



ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DEL LITORAL

**FACULTAD DE INGENIERIA MARITIMA
Y CIENCIAS DEL MAR**

**“DESARROLLO Y ANALISIS DE SONDAS
NUCLEICAS COMO HERRAMIENTAS
DE DIAGNOSTICO EN LA LARVICULTURA
DE CAMARONES PENEIDOS”**

TESIS DE GRADO

Prevía la obtención del título de:
ACUICULTOR

Presentada por:
César Bedoya Piloza

GUAYAQUIL-ECUADOR

1996

DEDICATORIA

A MIS PADRES

Por creer en mí

AGRADECIMIENTO

A Dios, por brindarme su amor y ayuda cuando más lo necesitaba.

A mis padres por “soportarme”.

A mi familia por su cariño y aliento.

Al CENAIM, en la persona de Jorge Calderón V., Ph.D., por haberme dado la oportunidad de desarrollar esta tesis.

Al personal del CENAIM y en especial a mis amigos del “PIG” (Programa Patología, Inmunología y Genética) por su cooperación y simpatía.

A Eric por mostrarme el maravilloso mundo de la ciencia y enseñarme los tesoros más valiosos del universo, la humildad y la sinceridad.

A Emmerik por guiarme y brindarme su amistad.

A Rafaela por ser una excelente profesional y compañera de trabajo.

A mis compañeros de tesis, por “ ser como son”.

A Lucía, quien fue la primera persona que tuvo fé en mí, dondequiera que estes, GRACIAS, te quiero.

DECLARACION EXPRESA

“La responsabilidad por los hechos, ideas y doctrinas expuestos en esta tesis, me corresponden exclusivamente; y el patrimonio intelectual de la misma, a la ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DEL LITORAL.”

(Reglamento de Exámenes y Títulos profesionales de la ESPOL.)



.....
César Bedoya Piloza



Jorge Calderón, Ph.D.
Presidente del tribunal



Eric Mialhe, Ph.D.
Director de Tesis



Tamara de Ross, Ing.
Vocal Principal



Jerry Landívar, M.Sc.
Vocal Principal

RESUMEN

El proyecto tuvo dos componentes: en primer lugar, el desarrollo de una sonda homóloga de una cepa probablemente probiótica de *Vibrio alginolyticus* y de una prueba basada en este reactivo, y en segundo lugar la evaluación de una sonda heteróloga de densovirus de camarón (IHHNV).

La sonda homóloga fue preparada a partir del ADN plasmídico de la cepa 158 de *Vibrio alginolyticus*. Este tipo de ADN fue encontrado también en otras cepas, 160 y 166, del mismo vibrio. El plásmido fue marcado con digoxigenina según la técnica "Random primer labeling", y se evaluó su sensibilidad y especificidad mediante la técnica del Dot Blot. Se determinó que la sonda podía detectar hasta 10 pg de ADN plasmídico, en cuanto a su especificidad reaccionó con los ADNs de las cepas 160 y 166, sugiriendo la posibilidad que en realidad estas tres cepas posean el mismo tipo de plásmido. No presentó reacción con la cepa ILI de *Vibrio alginolyticus*, supuestamente del mismo tipo que la cepa 158, tampoco reaccionó con cepas de *Vibrio harveyi* ni con ADNs de otros orígenes. Se desarrolló la técnica del Colony Blot debido a que presenta las mejores características para utilizar este reactivo tanto en el diagnóstico de rutina como en el estudio de la probiosis en la larvicultura de camarones peneidos.

Se evaluó una sonda heteróloga de densovirus de camarón (IHHNV) preparada a partir del genoma completo del densovirus del lepidóptero *Junonia Cænia*. La evaluación se la realizó mediante la técnica del Dot Blot y se tomó como referencia la sonda del Kit "IHHNV shrimp probe" de DiagXotics. Los resultados mostraron que la sonda reconocía a las muestras que poseían al virus aunque la señal de reconocimiento era muy baja, por otro lado la sonda reaccionó con el control positivo del referido kit. Estos resultados abren la posibilidad de que las sondas heterólogas podrían ser utilizados en el futuro como herramientas de diagnóstico en el cultivo de camarones.

INDICE GENERAL

RESUMEN.....	i
INDICE GENERAL.....	ii
INDICE DE FIGURAS.....	v
INDICE DE TABLAS.....	vi
INTRODUCCION	vii

CAPITULO I

ANTECEDENTES.....	14
1.1. EL ADN COMO EL SOPORTE DE.....	14
INFORMACIÓN GENÉTICA.	
1.2. ESTRUCTURA DEL ADN.....	16
1.3. REPLICACIÓN DEL ADN.....	20
1.4. ORGANIZACIÓN DE GENOMAS.....	22
1.5. TECNOLOGÍA DE ADN.....	24
1.6. SONDAS NUCLEICAS.....	29
1.6.1. PARÁMETROS DE INTERÉS	
EN LA REACCIÓN DE HIBRIDACIÓN.....	31
1.6.2. APLICACIÓN DE LAS SONDAS	
NUCLEICAS Y DE TÉCNICAS DE	
HIBRIDACIÓN PARA EL DIAGNÓSTICO	
DE ENFERMEDADES EN ACUICULTURA.....	36

CAPITULO II

MATERIALES Y METODOS.....	37
2.1. MATERIAL BIOLÓGICO.....	37
2.2. MÉTODOS.....	38
2.2.1 EXTRACCIÓN DE ADN PLASMÍDICO.....	38
2.2.1.1. MÉTODO DE LISIS	
ALCALINA: MINIPREP.....	38
2.2.1. 2. MÉTODO DE LISIS	

ALCALINA: MAXIPREP.....	39
2.2.1. 3. MÉTODO QIAGEN: MINI PREP.....	41
2.2.2. EXTRACCIÓN ADN GENÓMICO.....	43
2.3.1. TÉCNICA DE EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO DEL MOSQUITO <i>ANOPHELES GAMBIAE</i>	43
2.2.3. DIGESTIÓN ENZIMÁTICA DEL ADN.....	45
2.2. 4. VISUALIZACIÓN DEL ADN.....	45
2.5.1. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA.....	45
2.2.5. CUANTIFICACIÓN DE ADN Y ESTIMACIÓN DE SU PUREZA.....	46
2.2.6. PURIFICACIÓN DE UN FRAGMENTO DE ADN.....	47
2.2.6.1. GEN CLEAN.....	47
2.2.7. MARCADO DE ADN CON DIGOXIGENINA.....	48
2.2.7.1. MÉTODO RANDOM PRIMED DNA LABELING.....	48
2.2.8. TÉCNICAS DE DETECCIÓN DE ADN.....	50
2.2.8.1. TÉCNICAS DE HIBRIDACIÓN CON SONDAS NUCLEICAS.....	50
2.2.8.1.1. SOUTHERN BLOT.....	50
2.2.8.1.2. ADN DOT BLOTTING.....	52
2.2.8.1.3. COLONY HYBRIDIZATIONS.....	53
2.2.8.2. VISUALIZACIÓN DE LA HIBRIDACIÓN.....	54
2.2.8.2.1. DETECCIÓN COLORIMÉ- TRICA CON NBT Y X-PHOSPHATE.....	54

CAPITULO III

RESULTADOS.....	56
-----------------	----

3.1. DESARROLLO DE SONDAS NUCLEICAS Y PRUEBAS DE TIPO DOT-BLOT Y COLONY-

BLOT ESPECÍFICAS DE LA CEPA 158 DE <i>VIBRIO ALGINOLYTICUS</i> , ASOCIADA A <i>PENAEUS VANNAMEI</i>	57
3.1.1. PUESTA EN EVIDENCIA Y CARACTERIZACIÓN DE UN PLÁSMIDO.....	57
3.1.2. PREPARACIÓN DE UNA SONDA NUCLEICA “FRÍA”.....	61
3.1.3. DESARROLLO DE UNA PRUEBA DE TIPO COLONY-BLOT CON LA SONDA NUCLEICA CORRESPONDIENTE AL PLÁSMIDO DE LA CEPA 158.....	63
3.2. EVALUACIÓN DE UNA SONDA ESPECÍFICA DEL DENSOVIRUS DEL LEPIDÓPTERO <i>JUNONIA CÆNIA</i> PARA EL DIAGNÓSTICO DE IHHNV.....	66
3.2.1. PREPARACIÓN DE UNA SONDA “FRÍA” ESPECÍFICA DE DENSOVIRUS DE <i>JUNONIA CÆNIA</i>	67
.	
CONCLUSIONES	71
RECOMENDACIONES.....	74
ANEXO.....	75
BIBLIOGRAFIA.....	83

INDICE DE FIGURAS

Figura 1: El ADN	14
Figura 2: ARN de transferencia.....	15
Figura 3: El ácido ribonucleico (ARN).....	17
Figura 4: Esqueleto azúcar-fosfato.....	18
Figura 5: Complementariedad de bases.....	19
Figura 6: Síntesis de ADN, proceso semiconservativo.....	20
Figura 7: Síntesis de ADN, aparato de replicación.....	21
Figura 8: Organización del cromosoma.....	22
Figura 9: Tecnología del ADN.....	24
Figura 10: Vectores de clonaje.....	28
Figura 11: Sondas nucleicas.....	30
Figura 12: Southern blot.....	32
Figura 13: Dot blot.....	33
Figura 14: Colony blot.....	34
Figura 15: Plásmido recombinante PBRJ con el genoma completo de <i>Junonia Cænia</i>	38
Figura 16: Random primer labeling.....	49
Figura 17: Extracción ADN total cepa 158.....	58
Figura 18: ADN plasmídico de la cepa 158 digerido.....	60
Figura 19: Dot blot de especificidad de la sonda p158.....	63
Figura 20: Evaluación de sensibilidad y especificidad de la sonda Jc.....	69
Figura 21: Evaluación de la respuesta de la sonda Jc.....	70

INDICE DE TABLAS

Tabla I: Enzimas de restricción.....	26
Tabla II: Reactivos utilizados en el marcado con digoxigenina.....	49
Tabla III: Enzimas de restricción.....	65

INTRODUCCION

La acuicultura de camarones peneidos ha crecido vertiginosamente en los últimos años, poseyendo el Ecuador un lugar muy destacado dentro de esta industria. Con el incremento en la producción han aparecido un serie de problemas patológicos (especialmente infecciosos) que amenazan al sector camaronicultor.

Las etiologías de algunas de estas enfermedades permanecen aún idiopáticas y poseen una epizootia rápida y devastadora (Ej. el Síndrome de Taura o el Síndrome de la Zoea 2). Por otro lado ciertas patologías han pasado de epidémicas a endémicas como es el caso del Síndrome de Bolitas en larvicultura o el de las gregarinas y los baculovirus en la fase de engorde de las camaroneras.

En la actualidad no se disponen de medios eficaces para eliminar a algunos de estos patógenos. Tal situación hace que sea necesario un diagnóstico precoz y confiable que permita tomar medidas preventivas para evitar la propagación de la enfermedad. Ninguna de las técnicas tradicionales puede brindar este tipo de diagnóstico entonces es prioritario que sean implementados métodos alternativos sensibles y rápidos basados en reactivos muy específicos (Mialhe, 1990; Mialhe et al, 1992; Mialhe et al, a consideración **a y b**).

Las tecnologías de diagnóstico basadas en sondas moleculares cumplen con estos requerimientos. Gracias a ello durante los últimos 10 años la patología de invertebrados marinos ha pasado de una descripción morfológica y un diagnóstico microscópico de los patógenos a una caracterización profunda y reconocimiento sensible de los mismos. Las sondas moleculares son agrupadas en dos tipos de tecnologías: de Anticuerpos y de Sondas Nucleicas.

La tecnología de anticuerpos presenta dos clases de herramientas, los anticuerpos monoclonales (producidos por hibridomas resultantes de la fusión de linfocitos, productores de anticuerpos, con células cancerosas o mielomas) y los anticuerpos policlonales. Ambos pueden ser usados para el reconocimiento de patógenos (antígenos) mediante pruebas de colony blot, dot blot y ELISA. La diferencia entre ambos tipos radica en que los monoclonales al poseer un solo epítipo son más específicos y están disponibles siempre en grandes cantidades.

La tecnología de sondas nucleicas esta basada en la detección de ADN o ARN de un patógeno en una muestra por hibridación específica de las secuencias complementarias de ADN o ARN del patógeno con el ADN o ARN de una sonda nucleica. Una sonda nucleica consiste en un fragmento monocatenario de un ácido nucleico (ADN o ARN) marcado, que tiene la capacidad de hibridarse por complementariedad de los nucleótidos con el ADN o ARN objetivo. Este fragmento es altamente específico de la secuencia objetivo de ahí que se constituye como una herramienta de diagnóstico muy valiosa. Existen también técnicas especiales para utilizar estos reactivos, como son: Southern Blot, Dot Blot y Colony blot.

El presente proyecto busca explorar la utilización de las sondas nucleicas como herramientas de diagnóstico para su aplicación en la camaronicultura de peneidos. Para este fin se han trazado los siguientes objetivos:

- Desarrollar sondas nucleicas homólogas y pruebas de diagnóstico específicas de una bacteria asociada a larvas de *Penaeus vannamei*
- Evaluar una sonda heteróloga específica de un densovirus de insecto para el diagnóstico de densovirus de camarón (IHHNV).

CAPITULO I

ANTECEDENTES

1.1. El ADN como el soporte de información genética.

El ácido desoxiribonucleico (ADN) es el material genético de todos los organismos, microorganismos y de un gran número de virus aunque algunos de ellos tienen el ácido ribonucleico (ARN) como material genético. El ADN (figura 1) y ARN están constituidos por elementos de base llamados nucleótidos, que difieren en la naturaleza del azúcar, desoxiribosa y ribosa respectivamente.

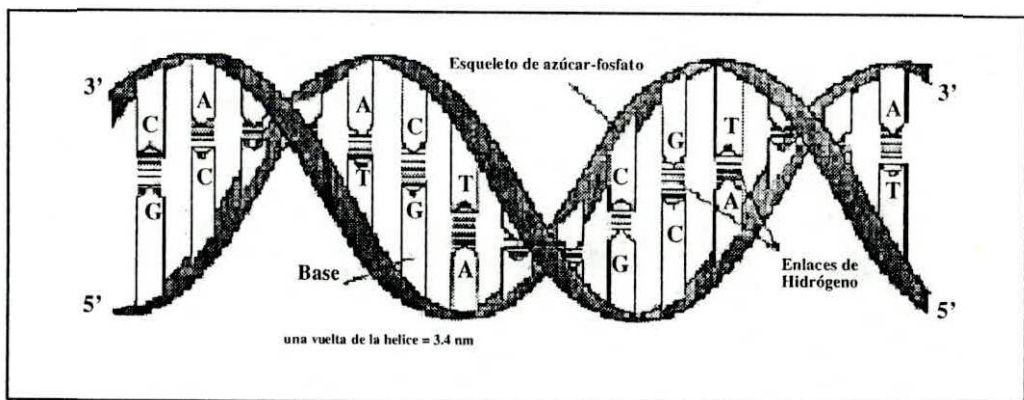


Figura 1: El ADN, tomado de *Microbiology, second edition, 1993 (Prescott, Harley. Klein), W.A.C. publishers.*

La expresión del material genético reposa sobre dos procesos consecutivos, la transcripción y la traducción.

La transcripción se efectúa mediante una enzima llamada la ARN polimerasa, cuya función es la producción de una molécula de ARN que es la copia de secuencia de una parte de la molécula de ADN portadora de la información global. Esta secuencia

parcial puede corresponder: a genes de ARNs ribosómicos, que son los elementos constitutivos principales del ribosoma; a genes de ARNs de transferencia (ARNt), que son moléculas transportadoras de los amino ácidos para la síntesis de proteínas; a genes codificadores de proteínas celulares, genes que son transcritos en moléculas llamadas ARN mensajero (ARNm).

La traducción de los ARNm en proteínas se efectúa mediante la lectura de su secuencia en el ribosoma, lectura que se efectúa de tres en tres nucleótidos (tres nucleótidos = un codón). El proceso de traducción empieza a nivel del codon de iniciación (AUG) y termina a nivel de codones de terminación. La traducción de la información ARNm en proteína necesita la participación de los ARNt (figura 2) que transportan sucesivamente el amino ácido correspondiente a cada codón. Así, una secuencia específica de nucleótidos corresponde a una secuencia específica de amino ácidos, es decir, que a un gen corresponde una proteína. Muchos genes en células eucariotas están interrumpidos por secuencias no codificantes llamadas intrones. Los segmentos codificantes separados por los intrones son llamados exones (Lehninger et al, 1993).

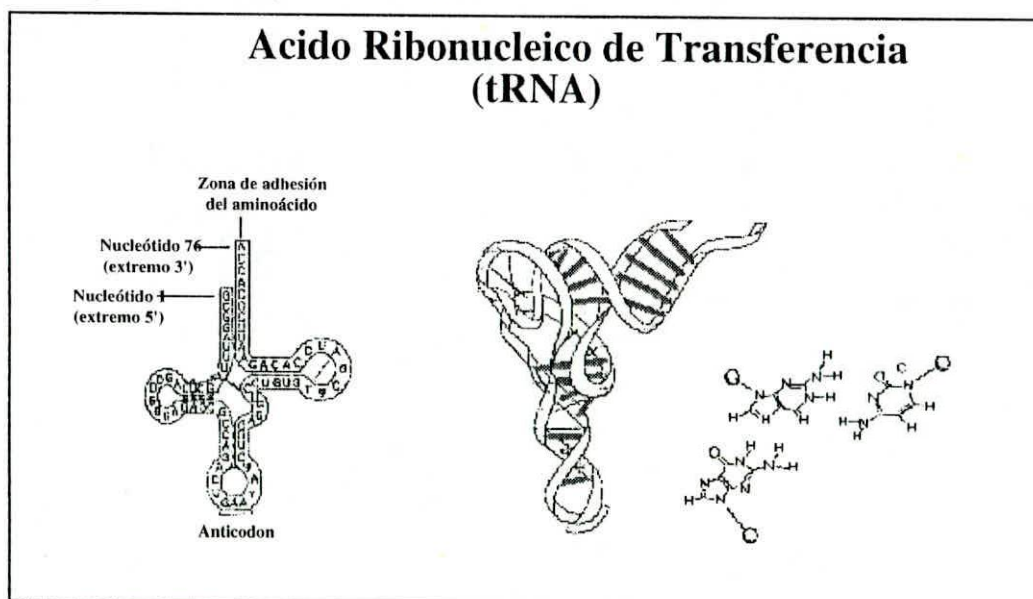


Figura 2: ARN de transferencia, tomado de *Microbiology, second edition, 1993* (Prescott, Harley. Klein), W.A.C. publishers.

El ADN, en cierta forma, se parece a una película de cine. Como en el filme, el ADN está subdividido en cuadros que tienen sentido cuando son vistos en correcto orden, estos cuadros son denominados nucleótidos. Cuando una serie de cuadros o nucleótidos están organizados en una combinación específica, ellos crean una escena en el caso del filme y un gene en el caso del ADN (Drilca, 1992).

En las células eucariotas, moléculas de ADN se encuentran dentro del núcleo (ADN cromosómico) y en diferentes organelas, las mitocondrias y los cloroplastos, característicos de las células vegetales.

En las procariotas tenemos ADN genómico libre en el citoplasma y ocasionalmente, ADN extracromosómico conocido como plásmídico.

Los virus tienen un genoma constituido por ADN o ARN.

1.2. Estructura del ADN

La molécula de ADN está generalmente formada por una doble cadena en hélice, cada una constituida de nucleótidos. Cada nucleótido está formado por un azúcar pentosa (un azúcar de 5 carbonos en forma de anillo), una base nitrogenada (un anillo heterocíclico de carbón y anillos de nitrógeno) y un grupo fosfato (Lewin, 1994).

Dos tipos de pentosa son encontrados en los ácidos nucleicos caracterizándolos con sus respectivos nombres. En el ADN la pentosa es una 2-desoxirribosa; y en el ARN es una ribosa. La base nitrogenada ligada al azúcar es llamada nucleósido cuando un grupo fosfato es añadido, la base-azúcar-fosfato es llamada nucleótido (Lewin, 1994).

Las bases nitrogenadas son de dos tipos: pirimidinas y purinas. Las pirimidinas tienen una estructura en anillo de 6 elementos; las purinas tienen dos anillos fusionados, de 5 y 6 elementos respectivamente.

Cada tipo de ácido nucleico contiene cuatro tipos de bases. Adenina y guanina, están presentes tanto en ADN como en ARN. Las dos pirimidinas en el ADN son citosina y timina; en el ARN el uracilo es encontrado en el lugar de la timina. Las bases son usualmente referidas por las letras iniciales, así el ADN contiene A, G, C, T mientras que el ARN contiene A, G, C, U (figura 3).

El grupo fosfato le da al ADN una carga eléctrica negativa. Cuando el ADN está en solución, *in vitro*, las cargas se neutralizan con la adición de iones metálicos;

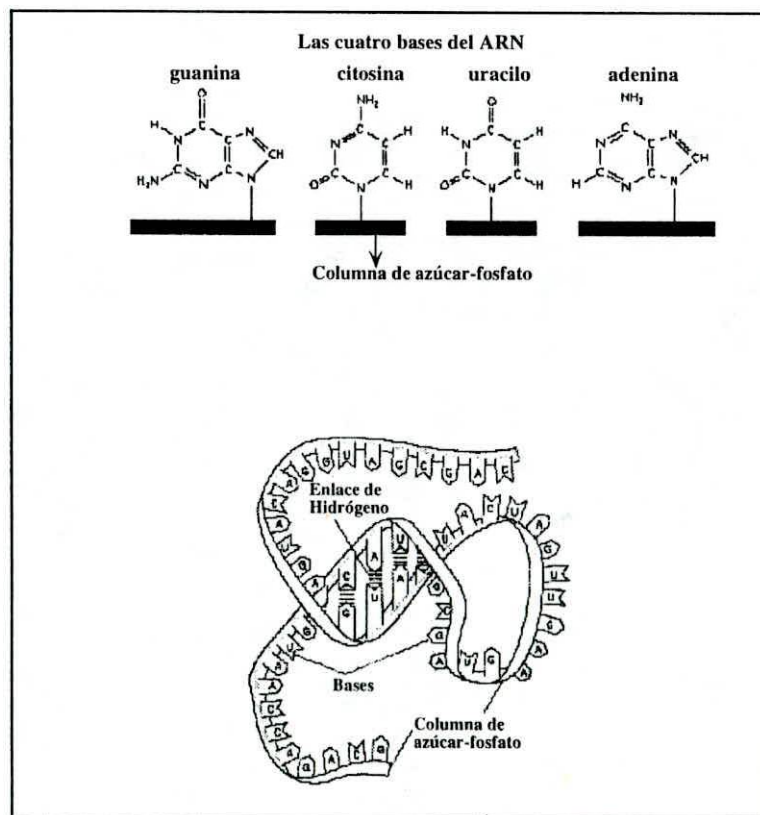


Fig 3: El ácido ribonucleico (ARN), tomado de *Microbiology, second edition, 1993 (Prescott, Harley. Klein), W.A.C. publishers.*

usualmente Na^+ es el que provee esta carga. En el estado natural, *in vivo*, las proteínas cargadas positivamente proveen de la fuerza neutralizadora.

Los nucleótidos son los bloques de construcción con los cuales los ácidos nucleicos serán contruidos. Los nucleótidos están unidos uno al otro en una cadena polinucleotídica, la cual descansa sobre una columna vertebral consistente en series alternativas de residuos de azúcar y fosfato. La posición 5' de un anillo de pentosa está conectada a la posición 3' del siguiente anillo de pentosa a través del grupo fosfato. Entonces el esqueleto azúcar-fosfato se dice que consiste de uniones fosfodiéster 5'-3' (figura 4).

Las dos cadenas de polinucleótidos se unen por puentes de hidrógeno entre las bases nitrogenadas. Usualmente la guanina se une mediante un doble enlace de

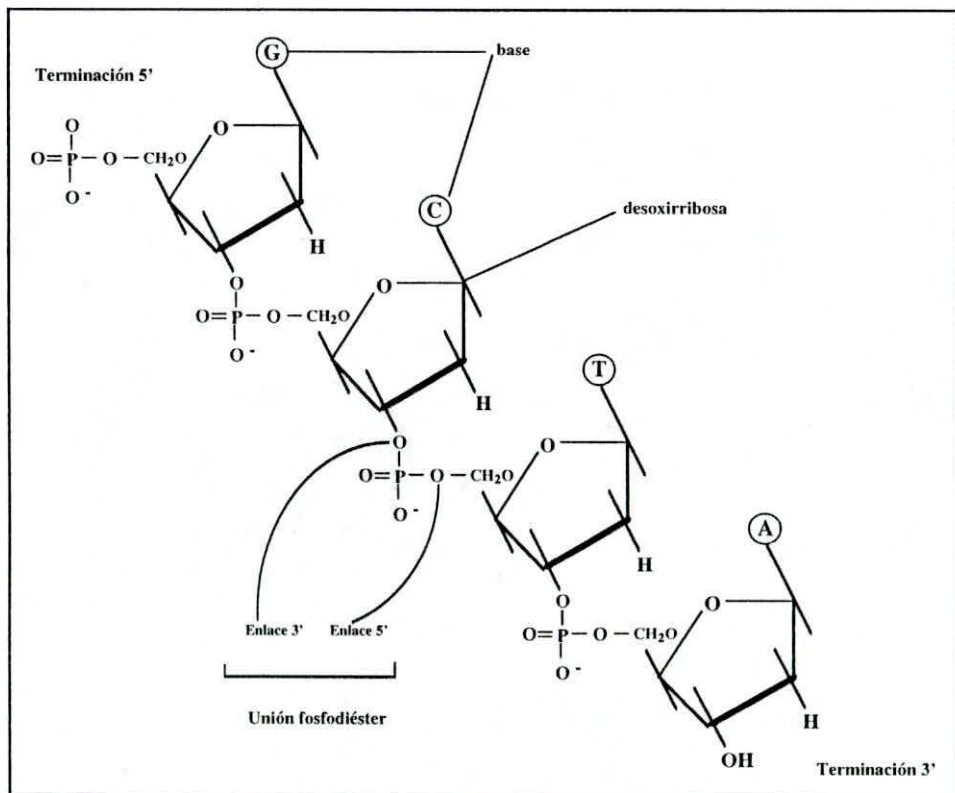


Figura 4: Esqueleto azúcar-fosfato tomado de *Genes V, fifth edition*, (Benjamin Lewin), Oxford university Press/Inc, New York

hidrógeno específicamente a la citosina, mientras la adenina con un triple puente de hidrógeno se une solamente con la timina. Estas reacciones son descritas como apareamiento de bases, y las bases apareadas se dice que son complementarias (figura 5).

El nucleótido terminal de una de las cadenas posee el carbono 5' libre mientras que la otra cadena tiene el carbono 3' libre. Es convención escribir las secuencias de los ácidos nucleicos en dirección 5'-3', o sea, dejando la terminación 5' a la izquierda y la 3' a la derecha. Las dos cadenas de polinucleótidos son antiparalelas. Así, a lo largo de la hélice una cadena corre en dirección 5'-3' y la otra 3'-5' (Lewin, 1994).

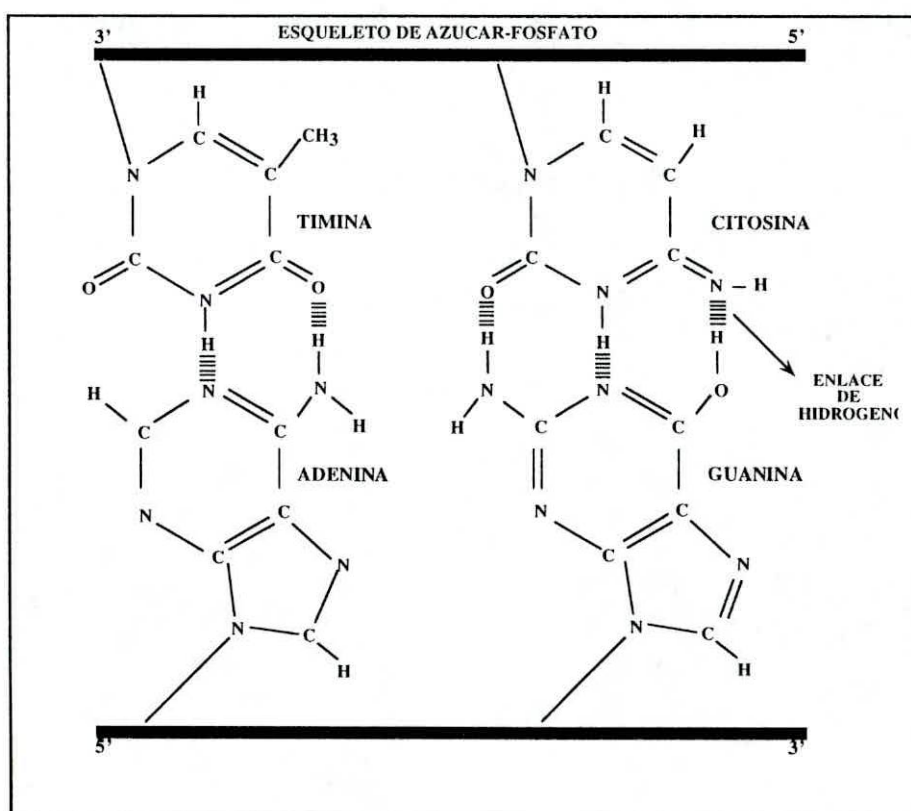


Figura 5: Complementariedad de bases, tomado de *Microbiology, second edition*, 1993 (Prescott, Harley, Klein), W.A.C. publishers.

Las bases nitrogenadas son estructuras planas dispuestas perpendicularmente al eje de la hélice. Hay que considerar que la doble hélice en término de una escalera

espiral, los pares de bases forman los peldaños. Los pares de bases contribuyen a la estabilidad termodinámica de la doble hélice liberando energía de dos maneras: por la formación de pares de bases y por las interacciones entre los pares de bases adyacentes.

1.3. Replicación del ADN

La replicación del ADN es un proceso capital en la transmisión de la información de la célula madre a las células hijas y también en la multiplicación de los virus. Este proceso presenta variantes en cuanto a su iniciación, pero en lo concerniente a la síntesis, el proceso de replicación es universal y de tipo semiconservativo, lo que significa que cada molécula hija tiene una cadena de la molécula madre y una de nueva síntesis (figura 6).

La síntesis de las moléculas de ADN se inicia a nivel de puntos llamados orígenes de replicación. Estos puntos son reconocidos por un grupo de proteínas, primosoma, resultando en la separación local de las dos cadenas. En este lugar, un sistema muy

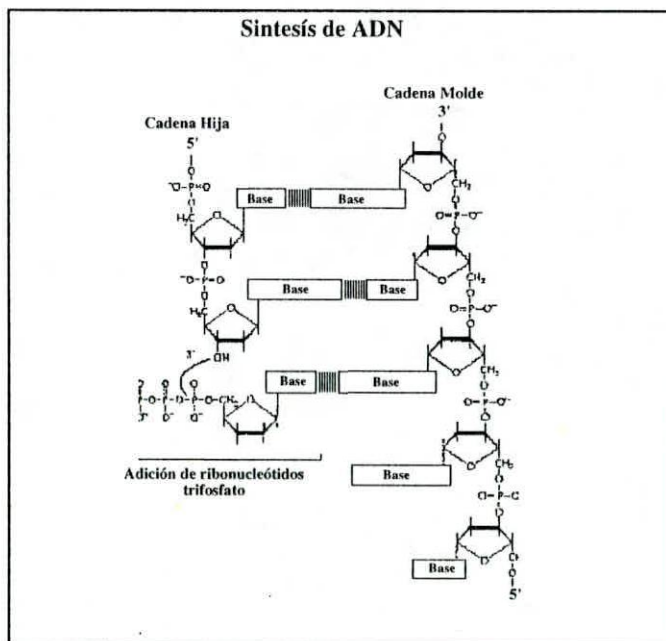


Figura 6: Síntesis de ADN, proceso semiconservativo

complejo de proteínas, el replisoma, tiene la función de desespiralización de la cadena, estabilización del ADN en simples cadenas y síntesis de las cadenas hijas. La enzima directamente involucrada en la síntesis de ADN, la ADN polimerasa, funciona solamente en la dirección 5' - 3', necesitando un pequeño fragmento de ARN, el iniciador, para iniciar su actividad y una molécula matriz para polimerizar nucleótidos de acuerdo con la complementariedad de bases A - T y G - C. Como consecuencia de estas características una nueva cadena de ADN es sintetizada de forma continua en la dirección 5' - 3' y la otra cadena de forma discontinua en pequeños fragmentos llamados "fragmentos de Okazaki" (figura 7). Posteriormente, los pequeños iniciadores de ARN son eliminados y los fragmentos de Okazaki son ligados gracias a la acción de una enzima, la ADN ligasa.

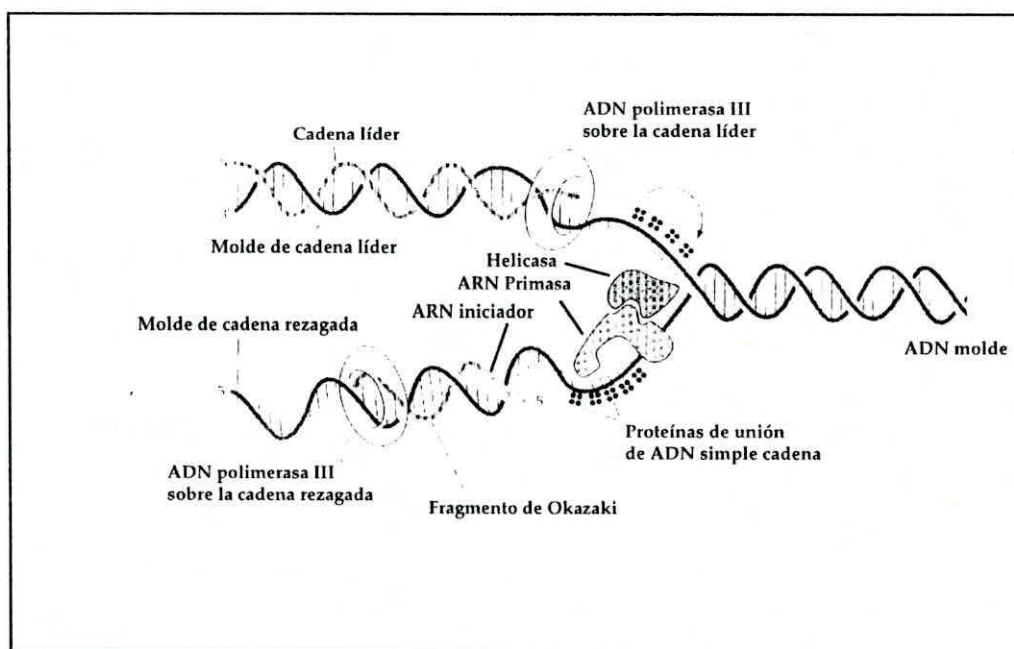


Figura 7: Síntesis de ADN, aparato de replicación, tomada de *Life: The Science of Biology, Third edition, 1992, (Purves, Orians, Heller), Sinauer Associates, Inc*

1.4. Organización de genomas

En los organismos superiores que son los eucariotas, el ADN genómico está generalmente organizado en cromosomas, con una estructura relativamente compleja, que se mantiene gracias a diferentes proteínas (figura 8). El tamaño del ADN cromosómico es de alrededor de mil millones de pares de nucleótidos.

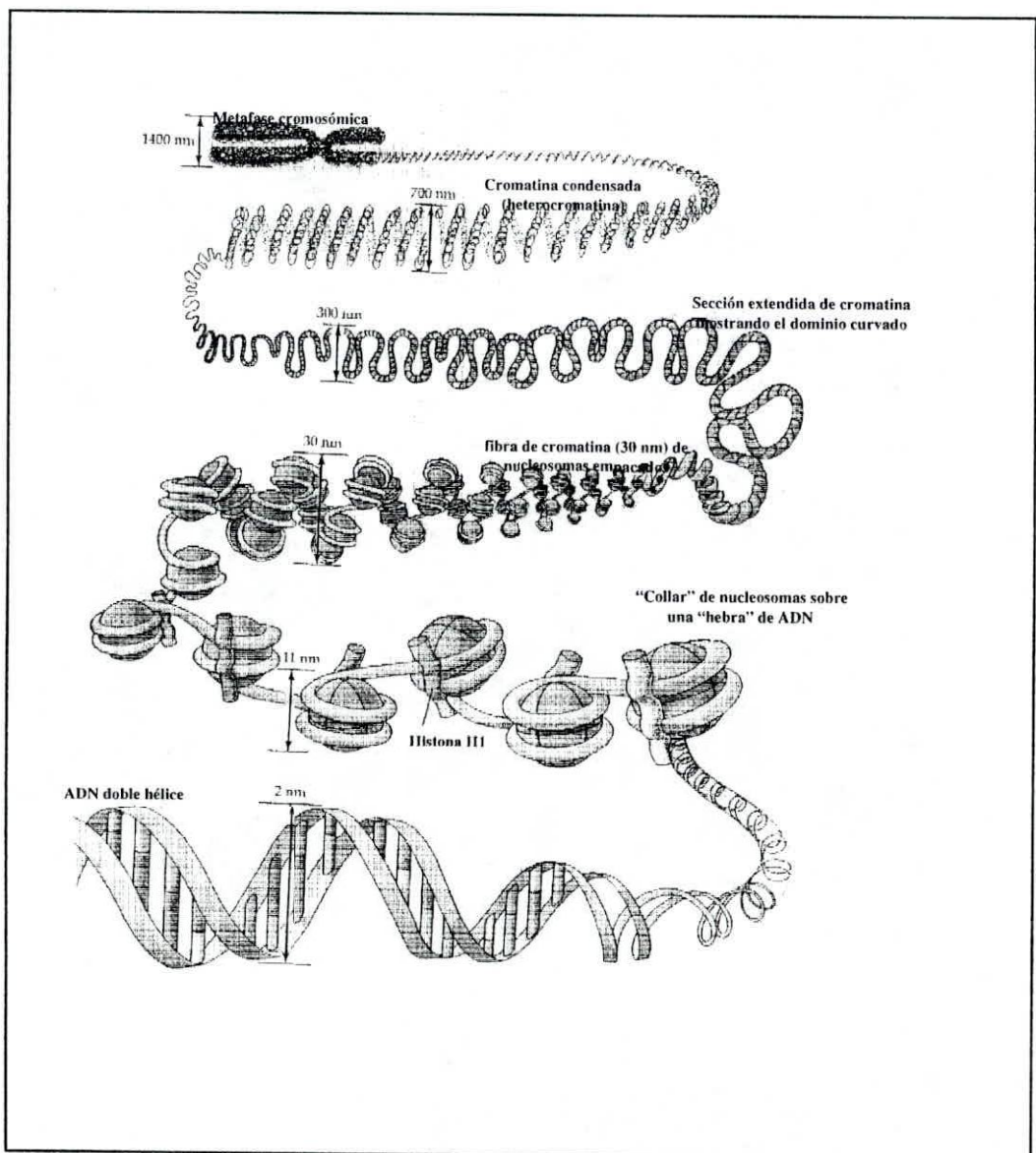


Figura 8: Organización del cromosoma, tomada de *Life: The Science of Biology*, Third edition, 1992, (Purves, Orians, Heller), Sinauer Associates, Inc

En los procariotas, el genoma está generalmente organizado en una sola molécula de ADN circular superenrollado, con un tamaño alrededor del millón de pares de nucleótidos.

En procariotas y eucariotas se pueden encontrar moléculas de ADN extracromosómico y no asociado a organelas, llamados plásmidos. Los plásmidos son moléculas de ADN circular, con un tamaño de algunos miles de pares de nucleótidos. Tienen relativamente pocos genes, que generalmente no son esenciales para la célula hospedadora.

En los virus los genomas, ADN o ARN, simple cadena o doble cadena, y mono o polimoleculares, tienen tamaño muy variado, entre cientos de miles y algunos miles de nucleótidos.

En base a su parentesco taxonómico, los organismos tienen relaciones más o menos cercanas, que se traducen en similitudes en la organización y la información de sus genomas. Los organismos dentro de una especie tienen una información genética casi idéntica, mientras que existen diferencias entre las especies dentro de un género, diferencias mayores cada vez si las especies pertenecen a diferentes géneros, familias, órdenes y clases. Así, si se considera el gen de una proteína como la actina, que constituye el citoesqueleto y que consecuentemente está presente en el genoma de todas las células eucariotas, la secuencia nucleotídica de este gen presenta un nivel de similitud u homología tanto más grande cuanto más próxima sea su relación taxonómica. Por el contrario, existen secuencias presentes específicamente en un grupo taxonómico, por ejemplo una toxina, que no tienen equivalente en otros grupos.

Este concepto de homología es muy importante en la tecnología de ADN, en particular en relación con la concepción y la utilización de sondas nucleicas.

1.5. Tecnología de ADN

En la biología, el campo más específico de la biología molecular, como temática y como tecnología, es relativamente reciente, pero hoy día, afecta a todas las disciplinas (patología, inmunología, fisiología, genética, endocrinología) y tiene numerosas aplicaciones, particularmente en el diagnóstico de las enfermedades infecciosas.

Se puede considerar que la tecnología del ADN fue iniciada con el conocimiento de las enzimas de restricción y sus primeras utilizaciones. En efecto, estas enzimas ofrecieron la posibilidad de generar fragmentos de ADN, que son más fáciles de manipular y analizar que las grandes moléculas en estado nativo (figura 9).

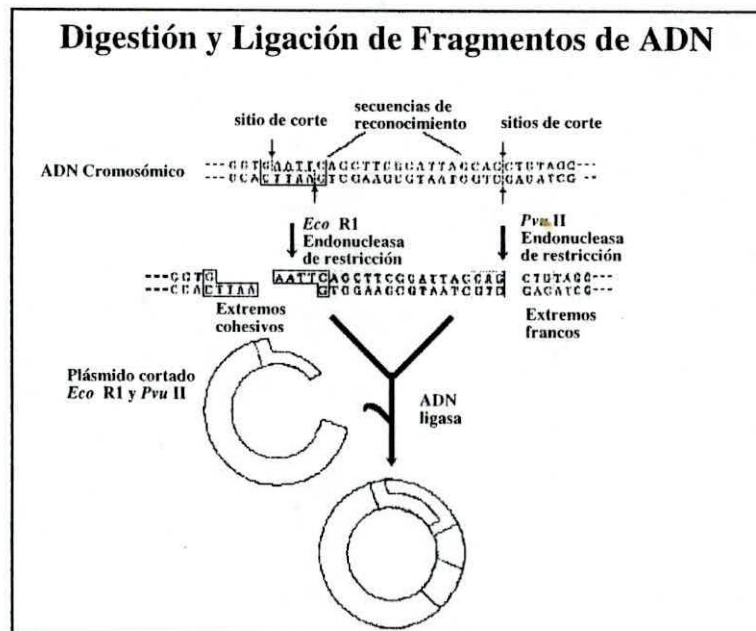


Figura 9: Tecnología del ADN

Las enzimas de restricción o endonucleasas se encuentran en un amplio rango de especies bacterianas y su función es reconocer específicamente secuencias de ADN y subsecuentemente, cortar este ADN. *In vivo*, el sistema de restricción protege a la célula del funcionamiento de ADN extranjero que puede penetrar y expresarse por un fenómeno conocido como transformación. En efecto, el ADN es rápidamente reconocido como extranjero porque no tiene ninguna modificación a nivel de las secuencias específicas de las enzimas de restricción. Por el contrario, el ADN de la bacteria está protegido de la acción de las enzimas de restricción porque las secuencias específicas están metiladas. Este proceso de metilación es realizado por enzimas celulares que funcionan a nivel del mismo sitio de reconocimiento que las enzimas de restricción y al mismo tiempo que la replicación del ADN. Clásicamente, estas enzimas de restricción y de metilación se consideran constituyentes del sistema restricción-modificación de la bacteria (Lehninger et al, 1993) .

Existen tres tipos de endonucleasas de restricción, designadas I, II, y III que pueden contener tanto las actividades de endonucleasa como de metilasa. La endonucleasa de tipo I corta ADN en sitios aleatorios que pueden estar situados hasta más de mil pares de bases antes del sitio de reconocimiento. Las enzimas del tipo III cortan ADN a unos 25 pares de bases del sitio de reconocimiento. Ambos tipos de enzimas se mueven a lo largo del ADN en una reacción que requiere un aporte de energía, proporcionado por el ATP. Las enzimas de restricción del tipo II son simples, no requieren ATP y cortan el ADN dentro de la secuencia de reconocimiento. Más de 800 endonucleasas de restricción han sido descubiertas en diferentes especies bacterianas. Cerca de 100 diferentes secuencias específicas son reconocidas por una o más de estas enzimas. Algunas endonucleasas de restricción

cortan ambas cadenas de ADN sin dejar bases no apareadas en cualquiera de los dos extremos; estos extremos son llamados **terminaciones francas**. Otros en cambio al cortar dejan en alguno de los dos extremos algunos nucleótidos libres, denominándose **terminaciones cohesivas**, debido que ellas pueden unirse con otra extremidad saliente complementaria de otro fragmento de ADN. A continuación se presenta una tabla (tabla I) con algunas enzimas del tipo II con sus correspondientes sitios de reconocimiento.

Enzima de restricción	Secuencia de reconocimiento
Alu I	(5') AG Δ CT (3') (3') TC Δ GA (5')
BamH I	(5') G Δ GATCC (3') (3') CCTAG Δ G (5')
EcoR I	(5') G Δ AATTC (3') (3') CTTAA Δ G (5')
Hae III	(5') GG Δ CC (3') (3') CC Δ GG (5')
HindIII	(5') A Δ AGCTT (3') (3') TTCGA Δ A (5')
Pst I	(5') CTGCA Δ G (3') (3') G Δ ACGTC (5')
Sal I	(5') G Δ TCGAC (3') (3') CAGCT Δ G (5')
Xho I	(5') C Δ TCGAG (3') (3') GAGCT Δ C (5')

Tabla I: Enzimas de restricción

Los fragmentos generados por las enzimas de restricción pueden ser fácilmente identificados y separados por electroforesis en gel de agarosa, aprovechando la carga negativa del ADN y la movilidad relativa de los fragmentos en relación inversa a su

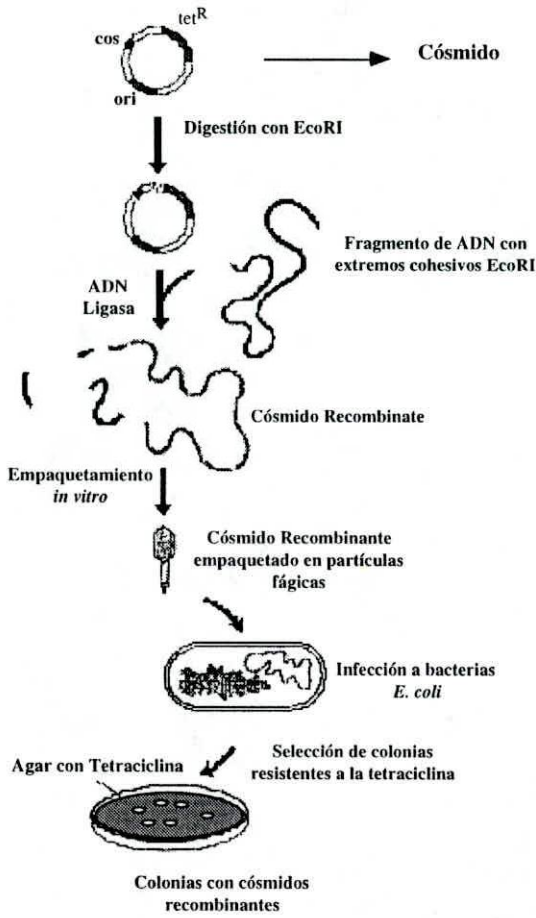
tamaño. Los fragmentos separados pueden después ser purificados, bien por electroelución del gel, o con el uso de kits que permitan la solubilización de la agarosa y la precipitación consiguiente del fragmento de ADN. La etapa siguiente consiste en introducir el fragmento purificado en un sistema vector capaz de replicarse debido a la presencia de un origen de replicación. Con este fin, el fragmento y el vector, previamente abierto con una enzima de restricción, son mezclados y ligados utilizando una enzima, ligasa.

Existen tres tipos de vectores de clonaje: plásmidos, bacteriófagos y cósmidos.

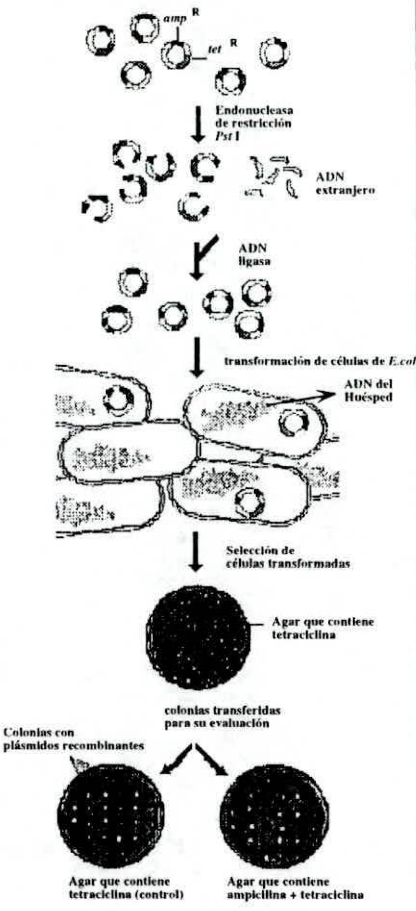
Los plásmidos (figura 10) son moléculas de ADN circular extracromosómico que tienen capacidad de replicarse dentro de la célula huésped. Tienen un rango de tamaño entre las 5.000 hasta 40.000 pares de bases. Pueden incorporar fragmentos de ADN exógeno de hasta 15.000 pares de bases. Estos vectores son introducidos en la célula huésped por un proceso denominado **transformación**, en el cual la membrana de la célula se permeabiliza por acción del cloruro de calcio permitiendo el ingreso del vector. Los plásmidos a menudo poseen genes de resistencia a antibióticos y de caracteres fenotípicos fácilmente detectables, ambas propiedades son empleadas para seleccionar a la célula huésped que lo contiene.

Segmentos de ADN de hasta ~ 23.000 pares de bases pueden ser clonados usando bacteriófagos λ como vector. Los bacteriófagos λ tiene un mecanismo muy eficaz para introducir su genoma dentro de una bacteria, que corresponde al proceso natural de infección, siendo el ADN inyectado después de la fijación de la partícula viral sobre la bacteria. El clonaje de ADN en un bacteriófago λ (figura 10) está basado en dos características de su genoma : (1) cerca de una tercera parte del genoma no es esencial y puede ser reemplazada con ADN extranjero, resultando en un ADN

Clonaje con Cósmidos



Clonaje en Plásmidos



Clonaje en Fagos

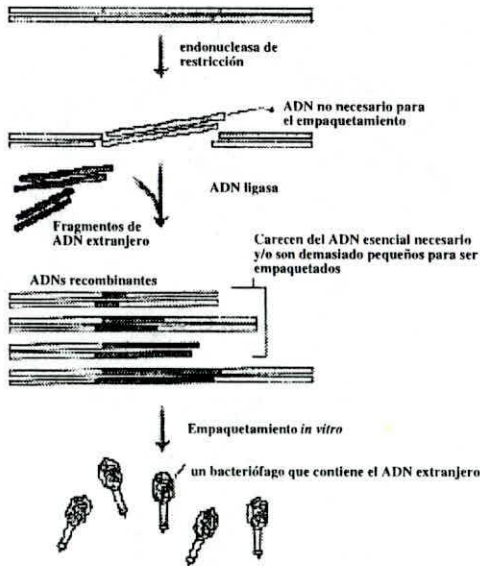


Figura 10: Vectores de Clonaje

recombinante. (2) El ADN será empaquetado espontáneamente dentro de las partículas virales por mezcla simple con los elementos constitutivos de la cápsida, con la condición de que el ADN recombinante debe tener un tamaño final de 40.000 a 50.000 pares de bases

Los **cósmidos** (figura 10) son plásmidos recombinantes que pueden incorporar segmentos de ADN hasta 45.000 pares de bases. Los cósmidos son pequeñas moléculas circulares de 5000 a 7000 pares de bases. Poseen un origen de replicación plasmídico, uno o más marcadores de selección, una serie de sitios de restricción únicos donde el ADN extranjero puede ser insertado y una secuencia para el empaquetamiento del ADN (secuencias cos del bacteriofago λ).

1.6. Sondas nucleicas

La sonda nucleica o genética es una molécula monocatenaria de un ácido nucleico (ADN o ARN), obtenida generalmente por tecnología de ADN recombinante anteriormente descrita, o directamente extraída de células (plásmido o ARNm) o por síntesis *in vitro* (en sistemas biológicos o con aparatos de síntesis química). Esta molécula monocatenaria tiene la particularidad de unirse específicamente a un fragmento de un ácido nucleico de interés basándose en la complementariedad de sus bases (figura 11). El producto de esta unión específica es una molécula híbrida, que es visualizada gracias a que la sonda nucleica tiene incorporado un marcador fácilmente detectable.

Las sondas nucleicas tienen un tamaño comprendido entre unos pocos nucleótidos (oligonucleotídicas) hasta miles de nucleótidos. Se pueden distinguir dos tipos de sondas en función de su marcado: sondas isotópicas o radioactivas y sondas frías o no isotópicas. Las sondas radioactivas fueron las primeras en ser desarrolladas, se denominaron así porque sus marcadores son elementos radioactivos, generalmente

el P^{32} . Su revelado se efectúa con contadores de centelleo o autoradiografía. Actualmente están siendo desplazadas por las sondas frías debido a que tienen dos desventajas: el corto tiempo de existencia del isótopo afecta la estabilidad del marcado y el peligro que contempla el manejo de material radioactivo.

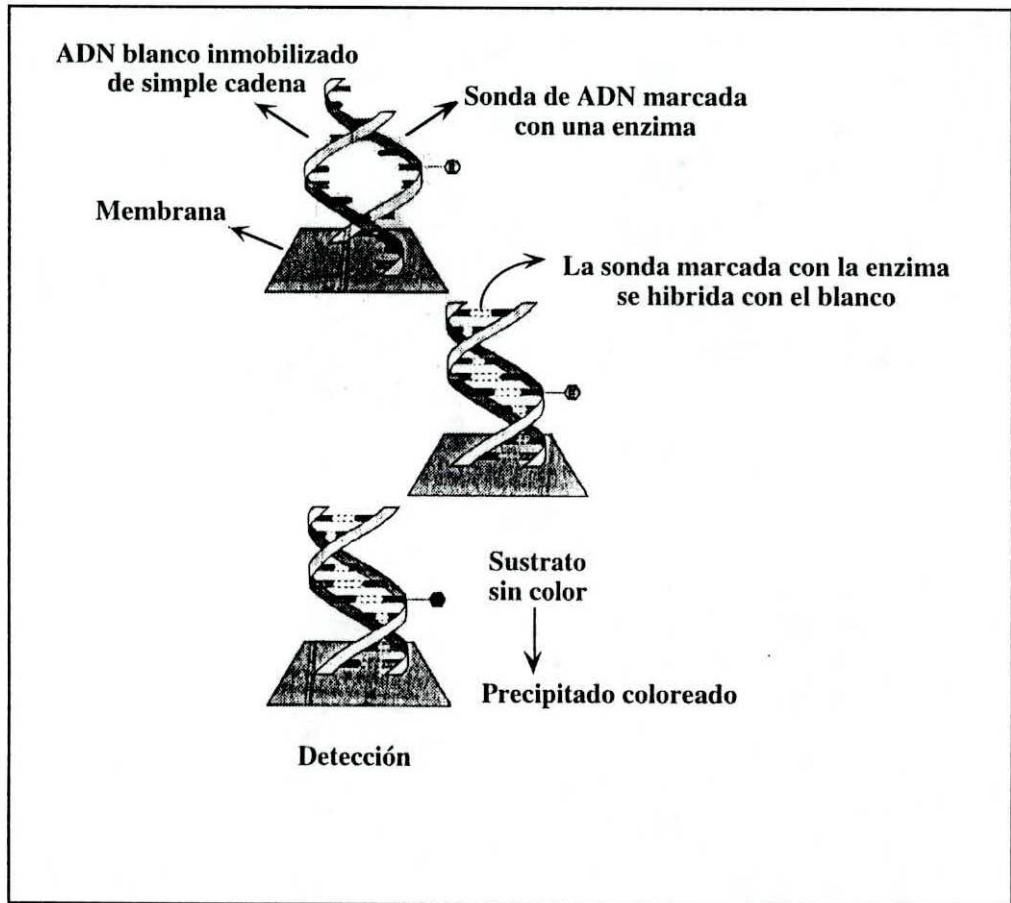


Figura 11: Sondas nucleicas, tomado de *Microbiology, second edition, 1993* (Prescott, Harley. Klein), W.A.C. publishers.

Las sondas frías son llamadas de esta manera, porque sus marcadores son moléculas no isotópicas, pequeñas moléculas como haptenos (digoxigenina) y la biotina que son reconocidos por un anticuerpo en el primer caso o por la avidina y la streptavidina en el segundo caso. La visualización del resultado se realiza mediante 3 tipos de reacciones: colorimétricas, fluorescentes, y quimioluminiscentes o bioluminiscentes.

6.1. Técnicas de hibridación.

Las técnicas de hibridación de uso más corriente son las realizadas sobre filtros de nitrocelulosa o de nylon, en los que las muestras son fijadas tras un tratamiento de desnaturalización química, practicada con el fin de separar las cadenas complementarias. Una vez fijadas, las muestras se ponen en contacto con la sonda, que se uniran solamente si existe un cierto nivel de homología entre las secuencias diana y las secuencias de la sonda. La visualización del híbrido (diana-sonda) depende del tipo de marcador. Las técnicas de hibridación basadas en el uso de membranas se distinguen por la naturaleza del ácido nucleico (ADN o ARN) y por la modalidad de transferencia sobre la membrana. Así, el Northern blot y el Southern blot (figura 12) corresponden a una separación de moléculas por electroforesis de ARN y ADN respectivamente, seguidas de una desnaturalización química en el gel y por último una transferencia sobre la membrana. La técnica de dot blot (figura 13) corresponde a un simple depósito sobre la membrana de una gota de la muestra previamente desnaturalizada químicamente. La técnica colony-blot (figura 14) corresponde a una transferencia de colonias bacterianas sobre la membrana, seguida de una desnaturalización química.

1.6.1. Parámetros de interés en la reacción de hibridación.

Diferentes parámetros pueden influenciar fuertemente la reacción de hibridación entre un ácido nucleico diana y una sonda.

Secuencia de la sonda. La secuencia de la sonda y su grado de homología con el ácido nucleico diana, van a influenciar radicalmente la reacción de hibridación, la rapidez de la reacción y su estabilidad, y, consecuentemente, la especificidad y sensibilidad de la reacción. De hecho, sondas homólogas son más apropiadas en cuanto a sensibilidad y especificidad de la reacción,

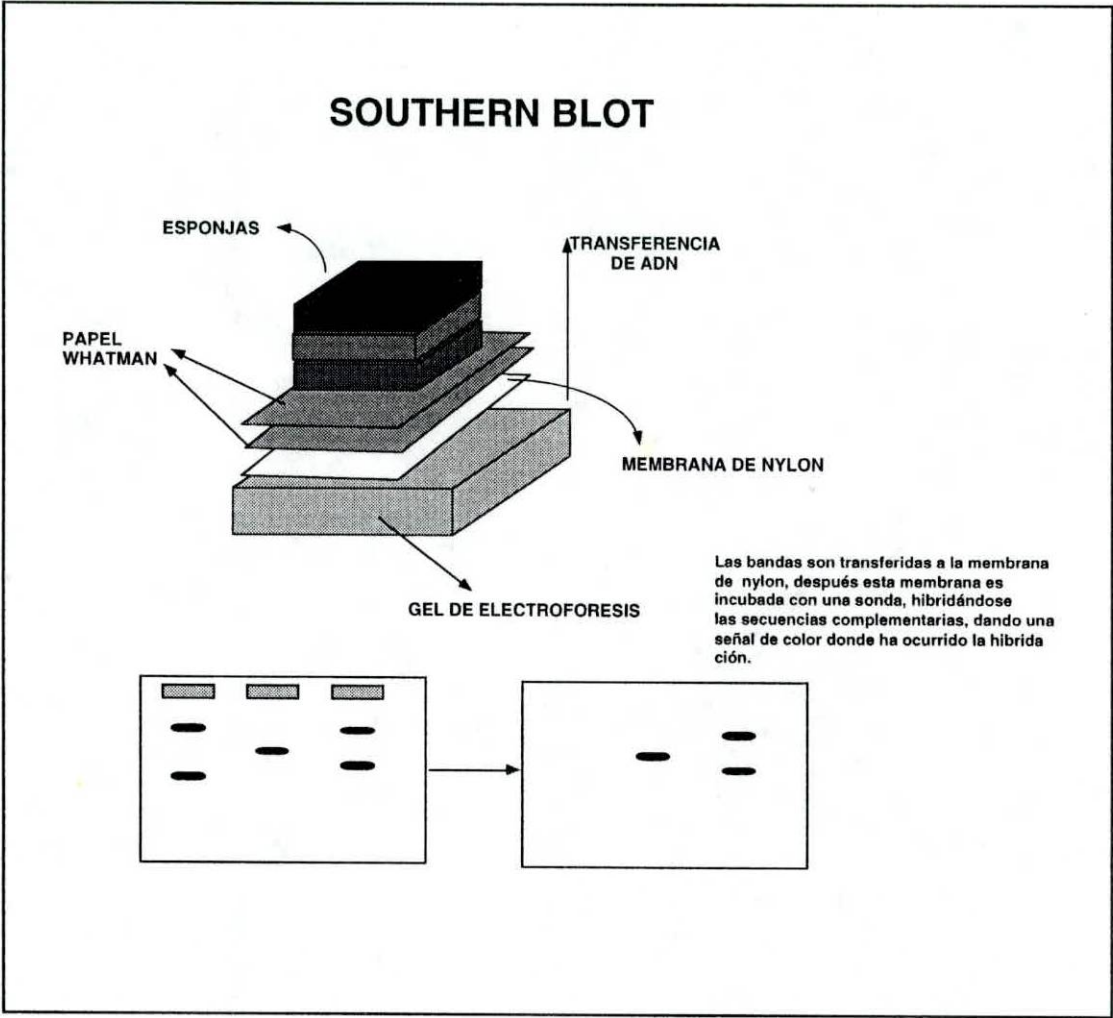


Figura 12: Southern Blot

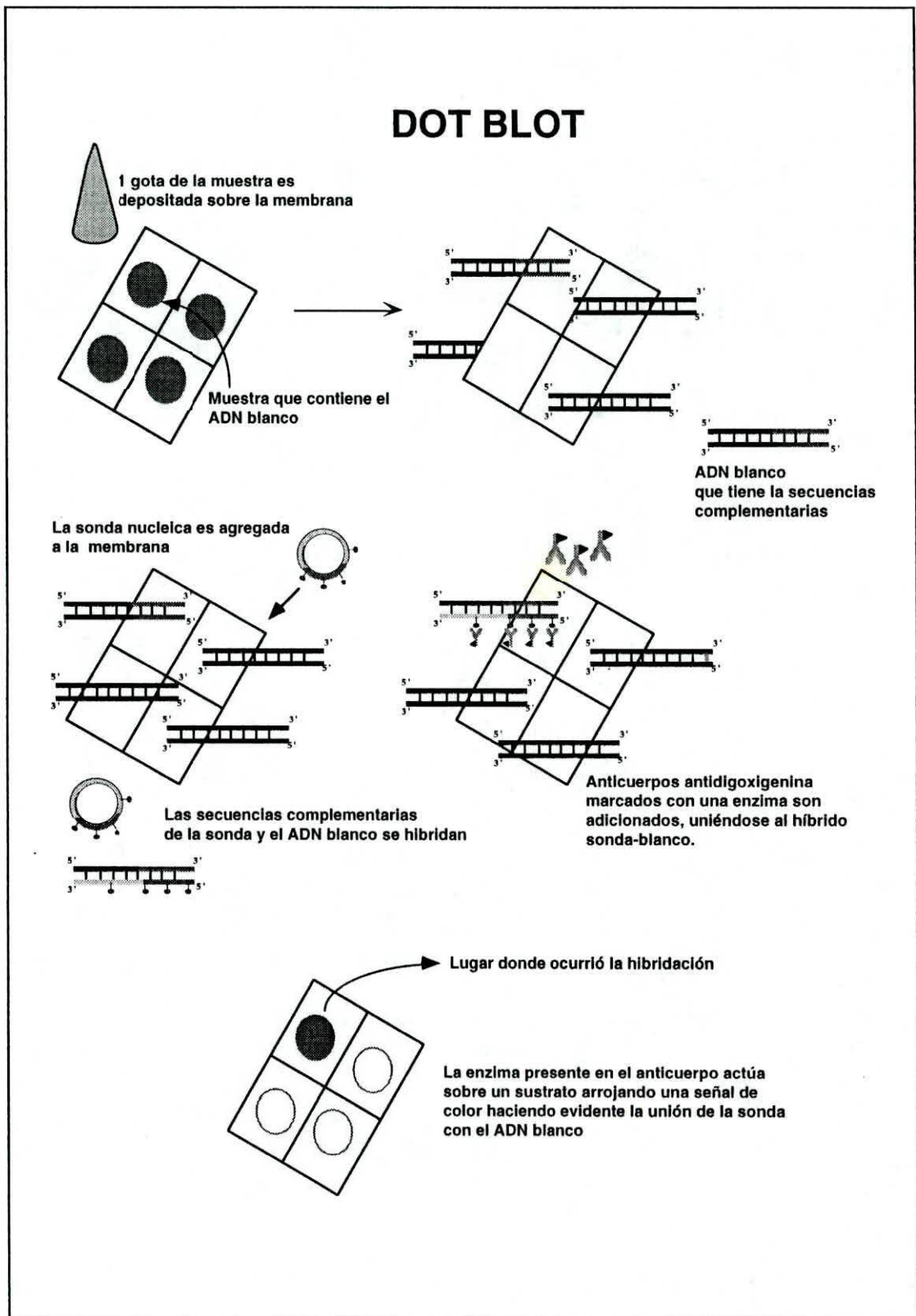


Figura 13: Dot Blot

COLONY BLOT

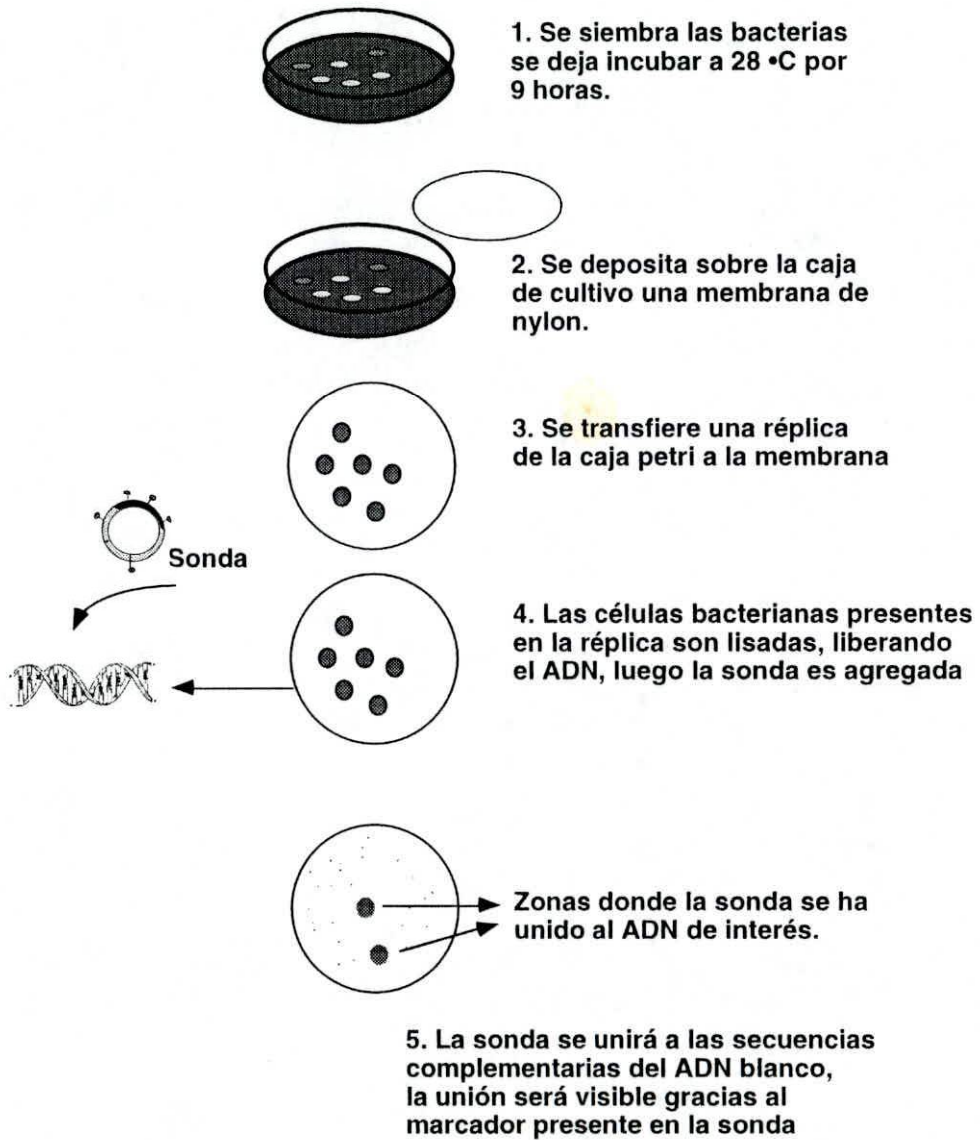


Figura 14: Colony Blot

ya que las secuencias de la diana y de la sonda son prácticamente iguales. Por el contrario, el uso de sondas heterólogas lleva a una eficacia de hibridación dependiente del nivel de homología.

Tamaño de la sonda. Es muy importante y debe ser considerado debido a que va a influir en la velocidad de la reacción y en la sensibilidad de la detección si el marcador está presente a lo largo de toda la sonda.

Composición nucleotídica de la sonda. La composición de la cadena, en cuanto a porcentaje de G y C va a influenciar positivamente la estabilidad del híbrido, ya que cuanto mayor es el porcentaje, mayor será la estabilidad.

Fuerza iónica. La velocidad de hibridación está en relación directa con la fuerza iónica. Esta velocidad aumenta 5 veces cuando la concentración de NaCl pasa de 0.2 a 1.5 M.

Temperatura de hibridación. La temperatura es uno de los factores más importantes que influye en la velocidad y especificidad de hibridación. A temperaturas demasiado bajas no existe la suficiente energía para activar la reacción pero por otro lado con temperaturas demasiado elevadas no se podrán formar los puentes de hidrógeno necesarios para la hibridación.

En cuanto a la especificidad con un aumento de la temperatura la unión de cadenas que no son totalmente complementarias será menos probable.

Formamida: La formamida permite disminuir la temperatura de hibridación, sin alterar la especificidad del apareamiento entre el ácido nucleico diana y la sonda.

1.6.2. Aplicación de las sondas nucleicas y de técnicas de hibridación para el diagnóstico de enfermedades en acuicultura.

En acuicultura marina, el desarrollo de diagnóstico basado en el uso de sondas nucleicas y de técnicas de hibridación es relativamente reciente y concierne mayoritariamente a enfermedades de moluscos bivalvos (Lubat et al, 1990; Goggin et al, 1991; Le Deuff et al, 1991; Kellner et al, 1993; Robledo et al, 1995)

En cuanto a la utilización de las sondas nucleicas en patología de camarones, los primeros trabajos se remontan a 1993, sobre baculovirus tipo monodon (Vickers et al, 1993; Mari et al, 1993 **a**; Lightner et al, 1994; Poulos et al, 1994). Después, fue aislado, caracterizado y clonado el ADN del virus de la infección de la necrosis hipodérmica y hematopoyética IHHNV (Mari et al, 1993 **b**; Lightner et al, 1994). Estudios posteriores lograron desarrollar sondas genéticas para el Baculovirus penaei BP (Bruce et al, 1993; Bonami et al, 1995 **a**; Lightner et al, 1994); para el parvovirus hepatopancreático HPV (Mari et al, 1995; Lightner et al, 1994; Bonami et al, 1994 **b**); para el virus del Síndrome de Taura (Hasson, en prensa); y para el agente causante de la hepatopancreatitis necrotizante NHP (Frelie, en prensa).

CAPITULO II

MATERIALES Y METODOS

2.1. Material Biológico.

Animales: Se emplearon camarones *P. stylirostris* infectados con IHNV provenientes tanto de muestreos a diferentes laboratorios de larvas realizados por el área de epidemiología del CENAIM como de infecciones experimentales efectuadas por María Dolores Villacreses (Tesis de Grado). También se utilizó camarones sanos *P. vannamei* y *P. stylirostris* procedentes del stock corriente del CENAIM.

Cepas bacterianas: Las cepas utilizadas fueron las siguientes: del *Vibrio alginolyticus* las cepas B783R, 158, 160, 166, ProA, Ili la primera aislada por el departamento de bacteriología del CENAIM, la segunda, tercera y cuarta cepa por Ileana Morales (comunicación personal) y la última por Acuatecsa; del *Vibrio harveyi* las cepas S2, E22, aisladas por Ileana Morales (comunicación personal) y por el departamento de bacteriología del CENAIM respectivamente; una cepa de *Vibrio Tubishii* y una cepa de *Escherichia coli*, aisladas por el departamento de Epidemiología del CENAIM.

Plásmido PBRJ: Es una donación del Dr. Max Bergoin (Universidad Montpellier II, Francia) para el CENAIM. Es un plásmido recombinante (10271 pares de bases) formado a partir de la inserción del genoma completo del densovirus *Junonia coenia* en el plásmido pBR322 (Jourdan et al, 1990; Dumas et al, 1992). El plásmido recombinante antes de su donación había sido introducido en bacterias del tipo *E. coli* (figura 15) y como tal fue entregado a la unidad de Biología molecular del CENAIM.

Sonda homóloga de IHNV: Se utilizó la sonda homóloga de IHNV del Kit de IHNV Shrimp Probe, que es distribuido por DiagXotics, Inc, 27 Cannon Road Wilton, CT 06897, EE.UU.

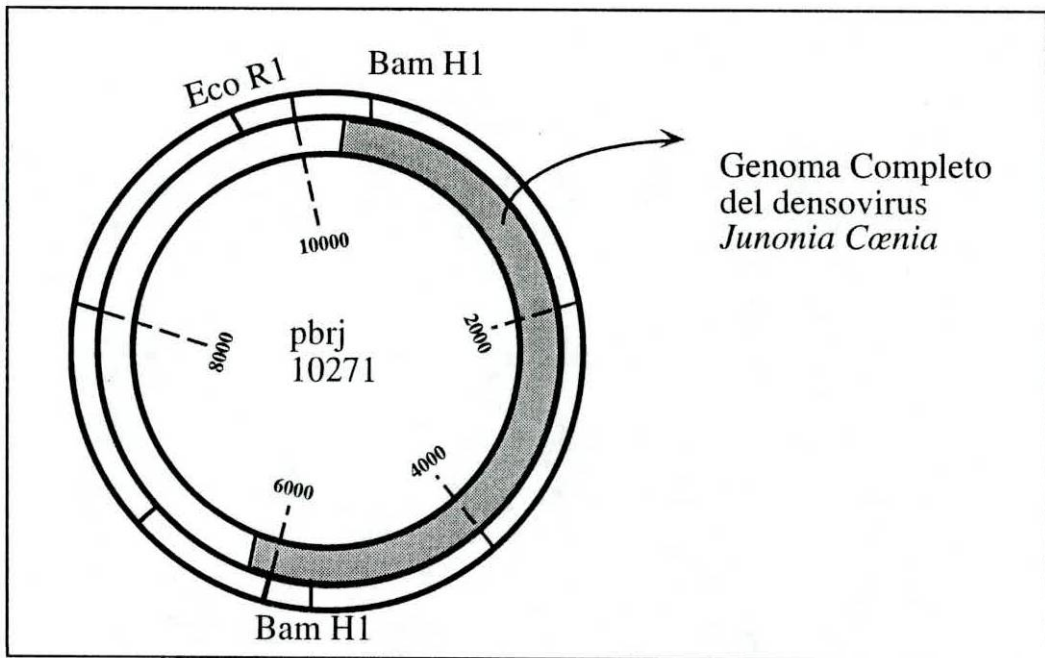


Figura 15: Plásmido recombinante PBRJ con el genoma completo de *Junonia cænia*

2.1. METODOS

2.2.1 Extracción de ADN Plasmídico

2.2.1.1 Método de Lisis alcalina: miniprep (Protocolo según Maniatis et al, 1989)

1. Sembrar una colonia bacteriana individual o 10 µl en 2 ml de medio LB (ver anexo) que contenga el antibiótico apropiado. Incubar el cultivo toda la noche a 37 °C (28 °C para bacterias marinas) con movimiento constante.
2. Vertir 1.5 ml del cultivo en un microtubo. Centrifugar a 12.000 g por 30 segundos a 4 °C en una microcentrifuga.
3. Remover el medio por aspiración, dejar el pellet (sedimento) bacteriano tan seco como sea posible.
4. Resuspender el pellet bacteriano en 100 µl de Solución Glucosa-Tris-EDTA, GTE (ver anexo), helada en hielo con una agitación vigorosa.
5. Añadir 200 µl de Solución NaOH-SDS (ver anexo 1) recién preparada.

Cerrar el tubo y mezclar los contenidos invirtiendo el tubo rápidamente cinco veces. Asegurarse que la superficie entera del tubo este en contacto con la Solución II. No hay que agitar vigorosamente. Almacenar el tubo en hielo.

6. Añadir 150 μ l de solución Acetato de Potasio (ver anexo) helada en hielo. Cerrar el tubo, mezclarlo y agitarlo suavemente en una posición inversa por 10 segundos para dispersar la solución III a través del lisado bacterial viscoso. Almacenar el tubo en hielo por 3 - 5 minutos.

7. Centrifugar a 12.000 g por 5 minutos a 4 °C en una microcentrifuga. Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo.

8. Precipitar el ADN doble cadena con dos volúmenes de etanol 100% a temperatura ambiente y mezclar. Dejar que la mezcla se estabilice por 2 minutos a temperatura ambiente.

9. Remover el sobrenadante con una agitación suave. Parar el tubo en una posición invertida sobre papel toalla para permitir que todo el fluido drene. Remover cualquier gota de fluido que este adherido a las paredes del tubo.

10. Lavar el pellet del ADN doble cadena con 1 ml de etanol 70% a 4 °C. Remover el sobrenadante como es explicado en el paso anterior, y dejar secar el pellet del ácido nucleico al aire por 10 minutos.

11. Redisolver los ácidos nucleicos en 50 μ l de TE pH 8 (ver anexo) que contenga ARNasa libre de ADNasa (20 ug/ml). Mezclar. Almacenar el ADN a -20 °C.

2.2.1.2 Método de lisis alcalina: maxiprep (Según Maniatis et al, 1989)

1. Sembrar en 500 ml de medio LB 200 μ l de la cepa bacteriana pura,

incubar a 37 °C (28 °C para bacterias marinas) con agitación vigorosa por 12 -16 horas.

2. Cosechar las células bacterianas con una centrifugación a 4000 rpm por 15 minutos a 4 °C. Eliminar el sobrenadante. Parar la botella de centrifuga en una posición invertida para permitir que todo el sobrenadante drene.

3. Resuspender el pellet bacterial en 100 ml de STE (ver anexo) helado en hielo.

4. Colectar las células bacterianas por centrifugación como se explica en el paso 2.

5. El pellet resultante es resuspendido en 10 ml de Solución Glucosa-Tris-EDTA, GTE (ver anexo).

6. Añadir 1 ml de una solución recién preparada de lisozima (10 mg/ml en 10 mM Tris-Cl pH 8).

7. Añadir 20 ml de Solución NaOH-SDS recién preparada. Mezclar los contenidos a través de una suave inversión de la botella varias veces. Almacenar la botella a temperatura ambiente por 5 - 10 minutos.

8. Añadir 15 ml de Solución Acetato de Potasio helada en hielo. Mezclar los contenidos agitando la botella varias veces. No deben distinguirse las dos fases. Almacenar la botella en hielo por 10 minutos. Un floculado blanco debería formarse.

6. Centrifugar el lisado bacterial a 4000 rpm por 15 minutos a 4 °C.

7. Recuperar el sobrenadante y filtrarlo por varias mallas. Añadir 0.6 volúmenes de isopropanol, mezclar bien, y dejar la botella por 10 minutos temperatura ambiente.

8. Recuperar los ácidos nucleicos por centrifugación a 5000 rpm por 15

minutos a temperatura ambiente. Si la centrifugación es llevada a cabo a 4 °C puede ocurrir una precipitación de sal.

9. Drenar cuidadosamente el sobrenadante, Luego lavar el pellet y las paredes de la botella con etanol 70% a temperatura ambiente. Eliminar el alcohol, colocar la botella invertida sobre papel toalla por algunos minutos de tal manera que las últimas trazas de etanol se evaporen.

10. Disolver el pellet del ácido nucleico en 3 ml de TE (ver anexo) pH 7.4.

2.2.1.3. Método Qiagen: mini prep (Plasmid Midi Kit, Qiagen Inc, 9600 De Soto Avenue, Chatsworth, CA 91311, USA)

1. Sembrar una colonia bacteriana individual o 10 µl en 2 ml de medio LB (ver anexo) que contenga el antibiótico apropiado. Incubar el cultivo toda la noche a 37 °C (28 °C para bacterias marinas) con movimiento constante.

2. Cosechar las células bacterianas por centrifugación a 4 °C durante 15 minutos a 6000 g. Remover todas las trazas de sobrenadante invirtiendo el tubo de centrifuga abierto hasta que todo el medio haya sido drenado. Congelar el pellet a -20 °C para almacenar o proceder directamente con el siguiente paso.

3. Resuspender el pellet bacteriano en 4 ml de Buffer P1 (ver anexo). Asegurarse que la ARNasa A haya sido añadida al buffer P1. Las células bacterias deben ser resuspendida sin dejar grumos.

4. Añadir 4 ml de Buffer P2 (ver anexo), mezclar suavemente, e incubar a temperatura ambiente por 5 minutos. El Buffer P2 debe ser chequeado antes de ser usado debido a que el SDS (ver anexo) tiende a precipitarse

por las bajas temperaturas de almacenaje, si es necesario disolver SDS por calentamiento. Después de la adición de Buffer P2, la solución debe ser mezclada gentilmente pero invirtiendo el tubo varias veces (4-6). No agitar fuertemente puesto resulta en la fragmentación del ADN genómico. El lisado deberá aparecer viscoso. No hay que permitir que esta esta reacción dure más de 5 minutos.

5. Añadir 4 ml de Buffer P3 (ver anexo) helado, mezclar inmediatamente pero suavemente e incubar sobre hielo por 15 ó 20 minutos. Después de la adición del buffer P3 la solución se pone viscosa y grumosa.

6. Centrifugar a 4 °C por 30 minutos a ≥ 30000 g. Remover el sobrenadante rápidamente.

7. Equilibrar una columna QIAGEN tip 100 aplicando 4 ml de QBT (ver anexo) y dejar que la columna se vacie por gravedad.

8. Vertir el sobrenadante del paso 6 sobre la columna QIAGEN tip y permitir que este entre a la resina por gravedad

9. Lavar la columna QIAGEN tip dos veces con 10 ml de buffer QC (ver anexo). El primer lavado es suficiente para remover todos los contaminantes en la mayoría de las preparaciones de ADN. El segundo lavado es particularmente necesario cuando grandes volúmenes de cultivo o cepas bacterianas contienen grandes cantidades de carbohidratos.

10. Capturar el ADN con 5 ml de Buffer QF (ver anexo).

11. Precipitar ADN con 0.7 volúmenes de isopropanol, previamente equilibrado a temperatura ambiente. Centrifugar inmediatamente a ≥ 15000 g a 4 °C por 30 minutos, y cuidadosamente remover el

sobrenadante. La precipitación con ADN debe ser llevada con todas las soluciones equilibradas a temperatura ambiente para minizar el riesgo de precipitación de sales.

12. Lavar ADN con 5 ml de etanol 70% helado, secar al medio ambiente por 5 minutos y redissolver en un adecuado volumen de TE. El pellet del ADN debe ser lavado brevemente en etanol 70% y luego ser centrifugado nuevamente. El etanol de 70% sirve para remover cualquier sal precipitada, haciendo más fácil de redissolver el ADN.

2.2.2. Extracción ADN Genómico

2.2.2.1. Técnica de extracción de ADN genómico del mosquito *Anopheles gambiae* (Protocolo según Institute National of Health, EE.UU)

1. Se coloca 400 µl de Grinding buffer (ver anexo) a la muestra, macerar hasta homogenizar los tejidos del animal, tomando en cuenta que no haya una gran cantidad de muestra debido a que después será muy difícil de resuspender el ADN, incubar a 65 °C por 30 minutos.
2. Añadir 56 µl de acetato de Potasio 8 M (concentración final 1 M), mezclar, dejar en hielo 30 minutos, el acetato de Potasio debe ser colocado cuando aún el tubo esta caliente.
3. Microcentrifugar la muestra a 13000 rpm por 10 minutos, recuperar rápidamente el sobrenadante.
4. Añadir 0.1 volúmenes de acetato de Sodio 3 M pH 5.2 más 2 volúmenes de etanol 100% helado, dejar a temperatura ambiente por 5-10 minutos.
5. Microcentrifugar la muestra a 13000 rpm durante 10 minutos. Se

- elimina el sobrenadante.
6. Se lava el pellet del ADN con un l ml etanol 70%. Microcentrifugar a 13000 rpm durante 5 minutos.
 7. Se elimina el acohol, se seca al vacío 1 min, luego al medio ambiente por 15 minutos.
 8. Resuspender el ADN en 200 µl de TE (ver anexo), homogenizar sin usar las puntas de las pipetas automáticas. Añadir 10 ul de ARNasa libre de DNAasa incubar a 37 •C por 1 hora y media.
 9. Añadir 190 µl de TE (ver anexo), homogenizar suavemente.
 10. Añadir 100 µl de NaCl 5 M, mezclar.
 11. Añadir 55 µl de CTAB (ver anexo) 10% mezclar e incubar a 65 •C por 10 minutos.
 12. Esperar que la muestra vuelva a temperatura ambiente, luego añadir 1 volumen de Cloroformo/Isoamilo (24:1), microcentrifugar a 13000 rpm durante 55 segundos.
 13. Se recupera la fase superior y se le añade 1 volumen de Fenol/ Cloroformo/Isoamilo (25:24:1) luego se microcentrifuga a 13000 rpm durante 55 segundos.
 14. Se recupera la fase superior y se le agrega 1 volumen de Cloroformo/Isoamilo (24:1). Se microcentrifuga durante 55 segundos a 13000 rpm.
 15. Se recupera la fase superior, se le añade 0.1 volúmenes de acetato de Sodio 3M pH 5.2 más dos volúmenes de etanol 100% para precipitar el ADN purificado, se deja a temperatura ambiente por 5 minutos. Luego se microcentrifuga a 13.000 rpm por 55 segundos.
 16. Se lava el pellet del ADN con etanol 70%, se elimina el alcohol y se deja secar al vacío y luego a temperatura ambiente.

17, Se resuspende el ADN con TE (ver anexo) según la cantidad de ADN que se tenga.

2.2.3 Digestión enzimática del ADN

En un tubo de microcentrifugación se mezcla el ADN que se quiere cortar, la enzima que se quiere utilizar (tomando en cuenta la relación 1 U de enzima/ug de ADN) y el tampón de la enzima (colocándolo en un volumen que representa el 10 % de la reacción). El tiempo de incubación es mínimo una hora y la temperatura generalmente usada es 37 °C.

2.2.4. Visualización del ADN

2.2.4.1. Electroforesis en gel de Agarosa (Según Maniatis et al, 1989)

1. Preparar el gel, usando el buffer de electroforesis (ver anexo) y la cantidad de agarosa necesaria de acuerdo al tamaño de los fragmentos de ADN. Se utiliza un horno microonda o una estufa para calentar la agarosa y mezclarla con el buffer de electroforesis, luego se deja enfriar y cuando la temperatura haya descendido hasta 55 °C se coloca el gel en la plataforma de geles previamente sellada y se inserta el peine del gel para crear los pozos donde se van a colocar las muestras de ADN. El bromuro de Etidio puede ser añadido al gel y al buffer de electroforesis a 0.5 µg/ml.
2. Después que el gel se ha endurecido, se retira tanto el sello de la plataforma de geles como el peine del gel. Luego se coloca la plataforma con el gel en la cubeta de electroforesis y se añade suficiente buffer de electroforesis para cubrir el gel ≈ 1 mm.
3. Preparar las muestras de ADN con una apropiada cantidad de buffer de depósito 5x (ver anexo) luego colocar las muestras en los pozos con una pipeta. Hay que estar seguro de incluir los apropiados

marcadores de peso molecular para ADN (ver anexo).

4. Arreglar los polos de tal manera que el ADN (cargado negativamente) migre hacia el anodo o polo positivo y realizar la electroforesis a 1-10 V/cm del gel.

5. Parar la electroforesis cuando el tinte azul de bromofenol del buffer de depósito (ver anexo) ha migrado totalmente indicando así que los fragmentos de ADN estén ópticamente bien separados. El azul bromofenol coemigra con fragmentos de ≈ 0.5 Kilopares de bases (kb).

2.2.5. Cuantificación de ADN y estimación de su pureza

Después de la extracción es necesario conocer la concentración y pureza del ácido nucleico que se ha logrado obtener para poder aplicar con eficiencia las manipulaciones siguientes.

La concentración de ADN se determina mediante espectrofotometría utilizando la propiedad de las bases púricas y pirimidínicas de absorber los ultravioletas a 260 nm.

Una unidad de absorbancia a 260 nm corresponde a:

-Una solución de ADN bicatenario a 50 $\mu\text{g/ml}$

-Una solución de ARN monocatenario a 40 $\mu\text{g/ml}$

Las proteínas absorben a un máximo de 280 y 260 nm. Para determinar si existe una contaminación proteica se efectúa un control de densidad óptica comparando la razón DO_{260}/DO_{280} que tiene que situarse entre 1.8 y 2.0 para tener un ADN puro. La metodología es explicada a continuación

1. Una vez encendido el cuantificador de ADN Genequant (Pharmacia®), aparece un mensaje, *Instrument Ready*, indicándonos que podemos proceder

2. Antes de tomar la lectura de la muestra, primero se debe tomar una lectura de referencia. Esta lectura se almacena y se usa como lectura base para todas las medidas de la muestra hasta que tome una lectura de referencia

3. Una vez lista la referencia, se puede medir la muestra. Se aplasta el botón de *Sample*, la máquina indicará cuando es oportuno colocar la muestra, realizado este paso, la máquina nos indicará la absorbancia de la muestra, si deseamos conocer la cantidad de ADN aplastamos el botón *DNA RNA*, para la pureza *Purity*, para conocer la razón DO_{260}/DO_{280} aplastamos el botón *Ratio*.

2.2.6. Purificación de un fragmento de ADN

2.2.6.1. Gen Clean (GENECLEAN KIT, BIO 101, 1070 Joshua Way, Vista Ca 92083)

1. Cortar del gel de agarosa los fragmentos deseados
2. Los fragmentos cortados son pesados en tubos de eppendorf, si el peso es < 0.4 g pasarlo a un tubo de 1.5 ml. Si es mayor usar un tubo más grande. Se toma en cuenta la siguiente relación para calcular el volumen de muestra que hay, $1 \text{ g} = 1 \text{ ml}$.
3. Añadir 3 volúmenes de solución de NaI (concentración final 4 M), aquí se elimina la agarosa. Incubar a $45 - 55^\circ\text{C}$ durante 5 minutos en baño maría agitando con suavidad. Verificar si el gel se ha disuelto, de lo contrario incubar por dos minutos más.
4. Añadir 15 μl de Glasmilk sobre la muestra, mezclar e incubar sobre hielo durante 5 min, agitar la muestra cada 1-2 min. Si el volumen de muestra es superior a 1.5 ml incubar hasta 15 minutos sobre hielo.
5. Centrifugar a 13000 RPM por 25 seg dos veces para precipitar el glassmilk.

6. Recuperar el precipitado y guardar el sobrenadante.
7. Recuperar el pellet, lavar 3 veces con 500 μ l de New Wash, centrifugar cada lavado 2 veces a 13000 rpm por 25 seg.
8. Después de la última centrifugación, se recupera el pellet, se lo dejar la vacío y luego la medio ambiente,
9. Se resuspende el pellet del ADN en TE (anexo 1) de acuerdo a la cantidad que haya.

2.2.7. Marcado de ADN con digoxigenina.

2.2.7.1. Método Random primed DNA labeling (Genius 1 DNA Labeling and Detection Kit, Boehringer Mannheim)

Este método se basa en la síntesis de ADN utilizando primers aleatorios (hexaprimers) y deoxynucleótidos marcados con digoxigenina. Una vez que la cadena molde es desnaturalizada, los primers se aparean, iniciando la elongación de la cadena hija, los nucleótidos marcados son empleados para la creación de las cadenas de esta manera al final del proceso las nuevas cadenas llevarán incorporado la molécula de digoxigenina (figura 16).

1. El ADN debe ser linearizado previamente para optimizar el marcaje del mismo. Después el ADN deber ser desnaturalizado en un baño de agua hirviendo por 10 minutos y rápidamente ser enfriado en hielo por 30 segundos antes de su uso.
2. Se incuba en tubo de reacción el ADN linearizado y desnaturalizado con los siguientes reactivos: (tabla II)

REACTIVO	VOLUMEN
Cantidad de ADN	variable (10 ng-3 ug)
Mezcla de Hexanucleótidos	2 µl
Mezcla de dNTP para marcar	2 µl
H2O	hasta 19 µl
Enzima de Klenow	1 µl
Vólumen total	20 µl

Tabla II: Reactivos utilizados en el marcado con digoxigenina

La incubación se la realiza por 20 horas a 37 °C.

3. Se añade 2 µl de EDTA al tubo para terminar la reacción.

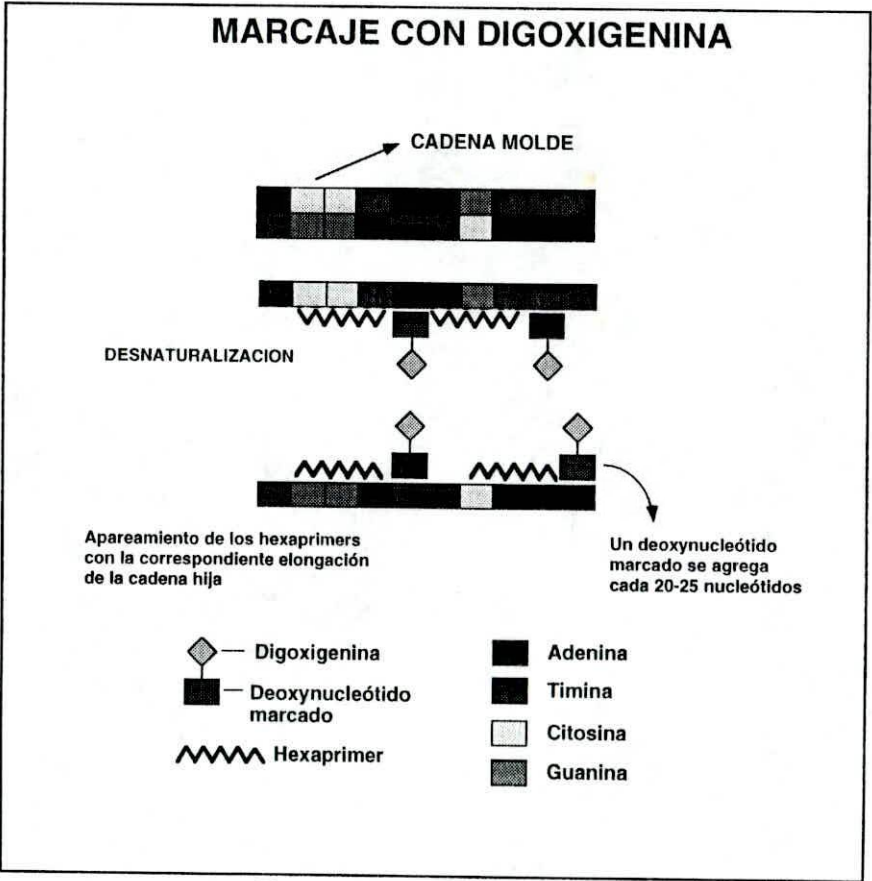


Figura 16: Random primer labeling

2.2.8. Técnicas de detección de ADN

2.2.8.1. Técnicas de Hibridación con sondas nucleicas

2.2.8.1.1. Southern Blot (Protocolo según The Genius System User's Guide for Filter Hybridization, Boehringer Mannheim, 1992)

1. Sumergir el gel de agarosa en solución desnaturalizadora (ver anexo 1) por 30-60 minutos a temperatura ambiente. Agitar suavemente. La incubación desnaturaliza el DNA blanco previo a la transferencia.
2. Sumergir el gel en solución neutralizadora (ver anexo 1) por 30-60 minutos a temperatura ambiente para neutralizar el gel.
3. Impregnar el ADN en una membrana de nylon (Boehringer Mannheim nylon membranes) cargada positivamente a través de una transferencia de capilaridad usando buffer 20x ssc (ver anexo 1). Realizar la operación de transferencia durante toda la noche.
4. Lavar la membrana en buffer 5x ssc (ver anexo 1) por 1 minuto a temperatura ambiente. El lavado remueve los restos del gel y contaminantes particulares que fueron introducidos como resultado del proceso de transferencia.
5. Cuidadosamente colocar la membrana húmeda sobre una pieza de papel toalla. Para fijar el ADN a la membrana, se la coloca en una estufa a una temperatura $\approx 80^{\circ}\text{C}$ por una hora. También se puede usar un horno U.V. crosslinker para fijar el ADN, en este caso se deja la membrana por 3 minutos.

6. Después de una hora, la membrana puede ser usada para la prehibridización o ser almacenada seca a -4°C en un cámara de desecamiento para futura detección.
7. Colocar la membrana en una funda plástica que contenga 20 ml de solución de prehibridación (ver anexo) por 100 cm^2 de área de membrana. Sellar la funda y prehibridizar a la temperatura de hibridación por 2 horas. La temperatura óptima de hibridación dependerá del largo de la sonda y de que tan grande sea la homología de secuencia.
8. Cuando se usan sondas ADN de doble cadena, hay que desnaturalizarla calentándola en agua hirviendo por 10 minutos previo a la hibridación.
9. Diluir la sonda en solución estándar de hibridación (ver anexo). El volumen de sonda a emplearse dependerá del tamaño de la muestra.
10. Eliminar la solución de prehibridación, colocar la solución estándar de hibridación que contiene la sonda marcada con digoxigenina. Dejar que la sonda se hibride, la temperatura y el tiempo de hibridación dependerá de la sonda y su concentración .
11. Al final de la hibridación, se recupera la solución de hibridación que contiene la sonda, se la guarda en un tubo y se la almacena en congelación a -20°C . La solución entera podrá ser utilizada en futuras hibridaciones.
12. Lavar la membrana dos veces en wash solution 2x. a temperatura ambiente. Este paso y el siguiente remueven

la sonda que no se ha unido, lo cual podría conducir a grandes falsos positivos si no es removido.

13. Lavar la membrana dos veces cada 15 minutos en wash solution 0.5x. Sondas grandes (> 100 bp) deben ser lavadas a -65 °C.

El revelado de la hibridación se lo efectúa mediante la técnica de detección colorimétrica .

2.2.8.1.2. ADN Dot Blotting (Protocolo según The Genius System User's Guide for Filter Hybridization, Boehringer Mannheim, 1992)

1. Añadir 0.1 volúmenes de solución desnaturizadora (ver anexo) a la muestra. Incubar a temperatura ambiente por 10 minutos. Esta solución desnaturaliza el ADN blanco y degrada cualquier ARN en la muestra.

2. Si la impregnación se la realiza sobre nitrocelulosa, neutralizar la muestra a través de la adición de un volumen igual de solución neutralizadora de nitrocelulosa (ver anexo). Esto no es necesario si la impregnación se la realiza sobre membranas de nylon.

3. Preparar la membrana de acuerdo a las recomendaciones del manufactor. Las membranas de nylon (Boehringer Mannheim Nylon membranes) cargadas positivamente no requieren de pasos adicionales de preparación.

4. Colocar la membrana sobre una pieza de papel toalla. Usando una micropipeta automática, colocar 1 µl de la muestra de ADN sobre una membrana seca.

5. Fijar el ADN a la membrana con el horno U.V. crosslinking durante 5 minutos o en una estufa a $\approx 80^{\circ}\text{C}$ por dos horas.

6. Se repiten los pasos del 7-12 de la técnica anterior.

El revelado de la hibridación es obtenido a través de la técnica de detección colorimétrica.

2.2.8.1.3. Colony Hybridizations (Protocolo según The Genius System User's Guide for filter Hybridization, 1992. Boehringer Mannheim)

1. Sembrar las bacterias en una caja Petri que contenga medio LB (ver anexo) para *E. coli* o TCBS para *Vibrios marinos*
2. Después que las colonias hayan alcanzado un diámetro de 1-2 mm, guardar las placas en refrigeración a 4°C por una hora.
3. Colocar las membranas sobre las colonias de la caja petri durante 5 minutos.
4. Remover las membranas. Lisar las células de las membranas incubando la membrana en solución desnaturizadora (ver anexo) durante 15 minutos dejando las colonias en la parte arriba.
5. Incubar las membranas por 15 minutos en solución neutralizadora (ver anexo).
6. Fijar el ADN a la membrana con U.V. crosslinking o colocando la membrana en una estufa a $\approx 80^{\circ}\text{C}$ por dos horas.

7. Antes de la prehibridación incubar las membranas en solución de prehibridación a la temperatura anticipada de hibridación por una hora. Este paso elimina los restos del cultivo bacteriano.

8. Se repiten los pasos 7-12 del Southern Blot.

2.2.8.2. Visualización de la hibridación

2.2.8.2.1. Detección colorimétrica con NBT y X-Phosphate (Protocolo según The Genius System User's Guide for Filter Hybridization, Boehringer Mannheim, 1992)

1. Después de la hibridación y de los lavados de post-hibridación equilibrar la membrana en Genius buffer 1 (ver anexo) por 1 minuto.

2. Usando una caja petri nueva o una funda bloquear la membrana con el Genius buffer 2 (ver anexo) utilizando una agitación suave durante 30-60 minutos. Al acercarse el final del período de bloqueo, preparar la solución de anticuerpo como se describe en el paso 3.

3. Diluir el anticuerpo antidigoxigenina-fosfatasa alcalina 1:5000 en el Genius buffer 2 (ver anexo 1) para obtener una concentración de trabajo de 150 mU/ml. Mezclar suavemente por inversión. Por ejemplo añadir 6 µl antidigoxignina a 30 ml de Genius buffer 2 (ver anexo) y mezclar. La solución de anticuerpo es estable por 12 horas a 4 °C.

4. Eliminar el Genius buffer 2 (ver anexo) e incubar la membrana por 30 minutos en la solución de anticuerpo

preparada en el paso 3. Si una funda es usada, hay que remover todas las burbujas de aire que se pueden presentar en la funda.

5. Transferir la membrana a una nueva funda o un disco que nunca ha estado en contacto con el anticuerpo antidigoxigenina.

6. Lavar dos veces, 15 minutos por lavado, en 100 ml de Genius buffer 1 (ver anexo). Este paso remueve el anticuerpo no unido.

7. Equilibrar la membrana en 20 ml Genius buffer 3 (ver anexo) por dos minutos.

8 Mezclar 45 μ l de NBT y 35 μ l X-phosphate en 10 ml de Genius buffer 3. Esta solución se denomina Solución de Coloración de Sustrato, es preparada antes de equilibrar la membrana con el Genius buffer 3 (ver anexo) y va a ser utilizada en el paso 9.

9. Eliminar el Genius buffer 3 y añadir aproximadamente 10 ml de Solución de Coloración de Sustrato a la membrana. Incubar la membrana en una funda plástica sellada o en una caja en la oscuridad. No agitar el contenido mientras la coloración se este desarrollando. La reacción es usualmente completa después de 12 horas.

10. Una vez que las manchas o bandas deseadas son detectadas, lavar la membrana con H₂O para prevenir sobredesarrollo. También puede utilizarse TE (ver anexo) o Genius buffer 4 (ver anexo) para parar la reacción de coloración.

CAPITULO III

RESULTADOS

En la estrategia de prevención de enfermedades infecciosas de camarones peneidos, las sondas moleculares parecen esenciales para desarrollar pruebas de diagnóstico útiles en cuanto a su sensibilidad, especificidad y aplicabilidad a las diferentes fases de la producción. Esta estrategia puede estar basada en anticuerpos específicos de determinantes antigénicos o en sondas nucleicas específicas de secuencias del material genético. La línea de investigación presentada se refiere a este segundo tipo de sondas, considerando las sondas nucleicas como reactivo homólogo o heterólogo.

En lo que concierne a la preparación y el uso de sondas nucleicas homólogas, el trabajo fue iniciado sobre un modelo bacteriano de tipo probiótico susceptible de constituir una alternativa al uso de antibióticos para controlar las cepas bacterianas patógenas. Desde el punto de vista tecnológico, la preparación de sondas homólogas de una bacteria parece un buen modelo, teniendo en cuenta que las bacterias pueden ser cultivadas fácilmente.

En lo que se refiere al uso de sondas nucleicas heterólogas y por tanto, inmediatamente disponibles, el trabajo fue iniciado sobre el modelo viral correspondiente al densovirus de la necrosis infecciosa hipodérmica y hematopoyética (IHHNV), debido a la disponibilidad de una sonda correspondiente al genoma completo de un densovirus del lepidóptero *Junonia coenia*.

3.1. Desarrollo de sondas nucleicas y pruebas de tipo dot-blot y colony-blot específicas de la cepa 158 de *Vibrio alginolyticus*, asociada a *Penaeus vannamei*

La bacteria *Vibrio alginolyticus*, cepa 158, fue obtenida de un laboratorio de producción donde fue aislada y utilizada como “probiótico”. El desarrollo de sondas nucleicas y de una prueba de tipo colony-blot fueron motivados por el interés de poder reconocer, detectar y cuantificar esta cepa en poblaciones bacterianas asociadas a larvas de camarón. Este tipo de sondas fue considerado preferencialmente a anticuerpos debido a que su preparación es, teóricamente, más rápida que la preparación de anticuerpos. Además, esta estrategia permitió el desarrollo en el CENAIM de tecnología del ADN, mientras la tecnología de preparación de anticuerpos e inmunodiagnóstico estaban más desarrolladas. Debido al carácter innovador de este trabajo, se escogió trabajar con bacterias, que como ya hemos mencionado, se pueden cultivar en medios de cultivo y por tanto se puede disponer de ellas sin límites para la preparación de la sonda, de la prueba y la evaluación de ambas.

3.1.1. Puesta en evidencia y caracterización de un plásmido

Teniendo en cuenta que las bacterias pueden poseer ADN extracromosómico plasmídico, inicialmente este tipo de ADN fue buscado. Este ADN es fácil de aislar, manipular y puede corresponder a genes particularmente importantes en algunos caracteres relacionados con una función, por ejemplo, la probiosis.

La aplicación de diferentes técnicas de aislamiento de ADN (ver Materiales y Métodos) permitió detectar constantemente la presencia de una

banda de ADN extracromosómico mediante electroforesis. Debido a su actuación cualitativa y cuantitativa y a su simplicidad, la técnica de minipreparación por lisis alcalina fue regularmente utilizada en la extracción de ADN plasmídico. Se debe señalar que esta técnica permite la obtención de ADN plasmídico puro, prácticamente sin contaminación con ADN cromosómico (Figura 17).

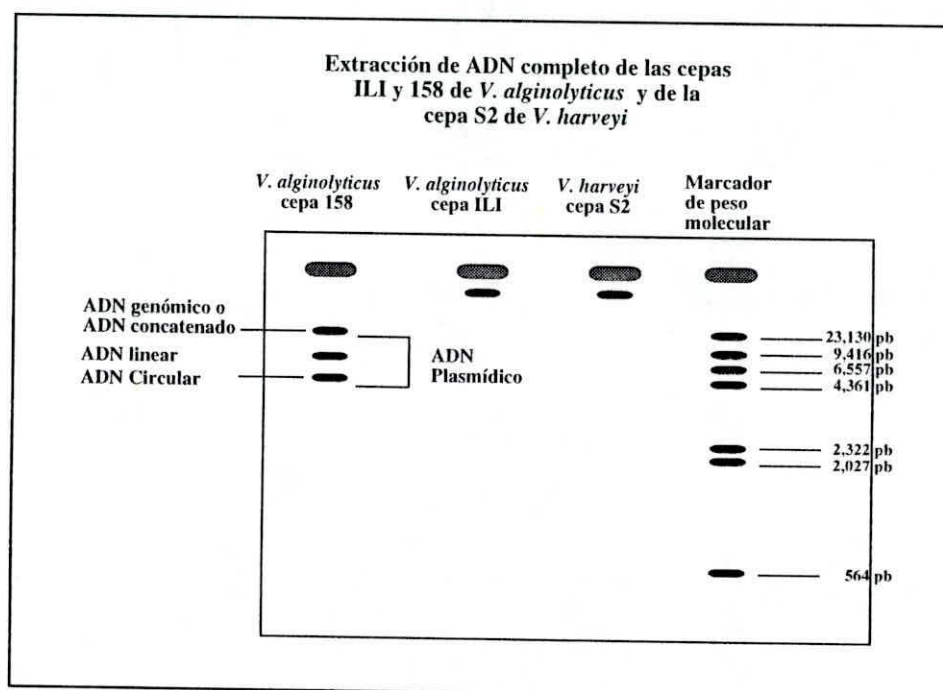


Figura 17: Extracción ADN total 158

La electroforesis en gel de agarosa condujo regularmente a la observación de 3 bandas (I de 23.13 Kb, II de 7.387 Kb y III de 4.898 Kb) y ocasionalmente una cuarta banda suplementaria (2.182 Kb) de peso molecular muy inferior a las otras. Las bandas II y III están muy próximas la una a la otra por lo que fueron purificadas de forma simultánea.

Las relaciones entre las diferentes bandas fueron investigadas para determinar si correspondían a diferentes formas de un mismo plásmido o a más de un plásmido. Con este fin fueron paralelamente purificadas las bandas

II-III y la banda IV. Cada una de estas preparaciones fueron analizadas por electroforesis. La electroforesis de la banda II-III mostró una imagen igual a la del ADN plasmídico completo, presentando ocasionalmente una cuarta banda. Al contrario, la preparación correspondiente a la banda IV purificada llevó a la identificación de esta banda solamente, después de la electroforesis.

Estas bandas, II-III y IV fueron posteriormente marcadas y utilizadas como reactivos de southern-blot para determinar similitudes de secuencias entre las bandas. Los resultados de esta experimentación de hibridaciones cruzadas mostraron que cada sonda reconocía las cuatro bandas, indicando la similitud de secuencias. Estas diferentes bandas fueron consideradas como las diferentes formas que puede presentar un plásmido: multimérica (I), lineal (II), circular (III), superenrollada simple cadena (IV). Esta última forma es raramente observada y puede ser interpretada como un artefacto de la técnica de purificación. Se piensa adicionalmente que a nivel de la primera banda existe la presencia de ADN genómico.

Similarmente, fueron realizadas extracciones de ADN de otras cepas bacterianas: ILI, 160 y 166, cepas usadas como probiótico. Mientras que no se aisló ningún plásmido de ILI, un plásmido del mismo tamaño y patrón electroforético fue identificado en las cepas 160 y 166.

Las enzimas de restricción, Eco RI, Bam HI, Alu I y Hha, fueron empleadas para intentar establecer el mapa de restricción del plásmido. La digestión con BamHI produjo una sola banda, lo que nos indica que el plásmido pasó de una forma circular a una lineal.

La enzima Hha mostró un patrón de restricción de cinco fragmentos, con los siguientes tamaños: 1.623 Kb, 1.234 Kb, 1.028 Kb, 687 pb y la última banda menor a 564 pb.

La digestión con Alu I mostró cinco fragmentos de 1.220 Kb, 1.061 Kb, 680 pb y los dos últimos menores a 564 pb, de menor peso que el marcador utilizado, por lo cual no fue posible estimar los tamaños de estas dos bandas.

El plásmido (figura 18) de la cepa 158 fue considerado como marcador potencial de cepas “probióticas” y por tanto como reactivo de elección para desarrollar una prueba de detección específica, de acuerdo con el concepto de sonda nucleica.

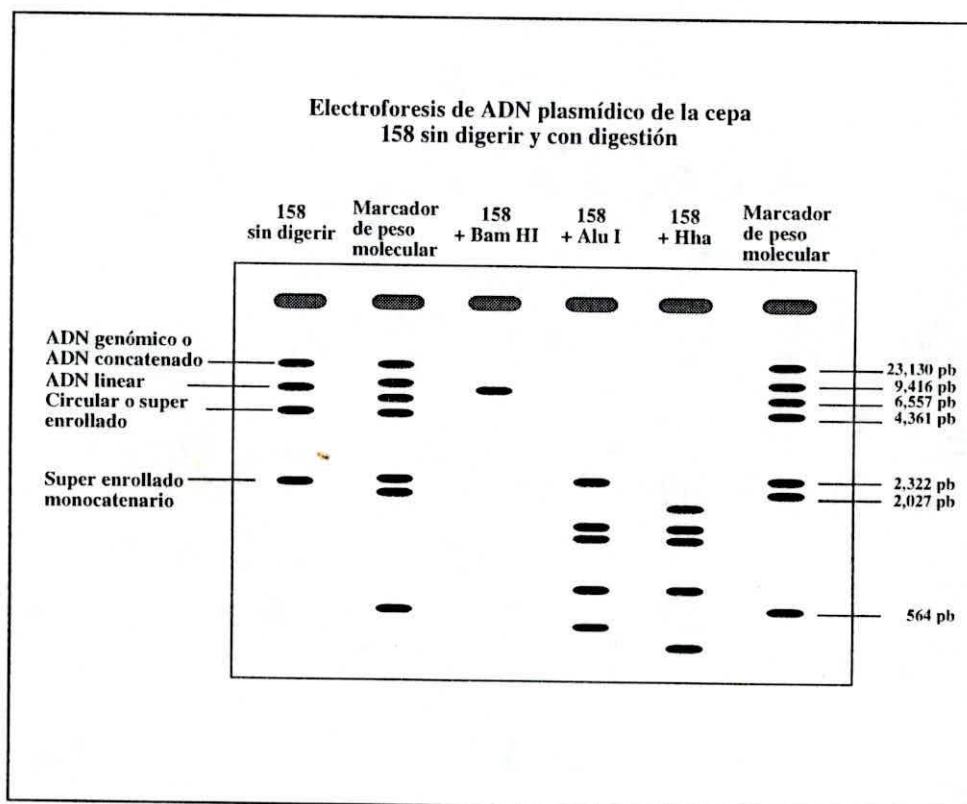


Figura 18; ADN plasmídico de la cepa 158 digerido

3.1.2. Preparación de una sonda nucleica “fría”

La preparación de una sonda nucleica corresponde generalmente a un fragmento del material nucleico de un organismo, fragmento que deberá ser clonado en un vector, a fin de ser producido en cantidad y subsecuentemente marcado. En el presente caso, se consideró el uso directamente del plásmido completo ya que la bacteria *Vibrio alginolyticus* puede ser cultivada fácilmente. En lo que concierne al tipo de marcador, fue imposible pensar en el uso de sondas radioactivas en laboratorios de camarón debido al problema de manejo de residuos y la inestabilidad del marcado relacionado con la vida media de los isótopos radioactivos.

Una técnica de marcado no radioactivo o “frío”, que es muy utilizada en la actualidad corresponde a la síntesis de ADN con el uso de nucleótidos marcados con digoxigenina, síntesis iniciada aleatoriamente con una mezcla de hexanucleótidos que reaccionan con la ADN polimerasa y la matriz de ADN previamente desnaturalizada en simple cadena. El marcado fue realizado siguiendo estrictamente el protocolo y recomendaciones del proveedor del kit de marcado (ver Materiales y Métodos).

A partir de 10 ml de ADN plasmídico directamente extraído de la bacteria 158 (200 ng), fueron obtenidos 130 ng de sonda marcada (**p158**) por referencia a la muestra dada en el kit. Esta rentabilidad de la operación de marcado fue aceptable, considerando las informaciones del proveedor. Ulteriormente, la sonda fue utilizada a la concentración de 10 ng/ml de tampón de hibridación.

La sensibilidad de la sonda fue determinada con la técnica de dot-blot, depositando sobre una membrana muestras de 1 µl correspondientes a una gama de dilución del plásmido, de 1 ng/µl a 0.1 pg/µl. Esta sensibilidad fue estimada en cerca de 10 pg de ADN plasmídico, que es compatible con la idea de desarrollar una prueba de tipo colony-blot, considerando la cantidad de ADN plasmídico que puede fijarse de una colonia.

La especificidad de la sonda fue posteriormente analizada también mediante la técnica de dot-blot, probando su reactividad *frente a frente* de diferentes ADN: *Vibrio harveyi*, cepas S2 y E22; *V. alginolyticus*, cepas 158, 160, 166 y proA; los plásmidos Mos y Hsp-Luc de *Escherichia coli*; y ADN de *Penaeus vannamei*.. Los resultados de la figura 19, muestran una reactividad de la sonda solamente con las cepas bacterianas 158, 160 y 166, todas pertenecientes a la especie *V. alginolyticus*. Por el contrario, las cepas ILI y proA, de los mismos orígenes no tuvieron reactividad. Es muy importante notificar que las dos cepas, ILI y 158 tienen el mismo origen geográfico y fueron consideradas como una sola cepa, mientras que el plásmido permite diferenciarlas categóricamente. La cepa 158, parece finalmente, considerando este plásmido, más relacionada con las cepas 160 y 166. La cepa proA, originaria de otro laboratorio, no presentó reactividad.

Estas observaciones fueron confirmadas con otras preparaciones de sondas correspondientes a fracciones del ADN plasmídico previamente separado por electroforesis, sean las bandas II-III o la banda IV.

Los resultados indican el interés de las sondas nucleicas como herramienta de caracterización bacteriana. La disponibilidad de esta sonda permitió iniciar

el desarrollo de una prueba para el diagnóstico cuantitativo y cualitativo de bacterias posiblemente probióticas dentro de poblaciones bacterianas presentes en los laboratorios y asociadas a larvas de camarón. Dicha prueba podría ser útil en la estrategia de uso de bacterias probióticas, permitiendo un constante seguimiento de su evolución.

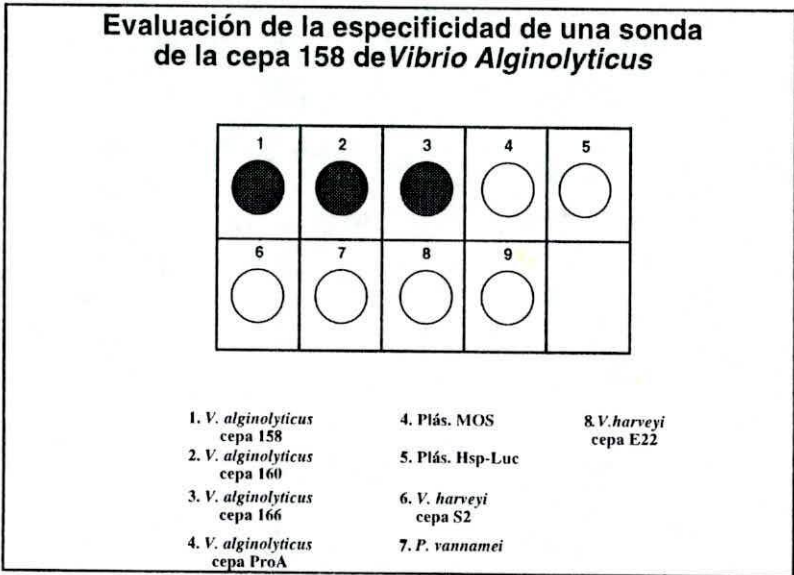


Figura 19: Dot Blot de especificidad de la sonda p158

3.1.3. Desarrollo de una prueba de tipo colony-blot con la sonda nucleica correspondiente al plásmido de la cepa 158.

Entre los distintos tipos de diagnóstico basados en el uso de sondas nucleicas, el colony-blot es una prueba de elección, teniendo en cuenta que permite reconocer específicamente colonias bacterianas en mezcla compleja de todo tipo de muestra en cultivo en agar. Además de esta gran especificidad, la prueba colony-blot es muy sensible pues se beneficia de la multiplicación bacteriana, permitiendo identificar en pocas horas de cultivo la presencia de una bacteria. La prueba colony-blot permite también estimar la población de la bacteria identificada (número de colonias reconocidas por la sonda) y estimar la proporción de estas bacterias en la mezcla (porcentaje de colonias reconocidas por la sonda).

Debido a que pruebas de tipo colony-blot con sondas nucleicas son frecuentemente practicadas en biología molecular para la selección de clones en bancos de ADN genómico o complementario (cADN), muchas referencias están disponibles (Moseley et al, 1980; Moseley et al, 1982) y descritas en libros de protocolos de biología molecular (Maniatis et al, 1989) y en la documentación técnica suministrada por proveedores (Boehringer, 1992).

Parámetros experimentales fueron analizados y optimizados. Por comodidad de presentación serán mostrados en forma resumida en un protocolo "optimizado" (tabla III).

Los tipos de membranas empleadas fueron, nylon y nitrocelulosa, proporcionando el último tipo un menor "ruido de fondo".

Se probaron dos tiempos de pre-hibridación, de 1 y 2 horas, encontrándose que 2 horas disminuían significativamente el "ruido de fondo".

La concentración de la sonda fue siempre la misma (10 ng/ml) de acuerdo con los resultados observados en el dot-blot (ver texto anterior), lo único que se cambió fueron los tiempos de hibridación, de 3, 5 y 16 horas, observándose que incluso con solo tres horas de hibridación se conseguía una respuesta similar a la respuesta observada a las 16 horas, lo que supone una ventaja si se piensa en desarrollar un método de diagnóstico.

El tiempo de cultivo de las bacterias antes de iniciar el colony-blot fue analizado a fin de determinar el tiempo mínimo de cultivo que permitiera el reconocimiento de colonias que correspondería en esta situación al criterio de

Tabla III: Protocolo optimizado del Colony Blot

Paso	Tiempo
1. Siembra de bacterias e incubación a 28°C	9 horas
2. Enfriar las cajas de cultivo a 4°C	1 hora
3. Colocar una membrana de nitrocelulosa sobre la caja de cultivo	5 minutos
4. Remover la membrana y colocarla en solución de desnaturalización	15 minutos
5. Incubar la membrana en solución de neutralización	15 minutos
6. Se fija el ADN a la membrana con el U.V. crosslinker	2 minutos
7. Para eliminar el exceso de colonias bacterianas, se incuba dos veces la membrana en solución de prehibridación a 68 °C	2 horas
8. Incubar la membrana con la sonda nucleica, que ha sido previamente desnaturalizada, dejar a 68 °C	3 horas
9. Al final del tiempo de incubación, se guarda la solución de hibridación en un tubo nuevo a -20°C. Lavar la membrana dos veces en wash solution 2x	5 minutos por cada lavado
10. Lavar la membrana dos veces en wash solution 0.5 x a 65 °C	15 minutos por cada lavado
11. Después de los lavados se equilibra la membrana con Genius Buffer 1	1 minuto
12. La membrana es bloqueada con Genius buffer 2, se utiliza una ligera agitación	30 minutos
13. Se incuba la membrana en la solución de anticuerpos (anti-DIG-alkaline phosphatase)	30 minutos
14. Se elimina la solución de anticuerpos, se lava la membrana en Genius Buffer 1 dos veces	15 minutos cada lavado
15. Se equilibra la membrana en Genius Buffer 1	2 minutos
16. Se deja incubar la membrana en la solución de coloración hasta obtener el revelado de la reacción	2-12 horas

sensibilidad. Se probaron tiempos de cultivo de 4, 5 y 9 horas, comprobándose que era necesario un cultivo de 9 horas para la obtención de resultados positivos.

Estos resultados de colony-blot y dot-blot, en términos de sensibilidad y especificidad, indican que esta tecnología nueva en bacteriología de camarón es funcional. En efecto, el colony-blot puede ser ahora utilizado en experimentaciones para el estudio *in vitro* e *in vivo* de interacciones de las bacterias 158, 160 ó 166, todas con una supuesta función probiótica, con otras bacterias posiblemente patógenas de tipo *Vibrio harveyi*. Es este tipo de estudios el que podría determinar en el futuro si efectivamente una bacteria tiene una función probiótica. Una aplicación factible a corto plazo concerniría a la ecología y/o epidemiología de bacterias de tipo probiótico, fácilmente identificada por la presencia del plásmido, teniendo en cuenta que los plásmidos frecuentemente son portadores de genes que podrían estar relacionados con su capacidad probiótica (genes codificadores de bactericinas, genes de resistencia a antibióticos, etc). Este colony-blot puede inmediatamente ser usado en laboratorios que utilicen estas cepas de bacterias probióticas para controlar su destino y su evolución, con el objetivo de modificar las condiciones de cultivo para favorecer a las bacterias probióticas.

3.2. Evaluación de una sonda específica del densovirus del lepidóptero *Junonia cænia* para el diagnóstico de IHNV.

Debido a su gran importancia en la regulación de las poblaciones de insectos causantes de plagas en agricultura, los densovirus de insectos son especialmente bien conocidos. Sus genomas son particularmente pequeños, con un tamaño de cerca de 5.000 nucleótidos. El genoma de algunos densovirus de insecto ha sido

secuenciado y diferentes laboratorios han sido capaces de clonar el genoma completo en un plásmido bacteriano ((Jourdan et al, 1990; Dumas et al, 1992)). Así, sondas correspondientes al genoma completo pueden ser fácilmente preparadas por simple marcado.

Teniendo en cuenta las relaciones entre insectos y crustáceos es muy probable que existan también relaciones entre sus virus, lo que significa, presencia de homologías en las secuencias de los genomas de ambos. Consecuentemente se decidió probar si una sonda preparada a partir del genoma completo del densovirus de *Junonia cænia* podría ser utilizada como sonda heteróloga para el diagnóstico de IHHNV de camarón, clasificado también en el género *Densovirus* de la familia Parvoviridae.

3.2.1. Preparación de una sonda “fría” específica de densovirus de *Junonia cænia*.

El plásmido recombinante pBRJ, que contenía el genoma completo del densovirus de *J. cænia*, fue producido en *Escherichia coli*, purificado y digerido con el enzima BamH1 debido a que existen solamente sitios de restricción para esta enzima en las terminaciones repetidas del genoma viral. Así fue posible obtener dos fragmentos correspondientes respectivamente al plásmido y al genoma viral casi completo. Este último fue purificado por electroforesis y extracción del gel mediante el kit “gen clean”.

Este fragmento fue posteriormente marcado con digoxigenina (ver Materiales y Métodos). La eficacia del marcado fue estimada en 10 ng/mL por comparación con una sonda de referencia suministrada en el kit.

La sensibilidad de la sonda fue analizada frente a una serie de diluciones del inserto correspondiente al genoma viral del densovirus de *J. cænia*. Esta sensibilidad fue estimada en cerca de 10 pg en dot-blot (gráfico 20). Esta sensibilidad relativamente débil puede ser explicada por una menor eficacia de marcado observada en el laboratorio cuando se marcan fragmentos lineares en comparación al marcado de plásmidos circulares.

La reactividad de la sonda derivada del densovirus **Jc** fue analizada frente a las muestras provistas en el kit de diagnóstico de IHHNV (X-Diagxotic) y correspondientes a controles positivo fuerte, débil y al control negativo .

Los resultados indicaron claramente una reactividad específica *frente a frente* del ADN de IHHNV. Esta especificidad fue confirmada por la ausencia de hibridación con ADN de camarón extraído de hepatopáncreas, con una preparación de ADN plasmídico de la bacteria *Vibrio alginolyticus* y con una preparación de ADN genómico de la bacteria *V. harveyi*.

La sonda del densovirus **Jc** fue posteriormente evaluada como sonda heteróloga frente a muestras de camarón identificadas como infectados por IHHNV gracias al uso del kit de diagnóstico de Diagxotic (figura 21). Los resultados mostraron que la sonda del densovirus Jc reconoció la muestra infectada, aunque con una menor sensibilidad en comparación a la sonda del kit de diagnóstico de IHHNV.

Considerados de forma global, estos resultados indican la posibilidad de utilizar la sonda heteróloga del densovirus Jc para el diagnóstico de IHHNV, con la condición previa de incrementar la sensibilidad de detección.

Evaluación de sensibilidad de la sonda Jc

1 	2 	3 
4 	5 	6 

1. 1 ng de ADN *Junonia cænia*
2. 100 pg de ADN *Junonia cænia*
3. 10 pg de ADN *Junonia cænia*
4. 1 pg de ADN *Junonia cænia*
5. 0,1 pg de ADN *Junonia cænia*
6. 0,01 pg de ADN *Junonia cænia*

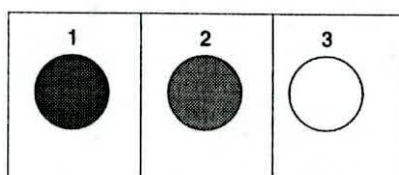
Evaluación de la especificidad de la sonda Jc

1 	2 	3 
4 	5 	

1. ADN de *Junonia cænia*
2. ADN de camarón con IHNV
3. ADN plasmídico de cepa 158 *Vibrio alginolyticus*
4. ADN de cepa S2 *Vibrio harveyi*
5. ADN hepatopáncreas de camarón

Figura 20: Evaluación de sensibilidad y especificidad de la sonda Jc

Evaluación de la especificidad de la sonda Jc con el control del Kit IHNV shrimp probe de DiagXotics

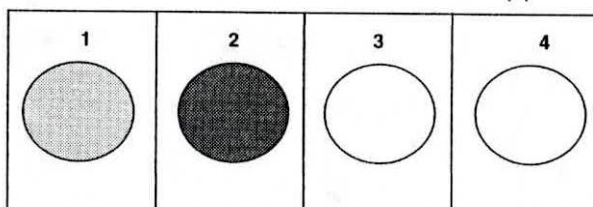


Control del kit de "IHNV shrimp probe" de DiagXotics

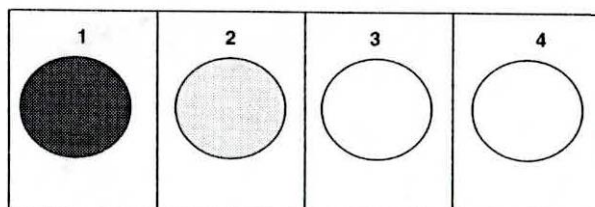
1. Control positivo fuerte
2. Control positivo débil
3. Control Negativo

Comparación de la respuesta de la sonda Jc frente a la sonda del Kit IHNV shrimp probe de DiagXotics

Membrana evaluada con la sonda del Kit IHNV shrimp probe de DiagXotics



Membrana evaluada con la sonda Jc



1. ADN *Junonia cænia*
2. ADN c amarón con IHNV
3. ADN hepatopáncreas de camarón
4. ADN plasmídico de cepa 158

Figura 21: Evaluación de la respuesta de la sonda Jc

CONCLUSIONES GENERALES

El desarrollo de sondas moleculares de tipo nucleico fue iniciado en el CENAIM con la perspectiva de obtener nuevas herramientas de diagnóstico para los microorganismos asociados a camarón, ya sea útiles como las bacteria probióticas o patógenos como los virus.

El trabajo fue organizado para explorar paralelamente dos tipos de sondas nucleicas, homólogas y heterólogas.

El concepto de sonda homóloga corresponde a una situación en la que el material de origen de la sonda es idéntico al material genético diana. En práctica, la preparación de una sonda homóloga de un microorganismo determinado implica la obtención de su material genético y la selección de una parte considerada como específica, correspondiendo la sonda a esta parte previamente marcada.

Una sonda homóloga fue preparada para una cepa bacteriana identificada como *Vibrio alginolyticus* en base a criterios bioquímicos, y además caracterizada por la presencia de un plásmido. Este plásmido fue considerado como parte específica del material genético de la cepa y utilizado directamente en la preparación de una sonda fría. A continuación una prueba de tipo colony-blot fue desarrollada para el diagnóstico de la cepa bacteriana. Este trabajo presentó algunas ventajas desde el punto de vista de su factibilidad. En efecto, la obtención del material genético de una bacteria es fácil así como la técnica de hibridación de la sonda con el ADN correspondiente a colonias bacterianas transferidas a una membrana. Además, no existen problemas de sensibilidad siempre y cuando las colonias puedan ser cultivadas el tiempo adecuado para que contengan un número de bacterias suficiente para una hibridación detectable.

El control de diversas tecnologías del ADN relacionadas con la preparación y el uso de sondas nucleicas permitirá investigaciones sobre la preparación de sondas nucleicas homólogas específicas de otros tipos de microorganismos asociados a camarón, en particular a los virus. Una dificultad corresponderá a la obtención de material genético con el que se deberá preparar las sondas, debido a la presente carencia del equipo necesario para la purificación de virus en el CENAIM.

Este problema de equipamiento fue en parte el origen del trabajo de exploración sobre el uso de sondas heterólogas para el diagnóstico de virus patógenos de camarón. La gran ventaja de sondas heterólogas está relacionada con su disponibilidad inmediata, pero tienen el riesgo de no ser funcionales por no existir suficiente homología con el ácido nucleico diana.

En este trabajo se estudió la posibilidad de utilizar una sonda específica de densovirus del lepidóptero *Junonia cænia* para el diagnóstico del densovirus del camarón causante del síndrome IHHN. Diferentes argumentos existieron para iniciar esta estrategia relativamente original en virología de camarón. Por una parte, existía una sonda homóloga del virus IHHN, que permitía realizar experimentaciones de hibridaciones cruzadas entre sondas y dianas correspondientes a los dos virus. Además, la sonda del densovirus Jc corresponde al genoma completo, lo que garantiza que esta sonda pueda reconocer la secuencia correspondiente a la sonda de diagnóstico de IHHNV, cualquiera que sea el fragmento genómico utilizado, ya que no existe información al respecto en el kit de diagnóstico. Los resultados indicaron que los dos virus tienen similitudes en las secuencias de sus genomas, ya que fueron detectadas hibridaciones cruzadas utilizando las dos sondas simultáneamente como sonda y como diana. Este resultado es interesante desde el punto de vista de relación taxonómica entre densovirus de insecto y de crustáceos. Además fue mostrado que la sonda heteróloga puede ser utilizada para identificar muestras de camarón

infectadas con IHHNV, aunque con menor sensibilidad. Esta limitación está probablemente relacionada con la baja eficacia de marcado con la digoxigenina de fragmentos lineares, que corresponde en esta situación al genoma del densovirus de Jc. Una alternativa para incrementar la sensibilidad de esta sonda podría consistir en marcar el plásmido recombinante completo.

Considerando este primer resultado sobre el uso de sondas heterólogas, parece primordial evaluar otras sondas heterólogas de virus de insectos, por ejemplo correspondientes a genes muy conservados entre baculovirus de insectos, como el gen de la poliedrina o de la ADN polimerasa. También podrían ser evaluadas sondas heterólogas correspondientes a genes bacterianos, por ejemplo genes de toxinas de *Vibrio cholera* que podrían tener homologías con genes de toxinas de *Vibrio harveyi*, patógeno para larvas de camarón.

En el futuro, la acumulación de información sobre las secuencias de genomas de virus asociados a los insectos podría permitir identificar pequeñas secuencias conservadas entre virus. Estas secuencias podrían también estar presentes en el genoma del virus de camarón y por tanto, ser consideradas como sondas homólogas.

RECOMENDACIONES

1. Proseguir rápidamente y en paralelo las estrategias de preparación de sondas nucleicas homólogas y de evaluación de sondas nucleicas heterólogas para el diagnóstico del mayor número de patógenos de camarón con el fin de mejorar los controles zoosanitarios.
2. Desarrollar nuevas técnicas de hibridación con mejor rendimiento en términos de sensibilidad y de aplicación al diagnóstico de campo.
3. Aplicar las técnicas relacionadas con las sondas nucleicas y la hibridación al estudio del genoma de camarón con el objetivo de caracterizar genes y secuencias de interés para la acuicultura, por ejemplo, transposones, genes de proteínas antimicrobianas o de hormonas.
4. Conectar del CENAIM con los bancos internacionales de secuencias y entrenamiento de científicos en programas de análisis de secuencias, con el objetivo de explotar la información existente en los diferentes grupos de invertebrados y de patógenos.
5. Entrenar a los acuicultores, biólogos y demás técnicos de los laboratorios y camaroneras en las técnicas de diagnóstico con sondas nucleicas y organizar la transferencia de estas tecnologías al sector camaronero y también a los sectores médico y agrícola.

ANEXO

REACTIVOS UTILIZADOS EN LAS DIFERENTES TECNICAS DE BIOLOGIA MOLECULAR

Extracción de ADN plasmídico

Método de lisis alcalina: miniprep

Preparación del medio Luria Bertani (LB)

Por litro:

A 950 ml de agua deionizada, se añade:

bacto-tryptone	10 g
bacto-yeast extract	5 g
NaCl	10 g

Se agita hasta que los solutos se hayan disueltos. Ajustar el pH a 7.0 con 5 N NaOH (~0.2 ml). Ajusta el volumen de la solución hasta un litro con agua deionizada. Esterilizar por autoclave durante 20 minutos.

Solución I (GTE)

Glucosa	50 mM
Tris.Cl (pH 8.0)	25 mM
EDTA (pH 8.0)	10 mM

Solución II

NaOH	0.2 N
SDS	1.0 %

Solución III

Acetato de potasio 5 M	60.0 ml
Acido acético glacial	11.5 ml
H ₂ O	28.5 ml

TE

Tris.Cl (pH 7.4)	10 mM
EDTA (pH 8.0)	1 mM

Método de lisis alcalina: maxiprep**STE**

NaCl	0.1 M
Tris.Cl (pH 8.0)	10.0 mM
EDTA (pH 8.0)	1.0 mM

Método Qiagen: midiprep**Buffer P1 (Buffer de resuspensión)**

Rnasa A	100 ug/ml
Tris.HCl	50 mM
EDTA (pH 8.0)	10 mM

Buffer P2 (Buffer de lisis)

NaOH	200 mM
SDS	1 %

Buffer P3 (Neutralization buffer)

Acetato de potasio pH 5.5	3.0 M
---------------------------	-------

Buffer QBT (Buffer de equilibración)

NaCl	750.0 mM
MOPS	50.0 mM
Etanol	15.0 %; ajustar el pH 7.0
Tritón X-100	0.15 %

Buffer QC (Buffer de lavado)

NaCl	1.0 M
MOPS	50 mM
Etanol	15 %; ajustar el pH a 7.0

Buffer QF (Buffer de elución)

NaCl	1.25 M
Tris.HCl	50 mM
Etanol	15 %; ajustar pH a 8.5

Electroforesis en gel de agarosa**Buffer de Electroforesis TAE****Solución stock 50X, pH ~8.5:**

Tris base	242.0 g
Acido acético glacial	57.1 ml
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	37.2 g

Se coloca agua hasta llegar a un litro

Loading buffer 10x

Ficoll 400	20%
Na ₂ EDTA, pH 8,0	0,1 M
SDS	1 %
bromphenol blue	0, 25 % (w/v)
xylene cyanol	0, 25 % (w/v)

SOLUCIONES UTILIZADAS EN LAS TECNICAS DE HIBRIDACION

Genius Buffer 1 (Detección Colorimétrica con NBT y X-Phosphate)

NaCl	150 mM
Tris-HCl, pH 7,5	100 mM

Se lo debe de filtrar a través de un filtro de membrana de 0,45 µm antes de usarlo.

Este buffer es estable por un año cuando es almacenado a temperatura ambiente.

Genius buffer 2 (Detección Colorimétrica con NBT y X-Phosphate)

NaCl	150 mM
Tris-HCl, pH 7,5	100 mM

2% Blocking reagent for nucleic acid hybridization.

A 80 ml de Genius buffer 1, se añade 2 g de Blocking reagent for nucleic acid hybridization. Se agita a 60 °C para disolver el Blocking reagent. No se deja hervir. El Blocking reagent se disolverá en aprox. 1 hora. Se completa con Genius buffer 2 hasta llegar 100 ml.

El Genius buffer es una solución espesa y no debe ser filtrada. Es estable por lo menos por dos semanas a 4 °C pero antes de usarse debe estar a temperatura ambiente. En alícuotas a -20 °C se conserva hasta por 6 meses.

Genius buffer 3 (Detección Colorimétrica con NBT y X-Phosphate)

Tris HCl 100 mM

NaCl 100 mM

Ajustar pH a 9,5

MgCl₂ 50 mM

Si el pH no es ajustado antes de añadir el MgCl₂, este se precipitará.

Se filtra a través de un filtro de membrana antes de usarlo.

Es estable por 6 mese a temperatura ambiente.

Genius buffer 4 (Detección Colorimétrica con NBT y X-Phosphate)

Tris-HCl 10 mM

EDTA 1 mM

Ajustar pH a 8.0

Este buffer es estable por 6 meses cuando se almacena a temperatura ambiente.

Wash solution 2X (Southern, Colony, Dot Blot)

SSC 2X

(Se diluye 1 volumen de 20X SSC con 9 volúmenes de agua deionizada)

SDS 0,1 %

Esta solución es estable por un año almacenada a temperatura ambiente.

Wash solution 0.5X (Southern, Colony, Dot Blot)

SSC 0,5X

(Diluir 1 volumen 20X SSC con 39 volúmenes de agua deionizada)

SDS 0.1 %

Esta solución es estable por un año almacenada a temperatura ambiente

SSC buffer, 20X (Southern blot)

NaCl 3 M

sodium citrate 300 mM

pH 7,0

Este buffer es estable por un año almacenado a temperatura ambiente.

Standard prehybridization solution (Southern, Colony, Dot Blot)

SSC 5X

N-lauroylsarcosine 0,1 %

Sodium dodecyl sulfate (SDS) 0,02 %

Blocking reagent for nucleic acid hybridization 1,0 % (w/v)

Esta solución es estable por un año almacenada a -20 °C. Almacenada a 4 °C por no más de dos semanas. Antes de usarlo debe estar a temperatura ambiente.

Solución de desnaturalización (Southern y Colony Blot)

NaOH 0,5 N

NaCl 1,5 N

Esta solución es estable por 6 meses almacenada a temperatura ambiente.

Solución de desnaturalización (Dot Blot)

NaOH 4 M

EDTA 100 mM

Esta solución es estable por 6 meses almacenada a temperatura ambiente.

Solución de neutralización (Colony, Southern Blot)

Tris HCl, pH 8,0 1,0 M

NaCl 1,5 M

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Boehringer Mannheim, 1992. The Genius System User's Guide for filter Hybridization.
2. Bonami J., and Shariff M., 1994. Distinction of HPV-type viruses in *Penaeus chinensis* and *Macrobrachium rosenbergii* using a DNA probe. Asian Fisheries Science 7:267-272.
3. Bonami. J.R., Bruce. L.D., Poulos. B.T., Mari. J., Lightner. D.V. (1995 a) Partial characterization and cloning of the genome of PVSNPV (=BP-type virus) pathogenic for *Penaeus vannamei*. Diseases of aquatic organisms, 23:59-66
4. Bruce L., Redman R., Lightner D., Bonami J., 1993 b. Application of gene probes to detect a penaeid shrimp baculovirus in fixed tissue using *in situ* hybridization. Dis. aquat. Org. 17:215-221.
5. Drilca Karl, 1992. Understanding DNA and gene cloning. A guide for the curious, second edition. John Wiley & Sons Inc, pp 4
6. Dumas B., Jourdan M., Pascaud A.M., and Bergoin M., 1992. Complete nucleotide sequence of the cloned infectious genome of *Junonia cænia* densovirus reveals an organization unique among parvoviruses. Virology, 191, 202-222.
7. Goggin C.L., Boulo V., Mialhe E., Cousin K., Hervio D., 1991. Diagnosis of *Perkinsus atlanticus* with monoclonal antibodies and DNA probes. European Aquaculture Society Special Publication, 14:123.
8. Frelier Paul. Conferencia "Early diagnosis and prevention of rickettsiosis in shrimp farming". Memorias del III Congreso Ecuatoriano de Acuicultura, en prensa.
9. Hasson Ken. Conferencia "Taura Syndrome of marine penaeid shrimp: demonstration of a viral etiology". Memorias del III Congreso Ecuatoriano de Acuicultura, en prensa.
10. Jourdan M., Jousset F-X, Gervais S., Skory S., Bergoin M. and Dumas B., 1990. Cloning of the genome of a densovirus and rescue of infectious virions from recombinant plasmid in the insect host *Spodoptera littoralis*. Virology, 179, 403-409.
11. Kellner-Cousin K., Le Gall G., Despres B., Kaghad M., Legoux P., Shire D., Mialhe E., Genomic DNA cloning of Rickettsia-like organisms of Saint-Jacques scallop *Pecten maximus*, 1993: evaluation of prokaryote diagnosis by hybridization with a non-isotopically labelled probe and by polymerase chain reaction. Dis. aquat. Org., 15: 145-152.

12. Le Deuff R.M., Bachere E., Boulo V., Despres B., Mialhe E., 1991. Preparation of specific reagents, monoclonal antibodies and nucleic probes, for diagnosis of Lymphocystis related virus (Iridoviridae). European Aquaculture Society Special Publication, 14:185-186.
13. Lehninger A., Nelson D., and Cox M, 1993. Principles of Biochemistry , second edition. Worth Publishers, Inc, pp 811.
14. Lewin Benajmin, 1994. Gene V, fifth edition.. Oxford University Press, pp 87-94.
15. Lightner D., Poulos B., Bruce L., Redman R., Nunan L., Pantoja C., Mari J., and Bonami J., 1994. Development and application of genomic probes for use as diagnostic and research reagents for the penaeid shrimp parvoviruses IHHNV and HPV and The Baculoviruses MBV and BP. USMSFP 10th Anniversary Review, GCRL Special Publication, 1:59-85.
16. Lubat V., Hervio D., Mialhe E., Grizel H., Baltz T., 1990. Characterization of a potential DNA probe for *Marteilia refringens*, a parasite of flat oyster *Ostrea Edulis*. 4th Internat. Colloq. Pathol. Marine Aquacul., 17-21 Sept, Vigo (Pontevedra), Spain.
17. Maniatis T., Fritsch E., and Sambrook J., 1989. Molecular cloning, a Laboratory manual, second edition, vol. 1, 2, 3. Cold Spring Harbor laboratory Press.
18. Mari J., Bonami J.R., Poulos B., Lightner D. (1993 a) Preliminary characterization and partial cloning of the genome of a baculovirus from *Penaeus monodon* (PmSNPV = MBV). Diseases of aquatic organisms 16, 207-215.
19. Mari J., Bonami J., and Lightner D., (1993 b). Partial cloning of the genome of infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus, an unusual parvovirus pathogenic for penaeid shrimps; diagnosis of the disease using a specific probe. Journal of General Virology, 74:2637-2643.
20. Mari J., Lightner D., Poulos B., and Bonami J., 1995. Partial cloning of the genome of unusual shrimp parvovirus (HPV): use of gene probes in disease diagnosis. Diseases of Aquatic Organisms, 22: 129-134.
21. Mialhe E., Boulo V., Bachere E., Hervio D., Cousin K., Noël T., Ohresser M., Le Deuff R.M., Gendreau S. (1992). Development of new methodologies for diagnostic of infectious diseases in mollusc and shrimp aquaculture. Aquaculture, 107:1-10.
22. Mialhe E., Bachere E., Boulo V., Cadoret J.P., *a consideración a*. Strategy for research and international cooperation in marine invertebrate pathology, immunology and genetics. Aquaculture.

23. Mialhe E.(1990). Infectious pathology in mollusc and shrimp hatcheries. In "Advances in tropical aquaculture" Ifremer Ed., 233-236.
24. Mialhe E., Bachere E., Boulo., Cadoret J.P., Saraiva E., Carrera L., Calderón. J., Colwell R., *a consideración b.* Biotechnology-based control of disease in marine invertebrates: developmente of molecular probe diagnostics and disease-resistant transgenic shrimps and mollucs. Molecular Marine Biology and Biotechnology.
25. Moseley S., Huq I., Alim A., So M., Samadpour-Motalebi M., and Falkow S., 1980. Detection of Enterotoxigenic *Escherichia coli* by DNA Colony Hybridization. J. Infect. Dis., 142:892-898.
26. Moseley S., Echeverria P., Seriwatana J., Tirapat C., Chaicumpa., Sakuldaipeara T., and Falkow S., 1982. Identification of Enterotoxigenic *Escherichia coli* by Colony Hybridization Using Three Enterotoxin Gene Probes. J. Infect. Dis., 145:863-869.
27. Poulos. B.T., Mari. J., Bonami. J.R., Redman. R., Ligthner. D.V. (1994). Use of non-radioactively labeled ADN probes for the detection of a baculovirus from *Penaeus monodon* by *in situ* hybridization on fixed tissue. Journal of virological methods. 49, 187-194
28. Robledo J.A.F., Bachere E., Boulo V., Despres B., Mialhe E., Figueras A.J., 1995. *Marteilia refringens* (Protozoa: Ascetosporra) Isolation and purification of the plasmodia, sporonts and spores; genomic DNA cloning test of a non isotopic labelled probe for the parasite diagnosis. Dis. aquat. Org.
29. Vickers. J.E., Bonami. J.R., Flegel. T.W., Ingham. A.B., Kidd. S.P., Lester. R.J.G., Lightner. D.V., Mari. J., Pemberton. J.M., Spradbrow. P.B., Wang. J.H., Wong. F.Y.K. and Young. P.R. (1993). A gene probe for monodon baculovirus. Second symposium on diseases in Asia. Aquaculture p. 2