 32

Persona que Tomo Muestra: Harivici Stromeyer / Rosa Matave / Betsy Andrade / Martha H

Observaciones: Se atarazó la piscina 2 veces. Se tomaron 10 camarones por la muestra, se depositaron en un recipiente limpio, se fijaron con etanol de 95% y se rotuló el recipiente. Se tomaron camarones con tamaño pequeño a comparación del resto.



◆ Muestreo # 5

Código: IH15009

Fecha de muestreo: 02/10/2015

Provincia: Santa Elena

Lugar de muestreo: Estación Experimental de Cencim "Palmar"

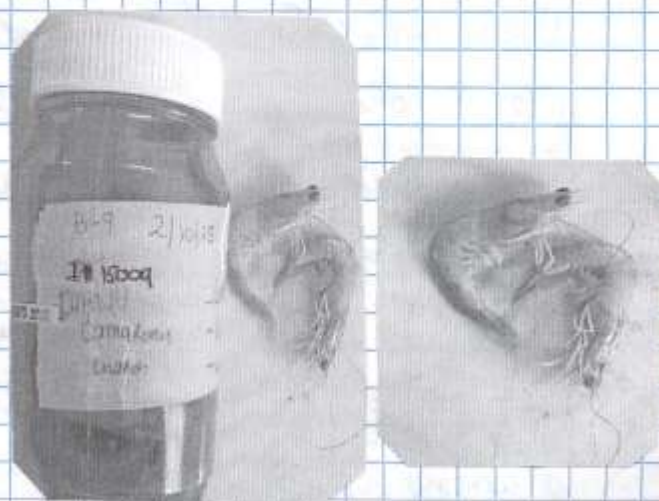
Origen de muestra: Mar Bravo

Nombre de Camaronera: "Lobo Marino"

Número de piscina: B-A

Persona que Tomo muestra: Denisse Níñez

Observaciones: Se atarazó la piscina 2 veces, se tomaron 10 camarones por la muestra, se depositaron en un recipiente limpio, se fijaron con etanol de 95% y se rotuló el recipiente. Se tomaron los camarones que presentaron un tamaño pequeño a comparación de los demás.



◆ Muestreo # 5

Código : IA 15010

Fecha de muestreo : 02/10/2015

Provincia : Santa Elena

Lugar de muestreo : Estación Experimental de CENAIM "Palmar"

Origen de muestra : San Pablo

Nombre de Camaronera : "Texcumar"

Número de piscina : B-26

Persona que tomó muestra : Denisse Nuñez

Observaciones : Se atarraco la piscina 1 vez. Se tomaron 10 camarones por la muestra, se depositaron en un recipiente limpio, se fijaron con etanol de 95% y se rotuló el recipiente. Se tomaron los camarones que presentaban un tamaño pequeño a comparación del resto.



◆ Muestreo # 5

Código : IH 15011

Fecha de muestreo : 02/10/2015

Provincia : Santa Elena

Lugar de muestreo : Estación Experimental CENAIM "Palmar"

Origen de muestra : Punta Carnero (larva silvestre)

Nombre de Camaronera : "SEHACUA"

Número de piscina : B-27

Persona que tomó muestra : Denisse Nuñez

Observaciones : Se atarraco la piscina 1 vez. Se tomaron 10 camarones por la muestra, se depositaron en recipiente limpio. Se fijaron con etanol de 95% y se rotuló el recipiente. Se tomaron los camarones que presentaban un tamaño pequeño a comparación del resto.



◆ Muestreo # 5

Código: IH15012

Fecha de muestreo : 02/10/2015

Provincia : Santa Elena

Lugar de muestreo : Estación Experimental GENAIM "PALMAR"

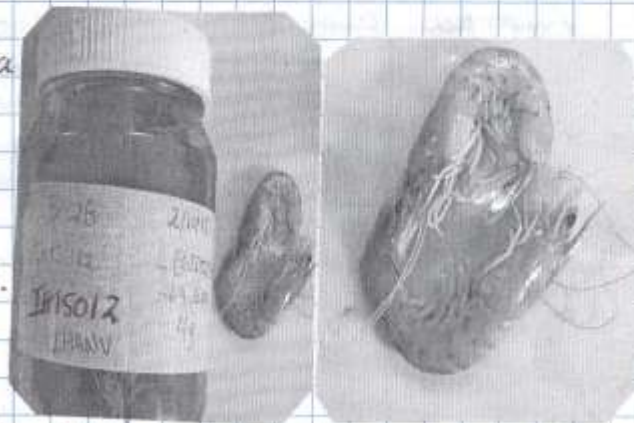
Origen de muestra : HAR BRAVO

Nombre de Camaronera : "EGIDIOSA"

Número de piscina : B-28

Persona que tomó muestra: Denisse Núñez

Observaciones: Se alarmó la piscina 1 vez. Se tomaron 10 camarones por la muestra, se depositaron en recipiente limpio. Se fijaron con etanol de 95% y se rotuló el recipiente. Los camarones presentaban un tamaño pequeño a los demás.



◆ Muestreo # 5

Código: IH15013

Fecha de muestreo : 02/10/2015

Provincia : Santa Elena.

Lugar de muestreo : Estación Experimental GENAIM "Palmar"

Origen de muestra : Renta Camero

Nombre de Camaronera : "SEMARCA"

Número de piscina : B-29

Persona que tomó muestra: Denisse Núñez

Observaciones: Se alarmó la piscina 1 vez. Se tomaron 10 camarones por la muestra, se depositaron en un recipiente limpio. Se fijaron con etanol de 95% y se rotuló el recipiente. Los camarones presentaban un tamaño pequeño a comparación del resto.



Muestreo #6

Código: IH15014

HS03-1 → IH15014 → 1E

HS03-2 → IH15014 → 2E

Fecha de muestreo: 15/10/2015

Provincia: Machala

Lugar de muestreo: Isla Pingallito

Origen de muestra: Agua Isla

Nombre de camaronera: Vivabrea S.A

Número de piscina: 5

Persona que tomó la muestra: Denisse Núñez

Observaciones: Se atornilló la piscina 5 veces. Se tomaron 5 camarones, 3 de estos se fijaron en etanol de 95%. Los otros dos camarones se cortaron de manera longitudinal y cada mitad se preservó en etanol de 95% y las otras mitades se fijaron con Davidson.

Fecha de muestreo : 16/10/2015
Provincia : Hachala
Lugar de muestreo : La Primavera
Origen de muestra : Harst. C.A
Nombre de Camaronera : Harst. C.A
Numero de piqueta : 5B
Persona que tomo la muestra : Dennis Múñez.

Código : IH15015
HSOS-1 → IH15015 → 5E
HSOS-2 → IH15015 → 6E

Observaciones: Se atarrago la piqueta 5 veces. Se tomaron 5 camarones como muestra, de los cuales los 3 conservaron enteros en alcohol de 95%. Los otros dos camarones se cortaron de manera longitudinal para fijar una mitad en Davidson y la otra en etanol de 95%.

Código: IH15016

H504-1 → IH15016 → 38

H504-2 → IH15016 → 48

Fecha de muestreo : 15/10/2015
Provincia : Machalí
Lugar de muestreo : La Primavera
Origen de muestra :
Nombre de camaronera : Harbot C.A.
Número de piscina : 24
Persona que tomó muestra : Donise Núñez

Observations:

Se abarroyó la piscina 5 veces. Se tomaron 5 camarones como muestra de los cuales tres se conservaron enteros en etanol de 95%. Los otros dos se conservaron y se cortaron de manera longitudinal una mitad se preservó en etanol de 95% y la otra mitad en Davidson.

Fecha de muestreo : 15/10/2015
Provincia : Machala
Lugar de muestreo : La Primavera
Origen de muestra :
Nombre de Comarona : Garycom
Número de Piscina : 6-10
Persona que Tomó la muestra : Denisse Núñez

Código : IH 15017
H506-1 → IH 15017 → 7E
H506-2 → IH 15017 → 8E

Observaciones:

Se atornilló la piscina 6 veces. Se tomaron 5 comarones como muestra de los cuales tres se conservaron enteros en etanol de 95%. Los otros dos se cortaron longitudinalmente para preservar una mitad en etanol de 95% y la otra mitad en Davidson, para realizar histología.

Fecha de muestreo : 15/10/2015
Provincia : Machala
Lugar de muestreo : La Primavera
Origen de muestra :
Nombre de Comarona : Garycom
Número de Piscina : 6-10
Persona que Tomó la muestra : Denisse Núñez

Código : IH 15017
H506-1 → IH 15017 → 7E
H506-2 → IH 15017 → 8E

Observaciones:

Se abarajó la piscina 6 veces. Se tomaron 5 comarones como muestra de los cuales tres se conservaron enteros en etanol de 95%. Los otros dos se cortaron longitudinalmente para preservar una mitad en etanol de 95% y la otra mitad en Davidson, para realizar histología.

Fecha de muestreo : 15/10/2015
Provincia : Machala
Lugar de muestreo : La Primavera
Origen de muestra : Garguam
Nombre de camarónera : Garguam
Número de piscina : 6-13
Persona que tomó la muestra : Dennis NÚÑEZ

Código : IH ISO 18
H507-1 → IH ISO 18 → 9E
H507-2 → IH ISO 18 → 10E

Observaciones :

Se atravesó la piscina 5 veces. Se tomaron 5 camarones por muestra de los cuales tres se conservaron enteros en etanol de 95%. Los otros dos se cortaron de manera longitudinal para preservar una parte en etanol de 95% y la otra parte se fijó con Davidson para realizar Histología.

Muestreo #7

Código: IH15019

Fecha de muestreo : 17/10/2015
Provincia : Guayas
Lugar de muestreo : Puerto Poma
Origen de muestra : Santa Elena
Nombre de camarón : Comuna de "Puerto Poma"
Número de piscina : 1
Persona que tomó la muestra : Denisse Nuñez.

Observaciones:

Se atravesó la piscina 10 veces. Se tomaron 5 camarones por la muestra, de los cuales tres se conservaron enteros en etanol de 95%. Los otros dos se cortaron de manera longitudinal para preservar una mitad en etanol de 95% y la otra parte se fijó con Davidson para realizar histología.

◆ Muestras Donadas por el CSA.

Centro de Servicios
para la Acuicultura

Fecha de Recepción de Muestras en CENAIM: 04/11/2015

Código CSA	Código CENAIM	Laboratorio Camerouna	# de Tanque	Fecha de Recepción en CSA.
367	I#15020	San Patricio y Compañía	TQ=5	09/07/2015
418	I#15021	AUSTROMAN S.A	TQ=27	12/08/2015
443	I#15022	San Patricio y Compañía	TQ=18	28/08/2015
449	I#15023	San Patricio y Compañía	TQ=1	28/08/2015
453	I#15024	San Patricio y Compañía	TQ=9	30/09/2015
458	I#15025	IMPRAGIL S.A.	TQ=11	3/09/2015
459	I#15026	IMPRAGIL S.A	TQ=18	3/09/2015
469	I#15027	RODA SOLSA S.A	TQ=2,9,12	06/10/2015
470	I#15028	RODA SOLSA S.A	5,3,10,11	06/10/2015
471	I#15029	RODA SOLSA SA	4,6,7,8	06/10/2015
472	I#15030			

Nota: Estas muestras fueron donadas por el CSA en microtubos que contienen el ADN extraído.

Muestra # 8

Código: IH15031
 H527-1 → IH15031 → 11E
 H527-2 → IH15031 → 12E

Fecha de muestreo : 11/11/2015
 Provincia : Esmeraldas
 Lugar de muestreo : Chameanga SAN JOSÉ
 Origen de muestra : Neblaña.
 Nombre de Camarero : N.A.C
 Número de piscina : 9
 Persona que tomó la muestra : Dennis Abñez

Observaciones : Se atarrajó la piscina 3 veces. Se tomaron 5 camaros en muestra de los cuales tres se conservaron enteros en etanol de 95%. Los otros dos se cortaron de manera longitudinal para preservar una parte en etanol de 95% y la otra parte se fijó con Davidson para posteriormente hacer histología.

Fecha de muestreo

: 11/11/2015

Provincia

: Esmeraldas

Lugar de muestreo

: San José de Otarrunga

Origen de muestra

: Nublada

Nombre de Camaronero

: NAC

Número de peces

: 10

Personas que tomaron la muestra: Denise Núñez

Código: IH15032

H528-1 → IH15032 → 13E

H528-2 → IH15032 → 14E

Observaciones:

Se atarrugó la pecera 5 veces - Se tomaron 5 camarones por muestra de los cuales los se conservaron enteros en alcohol de 95%. Los otros dos se cortaron de manera longitudinal para observar una parte en alcohol de 95% y la otra parte se fijó con Davidson para realizar histología.

Fecha de muestreo : 12/11/2015

Provincia : Honduras

Lugar de muestreo : Tama (La División - Don Juan)

Origen de muestra : Marita Costa pac.

Nombre de camarones : San Rafael

Número de piscina : 1

Persona que tomó la muestra : Denisse Norez

Código : IH 15033

HS24-1 → IH 15033 → 156

HS24-2 → IH 15033 → 166

Observaciones: Se abarrajó la piscina 3 veces. Se tomaron 5 camarones por muestra de los cuales tres se conservaron enteros en glacial de 95%. Los otros dos se cortaron de manera longitudinal para preservar una parte en glacial de 95% y la otra parte se fijó con Davidson para posteriormente realizar histología.

Fecha de muestreo

: 12/11/2015

Provincia

: Monabul

Lugar de muestreo

: Jama (La División - Don Juan)

Origen de muestra

: Monta Costapac.

Nombre de Camaronera

: San Rafael

Número de piscina

: 9

Persona que tomó la muestra: Denisse Núñez

Código: IH 15034

H530-1 → IH 15034 → 17E

H530-2 → IH 15034 → 18E

Observaciones: Se atascó la piscina 3 veces. Se tomaron 5 camarones por muestra de los cuales tres se conservaron enteros en etanol de 95%. Los otros dos se cortaron de manera longitudinal para preservar una parte en etanol de 95% y la otra parte se fijó con Davidson para posteriormente realizar histología.

Fecha de muestreo : 12/11/2015
Provincia : Manabí
Lugar de muestreo : San Vicente (Salinas)
Origen de muestra : J-C larvas
Nombre de camaroneo : Cuellar
Número de piscina : 3
Persona que tomó la muestra : Dennis Núñez

Código: IH15035
H531-1 → IH15035 → 19E
H531-2 → IH15035 → 20E

Observaciones : Se atarragó la piscina 3 veces. Se tomaron 5 camarones por muestra de los cuales tres se conservaron enteros en etanol de 95%. Los otros dos se cortaron de manera longitudinal para preservar una parte en etanol de 95% y la otra parte se fijó con Davidson para posteriormente realizar histología.

Fecha de muestreo : 12/11/2015
Provincia : Monabí
Lugar de muestreo : San Vicente (Salinas)
Tipo de muestra : J-C larvas
Nombre de camarero : Cuellar
Número de piscina : 1
Persona que tomó la muestra : Denise Nájera

Código : IH15036
HS32-1 → IH15036 → 21E
HS32-2 → IH15036 → 22E

Observaciones: Se atascó la piscina 3 veces. Se tomaron 5 camarones por muestra de los cuales tres se conservaron enteros en etanol de 95%. Los otros dos se cortaron de manera longitudinal para preservar una parte en etanol de 95% y la otra parte se fijó con Davidson para posteriormente realizar histología.

Fecha de muestreo : 13/11/2015
Provincia : Manabí
Lugar de muestreo : San Agustín Km 20
Origen de muestra :
Nombre de camarero : Vangel
Número de piscina : 2
Persona que tomó la muestra : Denisse Núñez

Código: IH15037
HS33-1 → IH15037 → 238
HS33-2 → IH15037 → 245

Observaciones: Se obtuvieron las piscinas 3 vasos. De tomaron 5 camareros por muestra de los cuales tres se conservaron enteros en etanol de 95%. Los otros dos se conservaron de manera longitudinal para preservar una parte en etanol de 95% y la otra parte se fijó con Davidson para posteriormente realizar histología.

Fecha de muestreo

= 13/11/2015

Provincia

= Moravia

Lugar de muestreo

= San Agustín Km 20

Origen de muestra

=

Nombre de camaronera

= Vaguel

Número de piscina

= 3

Persona que tomó la muestra

= Denise Nñez

Código: IH15038

H534-1 → IH15038 → 25E

H534-2 → IH15038 → 26E

Observaciones: De ataraje ya piscina 3 días. De tempon scamaronas por muestra de los males fin de conservación mltas en etanol de 95%.
Los otros de portamon de manera longitudinal para preservar una parte en etanol de 95% y la otra parte se fija con Davidson para posteriormente realizar histología.



Muestreo #9

Fecha de muestreo : 16/12/2015
Provincia : Santa Elena
Lugar de muestreo : San Pablo
Origen de muestras :
Nombre de Comisionado : Pomaquisco
Número de piscinas :
Persona que tomó la muestra : Denisse Nuñez

Observaciones:

- Animales Reproductivos.
- Se tomó cordón Nervioso del último segmento del animal.

Piscinas	Códigos	Animales/muestra.
CH-7	IH 15039	2
CH-8	IH 15040	2
CH-9	IH 15041	2
CH-10	IH 15042	2
CH-11	IH 15043	2
CH-12	IH 15044	2
M-14	IH 15045	4
M-15	IH 15046	4
M-16	IH 15047	2



Muestreo # 10

Fecha de muestreo : 18/12/2015
 Provincia : Machala - (Hegaron a San Pedro Cénaim)
 Lugar de muestreo : Isla Sambeli
 Diseño de muestra :
 Nombre de camaronera : Bravito
 Número de piscina :
 Persona que tomó la muestra:

Observaciones:

- Larvas de camarón
- Se realizó pool de cerebro de cuatro larvitas, por muestra se tomaron dos muestras de cuatro larvitas.

Piscinas

A1
 A1
 A2
 A2
 A2
 A2
 A
 A
 A

Códigos

IH15048-1
 IH15048-2
 IH15049-1
 IH15049-2
 IH15050-1
 IH15050-2
 IH15051-1
 IH15051-2



Muestreo # 11

Código: IH15052

Fecha de muestreo : 30/12/2015
 Provincia : Santa Elena
 Lugar de muestreo : Har. Bravo
 Origen de muestra :
 Nombre de laboratorio : Egidirosa
 Número de Tanque : RW 22
 Persona que tomó la muestra : Ruben Ramon

Observaciones:

- La muestra es de larvas de 22 días.
- Para tomarlos, se tamizó el Tanque y se tomaron las larvas jóvenes.



Muestreo # 12.

Códigos:

IH15053 → Ru
 IH15054 → Ru

Fecha de muestreo : 05/01/2016
 Provincia : Santa Elena
 Lugar de muestreo : San Pablo
 Origen de muestra : San Pablo
 Nombre de laboratorio : Nutriagro
 Número de Tanque : RW2 y RW3
 Persona que tomó la muestra : Rosa Malavé, Martha M, Denisse Nuñez

Observaciones: - Muestras de larvas



Muestra # 13.

Código: IH15055.

Fecha de muestreo : 06/01/2016
 Provincia : Santa Elena.
 Lugar de muestreo : Ayónque.
 Origen de muestra : Ayónque.
 Nombre de laboratorio : Macrobio.
 Número de Tanque : Ru-13.
 Persona que tomó la muestra : Rubén Román y Denisse Nuñez.

Observaciones:

- Muestras de larvas.
- Se tamizaron los larvas y se tomaron los larvas enanos.



Muestra # 14

Código: IH15056 - #17
 IH15056 Ru.1

Fecha de muestreo : 7/01/2016
 Provincia : Santa Elena.
 Lugar de muestreo :
 Origen de muestra :
 Nombre de laboratorio : Aqua Tropical
 Número de Tanque : 17 y Ru.1
 Persona que tomó la muestra : Martha Benabona, Denisse Nuñez, Romero

Observaciones: - Muestras de larvas -

Muestreo # 15

Fecha de muestreo : 8/01/2012
 Provincia :
 Lugar de muestreo :
 Origen de muestra :
 Nombre de laboratorio : Longstino S.A.
 Número de Tanque : 17, 18, 19, 20, 23, 21
 Persona que Tomo la muestra : Denisse Nunez, Martha Becker, Ramiro

Observaciones:

- Muestra de larvas.

Tanques

Códigos

17

IH 15056-17

18

IH 15057

19

IH 15058

20

IH 15059

23

IH 15060

21

IH 15061

Muestreo # 16

Código: IH15062-1
IH15062-2
IH15062-3
IH15062-4
IH15062-5

Fecha de muestreo : 10/01/2016
Provincia : Machala
Lugar de muestreo : El coco
Origen de muestra :
Nombre de laboratorio : Delai Coco
Número de Torque : 2
Persona que tomó la muestra : Segundo Paladines (Alimentosa S.A)

Observaciones: Se atornilló la piscina 2 veces. Se tomaron 5 camarones por muestra y se preservaron en etanol de 95%.

Muestreo # 16

Código: IH15063-1
IH15063-2
IH15063-3
IH15063-4

Fecha de muestreo : 10/01/2016
Provincia : Machala
Lugar de muestreo : El coco
Origen de muestra :
Nombre de laboratorio : Delai Coco
Número de Piscina : 3
Persona que tomó la muestra : Segundo Paladines.

Observaciones: Se atornilló la piscina 2 veces. Se tomaron 5 camarones por muestra y se preservaron en etanol de 95%.

Fecha de muestreo : 10/01/2016
Provincia : Machala
Lugar de muestreo : El Coco
Origen de muestra :
Nombre de Camaronera : Delai Coco
Número de piscina : 1
Persona que tomó la muestra : Segundo Paladines. (Alimentista)

Códigos: IH15064-1

IH15064-2

IH15064-3

IH15064-4

IH15064-5

Observaciones: Se atarragó la piscina 3 veces. Se tomaron 5 camarones por
por muestra y se preservaron en etanol de 95% hasta su posterior proceso.

◆ Muestreo # 17

Fecha de muestreo : 09/01/2016
Provincia : Guayas
Lugar de muestreo : Bulao
Origen de muestra :
Nombre de Camaronera : Delai Bulao
Número de piscina : 17
Persona que tomó la muestra : Segundo Paladines. (Alimentista)

Códigos: IH15065-1

IH15065-2

IH15065-3

IH15065-4

IH15065-5

Observaciones: Se atarragó la piscina 2 veces. Se tomaron 5 camarones por muestra
y se preservaron en etanol de 95% hasta su posterior proceso.

Fecha de muestra : 09/01/2016
 Provincia : Guayas
 Lugar de muestra : Baldoz
 Origen de muestra :
 Nombre de camarónes : Delai Baldoz
 Número de piscina : 4
 Persona que tomó la muestra : Segundo Paladinos (Alimentista) y D

Códigos: IH15066-1
 IH15066-2
 IH15066-3
 IH15066-4

Observaciones: Se atamizó la piscina 2 veces. Se tomaron 5 camarones por muestra y se preservaron en etanol de 95% hasta su posterior procesamiento.

Muestra # 18

Fecha de muestra : 12/01/2016
 Provincia : Guayas
 Lugar de muestra : Sabana Grande
 Origen de muestra :
 Nombre de camarónes : Pongora del Sol
 Número de piscina : 2
 Persona que tomó la muestra : Segundo Paladinos (Alimentista) y Denisse Nuez

Códigos: IH15067-1
 IH15067-2
 IH15067-3
 IH15067-4
 IH15067-5

Observaciones: Se atamizó la piscina 1 vez. Se tomaron 5 camarones por muestra y se preservaron en etanol de 95% hasta su posterior procesamiento.

Códigos : IH15068-1
IH15068-2
IH15068-3
IH15068-4
IH15068-5

Fecha de muestreo : 12/01/2016
 Provincia : Guayas
 Lugar de muestreo : Sabana grande
 Origen de muestra :
 Nombre de camaronero : Proquera del Sol
 Número de piscina : 5
 Persona que tomó la muestra : Segundo Paladines (Alimentación) y Denisse Nunez

Observaciones: Se atomizó la piscina 1 vez. Se tomaron 5 camarones por muestra y se preservaron en etanol de 95% hasta su posterior proceso.

■ Muestreo # 19.

Códigos : IH15069-1
IH15069-2
IH15069-3
IH15069-4
IH15069-5

Fecha de muestreo : 13/01/2016
 Provincia : Guayas
 Lugar de muestreo : Enayuga
 Origen de muestra : Biogemar
 Nombre de camaronero : Brumosa S.A.
 Número de piscina : 12
 Persona que tomó la muestra : Segundo Paladines (Alimentación) y Denisse Nunez

Observaciones: Se atomizó la piscina 2 veces. Se tomaron 5 camarones por muestra y se preservaron en etanol de 95% hasta su posterior proceso.

Fecha de muestreo : 13/01/2016
Provincia : Guayas
Lugar de muestreo : Enayunga
Origen de muestra : Texcoman
Nombre de camiones : Brumosa S.A.
Número de piscina : 25
Persona que tomó la muestra : Segundo Paladinos (Alimentaria) y Denisse Núñez

Códigos: IHISO70-1
IHISO70-2
IHISO70-3
IHISO70-4
IHISO70-5

Observaciones: Se aturde la piscina 2 veces. Se tomaron 5 camarones por muestra y se preservaron en etanol de 95% hasta su posterior proceso.

Diversidad Genética de IHHNV en los sistemas ecuatorianos de producción de camarón *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*.

Denisse Estefanía Nuñez Santillán

R e s u m e n

El virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa (IHHNV) está asociado con crecimiento retardado y deformidades en camarones *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*. El presente trabajo tuvo como objetivo obtener información de línea base sobre prevalencia y diversidad genética de las cepas de IHHNV circulando en Ecuador, y compararla con las secuencias de aislados virales de otras localidades geográficas. Las relaciones evolutivas de los aislados virales obtenidos en este estudio y 24 secuencias originarias de otros países productores de camarón fueron inferidas con el método discreto de máxima verosimilitud, usando el modelo de sustitución de nucleótidos de 2 parámetros de Kimura, como mejor ajuste de evolución molecular. El árbol filogenético mostró diferentes grupos de secuencias, diferenciando tanto el tipo de cepas (infecciosas versus no infecciosas) y el origen geográfico. Las muestras del Ecuador se ubicaron en un gran grupo de cepas infecciosas, pero presentando una diferenciación entre las cepas originarias del Guayas y las de El Oro, sugiriendo la presencia de genotipos en los aislados virales circulantes en el país. Los resultados encontrados pueden generar información útil para manejo a nivel de camaroneras (desarrollo de técnicas de diagnóstico más sensibles, estudios de correlación entre diversidad genética y virulencia, entre otros).

Abstract

The infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus (IHHNV) is associated with growth retardation and deformities in *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*. This work aims to obtain baseline information regarding the prevalence and genetic diversity of IHHNV strains circulating in Ecuador and to compare them with the sequences of virus isolates from other geographic locations. The evolutionary relationships between the samples collected in this study and 24 sequences originating from other shrimp-producing countries were inferred with the discrete maximum likelihood method, using the Kimura model of nucleotide substitution of 2 parameters, as the best fit for molecular evolution. The phylogenetic tree showed different sequence groups; differentiating both, type strains

(infectious vs. noninfectious) and geographical origin. Ecuador samples were located in a large group of infectious strains, but presenting a differentiation between strains of Guayas and El Oro, which suggests the presence of genotypes in viral isolates circulating in the country. The results found in this study can generate useful information for management at the shrimp farming level (development of more sensitive diagnostic techniques, correlation studies between genetic diversity and virulence, etc.).

Diversidad Genética de IHNV en los sistemas ecuatorianos de producción de camarón *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*.

Denisse Nuñez^{a,b}, Bonny Bayot^{a,b}, Leda Restrepo^a, Irma Betancourt^a, Leandro Bajaña^{a,b}, Ana A.

^a Escuela Superior Politécnica del Litoral, ESPOL, ^b Facultad de ingeniería Marítima, Ciencias Biológicas, Oceánicas y Recursos Naturales, Campus Gustavo Galindo Km 30.5 Vía Perimetral, P.O. Box 09-01-5863, Guayaquil, Ecuador

ARTICLE INFO

Article history:

Received January

Received in revised form April

Accepted May

Palabras Clave:

IHNV

Penaeus (Litopenaeus)

vannamei

PCR

Diversidad Genética

RESUMEN

El virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa (IHNV) está asociado con crecimiento retardado y deformidades en *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*. El presente trabajo tiene como objetivo obtener información de línea base sobre la prevalencia y diversidad genética de las cepas de IHNV que están circulando en Ecuador y compararla con las secuencias de aislados del virus de otras localidades geográficas. Se realizaron muestreos dirigidos a piscinas de producción de camarón con disparidad de tallas y camarones con signos de deformidades o enanismo. El ADN fue extraído del cordón nervioso y cerebro. La detección de IHNV se realizó con un PCR anidado que amplificó una región conservada en el ORF1 y ORF2 del virus, y que son usados para detectar los genotipos conocidos de IHNV. La prevalencia del virus en las provincias de Esmeraldas, Manabí, Guayas, Santa Elena y El Oro fue del 100, 67, 100, 100 y 86 %, respectivamente. Mientras que, a nivel de país fue del 92%. Solamente las muestras positivas a IHNV en el paso de detección fueron escogidas para amplificar una parte de la región variable del ORF3 (proteína de la cápside viral) del genoma de IHNV. Los productos amplificados de las muestras colectadas en este estudio fueron enviados a secuenciar y la información fue utilizada para un análisis de filogenética. Las relaciones evolutivas de las muestras colectadas en este estudio y 24 secuencias originarias de otros países productores de camarón fueron inferidas con el método discreto de máxima verosimilitud, usando el modelo de sustitución de nucleótidos de 2 parámetros de Kimura, como mejor ajuste de evolución molecular. El árbol filogenético mostró 4 diferentes grupos de secuencias: (1) un grupo grande conteniendo cepas infecciosas de América y Asia, donde se ubicaron los aislados de Ecuador, (2) un grupo de cepas infecciosas de Australia y Egipto, (3) un grupo de cepas infecciosas de Asia y (4) un grupo final de cepas no infecciosas de África (Tanzania, Madagascar), India y Australia. Las muestras del Ecuador se ubicaron en el primer gran grupo de cepas infecciosas de IHNV, pero presentando una diferenciación entre las cepas del Guayas y las de El Oro, sugiriendo la presencia de genotipos en los aislados virales circulantes en el país. Los resultados encontrados pueden generar información útil para manejo a nivel de camaroneras (desarrollo de técnicas de diagnóstico más sensibles, estudios de correlación entre diversidad genética y virulencia, entre otros).

© 2016 Hosting by Elsevier B.V. All rights reserved.

E-mail address: denunez@espol.edu.ec



Hosting by Elsevier

Hosting by Elsevier B.V. All rights reserved.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.rgo.2013.10.012>

1. INTRODUCCIÓN

El virus de la necrosis infecciosa hipodérmica y hematopoyética (Infectious Hypodermal and Hematopoietic Necrosis virus - IHNV, por sus siglas en inglés) fue inicialmente reportado en camarones juveniles *Penaeus (Litopenaeus) stylirostris* cultivados en Hawái (Lightner et al., 1983). En esta especie se ha reportado mortalidades de hasta 90% (Robles et al., 2010; Lightner et al., 1983). IHNV se presenta en forma crónica en *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* y *Penaeus monodon*, sin provocar altas mortalidades (entre 30 y 50%), pero ocasionando la enfermedad conocida como síndrome de deformidad y enanismo (Runt Deformity Syndrome - RDS, por sus siglas en inglés) (Cuellar et al., 2014). Las principales anormalidades están caracterizadas por deformidades cuticulares, resultando en ejemplares con antenas rugosas o quebradizas, rostrum desviado y segmentos abdominales deformes (Kalagayan et al 1991, Primavera & Qunitio 2000). En tanto que, el enanismo provoca una gran dispersión de tallas generando una tasa de conversión alimenticia elevada. Las lesiones provocadas por la enfermedad están caracterizadas por necrosis multifocal en tejidos ectodérmicos (branquias, epidermis cuticular, cordón nervioso) y mesodérmicos (tejido hematopoyético, glándula antenal, gónadas, órgano linfoide, tejido conectivo y músculo), presentando cuerpos de inclusión Cowdry de tipo A (Lightner et al., 1992).

IHNV ha sido últimamente renombrado como densovirus de decápodos *Penaeus stylirostris* 1 (Decapod penstyldensovirus 1 – PstDV1, por sus siglas en inglés) (Cotmore et al., 2014). El virus pertenece a la familia *Parvoviridae*, sub-familia *Densovirinae* y al nuevo género *Penstyldensovirus* (Cotmore et al., 2014). En este artículo se continuará utilizando la nomenclatura tradicional IHNV, considerando que es más reconocida en la literatura científica.

El virus IHNV es un parvovirus de forma icosaédrica sin envoltura y con un diámetro aproximado de 20-22 nm, que contiene ADN de cadena sencilla de aproximadamente 4.1 kb, lo que lo convierte en el más pequeño de los virus de los penaeidos (Bonami et al., 1990). El genoma del virus ha sido secuenciado de aislados obtenidos de *P. vannamei*, *P. stylirostris*, *P. monodon* y *P. semisulcatus*, provenientes de China, Vietnam, Taiwán, Egipto, India y Madagascar (Tang et al., 2003; Hao et al., 2008; Hung et al., 2009; Rai et al., 2011). El virus es uno de los principales patógenos de importancia comercial en los países productores de camarón y se encuentra ampliamente distribuido en América, Oceanía, Asia y África. (Lightner et al., 1996; Flegel et al., 1997)

El genoma del virus ha sido completamente secuenciado y contiene tres marcos abiertos de lectura (ORF) bien definidos (Bonami et al., 1990). Tomando como referencia el aislado viral de Hawái (Número de acceso GenBank AF218266), el ORF1 (2001 pb) está localizado a la izquierda del genoma del virus, entre los nucleótidos 650 y 2650, cubre el 56% del genoma viral y codifica para una

proteína no estructural (NS1) de 666 aminoácidos, asociada a la transcripción y replicación viral (Raí et al., 2011). El ORF2 u ORF intermedio (1092 pb), empieza 56 nucleótidos antes del inicio del ORF1, localizándose entre los nucleótidos 594 y 1685, y por tanto superponiéndose con el ORF1, codifica para una segunda proteína no estructural (NS2) compuesta de 363 aminoácidos, presumiblemente asociada a la replicación viral. El ORF3 (990 pb) es el más pequeño de los ORF, está localizado a la derecha del genoma y codifica para la proteína estructural de la cápside del virus, que está compuesta de 329 aminoácidos (Bonami et al., 1990; Raí et al., 2011).

En Ecuador, IHNV no produce mortalidades; sin embargo, tanto las deformidades como el enanismo generan pérdidas económicas, por lo tanto después de la enfermedad de la mancha blanca, IHNV es el segundo patógeno de importancia comercial en el país. Adicionalmente, dado que los reproductores pueden permanecer como portadores asintomáticos, su control es limitado, por lo que se incrementan las probabilidades de transmisión vertical a los descendientes; eventualmente, la prevalencia en las piscinas podría incrementarse por transmisión horizontal (Motte et al., 2003).

Se ha encontrado una baja diversidad genética de IHNV en los aislados americanos, pero una alta diversidad en los aislados asiáticos (Tang & Lightner 2002; Tang et al., 2003). En general, se conoce que hay 4 genotipos de IHNV: América y del este de Asia, sureste de Asia, Madagascar/India/Isla Mauricio/Australia y, África del Este/Mozambique/Tanzania (Rai et al., 2012). Los dos primeros genotipos son infecciosos para *P. vannamei* y *P. monodon*. En tanto que, los dos últimos genotipos (tipos 3A y 3B, respectivamente) son no infecciosos para las especies mencionadas. Además, las secuencias amplificadas de IHNV de los genotipos 3A y 3B se han encontrado insertadas en el genoma de *P. monodon* (Tang & Lightner 2006; Rai et al., 2009). A excepción de un aislado de IHNV de origen ecuatoriano (Número de acceso GenBank AY362548) (Hsia et al., 2003), no existe información de otras secuencias de aislados ecuatorianos con los que se pueda inferir aspectos de diversidad genética del virus en Ecuador. Tampoco existe en la literatura información sobre la distribución y prevalencia de IHNV en el país. Un monitoreo al detalle de distribución, prevalencia y diversidad genética podría detectar cambios moleculares del patógeno en ciertas áreas geográficas y con esa información se podría implementar medidas de control tales como, cerco sanitario y estudios más detallados de correlación entre diversidad genética y virulencia.

El presente trabajo tiene como objetivo obtener información de línea base sobre la prevalencia y diversidad genética de las cepas de IHNV que están circulando en el país y compararla con las secuencias de aislados del virus de otras localidades geográficas. La información de diversidad genética y evolución molecular de este virus contribuirá al diseño posterior de monitoreos y de medidas de control efectivas de la enfermedad.

2. Materiales y métodos

2.1. Colección de muestras

Entre julio 2015 y enero 2016 se colectó muestras de camarones juveniles *P. vannamei* de 35 estanques, localizados en 16 localidades de las 5 provincias productoras de camarón de cultivo de Ecuador (Tabla 1). Las muestras fueron preservadas en etanol al 95% y almacenadas hasta su análisis por biología molecular. Adicionalmente, se colectó y preservó camarones con solución Davidson AFA para análisis posterior de histología. El muestreo fue de tipo dirigido, tanto a nivel de estanques (piscinas con problemas de disparidad de tallas), como de individuos (camarones con signos clásicos de infección por IHNV, caracterizados por deformidades y enanismo).

Tabla 1. Provincias, localidad muestreada y número de estanques muestreados por localidad

Provincia	Localidad muestreada	No. De estanques positivos
Esmeraldas	San José de Chamanga	2
Manabí	Jama	2
	San Vicente	2
	San Agustín	2
Guayas	Naranjal	1
	Isla Josefina	2
	Isla Puna	1
	Puerto Roma	1
	Balao	2
	Sabana Grande	2
	Engunga	2
	Tenguel	4
Santa Elena	Estación Experimental de Cenaim “Palmar”	5
El Oro	Isla Pungalillo	1
	La Primavera	4
	El Coco	2

Tabla 2. Iniciadores usados para la detección de IHNV por PCR secuenciación

Uso	Nombre del iniciador	Secuencia	Referencia	Tamaño del amplicón
Diagnóstico: primer paso de PCR anidado	IHNV392F	5'-GGGCGAACCAGAATCACTTA-3'	Tang et al., 2000	392 pb
	IHNV392R	5'-ATCCGGAGGAATCTGATGTG-3'		
Diagnóstico: segundo paso de PCR anidado	NNJ208F	5'-AGGGAGCTTTCTGAT TCACT-3'	Macías-Rodríguez et al., 2014	208 pb
	NNJ208R	5'- ATCAAGACCCTAAACCCACT -3'		
Secuenciación	PF5	5'-ATCACCAGCGACGACTTCCTAGG-3'	Silva et al., 2014	941 pb
	PR6	5'-GGAAGAAGTCGGCTTGTACTCT-3'		

2.2. Extracción de ADN

El ADN fue extraído de cordón nervioso y cerebro usando 500 µl de buffer de lisis (NaCl 100 mM; Tris-HCl 10 mM pH 8.0; 1mM EDTA). La suspensión se incubó con 75µl de SDS y 20 µl de proteinasa K (Invitrogen) toda la noche a 65 °C. Posteriormente, se realizaron 2 extracciones seguidas de proteínas con fenol (600 µl) y cloroformo isoamil (500 µl), respectivamente, centrifugando en cada caso a 13000 RPM por 10 min y recuperando el sobrenadante. El ADN recuperado se precipitó por 4 horas a -20 °C con 1000 µl de etanol (100%) y 200 µl de acetato de amonio 5 M; luego, el ADN genómico se precipitó con una centrifugación a 13000 RPM por 10 min. El pellet se lavó dos veces con 300 µl de etanol al 70 % y se centrifugó a 13000 RPM por 10 min. Finalmente, el pellet se secó a 45 °C durante 2 horas y se resuspendió en 50 µl de agua Milli-Q. En la mayoría de los casos la extracción de ADN se realizó por individuos; en pocos casos, la extracción de ADN se realizó a partir de un pool de individuos. En total se analizó 147 muestras de ADN.

2.3. Detección de IHNV por PCR

La detección de IHNV se realizó con un PCR anidado, utilizando iniciadores previamente descritos para IHNV, que amplifican una región conservada en el ORF1 y ORF2 del virus, y que son recomendados por la OIE por su capacidad para detectar los 4 genotipos conocidos de IHNV, incluyendo los genotipos no infecciosos 3A y 3B, insertados en el genoma de camarones peneidos (OIE, 2008).

El primer paso de la amplificación del PCR anidado se realizó con los iniciadores IHNV392F/IHNV392R, diseñados en base a la secuencia del aislado de Hawái (Número de acceso GenBank AF218266), y que genera un amplicón de 392 pb (Tang et al., 2000) (Tabla 2). El segundo paso de la amplificación de PCR anidado se realizó con los iniciadores NNJ208F/NNJ208R, que genera un amplicón de 208 pb (Macías-Rodríguez et al., 2014) (Tabla 2). Previamente, se comprobó in silico la capacidad de amplificación de estos iniciadores en el único aislado de IHNV reportado para Ecuador en la base de datos GenBank (Número de acceso AY362548).

La mezcla de reacción (15 µl) contuvo 1.5 µl de buffer PCR (1x), 0.6 µl de MgCl₂ (2 mM), 0.75 µl de dNTPs (0.5 mM), 0.45 µl de cada uno de los iniciadores (0.3 µM), 0.15 µl de Taq DNA polimerasa® (Invitrogen), 9.1 µl de agua Milli-Q y 2 µl de ADN extraído.

La primera amplificación incluyó una desnaturalización inicial a 94 °C por 4 min, seguido por 35 ciclos de 94 °C por 30 s, 55 °C por 30 s y 72 °C por 30 s, y una extensión final a 72 °C por 7 min. La segunda amplificación incluyó una desnaturalización inicial a 94 °C por 4 min, seguido por 35 ciclos de 94 °C por 30 s, 52 °C por 30 s y 68 °C por 1 min, y una extensión final de 72 °C por 7 min. Las amplificaciones se realizaron en un termociclador Applied Biosystems.

Las alícuotas de los productos de PCR fueron verificados con electroforesis, en un gel de agarosa del 1.5 % (98 V por 40 min) marcado con (10 mM) Syber safe® (Invitrogen). La visualización de los productos de amplificación se realizó en un trans-iluminador con luz ultravioleta.

2.4. Determinación de la prevalencia de IHNV

La prevalencia de IHNV por provincia fue calculada como el total de estanques que resultaron positivos por PCR con los iniciadores para la detección de IHNV (IHNV392F/IHNV392R y NNJ208F/ NNJ208R) del total de estanques muestreados por provincia. Con este valor se determinó la prevalencia de IHNV a nivel de país, calculada como el promedio ponderado provincial, donde el peso y valores del promedio ponderado fueron el número de estanques positivos por provincia y la prevalencia a nivel de provincia, respectivamente.

2.5. Análisis de histología

Los tejidos de los camarones positivos a IHNV con los iniciadores para la detección de IHNV fueron procesados de acuerdo a los procedimientos delineados por Bell & Lightner (1988). Las secciones fueron cortadas a 4 µm y teñidas con hematoxilina y eosina (H & E). Los tejidos fueron examinados para cambios histopatológicos. (Figura 2).

2.6. Secuenciación

Solamente las muestras positivas a IHNV en el paso de detección fueron escogidas para amplificar un fragmento de 941 pb usando los iniciadores PF5/PR6 (Silva et al., 2014) (Tabla 2). La región amplificada por los iniciadores PF5/PR6 contiene el 95% de la región variable del ORF3 (proteína de la cápside viral) del genoma de IHNV. Dado que, los iniciadores PF5/PR6 fueron diseñados en base a la secuencia del aislado de Hawái, se comprobó in silico que estos iniciadores amplificaran la región mencionada en el aislado de IHNV de Ecuador (Número de acceso GenBank AY362548).

La mezcla de reacción de PCR (15 µl); contuvo 1.5 µl de buffer PCR (1x), 0.6 µl de MgCl₂ (2 mM), 0.3 µl de dNTPs (0.2 mM), 0.75 µl de cada uno de los iniciadores (0.5 µM), 0.6 µl de Taq DNA polimerasa® (Invitrogen), 6.5 µl de agua Milli-Q y 4 µl de ADN extraído. Las amplificaciones se realizaron en un termociclador (Applied Biosystems) y los parámetros de amplificación fueron: una desnaturalización inicial a 94 °C por 2 min, seguido por 35 ciclos de 94 °C por 30 s, 55 °C por 30 s y 72 °C por 2 min, y una extensión final a 72 °C por 10 min. Las alícuotas de los productos de PCR fueron verificados con electroforesis, en un gel de agarosa del 1.5 % (98V por 30 min) suplementados con (10 mM) Syber safe® (Invitrogen). La visualización de los productos amplificados se realizó en un trans-iluminador con luz ultravioleta.

Los productos de PCR fueron purificados con el QIAquick® PCR Purification Kit, siguiendo los pasos indicados por el distribuidor. Para cada producto amplificado se preparó una reacción con el iniciador forward y otra con el reverse. Los productos amplificados con PCR fueron bi-direccionalmente secuenciados por la compañía Macrogen (Corea) usando un ABI 377 Sequencer.

2.7. Análisis de las secuencias de ADN

Los cromatogramas forward y reverse de cada muestra fueron ensamblados con el programa CodonCode Aligner (versión 6.0.2), considerando los valores de calidad de las bases, y validados mediante inspección visual. Solamente las secuencias de mejor calidad obtenidas en este estudio fueron usadas para el análisis filogenético. Adicionalmente se descargó, de la base de datos de GenBank (Centro Nacional de Información Biotecnológica - NCBI), 24 secuencias de aislados de IHNV originarios de otros países productores de camarón, las mismas que incluyen al aislado de referencia de Hawái (AF218266) y el único aislado de Ecuador (AY362548) depositado en GenBank (Tabla 3). Los criterios de selección de las secuencias externas estuvieron basados en tres criterios: (a) amplia cobertura espacial, tratando de incluir secuencias de todas las regiones productoras de camarón de América, Australia, África y Asia, (b) inclusión de secuencias de los cuatro genotipos conocidos de IHNV, incluyendo secuencias de aislados infecciosos y no infecciosos (genotipos 3A y 3B) y (c) no redundancia de información de diversidad genética, tratando de no incluir muchas secuencias de un mismo linaje o de un mismo genotipo de IHNV (Tabla 3). Solo la región amplificada para secuenciación fue usada para el análisis filogenético, eliminando el resto del genoma de IHNV en las 24 secuencias externas. Las secuencias de los aislados ecuatorianos y externos fueron alineadas con el algoritmo de alineamiento de secuencias múltiples Clustal Omega, usando el software en línea del Instituto Bioinformático Europeo (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) (Sievers et al., 2014).

Las relaciones evolutivas para la reconstrucción del árbol filogenético fueron inferidas con el método discreto

de máxima verosimilitud (Maximum Likelihood - ML) (Tamura et al., 2011) usando el modelo de sustitución de nucleótidos de 2 parámetros de Kimura (K2) (Kimura et al., 1980) como mejor ajuste de evolución molecular para las secuencias analizadas (BIC = 2279.94). El soporte para los grupos de secuencias en un mismo nodo del árbol fue determinado con un análisis de re-muestreo de bootstrap (Felsenstein et al., 1985), utilizando 1000 réplicas de árboles estimados con el método de Neighbor-joining, bajo el modelo de máxima verosimilitud (porcentaje de árboles con nodos repetidos de un grupo de 1000 árboles). Las posiciones de codones consideradas en el análisis fueron +1, +2, +3, así como los sitios no codificantes; además se incluyó un filtro fuerte de

intercambio de rama. Las posiciones conteniendo vacíos y datos perdidos no fueron usadas para el análisis. Los datos finales tuvieron un tamaño de 208 posiciones. Las longitudes de las ramas horizontales del árbol fueron proporcionales a las tasas de sustitución de nucleótidos. El aislado viral de IHNV de Madagascar (Número de acceso GenBank DQ228358) fue usado para enraizar el árbol, dada la mayor disimilaridad presentado con las otras cepas infecciosas de IHNV (Zhang et al., 2007). Ambas pruebas de mejor modelo de sustitución de nucleótidos y de reconstrucción del árbol filogenético fueron inferidas con el software Evolutionary Genetics Analysis MEGA 7.0.14 (Kumar et al., 2015).

Tabla 3. Número de acceso GenBank, especie de camarón hospedera, origen y año de colección de aislados de los virus de la necrosis infecciosa hipodérmica y hematopoyética (IHNV) usados para el análisis in silico en este estudio.

Numero de Acceso GenBank	Especie	Origen	Año de colección
KP733862	<i>Penaeus vannamei</i>	China-Wenzhou	2014
JX258653	<i>Penaeus monodon</i>	China-Ganyu	2009
EF633688	----	China-Fujian	----
KP733858	<i>Penaeus monodon</i>	China-Ningbo	2014
KJ862253	<i>Penaeus vannamei</i>	Brazil	2013
JX840067	<i>Penaeus monodon</i>	Viet Nam	2012
KC513422	<i>Penaeus monodon</i>	Viet Nam	2011
JN616415	<i>Penaeus monodon</i>	Viet Nam	2009
JN377975	<i>Penaeus vannamei</i>	Corea del Sur	2010
GU138660	<i>Penaeus monodon</i>	Filipinas	2009
KT316253	<i>Penaeus semisulcatus</i>	Egipto	2014
KT316260	<i>Marsupenaeus japonicus</i>	Egipto-Bardawi	2014
GQ411199	<i>Penaeus monodon</i>	India	2007
AF273215	<i>Penaeus stylirostris</i>	México-Golf de California	1998
AY355306	<i>Penaeus monodon</i>	Taiwan	2004
AY355307	<i>Penaeus monodon</i>	Taiwan	----
AY102034	<i>Penaeus monodon</i>	Tailandia	2000
AF218266	<i>Penaeus stylirostris</i>	Hawái	1987
GQ475529	<i>Penaeus stylirostris</i>	Australia	2009
EU675312	<i>Penaeus monodon</i>	Australia	1993-1997
KM272866	<i>Penaeus monodon</i>	Australia	2008
AY124937	<i>Penaeus monodon</i>	Tanzania	2000
DQ228358	<i>Penaeus monodon</i>	Madagascar	2000
AY362548	<i>Penaeus vannamei</i>	Ecuador	2003
IH15014	<i>Penaeus vannamei</i>	Ecuador– El Oro	Este estudio
IH15014-1E	<i>Penaeus vannamei</i>	Ecuador– El Oro	Este estudio
IH15014-2E	<i>Penaeus vannamei</i>	Ecuador– El Oro	Este estudio
IH15069-4	<i>Penaeus vannamei</i>	Ecuador– Guayas	Este estudio
IH15069-5	<i>Penaeus vannamei</i>	Ecuador– Guayas	Este estudio
IH15070-1	<i>Penaeus vannamei</i>	Ecuador –Guayas	Este estudio

3. Resultados

De 147 muestras, 102 resultaron positivas a IHNV utilizando el método de detección por PCR anidado (Figura 1), siendo estas muestras utilizadas para el segundo paso de secuenciación.

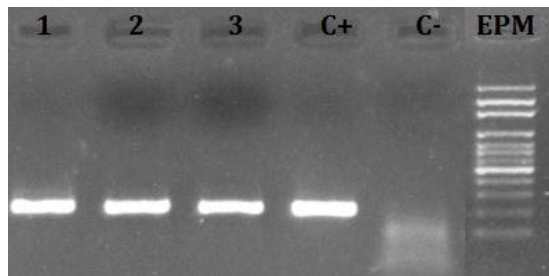


Figura 1. Amplificación por PCR del fragmento de 208 pb obtenido con los iniciadores NNJ208F/NNJ208R para la detección de IHNV. Se observa tres muestras de camarón *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* de este estudio que resultaron positivas a IHNV (Carriles 1, 2 y 3), C+: control positivo (Donado por el Laboratorio de Patología Acuática de la Universidad de Arizona), C-: control negativo y EPM: marcador de peso molecular.

Treinta y tres estanques de los 35 muestreados resultaron positivos a IHNV (Tabla 4). La prevalencia del virus en las provincias de Esmeraldas, Manabí, Guayas, Santa Elena y El Oro fue del 100, 67, 100, 100 y 86 %, respectivamente (Tabla 4). La prevalencia de IHNV a nivel de país fue del 92% (Tabla 4).

Tabla 4. Número de estanques positivos a IHNV por localidad muestreada, usando un PCR anidado (primer paso: IHNV392F/IHNV392R [23] y segundo paso: NNJ208F/ NNJ208R (Macías-Rodríguez et al., 2014).

Provincia	Localidad muestreada	No. De estanques positivos
Esmeraldas	San José de Chamanga	2/2
Manabí	Jama	0/2
	San Vicente	2/2
	San Agustín	2/2
Guayas	Naranjal	1/1
	Isla Josefina	2/2
	Isla Puna	1/1
	Puerto Roma	1/1
	Balao	2/2
	Sabana Grande	2/2
Santa Elena	Engunga	2/2
	Tenguel	4/4
	Estación Experimental de Cenaim “Palmar”	5/5
El Oro	Isla Pungalillo	1/1
	La Primavera	4/4
	El Coco	1/2
Total		33/35

La examinación histológica de los camarones positivos a IHNV por PCR mostró lesiones características de la enfermedad, con necrosis en grado medio en tejidos ectodérmicos y mesodérmicos y cuerpos de inclusión Cowdry de tipo A. Además se encontró otras afecciones como infiltraciones hemocíticas. La mayoría de las muestras analizadas por histología presentaron lesiones compatibles con IHNV en grado leve.

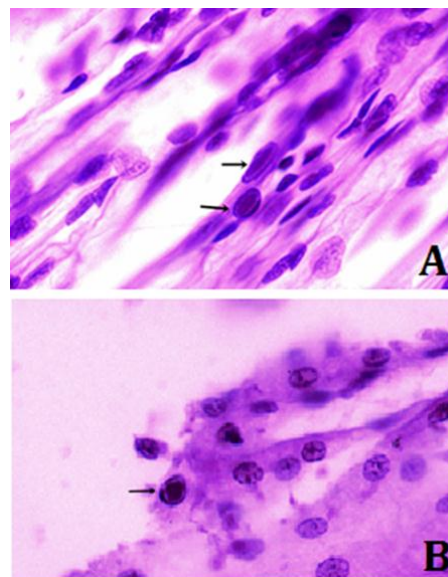


Figura 2. Histopatología de camarones juveniles ecuatorianos [*Penaeus (Litopenaeus) vannamei*] infectados con IHNV. (A) Tinción de cordón nervioso y (B) glándula antenal. Las flechas indican cuerpos de inclusión Cowdry de tipo A. (H & E. 40x).

La amplificación de ADN usando los iniciadores PF5/PR6 presentó dificultades, principalmente amplificaciones de banda leves. En la etapa de secuenciación se obtuvo una gran cantidad de secuencias de baja calidad (secuencias con valores bajos de calidad de bases). Las secuencias de mejor calidad obtenidas en este estudio y usadas para el análisis filogenético fueron las secuencias originarias de la provincia de Machala, sector Isla Pungalillo: IH15014 (tamaño final de 881 pb), IH15014-1E (tamaño final de 775 pb) y IH15014-2E (tamaño final de 892 pb) y las secuencias originarias de la provincia Guayas sector Engunga: IH15069-4 (tamaño final de 369 pb), IH15069-5 (tamaño final de 626 pb) e IH15070-1 (tamaño final de 709 pb). Las figuras 3 y 4 muestran el árbol filogenético obtenido en el estudio, presentando una evidente separación de las cepas infecciosas y no infecciosas. En particular, la cepa no infecciosa de Madagascar (DQ228358), usada para enraizar el árbol, se muestra apartada del resto de las cepas de IHNV. Los aislados no infecciosos de Tanzania (AY124937) y Australia (EU675312) se ubicaron en un solo grupo, permaneciendo cerca del aislado no infeccioso de la India (GQ41199). Estos tres aislados no infecciosos (Tanzania, Australia e India) se presentaron separados de

todas las cepas infecciosas de IHNV. Un primer gran grupo de cepas infecciosas correspondió a muestras de América y Asia (especialmente este de Asia), lo que incluyó muestras infecciosas de Australia (KM272866) y de Egipto (KT316253 y KT316260). En este grupo se encontró inscritas las muestras de este estudio. Mientras que, un segundo gran grupo de muestras infecciosas de IHNV estuvo conformado por muestras del este y del sur de Asia. Las muestras del Ecuador se ubicaron en el primer gran grupo de cepas infecciosas de IHNV, pero presentando una diferenciación entre las cepas del Guayas y las de El Oro, señalando la posibilidad de

diferencias geográficas en los aislados colectados en este estudio, y por tanto sugiriendo la presencia de genotipos en los aislados virales circulantes en el país. Además, las cepas aisladas en este estudio se ubicaron cerca del único aislado de IHNV reportado para Ecuador en la base de datos GenBank (AY362548), indicando que los resultados en este estudio son consistentes. Todas las muestras de América (Brasil, Ecuador, México y las secuencias de este estudio) se ubicaron en el primer gran grupo de muestras infecciosas, que además contuvo al aislado viral de Filipinas (GU138660).

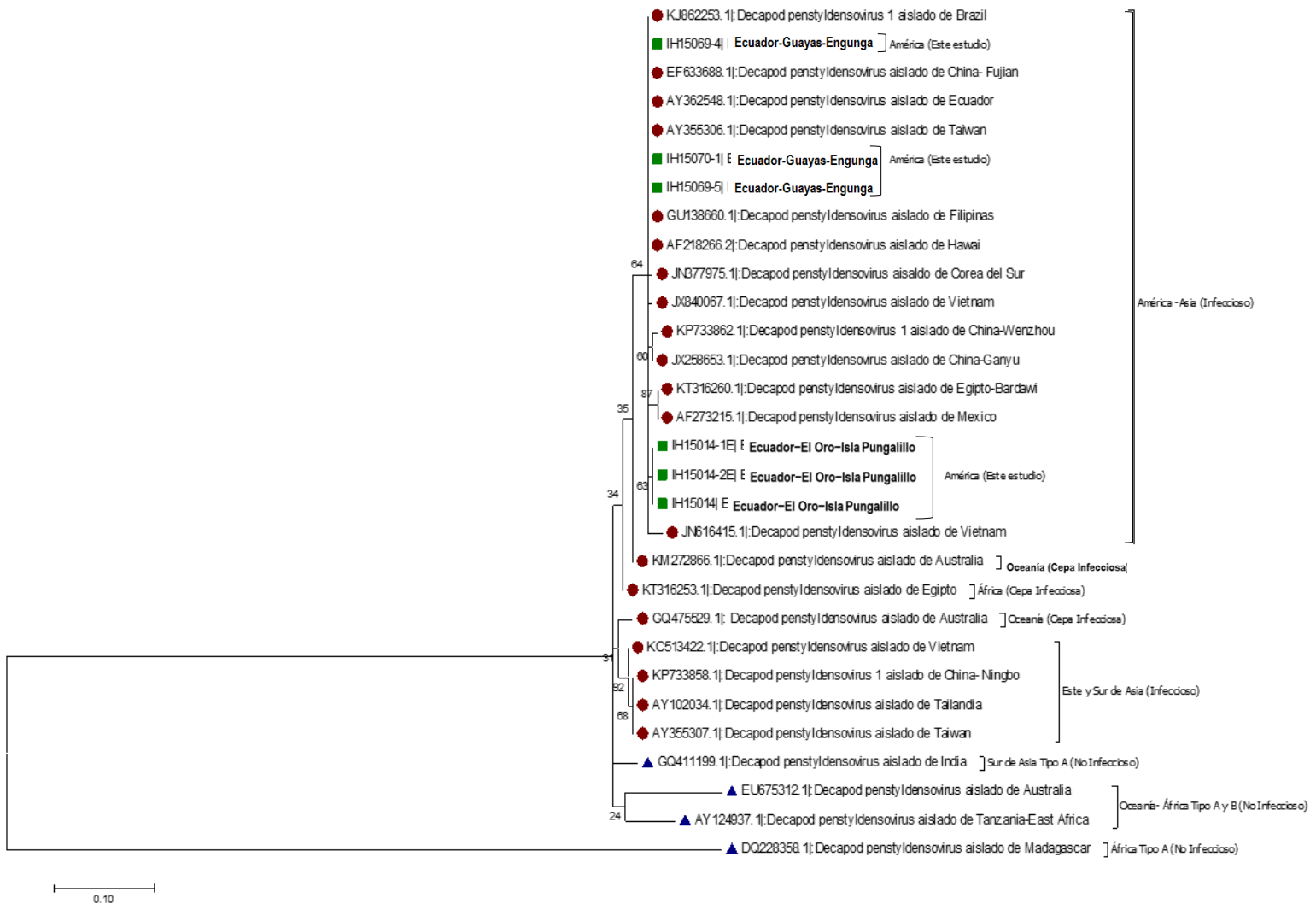


Figure 3. (A) La historia evolutiva se dedujo utilizando el método de Maximum Likelihood basado en el modelo de Kimura 2. Se muestra el árbol con la probabilidad de registro más alto (-882.8905). Se utilizó una discreta distribución gamma para modelar las diferencias de tipo evolutivas entre sitios (5 categorías (+ G, el parámetro = 2,5840)). El árbol está dibujado a escala, con longitudes de rama medidos en el número de sustituciones por sitio. Análisis evolutivo realizado en MEGA7.

- Muestras de carácter Infecciosas (Tipo 1 y 2)
- ▲ Muestras de carácter no infeccioso (Tipo A y B)
- Muestras de este estudio

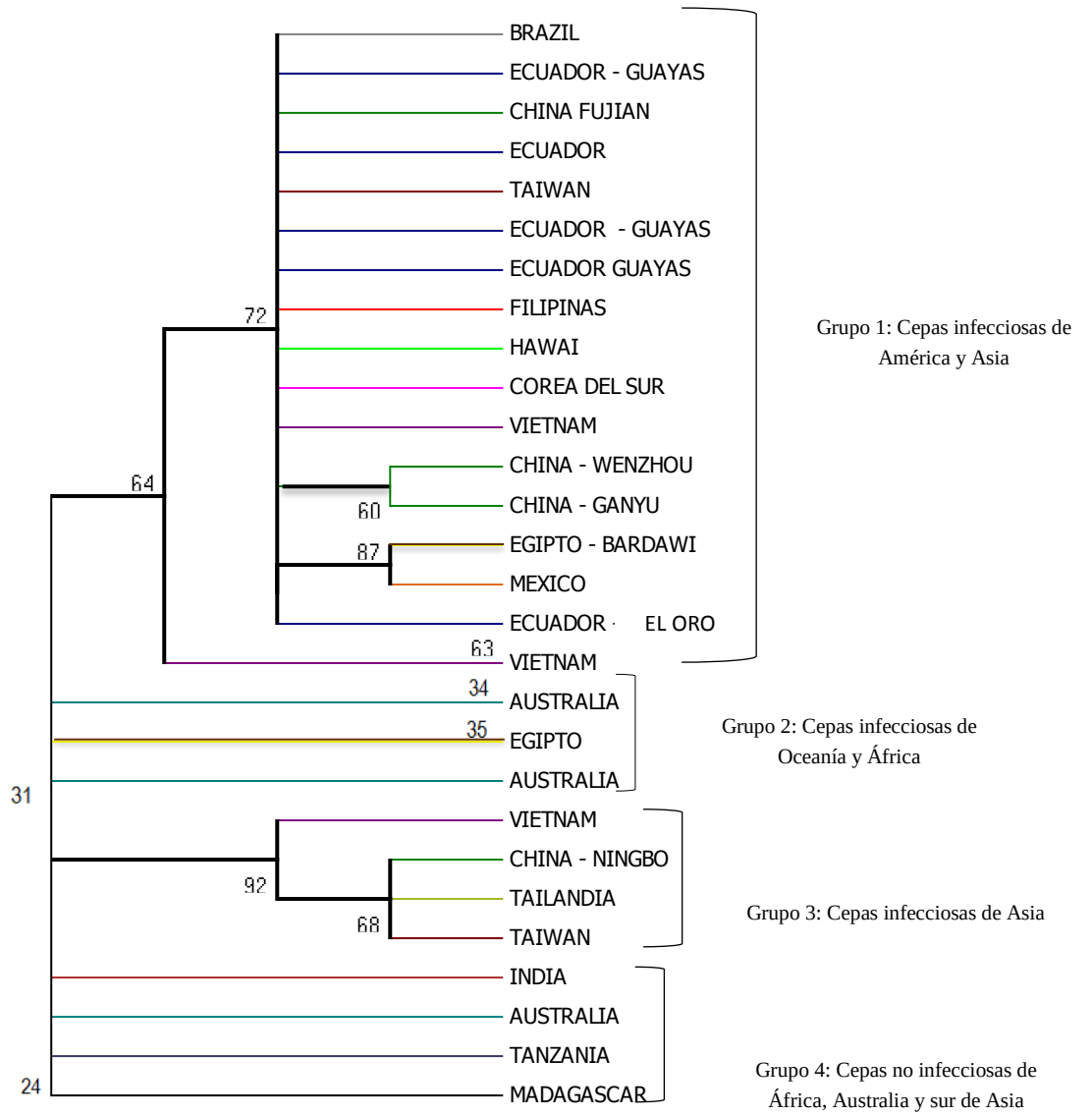


Figure 3. (B) Árbol topológico del árbol mostrado en la figura 3. Se muestran los países por colores.

4. Discusión

La alta prevalencia de IHHNV encontrado a nivel del país (92%), llegando a ser igual al 100% en 3 de 5 provincias muestreadas, indica que el virus es endémico en Ecuador, y que está completamente extendido en el país. La gran dispersión geográfica del virus en el país podría ser explicada en gran parte porque el control de la enfermedad es limitado, ya que los reproductores pueden portar el virus sin presentar los síntomas y transmitir verticalmente a su descendencia (Motte et al., 2003). De hecho, la prevalencia viral en reproductores del Ecuador ha sido determinada es del 53%; mientras que, en camarones adultos del medio silvestre colectados a lo largo de la costa ecuatoriana es del 58% (Motte et al., 2003). A través del análisis histológico, en este estudio confirmamos además que el grado de afectación fue en general leve. Estos resultados explicarían que siendo *P. vannamei* una especie resistente, en la cual IHHNV se presenta en forma crónica, sin desatar altas mortalidades, el control se limitaría porque el productor no observa muertes masivas en las piscinas. De hecho, durante el monitoreo realizado en este estudio, algunas de las muestras colectadas no provino de un muestreo direccionado, al dificultarse encontrar camarones con los signos clásicos de la enfermedad (deformidades y enanismo). En consecuencia, la prevalencia en etapa de engorde se incrementaría por efecto de la transmisión horizontal, hasta llegar a alcanzar niveles de alta prevalencia, tales como las observadas en el presente estudio. Según nuestro conocimiento, este es el primer reporte de prevalencia de IHHNV en Ecuador realizado en larvas y juveniles de *P. vannamei*.

La evidencia genética sugiere que la epidemia en las Américas probablemente fue introducida desde Filipinas por una importación viva de la especie *P. monodon*, promoviendo la aparición de la enfermedad en una amplia gama de huéspedes, facilitando las oportunidades para la patogenicidad y una distribución geográfica muy extendida (Tang et al., 2002; Tang et al., 2003; Krabsetsve et al., 2004; Tang & Lightner 2006). Después de su detección inicial en Hawái, IHHNV se encontró ampliamente distribuido tanto en camarones *P. stylirostris* como en *P. vannamei* en todas las regiones de cultivo de las Américas y en la población de camarón silvestre del Golfo de California, donde algunos informes sugieren que puede haber contribuido al colapso de la pesquería de captura (Pantoja et al., 1999). Estas observaciones se confirman en nuestro análisis de árbol filogenético, donde todas las muestras de América (Brasil, Ecuador, México y las secuencias de este estudio) se ubicaron en el primer gran grupo de muestras, que además contuvo al aislado viral de Filipinas y el de Hawái (AF218266), este último usado como referencia al ser uno de los primeros aislados en ser secuenciados. Este primer gran grupo de muestras se caracteriza en primer lugar por contener aislados de tipo infeccioso, y donde además

se encuentran los aislados de China, Taiwan, Corea del Sur, Vietnam y Egipto, tal como ha sido reportado por otros autores (Kim et al., 2011; Lightner, 2011; Silva et al., 2014). En segundo lugar, este primer grupo de aislados se caracteriza por presentar un patrón geográfico definido, reuniendo muestras provenientes de América y el este de Asia (Rai et al., 2012). Todos los aislados de este estudio se ubicaron en este primer gran grupo de muestras infecciosas, lo que soporta los resultados encontrados en este estudio de alta prevalencia de IHHNV en el país, cuyos altos valores llegan a ocurrir por efecto de alta transmisión vertical y horizontal originado del poco control que los productores pueden desplegar dado el comportamiento asintomático a nivel de maduración y engorde.

Tal como se encontró en otros estudios, la cepa no infecciosa de Madagascar se ubicó apartada del resto de las cepas de IHHNV; además, los aislados no infecciosos de Tanzania y Australia se ubicaron en un solo grupo, permaneciendo cerca del aislado no infeccioso de la India. Estos tres aislados no infecciosos (Tanzania, Australia e India) también se presentaron separados de todas las cepas infecciosas de IHHNV, tal como ha sido reportado en otros estudios (Rai et al., 2009; Tang et al., 2003; Zhang et al., 2007; Saksmerprome et al., 2010; Kim et al 2011; Kim et al 2012; Nita et al., 2012; Silva et al., 2014; Fajardo et al., 2015).

En forma interesante, las muestras del Ecuador se ubicaron en el primer gran grupo de cepas infecciosas de IHHNV, pero presentando una evidente diferenciación entre las cepas del Guayas y las de El Oro. Esto indicaría la presencia de genotipos en los aislados virales circulantes en el país. Es por tanto necesario, que se realicen estudios más detallados de correlación entre diversidad genética y virulencia, los mismos que pueden ser abordados a través de pruebas de desafío viral, usando como papilla viral los tejidos congelados a -80°C, colectados en este estudio y almacenados en las instalaciones del Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas (CENAIM-ESPOL).

Los resultados encontrados en el presente análisis filogenético, son consistentes con los cuatro genotipos documentados de IHHNV: América/Este de Asia (principalmente Filipinas); Sureste de Asia; Madagascar/India/Isla Mauricio/Australia y, África del Este/Mozambique/Tanzania (OIE., 2009; Walker., 2010; Rai et al., 2012). Los dos primeros genotipos siendo infecciosos para *P. vannamei* y *P. monodon*. En tanto que, los dos últimos genotipos (tipos 3A y 3B, respectivamente) siendo no infecciosos para las especies mencionadas (Tang et al., 2003; Krabsetsve et al., 2004; Saksmerprome., 2011). Cabe destacar que, las secuencias amplificadas de IHHNV de los genotipos 3A y 3B se han encontrado insertadas en el genoma de *P. monodon* (Tang & Lightner 2006; Rai et al., 2009). Las cepas aisladas en este estudio se ubicaron cerca del único aislado de IHHNV reportado para Ecuador en la base de datos GenBank (AY362548), confirmando los resultados encontrados en

nuestro trabajo. Adicionalmente, es importante destacar que, se probaron otros métodos de construcción de árboles filogenéticos (datos no mostrados), obteniendo topologías similares al presentado en este artículo, mostrando la robustez de los resultados encontrados en el estudio.

La literatura reporta que existen múltiples variantes geográficas de IHNV, algunas de las cuales no son detectadas por todos los métodos disponibles para IHNV. Dos conjuntos de iniciadores, 392F/392R y 389F/389R, son los más adecuados para la detección de todas las variantes conocidas (Tang, 2002; OIE, 2003; Tang, 2003; Krabsetsve et al., 2004), incluyendo tipos 3A y 4B, que se insertan en el genoma de ciertas poblaciones de *P. monodon* desde el oeste del Indo-Pacífico, África Oriental, Australia y la India (Krabsetsve, 2004; Tang, 2006; Tang, 2007). Este último hecho dificulta la detección de IHNV. En nuestro estudio, realizamos PCR de diagnóstico a partir de los iniciadores IHNV392F/R y NNJ208F/R en donde obtuvimos 102 resultados positivos de IHNV; sin embargo, al realizar el proceso de secuenciación se presentaron inconvenientes con la especificidad de los iniciadores PF5/PR6, que estuvieron diseñados en base al aislado de Hawái (AF218266) y probados *in silico* con la secuencia de Ecuador (AY362548) anteriormente reportada en GenBank. Posiblemente, la causa de la dificultad encontrada en la amplificación de los iniciadores con las muestras ecuatorianas se deba a que los aislados de Ecuador tienen una mayor variabilidad genética que la esperada. Por lo tanto es necesario, realizar un segundo estudio donde a partir de las secuencias obtenidas con los aislados ecuatorianos se diseñen iniciadores más específicos y se corran las muestras colectadas en este estudio. Adicionalmente, se podría correr los iniciadores específicos para diferenciar las cepas infecciosas de las no infecciosas. Esto permitirá contar con secuencias más cercanas a la realidad, las mismas que posteriormente pueden ser usadas para técnicas de diagnóstico más sensibles para el control de la enfermedad en el país.

Tang y Lightner en el 2002 reportaron una baja variación genética del virus entre aislados de América y Hawái. Estudios moleculares posteriores mostraron una considerable variación del virus entre aislados de Asia y una pequeña variación entre los aislados de América (Tang et al., 2003), lo que ha sido atribuido al desarrollo de una relación huésped-patógeno más equilibrado. Un análisis con muestras de camarón *P. vannamei* colectadas en el Golfo de California, determinaron una tasa media de sustitución de nucleótidos para IHNV inesperadamente alta (1,39 x 10⁻⁴ sustituciones/sitio/año) (Robles et al., 2010). Nuestros resultados confirman estas observaciones, ya que el árbol filogenético inferido muestra los aislados de América en un mismo grupo, mientras que los aislados de Asia se encuentran más dispersos. A pesar de esto, encontramos la presencia de dos genotipos en las muestras circulantes ecuatorianas, similar a lo encontrado por Robles en el 2010.

El árbol filogenético mostro 4 grupos diferenciados: Un grupo grande infeccioso de América y Asia, en donde se encontraron los aislados de Ecuador, un grupo pequeño de cepas infecciosas de Australia y Egipto, un grupo de cepas infecciosas de Asia y un grupo final de cepas no infecciosas de África (Tanzania, Madagascar), India y Australia. Los aislados de Ecuador presentados en este estudio, muestran indicios de una alta variabilidad genética entre ellos, aunque todas las muestras (Guayas y El Oro) están dentro del grupo infeccioso. Las muestras de El Oro-Isla Pungalillo se ubicaron en un mismo grupo, cercanas a las cepas de Vietnam y México. En tanto que, las muestras del Guayas se agruparon distantes a las de El Oro y muy cercanas a los aislados de Taiwán, Filipinas, China y Hawái y al aislado de Ecuador previamente reportado en GenBank. La posibilidad de ocurrencia de un brote epidémico provocado por aparición de genotipos virulentos no pueden ser excluidos, por lo tanto, los monitoreos, tales como los realizados en este estudio, son necesarios para conocer los genotipos circulantes y estudiar su asociación con virulencia diferencial. Un análisis más profundo de las muestras encontradas en este estudio permitirá dilucidar aspectos que pueden ser importantes para manejo a nivel de camaronerías (por ejemplo desarrollo de técnicas de diagnóstico más sensible). Esto será importante para prevenir futuros brotes en los cultivos de producción camaronesa del país.

5. Agradecimiento

Este trabajo fue financiado por la Secretaría de Educación Superior, Ciencia, Tecnología e Innovación del Ecuador (SENESCYT), a través del proyecto Desarrollo e implementación de métodos de control y prevención de enfermedades en especies acuáticas de uso comercial y uso potencial en maricultura o repoblación PIC-14-CENAIM-003.

6. Referencias

- Lightner, D. V., Redman, R. M., & Bell, T. A. (1983). Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis, a newly recognized virus disease of penaeid shrimp. *Journal of Invertebrate Pathology*, 42(1), 62-70.
- Robles-Sikisaka, R., Bohonak, A. J., McClenaghan Jr, L. R., & Dhar, A. K. (2010). Genetic signature of rapid IHNV (Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus) expansion in wild *Penaeus* shrimp populations. *PLoS One*, 5(7), e11799.
- Lightner, D. V., Redman, R. M., Bell, T. A., & Brock, J. A. (1983). Detection of IHNV virus in *Penaeus stylirostris* and *P. vannamei* imported into Hawaii. *Journal of the World Mariculture Society*, 14(1 - 4), 212-225.
- Cuéllar, Pantoja, Lightner, Lemos Pereira, Mendes, Vasconcelos, Arns Da Silva, Poletto, Morales-Covarrubias, Gómez Gil R, Barracco Luciane, Perazzolo, Da Rosa, De Blas Giral, Del Campo, Morales Q, Lara, & García Suárez (2014). Guía técnica-Patología e inmunología de camarones peneidos. - 2da edición.
- Kalagayan, H., Godin, D., Kanna, R., Hagino, G., Sweeney, J., Wyban, J., & Brock, J. (1991). IHNV Virus as an Etiological Factor in Runt - Deformity Syndrome (RDS) of Juvenile *Penaeus vannamei* Cultured in Hawaii. *Journal of the World Aquaculture society*, 22(4), 235-243.

- Primavera, J. H., & Qunitio, E. T. (2000). Runt-deformity syndrome in cultured giant tiger prawn *Penaeus monodon*. *Journal of Crustacean Biology*, 20(4), 796-802.
- Lightner, D. V., Redman, R. M., Moore, D. W., & Park, M. A. (1993). Development and application of a simple and rapid diagnostic method to studies on hepatopancreatic parvovirus of penaeid shrimp. *Aquaculture*, 116(1), 15-23.
- Cotmore, S. F., Agbandje-McKenna, M., Chiorini, J. A., Mukha, D. V., Pintel, D. J., Qiu, J., & Davison, A. J. (2014). The family parvoviridae. *Archives of virology*, 159(5), 1239-1247.
- Bonami, J. R., Trumper, B., Mari, J., Brehelin, M., & Lightner, D. V. (1990). Purification and characterization of the infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus of penaeid shrimps. *Journal of general virology*, 71(11), 2657-2664.
- Tang, K. F., Poulos, B. T., Wang, J., Redman, R. M., Shih, H. H., & Lightner, D. V. (2003). Geographic variations among infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) isolates and characteristics of their infection. *Diseases of aquatic organisms*, 53(2), 91-99.
- Wu, H., Xu, L. M., & Yang, F. (2008). Genome cloning of the infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) isolated from Fujian, China. *Journal of Oceanography in Taiwan Strait*, 27(2), 147.
- Hung, P.V., An, P.D.T. and Van, P. H. (2009). Sequencing the genomic of infectious hypodermatic and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) isolated from Viet Nam. *Journal Y Hoc Thanh Pho Ho Chi Minh (Supp. 2)*, 129-137.
- Rai, P., Safeena, M. P., Karunasagar, I., & Karunasagar, I. (2011). Complete nucleic acid sequence of *Penaeus stylirostris* densovirus (PstDNV) from India. *Virus research*, 158(1), 37-45.
- Lightner, D. V. (1996). Epizootiology, distribution and the impact on international trade of two penaeid shrimp viruses in the Americas. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*, 15(2), 579-601.
- Flegel, T. W. (1997). Major viral diseases of the black tiger prawn (*Penaeus monodon*) in Thailand. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 13(4), 433-442.
- [16] Motte, E., Yugcha, E., Luzardo, J., Castro, F., Leclercq, G., Rodríguez, J., ... & Montalvo, K. (2003). Prevention of IHHNV vertical transmission in the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, 219(1), 57-70.
- Tang, K. F., & Lightner, D. V. (2002). Low sequence variation among isolates of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) originating from Hawaii and the Americas. *Diseases of aquatic organisms*, 49(2), 93-97.
- Rai, P., Safeena, M. P., Krabetsve, K., La Fauce, K., Owens, L., & Karunasagar, I. (2012). Genomics, Molecular Epidemiology and Diagnostics of Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus. *Indian Journal of Virology*, 23(2), 203-214.
- Tang, K. F., & Lightner, D. V. (2006). Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV)-related sequences in the genome of the black tiger prawn *Penaeus monodon* from Africa and Australia. *Virus research*, 118(1), 185-191.
- Rai, P., Pradeep, B., Safeena, M. P., Karunasagar, I., & Karunasagar, I. (2009). Simultaneous presence of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) and Type A virus-related sequence in *Penaeus monodon* from India. *Aquaculture*, 295(3), 168-174.
- Hsia, H. L., Chen, L. L., Peng, S. E., Yu, H. T., Lo, C. F., & Kou, G. H. (2003). Comparison of genomic sequence of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) between Taiwan and other geographical isolates. *Fish Pathology* 8(4), 177-179.
- World organization for animal health OIE. (2008). *Aquatic Animal Health Code*. Eleventh Edition, 12-75017.WWW: <http://www.oie.int>.
- Tang, K. F., Durand, S. V., White, B. L., Redman, R. M., Pantoja, C. R., & Lightner, D. V. (2000). Postlarvae and juveniles of a selected line of *Penaeus stylirostris* are resistant to infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus infection. *Aquaculture*, 190(3), 203-210.
- Macías-Rodríguez, N. A., Mañón-Ríos, N., Romero-Romero, J. L., Camacho-Beltrán, E., Magallanes-Tapia, M. A., Leyva-López, N. E., ... & Méndez-Lozano, J. (2014). Prevalence of viral pathogens WSSV and IHHNV in wild organisms at the Pacific Coast of Mexico. *Journal of invertebrate pathology*, 116, 8-12.
- Silva, D. C., Nunes, A. R., Teixeira, D. I., Lima, J. P. M., & Lanza, D. C. (2014). Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus from Brazil: Sequencing, comparative analysis and PCR detection. *Virus research*, 189, 136-146.
- Sievers, F., & Higgins, D. G. (2014). Clustal Omega, accurate alignment of very large numbers of sequences. *Multiple sequence alignment methods*, 105-116.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., & Kumar, S. (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular biology and evolution*, 28(10), 2731-2739.
- Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of molecular evolution*, 16(2), 111-120.
- Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, 783-791.
- Zhang, C., Yuan, J. F., & Shi, Z. L. (2007). Molecular epidemiological investigation of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus and taura syndrome virus in *Penaeus vannamei* cultured in China. *Virologica Sinica*, 22(5), 380-388.
- Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular biology and evolution*, msw054.
- Krabetsve, K., Cullen, B. R., & Owens, L. (2004). Rediscovery of the Australian strain of infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus. *Diseases of aquatic organisms*, 61, 153-158.
- Pantoja, C. R., Lightner, D. V., & Holtschmit, K. H. (1999). Prevalence and geographic distribution of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) in wild blue shrimp *Penaeus stylirostris* from the Gulf of California, Mexico. *Journal of Aquatic Animal Health*, 11(1), 23-34.
- Kim, J. H., Choresca, C. H., Shin, S. P., Han, J. E., Jun, J. W., Han, S. Y., & Park, S. C. (2011). Detection of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) in *Litopenaeus vannamei* shrimp cultured in South Korea. *Aquaculture*, 313(1), 161-164.
- Lightner, D. V. (2011). Virus diseases of farmed shrimp in the Western Hemisphere (the Americas): a review. *Journal of invertebrate pathology*, 106(1), 110-130.
- Saksmerprome, V., Puiprom, O., Noonin, C., & Flegel, T. W. (2010). Detection of infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus

(IHHNV) in farmed Australian *Penaeus monodon* by PCR analysis and DNA sequencing. *Aquaculture*, 298(3), 190-193.

Kim, J. H., Kim, H. K., Nguyen, V. G., Park, B. K., Choresca, C. H., Shin, S. P., ... & Park, S. C. (2012). Genomic sequence of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) KLV-2010-01 originating from the first Korean outbreak in cultured *Litopenaeus vannamei*. *Archives of virology*, 157(2), 369-373.

Nita, M. H., Kua, B. C., Bhassu, S., & Othman, R. Y. (2012). Detection and genetic profiling of infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus (IHHNV) infections in wild berried freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* collected for hatchery production. *Molecular biology reports*, 39(4), 3785-3790.

Fajardo, C., Rodulfo, H., Rodriguez, M., Puig, J., & De Donato, M. (2015). Molecular characterization of strains of decapod penstyldensovirus 1 (PstDV1) isolated in farmed *Litopenaeus vannamei* from Venezuela. *Aquaculture*, 436, 34-39.

World organization for animal health OIE. (2009). *Aquatic Animal Health Code*. Eleventh Edition, 12-75017 .www: <http://www.oie.int>.

Walker, P. J., & Winton, J. R. (2010). Emerging viral diseases of fish and shrimp. *Veterinary research*, 41(6), 51.

Saksmerprom, V., Jitrakorn, S., Chayaburakul, K., Laiphrom, S., Boonsua, K., & Flegel, T. W. (2011). Additional random, single to multiple genome fragments of *Penaeus stylirostris* densovirus in the giant tiger shrimp genome have implications for viral disease diagnosis. *Virus research*, 160(1), 180-190.

World Organization for Animal Health OIE. (2003). *Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals*. Fourth Edition, 12-75017. <http://www.oie.int>.

Tang, K. F., Navarro, S. A., & Lightner, D. V. (2007). PCR assay for discriminating between infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) and virus-related sequences in the genome of *Penaeus monodon*. *Diseases of aquatic organisms*, 74(2), 165.