Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada

DETERMINACIÓN DE LA PATOGENICIDAD DE *Vibrio harveyi* EN *Litopenaeus vannamei* E IDENTIFICACIÓN DE PRODUCTOS EXTRACELULARES

TESIS
MAESTRIA EN CIENCIAS

DIANA ELOISA ARCE-MACHADO

ENSENADA BAJA CALIFORNIA DICIEMBRE DE 2002

TESIS DEFENDIDA POR

Diana Eloisa Arce-Machado

Y APROBADA POR EL SIGUIENTE COMITÉ

Dr. Jorge Olmos Soto

Director del Comité

Dr. Fernando Díaz Herrera

Miembro del Comité

Dra. Elizabeth Ponce Rivas

Miembro del Comité

Dr. Jorge De La Rosa Velez

Miembro del Comité

Dr. Benjamin Barón Sevilla

Jefe del Departamento de Acuicultura y Biotecnología Marina

Dr. Luis Alberto Delgado Argote

Director de Estudios de Posgrado

CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y DE EDUCACIÓN SUPERIOR DE ENSENADA

CICESE

DIVISIÓN DE OCEANOLOGÍA

DEPARTAMENTO DE ACUICULTURA, BIOTECNOLOGÍA MARINA

DETERMINACIÓN DE LA PATOGENICIDAD DE *Vibrio harveyi* EN *Litopenaeus vannamei* E IDENTIFICACIÓN DE PRODUCTOS EXTRACELULARES

TESIS

que para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de MAESTRO EN CIENCIAS

Presenta:

DIANA ELOISA ARCE-MACHADO

Ensenada, Baja California a Diciembre del 2002.

RESUMEN de la tesis de **Diana Eloisa Arce-Machado**, presentada como requisito parcial para la obtención del grado de MAESTRO EN CIENCIAS con orientación en BIOTECNOLOGÍA MARINA. Ensenada, Baja California. Diciembre del 2002.

DETERMINACIÓN DE LA PATOGENICIDAD DE *Vibrio harveyi* EN *Litopenaeus vannamei* E IDENTIFICACIÓN DE PRODUCTOS EXTRACELULARES

Resumen aprobado por:

Dr. Jorge Olmos Soto
Director de Tesis

Las enfermedades que afectan camarones de cultivo son causadas principalmente por microorganismos del género *Vibrio*, provocando mortalidades hasta del 100%. Dentro de los agentes causales principales, se encuentra *Vibrio harveyi*.

Tomando en consideración que son pocos los estudios enfocados a determinar la patogenicidad de esta bacteria, surge el interés de identificar los sistemas de virulencia que presenta esta especie, con lo que podría ser posible el desarrollo de estrategias biotecnológicas para prevenir o erradicar dichos problemas.

Mediante esta investigación se determinó el nivel de virulencia de las cepas en estudio y la naturaleza extracelular del factor responsable de patogenicidad en ensayos con camarón blanco. Las especies fueron identificadas como miembros del género *Vibrio* por medio de estrategias moleculares (PCR y RFLP). Adicionalmente se evaluó la actividad enzimática de la cepa Z3, donde se observó que la actividad de proteasas, amilasas y lipasas no es significativa. Sin embargo, la actividad hemolítica fue mayor a 28°C para la cepa patógena. Posteriormente se identificó que la cepa patógena codifica para un gen de hemolisina con tamaño diferente al codificado por la cepa no patógena.

Palabras clave: patogenicidad, *Vibrio harveyi*, camarón, herramientas moleculares.

ABSTRACT of the thesis presented by **Diana Eloisa Arce-Machado** as a partial requirement to obtain the MASTER OF SCIENCE degree in MARINE BIOTECHNOLOGY. Ensenada, Baja California, México. Diciembre 2002.

PATHOGENICITY DETERMINATION FROM *Vibrio harveyi* FOR *Litopenaeus vannamei* AND IDENTIFICATION OF EXTRACELLULAR PRODUCTS

Microorganisms of the genera *Vibrio* affect shrimp cultures causing considerable losses, been *Vibrio harveyi* one of the principal agents. Considering the pathogenicity of this bacterium, it is important to know more about the virulence systems that display this microorganism. Thus, the main goal of this work was to try to understand the pathogenicity of *V. harveyi* strains and to identify extracellular products as possible agents of virulence. To evalute pathogenicity among the strains and the nature of the virulence factors, *in vivo* assays where performed with white shrimp (*Litopenaeus vanammei*). Molecular identification was performed using PCR and RFLP. Proteases, amylases, lipases and hemolysins activities showed that hemolysin could be the responsible of pathogenicity. Hemolytic activity was found at 28°C only in the virulent strain. PCR products showed a small amplification of the hemolysin gene for the virulent strain, indicating that the strain codify for a different kind of protein.

Keywords: *Vibrio harveyi*, pathogenicity, shrimp, molecular strategies.

DEDICATORIAS

A MIS PRIMERAS MASCOTAS .....

..... LOS CAMARONES

AGRADECIMIENTOS

A CONACYT, POR HABER FINANCIADO ESTE TRABAJO, CON EL PROYECTO No.34035-V

..... Y A TODO AQUEL, QUE DIRECTA O INDIRECTAMENTE CONTRIBUYÓ CON ESTA INVESTIGACIÓN .....

CONTENIDO

	Página
I. INTRODUCCIÓN	**1**
II. ANTECEDENTES	**3**
II.1 Vibrio harveyi	5
II.1.1. Hábitat y poder patógeno	6
II.1.2. Patogenicidad (enzimas o toxinas)	7
II.1.3. Respuesta a densidad celular ('quorum sensing')	11
III. JUSTIFICACIÓN	**13**
IV. OBJETIVOS	**14**
IV.2. General	14
IV.2.1. Específicos	14
V. MATERIALES Y MÉTODOS	**15**
V.3. Identificación de cepas patógenas del género Vibrio	16
V.4. Estandarización de la curva de crecimiento	16
V.5. Evaluación de la patogenicidad de Vibrio harveyi mediante ensayos in vivo con Litopenaeus vannamei	16
V.6. Determinación de la naturaleza del factor de virulencia	18
V.7. HPLC	18
V.8.Identificación de productos extracelulares asociados a patogenicidad (enzimas o toxinas)	18
V.9. Codificación de hemolisina	19
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	**20**
VI.10. Identificación de cepas patógenas	20
VI.10.1. Amplificación de DNA (PCR, 16S ribosomal)	20
VI.10.2. Análisis de restricción con *Msp I* y *Sau 3A I*	20
VI.11. Estandarización de la curva de crecimiento	22
VI.11.1. Curva de crecimiento	22
VI.12. Evaluación de la patogenicidad de Vibrio harveyi mediante ensayos in vivo con Litopenaeus vannamei	24
VI.12.1. Ensayo *in vivo* para determinar patogenicidad (células)	24
VI.12.2. Ensayo *in vivo* para naturaleza extracelular (fracción de 10 kDa)	25
VI.13. HPLC	25
VI.14. Actividad enzimática en caja Petri	26
VI.14.1. Actividad de proteasas	27
VI.14.2. Actividad de amilasas	27
VI.14.3. Actividad de lipasas	27
VI.14.4. Actividad de hemolisinas	28
VI.15. Codificación de hemolisina	28

CONTENIDO (continuación)

	Página
VII. CONCLUSIONES	30
VIII. PERSPECTIVAS	31
REFERENCIAS	32
ANEXO	36

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Camarón de cultivo para exportación	3
2	Esquema general del protocolo experimental	15
3	Diagrama de flujo del sistema experimental para los ensayos *in vivo*, usando como hospedero camarón blanco	17
4	Gen 16S ribosomal amplificado por PCR, carril 1-5 cepas de *Vibrio harveyi* carril 6, cepa de *Bacillus subtilis*; carril 7, *B.s*, como marcador PM.....	21
5	Análisis de restricción, digestión con enzima *Msp I*. Donde: *B.s* = *Bacillus subtilis;* NP, Z3, Z2, PN, M1 = diferentes cepas de *V. harveyi* y MPM = marcador de peso molecular de PCR	21
6	Análisis de restricción, digestión con enzima *Sau 3A I*. Donde: *B.s*= *Bacillus subtilis;* NP, Z3, Z2, PN, M1= diferentes cepas de *V. harveyi* y MPM= marcador de peso molecular de PCR	22
7	Curva de crecimiento de *Vibrio harveyi* a 200 rpm y 28°C, para la cepa NP)act. 14126 –no patógena) y Z3 (silvestre –patógena-). Se registró la absorbancia a 600 nm por un espacio de 8 h	23
8	Cromatogramas superpuestos para las cepas NP y Z3 de *Vibrio harveyi* (HPLC)	26
9	Cajas Petri del ensayo para actividad enzimática (lipasas)	27
10	Gel de electroforesis gen hemolisina, carril 1: MPM (marcador peso molecular), 2: cepa no patógena NP, 3: cepa patógena Z3, (cepas de *Vibrio harveyi*)	29

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
I	Ensayo *in vivo* de mortalidad/sobrevivencia, inoculando células de las cepas NP y Z3 de *Vibrio harveyi*	24
II	Ensayo *in vivo* de mortalidad/sobrevivencia, inoculando, fracción de 10 kDa de las cepas NP y Z3 de *Vibrio harveyi*	25

I. INTRODUCCIÓN

En México, el cultivo de camarón es una de las áreas de la acuicultura considerada como la actividad de mayor importancia económica (Lucien-Brun, 1997), debido a la demanda y altos precios que alcanza el camarón en el mercado internacional. Sin embargo, la camaronicultura ha tenido que enfrentar varios desafíos para su desarrollo entre los que destacan la prevención y control de enfermedades que afectan significativamente esta industria (Unzueta-Bustamante, 2000).

Dentro de las patologías más comunes se encuentra la *vibriosis*, enfermedad producida por bacterias del género *Vibrio*. Las especies que pertenecen a este género han sido estudiadas debido a la importancia que presentan como vectores de enfermedades en humanos (Faruque *et al*, 1998). En el cultivo de camarón, se han presentado frecuentes problemas de origen bacteriano atribuidos principalmente a microorganismos del género antes mencionado, los cuales han provocado serias pérdidas en los estanques de engorda y en la larvicultura.

Vibrio harveyi es una de las especies del género que aún cuando no genera brotes epidémicos, sí afecta considerablemente la ecología y sanidad del cultivo de camarón repercutiendo por tanto en la producción acuícola. Tomando en consideración que son pocos los estudios enfocados a dilucidar los mecanismos de patogenicidad que presenta esta bacteria, surge el interés por identificar los sistemas de virulencia que presenta esta especie. Para determinar la patogenicidad de las cepas de *V. harveyi*, en este trabajo se realizaron ensayos *in vivo* usando como hospedero al camarón blanco(*Litopenaeus vannamei*), especie de interés en la región y el país. Además se identificaron los productos extracelulares asociados a virulencia mediante ensayos del mismo tipo, para de esta manera,

responder la hipótesis de que existen cepas de *V. harveyi* que difieren en patogenicidad y los productos extracelulares están asociados la virulencia.

La información será invaluable en el diseño de profilácticos/terapéuticos para la prevención y tratamiento de *vibriosis* en la acuicultura de camarón, contribuyendo a la solución del problema de mortalidad causado por *V. harveyi* en los estanques de cultivo.

II. ANTECEDENTES

En los últimos años la camaronicultura ha crecido notablemente en el nivel mundial, principalmente en países como Ecuador y Tailandia. Aunque en México todavía se observa una mayor producción de camarón silvestre debido a la captura en alta mar, el área de exportación va en aumento (Figura 1).

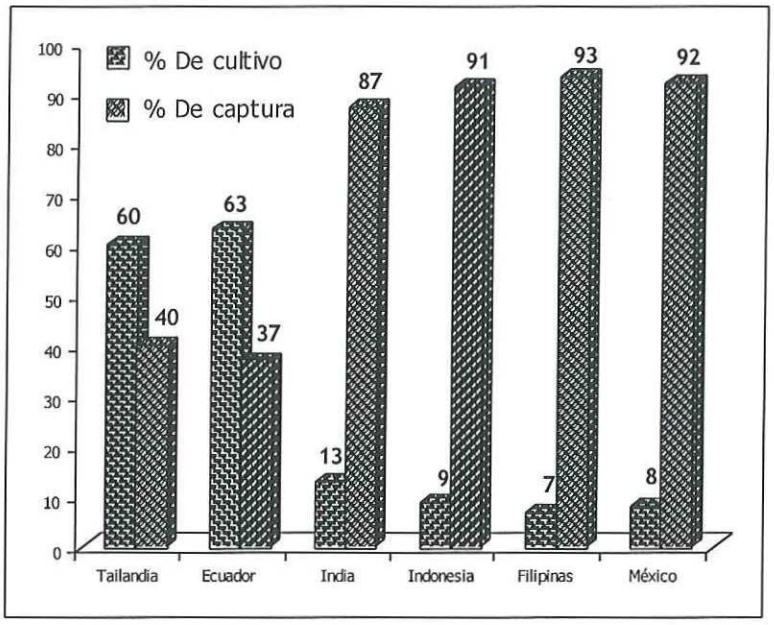

Figura 1. Camarón de cultivo para exportación.
Fuente: Instituto Nacional de Alimentación (Tailandia), Mayo, 1999.

Los camarones peneidos por su valor comercial son considerados de gran importancia en el ámbito mundial, tanto para las pesquerías como para el cultivo. El cultivo de cualquier organismo requiere conocer los aspectos relacionados con su anatomía, alimentación, reproducción y el efecto de parámetros ambientales en su fisiología (Martínez-Córdova, 1999).

En la actualidad existen más de 25 especies de camarón que se utilizan a nivel comercial, piloto o experimental para su cultivo, pero en realidad se considera que existen muchas otras que son potencialmente explotables para este

propósito. El precio del camarón depende de varios factores, pero principalmente del tamaño y el aspecto. Las especies que alcanza un máximo valor comercial son *Litopenaeus stylirostris* y *L. vannamei,* es decir los camarones 'blancos' o 'cristalinos', los cuales son preferidos a los pigmentados como *Penaeus monodon* o *Farfantapenaeus californiensis* (Martínez-Córdova, 1999).

La industria productora de alimentos con mayor dinamismo en el mundo es la camaronicultura, sin embargo existen una gama de aspectos tecnológicos por solucionar. Además de la amenaza permanente de epizootias causadas por enfermedades de diversa índole capaces de repercutir en la economía de los cultivos. El desarrollo de métodos que permiten obtener un diagnóstico rápido y preciso, son herramientas de máxima prioridad para controlar la diseminación de enfermedades y epizootias. Además del reconocimiento temprano de los posibles agentes etiológicos en la población y en el ambiente a utilizar para las operaciones de cultivo (Martínez-Córdova, 1999).

Aunque no todas las especies de camarón presentan la misma resistencia a la manipulación que se ejerce sobre ellas durante el cultivo, algunas como el camarón blanco del Pacífico (*L. vannamei*) o el camarón azul (*L. stylirostris*), han mostrado una excelente resistencia al manejo, mientras que el camarón café del Pacífico (*F. californiensis*) es menos resistente. Las especies de camarón son susceptibles a enfermedades causadas por diferentes agentes patogénicos entre los cuales encontramos hongos, protozoarios, infección por ricketsias, viruses (Virus de la necrosis infecciosa del tejido hipodermíco y hematopoyético, THHNV, virus del síndrome Taura, TSV, necrohepatopancreatitis, NHP) y las producidas por bacterias. Estas últimas principalmente del género *Vibrio,* que causan la enfermedad denominada *vibriosis* (Martínez-Córdova, 1999).

La *Vibriosis* es considerada la enfermedad de mayor importancia en la acuicultura del camarón, generando altas mortalidades y severas pérdidas económicas (Goarant *et al*, 1998). La *Vibriosis* afecta todas las etapas de desarrollo del

crustáceo; sin embargo, hay que resaltar que la presencia de un patógeno potencial no es equivalente a la presencia de la enfermedad. La expresión de ésta es el resultado de una interacción compleja entre el agente, el hospedero y el ambiente.

Mortalidades altas se presentan en postlarvas y juveniles. Los camarones moribundos presentan hipoxia y los estanques luminiscencia. Además, en la hemolinfa de los camarones la cantidad de bacterias es alta, la muda es lenta y se presenta melanosis de la cutícula. Los órganos comúnmente afectados por *Vibrios* son la cutícula, el hepatopáncreas, la glándula antenal, la hemolinfa, el corazón y el músculo estriado. Bacterias gram negativas son encontradas frecuentemente en estanques, entre los agentes etiológicos que desencadenan esta enfermedad, encontramos a *V. harveyi, V. vulnificus, V. parahaemolyticus* y *V. alginolyticus.* Además la susceptibilidad de los camarones se eleva en condiciones extremas de estrés(http://www.sci.tamucc.edu/pals/maric/Index/WEBPAGE/DLec4.html).

El género *Vibrio* se caracteriza por tolerar un amplio intervalo de salinidades, por lo que generalmente habitan en ambientes marinos y estuarios, aunque también pueden encontrarse en agua dulce. Algunas especies de este género, como *V. cholerae, V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus,* son los patógenos que más afectan humanos (Faruque *et al*, 1998).

II.1. *Vibrio harveyi*

Es también denominado, *Achromobacter harveyi, Pseudomonas harveyi, Photobacterium harveyi, Beneckea harveyi, Lucibacterium harveyi .Vibrio harveyi* fue aislado en 1936 de un anfípodo marino (*Talorchestia sp.*) y denominado "*Achromobacter harveyi*". Esta bacteria se inscribe en el "Approved Lists of Bacterial Names" bajo las denominaciones de *Beneckea harveyi* y *Lucibacterium harveyi.* En 1980, suprime las

clases *Beneckea* y *Lucibacterium*, transfiriendo las distintas especies a la clase *Vibrio* (Thompson *et al*, 2002).

En 1998, Pedersen, *et al*, ponen de manifiesto mediante el estudio de las homologías de hibridación DNA-DNA, los polimorfismos de los fragmentos de DNA amplificado (AFLP) y por el análisis de los ribotipos que *V. carcha* es en realidad un sinónimo posterior de *V. harveyi*. El estudio de las secuencias del RNA ribosomal 16S, los porcentajes de G + C, el análisis numérico de los fragmentos obtenidos por una técnica FAFLP (Fluorescent Amplified Fragment Length Polymorphism), así como los caracteres fenotípicos estudiados con ayuda de kits BIOLOG GN confirman que *V. harveyi* y *V. trachuri* son una misma especie. *V. trachuri* es pues un sinónimo posterior de *V. harveyi* (Thompson *et al*, 2002).

II.1.1. HÁBITAT Y PODER PATÓGENO

El hábitat de *V. harveyi* está constituido por los mares tropicales y subtropicales (25 a 30°C), los sedimentos marinos, así como por el tracto digestivo de los animales marinos (vertebrados e invertebrados). *V. harveyi* causa infecciones severas e incluso un alto porcentaje de mortalidad en tiburones, camarones y raramente en la ostra perlera (*Pinctada maximos*) y peces. Se ha encontrado en tiburones grandes mantenidos en cautiverio, como son; tiburón gris (*Carcharhinus plumbeus*) y tiburón limón (*Negaprion brevirostris*). Clínicamente, los animales infectados presentan un estado de letargo, anorexia, pérdida del sentido de la orientación y la muerte. A la autopsia se observa necrosis de los riñones, así como quistes subcutáneos. Experimentalmente, la inyección intrapéritoneal del microorganismo ($4x10^6$ células), causa la muerte del perro espinoso (*Squalus acanthias*) en 18 horas, mientras que el tiburón limón (*Negaprion brevirostris*) es más resistente requiriendo una inyección intraperitoneal de $5x10^7$ células (Grimes *et al*, 1984 y Grimes *et al*, 1993).

V. harveyi es la causa de pérdidas importantes en el cultivo de camarones; la mortalidad afecta las larvas y las fases postlarvales. La infección se traduce en anorexia, retraso en el crecimiento, y disminución del nado. Los animales se tornan opacos, eventualmente luminiscentes; además presentan un decaimiento de los tejidos orgánicos del hepatopáncreas. Se describieron tales infecciones en distintas especies de camarones (*Penaeus japonicus, P. monodon* y *L. vannamei*) en Australia, Ecuador, la India, Indonesia, Filipinas, Taiwán y Tailandia (**Lavilla-Pitogo** *et al*, **1990** y **Liu** *et al*, **1996**). Las bacterias aisladas de camarones muertos se revelan virulentas y son aptas a reproducir la enfermedad a dosis que varían de 10^2 a 10^5 bacterias por mL de agua de mar. En cambio, las aisladas del ambiente no son patógenas en dosis de 10^6 células por mL (**Robertson** *et al*, **1998**).

II.1.2. PATOGENICIDAD (ENZIMAS O TOXINAS)

V. harveyi es reconocido como patógeno primario de muchas especies de invertebrados cultivados comercialmente, siendo el más importante *P. monodon*. *V. harveyi* puede causar hasta el 100% de mortalidad de larvas de camarón en cultivo (**Jiravanichpaisal** *et al*, **1994**, **Lavilla-Pitogo** *et al*, **1990**). De los *Vibrios*, *V. harveyi* es el más común en los estanques de cultivo de camarón (**Tendencia y De La Peña, 2001**).

En años recientes, *V. harveyi* ha sido reconocido como un patógeno devastador de larvas de peneidos en el Sureste de Asia (**Baticados** *et al*, **1990**; **Lavilla-Pitogo** *et al*, **1992**) y Norte de Australia (**Owens** *et al*, **1992**). Cepas altamente virulentas de *V. harveyi* provocan hasta un 100% de mortalidad en organismos durante baños de inmersión, conteniendo 10^2 CFU/ml (**Lavilla-Pitogo** *et al*, **1992**). Los factores involucrados en la patogenicidad de las cepas virulentas de *V. harveyi* sobre larvas de *P. monodon*, no han sido bien caracterizados (**Pizzutto y Hirst, 1995**).

Se ha reportado que proteasas, fosfolipasas, hemolisinas u otras exotoxinas, podrían jugar un papel importante en la virulencia de esta bacteria (Montgomery y Kirchman, 1994; Liu y Lee, 1996). Montero y Austin (1999), sugieren que los lipopolisacáridos pueden constituir la toxina letal de *V. harveyi*.

Por otra parte, Zhang y Austin (2000), después de examinar un gran número de cepas de *V. harveyi* y encontrar que la actividad hemolítica en los productos extracelulares está involucrada en la patogénesis para salmónidos, afirman que la cepa VIB 645, es la más patógena ya que expresa productos extracelulares con la más alta titulación de actividad hemolítica en el salmón del Atlántico. En general, la hemólisis bacteriana es un factor importante de virulencia de los *Vibrios* patógenos, por causar septicemia hemorrágica y diarrea en el hospedero. Muchas de estas hemolisinas han sido caracterizadas y los genes codificantes han sido clonados a partir de *V. parahaemolyticus* (Nischibuchi y Kaper, 1985; Taniguchi *et al*, 1986).

Por otro lado, se demostró que existe una relación entre la producción de sideróforos y la virulencia para peces infectados con cepas de *V. harveyi*. Sin embargo, la misma relación no fue observada para las cepas de esta bacteria cuando infectan invertebrados (Owens *et al*, 1996).

Es sabido que *V. harveyi* produce proteasas (Liu *et al*, 1996) y quitinasas (Svitil *et al*, 1997); pero la relación de estos factores con la virulencia no está clara. Aparentemente es requisito de la cepa de *V. harveyi* ser infectada por ser un bacteriófago para causar la enfermedad de 'branquías cafés' en camarones adultos (Ruangpan *et al*, 1999). Es posible que los factores que codifica el fago contribuyan a la virulencia de las cepas causantes de enfermedades a las larvas. Se sugiere a las exotoxinas como las responsables de enfermedades provocadas por bacterias luminosas. Esto basado en características histopatológicas de los estudios toxicológicos en larvas infectadas (Muir, 1991), así como en la toxicidad

de los productos extracelulares (PEC) de *V. harveyi* al infectar camarón tigre (Liu *et al*, 1996).

Sin embargo, la identidad y el papel de las toxinas involucradas en la virulencia de las cepas no es del todo conocida, aún cuando ya se han identificado algunas como es el caso de la proteína extracelular T1, que es producida a la mitad de la fase exponencial de crecimiento y tiene secuencia similar a proteínas asociadas a virulencia producidas por *Salmonella, Shigella* y *Bacillus* (Harris y Owens, 1999).

Tres proteasas extracelulares sensibles a secuestrantes de metales producidas por *V. harveyi* se aislaron de agua de mar. Sin embargo, la información sobre la función patológica de estas proteasas para animales acuáticos no es concluyente. Adicionalmente se purificó y caracterizó una cisteín-proteasa como la mayor exotoxina de esta especie (Lee *et al*, 1999).

Al investigar los efectos de los PEC y la cisteín-proteasa se observó que éstos actúan sobre la coagulación del plasma *in vitro* e *in vivo* de camarón y pueden interferir marcadamente con la hemostasis evitando la coagulación de la hemolinfa. Estos eventos pueden contribuir significativamente a la patogenicidad de *V. harveyi* en el camarón, ya que la coagulación juega un papel esencial en la defensa previniendo la pérdida de hemolinfa por daño al exoesqueleto impidiendo la diseminación de la bacteria a través del cuerpo. El fenómeno anticoagulante puede facilitar la diseminación y propagación de *V. harveyi* en el hospedero, aunque el mecanismo responsable de la inactivación de la coagulación no ha sido evidenciado, presumiblemente la cisteín-proteasa es el factor que provee a la bacteria de esta habilidad (Lee *et al*, 1999).

Otra vertiente menciona que la toxicidad de la cepa VH1039 para *P. monodon* es mediada por un bacteriófago. Este mecanismo probablemente no involucra

simplemente la liberación de toxinas preexistentes como resultado de la lisis bacteriana. De acuerdo a esto, si la producción de la toxina es mediada por el bacteriófago existendo 2 posibilidades. La primera sería que éste promueva la producción de una toxina existente o induzca la producción de una nueva, y la otra es que si la toxina es sintetizada de *novo* podría originarse la inducción de un gen silencioso o de un nuevo gen transportado por el propio fago (Raungoan *et al*, 1999).

La participación del bacteriófago en la toxicidad de especies de *Vibrio* cuando se cultiva camarón, puede ser un problema significativo para los camaronicultores. Esto puede explicar parcialmente, la confusión que prevalece alrededor de la variación en la toxicidad de cepas bacterianas aisladas de camarones endémicos y de estanques de cultivo de camarón. Además sustenta la postura que sostiene que la virulencia de *V. harveyi* es derivada de la movilidad de elementos genéticos, explicando porque muchas cepas pierden su virulencia cuando se realizan cultivos en serie dentro del laboratorio (Raungoan *et al*, 1999). Por lo tanto el conocimiento de los mecanismos para inducir la toxicidad también tiene implicaciones en la prevención y control de patógenos para camarón.

La luminiscencia en *V. harveyi* está controlada a nivel transcripcional por un sistema de censado poblacional atípico (Bassler, 1999) y la expresión de luminiscencia en *V. harveyi* ha sido asociada con virulencia en cepas patogénicas de este organismo (Karunasagar *et al*,1994).

Pizzutto y Hirst (1995), afirmaron que la virulencia de *V. harveyi* puede explicarse por la transferencia genética de factores de virulencia. Sin embargo, otra vertiente mantiene que la patogenicidad en *V. harveyi* (cepa 47666-1) es debida a la producción de una proteína extracelular vía un bacteriófago, referida como toxina T1 con un peso molecular aproximado de 100 kDa (Harris y Owens, 1999; Pizzutto y Hirst, 1995).

Por otro lado, aunque existe un gran número de estudios sobre los mecanismos de defensa de los crustáceos, recientemente se ha incrementado el interés por diferentes especies de camarón producidas en estanques, debido a su importancia económica como es el caso del camarón blanco(*L. vannamei*), siendo necesario conocer el mecanismo de defensa desencadenado en este organismo al ser infectado por *V. harveyi* en este organismo. Debido a que el crustáceo al igual que los invertebrados no posee un sistema inmunológico como el conocido para vertebrados, el camarón manifiesta como primer proceso de defensa aquél mediado por los hemocitos los cuales presentan tres tipos celulares: hialinos que participan en la coagulación, las células semigranulares y granulares están implicados en la activación del sistema profenoloxidasa (proPO) y en la fagocitosis **(Gargioni y Barracco, 1998).**

Otra acción de defensa, es el sistema inmediato, que activa la enzima fenoloxidasa desencadenando la melanización y producción de oxígeno reactivo citotóxico. Además, en crustáceos la reacción de defensa innata involucra la síntesis de péptidos antimicrobianos que funcionan como aglutininas **(Bachere, 2000).**

II.1.3. RESPUESTA A DENSIDAD CELULAR ('Quorum sensing'):

El censado poblacional, que es dependiente de la densidad, ha sido postulado para ser un componente importante en el crecimiento y colonización de comunidades bacterianas **(Batchelor** *et al*, **1997; McLean** *et al*, **1997).**

Moléculas señal y de comunicación intracelular proveen a la célula bacteriana de métodos para discriminar entre una bacteria de vida libre, una presente a baja densidad celular y otra en alta densidad **(Fuqua** *et al*, **1996; Swift** *et al*,**1996).**

En bacterias, la regulación de la expresión genética en respuesta a cambios en densidad celular se denomina 'quorum sensing' (Fuqua *et al*, 1996). En *V. harveyi* este sistema produce, libera y responde a autoinductores como HBHL (N-hidroxibutanoil-l-L-homoserinlactona), el cual se acumula en el ambiente externo en respuesta al aumento de la población celular.

En *V. harveyi* existen dos sistemas de 'quorum sensing', cada uno está compuesto de un autoinductor y un sensor, éstos funcionan en paralelo para controlar la expresión de bioluminiscencia densidad-dependiente. *V. harveyi* presenta cepas capaces de detectar únicamente autoinductor 1 (AI-1) o autoinductor 2 (AI-2) (Bassler y Silverman, 1995). Debido a que mutantes de este microorganismo son capaces de responder a uno de los inductores, es posible determinar cómo fluyen las señales en esta bacteria. La comunicación intercelular y el control de la expresión genética a través del uso de autoinductores es esencial para asegurar la comunicación entre especies y la supervivencia en varios nichos ecológicos (Bassler *et al*, 1997).

El camarón de cultivo se ve afectado en gran medida por bacterias (principalmente del género *Vibrio*). Puesto que este organismo presenta un sistema de defensa a partículas extrañas que difiere grandemente de lo que para vertebrados se conoce como sistema inmune, surge el interés por estudiar la virulencia de *V. harveyi* usando como hospedero al camarón blanco (*L. vannamei*) para determinar la patogenicidad de la bacteria mediante ensayos *in vivo*. El estudio de los mecanismos la virulencia de *V. harveryi* en camarón es importante para sustentar el control de enfermedades como *vibriosis*, mediante el conocimiento de determinantes de la virulencia, es decir productos extracelulares asociados a la patogénesis, posibilitando el desarrollo de estrategias moleculares capaces de controlar dichos problemas.

III. JUSTIFICACIÓN

La demanda y altos precios del camarón en el mercado internacional lo hacen un producto atractivo económicamente, sin embargo, la camaronicultura se ha visto disminuida considerablemente en su desarrollo y producción debido a los problemas de *vibriosis* que se presentan frecuentemente en el cultivo de camarón. Esta enfermedad ha provocado serias pérdidas en los estanques de engorda y en la larvicultura. Dentro de los agentes causales principales se encuentra *V. harveyi* que afecta considerablemente la ecología y sanidad del cultivo, lo cual repercute en la producción masiva de camarón en gran parte del mundo.

Tomando en consideración que son pocos los estudios enfocados a dilucidar los mecanismos de patogenicidad que presenta esta bacteria, surge el interés por identificar los sistemas de virulencia que presenta esta especie. La información generada será invaluable en el diseño de profilácticos/terapéuticos para la prevención y tratamiento de la enfermedad en la acuicultura de camarón, contribuyendo a la solución del problema de mortalidad causado por *V. harveyi.*

IV. OBJETIVOS

IV.2. GENERAL

- Determinar la patogenicidad de *Vibrio harveyi* mediante ensayos *in vivo* usando *Litopenaeus vannamei* e identificar los productos extracelulares causantes de la virulencia.

IV.2.1. ESPECÍFICOS

- Identificar cepas patógenas como miembros del género *Vibrio.*
- Caracterizar la curva de crecimiento de *V. harveyi* en dos medios de cultivo
- Evaluar la patogenicidad de las cepas de *V. harveyi* mediante ensayos *in vivo* utilizando como hospedero al camarón blanco (*L. vannamei*)
- Determinar la naturaleza del factor de virulencia e identificar los productos extracelulares asociados a la patogenicidad (enzimas o toxinas) de *V. harveyi*

V. MATERIALES Y MÉTODOS

Para el desarrollo de esta investigación, el protocolo experimental se realizó bajo el siguiente esquema:

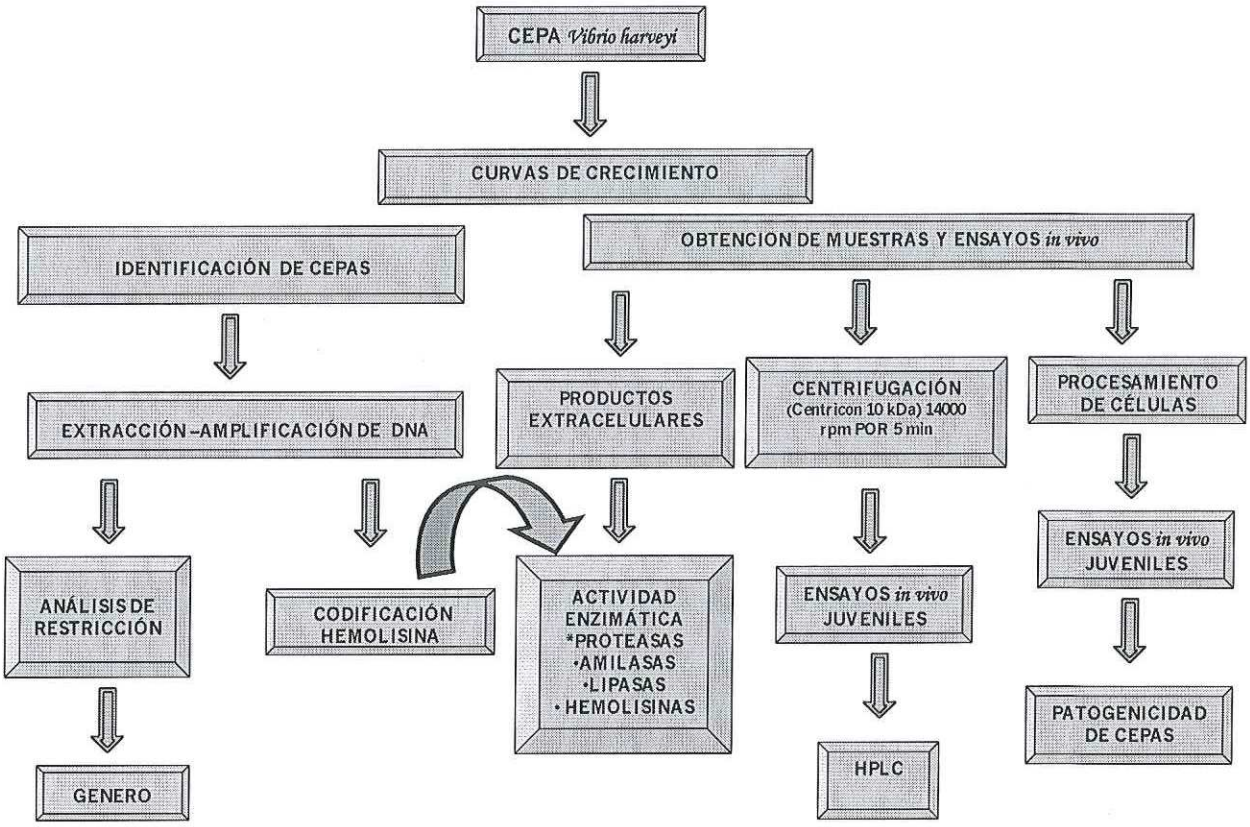

Figura 2. Esquema general del protocolo experimental.

Las cinco cepas de tipo silvestre de *Vibrio*, NP (ATCC 14126), M1, PN (PN9801), Z2 y Z3, fueron proporcionadas por el Laboratorio de Patología del CIAD de Mazatlán, Sinaloa; cuya identificación como *V. harveyi*, fue realizada mediante la utilización de técnicas bioquímicas y herramientas moleculares (Sistema Biológico de huellas metabólicas y AFLP). La cepa de *V. harveyi* ATCC 14126 (NP) fue utilizada como un control negativo de virulencia.

Los medios de cultivo utilizados fueron el medio de cultivo infusión de corazón (MIC), reportado su uso principalmente en el área de biología molecular. Además del medio luminoso, líquido (MLL) y sólido (MSL), empleado en los estudios mediante ensayos *in vivo.*

V.3. IDENTIFICACIÓN DE CEPAS DEL GÉNERO Vibrio

Se purificó DNA cromosómico de *Vibrio* posteriormente se amplificó el gen que codifica para el RNA ribosomal 16 S mediante PCR para el posterior análisis de restricción con las enzimas *Msp I y Sau 3A I,* reportadas por García-Ortega (1997) para RFLP de estas especies. Ver anexo.

V.4. ESTANDARIZACIÓN DE LA CURVA DE CRECIMIENTO

Se realizaron curvas de crecimiento para determinar el comportamiento de las cepas en dos medios de cultivos diferentes (MIC y MLL), para adicionalmente determinar la fase de expresión del factor de virulencia. En anexo.

V.5. EVALUACIÓN DE LA PATOGENICIDAD DE Vibrio harveyi MEDIANTE ENSAYOS in vivo CON L. vannamei

Los ensayos se llevaron a cabo empleando como organismo hospedero camarón blanco (*L. vannamei*), los cuales fueron proporcionados por el Laboratorio de Ecofisiología de organismos acuáticos de CICESE. Los organismos fueron adquiridos en AQUANOVA en Mazatlán, Sinaloa en etapa de poslarva (PL20), fueron desarrollados hasta juveniles de 5-7 g. Antes de aplicar las muestras, los organismos estuvieron en un período de aclimatación bajo las siguientes condiciones, salinidad 35 ppm y temperatura de 28°C, siendo alimentados diariamente con 1.5 g de alimento RANGEN, racionado en dos porciones a lo largo del día. Se realizaron recambios diarios de un 50% de volumen total de agua

del sistema experimental, para mantener en óptimas condiciones el agua del estanque. Figura 3.

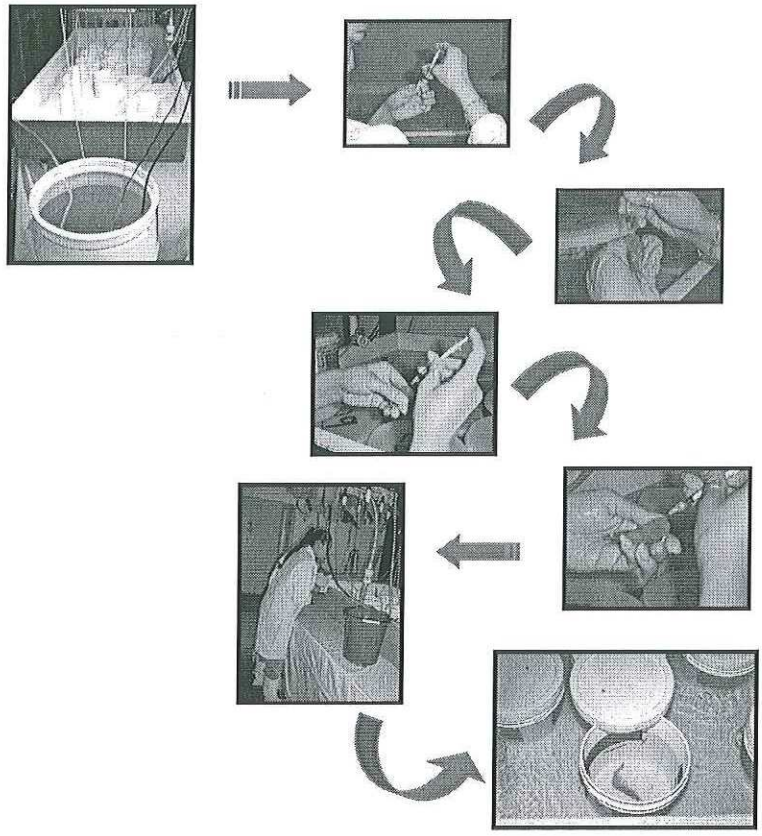

Figura 3. Diagrama de flujo del sistema experimental para los ensayos *in vivo*, usando como hospedero camarón blanco.

En los ensayos *in vivo* para evaluar la patogenicidad mediante la inoculación de células, el sedimento almacenado de la curva arrestado al inicio de la fase estacionaria (3 h en MLL) fue resuspendido en 1 ml de PBS (amortiguador salino de fosfatos, pH 7.4). Posteriormente se inyectó a los camarones en el tercer segmento dorsal con 20 µl de la muestra, experimento realizado en el sistema experimental que se mostro anteriormente. Durante el desarrollo del ensayo, se observó la mortalidad/sobrevivencia de los organismos tratados por un espacio de 24-48 h.

V.6. DETERMINACIÓN DE LA NATURALEZA DEL FACTOR DE VIRULENCIA

Se obtuvo el factor de virulencia para realizar los ensayos *in vivo,* para inocular la fracción de 10 kDa. Se filtró el sobrenadante através de un filtro 0.2 µm, para eliminar restos bacterianos. Se concentró por centrifugación en centricon de 10 kDa a 3500 rpm, 4°C durante 1 h en intervalos de 15 min.

Los especimenes fueron inyectados intramuscularmente con 50 µl de la fracción recuperada en el tercer segmento anterior al telson. Posteriormente se observó la mortalidad/sobrevivencia de los organismos tratados por un espacio de 24 h.

V.7. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)

Se procesaron las muestras igual que la fracción de 10 kDa, únicamente NP y Z3 para usar la primera como control no virulento y la segunda de interés para el estudio por ser virulenta. Se aplicaron 20 µl de muestra al cromatografo, columna vydac 201TP52 fase reversa C18. Eluir en gradiente de 0 – 60 % de 0.085% TFA/Acetonitrilo en flujo de 0.5 ml/min durante 60 min. Obtener el cromatograma, comparar ambas corridas.

V.8.IDENTIFICACIÓN DE PRODUCTOS EXTRACELULARES ASOCIADOS A PATOGENICIDAD

Para lo anterior de evaluó la actividad enzimática de proteasas, amilasas, lipasas y hemolisinas en caja Petri. Se prepararon los medios de cultivo para determinar si los productos extracelulares eran enzimas. Ver anexo.

V.9. CODIFICACIÓN DEL GEN DE HEMOLISINA

Para determinar la presencia del gen de hemolisina en la bacteria, se purificó DNA por el método fenol/cloroformo a partir de cultivo sólidos de *Vibrio harveyi,* para optimizar la purificación se realizó el cultivo en sólido ya que se tiene menor interacción con el medio de cultivo y es más fácil eliminar impurezas. Posteriormente de amplificó el gen mediante PCR y después se secuenciaran los productos de PCR (anexo).

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las cepas silvestres M1, PN9801, Z2 y Z3 de *Vibrio* fueron identificadas como miembros de este género, empleando técnicas moleculares como, amplificación de genes por PCR y análisis de restricción.

VI.10. IDENTIFICACIÓN DE CEPAS PATÓGENAS

Para asegura que las cepas utilizadas pertenecían al género *Vibrio*, las cepas descritas en la tabla 4 se usaron para la extracción de DNA cromosómico, la amplificación del gen 16S ribosomal por PCR y el análisis de restricción para la digestión con endonucleasas del producto de PCR. De acuerdo a los resultados obtenidos que se muestran a continuación, dichas cepas se confirmaron como miembros del género.

VI.10.1. AMPLIFICACIÓN DE DNA (Gen 16S ribosomal de *Vibrio harveyi*)

La reacción en cadena de la polimerasa fue realizada con la finalidad de obtener DNA amplificado empleando oligonucleótidos universales para el gen 16S descritos en Arellano y Olmos (2002). Obteniendo un fragmento conservado de aproximadamente 1500 pb para las diferentes cepas, lo cual coincide con el tamaño amplificado por *B. subtilis*, que se usó como marcador de peso molecular. Confirmando así la identidad de los microorganismos como eubacterias (Figura 4).

VI.10.2. ANÁLISIS DE RESTRICCIÓN

Posteriormente, el producto de PCR fue sometido a digestión con enzimas de restricción *Msp I y Sau 3A I*, con el fin de evidenciar que el fragmento obtenido presentaba un patrón de restricción conservado, para las especies del género

Vibrio (García-Ortega, 1997). No obstante, con esta información no se puede determinar la especie únicamente el género.

El patrón de restricción generado por la enzima *Msp I* se presenta en la figura 5, se observó que los fragmentos obtenidos coinciden con los esperados de acuerdo al análisis teórico para las cepas de *Vibrio* (García-Ortega, 1997), difiriendo claramente del patrón generado por *B. subtilis.*

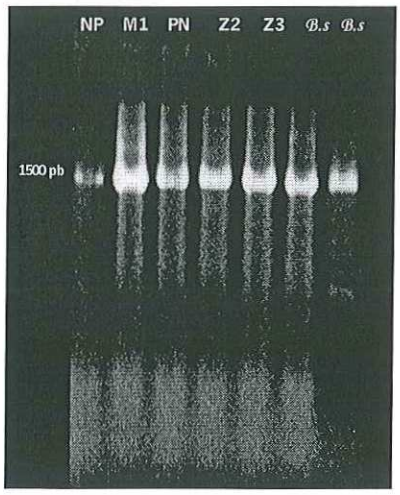

Figura 4. Gen 16S ribosomal amplificado por PCR, carril 1-5 cepas de *Vibrio*, carril 6, cepa de *Bacillus subtilis*; carril 7, *B.s*, como marcador PM.

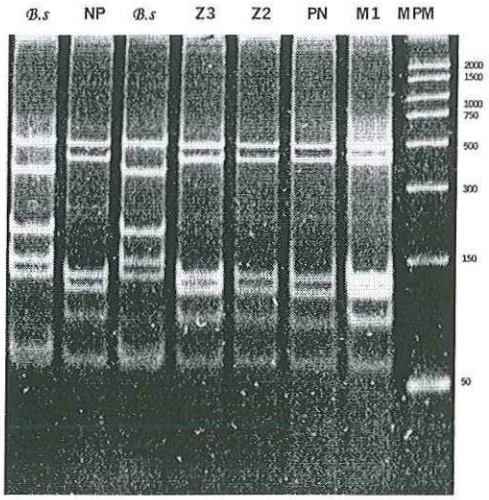

Figura 5. Análisis de restricción, digestión con enzima *Msp I*. Donde: *B.s* = *Bacillus subtilis;* NP, Z3, Z2, PN, M1 = diferentes cepas de *V. harveyi* y MPM = marcador de peso molecular de PCR.

Por otro lado, el patrón de restricción generado por la enzima *Sau 3A I* se presenta en la figura 6, se observó que los fragmentos obtenidos coinciden con los esperados de acuerdo al análisis teórico para las cepas de *Vibrio* (García-Ortega, 1997), difiriendo claramente del patrón generado por *B. subtilis.*

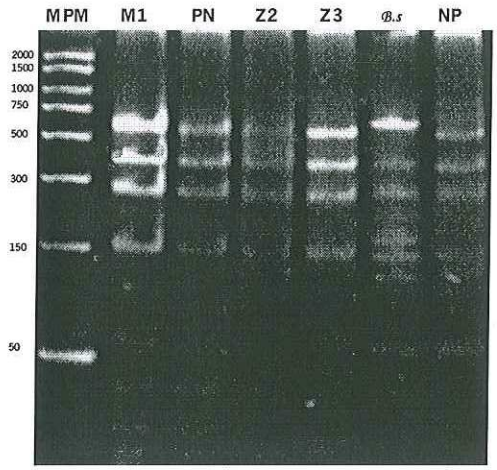

Figura 6. Análisis de restricción, digestión con enzima *Sau* 3A I. Donde: *B.s= Bacillus subtilis;* NP, Z3, Z2, PN, M1= diferentes cepas de *V. harveyi* y MPM= marcador de peso molecular de PCR.

VI.11. ESTANDARIZACIÓN DE LA CURVA DE CRECIMIENTO

VI.11.1. CURVA DE CRECIMIENTO

Para evidenciar el comportamiento de las diferentes cepas en sus etapas de desarrollo, así como determinar la fase de expresión del factor de virulencia asociado a la patogenicidad se realizaron curvas de crecimiento durante las cuales se obtuvieron muestras a diferentes tiempos, para obtener el extracto requerido para los ensayos *in vivo*. Después de ensayos preliminares se observó que el factor de virulencia era producido al inicio de la fase estacionaria, determinándose que el tiempo de expresión en MLL es a las 3 horas de iniciado el cultivo y para MIC a las 5 h, esto para las cepas NP y Z3 (figura 7). Posteriormente, las muestras fueron procesadas de acuerdo a lo descrito en materiales y métodos, con la finalidad de obtener los extractos inyectables, células o fracción de 10 kDa, dependiendo del ensayo por realizar.

El crecimiento observado en la figura anterior coincide con lo que se conoce de 'quorum sensing', siendo este el momento en el cual se expresan enzimas o toxinas para conservar el nicho, es decir dominar sobre otras especies (Bassler et al, 1997).

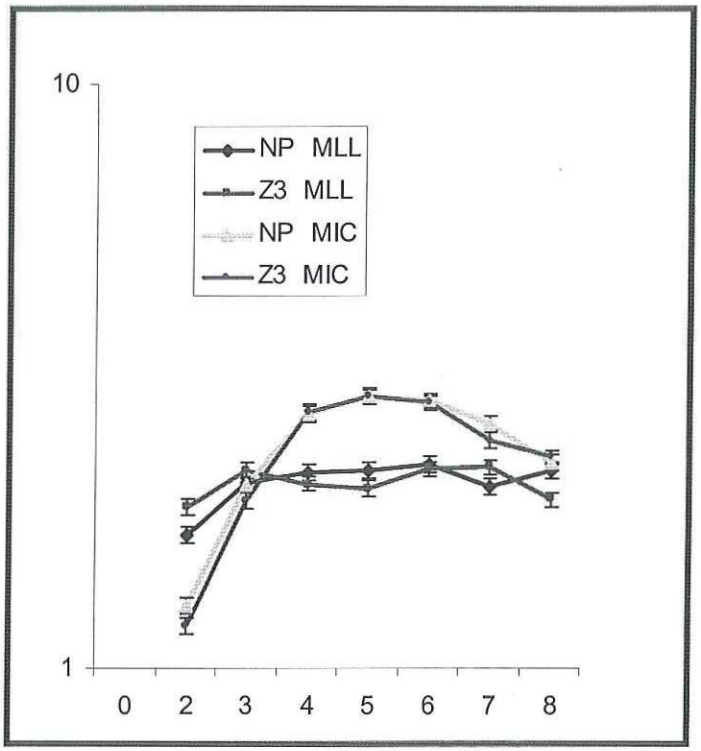

Figura 7. Curva de crecimiento de *Vibrio harveyi* a 200 rpm y 28°C, para la cepa NP (ATCC 14126 –no patógena-) y Z3 (silvestre –patógena-). Se registró la absorbancia a 600 nm por un espacio de 8 h.

Las cepas NP y Z3 en los dos medios de cultivo (MLL y MIC) presentan el mismo comportamiento constando de un periodo logarítmico y una fase estacionaria. La variación observada en la densidad de crecimiento depende del medio de cultivo, la diferencia radica en que MLL alcanza la etapa estacionaria a las 3 h de iniciado el cultivo mientras que en MIC lo hace hasta las 5 h.

Lo anterior puede explicarse teniendo en consideración que MIC es un medio extremadamente rico en nutrientes y estas esté disponibles durante mayor tiempo que los de MLL, debido probablemente a que sus componentes pudieran ser más

complejos y que estas cepas no tuvieran las enzimas necesarias para la degradación de dichos compuestos y de esta manera poder tenerlos disponibles. Por esto quizás no se favorece el crecimiento sino únicamente la sobrevivencia, manteniéndose un periodo considerable en estado estacionario.

VI.12. EVALUACIÓN DE LA PATOGENICIDAD DE LAS CEPAS MEDIANTE ENSAYOS *in vivo* CON *Litopenaeus vannamei*

VI.12.1 ENSAYOS *in vivo* PARA DETERMINAR PATOGENICIDAD (CÉLULAS)

Dieciséis horas después de haber inoculado los camarones vía inyección intramuscular se observó el siguiente comportamiento, los organismos inyectados con la cepa NP no presentaron mortalidad, a los que se le aplicó la M1 se observó una mortalidad del 60%, mientras que las cepas Z2 y Z3 causaron el 100% de mortalidad en los camarones tratados. Tabla I.

Tabla I. Ensayo *in vivo* de mortalidad/ sobrevivencia, inoculando células de las cepas NP y Z3 de *Vibrio harveyi.*

Tratamiento	CÉLULAS AL INICIO DE FASE ESTACIONARIA				CONTROLES	
	NP	M1	Z2	Z3	Ø.s	PBS
Org. No. 1 (16 h)	-	-	+	+	-	-
Org. No. 2 (16 h)	-	+	+	+	-	-
Org. No. 3 (16 h)	-	+	+	+	-	-
Org. No. 4 (16 h)	-	+	+	+	-	-
Org. No. 5 (16 h)	-	-	+	+	-	-
µl inyectados	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl

\- Sobrevivencia
\+ Mortalidad

Con esta información se puede diferenciar claramente la patogenicidad de las cepas analizadas. Así como la toxicidad de los controles de PBS (amortiguador salino de fosfatos) y *B. subtilis* (control negativo).

VI.12.2. ENSAYOS *in vivo* PARA DETERMINAR LA NATURALEZA EXTRACELULAR DEL FACTOR DE VIRULENCIA (FRACCIÓN 10 kDa)

Aproximadamente 12 h después de iniciado el ensayo se observó mortalidad en los organismos tratados con la cepa Z3, no así en los tratados con la cepa no patógena (NP) en cuyo tratamiento todos los organismos sobrevivieron. Los controles de igual manera no presentaron mortalidad (tabla II). Lo anterior resulta útil para determinar la naturaleza extracelular del factor de virulencia confirmando además la expresión del factor durante el 'quorum sensing', por la etapa en la que se tomaron las muestras en la curva de crecimiento.

Tabla II. Ensayo *in vivo* de mortalidad/sobrevivencia, inoculando, fracción de 10 kDa de las cepas NP y Z3 de *Vibrio harveyi.*

Tratamiento	MTRA INICIO EST (JUN.04.2002)		CONTROL		MTRA INICIO EST (MAY.07.2002)		J.4 7N
	NP	Z3	PBS	MLL	NP	Z3	Z3
Org. No. 1 (12 h)	-	+	-	-	-	+	+
Org. No. 2 (12 h)	-	+	-	-	-	+	+
Org. No. 3 (12 h)	-	+	-	-	-	+	+
Org. No. 4 (12 h)	-	+	-	-	-	+	+
µl inyectados	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	20 µl

VI.13. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)

Esta metodología se aplicó para tratar de determinar la naturaleza proteica del factor en cuestión, para despejar esta incógnita se procedió a realizar

cromatografía líquida de las fracciones de 10 kDa de ambas cepas (NP y Z3). Esto con la finalidad de encontrar u observar la presencia de un perfil proteico que difiriera entre las cepas y que se relacionara con la patogenicidad, es decir, que una de ellas (la patógena, p.e) presentara una o varias proteínas que no se encontraran en el perfil de la otra (no patógena) o viceversa. Figura 8. En relación a los cromatogramas no presentaron ninguna diferencia, lo cual puede deberse a la concentración de enzima que posiblemente es mínima y no es suficiente para detectarse una diferencia significativa.

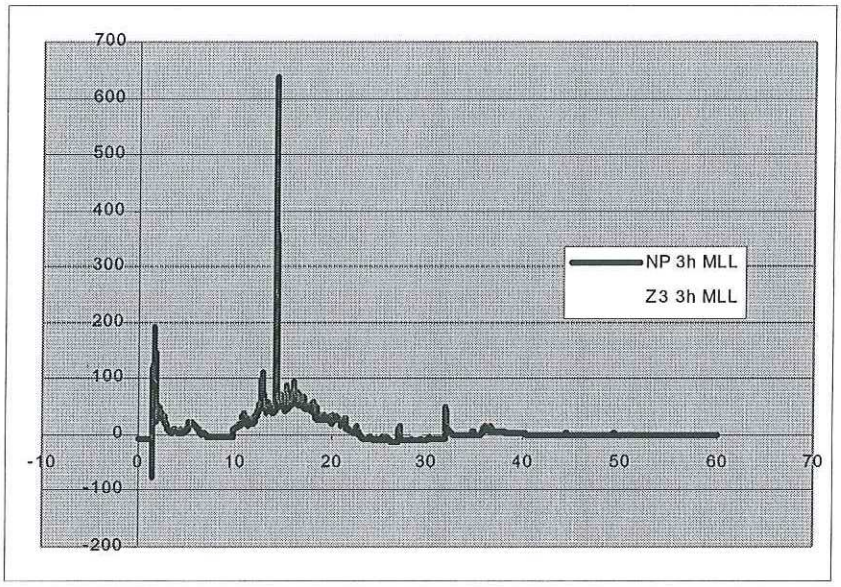

Figura 8. Cromatogramas superpuestos para las cepas NP y Z3 de *Vibrio harveyi* (HPLC)

VI.14. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EN CAJA PETRI

Una vez determinada la producción extracelular de la molécula de interés, el siguiente paso sería determinar si era una enzima o una toxina. Primeramente se determinó la actividad enzimática de las cepas (proteasas, amilasa, lipasas y hemolisinas), debido a que estas son algunas de las enzimas reportadas en literatura que han sido asociadas a patogenicidad (Liu *et al*, 1996).

VI.14.1. ACTIVIDAD DE PROTEASAS

Los ensayos con células y PEC's de las cepas NP y Z3 a 28 y 37°C, ninguna de las cepas presentaron actividad proteolítica bajo estas condiciones de estudio, no mostraron halo de degradación descartando así que se trate de una enzima proteolítica la encargada de la virulencia.

VI.14.2. ACTIVIDAD DE AMILASAS

En los ensayos con células y PEC's de las cepas NP y Z3 a 28 y 37°C, se presentaron actividad amilolítica mostrando un halo lítico mayor con PEC's a 37°C, debido a que ambas cepas mostraron actividad a 28°C se descarta la posibilidad de que una amilasa sea la responsable de la virulencia, ya que si este fuera el determinante ambas cepas serían patógenas bajo estas condiciones.

VI.14.3. ACTIVIDAD DE LIPASAS

En los ensayos con células para actividad lipolítica se observó mayor actividad a 28°C para Z3 en relación a NP; sin embargo, ninguna presentó actividad a 37°C. Con los resultados anteriores tampoco se puede atribuir la patogenicidad a una lipasa. Figura 9.

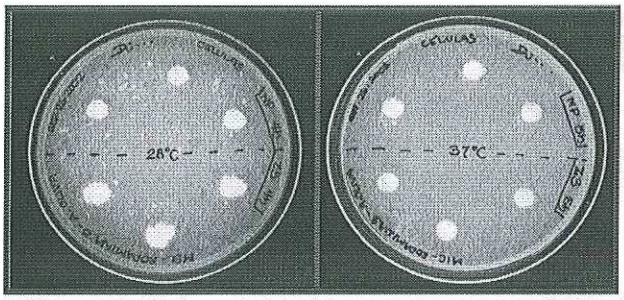

Figura 9. Cajas Petri del ensayo para actividad enzimática (lipasas).

VI.14.4. ACTIVIDAD DE HEMOLISINAS

El ensayo con células para actividad hemolítica con las cepas NP y Z3 a 28 y 37 °C mostró mayor actividad a 28 °C para Z3 con relación a NP, presentando un halo de 5 mm y 1 mm, respectivamente. Lo anterior posiblemente implique que estas enzimas presentan diferente actividad dependiendo de la temperatura. Además de convertirse en un serio candidato como responsable de la virulencia.

VI.15. CODIFICACIÓN DE HEMOLISINA

De acuerdo a los resultados anteriores, se optó por identificar los genes de hemolisina codificados en el genoma bacteriano por medio de la amplificación del gen de hemolisina de *V. harveyi* utilizando oligonucleótidos específicos, obteniendo que la cepa NP presenta el gen de 656 pb de hemolisina esperado (Hernández-Zarate y Olmos, en preparación); mientras que la cepa patógena Z3 muestra un fragmento genómico de ~ 300 pb, por lo que se determinó que este puede presumiblemente ser un tipo de hemolisina de menor tamaño. Esto coincide con los genes reportados para *V. parahaemolyticus*, que presenta 2 genes de hemolisina de diferente tamaño (*trh* y *tdh*), a los cuales se les ha considerado como marcador de virulencia. Estos genes son considerados importantes en la patogenicidad de *V. parahaemolyticus* (Miyamoto, 1969; Suthienkul, 1995).

Por lo anterior, se atribuye en gran medida la patogenicidad de las cepas de *V. harveyi* a la expresión del gen de hemolisina, codificado únicamente en la cepa caracterizada mediante ensayos *in vivo* como virulenta. Figura 10.

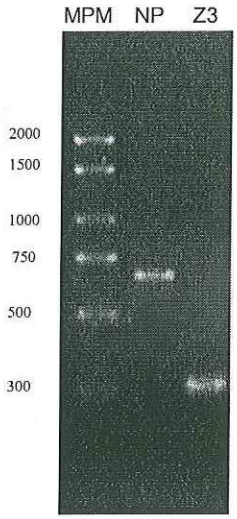

Figura 10. Gel de electroforesis gen hemolisina, carril 1:MPM (marcador peso molecular), 2: cepa NP (no patógena), 3: cepa patógena Z3, (cepas de *Vibrio harveyi*).

VII. CONCLUSIONES

- SE CONFIRMÓ QUE LAS CEPAS SILVESTRES DE *Vibrio*, PERTENECÍAN A ESTE GÉNERO
- NO TODAS LAS CEPAS DE *Vibrio harveyi* SON PATÓGENAS
- SE IDENTIFICARON LAS CEPAS PATOGENAS MEDIANTE ENSAYOS *in vivo* CON *Litopenaeus vannamei*
- LOS ENSAYOS *in vivo* CON CAMARÓN BLANCO SUSTENTAN LA PATOGENICIDAD DE LA CEPA Z3
- EXISTEN FACTORES EXTRACELULARES QUE FORMAN PARTE DEL SISTEMA DE VIRULENCIA DE *Vibrio harveyi*, PROBABLEMENTE HEMOLISINA
- LA CEPA DE *Vibrio harveyi* NP(ATCC14126), CODIFICA PARA HEMOLISINA 656 pb, NO ACTIVA A 28°C EN MEDIO INFUSIÓN DE CORAZÓN
- LA CEPA DE *Vibrio harveyi* Z3 (SILVESTRE), CODIFICA UN GEN PRESUMIBLEMENTE DEL TIPO HEMOLISINA DE 300 pb, ACTIVA A 28 °C
- LOS PRODUCTOS EXTRACELULARES DE *Vibrio harveyi* PRESENTAN ACTIVIDAD DE LIPASAS, AMILASAS Y HEMOLISINAS

VIII. PERSPECTIVAS

- SECUENCIAR LOS GENES DE HEMOLISINA
- REALIZAR MUTAGÉNESIS (PUNTUAL O AL AZAR) PARA INACTIVAR GEN (HEMOLISINA) Y DETERMINAR SI ES EL RESPONSABLE DE LA VIRULENCIA
- REALIZAR ENSAYOS PRELIMINARES DE PROTECCIÓN CONTRA LA CEPA PATÓGENA Y EL FP, USANDO CEPAS PATÓGENAS ATENUADAS
- .BUSCAR MARCADORES MOLECULARES ENTRE LAS CEPAS PATÓGENAS Y NO PATÓGENAS QUE PERMITAN DISTINGUIR UNAS DE OTRAS

REFERENCIAS

Arellano-Carbajal, F. y Olmos-Soto, J. 2002. Thermostable α-1,4 and α-1,6 glucosidase enzymes from Bacillus sp. Isolated from a marine environmental. World J. Microb. & Biotech. **18:** 791-795.

Bachere, E. 2000. Shrimp immunity & disease control. Aquaculture. **191:** 3-11.

Bassler, BL. 1999. A multichannel two-component signaling relay controls quorum sensing in *Vibrio harveyi*, p. 259–273. *In* G. M. Dunny and S. C. Winans (ed.), Cell-cell signaling in bacteria. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

Bassler, BL., Greenberg, PE y Stevens, AM. 1997. Croos-Species induction of luminiscence in the quorum sensisng bacterium *Vibrio harveyi*. Journal of Bacteriology. **179 (12):** 4043-4045.

Bassler, BL y Silverman, MR. 1995. In two-component signal transduction, eds. Hoch, J.A. & Silhavy, T.J. (Am. Soc. Microbiol., Washington, D.C.) 431-445.

Batchelor, SE, Cooper,M, Chhabra, SR, Glover, LA, Stewart,GSAB, Williams, P y Prossner, JL. 1997. Cell density-regulated recovery of starved biofilm populations of ammonia-oxidizing bacteria. Appl. Environ. Microbiol. **63:** 2281–2286.

Baticados, MCL., Lavilla-Pitogo, CL, Cruz-Lacierda, ER, De La Peña, LD y Sunaz, NA. 1990. Studies on the chemical control of luminous bacteria *Vibrio harveyi* and *Vibrio splendidus* isolated from diseased *Penaeus monodon* larvae and rearing water. Dis. Aquat. Org. **9:**133–139.

Faruque, SM, Albert, MJ y Mekalanos, JJ. 1998. Epidemiology, genetics & ecology of toxigenic *Vibrio cholerae*. Microbiology & Molecular Biology Reviews. **62 (4):** 1301-1314

Fuqua, C., Winans, SC y Greenberg, EP. 1996. Census and consensus in bacterial ecosystems: the LuxR-LuxI family of quorum sensing transcriptional regulators. Annu. Rev. Microbiol. **50:**727–751.

García-Ortega, AM., 1997. Caracterización molecular de especies del género *Vibrio*. UABC. Facultad de Ciencias Químicas. Tijuana, B.C.

Gargioni, R, y Barraccco, MA. 1998. Haemocytes of the palaemonids *Macrobrachium rosenbergii* & *M. acanthurus*, and the penaeid *Penaeus paulensis*. J. Morphol. **236:** 209-221.

Goarant, C, Merien, F, Berthe, F, Mermoud, I. y Perolat, P. 1999. Arbitrarily Primed PCR To Type *Vibrio* spp. Pathogenic for Shrimp. Appl. Envir. Microbiol. 65: 1145 - 1151.

Grimes, DJ, Stemmler, J, Hada, H, May, EB, Maneval, D, Hetrick, FM, Jones, RT, Stoskopf, M, y Colwell, RR. 1984. *Vibrio* species associated with mortality of sharks held in captivity. Microb. Ecol. **10:** 271-282.

Grimes, DJ, Jacobs, D, Swartz, DG, Brayton, PR. y Colwell, RR. 1993. Numerical taxonomy of Gram-negative, oxidase-positive rods from *carcarhinid* sharks. Int. J. Syst. Bacteriol. **43:** 88-98.

Harris, LJ, y Owens, L. 1999. Production of exotoxins by two luminous *Vibrio harveyi* strains known to be primary pathogens of *Penaeus monodon* larvae. Dis. Aquat. Org. **38:**11–22.

Hernandez-Zarate y Olmos, en preparación

http://www.sci.tamucc.edu/pals/maric/Index/WEBPAGE/DLec4.html).

Jiravanichpaisal, P, Miyazaki, T y Limsuwan, C. 1994. Histopathology, biochemistry and pathogenicity of *Vibrio harveyi* infecting black tiger prawn *Penaeus monodon*. J. Aquat. Anim. Health. **6:**27–35.

Karunasagar, I, Pai, R, Malathi, GR y Karunasagar, I. 1994. Mass mortality of *Penaeus monodon* larvae due to antibiotic-resistant *Vibrio harveyi* infection. Aquaculture **128:**203–209.

Lavilla-Pitogo, CR, Baticados,MCL, Cruz-Lacierda, ER y De la Peña, LD. 1990. Occurrence of the luminous bacterial disease of *Penaeus monodon* larvae in the Philippines. Aquaculture **91:**1–13.

Lee, KK, Chen, YL y Liu, PC. 1999. Hemostasis of tiger prawn *Penaeus monodon* affected by *Vibrio harveyi*, extracellular products and toxic cistein protease. Blood Cells, Molucules, & Diseases. **25 (13):** 180-192.

Liu, PC y Lee, KK., 1996 . Phathogenecity of different isolates of *Vibrio harveyi* in tiger prawn, *Penaeus monodon*. Lett Appl. Microbiol. **22:** 413-416.

Liu, PC, Lee, KK., Yii, KC, Kou, GH, y Chen, SN. 1996 . Isolation of *Vibrio harveyi* from diseased kuruma prawns Penaeus japonicus. Current Microbiol. 33: 129-132.

Lucien-Brun, H. 1997. Evolution of world shrimp production: fisheries and aquaculture. World Aquaculture. **28 (4):** 21-33.

Mártinez-Córdova, LR. 1999. Cultivo de camarones peneidos. Principios y prácticas. AGT editor, S.A. México.

McLean, RJC, Whitely, M, Stickler, DJ y Fuqua, WC. 1997. Evidence of autoinducer activity in naturally occurring biofilms. FEMS Mi-crobiol. Lett. **154:**259–263.

Miyamato Y, Kato T, Obara Y, Akiyama S, Takizawa K, Yamai S, 1969. *in vitro* hemolytic characteristic of *Vibrio parahaemolyticus*: its close correlation with human pathogenicity. J. Bacteriolo **100:** 1147-1149.

Montero, AB., y Austin, B. 1999. Characterization of extracellular products from an isolate of *Vibrio harveyi* recovered from diseased post-larval *Penaeus vannamei* (Bonne). J. Fish Dis. **22:** 277-386.

Montgomery, MT y Kirchman, DL. 1994. Induction of chitin-binding proteins during the specific attachment of the marine bacterium *Vibrio harveyi* to chitin. Appl. Environ. Microbiol. **60:** 4284-4288.

Muir, PR.1991. Factors affecting the survival of penaeid prawns. Ph.D thesis, James Cook. University of North Queensland, Townsville.

Nishibuchi, M. y Kaper, JB. 1985. Nucleotide sequence of the thermostable direct hemolysin gene of *Vibrio parahaemolyticus*. J. Bacteriol. **162:** 558-564.

Owens, L, Muir, P, Sutton, D y Wingfield, M. 1992. The pathology of microbial diseases in tropical Australian crustacea, p. 165–172. *In* I. M. Shariff, R. P. Subasinghe, and J. R. Arthur (ed.), Diseases in Asian aqua-culture. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, The Philippines.

Owens, L, Austin, DA y Austin, B. 1996. Effect of strain origin on siderophoro production in Vibrio harveyi isolates. Dis. Aquat Org. **27:** 157-160.

Pedersen, K, Verdonck, L, Austin, B, Austin, DA, Blanch, AR, Grimont, PAD, Jofre, J, Koblavi, S, Larsen, JL, Tiainen, T, Vigneulle, M, y Swings, J. 1998. Taxonomic evidence that *Vibrio carchariae* Grimes et al. 1985 is a junior synonym of *Vibrio harveyi* (Johnson and Shunk 1936) Baumann et al. 1981. Int. J. Syst. Bacteriol. **48:** 749-758.

Pizzutto, M, y Hirst, RG. 1995. Classification of isolates of *Vibrio harveyi* virulent to *Penaeus monodon* larvae by protein profile analysis and M13 DNA fingerprinting. Dis. Aquat. Org. **21:**61–68.

Robertson, PAW, Calderon, J, Carrera, L, Stark, JR, Zherdmant, M, y Austin, B. 1998. Experimental *Vibrio harveyi* infections in *Penaeus vannamei* larvae. Dis. Aquat. Org. **32:** 151-155.

Ruangpan, L, Danayadol, Y, Direkbusarakom, S, Sriurairatana, S y Flegel, TW. 1999. Letal toxicity of *Vibrio harveyi* to cultivated *Penaeus monodon* induced by a bacteriophago. Dis. Aquat. Org. 35: 195-201.

Suthienkul, O, Ishibashi, M, Iida, T, Nettip, N, Supavej, S, Eampokalap, B, et. al. 1995. Urease production correlates with possession of the *trh* gene in *Vibrio parahaemolyticus* strains isolated in Thailand. J Infect Dis. **172:** 1405-1408.

Svitil, AL, Chadhain, SM, Moore, JA y Kirchman, DL. 1997. Chitin degradation proteins produced by the bacterium *Vibrio harveyi* growing on different forms of chitin. Appl. Enveron. Microbiol. 63 (2): 408-413.

Swift, S, Throup,JP, Williams,P, Salmond, GPC y Stewart, GSAB. 1996. Quorum sensing: a population-density component in the determination of bacterial phenotype. Trends Biochem. Sci. **21:**214–219.

Taniguchi, H, Hirano, H, Kubomura, S, Higashi, K, y Mizuguchi, Y. 1986. Comparision of the nucleotide sequences of the genes for the thermostable direct hemolysin from *Vibrio parahaemolyticus*. Microb. Pathog. **1:** 425-432.

Tendencia, EA y De La Peña, LD. 2001. Antibiotic restance of bacteria from shrimp ponds. Aquaculture, **195:** 193-204.

Thompson, FL, Hoste, B, Vandemeulebroecke, K, Engelbeen, K, Denys, R, y Swings, J. 2002. *Vibrio trachuri* (Iwamoto et al. 1995) is a junior synonym of *Vibrio harveyi* (Johnson and Shunk 1936) Baumann et al. 1981. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **52:** 973-976.

Unzueta Bustamante, ML. 2000. Problemas patológicos en camarones peneidos de importancia comercial en las Americas. En: Memorias del III Simposium Internacional de Acuacultura. Culiacan, Sinaloa.

Zhang, XH. y Austin, B. 2000. Pathogenicity of *Vibrio harveyi* to salmonids. J. Fish Dis. 23: 93-102.

ANEXO

Las cepas bacterianas y medios de cultivo empleados en el estudio, se describen a continuación, tabla III.

Tabla III. Descripción y características de las cepas

CEPA	ORGANISMO	GENOTIPO	Fuente
NP (ATCC 14126)	*Vibrio harveyi*	Silvestre	Anfípodo moribundo
M1	*Vibrio harveyi*	Silvestre	Juveniles enfermos
PN (PN9801)	*Vibrio harveyi*	Silvestre	Estanques con reproductores
Z2	*Vibrio harveyi*	Silvestre	Estanques con reproductores
Z3	*Vibrio harveyi*	Silvestre	Estanques con reproductores

Los medios de cultivo, utilizados fueron: Medio de cultivo infusión de corazón (MIC), que contiene 25 g infusión de corazón (Difco), 20 g NaCl L^{-1} (*Vibrio harveyi*), reportado su uso principalmente en el área de biología molecular. Además se usó medio luminoso (MLL y MSL), por estar referido su empleo en los estudios mediante ensayos *in vivo*. Tabla IV.

Tabla IV. Composición de medio luminoso (MLL - líquido-, MSL –sólido-)

COMPONENTE	Cant/Lt
Amortiguador Tris-HCl 1 M (pH 7.5)	50 ml
Glicerol	3 ml
Cloruro de sodio (NaCl)	30 g
Cloruro de amonio (NH_4Cl)	5 g
Extracto de levadura	5 g
Carbonato de calcio (CaCO3)	1 g
Triptona (Digestión pancreática de Caseína)	5 g
Fosfato de potasio dibásico (K2HPO4)	3.9 g
Fosfato de potasio monobásico (KH2PO4)	2.1 g
Sulfato de magnesio heptahidratado ($MgSO_4$-7H2O)	1 g
Cloruro de potasio (KCl)	0.75 g
Agar	20 g

PURIFICACIÓN DE DNA MEDIANTE EL MÉTODO 'Gene releaser' (Procedimiento en microondas)

1. Purificar DNA cromosómico de *Vibrio,* transfiriendo a tubo una asada de medio sólido o 500 µl de medio líquido. Posteriormente adicionar 50 µl de agua destilada.

2. Agitar en 'vortex', centrifugar 2.5 min a 12000 rpm y descartar sobrenadante.

3. Adicionar 20 µl de solución amortiguadora TE pH 8.0. Repetir paso 2.

4. Adicionar 50 µl de TE y 10 µl de reactivo 'gene releaser'.

5. Agitar en 'vortex' 30 seg, colocar 'parafilm' y tapa de seguridad a tubo Epp, calentar la mezcla en horno de microondas durante 1 min a intervalos de 10 seg.

6. Centrifugar 30 seg, transferir 20 µl del sobrenadante a tubo limpio, adicionar 30 µl de TE y almacenar a -20°C.

AMPLIFICACIÓN DEL 16S DNA RIBOSOMAL MEDIANTE PCR

1. Preparar mezcla de reacción de acuerdo a tabla V:

Tabla V. Mezcla de reacción PCR, 16S ribosomal

Reactivo	µl/tubo rx		Vol final
Amortiguador enzima	5 µl	Multiplicar por el número de tubos p.e. 7 tubos	35 µl
$MgCl_2$	3 µl		21 µl
dNTP's	1 µl		7 µl
Oligonucleótido sentido (5' ccgtcgacagagtttgatcctggctcag3')	1 µl		7 µl
Oligonucleótido antisentido (5'cgggatccaccttgttacgacttcaccc3')	1 µl		7 µl
Taq polimerasa (1U/µl)	0.2 µl		1.4 µl

2. La sumatoria de la columna volumen final (p.e 78.4 µl), menos el valor obtenido de la multiplicación del volumen de reacción sin DNA por el número de tubos (p.e 45 * 7 = 315 µl). El valor resultante es el volumen de agua requerido para obtener 45 µl de la mezcla para cada tubo (p.e 236.6 µl).

3. Adicionar a cada tubo el DNA correspondiente (5 µl), para obtener 50 µl en el tubo de reacción.

4. En termociclador, realizar la reacción en cadena de la polimerasa, bajo el programa, en tabla VI:

Tabla VI. Programa de parámetros de PCR, 16S rib

Programa		Parámetros(T° y t)	Repeticiones
Ciclo 1	Desnaturalización	95°C, 6 min	1
Ciclo 2	Desnaturalización Alineamiento Elongación	95°C, 1 min 55°C, 1 min 72°C, 2 min	25
Ciclo 3	Elongación	72°C, 10 min 4°C	1 ∞

5. Realizar electroforesis, aplicar en gel de agarosa al 1.2 % las muestras del PCR, bajo los siguientes parámetros: 20 min a 50V (separación de colorantes) y 30 min a 100V; finalmente observar en analizador de DNA (tomar fotografía).

ANÁLISIS DE RESTRICCIÓN DE LAS CEPAS DE *Vibrio* CON ENZIMAS *Msp I* y *Sau 3A I*

1. Prepara mezcla de reacción, conforme tabla VII:

Tabla VII. Mezcla de reacción para digestión con enzima de restricción

Reactivo	µl/tubo rx		Vol final
Agua destilada	21 µl	Multiplicar por el número de tubos	231 µl
Amortiguador enzima	3 µl		33 µl
Enzima (5U/µl)	1 µl	p.e. 11 tubos	11 µl
Cóctel	Dividir en 25 µl para cada tubo rx		275 µl
DNA amplificado (PCR)	Adicionar 5 µl a cada tubo de rx		---

2. Incubar en baño a 37°C durante 3 horas ('parafilm' y tapa de seguridad), revisar cada hora.

3. Enfriar en baño de hielo durante 5 min, adicionar colorante (3 µl por cada 30 µl de la mezcla de reacción).

4. Mezclar y tomar 20 µl para aplicar a gel las muestras de la restricción.

5. Realizar electroforesis en gel de poliacrilamida 30:0.8 %, bajo las siguientes condiciones (35 min a 50 V y 60 min a 120 V).

CURVA DE CRECIMIENTO DE LAS CEPAS DE *Vibrio harveyi*

1. Sembrar en MSL cepas.
2. Incubar a 28°C de 12 a 24 h.
3. Inocular asada a 20 MLL (matraz).
4. Incubar toda la noche 28 °C a 200 rpm
5. preparar preinóculos (50 µl glicerol estéril + 500 µl de cultivo)
6. PREINÓCULO: Inocular 200 µl de la fracción correspondiente (curvas anteriores) en 20 ml de MLL y MIC
7. Incubar toda la noche 28°C a 200 rpm (~13 h)
8. Inocular 1 ml de preinóculo (cultivo toda la noche) a 20 MLL (matraz)
9. Incubar 1 h, 28°C a 200 rpm (inóculo)
10. Sincronizar cultivo

    Del tubo que presente abs 0.5 (D.O). Realizar calculó para obtener el volumen requerido (0.5 a 2 ml). $C_1V_1 = C_2V_2$
11. Iniciar curva, inoculando volumen requerido a 20 ml de MLL (08 D.O)
12. Incubar durante 2h, 28°C a 200 rpm
13. Registrar Absorbancia a 600 nm de una dilución 1:2 (500 µl de cultivo + 500 µl medio cultivo).
14. Muestreo para recuperar extracto crudo y células (Ensayos *in vivo*)
15. Tomar 1.0 ml muestra, centrifugar 5' a 14000 rpm, recuperar sedimento, nitrógeno líquido y almacenar –20°C (Células)
16. Tomar 1.0 ml muestra, centrifugar 5' a 14000 rpm, recuperar sobrenadante, nitrógeno líquido y almacenar –70°C (Extracto crudo)
17. Repetir pasos 9 a 12 por 4 h hasta la hora 8, para tomar muestras a diferentes tiempos y así evaluar el momento de expresión de los factores de virulencia.

ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EN CAJA PETRI

PROTEASAS

1. Preparar medio de cultivo (base MSL, LB o MIC, dependiendo de las muestras por inocular), adicionado con Skim-Milk
2. Impregnar sensidiscos con 20 µl de muestra e inocular estos en caja Petri.
3. Incubar a 28 y 37°C durante 24 h.
4. Observar y determinar presencia de halo degradativo.

AMILASAS

1. Preparar medio de cultivo (base MSL, LB o MIC, dependiendo de las muestras por inocular), adicionado con almidón.
2. Impregnar sensidiscos con 20 µl de muestra e inocular estos en caja Petri.
3. Incubar a 28 y 37°C durante 24 h.
4. Revelar con vapores de Iodo (I_2) (calentar granulos en campana)
5. Determinar presencia de halo degradativo y medirlo.

LIPASAS

1. Preparar medio de cultivo (base MSL, LB o MIC, dependiendo de las muestras por inocular), adicionado con aceite de oliva y rodamina B.
2. Impregnar sensidiscos con 20 µl de muestra e inocular estos en caja Petri.
3. Incubar a 28 y 37°C durante 24 h.
4. Exponer a luz UV, observar intensidad (fotografiar).
5. Determinar la formación de colonias rosadas.

HEMOLISINAS

1. Cajas de agar sangre comerciales (sangre de humano)
2. Impregnar sensidiscos con 20 µl de muestra e inocular estos en caja Petri.
3. Incubar a 28 y 37°C durante 24 h.
4. Observar presencia de halo degradativo alrededor del disco (fotografiar).

EXTRACCIÓN DE DNA MÉTODO FENOL/CLOROFORMO A PARTIR DE CULTIVO SÓLIDOS DE *Vibrio harveyi*

1. Crecer cepas en caja MSL, durante 18-24 h a 28°C
2. Tomar muestra con palillo
3. Transferir a tubo Epp con 1.5 ml de Buffer TE pH 8.0
4. Agitar en 'vortex', para homogenizar el sedimento
5. Lavar 2 veces con TE
    a. Centrifugar 3 min a 12000 rpm
    b. Decantar TE, extraer el exceso con pipeta
    c. Adicionar 1.5 ml de TE, 'vortex' & mismo proceso a,b
6. Resuspender en 567 µl de TE
7. Agitar en 'vortex' hasta resuspender el sedimento tomar muestra con palillo
8. Adicionar 5 µl lisozima (10 mg/ml, almacenar a -20°C)
9. Agitar suavemente (por inversión o con dedo)
10. Incubar 37°C por 10 min (baño María)
11. Adicionar 10 µl RNAasa (10 mg/ml, almacenar a -20°C)
12. Incubar 20 min a 37°C
13. Adicionar 30 µl SDS 10% (mezclar suavemente)
14. Adicionar 3 µl de proteinasa K (20 mg/ml, almacenar a -20°C)
15. Incubar 1h a 37°C, agitar por inversión cada 15 min
16. Adicionar 100 µl NaCl 5M y mezclar
17. Adicionar 80 µl CTAB-NaCl (precalentar en baño a 37°C)
18. Mezclar e incubar a 65°C en 'termoblock' durante 10 min (parafilm y tapa seguridad)
19. Adicionar 700 µl de fenol puro, 'vortex' y centrifugar 5 min a 14000 rpm
20. Recuperar FAS (fase acuosa superior ~700 µl)
21. Repetir paso 19 y 20

22. Extraer con cloroformo puro (700 µl), 'vortex' y centrifugar 5 min a 14000 rpm
23. Recuperar FAS (~600 µl)
24. Adicionar 700 µl de la mezcla cloroformo/R-OH isoamílico
25. Agitar en 'vortex' y centrifugar 5 min a 14000 rpm
26. Transferir sobrenadante acuoso-viscoso (~500 µl)
27. Adicionar igual volumen de Fenol/Cloroformo/R-OH isoamílico
28. Agitar en 'vortex' y centrifugar 5 min a 14000 rpm
29. Transferir el sobrenadante acuoso ~600 µl ....(300-500 µl)
30. Adicionar 0.6 volúmenes de isopropanol (360 µl, si 600 µl) a cada tubo
31. Agitar por inversión y centrifugar 10 min a 14000 rpm
32. Decantar y invertir los tubos sobre papel secante
33. Lavar con 1 ml de EtOH 70%, almacenar a -20°C
34. Agitar en 'vortex' y centrifugar 5 min a 14000 rpm
35. Decantar sobrenadante y repetir paso 33 & 34
36. Descartar sobrenadante, invertir los tubos sobre papel secante
37. Secar en rota evaporador 10 min. a 30°C en fase alcohol (vacufuge)
38. Disolver el sedimento en 100 µl TE, almacenar a -20°C (En el momento de usarlo)
39. Verificar en gel de agarosa al 1.2%
40. Aplicar 5 µl DNA y 2 µl colorante, parámetros electroforesis 20' 50 V (teñir) y 40' 100 V

AMPLIFICACIÓN DEL GEN DE HEMOLISINA MEDIANTE PCR

1. Preparar mezcla de reacción de acuerdo a tabla VIII:

Tabla VIII. Mezcla de reacción PCR, hemolisina

Reactivo	µl/tubo rx		Vol final
Amortiguador enzima/ $MgCl_2$	5 µl	Multiplicar por el número de tubos	35 µl
dNTP's	1 µl		7 µl
Oligonucleótido sentido (5'gccgataaccgtttctcc3')	1 µl		7 µl
Oligonucleótido antisentido (5'ctttcaaacagtgcatgcg3')	1 µl	p.e. 7 tubos	7 µl
Taq polimerasa (10U/µl)	1 µl		7 µl

2. La sumatoria de la columna volumen final (p.e 63 µl), menos el valor obtenido de la multiplicación del volumen de reacción sin DNA por el número de tubos (p.e 49 * 7 = 343 µl). El valor resultante es el volumen de agua requerido para obtener 49 µl de la mezcla para cada tubo (p.e 280 µl).

3. Adicionar a cada tubo el DNA correspondiente (1 µl), para obtener 50 µl en el tubo de reacción.

4. En termociclador, realizar la reacción en cadena de la polimerasa, bajo el programa, en tabla IX:

Tabla IX. Mezcla de reacción PCR, hemolisina

Programa		Parámetros(T° y t)	Repeticiones
Ciclo 1	Desnaturalización	95°C, 6 min	1
Ciclo 2	Desnaturalización Alineamiento Elongación	95°C, 1 min 51°C, 1 min 72°C, 2 min	25
Ciclo 3	Elongación	72°C, 10 min 4°C	1 ∞

5. Realizar electroforesis, aplicar en gel de agarosa al 1.6 % las muestras del PCR (1 µl colorante + 9 µl DE muestra), bajo los siguientes parámetros: 20 min a 50V (separación de colorantes y 30 min a 100V; finalmente observar en analizador de DNA (tomar fotografía).

SECUENCIACIÓN

1. Preparar muestras Para enviar a secuenciar

2. Preparar columna cromatografica de exclusión molecular, empaquetar con Sephadex G-50 resuspendido en agua destilada/desionizada (H_2O_{dd})

3. Aplicar muestra (producto de PCR), eluir con H_2O_{dd} y recolectar fracciones

4. Determinar la concentración de DNA espectrofotométricamente (Relación 260/280)

5. Evaporar por vacio (4-6 h) a 30°C

6. Resuspender en H_2O_{dd} (obteniendo una concentración de 1 µg/µl de DNA purificado)

7. Realizar Electroforesis, para determinar en que fracción se encuentra el DNA purificado

8. Enviar la muestra a 'San Diego State' para su secuenciación.