

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL CALLAO

**FACULTAD DE INGENIERÍA PESQUERA Y DE
ALIMENTOS**

**ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERIA PESQUERA
Y DE ALIMENTOS**



**DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE ENFERMEDADES VIRALES Y
BACTERIANAS EN EL CULTIVO DE TILAPIA *Oreochromis
niloticus* EN LA EMPRESA PEZBIOTEC SAC**

**TRABAJO DE SUFIENCIA PROFESIONAL PARA OPTAR EL
TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERO PESQUERO**

AUTOR:

ADRIAN EDÚ ZATÁN VALDIVIEZO

Callao, 2023

PERÚ

Document Information

Analyzed document	TRABAJO DE SUFICIENCIA PROFESIONAL FIPA-IP (AUTOR_ADRIAN EDÚ ZATÁN VALDIVIEZO).docx (D178813350)
Submitted	11/14/2023 10:52:00 PM
Submitted by	INVESTIGACIÓN FIPA-UNAC
Submitter email	fipa.investigacion@unac.edu.pe
Similarity	0%
Analysis address	fipa.investigacion.unac@analysis.arkund.com

Sources included in the report

W	URL: https://www.pezbiotec.com/ Fetched: 11/14/2023 10:52:00 PM	 1
----------	---	--

Entire Document

I. ASPECTOS GENERALES 1.1. Objetivos

1.1.1. Objetivo general

- Diagnosticar mediante técnicas moleculares las enfermedades virales y bacterianas en el cultivo de tilapia en la empresa Pezbiotec SAC.

1.1.2. Objetivos específicos

- Diagnosticar las enfermedades virales en el cultivo de tilapia por el método de semi-nested PCR, también llamada PCR semi-anidada.
- Diagnosticar las enfermedades bacterianas en el cultivo de tilapia por método de PCR de punto final.
- Determinar la ausencia o presencia de las enfermedades virales y bacterianas en el cultivo de tilapia que se comercializa en una piscigranja en la Banda de Shilcayo – San Martín – Perú.

1.2. Organización de la empresa o institución

PEZBIOTEC SAC es

100%

MATCHING BLOCK 1/1

W

una empresa peruana especializada en biotecnología acuícola, conformada por un equipo de profesionales multidisciplinarios altamente capacitados.

PEZBIOTEC se encuentra ubicada en el departamento de Piura, provincia de Piura, distrito de Piura, desde donde realiza sus actividades.

PEZBIOTEC fue creada en el año del 2019 por 5 jóvenes egresados de la maestría de biotecnología molecular de la Universidad Nacional de Tumbes. La empresa empezó sus operaciones en la ciudad de Tumbes, posteriormente en el año 2020 la empresa se trasladó a su ubicación actual, donde cuenta con un laboratorio que cuenta con equipos especializados para diversas áreas de la biología molecular.



Acta de Exposición de Trabajo de Suficiencia Profesional
 En la sala de sesión del Consejo de Facultad de Ingeniería,
 Investigación y de Alimentos de la Universidad Nacional del
 Callao, sito en la Av. Juan Pablo II N° 306, Bellavista, Callao,
 a las 10:00 am del día miércoles 27 de diciembre de 2023
 Los miembros del Jurado Evaluador de Trabajo de Suficiencia
 titulado "Diagnostico molecular de Enfermedades Virales y
 Bacterianas en el cultivo de Tilapia *Oreochromis niloticus*
 en la Empresa Pezbiotec SAC", designados mediante Resolución
 de Decano N° 089-2023-DFIPS, del 18 julio de 2023,
 conformado por:

MSc. Arnulfo Antonio Hauluz Fernández	Presidente
Ing. Gloria ALBINA GUTIÉRREZ ROMERO	Secretaria
Bjgc Alicia Cecilia Decheo Egusquiza	Vocal
Ing. Walter Alento Ruesta	Asesor

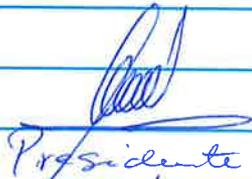
Para lectura de la Resolución de Decano N° 151-2023-DFIPS
 de fecha 26 de diciembre de 2023; Memorandum N° 09-2023-
 DFIPS, de fecha 26 de diciembre de 2023; el oficio N° 003-2023-
 JETSP-FIPS, de fecha 18 de diciembre de 2023, del
 Presidente del Jurado Evaluador de Trabajo de Suficiencia
 Profesional, fijando fecha y hora de acuerdo al artículo 97°
 del Reglamento de Grados y Títulos N° 150-2023-CU. Se dio
 inicio al Acto de Exposición del Trabajo Académico "Diagnostico
 molecular de Enfermedades Virales y Bacterianas en el cultivo de
 Tilapia *Oreochromis niloticus* en la Empresa Pezbiotec SAC",
 en un tiempo de 20 minutos. Concluido el acto de Exposición,
 los miembros del Jurado Evaluador procedieron a formular
 las preguntas correspondiente al Informe de Suficiencia Profesional
 expuesto para ser absueltas por el sustentante, Zatar Valdiviezo Adrian
 Edi, Culminada esta etapa el Jurado procedio a deliberar la
 calificación del Informe.

En concordancia al artículo 7° del Reglamento de Grados y títulos de la Resolución N° 150-2023-CU, se le otorga la calificación Excelente (18). Seguido se dio lectura en público, el Acta de Exposición de Trabajo de Suficiencia Profesional del señor Adrian Edú Zator Valdinezo.

A continuación se realizó la Juramentación del titulado a cargo del Presidente del Jurado

Siendo las 11:20 am horas del mismo día y habiéndose con lo dispuesto en el artículo N° 97° del Reglamento de Grados y Títulos.

Se declaró cerrada la Sesión, dando fe de lo actuado en las respectivas firmas.



Presidente
A. ANTONIO MARILUZ FERNANDEZ

Gloria A. Gutiérrez R.

Secretaria

GLORIA ALBINA GUTIERREZ ROMERO.

Alicia Decheo Egusquiza

Jocal

Blgo. ALICIA CECILIA DECHEO EGUSQUIZA

ASESOR



Ing. Walter Alvaros Ruesta

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL CALLAO
FACULTAD DE INGENIERÍA PESQUERA Y DE ALIMENTOS

Bellavista, 12 de enero del 2024

OFICIO N° 01-2024-JESTP-FIPA

Señor Doctor
ENRIQUE GARCIA TALLEDO
Decano
Facultad de Ingeniería Pesquera y de Alimentos

Presente. -

Asunto: Dictamen de Exposición de Trabajo de Suficiencia Profesional
Referencia: Resolución N°089-2023- DFIPA

Por intermedio del presente, tenemos a bien dirigirnos a usted, para saludarlo cordialmente y a la vez informarle, que los Miembros del Jurado de Exposición del Trabajo de Suficiencia Profesional titulado “**DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE ENFERMEDADES VIRALES Y BACTERIANAS EN EL CULTIVO DE TILAPIA *Oreochromis niloticus* EN LA EMPRESA PEZBIOTEC SAC**” del señor bachiller de Ingeniería Pesquera ADRIAN EDÚ ZATÁN VALDIVIEZO, cumplimos con llevar a cabo la exposición del Trabajo de Suficiencia Profesional, el 27 de diciembre del 2023, sustentado el mismo, obtuvo el calificativo de Excelente (18); sin observaciones.

Por lo expuesto señor Decano, sugerimos disponga lo pertinente, a fin de que continúe con los trámites respectivos.

Aprovechamos la oportunidad para manifestarle los sentimientos de nuestra consideración y estima personal.

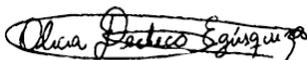
Atentamente;



Dr. Antonio Mariluz Fernández
Presidente



Ing. Gloria Gutiérrez Romero
Secretario



Dra. Alicia Decheco Egusquiza
Vocal

ÍNDICE

I. ASPECTOS GENERALES	10
1.1. Objetivos	10
1.1.1. Objetivo general	10
1.1.2. Objetivos específicos	10
1.2. Organización de la empresa o institución	10
II. FUNDAMENTACIÓN DE LA EXPERIENCIA PROFESIONAL	14
2.1 Marco teórico	14
2.1.1 Tilapia nilótica (<i>Oreochromis niloticus</i>)	14
2.1.2 Cultivo de tilapia en el Perú	15
2.1.3 Diagnóstico molecular de enfermedades	15
2.1.4 Reacción en cadena de la polimerasa - PCR	16
2.1.5 Electroforesis	18
2.1.6 Patógenos que atacan al cultivo de tilapia	20
a) Virus de la tilapia del lago TiLV	20
b) <i>Aeromonas hydrophila</i>	20
c) <i>Flavobacterium columnare</i>	21
d) <i>Streptococcus agalactiae</i>	22
e) <i>Lactococcus garvieae</i>	22
2.2. Descripción de las actividades desarrolladas	23
2.2.1 Recepción y toma de muestra	24
2.2.2 Extracción de ARN (para detección de patógenos virales)	26
a) Preparación de muestra	26
b) Separación de fases	26
c) Precipitación de ARN	27
d) Lavado de ARN	27

e) Solubilización de ARN	27
f) Consideraciones importantes	27
2.2.3 Transcripción reversa (RT, por sus siglas en inglés)	28
2.2.4 Extracción de ADN (para detección de patógenos bacterianos)	28
a) Preparación de muestra	28
b) Separación de fases	28
c) Precipitación del ADN.....	29
d) Lavado del ADN	29
e) Solubilización del ADN.....	29
2.2.5 Cuantificación de ácidos nucleicos.....	30
2.2.6 Reacción en cadena de la polimerasa PCR	31
b) PCR de punto final para diagnóstico de <i>A. hydrophila</i>	32
c) PCR de punto final para diagnóstico de <i>F. columnare</i>	33
d) PCR de punto final para diagnóstico de <i>S. agalactiae</i>	33
e) PCR de punto final para diagnóstico de <i>L. garvieae</i>	34
2.2.7 Electroforesis	37
2.2.8 Visualización de resultados	38
III. APORTES REALIZADOS.....	40
3.1 Evidencias de las actividades realizadas en la empresa.....	40
IV. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.....	44
V. RECOMENDACIONES	45
VI. BIBLIOGRAFÍA.....	46
ANEXOS	56

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Órganos usados para detección de patógenos que afectan al cultivo de tilapia.....	26
Tabla 2. Cebadores usados para el diagnóstico de TiLV.....	31
Tabla 3. Reactivos y cantidades para reacción de PCR I TiLV	31
Tabla 4. Reactivos y cantidades para reacción de PCR II TiLV	32
Tabla 5. Cebadores usados el para el diagnóstico de <i>Aeromonas hydrophila</i> ..	32
Tabla 6. Reactivos y cantidades para reacción de PCR <i>Aeromonas hydrophila</i>	32
Tabla 7. Cebadores usados para el diagnóstico de <i>Flavobacterium columnare</i>	33
Tabla 8. Reactivos y cantidades para reacción de PCR <i>Flavobacterium columnare</i>	33
Tabla 9. Cebadores usados para el diagnóstico de <i>Streptococcus agalactiae</i>	33
Tabla 10. Reactivos y cantidades para reacción de PCR <i>Streptococcus agalactiae</i>	34
Tabla 11. Cebadores usados para el diagnóstico de <i>Lactococcus garvieae</i>	34
Tabla 12. Reactivos y cantidades para reacción de PCR <i>Lactococcus garvieae</i>	34
Tabla 13. Programa TiLV (1era PCR)	36
Tabla 14. Programa TiLV (2da PCR).....	36
Tabla 15. Programa <i>Aeromonas hydrophila</i>	36
Tabla 16. Programa <i>Flavobacterium columnare</i>	36
Tabla 17. Programa <i>Streptococcus agalactiae</i>	37
Tabla 18. Programa <i>Lactococcus garvieae</i>	37

TABLA DE FIGURAS

Figura 1. Organigrama de la empresa PEZBIOTEC SAC	13
Figura 2. Representación del proceso de PCR	18
Figura 3. Representación de la visualización de los resultados de una corrida de electroforesis.....	19
Figura 4. Diagrama de flujo de la detección de patógenos bacterianos y virus de la tilapia del lago TiLV en ejemplares de tilapia realizado en el laboratorio de PEZBIOTEC SAC	24
Figura 5. Alevines de tilapia nilótica <i>Oreochromis niloticus</i> recibidos en el laboratorio antes de ser diseccionados	25
Figura 6. Proceso de extracción de ADN de órganos de tilapia en el área de extracción de ácidos nucleicos.....	29
Figura 7. Cuantificación de ácidos nucleicos.....	30
Figura 8. Repartición del mix de PCR en tubos de 0.2ml antes de adicionar la muestra de ADN o ADNc	35
Figura 9. Colocación de las muestras en termociclador e inicio de la técnica de PCR	35
Figura 10. Fuente de poder y cubeta de electroforesis usado para la técnica de electroforesis... ..	38
Figura 11. Gel de electroforesis puesto en transiluminador de luz azul.	39
Figura 12. Transiluminador UV usado para la visualización de los resultados luego de la técnica de electroforesis	39
Figura 13. Foto tomada en las instalaciones de PEZBIOTEC, mostrando el ingreso al área de extracción de ácidos nucleicos	40
Figura 14. Muestras de hígado y bazo de tilapia antes de ser procesados.....	41
Figura 15. Proceso de extracción de ARN de órganos de tilapia en el área de extracción de ácidos nucleicos.....	41
Figura 16. Proceso de técnica PCR	42

Figura 17. Visualización de resultados de PCR para detección de TiLV.....	42
Figura 18. Visualización de resultados de PCR para detección de Aeromonas Hydrophila.....	43
Figura 19. Formato interno usado para la anotación de los resultados de diagnósticos realizados.....	43

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

A260:	Absorbancia a 260 nanómetros
A280:	Absorbancia a 280 nanómetros
ACTG:	Adenina-citocina-tiamina-guanina
ADN:	Ácido desoxirribonucleico
ADNc:	Ácido desoxirribonucleico complementario
ARN:	Ácido ribonucleico
ARNm:	Ácido ribonucleico mensajero
AUP:	Agua ultrapura
BFT:	<i>Biofloc Technology</i> (Sistema de tecnología biofloc)
CTAB:	Bromuro de hexadeciltrimetilamonio
dNTPs:	Desoxirribonucleótidos trifosfatos
DTAB:	Bromuro de dodeciltrimetilamonio
ETiLV:	Enfermedad del virus de la tilapia lacustre
g:	Gravedades
min:	Minutos
mg:	Miligramos
ml:	Mililitro
mM:	Milimolar
ng:	Nanogramos
nm:	Nanómetro
pb:	Pares de bases
PCR:	<i>Polymerase chain reaction</i> (Reacción en cadena de la polimerasa)

RAS:	<i>Recirculating aquaculture systems</i> (Sistema de recirculación acuícola)
rpm:	Revoluciones por minuto
RT-PCR:	<i>Reverse transcription Polymerase chain reaction</i> (Transcripción reversa – Reacción en cadena de la polimerasa)
s:	Segundo
SAM:	Septicemia por <i>Aeromonas</i> móviles
TAE:	Buffer Tris-Acetato-EDTA
TiLV:	<i>Tilapia lake virus</i> (Virus de la tilapia lacustre)
U:	Unidad de actividad enzimática
μl:	Microlitro
μM:	Micromolar

I. ASPECTOS GENERALES

1.1. Objetivos

1.1.1. Objetivo general

- Diagnosticar mediante técnicas moleculares las enfermedades virales y bacterianas en el cultivo de tilapia en la empresa Pezbiotec SAC.

1.1.2. Objetivos específicos

- Diagnosticar las enfermedades virales en el cultivo de tilapia por el método de semi-nested PCR, también llamada PCR semi-anidada.
- Diagnosticar las enfermedades bacterianas en el cultivo de tilapia por método de PCR de punto final.
- Determinar la ausencia o presencia de las enfermedades virales y bacterianas en el cultivo de tilapia que se comercializa en una piscigranja en la Banda de Shilcayo – San Martín – Perú.

1.2. Organización de la empresa o institución

PEZBIOTEC SAC es una empresa peruana especializada en biotecnología acuícola, conformada por un equipo de profesionales multidisciplinarios altamente capacitados. PEZBIOTEC se encuentra ubicada en el departamento de Piura, provincia de Piura, distrito de Piura, desde donde realiza sus actividades.

PEZBIOTEC fue creada en el año del 2019 por 5 jóvenes egresados de la maestría de biotecnología molecular de la Universidad Nacional de Tumbes. La empresa empezó sus operaciones en la ciudad de Tumbes, posteriormente en el año 2020 la empresa se trasladó a su ubicación actual, donde cuenta con un laboratorio que cuenta con equipos especializados para diversas áreas de la biología molecular.

Las principales actividades de PEZBIOTEC son el diagnóstico molecular de enfermedades en diversos cultivos acuícolas, análisis microbiológico de los cultivos acuícolas y aguas, formulación de proyectos para postulación de fondos concursables nacionales e internacionales, realización de talleres, cursos especializados y diplomados enfocados en aplicaciones de la biotecnología

molecular en la acuicultura y asesorías técnicas en el diagnóstico y tratamiento de enfermedades en el cultivo acuícola. Además, destaca por ser una empresa enfocada en la ejecución de proyectos, siendo reconocida por sus novedosos proyectos y financiamientos ganados para seguir la línea de investigación sobre técnicas de diagnóstico, mejoramiento del crecimiento y conversión alimenticia y prospección de nuevos insumos para la elaboración de alimentos balanceados para el mejoramiento de la acuicultura nacional.

La misión de PEZBIOTEC es integrar la biotecnología a través del desarrollo de productos y servicios innovadores que permitan dar soluciones con el fin de fortalecer la cadena productiva, contribuyendo al desarrollo de la actividad acuícola nacional. PEZBIOTEC tiene como visión ser un laboratorio de referencia en biotecnología acuícola en Perú y ser reconocido por sus servicios realizados, ideas innovadoras y calidad humana.

La empresa cuenta con participación en las redes sociales donde difunde sus actividades y capacitaciones ejecutadas. Además, la empresa cuenta con una página web <https://www.pezbiotec.com> donde pueden encontrar toda la información de la empresa como números para contactos, servicios que se brindan y principales clientes.

PEZBIOTEC actualmente se encuentra dividida en 5 departamentos (Fig. 1) tales como: Departamento de patología y sanidad acuícola, encargado de realizar investigaciones sobre enfermedades virales, bacterianas, micóticas y parasitarias que afectan la acuicultura nacional, utilizando herramientas biotecnológicas de vanguardia. Las líneas de investigación se dirigen a estudios de caracterización de microorganismos patógenos emergentes y sus mecanismos de virulencia, interacción patógena /hospedero, así como también al desarrollo de nuevos métodos de diagnóstico empleando técnicas moleculares. Este departamento es el encargado del servicio de diagnóstico molecular a las diferentes especies acuícolas.

En el departamento de microbiología molecular se desarrollan investigaciones orientadas a la caracterización molecular de microorganismos (bacterias, virus, hongos y parásitos) y su interacción con el medio ambiente y el hospedador mediante el uso de la microbiología, biotecnología molecular, genómica

microbiana y bioinformática. Este departamento realiza investigaciones en la búsqueda de microorganismos que sirvan de herramientas biotecnológicas para el beneficio de los cultivos piscícolas, como, el aislamiento y caracterización de bacterias nativas con potencial probiótico. Este departamento lleva a cabo los servicios de aislamiento de bacterias y hongos, antibiogramas, identificación molecular, caracterización a nivel molecular y cultivo *in vitro* de bacterias.

El Departamento de nutrición y nutrigenómica se encarga de investigar necesidades alimentarias de los organismos acuáticos cultivados a partir de la determinación de requerimientos nutricionales, y caracterización de ingredientes para la formulación de dietas. Además, se hacen estudios con el objetivo de buscar marcadores moleculares para evaluar la digestibilidad de insumos, dietas y mejorar así el proceso de formulación de nuevos alimentos. Esta área se encarga de las pruebas de diferentes alimentos, adición de insumos y aditivos al alimento comercial, realizando evaluaciones *in vivo*, usando como especies de prueba a peces de importancia acuícola nacional como tilapia, gamitana y trucha.

El Departamento de Innovación y Desarrollo Tecnológico efectúa un análisis constante de la problemática asociada a la actividad acuícola nacional, a partir del cual se idean y desarrollan estrategias integradas para dar soluciones precisas sobre los problemas identificados empleando la biotecnología como pilar fundamental.

El Departamento de Integración de biotecnología en los sistemas de cultivo está orientado a la investigación enfocada al desarrollo e implementación de técnicas y herramientas de biotecnología para hallar soluciones y mejoras alternativas en los diferentes sistemas de producción acuícola controlados (RAS, BFT, etc.) de las diversas especies de interés nacional.

La experiencia profesional descrita en este informe se realizó en el **Departamento de patología y sanidad acuícola**, donde se ejecuta el diagnóstico de enfermedades en diversos cultivos acuícolas, donde realizo el flujo de trabajo para el diagnóstico molecular de enfermedades en tilapia, desde la toma de muestra, extracción de ácidos nucleicos, cuantificación de ácidos nucleicos, reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) y electroforesis, culminando en la elaboración del informe correspondiente.

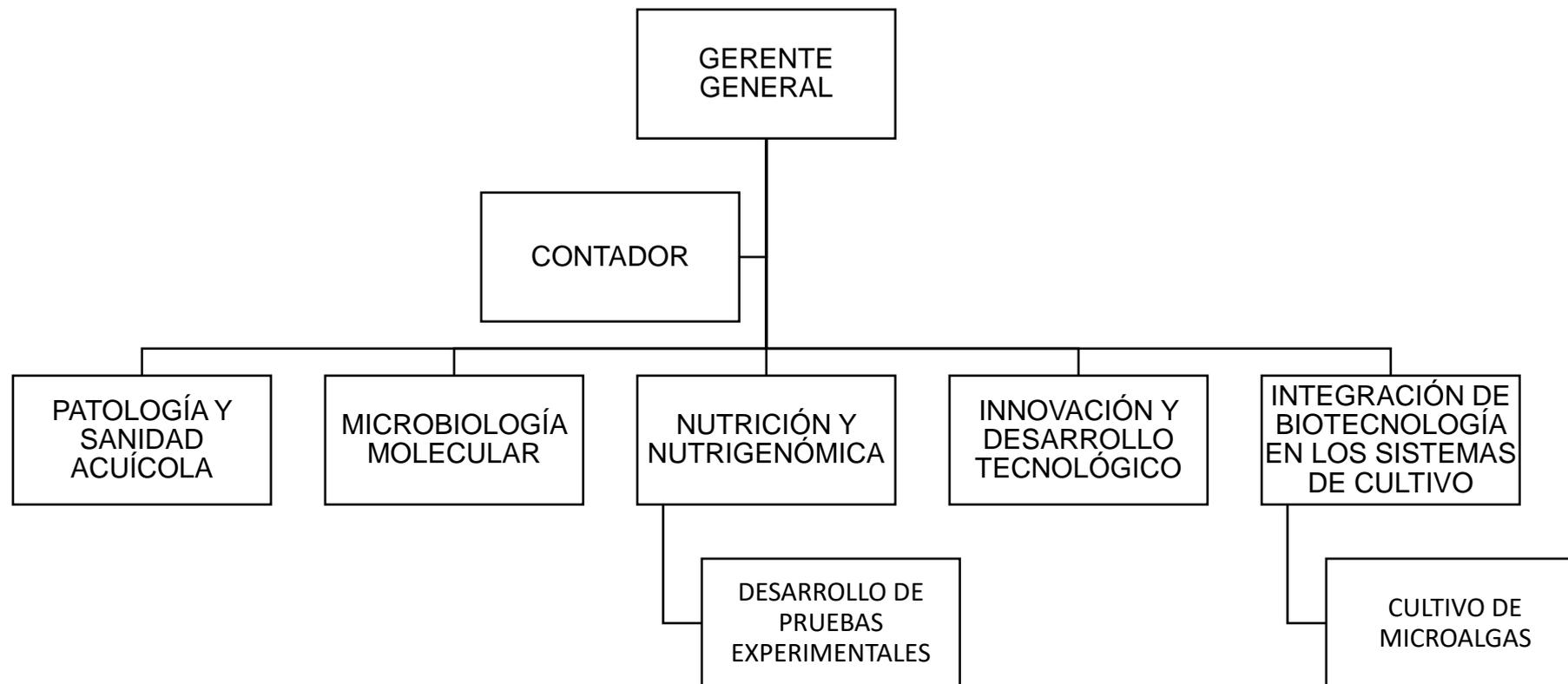


Figura 1. Organigrama de la empresa PEZBIOTEC SAC. Elaboración propia.

II. FUNDAMENTACIÓN DE LA EXPERIENCIA PROFESIONAL

2.1 Marco teórico.

2.1.1 Tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*)

Oreochromis niloticus “tilapia nilótica” es un pez originario del continente africano que ha sido introducido en las últimas décadas en casi todas las regiones del mundo. Su resistencia a las enfermedades, facilidad de reproducción y elevada adaptabilidad a diferentes entornos, alimentos y calidades de agua, la convierten en una de las especies más populares para la acuicultura en los países en desarrollo (Vega-Villasante et al. 2010). Su introducción en el país se dio en la década de los sesenta, sin embargo, no es hasta el 2001 que su cultivo comienza a cobrar importancia (Baltazar y Mendoza 2017).

Taxonómicamente, las tilapias se dividen en tres géneros según su comportamiento de crianza (Vajargah 2021): 1) Género Tilapia: incluye organismos que desovan en sustrato, 2) Género Sarotherodon: incluye especies que realizan una incubación bucal biparental, y 3) Género Oreochromis: incluye especies donde exclusivamente las hembras incuban en la boca (Trewavas 1983). *O. niloticus*, como el resto de tilapias, se caracteriza por poseer un cuerpo comprimido; la profundidad del pedúnculo caudal es igual a su longitud. Sus escamas son redondeadas con bordes lisos (cicloideas). La longitud de la quijada superior no evidencia dimorfismo sexual, la línea lateral es interrumpida, la aleta dorsal está compuesta espinas rígidas y blandas continuas, la aleta caudal es trunca y las aletas pectoral, dorsal y caudal se tornan a una coloración rojiza en temporada de desove (FAO 2009).

Las tilapias del género *Oreochromis* son principalmente micrófagas y se alimentan principalmente de fitoplancton, perifitón, plantas acuáticas, fauna béntica, detritos, larvas de peces y tejido orgánico en descomposición (Beveridge y Baird 2000; Vajargah 2021). *O. niloticus* exhibe plasticidad trófica de acuerdo con el ambiente y las otras especies con las que coexiste (El-Sayed 2020).

En cuanto a las condiciones de cultivo, la tilapia nilótica suele ser más resistente a hipoxia, alta salinidad, altas temperaturas y altos niveles de amoníaco en el agua de cultivo, en comparación con otras especies de agua dulce (Vajargah,

2021). Además, es una especie tropical que prefiere vivir en aguas someras, temperaturas inferiores a 11-12 °C y superiores a 42 °C pueden ser letales, lo ideal es entre 31 y 36 °C (FAO 2009), pero se requieren temperaturas mayores a 20 °C para la reproducción (FONDEPES 2004).

2.1.2 Cultivo de tilapia en el Perú

Según PRODUCE (2021), la cosecha de tilapia en el 2021 aumentó en 11,72 % con respecto al 2020. El cultivo de esta especie se desarrolla principalmente en los departamentos de Piura, San Martín, Cajamarca, Amazonas y Madre de Dios. El cultivo de tilapia en Perú se realiza como monocultivo o policultivo debido a la versatilidad de la especie. Estos cultivos se llevan a cabo en estanques de tierra o de concreto, y muy pocas veces en jaulas, alimentados con alimento balanceado comercial.

Las empresas ubicadas en el departamento de Piura trabajan con semillas de tilapia azul y tilapia nilótica del tipo chitralada de buena calidad genética, en cambio, en Cajamarca y San Martín, los cultivos producen y emplean semillas de tilapia nilótica de calidad baja con altos grados de degeneración y bajo rendimiento. Por lo tanto, los esfuerzos para la producción de semillas de alta calidad se presentan como una oportunidad de desarrollo y una necesidad que permita responder a las necesidades de los productores (Baltazar y Mendoza 2017).

2.1.3 Diagnóstico molecular de enfermedades

Diagnóstico se refiere al proceso de identificar la enfermedad o cualquier condición anormal que se explique y se derive de los signos y síntomas del huésped (Ador et al. 2021). El diagnóstico molecular usa los ácidos nucleicos como muestra de interés que se puede sondear (Altinok y Kurt 2003), permitiendo detectar el patógeno directamente, apuntando al material genético, reemplazando las técnicas de cultivo, serológicas o histológicas. Los métodos moleculares evitan los problemas asociados al estudio de organismos para los que no se dispone de un método o medio de cultivo *in vitro*, proporcionando una alta sensibilidad y especificidad, convirtiéndolos en las opciones preferidas en muchos laboratorios para el diagnóstico de enfermedades bacterianas, virales y

parasitarias de peces (Austin 2019; Cunningham 2002). La reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) es una de las técnicas moleculares más comunes que se utiliza ampliamente para la detección rápida de patógenos de peces. El diagnóstico basado en PCR puede presentar variantes como: PCR en tiempo real, PCR anidada, PCR de transcripción inversa y PCR multiplex, que se aplican para la detección concurrente y cuantitativa de una variedad de patógenos (Abdelsalam et al. 2023).

2.1.4 Reacción en cadena de la polimerasa - PCR

La reacción en cadena de la polimerasa es una reacción enzimática *in vitro* que amplifica millones de veces una secuencia específica de ADN durante varios ciclos repetidos en los que la secuencia blanco es copiada fielmente (Tamay de Dios, Ibarra y Vellasquillo 2013). Para ello, la reacción replica la actividad de la enzima ADN polimerasa que tiene la capacidad de sintetizar naturalmente el ADN en las células, un proceso fisiológico utilizado por todas las células vivas para duplicar su material genético antes de la división celular (Thornburg y Gugliucci 2014).

La PCR emplea una polimerasa termoestable para producir múltiples copias de una región de ácido nucleico específica de forma rápida y exponencial. En la reacción, si usamos como sustrato ADN genómico, entonces típicamente hablamos de una PCR, pero si usamos ADN complementario (ADNc) proveniente del ARNm (ácido ribonucleico mensajero) se le conoce como RT-PCR (*Reverse Transcription-PCR*, por sus siglas en inglés). Esta conversión se logra mediante una reacción conocida como transcripción reversa y controlada por la enzima transcriptasa reversa, capaz de convertir el ARNm en una molécula de ADNc (Farkas y Holland 2009).

La reacción de PCR se efectúa en equipos conocidos como termocicladores, programados producir ciclos de temperatura a los que se realiza la amplificación, en los tiempos necesarios, sin modificaciones en cada uno de los ciclos (Espinosa 2007; Tamay de Dios, Ibarra y Vellasquillo 2013).

Los elementos que componen una reacción de PCR son el templado o molde (ADN o ADNc), la enzima polimerasa, los oligonucleótidos o cebadores, los desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTPs: adenina, timina, citosina y guanina),

una solución amortiguadora o buffer y agua ultrapura o bidestilada (Tamay de Dios, Ibarra y Vellasquillo 2013). Todos estos elementos actúan de manera conjunta en las tres etapas que posee cada ciclo de PCR:

- La desnaturalización, cuando la temperatura de la mezcla se eleva entre 90-94 °C, haciendo que el ADN de doble cadena se separe rompiendo los enlaces de puente de hidrógeno (Jalali, Zaborowska y Jalali 2017; Maddocks y Jenkins 2017).
- La hibridación, donde los cebadores, que son pequeños fragmentos de nucleótidos, se unen mediante el principio de complementariedad de bases nitrogenadas a las cadenas de ADN opuestas (molde), ocurriendo a una temperatura entre 55 a 60 °C (Ador et al. 2021).
- La extensión, cuando la mezcla de reacción alcanza una temperatura de 72 °C, temperatura óptima para la actividad de la enzima ADN polimerasa que se une al complejo híbrido cebador-molde y luego ensambla una nueva cadena complementaria utilizando los nucleótidos libres en la mezcla de reacción. La polimerasa responsable de la replicación del ADN empieza a agregar nucleótidos al extremo 3' de la secuencia del cebador hibridada con el ADN molde (Jalali, Zaborowska y Jalali 2017).

Los productos de la PCR, se denominan amplicones, definidos como moléculas diana replicadas cuyos extremos están delimitados por los cebadores (Farkas y Holland 2009). Para una mejor comprensión de este proceso complejo se muestra la Fig. 2 que representa toda la reacción de la PCR.

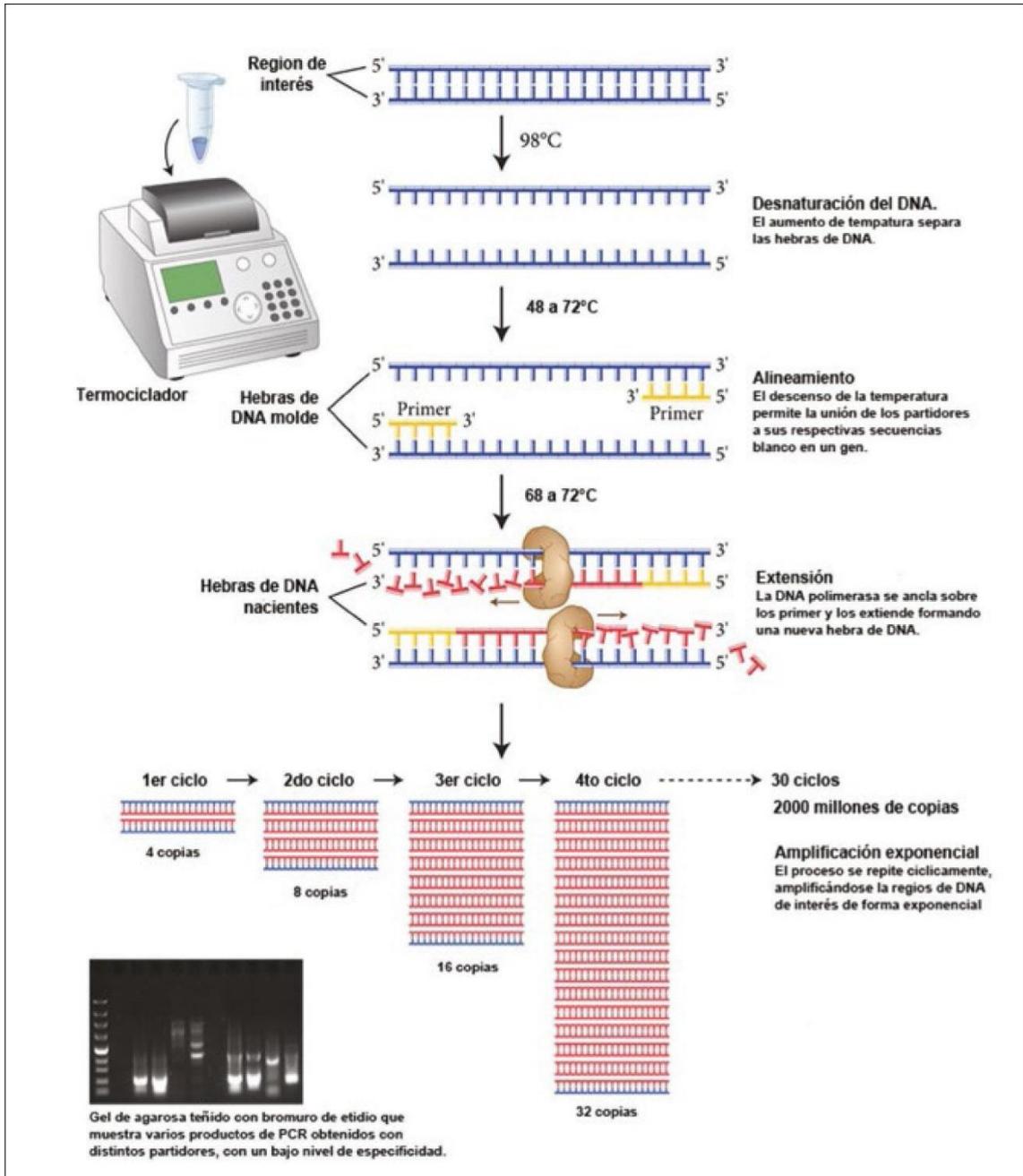


Figura 2. Representación del proceso de PCR. Tomada de “Biología Molecular en oncología: Lo que un clínico debiera saber” Por Encina, 2013, p. 567.

2.1.5 Electroforesis

Mediante la electroforesis podemos separar fragmentos de ADN y ARN en función de su tamaño, estimado en pares de bases (pb), y visualizarlos mediante una sencilla tinción, de esta forma determinar el contenido de ácidos nucleicos

de una muestra, teniendo una estimación de su concentración y grado de entereza (Fierro 2014).

Durante la electroforesis, en gel de agarosa, el ADN es cargado en pocillos prefabricados en el gel y se aplica una corriente eléctrica. Los grupos fosfato de los nucleótidos otorgan carga negativa a las moléculas de ADN y ARN, por lo tanto, cuando se coloca en un campo eléctrico, los fragmentos de ácidos nucleicos migrarán al ánodo positivo. Los poros del gel o la matriz actúan como un tamiz, permitiendo que las moléculas más pequeñas migren más rápido que las más grandes, y debido a que las moléculas de ADN poseen una relación masa/carga uniforme, la distancia recorrida es inversamente proporcional al logaritmo de su peso molecular (Lee et al. 2012).

Para la determinación del tamaño de las moléculas de una muestra se usan marcadores de tamaños conocidos que se colocan en el mismo gel que se comparan con la muestra (Fig. 3).

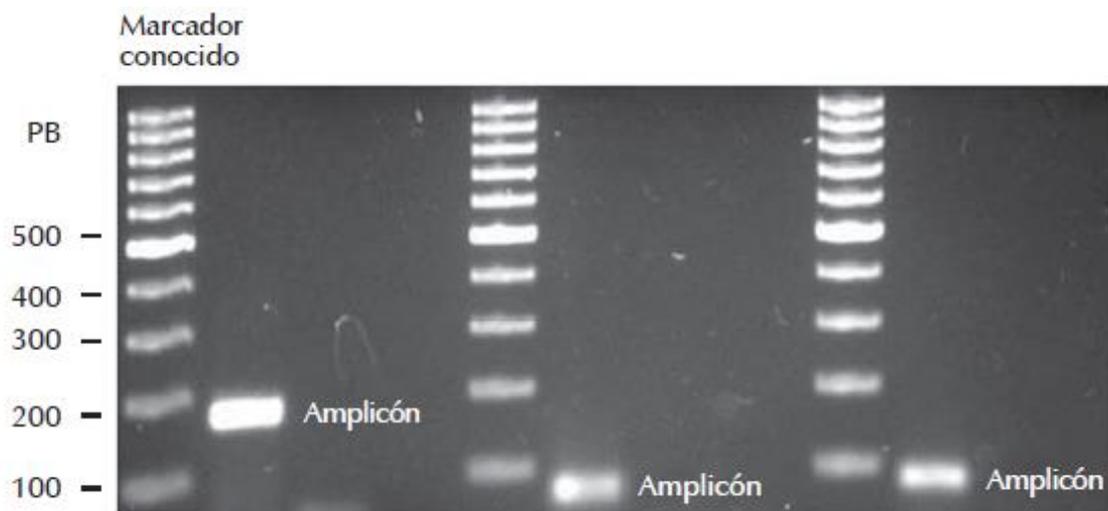


Figura 3. Representación de la visualización de los resultados de una corrida de electroforesis. Tomada de “Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real”, por Tamay de Dios, Ibarra y Vellasquillo 2013, p.74.

2.1.6 Patógenos que atacan al cultivo de tilapia

a) Virus de la tilapia del lago TiLV

La enfermedad del virus de la tilapia lacustre (ETiLV) es el nombre de la patología causada por el virus emergente de la tilapia del lago (TiLV). TiLV es miembro de la familia Amnoonviridae, una nueva familia de virus de ARN, del género *Tilapinevirus* y la especie *Tilapia tilapinevirus* (SANIPES 2022). ETiLV es una enfermedad viral que ha causado mortalidades severas en poblaciones de tilapia cultivadas y silvestres. Los principales órganos en los que se ha observado la patología son los ojos, el cerebro y el hígado (Eyngor et al. 2014).

Las lesiones generales incluyen alteraciones oculares, como la opacidad del cristalino y, en casos graves, su ruptura. Otras lesiones: erosiones dérmicas y congestión del bazo (Eyngor et al. 2014). Según SANIPES (2022), la primera sospecha del virus del TiLV en el Perú se dio en el año 2017, cuando ocurrió una mortalidad atípica en el Reservorio de Poechos-La Manga (Piura), recién en el año 2018 se confirmó la presencia del virus TiLV en muestras analizadas provenientes de Piura y San Martín.

b) *Aeromonas hydrophila*

Las bacterias *Aeromonas* son bacilos anaeróbicos facultativos, gramnegativo, que pertenece a la familia Vibrionaceae, que comprende dos géneros como *Vibrio* y *Aeromonas*, patógenos móviles, no formadores de esporas y con flagelos unipolares (Harikrishnan y Balasundaram 2005). La enfermedad más importante que afecta a los peces de cultivo es la septicemia por *Aeromonas* móviles (SAM) causada por *A. hydrophila*, es descrita como una enfermedad septicémica de distribución mundial que afecta a numerosas especies de peces de agua dulce y marina (Aboyadak et al. 2015). La infección por *A. hydrophila* causa síntomas tales como septicemia hemorrágica, exoftalmia y pudrición de la aleta y la cola, ocasionando una alta tasa de mortalidad (Austin y Austin 2016). La septicemia hemorrágica se caracteriza por la presencia de síntomas externos como pequeñas lesiones superficiales, hemorragias locales, particularmente en branquias y cloacas, úlceras, abscesos, distensión abdominal y síntomas internos como anemia, acumulación de líquido ascítico y daño a los órganos, en particular los riñones y el hígado (Harikrishnan y Balasundaram

2005). Esta enfermedad presenta un periodo de incubación que varía según la especie y la resistencia de los peces, las condiciones ambientales y la temporada. Es así que el período varía de 2 a 4 días en infecciones naturales y de 8 a 48 horas en modelos de infección experimental. Clínicamente, se pueden observar síntomas comunes como debilidad, estar cerca de la pared y el piso de la piscina, estancamiento y anorexia con mucosidad libre o heces en forma de intestino en el agua (Yardimci y Aydin 2011).

c) *Flavobacterium columnare*

Flavobacterium columnare, es el agente causante de columnariosis, es una bacteria gramnegativa que afecta a muchos peces de agua dulce comercialmente importantes en todo el mundo y puede resultar en una alta mortalidad (Xu, Shoemaker y LaFrentz 2014). Los primeros pasos de la patogénesis de esta bacteria es la colonización de la piel y branquias (Shoemaker y LaFrentz 2015), luego siguen signos clínicos como la corrosión de las aletas dorsal y caudal, y esta progresa a una infección externa en la que aparecen manchas grises o áreas amarillentas de erosión, generalmente rodeadas de una zona enrojecida hiperémica en la región craneal, superficie corporal y branquias. En estas localizaciones se produce una necrosis progresiva que afecta a la epidermis, la dermis y la musculatura. A menudo los músculos quedan al descubierto debido a que la piel se erosiona por completo. Resultando en la muerte del pez dentro de las 48 horas siguientes a la aparición de los signos (Austin y Austin 2016; Declercq et al. 2013). Es posible aislar *F. columnare* a partir de muestras de riñón e hígado (Sebastião et al. 2011).

F. columnare se considera una bacteria oportunista y forma parte de la microbiota habitual del ambiente (agua y suelo) y del hospedero (piel, intestino y branquias). Debido a esto, un aumento de temperatura del agua puede iniciar rápidamente una infección por columnaris, que puede transmitirse horizontalmente por contacto directo, heridas en la piel, así como por vía oro-fecal (Sebastião et al. 2011). Se ha documentado que condiciones como temperaturas mayores a 25 °C, niveles bajos de oxígenos, altas concentraciones de amoníaco o densidades elevadas potencian la patogenicidad y virulencia de esta bacteria, resultando en

tasas de mortalidad extremadamente altas del 60 al 90 % (Eissa, Zaki y Aziz 2010).

d) *Streptococcus agalactiae*

El género *Streptococcus* es una de las bacterias más importantes que afectan el cultivo de tilapia. Dentro de esta, la especie *S. agalactiae* es la más prevalente a nivel mundial (Ortega et al. 2016). Son descritos como cocos grampositivos de diámetro variable en pequeñas cadenas (Austin y Austin 2016). La infección causada por esta bacteria se denomina streptococcosis, y es prevalente en seres humanos, mamíferos, reptiles, anfibios y peces, especialmente tilapia (Zhang et al. 2018). Los signos clínicos más relevantes son nado errático, dificultad en la natación, letargia y disminución del apetito. Las lesiones macroscópicas más evidentes son exoftalmia con hemorragia intraocular y opacidad de la córnea, áreas rojizas y pardas en la región periorbital, lesiones en piel, aletas, branquias, líquido en cavidad visceral y esplenomegalia. También se evidencia agrandamiento del hígado, congestión del riñón y bazo, y líquido en la cavidad peritoneal (Austin y Austin 2016). La intensidad de las lesiones y signos clínicos en tilapia depende de factores relacionados con la cepa de *S. agalactiae*, dosis infectiva, cantidad de agua, temperatura, biomasa y del manejo de cultivo, llegando a alcanzar tasas de mortalidad de alrededor del 95 % (Preto-Giordano et al. 2010; Ye et al. 2011).

El primer reporte de *S. agalactiae* en *Oreochromis niloticus* se dio en el año 2016, en cultivos en el departamento de Piura (Ortega et al. 2016). En la actualidad, debido a su alto porcentaje de mortalidad en los cultivos de tilapia, este patógeno ha sido incluido en la lista de enfermedades del Plan de Vigilancia Oficial de Enfermedades del SANIPES.

e) *Lactococcus garvieae*

Lactococcus garvieae, es una bacteria grampositiva, anaerobia facultativa con forma de pequeñas cadenas de cocos (Austin y Austin 2016). Es un patógeno zoonótico emergente, conocido como responsable de lactococcosis en peces, cuyos brotes causan grandes pérdidas económicas (López-Campos et al. 2015). La lactococcosis se define como una infección hiperaguda sistémica con

hemorragia generalizada. Los primeros síntomas de infección incluyen anorexia, melanosis y natación errática. Otros signos externos incluyen exoftalmia unilateral o bilateral, abdomen hinchado y prolapso anal. Durante la necropsia se puede observar acumulación de líquido ascítico en la cavidad peritoneal, congestión de órganos internos, agrandamiento del bazo y el hígado, y exudado alrededor del cerebro (Meyburgh, Bragg y Boucher 2017; Vendrell et al. 2006). El periodo de incubación es muy corto y actúa con alta virulencia, causando mortalidades de más del 50 % (Vendrell et al. 2006) y suele ser más grave cuando la temperatura del agua es superior a 20 °C (Alcántara-Jauregui, Valladares-Carranza y Ortega 2022).

2.2. Descripción de las actividades desarrolladas.

El diagnóstico de enfermedades en tilapias sigue un proceso como se muestra en el diagrama de flujo (Fig.4), el periodo del proceso fue alrededor de un día, cuando los órganos para el diagnóstico llegaron preservados en alcohol u otro preservante de ácidos nucleicos, el proceso se extendió a dos días cuando los peces llegaron enteros, pasando primero por un paso de disección y toma de muestra en el laboratorio.

Luego, se llevó a cabo la extracción de ARN y una posterior conversión a ADNc, mediante transcripción reversa, para detección del virus de la tilapia de lago TiLV, debido a que su material genético es ARN. En el caso de detección de patógenos bacterianos, se procedió con la extracción de ADN, material genético que estos poseen.

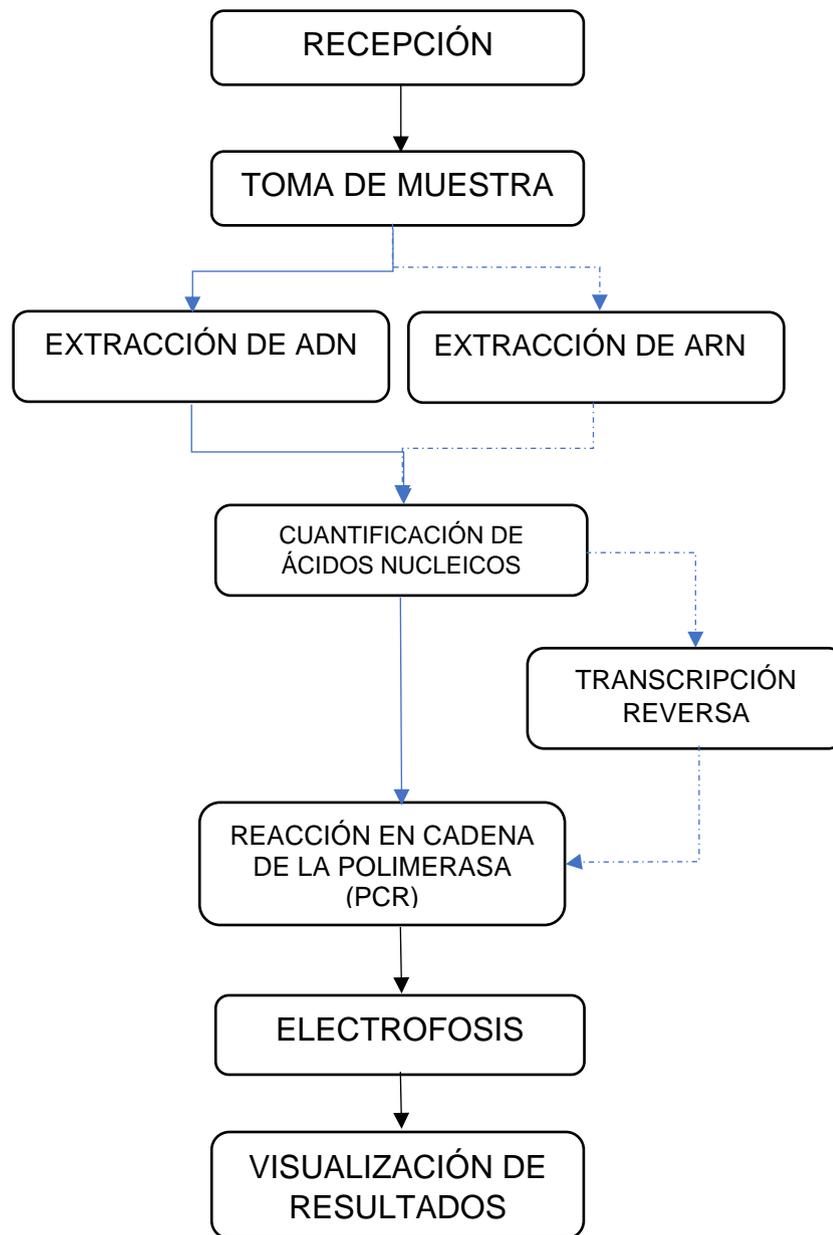


Figura 4. Diagrama de flujo de la detección de patógenos bacterianos y virus de la tilapia del lago TiLV en ejemplares de tilapia realizado en el laboratorio de PEZBIOTEC SAC. Nota: Las líneas negras representan procedimientos en común, las líneas celestes: proceso para detección patógenos bacterianos y las líneas punteadas: proceso para detección de patógenos virales. Elaboración propia.

2.2.1 Recepción y toma de muestra

En PEZBIOTEC recibimos las muestras de diferentes maneras, el cliente puede enviar al laboratorio los órganos de los individuos a analizar en recipientes con alcohol 96° o preservantes de ácidos nucleicos, también tiene la opción de enviar

los individuos enteros mediante congelación y/o vivos para ser diseccionados en el laboratorio (Fig. 5).

El proceso de disección y toma de muestra se realiza de acuerdo al protocolo de PEZBIOTEC (anexo 1), en un área desinfectada previamente con alcohol etílico 70°, los peces son colocados en bandejas desinfectadas o en papel aluminio, luego se empieza la disección con la ayuda de un kit de disección compuesto por bisturí, tijeras y pinzas. Los órganos extraídos varían según el patógeno a detectar (tabla 1), pero por lo general son cerebro, hígado, baso y riñón, que son órganos blandos sencillos de lisar. En el caso de *F. columnare* también es posible usar las branquias, pero al ser un tejido duro, dificulta el proceso de lisado en la extracción de ADN, lo cual es un inconveniente que aumenta el tiempo de trabajo.

Los órganos extraídos fueron colocados en tubos para centrífuga de 1,5 ml, para luego proceder con la extracción de ADN o ARN, para el diagnóstico de un patógeno bacteriano o viral, respectivamente.



Figura 5. Alevines de tilapia nilótica *Oreochromis niloticus* recibidos en el laboratorio antes de ser diseccionados. Elaboración propia.

Tabla 1. Órganos usados para detección de patógenos que afectan al cultivo de tilapia

Patógenos a detectar	Órganos extraídos
TiLV	Cerebro, hígado y bazo
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Hígado, bazo y riñón
<i>Flavobacterium columnare</i>	Riñón, bazo y lesiones
<i>Streptococcus agalactiae</i>	Hígado y bazo
<i>Lactococcus garvieae</i>	Hígado y bazo

Nota: Elaboración propia.

2.2.2 Extracción de ARN (para detección de patógenos virales)

Se pesó 100 mg de tejido de cada muestra en una balanza analítica, luego se quitó el exceso de etanol haciendo lavados con agua ultrapura (AUP) antes de iniciar el proceso de extracción de ARN. El proceso de extracción se realizó con el kit comercial RNA-XPress siguiendo las recomendaciones del fabricante descrito en el protocolo del anexo 2.

Pasos del protocolo de extracción del ARN:

a) Preparación de muestra

Se agregó 1 ml de RNA-XPress al tejido de cada muestra y se trituró manualmente con la ayuda de maceradores.

b) Separación de fases

Las muestras homogeneizadas se incubaron durante 5 min a temperatura ambiente (15 - 25 °C) para permitir la disociación completa de los complejos de nucleoproteína. Luego se añadió a cada muestra 200 µl de cloroformo por cada 1 ml de reactivo RNA-Xpress empleado. Las muestras fueron agitadas vigorosamente durante 15 s y luego se dejaron en reposo durante 10 min a temperatura ambiente (15 - 25 °C). Las mezclas resultantes se centrifugaron a 12 000 g (»13 000 rpm) durante 15 min a 4 °C. Después de la centrifugación, en los tubos de muestras, la mezcla se separó en una fase orgánica inferior de color

rojo intenso (contiene proteína), una interfase (contiene ADN) y una fase acuosa superior incolora que contiene ARN.

c) Precipitación de ARN

Las fases acuosas de cada muestra que contienen ARN fueron transferidas a tubos nuevos y se agregó 500 µl de alcohol isopropílico. Las muestras se dejaron en reposo durante 5 - 10 min a temperatura ambiente (15 - 25 °C) y luego fueron centrifugadas a 12 000 g (»13 000 rpm) durante 10 min a 4 °C. El ARN precipitado, a menudo invisible antes de la centrifugación, formó un gránulo similar a un gel en el costado y el fondo de los tubos.

d) Lavado de ARN

Se retiró el sobrenadante de cada muestra sin perturbar el sedimento y el sedimento de ARN fue lavado agregando 1 ml (mínimo) de etanol al 75 %. Se agitaron las muestras y luego fueron centrifugadas a 7 500 g (»10 500 rpm) durante 5 min a 4 °C.

e) Solubilización de ARN

En cada muestra, el sobrenadante fue eliminado sin perturbar el sedimento. Se dejó secar brevemente el sedimento de ARN durante 5 - 10 min al aire o al vacío. Finalmente, se agregó un volumen apropiado (50 µl) de agua libre de ARNasa a cada sedimento de ARN. Para facilitar la disolución, se mezcló pipeteando repetidamente con una micropipeta. Se dejaron incubar a 55 - 60 °C durante 10 - 15 min, las muestras quedaron listas para el proceso de transcripción inversa. Ver diagrama de flujo en el anexo 3.

f) Consideraciones importantes

El ARN, a diferencia del ADN, es más susceptible a un proceso de degradación, es por ello que para la extracción de ARN se recomienda el uso de mascarilla, gorro descartable para cubrir el cabello y el uso de doble par de guantes de nitrilo sin talco para evitar la degradación del ARN por enzimas ARNasas presentes en la superficie de las manos.

2.2.3 Transcripción reversa (RT, por sus siglas en inglés)

Una vez extraído el ARN, se realizó la transcripción reversa utilizando el kit comercial de *Thermo Scientific RevertAid RT Kit*. Se preparó el RT Mix I con agua ultrapura y cebadores aleatorios a una concentración de 10 μM , el cual fue agregado a cada una de las muestras, luego se incubaron durante 5 min a 65 °C seguido de 5 min en hielo. El RT Mix II se preparó usando Buffer de Reacción 1 X, RiboLock RNase Inhibitor 1 U, dNTP Mix 1 mM, RevertAid RT 10 U, el Mix II fue agregado a las muestras que ya contenían el RT Mix I, luego, mediante el empleo de un termociclador se efectuó una incubación de 60 min a 42 °C. Una vez terminado el proceso obtuvimos ADN complementario en cada una de las muestras. El protocolo completo se describe en el anexo 4.

2.2.4 Extracción de ADN (para detección de patógenos bacterianos)

Se pesó 100 mg de tejido diana de cada muestra y se procesó siguiendo el protocolo “*in house*” bromuro de dodeciltrimetilamonio/bromuro de hexadeciltrimetilamonio conocido como DTAB/CTAB, descrito en el anexo 5.

Pasos del protocolo de extracción del ADN:

a) Preparación de muestra

El exceso de etanol fue retirado haciendo lavados con agua ultrapura. Luego se agregó 600 μl de la solución DTAB, se agitaron las muestras en el vórtex por 20 segundos y fueron incubadas por 5 min a 75 °C.

b) Separación de fases

Las muestras se dejaron enfriar a temperatura ambiente por 2 min, luego se adicionó 700 μl de cloroformo y se volvieron a agitar en el vórtex por 20 s. Se centrifugaron las muestras a 12 000 g por 5 min. Se transfirió 250 μl de cada muestra a un nuevo microtubo para centrífuga de 1.5 ml y se agregó 100 μl de solución CTAB y 900 μl de agua destilada estéril. Las muestras se agitaron en el vórtex brevemente y fueron incubadas a 75 °C por 5 min. Las muestras se dejaron enfriar a temperatura ambiente y luego fueron centrifugadas nuevamente a 12 000 g por 10 min. Se eliminó el sobrenadante de cada muestra y se

suspendieron con 150 μ l de solución disolvente para ser incubadas a 75 °C por 5 min. Se dejaron enfriar a temperatura ambiente y luego se centrifugaron a 12 000 g por 5 min.

c) Precipitación del ADN

El sobrenadante de cada muestra fue transferido a un nuevo microtubo para centrifuga de 1.5 ml y se agregó 300 μ l de etanol absoluto, se agitaron en el vórtex por 20 s y luego fueron centrifugadas a 12 000 g por 5 min.

d) Lavado del ADN

El sobrenadante de cada muestra fue eliminado y se agregó 200 μ l de etanol 75 %, luego los microtubos fueron agitados manualmente con movimientos suaves de arriba hacia abajo durante 5 veces como mínimo, posteriormente fueron centrifugados a 7500 g por 5 min.

e) Solubilización del ADN

Se eliminó el sobrenadante de cada muestra cuidadosamente sin desprender el sedimento de ADN y luego se dejaron secar a temperatura ambiente colocando los microtubos de manera invertida sobre papel toalla por 15 min. Finalmente, se suspendieron los sedimentos de ADN con 50 μ l de agua ultrapura libre de nucleasas para ser utilizado en la PCR (Fig. 6). Ver diagrama de flujo en el anexo 6.



Figura 6. Proceso de extracción de ADN de órganos de tilapia en el área de extracción de ácidos nucleicos. Elaboración propia.

2.2.5 Cuantificación de ácidos nucleicos

Para determinar la cantidad de los ácidos nucleicos de las muestras obtenidas, se realizó la cuantificación por espectrometría de absorbancia a una longitud de onda de 260 nm (A260) mediante el equipo Implen NanoPhotometer® (Fig.7). El uso de este equipo nos permitió saber la concentración de los ácidos nucleicos en ng/μl como unidades de medida. Se espera obtener valores superiores a 100 ng/μl para considerar una buena extracción. A través de este método también se obtuvo una estimación de la pureza del ADN por medio de la relación de absorbancia (A260/A280 nm).

Consideramos que la pureza de una muestra de ADN es óptima cuando tiene un valor de ratio A260/A280 entre 1.8 - 2.0. La pureza es aceptable en valores mayores a 1.6, valores menores a esto es una posible contaminación por compuestos aromáticos como fenoles y proteínas. Un valor de ratio A260/A280 mayor a 2.1 podría deberse a la presencia de ARN en la muestra.

Con respecto a la pureza del ARN, se consideró óptima si la relación de absorbancias A260/280 se encuentra en un valor entre 2.0 – 2.2. Valores mayores a 1.7 es una pureza aceptable y menores a esto es un indicativo de contaminación por la presencia de compuestos aromáticos.



Figura 7. Cuantificación de ácidos nucleicos. Elaboración propia.

2.2.6 Reacción en cadena de la polimerasa PCR

Obtenidos el ADN y ADNc, se realizó la técnica de reacción en cadena de la polimerasa. Según el patógeno viral o bacteriano que se desea detectar se llevan a cabo las reacciones de PCR para las muestras requeridas, a continuación, se muestran reactivos y cantidades utilizadas para cada patógeno a diagnosticar (ver tablas: 2 al 12).

a) PCR de punto final para diagnóstico de TiLV

Tabla 2. Cebadores usados para el diagnóstico de TiLV

Cebadores	Secuencia 5' a 3'	Producto (pb)	Gen diana
ME 1	GTTGGGCACAAGGCATCCTA	415	Segmento 3
Nested ext 1	TATGCAGTACTTTCCCTGCC		
ME 1	GTTGGGCACAAGGCATCCTA	250	
ME 2	TATCACGTGCGTACTCGTTCAGT		

Nota: Cebadores: Secuencia corta de ADN de una sola cadena; pb: pares de bases nitrogenadas, medida usada para estimar la longitud de la secuencia obtenida; G: Guanina; T: Tiamina; C: Citocina; A: Adenina; Gen diana: Segmento del ADN donde se unirán los cebadores. Tomado de Dong et al. 2017.

Tabla 3. Reactivos y cantidades para reacción de PCR I TiLV

Reactivo	Concentración inicial	Volumen (µl)
AUP	-	18,3
Buffer taq	10X	2,5
dNTPs	10mM	1
ME 1	15µM	0,5
Nested ext 1	15µM	0,5
Taq polimerasa	5U	0,2
ADNc	-	2

Nota: Tomado de Dong et al. 2017.

Tabla 4. Reactivos y cantidades para reacción de PCR II TiLV

Reactivo	Concentración inicial	Volumen (µl)
AUP	-	19,3
Buffer taq	10X	2,5
dNTPs	10mM	1
ME 1	15µM	0,5
ME 2	15µM	0,5
Taq polimerasa	5U	0,2
Producto 1°PCR	-	1

Nota: Tomado de Dong et al. 2017.

La técnica realizada para la detección de TiLV fue una variante de la PCR convencional llamada Seminested PCR o PCR semi-anidada, donde se realizó una segunda PCR usando uno de los cebadores de la primera y se añadió uno nuevo (un total de tres cebadores), de esta manera la región amplificada se acorta y la detección de fragmentos es más específica (Palomares et al. 2007). El protocolo completo se encuentra en el anexo 7.

b) PCR de punto final para diagnóstico de *A. hydrophila*

Tabla 5. Cebadores usados el para el diagnóstico de *A. hydrophila*

Cebadores	Secuencia 5' a 3'	Producto (pb)	Gen diana
A-hyd F	AGTCTGCCGCCAGTGGC	144	gyrB
A-hyd R	CGCCCATCGCCTGTTCG		

Nota: Tomado de Persson et al. 2015.

Tabla 6. Reactivos y cantidades para reacción de PCR *A. hydrophila*

Reactivo	Concentración inicial	Volumen (µl)
AUP	-	17,8
Buffer taq	10X	2,5
dNTPs	10mM	0,5
Aero 1	15µM	1
Aero 2	15µM	1
Taq polimerasa	5U	0,2
DNA	-	2

Nota: Tomado de Persson et al. 2015.

El protocolo completo para la reacción de PCR dirigida a *A. Hydrophila* se encuentra en el anexo 8.

c) PCR de punto final para diagnóstico de *F. columnare*

Tabla 7. Cebadores usados para el diagnóstico de *F. columnare*

Cebadores	Secuencia 5' a 3'	Producto (pb)	Gen diana
Fla-F3	CGTTGTATACACATCCGAAGT	203	csiA.
Fla-B3	CCTGTACCTAATTGGGGAA		

Nota: Tomado de Suebsing et al. 2015.

Tabla 8. Reactivos y cantidades para reacción de PCR *F. columnare*

Reactivo	Concentración inicial	Volumen (µl)
AUP	-	17,8
Buffer taq	10X	2,5
dNTPs	10mM	0,5
161 F3	15µM	1
161 B3	15µM	1
Taq polimerasa	5U	0,2
DNA	-	2

Nota: Tomado de Suebsing et al. 2015.

El protocolo completo para la reacción de PCR dirigida a *F. columnare* se encuentra en el anexo 9.

d) PCR de punto final para diagnóstico de *S. agalactiae*

Tabla 9. Cebadores usados para el diagnóstico de *S. agalactiae*

Cebadores	Secuencia 5' a 3'	Producto (pb)	Gen diana
Sdi 61	AGGAAACCTGCCATTTGCG	192	Región Inter génica 16S- 23S ADNr
Sdi 252	CAATCTATTTCTAGATCGTGG		

Nota: Tomado de Berridge, Bercovier, Frelier 2001.

Tabla 10. Reactivos y cantidades para reacción de PCR *S. agalactiae*

Reactivo	Concentración inicial	Volumen (µl)
AUP	-	18,3
Buffer taq	10X	2,5
dNTPs	10mM	1
Sdi 61	15µM	0,5
Sdi 252	15µM	0,5
Taq polimerasa	5U	0,2
DNA	-	2

Nota: Tomado de Berridge, Bercovier, Frelier 2001.

El protocolo completo para la reacción de PCR dirigida a *S. agalactiae* se encuentra en el anexo 10.

e) PCR de punto final para diagnóstico de *L. garvieae*

Tabla 11. Cebadores usados para el diagnóstico de *L. garvieae*

Cebadores	Secuencia 5' a 3'	Producto (pb)	Gen diana
pLG 1	CATAACAATGAGAATCGC	1100	16S ADNr
pLG 2	GCACCCTCGCGGGTTG		

Nota: Tomado de Zlotkin et al. 1998.

Tabla 12. Reactivos y cantidades para reacción de PCR *L. garvieae*

Reactivo	Concentración inicial	Volumen (µl)
AUP	-	16,4
Buffer taq	10X	5
dNTPs	10mM	0,5
pLG 1	15µM	0,5
pLG 2	15µM	0,5
Taq polimerasa	5U	0,1
DNA	-	2

Nota: Tomado de Zlotkin et al. 1998.

El protocolo completo para la reacción de PCR dirigida a *L. garvieae* se encuentra en el anexo 11.

Las reacciones totales se realizaron en un solo tubo llamado MIX DE PCR, en el cual se realizó la adición de todos los reactivos y la mezcla respectiva, el mix se repartió a razón de 23 o 24 μ l en tubos de microcentrífuga de 0.2 ml (Fig. 8).



Figura 8. Repartición del mix de PCR en tubos de 0.2ml antes de adicionar la muestra de ADN o ADNc. Elaboración propia.

Finalmente, se adicionó el material genético, ADN u ADNc a razón de 2 μ l o 1 μ l según el patógeno a diagnosticar. Las muestras están listas para ser llevadas al termociclador (Fig. 9) donde se realizó la PCR siguiendo el programa correspondiente a cada patógeno (ver tablas: 13 al 18) como se muestra a continuación:



Figura 9. Colocación de las muestras en termociclador e inicio de la técnica de PCR. Elaboración propia.

Tabla 13. Programa TiLV (1era PCR)

Temperatura	Tiempo	Ciclos
95 °C	3 min	
95 °C	30 s	
60 °C	30 s	30
72 °C	1 min	
72 °C	5 min	

Nota: Tomado de Dong et al. 2017.

Tabla 14. Programa TiLV (2da PCR)

Temperatura	Tiempo	Ciclos
95 °C	3 min	
95 °C	30 s	
60 °C	30 s	30
72 °C	1 min	
72 °C	5 min	

Nota: Tomado de Dong et al. 2017.

Tabla 15. Programa *A. hydrophila*

Temperatura	Tiempo	Ciclos
95 °C	5 min	
95 °C	30 s	
65 °C	30 s	35
72 °C	1 min	
72 °C	5 min	

Nota: Tomado de Persson et al. 2015.

Tabla 16. Programa *F. columnare*

Temperatura	Tiempo	Ciclos
95 °C	3 min	
95 °C	30 s	
65 °C	30 s	35
72 °C	1 min	
72 °C	5 min	

Nota: Tomado de Suebsing et al. 2015.

Tabla 17. Programa *S. agalactiae*

Temperatura	Tiempo	Ciclos
95 °C	3 min	
95 °C	45 s	
56 °C	45 s	35
72 °C	1 min	
72 °C	5 min	

Nota: Tomado de Berridge, Bercovier, Freliey 2001.

Tabla 18. Programa *L. garvieae*

Temperatura	Tiempo	Ciclos
95 °C	3 min	
95 °C	50s	
55 °C	50s	35
72 °C	1 min 15 s	
72 °C	10 min	

Nota: Tomado de Zlotkin et al. 1998.

Además de las muestras a analizar, se colocó un control positivo (muestra positiva, previamente analizada), control de extracción y control negativo (reactivos sin DNA). Los productos amplificados para el diagnóstico de virus y bacterias se almacenaron a -20 °C, para sus posteriores evaluaciones.

2.2.7 Electroforesis

La técnica de electroforesis usó una fuente de poder y una cubeta de electroforesis llena del buffer Tris-Acetato-EDTA (TAE 1X), que permite mantener el pH de manera estable durante la transmisión de corriente eléctrica (Fig. 10). Los ácidos nucleicos poseen carga negativa debido a su esqueleto de fosfatos, durante la electroforesis, los ácidos nucleicos migrarán hacia el polo positivo; es decir, el ánodo.

La electroforesis separó a los productos de amplificados de las PCR en función de su tamaño y carga eléctrica. Los amplicones fueron mezclados con un *buffer* de carga compuesto por azul de bromofenol y glicerol que les proporcionó color y densidad. Luego las muestras fueron cargadas en pocillos de un gel de agarosa TAE 1X coloreado previamente con un tinte de visualización *Safe View*. Las

muestras fueron sometidas a corriente eléctrica de 90 voltios por 30 min. La preparación del gel de agarosa se describe en el anexo 12.



Figura 10. Fuente de poder y cubeta de electroforesis usado para la técnica de electroforesis. Elaboración propia.

2.2.8 Visualización de resultados

Una vez finalizada la técnica de electroforesis, el gel de agarosa (Fig. 11) fue colocado en un transiluminador de luz azul (Fig. 12), el tinte *Safe View* se adhiere a las cadenas de ácidos nucleicos y emite fluorescencia de color amarilla que permite visualizar la presencia o ausencia de los patógenos analizados. La presencia del patógeno se confirmó con la presencia de bandas de color amarillo.



Figura 11. Gel de electroforesis puesto en transiluminador de luz azul. Elaboración propia.

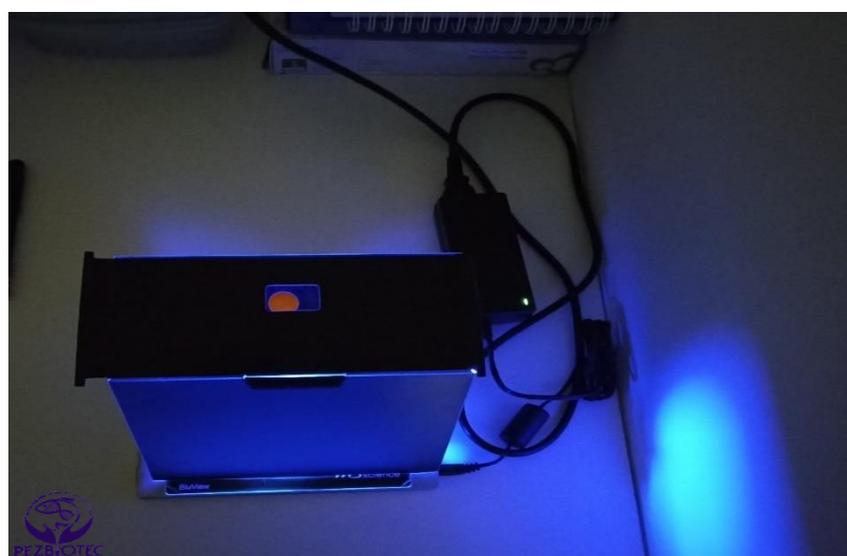


Figura 12. Transiluminador UV usado para la visualización de los resultados luego de la técnica de electroforesis. Elaboración propia.

III. APORTES REALIZADOS

3.1 Evidencias de las actividades realizadas en la empresa

Las actividades descritas en este informe se realizaron desde el año 2020, en el Departamento de patología y sanidad acuícola de la empresa PEZBIOTEC SAC, la función realizada en esta área fue el diagnóstico molecular de enfermedades virales y bacterianas en peces interés acuícola (Fig. 13). El trabajo realizado también comprendió la revisión bibliográfica de investigaciones relacionadas con el tema, como nuevas técnicas de diagnóstico y la revisión y estandarización de nuevos protocolos.



Figura 13. Foto tomada en las instalaciones de PEZBIOTEC, mostrando el ingreso al área de extracción de ácidos nucleicos. Usando la indumentaria adecuada que consta de gorro descartable, cubrebocas y guardapolvo, en la foto contigua usando el uniforme de la empresa luego de terminar el proceso de extracción. Elaboración propia.

Se realizó la toma de muestras de los peces enteros que llegan al laboratorio, de acuerdo a la fisiología interna de la especie, muestra de los diversos órganos como son: cerebro, hígado, bazo, riñón (Fig.14) fue recolectada para su posterior procesamiento. En algunas ocasiones, los clientes enviaron solo los órganos contenidos en un recipiente con líquido preservante como alcohol 96° u otro

preservante comercial, de ser así, estos casos la labor era revisar la integridad de los órganos y tomar una pequeña muestra de alrededor de 100 mg.



Figura 14. Muestras de hígado y bazo de tilapia antes de ser procesados. Elaboración propia.

La extracción de ácidos nucleicos de las diversas muestras a trabajar se realizó siguiendo los protocolos de la empresa, se puede usar protocolos de kit de extracción de ADN y ARN o protocolos adaptados de revisión bibliográfica. (Fig.15).

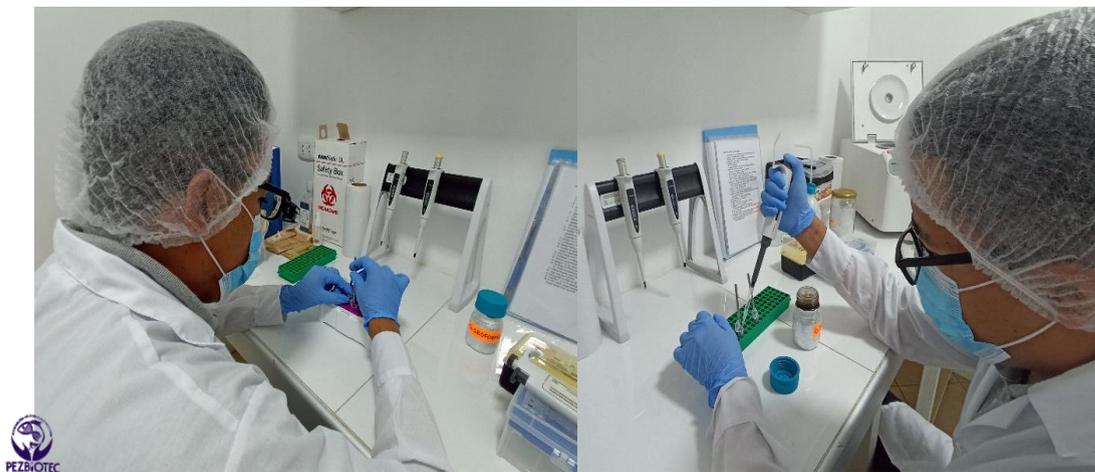


Figura 15. Proceso de extracción de ARN de órganos de tilapia en el área de extracción de ácidos nucleico. Elaboración propia.

Para la detección de patógenos presentes en los cultivos de tilapia se aplicó la técnica molecular PCR de punto final (enfermedades bacterianas) o PCR semi-

anidada (TiLV). Esta labor se realizó en el área de PCR, donde se encuentra los equipos necesarios, como son la cámara de seguridad, en la cual se adicionó las muestras de ADN o ADNc al mix de PCR y el termociclador donde ocurrió toda la reacción de PCR (Fig. 16).



Figura 16. Proceso de técnica PCR: a) Inoculación del ADN al mix de PCR; b) Colocación de las muestras en el termociclador, en el área de PCR de la empresa PEZBIOTEC SAC. Elaboración propia.

Basándonos en los resultados obtenidos de la visualización de los amplicones en un gel de electroforesis, se determinó la presencia o ausencia de los patógenos en las muestras analizadas (Fig. 17 y 18).

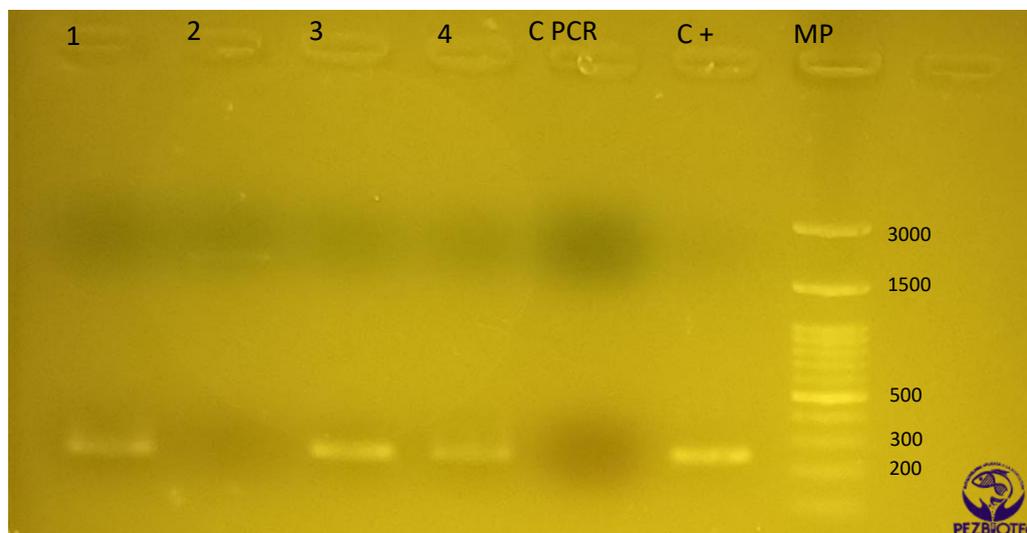


Figura 17. Visualización de resultados de PCR para detección de TiLV. 1,3 y 4: muestras positivas; C PCR: control de PCR; C+: control positivo y MP: marcador de peso. Elaboración propia.

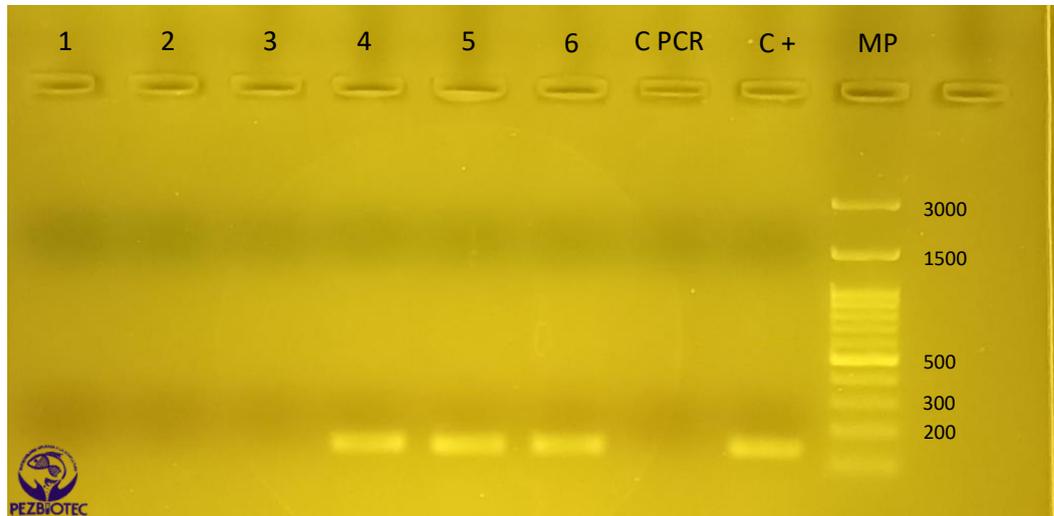


Figura 18. Visualización de resultados de PCR para detección de *Aeromonas hydrophila*. 4,5 y 6: muestras positivas; C PCR: control de PCR; C+: control positivo y MP: marcador de peso. Elaboración Propia.

Finalmente, se generó un reporte de los resultados obtenidos, esta labor consistió en llenar un formato interno de la empresa (Fig.18), en el cual se anotó todos los datos del cliente y datos de la muestra como código, especie (en este caso tilapia), peso (si la muestra llegó entera), estadio del pez, órganos utilizados y los resultados obtenidos. Este reporte fue entregado al jefe del área de **Departamento de patología y sanidad acuícola**, quien es la persona encargada de realizar el informe correspondiente para el cliente que solicitó el servicio.

LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR

Número de orden: -BM-2023 Fecha de ingreso: Fecha de proceso: Fecha de reporte:

Persona natural / Empresa: Dni / Ruc: Teléfono:

Responsable de toma de muestra: Fecha de muestreo: Fecha de envío:

Dirección / Ciudad / Región:

DATOS DE LA MUESTRA							RESULTADOS DE PCR			
N°	Unidad Productiva	Código de la Muestra	Especie	Peso (g) / talla (cm)	Estadio	Órganos*	N° indiv / pool			
1										
2										
3										
4										
5										
6										
7										
8										
9										
10										
11										
12										
13										

Observaciones:

*Órganos: Entero (En), Branquias (Br), Bazo (Bz), Riñón (Ri), Corazón (Cz), Cerebro (C), Piel (P), Hígado (Hg), Mucoso (Mu)

Figura 19. Formato interno usado para la anotación de los resultados de diagnósticos realizados

IV. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Eyngor et al. (2014) refiere que la patología de la enfermedad del virus de la tilapia lacustre (ETiLV) se ha observado en los ojos, cerebro e hígado, según el protocolo de la empresa, tomamos los mismos órganos antes mencionados para la detección de esta enfermedad, obteniendo resultados positivos

De acuerdo con Harikrishnan y Balasundaram (2005), *Aeromonas hydrophila* daña los órganos del hospedero, en particular los riñones e hígado, nuestro protocolo de diagnóstico molecular detectó en muestras de dichos órganos la presencia de *A. hydrophila*.

Fierro (2014) menciona que la electroforesis separa los fragmentos de ADN en función de su tamaño, visualizarlos mediante una sencilla tinción, y de esta forma determinar el contenido de ácidos nucleicos de una muestra, nosotros coincidimos con este enunciado, ya que, en el trabajo realizado en el laboratorio, la electroforesis nos permitió visualizar los fragmentos de ADN del genoma de los patógenos a detectar, confirmando así su presencia.

Según Austin (2019) y Cunningham (2002), los métodos moleculares de diagnóstico proporcionan alta sensibilidad y especificidad para el diagnóstico de enfermedades bacterianas y virales, confirmamos lo antes descrito porque utilizamos para el proceso de diagnóstico molecular, solamente 100 mg de los órganos de referencia de tilapia nilótica, lo que es considerado una cantidad muy pequeña de tejido.

Podemos concluir que el uso de técnicas de diagnóstico molecular como la PCR de punto final y PCR semi anidada nos permitió determinar la presencia o ausencia de patógenos bacterianos como *A. Hydrophila*, *F. columnare*, *S. agalactiae* y *L. garviae* y enfermedades virales como el virus de la tilapia del lago TiLV, en los cultivos de tilapia nilótica.

V. RECOMENDACIONES

Se recomienda implementar una variante de la reacción en cadena de la polimerasa, como es la PCR en tiempo real, la cual permitirá detectar la ausencia o presencia de los patógenos en menos tiempo y con una mayor sensibilidad que la técnica usada actualmente.

Emplear la tecnología de diagnóstico molecular de patógenos mediante PCR en otras especies de peces de importancia comercial.

Utilizar la tecnología de diagnóstico molecular de patógenos mediante PCR en especies de invertebrados tales como crustáceos y moluscos de importancia comercial.

Eliminar cualquier reactivo donde se detecte o sospeche que existe contaminación: cebadores, agua, polimerasa, etc. Para evitar pérdidas de los stocks de reactivos por contaminación, se recomienda preparar alícuotas, previo a su uso, para eliminar únicamente la alícuota en uso si se detecta contaminación.

VI. BIBLIOGRAFÍA

- ABDELSALAM, Mohamed, ELGENDY, Mamdouh Y., ELFADADNY, Medhat R., ALI, Sameh, SHERIF, Ahmed H. y KAMAL, Said. A review of molecular diagnoses of bacterial fish diseases. *Aquaculture International* [en línea]. 2023, Vol. 31, número 1, pp. 417–434 [consulta: 2 mayo 2023]. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1007/s10499-022-00983-8>
- ABOYADAK, Ibrahim M., ALI, Nadia G., GODA, Ashraf, ABOELGALAGEL, Walaa H. y SALAM, Asmaa. Molecular Detection of *Aeromonas hydrophila* as the Main Cause of Outbreak in Tilapia Farms in Egypt. *Journal of Aquaculture & Marine Biology* [en línea]. 2015, Vol. 2, número 6, pp. 237–240 [consulta 2 mayo 2023]. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.15406/jamb.2015.02.00045>.
- ADOR, Md. Ali Arman, HAQUE, Shamuël, PAUL, Sulav, CHAKMA, Sui, EHSAN Rakib y RAHMAN, Ashikur. Potential Application of PCR Based Molecular Methods in Fish Pathogen Identification: A Review. *Aquaculture Studies* [en línea]. 2021, Vol. 22, número 1 [consulta: 26 abril 2023]. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.4194/2618-6381/aquast621>
- ALCÁNTARA-JAUREGUI, Frida M., VALLADARES-CARRANZA, Benjamín y ORTEGA, S. César. Bacterial diseases and bacteria identified in farmed fish from Mexico. *Revista MVZ Cordoba* [en línea]. 2022, Vol. 27, número 2 [consulta: 2 mayo de 2023]. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.21897/rmvz.2387>
- ALTINOK, Ilhan y KURT, Ilknur. *Molecular Diagnosis of Fish Diseases: a Review* [en línea]. 2003, 3(2), 131-138 [consulta: 4 junio de 2023]. ISSN: 1303 – 2712. Disponible en: https://www.trjfas.org/uploads/pdf_220.pdf
- AUSTIN, Brian y AUSTIN, Dawn A. *Bacterial fish pathogens* [en línea]. 6ta edición. Reino Unido. Springer International Publishing, 2016 [consulta: 3 mayo 2023]. ISBN 9783319326733. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1007/978-3-319-32674-0>.

- AUSTIN, Brian. Methods for the diagnosis of bacterial fish diseases. *Marine Life Science & Technology* [en línea]. 2019, Vol. 1, número 1, pp. 41–49 [consulta: 2 mayo 2019]. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1007/s42995-019-00002-5>
- BALTAZAR, Paul M. y MENDOZA, David. El potencial de la tilapia en el Perú. En: BALTAZAR GUERRERO, PAUL MARTÍN et al. (eds.), *LIBRO DE RESÚMENES I CONGRESO INTERNACIONAL DE ACUICULTURA Y DESARROLLO RURAL 2017*, pp. 63–80. CAJAMARCA. julio 2017. Disponible en: https://www.cientifica.edu.pe/sites/default/files/2020-10/1_Libro%20Cinader%202018_Interiores.pdf
- BERRIDGE, B, BERCOVIER, H y FRELIER, P. Streptococcus agalactiae and Streptococcus difficile 16S–23S intergenic rDNA: genetic homogeneity and species-specific PCR. *Veterinary Microbiology* [en línea]. 2001, Vol. 78, número 2, pp. 165–173 [consulta: 25 abril 2023]. Disponible en: [http://dx.doi.org/10.1016/s0378-1135\(00\)00285-6](http://dx.doi.org/10.1016/s0378-1135(00)00285-6)
- BEVERIDGE, Malcolm y BAIRD, D.J., 2000. Diet, feeding and digestive physiology. En: BEVERIDGE, Malcolm C. M. y MCANDREW, Brendan J. (eds.), *Tilapias: Biology and Exploitation*, pp. 59–81. Dordrecht: Springer Netherlands, 2000. ISBN 978-0-7923-6391-0. Disponible en: doi: <http://dx.doi.org/10.1007/978-94-011-4008-9>
- CUNNINGHAM, Carey O. Molecular diagnosis of fish and shellfish diseases: present status and potential use in disease control. *Aquaculture* [en línea]. 2002, Vol. 206, número 1–2, pp. 19–55 [consulta: 2 de mayo 2023]. Disponible en: [http://dx.doi.org/10.1016/s0044-8486\(01\)00864-x](http://dx.doi.org/10.1016/s0044-8486(01)00864-x).
- DECLERCQ, Annelies Maria, HAESEBROUCK, Freddy, VAN DEN BROECK, Win, BOSSIER, Peter y DECOSTERE, Annemie. Columnaris disease in fish: a review with emphasis on bacterium-host interactions. *Veterinary Research* [en línea]. 2013, Vol. 44, número 1, p. 27 [consulta: 13 junio 2023]. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1186/1297-9716-44-27>

- DONG, H.T., SIRIBOOB, S., MEEMETTA, W., SANTIMANAWONG, W., GANGNONNGIW, W., PIRARAT, N., KHUNRAE, P., RATTANAROJPONG, T., VANICHVIRIYAKIT, R., y SENAPIN, S. Emergence of tilapia lake virus in Thailand and an alternative semi-nested RT-PCR for detection. *Aquaculture* [en línea]. 2017, Vol. 476, pp. 111–118 [consulta: 25 abril 2023]. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.04.019>
- EISSA, Alaa E., ZAKI, Manal M. y AZIZ, A. Abdel. Flavobacterium columnare / Myxobolus tilapiae Concurrent Infection in the Earthen Pond Reared Nile Tilapia (Oreochromis niloticus) during the Early Summer. *Interdisciplinary Bio Central* [en línea]. 2010, Vol. 2, número 2, pp. 5.1-5.9. DOI 10.4051/ibc.2010.2.2.0005.
- EL-SAYED, Abdel-Fattah M., 2020. Taxonomy and basic biology. En: *Tilapia Culture* [en línea]. Elsevier, 2020, pp. 297–328 [consultado el 7 de junio de 2023]. ISBN 9780128165096. Disponible en: <http://dx.doi.org/doi:10.1016/b978-0-12-816509-6.00013-6>
- ENCINA, Gonzalo. Biología molecular en oncología: lo que un clínico debiera saber. *Revista Médica Clínica Las Condes* [en línea]. 2013, Vol. 24, número 4, pp. 563–570 [consulta: 24 mayo 2023]. Disponible en: [http://dx.doi.org/10.1016/s0716-8640\(13\)70196-2](http://dx.doi.org/10.1016/s0716-8640(13)70196-2)
- ESPINOSA, Laura. Guía práctica sobre la técnica de PCR. En: EGUIARTE, Luis, SOUZA, Valeria y AGUIRRE, Xitlali (eds.), *Ecología molecular* [en línea]. Mexico D.F: Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto Nacional de Ecología, 2007, pp. 517-540 [consultado el 24 de febrero de 2023]. ISBN 978-968-817-839-3. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/258129643_Ecologia_Molecular

- EYNGOR, Marina, ZAMOSTIANO, Rachel, KEMBOU-TSOFAK Japhette E., BERKOWITZ, Asaf, BERCOVIER, Hillel, TINMAN, Simmon, LEV, Menachem, HURVITZ, Avshalom, GALEOTTI, Marco, BACHARACH, Eran y ELDAR, Avi. Identification of a Novel RNA Virus Lethal to Tilapia. *Journal of Clinical Microbiology* [en línea]. 2014, Vol. 52, número 12, pp. 4137–4146 [consulta: 13 mayo 2023]. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1128/jcm.00827-14>
- FAO. *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) [Cichlidae]. *Cultured aquatic species fact sheets* [en línea]. 2009. Recuperado a partir de: https://www.fao.org/fishery/docs/DOCUMENT/aquaculture/CulturedSpecies/file/en/en_niletilapia.htm [consultado 5 julio 2023].
- FARKAS, Daniel H. y Carol A. HOLLAND. Overview of molecular diagnostic techniques and instrumentation. En: *Cell and tissue based molecular pathology* [en línea]. Elsevier, 2009, pp. 19–32 [consultado el 26 de abril de 2023]. ISBN 9780443069017. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/b978-044306901-7.50008-0>
- FIERRO FIERRO, Francisco. *Electroforesis de ADN*. En: Amelia CORNEJO ROMERO et al., eds. *Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos*. México, D.F: Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, 2014, pp. 27–30. ISBN 978-607-8246-72-4.
- FONDEPES. Manual de cultivo de tilapia. [en línea]. 2004. Recuperado a partir de: https://www2.produce.gob.pe/RepositorioAPS/3/jer/ACUISUBMENU4/manual_tilapia.pdf [consultado 1 junio 2023].
- HARIKRISHNAN, R. y BALASUNDARAM, C. Modern Trends in *Aeromonas hydrophila* Disease Management with Fish. *Reviews in Fisheries Science* [en línea]. 2005, Vol. 13, número 4, pp. 281–320 [consulta: 2 mayo 2023]. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1080/10641260500320845>

- JALALI, Mehdi, Justyna ZABOROWSKA y Morteza JALALI. The polymerase chain reaction. En: *Basic science methods for clinical researchers* [en línea]. Elsevier, 2017, pp. 1–18 [consultado el 26 de abril de 2023]. ISBN 9780128030776. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-803077-6.00001-1>
- LEE, Pei Y., COSTUMBRADO, John, HSU, Chih-Yuan y KIM, Yong Hoon. Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. *Journal of Visualized Experiments* [en línea]. 2012, Número 62 [consulta: 2 mayo 2023]. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3791/3923>
- LÓPEZ-CAMPOS, Guillermo, AGUADO-URDA, Mónica, BLANCO, María M., GIBELLO, Alicia, CUTULI, María T., LÓPEZ-ALONSO, Victoria, MARTÍN-SÁNCHEZ y FERNÁNDEZ-GARAYZÁBAL, JOSÉ F. *Lactococcus garvieae*: a small bacteria and a big data world. *Health Information Science and Systems* [en línea]. 2015, Vol. 3, número S1 [consulta: 2 mayo 2023]. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1186/2047-2501-3-s1-s5>
- MADDOCKS, Sarah y Rowena JENKINS. Designing and ordering your polymerase chain reaction primers. En: *Understanding PCR* [en línea]. Elsevier, 2017, pp. 11–30 [consulta: 2 mayo 2023]. ISBN 9780128026830. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-802683-0.00002-2>
- MEYBURGH, C. M., BRAGG, R. R. y BOUCHER, C. E. *Lactococcus garvieae*: An emerging bacterial pathogen of fish. Inter-Research. *Diseases of Aquatic Organisms* [en línea]. 2017, Vol. 123, número 1. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3354/dao03083>

- ORTEGA, Yessica, BARREIRO, Frank, BUENO, Hamilton, HUANCARÉ, Karina, OSTOS, Henry, MANCHEGO, Alberto, PEREIRA, Mayra A., GÓMEZ, Wison, de ANDRADE, Marco A. y SANDOVAL, Nieves. First report of *Streptococcus agalactiae* isolated from *Oreochromis niloticus* in Piura, Peru: Molecular identification and histopathological lesions. *Aquaculture Reports* [en línea]. 2016, Vol. 4, pp. 74–79 [consulta: 2 mayo 2023]. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aqrep.2016.06.002>
- PALOMARES, José Carlos, CUENCA, Manuel, FERRER, Consuelo y COLOM, M^a Francisca. Diagnóstico micológico mediante técnicas de biología molecular. En: Javier PEMÁN, Estrella MARTÍN-MAZUELOS y M^a Carmen RUBIO CALVO, eds. *Guía práctica de identificación y diagnóstico en micología clínica* [en línea]. 2a ed. Bilbao: Revista Iberoamericana de Micología, 2007, pp. 20–9 [consultado el 24 de febrero de 2023]. ISBN 978-84-611-8776-8. Disponible en: <https://www.guia.reviberoammicol.com/Capitulo20.pdf>
- PERSSON, Søren, AL-SHUWELI, Suzan, YAPICI, Seval, JENSEN, Joan N. y OLSEN, Katharina E.P. Identification of Clinical *Aeromonas* Species by *rpoB* and *gyrB* Sequencing and Development of a Multiplex PCR Method for Detection of *Aeromonas hydrophila*, *A. caviae*, *A. veronii*, and *A. media*. *Journal of Clinical Microbiology* [en línea]. 2015, Vol. 53, número 2, pp. 653–656 [consulta: 26 abril 2023]. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1128/jcm.01963-14>
- PRETTO-GIORDANO, Lucienne G., MÜLLER, Ernst E., de FREITAS, Julio C. y GOMES da SILVA, Vanessa. Evaluation on the Pathogenesis of *Streptococcus agalactiae* in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Brazilian Archives of Biology and Technology* [en línea]. 2010, Vol. 53, número 1, pp. 87–92 [consulta: 2 mayo 2023]. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1590/s1516-89132010000100011>

- PRODUCE. *ANUARIO ESTADÍSTICO Pesquero y Acuícola 2021* [en línea]. Lima: Oficina General de Evaluación de Impacto y Estudios Económicos, 2022 [consulta: 8 junio 2023]. Disponible en: <https://ogeiee.produce.gob.pe/index.php/en/shortcode/oeedocumentos-publicaciones/publicaciones-anuales/item/1080-anuario-estadistico-pesquero-y-acuicola-2021>
- SANIPES. *Virus de la tilapia lacustre TiLV – guía informativa*. Lima. 2022 [consulta:1 de junio 2023]. Disponible en: <https://www.sanipes.gob.pe/tilapia/archivo/GUIA%20INFORMATIVA%20TILAPIA.pdf>
- SEBASTIÃO, F. A., NOMURA, D., SAKABE, R. y PILARSKI, F. Hematology and productive performance of nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) naturally infected with *Flavobacterium columnare*. *Brazilian Journal of Microbiology* [en línea]. 2011, Vol. 42, número 1, pp. 282–289 [consulta: 13 junio 2023]. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1590/s1517-83822011000100036>
- SHOEMAKER, Craig A. y LAFRENTZ, Benjamin R. Growth and survival of the fish pathogenic bacterium, *Flavobacterium columnare*, in tilapia mucus and porcine gastric mucin. *FEMS Microbiology Letters* [en línea]. 2015, Vol. 362, número 4 [consulta: 13 junio 2023]. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1093/femsle/fnu060>
- SUEBSING, Rungkarn, KAMPEERA, Jantana, SIRITHAMMAJAK, Sarawut, WITHYACHUMNARNKUL, Boonsirm, TURNER, Warren y KIATPATHOMCHAI, Wansika. Colorimetric Method of Loop-Mediated Isothermal Amplification with the Pre-Addition of Calcein for Detecting *Flavobacterium columnare* and its Assessment in Tilapia Farms. *Journal of Aquatic Animal Health* [en línea]. 2015, Vol. 27, número 1, pp. 38–44 [consulta: 26 abril 2023]. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1080/08997659.2014.966212>

- TAMAY DE DIOS, L., IBARRA, C. y VELASQUILLO, C. Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación en discapacidad* [en línea]. 2013, Vol. 2, número 2, pp. 70–78 [consulta: 2 febrero 2023]. ISSN 2007-6452. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/invdiss/ir-2013/ir132d.pdf>
- THORNBURG, Robert y GUGLIUCCI, Alejandro. Deoxyribonucleic Acid. En: BAYNES, John y DOMINICZAK, Marek (eds.), *Medical biochemistry: with STUDENT CONSULT*. 4a ed. United Kingdom: Elsevier - Health Sciences Division, 2014. ISBN 9781455745807.
- TREWAVAS, Ethelwynn. *Tilapiine fishes of the genera sarotherodon, oreochromis and danakilia* [en línea]. Londres: British Museum (Natural History), 1983. [consulta: 6 junio 2023]. ISBN 0565008781. Disponible en: <https://doi.org/10.5962/bhl.title.123198>
- VAJARGAH, Mohammad Forouhar. A review of the physiology and biology of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Journal of Aquaculture & Marine Biology* [en línea]. 2021, Vol. 10, número 5, pp. 244–246 [consulta: 7 mayo 2023]. Disponible en: <https://doi.org/10.15406/jamb.2021.10.00328>
- VEGA, Fernando, CORTES-LARA, María, ZÚÑIGA-MEDINA, Luz M., JAIME-CEBALLOS, Barbarito, GALINDO-LÓPEZ, José, BASTO-ROSALES, Mao E. R. y NOLASCO-SORIA, Héctor. Cultivo de tilapia (*Oreochromis niloticus*) a pequeña escala ¿alternativa alimentaria para familias rurales y periurbanas de México? *Revista electrónica de Veterinaria*, [en línea]. 2010, Vol. 11, número 3 [consulta: 7 junio 2023]. ISSN 1695-7504. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/259827156_Cultivo_de_tilapia_Oreochromis_niloticus_a_pequena_escal_a_alternativa_alimentaria_para_familias_rurales_y_periurbanas_de_Mexico

- VENDRELL, Daniel. BALCÁZAR, José L., RUIZ-ZARZUELA, Imanol, de BLAS, Ignacio, GIRONÉS, Olivia y MÚZQUIZ, José L. Lactococcus garvieae in fish: a review. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* [en línea]. 2006, Vol. 29, número 4, 177–198 [consulta: 2 mayo 2023]. ISSN 0147-9571. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cimid.2006.06.003>
- XU, De Hai, SHOEMAKER, Craig A. y LAFRENTZ, Benjamin R. Enhanced susceptibility of hybrid tilapia to *Flavobacterium columnare* after parasitism by *Ichthyophthirius multifiliis*. *Aquaculture* [en línea]. 2014, Vol. 430, pp. 44–49 [consulta: 13 junio 2023]. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.03.041>
- YARDIMCI, Banu y AYDIN, Yılmaz. Pathological findings of experimental *Aeromonas hydrophila* infection in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* [en línea]. 2011, Vol.58, número 1, pp. 47–54 [consulta: 13 junio 2023]. ISSN 1300-0861. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1501/vetfak_0000002448
- YE, Xing, LI, Jiong, LU, Maixin, DENG, Guocheng, JIANG, Xiaoyan, TIAN, Yuanyuan, QUAN, Yingchun y JIAN, Qian. Identification and molecular typing of *Streptococcus agalactiae* isolated from pond-cultured tilapia in China. *Fisheries Science* [en línea]. 2011, Vol. 77, número 4, pp. 623–632 [consulta: 2 mayo 2023]. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1007/s12562-011-0365-4>
- ZHANG, Ze, LAN, Jiangfeng, LI, Yuhui, HU, Minqiang, YU, Angen, ZHANG, Jie y WEI, Shun. The pathogenic and antimicrobial characteristics of an emerging *Streptococcus agalactiae* serotype IX in Tilapia. *Microbial Pathogenesis* [en línea]. 2018, Vol. 122, pp. 39–45 [consulta: 2 mayo 2023]. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.micpath.2018.05.053>

ZLOTKIN, Amir, ELDAR, Avi, GHITTINO, Claudio y BERCOVIER, Herve.
Identification of *Lactococcus garvieae* by PCR. *Journal of Clinical Microbiology* [en línea]. 1998, Vol. 36, número 4, pp. 983–985 [consulta: 25 abril 2023]. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1128/jcm.36.4.983-985.1998>

Título: PROCEDIMIENTO DE NECROPSIA EN PECES		Código:
		Elaborado por: Adrian Zatán
Edición N°01	Fecha: 01/10/20	Aprobado por:

ANEXOS

ANEXO 1

PROTOCOLO DE NECROPSIA EN PECES

1. ÁMBITO DE APLICACIÓN

La toma de muestra se realiza en la empresa PEZBIOTEC, los ejemplares e reciben enteros, congelados o frescos, para la detección de los patógenos requeridos por la empresa solicitante.

2. PREPARACIÓN DE REACTIVOS Y MATERIALES, FLUJO A SEGUIR

1. Preparación de tijera, fórceps, bandeja, papel para la disección.
2. Terminar el pescado con una sobredosis de aceite de clavo (≥ 100 ppm) o hielo.
3. Desinfectar la superficie del cuerpo del pescado con alcohol al 70 %.
4. Diseccionar el pescado.
5. Recolectar tejidos objetivo para diferentes propósitos (histología, análisis molecular, TEM o aislamiento de virus).

3. MATERIALES PARA NECROPSIA Y DISECCIÓN

- Pinzas anatómicas estériles
- Pinzas de diente de león estériles
- Tijeras punta aguda y roma estériles
- Mangos de bisturí estériles
- Hojas de bisturí desechables
- Alcohol 70 %
- Papel absorbente desechable
- Aspersores
- Bolsas para residuos
- Recipientes para residuos peligrosos (cajas de cartón o plásticos)
- Bandeja
- Papel Kraft

Título: PROCEDIMIENTO DE NECROPSIA EN PECES		Código:
		Elaborado por: Adrian Zatán
Edición N°01	Fecha: 01/10/20	Aprobado por:

4. EQUIPOS Y MATERIALES DEL PERSONAL MUESTREADOR

- Guantes de látex o nitrilo desechable
- Mascarilla desechable
- Batas estériles desechables
- Toca

5. PROCEDIMIENTO:

Para iniciar la necropsia se debe considerar que los peces deben ser aperturados por el lado izquierdo para la visualización del bazo.

1. Realizar un corte empleando la tijera punta aguda y roma (punta aguda hacia afuera para evitar perforar los órganos), desde el ano hasta el extremo inferior del opérculo, asimismo se debe apoyar con el uso de las pinzas estériles para ir separando la musculatura.
2. Realizar un corte paralelo al opérculo que une el corte anterior hasta el extremo superior del opérculo (Fig. 1)
3. Realizar un corte cráneo caudal que une el corte anterior hacia el ano.
4. Realizar el corte hacia el ano evitando la perforación de los órganos.
5. Realizados los cortes 1,2,3 y 4, la musculatura es extraída para exponer los órganos y sistema de la cavidad (Fig. 2).
6. Para exponer las branquias se deberá levantar el opérculo hacia la cabeza empleando pinzas estériles y realizar un corte a lo largo del margen preopercular paralelo al corte 2 comenzando en el margen ventral del preopérculo cerca a la base de los arcos branquiales

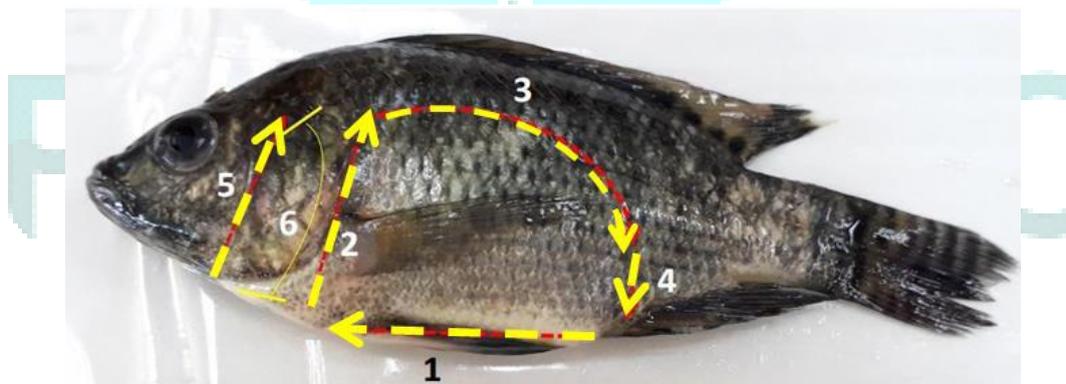


Fig. 1 Dirección de los cortes para realizar la necropsia en peces (Fuente: Sanipes 2020)

Título: PROCEDIMIENTO DE NECROPSIA EN PECES		Código:
		Elaborado por: Adrian Zatán
Edición N°01	Fecha: 01/10/20	Aprobado por:

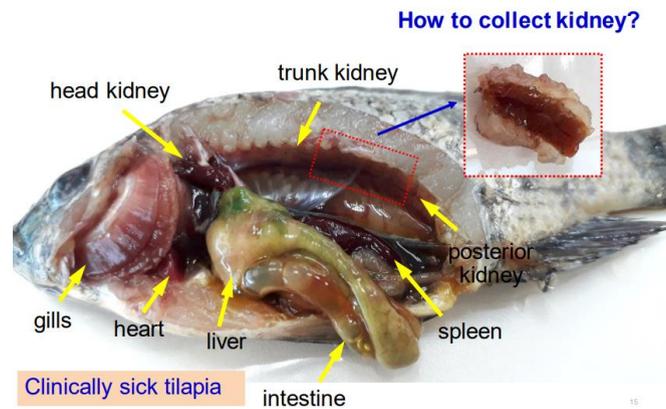


Fig. 2. Ubicación de los diversos órganos a muestrear. (Fuente: Dong 2018)

6. PROTOCOLO DE NECROPSIA DE CEREBRO

Proceder a realizar la necropsia de cerebro siguiendo los siguientes pasos:

1 y 2. Usar un mango estéril con una hoja bisturí para cortar la piel, el cartílago y el hueso (emplear tijera punta agua roma) que recubre el cerebro iniciando el corte justo en las fosas nasales. Tener cuidado de dañar el cerebro.

3 y 4. Con el mango estéril con hoja bisturí ir cortando los bordes del músculo que rodean al cerebro e ir levantando con ayuda de bisturí y pinzas estériles el músculo y cartílago para exponer el cerebro (Fig. 3).

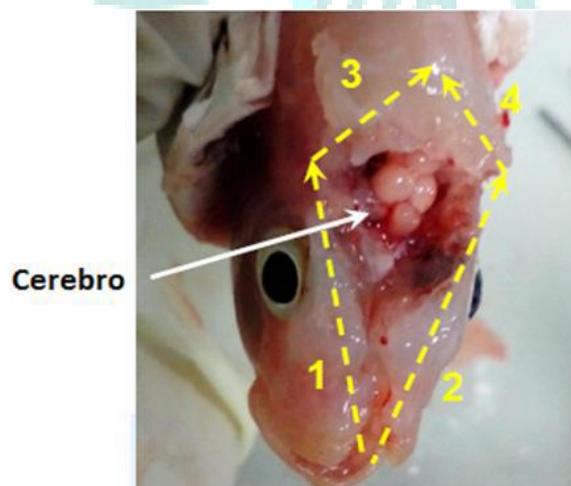


Fig. 3. Dirección de los cortes para colectar cerebro de peces (Fuente: Sanipes 2020)

7. REFERENCIAS

Dong H. 2018. *Fish necropsy & sample collection for TiLV en FAO/China Intensive Training Course on Tilapia Lake Virus (TiLV)*. FAO (Organización de las Naciones unidas para la Agricultura y la Alimentación) Fisheries and Aquaculture Department.

SANIPES. 2020. Procedimiento técnico sanitario para el muestreo y envío al laboratorio de recursos hidrobiológicos para el diagnóstico de enfermedades

Título: PROTOCOLO DE EXTRACCION DE ARN REACTIVO RNA-XPRESS		Código:
Edición N°01		Elaborado por: Arnaldo Castañeda
Fecha: 15/04/20	Aprobado por:	



ANEXO 2

PROTOCOLO EXTRACCIÓN DE ARN CON RNA-XPRESS

1. Preparación de la muestra

1a. Tejido

Homogeneice las muestras de tejido en el reactivo RNA-XPRESS (1 ml para 50-100 mg de tejido) en un homogeneizador con mano dentada S.P-2 ml (código de producto GW117) u otro homogeneizador adecuado.

1b. Células en monocapa

Lise las células directamente en la placa de cultivo. Utilice 1 ml de reactivo RNA-XPRESS por 10 cm² de superficie de placa de cultivo de vidrio. Después de agregar el reactivo, el lisado celular debe mezclarse completamente con una micropipeta para formar un lisado homogéneo.

NOTA: El reactivo RNA-XPRESS no es compatible con las placas de cultivo de plástico.

1c. Células en suspensión

Sembrar hasta 1×10^7 células mediante centrifugación a 4 °C durante 5 minutos a 300 x g (≈ 1500 rpm) en un tubo de recolección (no suministrado) y luego lisar en reactivo RNA-XPRESS mediante pipeteo repetido. 1 ml de reactivo es suficiente para lisar hasta 10×10^6 células animales, vegetales o de levadura o 10^7 células bacterianas.

NOTA:

A. Algunas levaduras y células bacterianas pueden requerir un homogeneizador.

B. Después de homogeneizar o lisar las células en el reactivo RNA-XPRESS, las muestras se pueden almacenar a -70 °C durante un máximo de 1 mes.

C. Si las muestras tienen un alto contenido de grasa, proteína, polisacáridos o material extracelular como músculo, tejido adiposo y partes tuberosas de las plantas, puede ser necesario un paso adicional. Después de la homogeneización, centrifugue el homogeneizado a 12 000 x g ($\approx 13\ 000$ rpm) durante 10 minutos a 4 °C para eliminar el material insoluble (membranas extracelulares, polisacáridos y ADN de alto peso

Título: PROTOCOLO DE EXTRACCION DE ARN REACTIVO RNA-XPRESS		Código:
Edición N°01		Elaborado por: Arnaldo Castañeda
Fecha: 15/04/20	Aprobado por:	

molecular). El sobrenadante contiene ARN y proteína. Si la muestra tenía un alto contenido de grasa, habrá una capa de material graso en la superficie de la fase acuosa que debe eliminarse. Transfiera el sobrenadante transparente a un tubo nuevo y continúe con el paso 2.

2. Separación de fases

Incube las muestras homogeneizadas durante 5 minutos a temperatura ambiente (15-25 °C) para permitir la disociación completa de los complejos de nucleoproteína. Añadir 200 µl de cloroformo por ml de reactivo RNA-Xpress utilizado. Cubra bien la muestra, agite vigorosamente durante 15 segundos y deje reposar durante 10 minutos a temperatura ambiente (15-25 °C). Centrifugar la mezcla resultante a 12 000 x g (»13 000 rpm) durante 15 minutos a 4 °C. Después de la centrifugación, la mezcla se separa en una fase orgánica inferior de color rojo intenso (que contiene proteína), una interfase (que contiene ADN) y una fase acuosa superior incolora que contiene ARN.

NOTA: El cloroformo utilizado para la separación de fases no debe contener alcohol isoamílico ni otros aditivos.

3. Precipitación de ARN

Transfiera la fase acuosa que contiene ARN a un tubo nuevo y agregue 500 µl de alcohol isopropílico. Deje reposar la muestra durante 5-10 minutos a temperatura ambiente (15-25 °C). Centrifugar a 12 000 x g (»13 000 rpm) durante 10 minutos a 4 °C. el ARN precipitado, a menudo invisible antes de la centrifugación, forma un gránulo similar a un gel en el costado y el fondo del tubo.

4. Lavado de ARN

Retire el sobrenadante sin perturbar el sedimento y lave el sedimento de ARN agregando 1 ml (mínimo) de etanol al 75 %. Vortexear la muestra y luego centrifugar a 7.500 x g (»10.500 rpm) durante 5 minutos a 4 °C.

Título: PROTOCOLO DE EXTRACCION DE ARN REACTIVO RNA-XPRESS		Código:
Edición N°01		Elaborado por: Arnaldo Castañeda
Fecha: 15/04/20	Aprobado por:	



NOTA:

- a. Si los gránulos de ARN flotan, realice el lavado en etanol al 75 % a 12 000 x g (13 000 rpm).
- b. Las muestras se pueden almacenar en etanol durante al menos 1 semana a 4 °C y hasta 1 año a -20 °C.

5. Redisolución del ARN

Desechar el sobrenadante sin perturbar el sedimento. Seque brevemente el sedimento de ARN durante 5-10 minutos al aire o al vacío.

NOTA: No deje que el sedimento de ARN se seque por completo, ya que esto disminuirá en gran medida su solubilidad. No seque el sedimento de ARN mediante centrifugación al vacío. Agregue un volumen apropiado (50 µl) de agua libre de ARNasa al sedimento de ARN. Para facilitar la disolución, mezcle pipeteando repetidamente con una micropipeta. Incubar a 55-60 °C durante 10-15 minutos.

Almacenamiento del eluido con ARN purificado: El eluido contiene ARN puro, se recomienda almacenarlo a una temperatura más baja (-80 °C). Evite congelar y descongelar repetidamente la muestra, lo que puede provocar la desnaturalización del ARN.

NOTA: En raras ocasiones, cuando se observan rastros de ADN, recomendamos digerir el ARN con ADNasa libre de ARNasa, si se desea.

Referencias

1. Chomczynski P., BioTechniques 15, 532-537(1993).
2. Chomczynski P. and Sacchi, N., Anal. Biochem., 162,156-159(1987)

ANEXO 3

DIAGRAMA DE FLUJO DE EXTRACCIÓN DE ARN (PARA DETECCIÓN DE PATÓGENOS VIRALES)

PREPARACIÓN DE MUESTRA

1 ml de RNA-Xpress + trituración

SEPARACIÓN DE FASES

Incubación (5 min)
200 μ l de cloroformo por ml
10 min t° amb. (15-25 °C)
Centrifugación 12000 g a 4 °C (5 min)

PRECIPITACIÓN DE ARN

5 min a t° amb. (15-25 °C)
Centrifugación 12000 g a 4 °C (10 min)

LAVADO DE ARN

1 ml etanol 75%
Centrifugación 7.500 g a 4 °C (5 min)

SOLUBILIZACIÓN DE ARN

Secar a t° amb. (5-10 min)
50 μ l de AUP
Incubación a 55 – 60 °C (10-15 min)

Título: PROTOCOLO DE RT		Código:
		Elaborado por: Arnaldo Castañeda
Edición N°01	Fecha: 10/04/20	Aprobado por:

ANEXO 4

PROTOCOLO DE RT

1. Someter a luz UV los materiales a usar (micropipetas, gradillas, microtubos, guantes, etc.) durante 15 minutos.
2. Colocar en la cabina de bioseguridad todos los reactivos necesarios para la preparación del mix de RT 1 y 2 (utilizar un rack de congelación).
3. Colocar todos los reactivos menos el RiboBLOck y ReverAid en otra gradilla a temperatura ambiente para su descongelación.

*Rotular dos tubos de 1,5 ml como Mix1 y Mix2 y colocar en un rack de congelación y rotular los microtubos de 0,2 ml de acuerdo con el número de muestras analizar (muestras más C+).

4. Vortexear y hacer spin down a cada reactivo.

Mix 1 RT

5. Preparar el mix 1 RT añadiendo a un microtubo de 1,5 ml los reactivos en orden de mayor a menor volumen.

Reactivo	Volumen (µl) x muestra
AUP	3
Primer genérico	1

6. Vortexear y hacer spin down.

Mix 2 RT

7. Preparar el mix 2 RT añadiendo a un microtubo de 1,5 ml los reactivos en orden de mayor a menor volumen:

Título: PROTOCOLO DE RT		Código:
		Elaborado por: Arnaldo Castañeda
Edición N°01	Fecha: 10/04/20	Aprobado por:

Reactivo	Volumen (µl) x muestra
5X Reaction Buffer	4
dNTPs 10mM	2
Riboblock RNase Inhibitor	1
ReverAid RT	1

1. Vortexear y hacer spin down.
2. Repartir 4 µl del mix 1 RT en los tubos de 0,2 ml.
3. Añadir 8 µl de las muestras de ARN a los tubos de 0.2 ml que contiene al mix 1 RT, se recomienda homogenizar el ARN antes de añadirlo.
4. Incubar a 70 °C por 5 minutos en el termociclador o equipo de baño seco.
5. Colocar rápidamente a -20 °C por 5 minutos.
6. Agregar 8 µl de mix 2 RT a los tubos de 0,2 ml y colocar las muestras en el termociclador a 42 °C por 60 minutos.
7. Una vez terminado el tiempo, las muestras de ADN complementario están listas para ser usadas en los protocolos respectivos o se pueden almacenar a -20 °C.

Título: PROTOCOLO DE EXTRACCION DE ADN MÉTODO DTAB/CTAB		Código:
Edición N°01		Elaborado por: Arnaldo Castañeda
Fecha: 10/04/20	Aprobado por:	

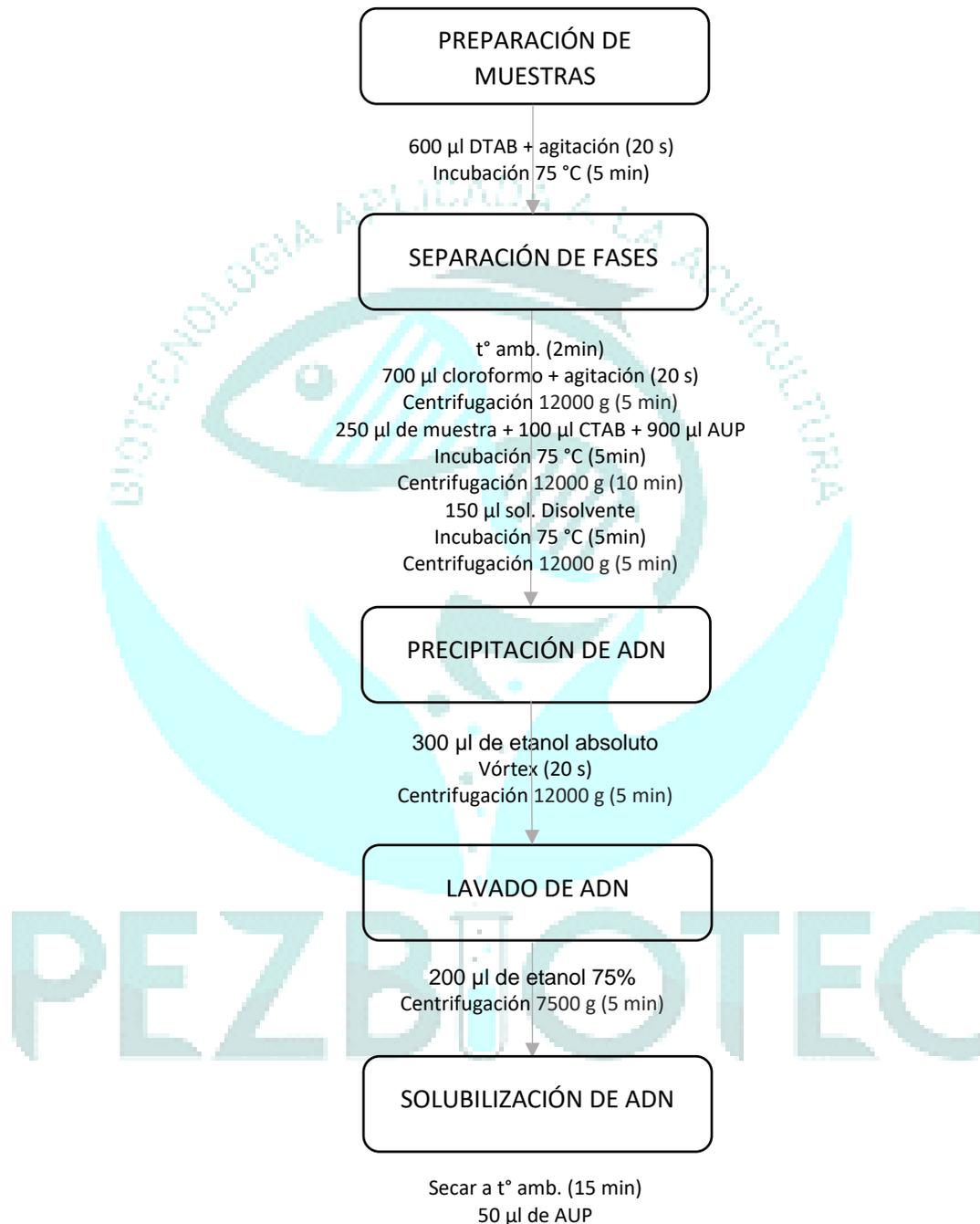
ANEXO 5

EXTRACCION DE ADN POR EL MÉTODO DTAB/CTAB

1. Micro centrifugar a 10 000 rpm por 2 minutos los tubos que contienen el medio de cultivo en caldo con la bacteria cultivada.
2. Eliminar el sobrenadante y resuspender el sedimento en 600 µl de la solución DTAB.
3. Agite la muestra en el vórtex por 20 segundos e incube por 5 minutos en baño maría a 75 °C.
4. Retire y deje enfriar a temperatura ambiente por 2 minutos, luego adicione 700 µl de cloroformo y vuelva a agitar en el vortex por 20 segundos.
5. Centrifugue la muestra a 12 000 g por 5 minutos.
6. Transfiera 250 µl a un nuevo microtubo para centrifuga de 1,5 ml que contenga 100 µl de solución CTAB y 900 µl de agua destilada estéril.
7. Agite en el vórtex brevemente e incube a 75 °C por 5 minutos.
8. Deje enfriar la muestra a temperatura ambiente y centrifugue nuevamente a 12 000 g por 10 minutos.
9. Elimine el sobrenadante y resuspenda el pellet con 150 µl de solución disolvente, incube a 75 °C por 5 minutos.
10. Deje enfriar a temperatura ambiente.
11. Vuelva a centrifugar a 12 000 g por 5 minutos.
12. Transfiera el sobrenadante a un microtubo para centrifuga de 1,5 ml que contenga 300 µl de etanol 95 %.
13. Agite en el vórtex por 20 segundos, centrifugue a 12 000 g por 5 minutos.
14. Elimine el sobrenadante, agregue 200 µl de etanol 75 % y agite el tubo con movimientos suaves arriba hacia abajo durante 5 veces como mínimo.
15. Centrifugar a 7 500 g por 5 minutos.
16. Elimine el sobrenadante cuidadosamente sin desprender el pellet de ADN.
17. Deje secar el pellet a temperatura ambiente, colocando el microtubo invertido sobre papel toalla por 15 minutos.
18. Resuspende el pellet de ADN con 50 µl de agua ultrapura libre de nucleasas
19. El ADN extraído puede procesarse de inmediato o conservarse a -20 °C, hasta su uso en la PCR.

ANEXO 6

DIAGRAMA DE FLUJO DE EXTRACCIÓN DE ADN (PARA DETECCIÓN DE PATÓGENOS BACTERIANOS)



Título: PROCEDIMIENTO DE NESTED RT-PCR PARA LA DETECCIÓN DE TiLV		Código:
Edición N°02		Elaborado por: jefe de Laboratorio
Fecha: 01/12/22	Aprobado por:	

ANEXO 7

PROTOCOLO NESTED RT-PCR TiLV

1. Propósito

El objetivo de este procedimiento es la detección del segmento 3 en el Virus de la Tilapia del Lago (TiLV) mediante Nested RT-PCR.

2. Alcance

El procedimiento es ejecutado por personal autorizado de PEZBIOTEC y se aplica a nivel de investigación y diagnóstico de enfermedades.

3. Referencias

3.1. **Dong H., Siriroob S., Meemetta W., Santimanawong W., Gangnonngiw W., Pirarat N., Khunrae P., Rattanarojpong T., Vanichviriyakit R. & Senapin S., 2017.** Emergence of Tilapia Lake Virus in Thailand and an alternative semi-nested RT-PCR for detection. *Aquaculture.*, 476, 111-118.

4. Responsabilidades

El jefe de laboratorio es responsable de la implementación y actualización de este procedimiento. También es responsable de supervisar su correcta ejecución, revisar los resultados, revisar y elaborar el informe final de los resultados y supervisar su envío por la vía solicitada.

El analista de laboratorio es el responsable de realizar las actividades de análisis descritas en este procedimiento.

5. Actividad

El método de PCR se realiza a partir de una muestra de cDNA de tejido de *Oreochromis niloticus* utilizando los iniciadores referenciados por Dong *et al.*, 2018, en termociclador convencional y se visualiza en un gel de agarosa al 2.5 % teñido con Safe View.

6. Preparación de la muestra

6.1. Las muestras se analizarán de manera individual o en pool de tres animales.

6.2. Seguir el protocolo de extracción de RNA (RNA-XPress).

6.3. Seguir el protocolo de tratamiento con DNase (RQ1 RNase-Free DNase – Promega).

6.4. Seguir el protocolo de elaboración de cDNA (RevertAid first strand cDNA synthesis – Thermo Scientific).

Título: PROCEDIMIENTO DE NESTED RT-PCR PARA LA DETECCIÓN DE TiLV		Código:
Edición N°02		Elaborado por: jefe de Laboratorio
Fecha: 01/12/22	Aprobado por:	

7. Condiciones de PCR

7.1. Iniciadores

Primer	Secuencia 5' a 3'	Producto (pb)	Gen diana
ME 1	GTTGGGCACAAGGCATCCTA	415	Segmento 3
Nested ext 1	TATGCAGTACTTTCCCTGCC		
ME 1	GTTGGGCACAAGGCATCCTA	250	
ME 2	TATCACGTGCGTACTCGTTCAGT		

7.2. Reactivos y cantidades

Reactivo	Concentración inicial	Volumen (µl)
AUP	-	18,3
Buffer taq	10X	2,5
dNTPs	10mM	1
ME 1	15µM	0,5
Nested ext 1	15µM	0,5
Taq polimerasa	5U	0,2
cDNA	-	2

Reactivo	Concentración inicial	Volumen (µl)
AUP	-	19.3
Buffer taq	10X	2,5
dNTPs	10mM	1
ME 1	15µM	0,5
ME 2	15µM	0,5
Taq polimerasa	5U	0,2
Producto 1° PCR	-	1

7.3. Programa (1era y 2da PCR)

Temperatura	Tiempo	Ciclos
95 °C	3 min	-
95 °C	30 s	30
60 °C	30 s	
72 °C	1 min	
72 °C	5 min	-

Título: PROCEDIMIENTO DE NESTED RT-PCR PARA LA DETECCIÓN DE TiLV		Código:
Edición N°02		Elaborado por: jefe de Laboratorio
Fecha: 01/12/22	Aprobado por:	

8. Cálculo de resultados

Una vez ejecutada la PCR las muestras mantenidas en hielo deben ser cargadas en un gel de agarosa TAE 1X al 2.0 % teñido con tinte de ácidos nucleicos Safe View. Las muestras deben ser corridas por 35 minutos a 90 voltios y posteriormente visualizadas en un transiluminador de luz azul. Los resultados deben corresponder a una banda de 250pb.

9. Control de calidad

9.1. Cada reacción será comparada con su respectivo control positivo (muestra conocida), control de extracción y control negativo (reactivos sin cDNA).

9.2. En caso de existir bandas en los controles negativos los reactivos deben ser revisados y las reacciones repetidas posteriormente.

10. Expresión de resultados

Expresar como positivo o negativo en caso de existir o no la presencia de una banda del peso molecular esperado.

11. Documentación

Informe de resultados.

Título: PROCEDIMIENTO DE PCR DE PUNTO FINAL PARA LA DETECCIÓN DE <i>Aeromonas hydrophila</i>		Código:
Edición N°02		Elaborado por: jefe de Laboratorio
Fecha: 01/12/22	Aprobado por:	

ANEXO 8

PROTOCOLO DE PCR de punto final para *Aeromonas hydrophila*

1. Propósito

El objetivo de este procedimiento es la detección del gen Subunidad B del ADN girasa (*gyrB*) en *Aeromonas hydrophila* mediante PCR de punto final.

2. Alcance

El procedimiento es ejecutado por personal autorizado de PEZBIOTEC y se aplica a nivel de investigación y diagnóstico de enfermedades.

3. Referencias

3.1. **Persson, S., Al-Shuweli, S., Yapici, S., Jensen, J. N. & Olsen, K. E. P. (2015).** Identification of clinical *Aeromonas* species by *rpoB* and sequencing and development of a multiplex PCR method for detection of *Aeromonas hydrophila*, *A. caviae*, *A. veronii*, and *A. media*. *Journal of Clinical Microbiology*. 53(2). 653–656.

4. Responsabilidades

El jefe de laboratorio es responsable de la implementación y actualización de este procedimiento. También es responsable de supervisar su correcta ejecución, revisar los resultados, revisar y elaborar el informe final de los resultados y supervisar su envío por la vía solicitada.

El analista de laboratorio es el responsable de realizar las actividades de análisis descritas en este procedimiento.

5. Actividad

El método de PCR se realiza a partir de una muestra de DNA de tejido/bacteria utilizando los iniciadores referenciados por Persson et al. 2015, en termociclador convencional y se visualiza en un gel de agarosa al 2.5 % teñido Safe View.

6. Preparación de la muestra

6.1. Las muestras se analizarán de manera individual o en pool de tres animales.

6.2. Seguir el protocolo de extracción de DNA.

6.3. Seguir el protocolo de tratamiento con RNase (RQ1 RNase-Free DNase – Promega).

7. Condiciones de PCR

7.1. Iniciadores

Primer	Secuencia 5' a 3'	Producto (pb)	Gen diana
A-hyd F	AGTCTGCCGCCAGTGGC	144	<i>gyrB</i>
A-hyd R	CGCCCATCGCCTGTTCG		

Título: PROCEDIMIENTO DE PCR DE PUNTO FINAL PARA LA DETECCIÓN DE <i>Aeromonas hydrophila</i>		Código:
Edición N°02		Elaborado por: jefe de Laboratorio
Fecha: 01/12/22	Aprobado por:	

7.2. Reactivos y cantidades (Kit de PCR)

Reactivo	Concentración inicial	Volumen (µl)
AUP	-	17,8
Buffer taq	10X	2,5
dNTPs	10mM	0,5
Aero 1	15µM	1
Aero 2	15µM	1
Taq polimerasa	5U	0,2
DNA	-	2

7.3. Programa

Temperatura	Tiempo	Ciclos
95 °C	5 min	-
95 °C	30 s	35
65 °C	30 s	
72 °C	1min	
72 °C	5 min	-

8. Cálculo de resultados

Una vez ejecutada la PCR las muestras mantenidas en hielo deben ser cargadas en un gel de agarosa TAE 1X al 2.5 % teñido con tinte de ácidos nucleicos Safe View. Las muestras deben ser corridas por 30 minutos a 90 voltios y posteriormente visualizadas en un transiluminador de luz azul. Los resultados deben corresponder a una banda de 144 pb.

9. Control de calidad

9.1. Cada reacción será comparada con su respectivo control positivo (muestra conocida), control de extracción y control negativo (reactivos sin DNA).

9.2. En caso de existir bandas en los controles negativos los reactivos deben ser revisados y las reacciones repetidas posteriormente.

10. Expresión de resultados

Expresar como positivo o negativo en caso de existir o no la presencia de una banda del peso molecular esperado.

11. Documentación

Informe de resultados.

Título: PROCEDIMIENTO DE PCR DE PUNTO FINAL PARA LA DETECCIÓN DE <i>Flavobacterium columnare</i>		Código:
Edición N°02	Fecha: 01/12/22	Elaborado por: jefe de Laboratorio
		Aprobado por:

ANEXO 9

PROTOCOLO DE PCR de punto final para *Flavobacterium columnare*

1. Propósito

El objetivo de este procedimiento es la detección del gen *csIA* en *Flavobacterium columnare* mediante PCR de punto final.

2. Alcance

El procedimiento es ejecutado por personal autorizado de PEZBIOTEC y se aplica a nivel de investigación y diagnóstico de enfermedades.

3. Referencias

3.1 **Suebsing, R., Kampeera, J., Sirithammajak, S., Withyachumnarnkul, B., Turner, W., & Kiatpathomchai, W. (2015).** Colorimetric method of loop-mediated isothermal amplification with the pre-addition of calcein for detecting *Flavobacterium columnare* and its assessment in tilapia farms. *Journal of aquatic animal health*, 27(1), 38-44.

4. Responsabilidades

El jefe de laboratorio es responsable de la implementación y actualización de este procedimiento. También es responsable de supervisar su correcta ejecución, revisar los resultados, revisar y elaborar el informe final de los resultados y supervisar su envío por la vía solicitada.

El analista de laboratorio es el responsable de realizar las actividades de análisis descritas en este procedimiento.

5. Actividad

El método de PCR se realiza a partir de una muestra de DNA de tejido/bacteria utilizando los iniciadores referenciados por Suebsing et al., 2015, en termociclador convencional y se visualiza en un gel de agarosa al 2.5 % teñido con Safe View.

6. Preparación de la muestra

- Las muestras se analizarán de manera individual o en pool de tres animales.
- Seguir el protocolo de extracción de DNA.
- Seguir el protocolo de tratamiento con RNase (RQ1 RNase-Free DNase – Promega).

7. Condiciones de PCR

- Iniciadores

Primer	Secuencia 5' a 3'	Producto (pb)	Gen diana
Fla-F3	CGTTGTATACACATCCGAAGT	203	<i>csIA</i>
Fla-B3	CCTGTACCTAATTGGGGAA		

Título: PROCEDIMIENTO DE PCR DE PUNTO FINAL PARA LA DETECCIÓN DE <i>Flavobacterium columnare</i>		Código:
Edición N°02		Elaborado por: jefe de Laboratorio
Fecha: 01/12/22	Aprobado por:	

b. Reactivos y cantidades (Kit de PCR)

Reactivo	Concentración inicial	Volumen (µl)
AUP	-	17,8
Buffer taq	10X	2,5
dNTPs	10mM	0,5
161 F3	15µM	1
161 B3	15µM	1
Taq polimerasa	5U	0,2
DNA	-	2

c. Programa

Temperatura	Tiempo	Ciclos
95 °C	3 min	-
95 °C	30 s	35
65 °C	30 s	
72 °C	1 min	
72 °C	5 min	-

8. Cálculo de resultados

Una vez ejecutada la PCR las muestras mantenidas en hielo deben ser cargadas en un gel de agarosa TAE 1X al 2.5 % teñido con tinte de ácidos nucleicos Safe View. Las muestras deben ser corridas por 30 minutos a 90 voltios y posteriormente visualizadas en un transiluminador de luz azul. Los resultados deben corresponder a una banda de 203 pb.

9. Control de calidad

- Cada reacción será comparada con su respectivo control positivo (muestra conocida), control de extracción y control negativo (reactivos sin DNA).
- En caso de existir bandas en los controles negativos los reactivos deben ser revisados y las reacciones repetidas posteriormente.

10. Expresión de resultados

Expresar como positivo o negativo en caso de existir o no la presencia de una banda del peso molecular esperado.

11. Documentación

Informe de resultados.

Título: PROCEDIMIENTO DE PCR DE PUNTO FINAL PARA LA DETECCIÓN DE <i>Streptococcus agalactiae</i>		Código:
Edición N°02		Elaborado por: jefe de Laboratorio
Fecha: 01/12/22	Aprobado por:	

ANEXO 10

PROTOCOLO DE PCR de punto final para *Streptococcus agalactiae*

1. Propósito

El objetivo de este procedimiento es la detección de la región inter génica 16S-23S ADNr en *Streptococcus agalactiae* mediante PCR de punto final.

2. Alcance

El procedimiento es ejecutado por personal autorizado de PEZBIOTEC y se aplica a nivel de investigación y diagnóstico de enfermedades.

3. Referencias

- a. **Berridge B., Bercovier H. & Frelie P. 2001.** *Streptococcus agalactiae* and *Streptococcus difficile* 16S-23S intergenic rDNA: genetic homogeneity and species-specific PCR. *Vet. Microbiol.* 78, 165-173.
- b.

4. Responsabilidades

El jefe de laboratorio es responsable de la implementación y actualización de este procedimiento. También es responsable de supervisar su correcta ejecución, revisar los resultados, revisar y elaborar el informe final de los resultados y supervisar su envío por la vía solicitada.

El analista de laboratorio es el responsable de realizar las actividades de análisis descritas en este procedimiento.

5. Actividad

El método de PCR se realiza a partir de una muestra de DNA de tejido/bacteria utilizando los iniciadores referenciados por Berridge *et al.*, 2001, en termociclador convencional y se visualiza en un gel de agarosa al 2.5 % teñido con Safe View.

6. Preparación de la muestra

- a. Las muestras se analizarán de manera individual o en pool de tres animales.
- b. Seguir el protocolo de extracción de DNA.
- c. Seguir el protocolo de tratamiento con RNase (RQ1 RNase-Free DNase – Promega).

Título: PROCEDIMIENTO DE PCR DE PUNTO FINAL PARA LA DETECCIÓN DE <i>Streptococcus agalactiae</i>		Código:
Edición N°02		Elaborado por: jefe de Laboratorio
Fecha: 01/12/22	Aprobado por:	

7. Condiciones de PCR

a. Iniciadores

Primer	Secuencia 5' a 3'	Producto (pb)	Gen diana
Sdi 61	AGGAAACCTGCCATTTGCG	192	Región intergénica 16S-23S ADNr
Sdi 252	CAATCTATTTCTAGATCGTGG		

b. Reactivos y cantidades (Kit de PCR)

Reactivo	Concentración inicial	Volumen (µl)
AUP	-	18,3
Buffer taq	10X	2,5
dNTPs	10mM	1
Sdi 61	15µM	0,5
Sdi 252	15µM	0,5
Taq polimerasa	5U	0,2
DNA	-	2

c. Programa

Temperatura	Tiempo	Ciclos
95 °C	3 min	-
95 °C	45 s	35
56 °C	45 s	
72 °C	1 min	
72 °C	5 min	-

8. Cálculo de resultados

Una vez ejecutada la PCR las muestras mantenidas en hielo deben ser cargadas en un gel de agarosa TAE 1X al 2.5 % teñido con tinte de ácidos nucleicos Safe View. Las muestras deben ser corridas por 35 minutos a 90 voltios y posteriormente visualizadas en un transiluminador de luz azul. Los resultados deben corresponder a una banda de 192 pb.

9. Control de calidad

- Cada reacción será comparada con su respectivo control positivo (muestra conocida), control de extracción y control negativo (reactivos sin DNA).
- En caso de existir bandas en los controles negativos los reactivos deben ser revisados y las reacciones repetidas posteriormente.

Título: PROCEDIMIENTO DE PCR DE PUNTO FINAL PARA LA DETECCIÓN DE <i>Streptococcus agalactiae</i>		Código:
		Elaborado por: jefe de Laboratorio
Edición N°02	Fecha: 01/12/22	Aprobado por:

10. Expresión de resultados

Expresar como positivo o negativo en caso de existir o no la presencia de una banda del peso molecular esperado.

11. Documentación

Informe de resultados.



Título: PROCEDIMIENTO DE PCR DE PUNTO FINAL PARA LA DETECCIÓN DE <i>Lactococcus garvieae</i>		Código:
Edición N°02		Elaborado por: Adrian Zatán
Fecha: 01/05/20	Aprobado por:	

ANEXO 11

PROTOCOLO DE PCR de punto final para *Lactococcus garvieae*

1. Propósito

El objetivo de este procedimiento es la detección del gen 16s ADNr en *Lactococcus garvieae* mediante PCR de punto final.

2. Alcance

El procedimiento es ejecutado por personal autorizado de PEZBIOTEC y se aplica a nivel de investigación y diagnóstico de enfermedades.

3. Referencias

- a. Zlotkin, A., Eldar, A., Ghittino, C., & Bercovier, H. 1998. Identification of *Lactococcus garvieae* by PCR. *Journal of clinical microbiology*, 36(4), 983-985.

4. Responsabilidades

El jefe de laboratorio es responsable de la implementación y actualización de este procedimiento. También es responsable de supervisar su correcta ejecución, revisar los resultados, revisar y elaborar el informe final de los resultados y supervisar su envío por la vía solicitada.

El analista de laboratorio es el responsable de realizar las actividades de análisis descritas en este procedimiento.

5. Actividad

El método de PCR se realiza a partir de una muestra de DNA de tejido/bacteria utilizando los iniciadores referenciados por Zlotkin et al., 1989, en termociclador convencional y se visualiza en un gel de agarosa al 1 % teñido con Safe View.

6. Preparación de la muestra

- a. Las muestras se analizarán de manera individual o en pool de tres animales.
- b. Seguir el protocolo de extracción de DNA.
- c. Seguir el protocolo de tratamiento con RNase (RQ1 RNase-Free DNase – Promega).

7. Condiciones de PCR

- a. Iniciadores

Primer	Secuencia 5' a 3'	Producto (pb)	Gen diana
pLG 1	CATAACAATGAGAATCGC	1100	16s ADNr
pLG 2	GCACCCTCGCGGGTTG		

Título: PROCEDIMIENTO DE PCR DE PUNTO FINAL PARA LA DETECCIÓN DE <i>Lactococcus garvieae</i>		Código:
Edición N°02		Elaborado por: Adrian Zatán
Fecha: 01/05/20	Aprobado por:	

b. Reactivos y cantidades (Kit de PCR)

Reactivo	Concentración inicial	Volumen (µl)
AUP	-	16,4
Buffer taq	10X	5
dNTPs	10mM	0,5
Sdi 61	15µM	0,5
Sdi 252	15µM	0,5
Taq polimerasa	5U	0,1
DNA	-	2

c. Programa

Temperatura	Tiempo	Ciclos
95 °C	3 min	-
95 °C	50 s	35
55 °C	50 s	
72 °C	1 min 15 s	
72 °C	10 min	-

8. Cálculo de resultados

Una vez ejecutada la PCR las muestras mantenidas en hielo deben ser cargadas en un gel de agarosa TAE 1X al 1 % teñido con tinte de ácidos nucleicos Safe View. Las muestras deben ser corridas por 30 minutos a 90 voltios y posteriormente visualizadas en un transiluminador de luz azul. Los resultados deben corresponder a una banda de 1100 pb.

9. Control de calidad

- Cada reacción será comparada con su respectivo control positivo (muestra conocida), control de extracción y control negativo (reactivos sin DNA).
- En caso de existir bandas en los controles negativos los reactivos deben ser revisados y las reacciones repetidas posteriormente.

10. Expresión de resultados

Expresar como positivo o negativo en caso de existir o no la presencia de una banda del peso molecular esperado.

11. Documentación

Informe de resultados.

Título: PROCEDIMIENTO DE PREPARACIÓN DE GEL DE AGAROSA		Código:
Edición N°02		Elaborado por: Adrian Zatán
Fecha: 01/05/20	Aprobado por:	

ANEXO 12

PREPARACIÓN DEL GEL DE AGAROSA

1. Pesar la masa adecuada de agarosa y colocar en un matraz Erlenmeyer.
2. Agregue el tampón de ejecución (TAE 1X) al matraz que contiene agarosa. Agitar para mezclar.
3. Derrita la mezcla de agarosa/tampón en un microondas o mechero bunsen. A intervalos de 30 segundos, retire el matraz y agite el contenido para mezclarlo bien. Repita hasta que la agarosa se haya disuelto por completo.
4. Dejar enfriar la agarosa a temperaturas menores a 65 °C, luego agregar el tinte de ácidos nucleicos Safe View a una concentración de 1 µl/20ml de tampón.
5. Mezclar y verte al molde del gel de electroforesis y colocar la peineta que creara los pocillos.
6. Permita que la agarosa se asiente a temperatura ambiente. Retire el peine y coloque el gel en la bandeja de electroforesis para empezar.

REFERENCIA:

Lee, P.Y., Costumbrado, J., Hsu, C.Y., Kim, Y.H. Agarose Gel Electrophoresis for the Separation of DNA Fragments. J. Vis. Exp. (62), e3923, doi:10.3791/3923 (2012)