

UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA SALUD

Detección de la Bacteria de la Necrosis Hepatopancreática (BNHP) en Camarón Blanco *Litopenaeus vannamei* Mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa en Granjas del Centro y Sur de Sonora



TESIS PROFESIONAL PRÁCTICA

Que para obtener el Título de

QUÍMICO BIÓLOGO CLÍNICO

Presenta:

Zulema Guadalupe Chalas Vega

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



“El saber de mis hijos
hará mi grandeza”



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

FORMA DE APROBACIÓN

Los miembros del jurado designado para revisar la Tesis Profesional de **Zulema Guadalupe Chalas Vega**, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el título de **Químico Biólogo Clínico**.

Dra. Luz Angélica Avila Villa

Directora de tesis

Dr. Joel Arias Martínez

Secretario

Dra. Alba Rocío Ochoa Meza

Vocal

Dra. Jael Teresa de Jesús Quintero Vargas

Suplente

DEDICATORIAS

A mis Padres

Dedico este proyecto de tesis con mucho amor a mis Padres María del Rosario Vega Cruz y Miguel Chalas Cruz por el gran apoyo que me brindaron para lograr culminar con esta profesión y por el esfuerzo que implicaron en mí emocionalmente para levantarme cada día y cumplir con este proyecto, y que cada esfuerzo fue por ellos, los Amo.

A mi hijo y abuela

Dedico este proyecto con mi más grande amor a mi hijo Fernando Martínez Chalas por ser el principal motivo que me llevó a ser una estudiante responsable, que me impulsó a terminar satisfactoriamente esta etapa profesional, fueron por ti cada desvelo, cada dolor de cabeza, cada satisfacción y cada sacrificio que hice al no estar a tu lado, sé que valdrá la pena cada uno de estos puntos porque todo lo hice pensando en tí, te Amo.

A mi abuela Rosario Cruz López por ser una excelente y la mejor maestra que he tenido, ya que desde mi crianza me ha brindado los mejores consejos que me ayudaron a elegir esta carrera y terminar este proyecto, para lograr ser una profesionalista responsable y dedicada, mi segunda Madre a la cual admiro.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mis Padres: Miguel Chalas Cruz y María del Rosario Vega Cruz; Abuela: Rosario Cruz López, Hijo: Fernando Martínez Chalas y marido: Fernando Martínez Valdéz, por apoyarme moral, económica y emocionalmente, en esta etapa y meta de mi vida que hoy he logrado culminar, por estar a mi lado cuando más los necesité y no dejarme caer en los momentos de estrés; así también les agradezco el estar a mi lado en los momentos de alegrías y satisfacciones.

A mi directora de tesis Dra. Luz Angélica Avila Villa y sínodos por permitir y motivarme, para llevar a cabo este proyecto de Tesis, el cual me enseñó a ser constante, tolerante y responsable en cada obligación y actividad que este requería; así como, a sentir entusiasmo e interés por conocer los resultados del trabajo realizado.

Al Dr. Roberto Rodríguez por brindarme su apoyo y hacerme prestación del laboratorio de análisis especiales, en el cual se llevó a cabo este proyecto; así como a todos los trabajadores del mismo, en especial al M.C. Gabriel Barco, por compartir sus conocimientos en las técnicas de Biología Molecular, así como sus conocimientos de grandeza, nobleza y humildad.

A mi amigo, compañero y colega pQBC. Sergio Luis Valle Sánchez por apoyarme en todo momento, en cuestiones de la licenciatura, maestría y vida personal, ya que ha sabido brindarme los mejores consejos y ser paciente al escucharme, gracias Sergio.

CONTENIDO

	Página
LISTA DE TABLAS	7
LISTA DE FIGURAS	8
RESUMEN	9
INTRODUCCIÓN	10
OBJETIVOS	12
General	12
Específicos	12
REVISIÓN DE LA LITERATURA	13
Importancia de la Camaronicultura	13
Características del Camarón Blanco <i>Litopenaeus vannamei</i>	14
Bacteria de la Necrosis Hepatopancreática (BNHP)	17
Mecanismos de Transmisión	17
Signos Clínicos	18
Etapas de la Enfermedad	18
Etapa aguda	18
Fase de transición	18
Fase crónica	19
Diagnóstico de la Bacteria de la Necrosis Hepatopancreática (BNHP)	19
Observación por Análisis en Fresco de Hepatopáncreas	19
Bioanálisis de Animales	20
Métodos de Detección del Antígeno Basados en Anticuerpos	20
Técnicas de Biología Molecular	20
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	22
Reacción en cadena de polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR)	23
METODOLOGÍA	24
Muestreo de Organismos	24
Extracción de ADNg a partir de hepatopáncreas de Camarón	25
Cuantificación de ADNg por Espectrofotometría UV	25
Detección de la BNHP por PCR	25
Electroforesis en Geles de Agarosa	26
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	27

Extracción con el Kit Gene Clean	27
Extracción con el Método de NaCl Saturado	28
Geles de Electroforesis	34
CONCLUSIONES	40
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41
ANEXOS	45
Anexo 1	45
Anexo 2	47
Anexo 3	48
Anexo 4	50
Anexo 5	52

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
1. Taxonomía de <i>L. vannamei</i> .	15
2. Granjas camaronícolas de la zona Centro y Sur del Estado de Sonora muestreadas de Enero a Julio de 2017.	24
3. Concentración e integridad de ADNg de hepatopáncreas de muestras de la granja 1, método de extracción: kit Gene Clean.	27
4. Concentración e integridad de ADNg de hepatopáncreas de la granja 1, método de extracción: NaCl saturado.	29
5. Concentración e integridad de ADNg de hepatopáncreas, método de extracción: NaCl. Granja 2, estanque 19.	29
6. Concentración e integridad de ADNg de hepatopáncreas, método de extracción: NaCl. Granja 2, estanque 23.	30
7. Concentración e integridad de ADNg de hepatopáncreas, método de extracción: NaCl. Granja 3, estanque 19.	31
8. Concentración e integridad de ADNg de hepatopáncreas, método de extracción: NaCl. Granja 4, estanque 34.	32
9. Concentración e integridad de ADNg de hepatopáncreas, método de extracción: NaCl. Granja 4, estanque 93.	32
10. Concentración e integridad de ADNg de hepatopáncreas, método de extracción: NaCl saturado. Granja 5, estanque 21.	33
11. Concentración e integridad de ADNg de hepatopáncreas, método de extracción: NaCl saturado. Granja 5, estanque 49.	33
12. Concentración e integridad de ADNg de hepatopáncreas, método de extracción: NaCl saturado. Granja 6, estanque 1.	34
13. Proporción de muestras negativas y positivas a la BNHP por PCR de las seis granjas analizadas.	38
14. Proporción de muestras negativas y positivas a la BNHP por PCR del número total de muestras analizadas con los métodos de extracción de Gene Clean y NaCl saturado.	39
15. Protocolo de temperatura en Termociclador para PCR.	51

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Producción anual acuícola de camarón en las principales naciones agrícolas en América Latina.	13
2. Camarón blanco <i>L. vannamei</i> .	15
3. Morfología interna de camarón <i>Peneido</i> generalizado.	16
4. Tejido de hepatopáncreas sano de camarón <i>L. vannamei</i> .	19
5. Tejido de hepatopáncreas infectado con la BNHP de camarón <i>L. vannamei</i> .	19
6. Productos de PCR de las muestras de ADNg de hepatopáncreas de la granja 1 extraídas con el kit Gene Clean.	35
7. Productos de PCR de las muestras de ADNg de hepatopáncreas de la granja 1 extraídas con NaCl saturado.	36
8. Productos de PCR de las muestras de ADNg de hepatopáncreas de la granja 1 extraídas con el método de NaCl saturado.	36
9. Productos de PCR de las muestras de ADNg de hepatopáncreas de la granja 3 extraídas con NaCl saturado.	37

RESUMEN

La camaronicultura se ha convertido en una actividad de alta viabilidad económica, donde se cultiva camarón en condiciones controladas; Sonora es uno de los principales estados de producción en México, generando miles de toneladas al año. La principal especie de camarón utilizada para este fin es el camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*), el cual representa un alto valor comercial en el mercado debido a que alcanza su talla comercial en poco tiempo, y presenta una mayor resistencia ante bacterias y virus comparado con otras especies. Sin embargo, debido a las prácticas acuícolas y los cambios en la resistencia a antibióticos de algunas bacterias, éstas han afectado la producción de este crustáceo, por lo que se ha visto una baja en la producción debido a la infección por virus, bacterias, hongos y protozoarios; en 1985 surge una enfermedad emergente en Texas, debido a una bacteria desconocida: la Bacteria de Necrosis Hepatopancreática (BNHP) causando altas mortalidades en granjas camaronícolas, se prosiguió a su estudio, donde se descubre que se trataba de una bacteria intracelular tipo Rickettsia, Gram negativa y pleomórfica, que afecta a todos los tipos de células del hepatopáncreas; estudios recientes proponen una posición taxonómica mediante análisis del ácido ribonucleico ribosomal (ARNr) con el nombre de "*Candidatus Hepatobacter penaei*". Se han realizado estudios de su presencia en Sonora a partir del 2007, tratando de establecer un protocolo específico y sensible para su detección. En este proyecto se analizaron seis granjas del centro y sur de Sonora mediante la técnica de biología molecular de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Inicialmente, se utilizaron dos métodos para la extracción de ADNg: Kit Gen Clean y NaCl saturado, con el fin de comparar y establecer el método más indicado para la realización de la PCR, donde el método de NaCl saturado generó una mayor obtención de ADNg e integridad a partir de hepatopáncreas de camarón; así también se llevó a cabo la detección de la bacteria causal de la Necrosis Hepatopancreática (NHP) mediante PCR utilizando los iniciadores : NHPUA/Fw (5'-CGTTGGAGGTTTCGTCCTTCAGT-3') y NHPUA/Rv (5'GCCATGAGGACCTGACATCATC-3'), desarrollados por el Laboratorio de la Universidad de Patología en Acuicultura de Arizona (UAZAPL).

INTRODUCCIÓN

La acuicultura es una actividad de alta viabilidad económica, en la cual se cultivan camarones mediante condiciones controladas como lo es la salinidad, oxigenación, temperatura, entre otras. Estas condiciones permiten un adecuado desarrollo de los organismos, pero a pesar de ello éstos no se encuentran a expensas de verse infectados por microorganismos (Lightner y col., 2012). La aparición de enfermedades en el sector acuícola ha generado grandes pérdidas económicas, lo que ha generado un gran interés en la búsqueda de métodos de detección de los microorganismos implicados, para poder establecer una adecuada prevención y control de los mismos. Estas infecciones pueden ser causadas por protozoarios, hongos, virus, bacterias (incluyendo rickettsias) y parásitos metazoarios; los cuales afectan el crecimiento y sobrevivencia de los camarones (Swain y col., 2014).

Las enfermedades virales son una de las más importantes debido a que causan mortalidades significativas tales como la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa (IHHNV), Virus del Síndrome de la Mancha Blanca (WSSV), Virus del Síndrome de Taura (TSV), entre otros, son los patógenos más importantes debido a que causan pérdidas económicas significativas (Lightner y col., 2012). Sin embargo, las bacterias como las del género *Vibrio*, que forman parte de la flora normal de los organismos marinos, pueden llegar a ser patógenos y causar enfermedades de gran magnitud, como *Vibrio parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. harveyi*, y *Photobacterium daunselae* y las especies que tienen cepas patógenas reportadas en los laboratorios causantes de mortalidades en larvas y postlarvas como *V. harveyi*, *V. splendidus* y *Vibrio* sp. (Morales, 2008).

Entre las principales enfermedades bacterianas en camaronicultura en la Zona Noroeste del Pacífico en México, se ha reportado la Necrosis Hepatopancreática (NHP) causada por una bacteria intracitoplasmática que lleva su nombre (Bacteria de la Necrosis Hepatopancreática, BNHP). Debido a que se ha observado un aumento en el desarrollo de la resistencia a los antibióticos principalmente en estos microbios acuáticos, estudios recientes se han orientado en la búsqueda de nuevos métodos para su detección y eliminación en estanques acuícolas (Bermúdez y col., 2009).

En México, al igual que en diferentes países del mundo donde el cultivo de camarón blanco (*L. vannamei*) es una fuente principal económica, se ha visto afectado considerablemente en los últimos años por microorganismos patógenos. Entre las principales bacterias patógenas para la camaronicultura, está la infección producida por la BNHP; la cual crece y se desarrolla en el epitelio tubular de las células hepatopancreáticas de los camarones

peneidos. Esta bacteria tiene como especies hospedadoras a *L. vannamei* y *Litopenaeus stylirostris*. Donde puede causar brotes importantes de enfermedad y mortalidades significativas de hasta un 95% en cultivo (Frelier y col., 1996; Lightner y col., 2012; OIE, 2017).

Particularmente la BNHP es intracitoplasmática, gramnegativa, pleomórfica, pertenece a la α -subclase de las proteobacterias y aún no está clasificada taxonómicamente; la forma predominante es un microorganismo tipo-Rickettsia baciliforme que mide 0.5 x 0.9 μm y una segunda forma, helicoidal de 0.25 a 2 x 3.5 μm , posee ocho flagelos en la base y dos en la cresta (Frelier y col., 1996; Nunan y col., 2008; Nunan y col., 2013; OIE, 2017).

El desarrollo de la infección bacteriana por la BNHP se da en cuatro etapas: inicial, aguda, de transición y crónica. En la fase aguda y de transición de dicha enfermedad es característico observar lesiones patognomónicas en cortes histológicos de hepatopáncreas, mientras que en la fase inicial y crónica de la enfermedad no hay lesiones patognomónicas y para su diagnóstico es necesario métodos moleculares y basados en anticuerpos; con el fin de hacer la detección de la BNHP en periodos tempranos de la infección (Morales y col., 2010).

Los métodos que generalmente se utilizan para la detección de la BNHP son los no confirmatorios y confirmatorios; en los métodos no confirmatorios tenemos la observación de signos clínicos ya que existe una gran variedad de signos macroscópicos que indican la posible presencia de la BNHP; estos son letargo, reducción de la ingesta de alimentos, cuerpos flácidos, hepatopáncreas atrofiado, reducción de crecimiento, entre otros signos que nos orientan a una posible detección temprana de la bacteria. Dentro de los métodos no confirmatorios encontramos la realización de análisis en fresco donde podemos observar reservas bajas de lípidos y los cortes histológicos donde se observa el daño al hepatopáncreas por la BNHP.

Entre los métodos confirmatorios para la detección de la BNHP podemos encontrar: Histología y tinciones con Hematoxilina & Eosina (H&E) y Giemsa, donde se logran observar las formas bacterianas a partir de microscopía electrónica avanzada, Hibridación *in situ* con sondas de ADN específicas, Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcripción Inversa (RT-PCR), entre otras (Briñez y col., 2003; Nunan y col., 2008; OIE, 2017). La mayoría de los estudios realizados no indican que método es más específico y sensible para la detección de la BNHP, por ello la realización del presente estudio.

OBJETIVOS

General

Detectar la Bacteria de la Necrosis Hepatopancreática (BNHP) en camarón blanco *Litopenaeus vannamei* mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

Específicos

1. Realizar muestreos en estanques de granjas de camarones *L. vannamei* de la zona Centro y Sur del Estado de Sonora que presenten signos de la BNHP.
2. Extraer el ADN genómico (ADNg) de hepatopáncreas de *L. vannamei* con el kit Gene Clean.
3. Extraer el ADN genómico de hepatopáncreas de *L. vannamei* con el método de NaCl saturado.
4. Determinar la concentración e integridad de ADNg mediante espectroscopia UV-VIS.
5. Identificar la presencia de la BNHP mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) utilizando iniciadores específicos (NHPUA/Fw y NHPUA/Rv).

REVISIÓN DE LA LITERATURA

Importancia de la Camaronicultura

La acuicultura es una de las actividades con mayor viabilidad económica para la producción de alimento, apoyándose en técnicas y procesos sobre los cuales se cultivan organismos acuáticos en condiciones controladas (Guerrero y col., 2004; Montemayor y col., 2005). En la última década, el cultivo de camarón (Camaronicultura) se ha desarrollado de manera exponencial en todo el mundo, expandiéndose más que cualquier otro sector productivo pecuario (Allsopp y col., 2008). Los principales países que han desarrollado ésta actividad son: Ecuador, México, Brasil, Honduras, Nicaragua y Venezuela (Figura 1), los cuales han generado una producción anual en miles de metros (FAO, 2013; GOAL, 2016).

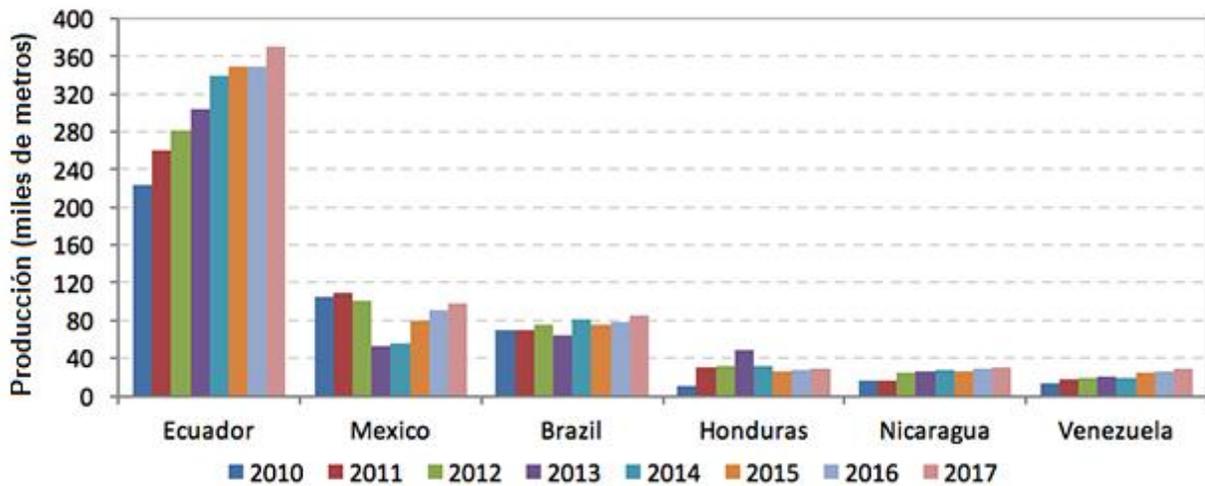


Figura 1. Producción anual acuícola de camarón en las principales naciones agrícolas en América Latina. (FAO, 2013; GOAL, 2016).

Esta actividad desempeña un papel fundamental en los medios de subsistencia de millones de personas en todo el mundo. De acuerdo al último reporte mundial de la FAO, el camarón continúa como el principal producto acuático comercializado, alcanzando ingresos superiores a los \$14,000 millones de dólares (Godínez y col., 2011).

En México, la camaronicultura se ha incrementado en el Noroeste del país en donde se encuentran el 89% de las hectáreas de producción. En 2008 en Sonora y Sinaloa produjeron 114,317 toneladas que representó más del 90% de la producción en el país (Godínez y col., 2011).

Más de 30 especies de camarones peneidos son cultivadas en el mundo con interés comercial, siendo hasta el momento cuatro especies las que dominan el mercado internacional, *Penaeus monodon*, *L. vannamei*, *L. stylirostris* y *Marsupenaeus japonicus*, debido fundamentalmente a tres razones: la abundancia de individuos salvajes en los ecosistemas naturales, el rápido crecimiento, tamaño en el cual se desarrolla y la alta demanda en el mercado (Pérez Farfante y Kensley 1997; Lightner y col., 2012).

La mayor parte de camarón cultivado en México ha sido la especie camarón blanco *L. vannamei*, la cual aporta hasta el 97% de las capturas, esta especie es la mejor adaptada al cautiverio; y de ella se obtienen mayores rendimientos de crecimiento, ya que presenta una mejor tolerancia a las condiciones ambientales como las altas concentraciones de salinidad y de temperatura (Roseberry, 2009).

Características del Camarón Blanco *Litopenaeus vannamei*

L. vannamei es un crustáceo decápodo macruro nadador, de mediano tamaño (Figura 2), comestible, apreciado y comercializado; pertenece al phylum Arthropoda, clase Malacostraca y orden Decápoda (Tabla 1). Se trata de una especie alóctona, nativa de la costa oriental del Océano Pacífico, desde Sonora hasta Perú, pero que hoy procede de los cultivos en numerosos países del continente Americano (Brasil, Ecuador, México, Venezuela, Honduras, Guatemala, Nicaragua, Perú, Colombia, Costa Rica, Panamá, El Salvador, Jamaica, Cuba, República Dominicana, EUA) y asiáticos (China, Tailandia, Indonesia, Vietnam, Malasia, Taiwán, India, Filipinas, Camboya, Surinam) (OIE, 2017).



Figura 2. Camarón blanco *L. vannamei*.
(Arias, 2005).

Tabla 1. Taxonomía de *L. vannamei*.

Phylum	Arthropoda
Clase	Malacostraca
Orden	Decápoda
Suborden	Dendobranchiata
Superfamilia	Penaeoidea
Familia	Penaeidae
Género	<i>Litopenaeus</i>
Especie	<i>vannamei</i>

(Farfante y Kensley, 1997)

La especie de camarón blanco es la mayormente utilizada por los acuicultores, debido a que alcanza su talla comercial en menor tiempo, presenta un alto porcentaje de sobrevivencia y valor comercial en el mercado aunado a una alta resistencia ante virus y bacterias (Martínez, 1993; Morales y col., 2010). Los camarones peneidos y los artrópodos en general poseen un sistema circulatorio abierto con un corazón muscular dorsal localizado en el cefalotórax. A la sangre y a las células de ésta se les denomina hemolinfa y hemocitos, respectivamente. Los vasos sanguíneos (con válvulas) dejan el corazón y se ramifican varias veces antes de que la hemolinfa llegue a los senos sanguíneos ubicados por todo el cuerpo y donde el intercambio de gases se produce. Después de pasar por las branquias la hemolinfa retorna al corazón por medio de tres aberturas sin válvulas ubicadas en las paredes del corazón. Uno de los vasos sanguíneos que dejan el corazón termina en el órgano linfoide, en donde la hemolinfa es

filtrada. Este órgano está localizado ventro-anteriormente al hepatopáncreas. Los hemocitos son producidos en el tejido hematopoyético. Este órgano está disperso en el cefalotórax y mayormente presente alrededor del estómago (Figura 3) y en la base de los maxilípedos (Bell y Lightner, 2008).

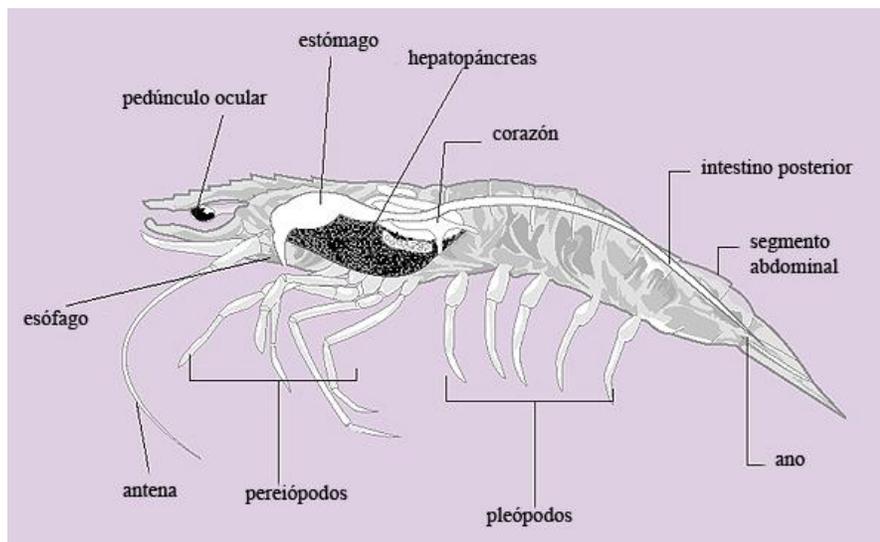


Figura 3. Morfología interna de camarón *Peneido* generalizado. (Bell y Lightner, 2008).

El aparato digestivo es uno de los sistemas más importantes del camarón blanco *L. vannamei*, el cual está constituido por un tubo recto que va desde el orificio oral hasta el anal (situado en el último segmento del abdomen); el estómago que comprende una cámara cardíaca, la cual posee un aparato triturador calcificado que completa la acción de los *gnatópodos* y una cámara pilórica, en la que desembocan los canales del hepatopáncreas (Cleveland y col., 2002).

Gran parte del cefalotórax está ocupado por el hepatopáncreas (Figura 3). Esta glándula digestiva está formada por divertículos del intestino. Los espacios entre los túbulos son senos de hemolinfa. La principal función de este órgano es la absorción de nutrientes, almacenaje de lípidos y producción de enzimas digestivas (Bell y Lightner, 2008). Dentro del hepatopáncreas se llevan a cabo otras funciones metabólicas tales como síntesis de proteínas, absorción, secreción y metabolismo de lípidos e hidratos de carbono, es el órgano más importante del sistema digestivo de los decápodos, realiza las mismas funciones que realiza el hígado y el

páncreas en los mamíferos, es el órgano que se ha visto mayormente afectados por microorganismos patógenos como: virus, bacterias, protozoarios y hongos (Lightner y Redman, 1998).

Bacteria de la Necrosis Hepatopancreática (BNHP)

La BNHP es una bacteria intracitoplasmática gram negativa pleomórfica que pertenece a la α -subclase de las proteobacterias y que todavía no está clasificada, pero estudios recientes han propuesto una posición taxonómica mediante análisis de ARNr con el nombre de "*Candidatus Hepatobacter penaei*" (Nunan y col., 2013). La forma predominante es un microorganismo tipo-Rickettsia baciliforme de $0.25 \times 0.9 \mu\text{m}$. La mayoría de las especies de los peneidos pueden resultar infectadas con la BNHP, incluidas las principales especies de piscifactoría en Latinoamérica que son: *L. vannamei* (camarón blanco del Pacífico) y *L. stylirostris* (camarón azul) (OIE, 2017). *L. vannamei*, es la especie de mayor importancia económica en América, principalmente del Pacífico, específicamente en el Noroeste de México (Ibarra y col., 2007).

El tejido diana de la BNHP es el hepatopáncreas y se ha notificado infección por ésta en todos los tipos de células de este órgano. En *L. vannamei*, la infección por la BNHP da lugar a la NHP, una enfermedad aguda y normalmente catastrófica, con mortalidades que se acercan al 100%; los principales síntomas detectados son un crecimiento lento, cutícula blanda, cuerpo flácido y una disminución considerable en los ácidos grasos presentes en el hepatopáncreas (OIE, 2017).

La utilización de los antibióticos oxitetraciclina y florfenicol en piensos medicados cada 8 horas durante 10 días es probablemente el mejor tratamiento frente a la BNHP del que se dispone hoy en día, en concreto si la enfermedad se detecta en la fase inicial (Morales y col., 2012).

Mecanismos de Transmisión

La transmisión de la BNHP puede ser horizontal por canibalismo; también se ha demostrado la transmisión por agua de mar contaminada (Aranguren y col., 2006).

Signos Clínicos

Existe una gran variedad de signos macroscópicos que indican la posible presencia de la BNHP, tales como: letargo, reducción de la ingesta de alimento, hepatopáncreas atrofiado, anorexia e intestinos vacíos, considerable reducción del crecimiento y malos cocientes de longitud/peso (“colas delgadas”); conchas blandas y cuerpos flácidos; branquias negras u oscurecidas; superficies de olor nauseabundo debido a organismos epicomensales; enfermedades bacterianas en la concha, que incluyen lesiones ulcerosas en la cutícula o erosiones melanizadas en los apéndices; y cromatóforos expandidos quedan lugar a la aparición de bordes oscurecidos en urópodos y pleópodos (OIE, 2017).

Etapas de la Enfermedad

La infección inicial por la BNHP es más difícil de diagnosticar mediante métodos histológicos sistemáticos basados en tinciones como la de H&E. Para el diagnóstico de infecciones iniciales, se recomienda utilizar métodos moleculares para detectar la BNHP (por ejemplo, PCR o la aplicación de sondas de ADN específico de la bacteria a pruebas de hibridación por transferencia puntual o hibridación *in-situ* (ISH) de cortes histológicos) (OIE, 2017).

Etapas aguda. Se caracteriza por una atrofia del hepatopáncreas con atrofia moderada del epitelio del túbulo, presencia de formas bacterianas y hematocitos infiltrados que afectan a uno o más túbulos (encapsulaciones multifocales). Se observan células hipertróficas y epiteliales individuales que parecen estar separadas de las células adyacentes, y sufrir una necrosis y descamación hacia el interior de la luz tubular; el contenido lipídico de las células epiteliales es variable (OIE, 2017).

Fase de transición. Se caracteriza por una inflamación hemocítica de los espacios intertubulares como respuesta a la necrosis, la citólisis y el desprendimiento de células epiteliales del túbulo del hepatopáncreas. El epitelio del túbulo del hepatopáncreas está considerablemente atrofiado, lo cual da lugar a la formación de grandes zonas edematosas (llenas de líquido o “acuosas”) en el hepatopáncreas. Las células epiteliales tubulares del interior de la encapsulación multifocal están típicamente atrofiadas y se reducen, de modo que su morfología pasa de ser columnar simple a cuboide (OIE, 2017).

Fase crónica. En esta etapa disminuye la abundancia de las lesiones tubulares, la encapsulación multifocal y las zonas edematosas, y son sustituidas por infiltrado y acumulación de hemocitos en los puntos de necrosis. Hay zonas con fibrosis, túbulos melanizados y necróticos y muy poca presencia de células hipertrofiadas con masas de bacterias en el citoplasma y pocos nódulos hemocíticos (OIE, 2017).

Diagnóstico de la Bacteria de la Necrosis Hepatopancreática (BNHP)

Observación por Análisis en Fresco de Hepatopáncreas

En el análisis en fresco del hepatopáncreas se puede observar: cutícula blanda, melanizada, blancuzca y acuosa, pleópodos negros y atrofia de la mucosa epitelial del hepatopáncreas con una visualización radical de reservas bajas de lípidos (Figura 4 y 5). La tinción del tejido se lleva a cabo principalmente con H&E o Giemsa (Briñez y col., 2003; Nunan, y col., 2008).



Figura 4: Tejido de hepatopáncreas sano de camarón *L. vannamei*. (Gracia, 2010).



Figura 5: Tejido de hepatopáncreas infectado con la BNHP de camarón *L. vannamei*. (Gracia, 2010).

Bioanálisis de Animales

Se analizan organismos de diferentes tallas (generalmente estadio juvenil) de *L. vannamei* con signos de la BNHP contra organismos de la misma especie libres de patógenos específicos (SPF) que sirvan de indicador o control negativo. Para realizar una infección experimental con la BNHP, pueden utilizarse protocolos orales. El método oral es relativamente sencillo de realizar y se lleva a cabo alimentando a organismos juveniles SPF de *L. vannamei* con hepatopáncreas de camarones positivos a la BNHP, en pequeños depósitos, los cuales suelen detectarse en cuestión de 3 a 4 días tras la exposición inicial y aparecen mortalidades considerables unos 3 a 8 días después de dicha exposición (OIE, 2017).

Métodos de Detección del Antígeno Basados en Anticuerpos

En las pruebas de inmunohistoquímica (IHC) se utilizan anticuerpos monoclonales (MAb) que van dirigidos ante los antígenos presentes en la pared celular de la BNHP, según los métodos descritos por Bradley-Dunlop y col., 2004.

Técnicas de Biología Molecular

En la actualidad las técnicas moleculares para la identificación de microorganismos están teniendo un auge muy importante debido a: especificidad (pueden detectar solo la molécula o microorganismo de interés), sensibilidad (son capaces de detectar la presencia de un solo microorganismo), rapidez (se puede identificar un microorganismo en menos de 24 horas) y pueden ser automatizadas (permiten tener un diagnóstico en un menor tiempo y reducir los costos). El uso de técnicas moleculares ha permitido identificar nuevos microorganismos, los cuales no había sido posible su cultivo e identificación por técnicas tradicionales, como lo es la bacteria de necrosis hepatopancreática que afecta al camarón (Jan y LeBorgne, 2001).

Las principales técnicas de biología molecular utilizadas como apoyo para la detección de esta bacteria (BNHP) específicamente, son: Dot blot, Hibridación *in situ*, PCR, RT-PCR y PCR en tiempo real (qPCR), esta última principalmente utilizada en investigación más que en diagnóstico, ya que presentan mayor sensibilidad y especificidad, en cuestiones de concentración o cantidad (Morales y Cuéllar, 2008; OIE, 2017).

La aplicación de técnicas moleculares inicia con la extracción de ADN y la obtención exitosa de datos confiables y reproducibles depende, en gran medida, de la extracción de ADN

íntegro y puro. La extracción consiste en el aislamiento y purificación de moléculas de ADN y se basa en las características fisicoquímicas de la molécula. El ADN está constituido por dos cadenas de nucleótidos unidas entre sí formando una doble hélice. Los nucleótidos están integrados por un azúcar (desoxirribosa), un grupo fosfato y una base nitrogenada (adenina, guanina, timina o citosina). La unión de los nucleótidos ocurre entre el grupo fosfato y el azúcar, mediante enlaces fosfodiéster, dando lugar al esqueleto de la molécula. Las bases de cadenas opuestas se unen mediante puentes de hidrogeno y mantienen estable la estructura helicoidal. Los grupos fosfato están cargados negativamente y son polares, lo que le confiere al ADN una carga neta negativa y lo hace altamente polar, características que son aprovechadas para su extracción (Alejos y col., 2011).

A lo largo del tiempo se han diseñado distintos protocolos con la finalidad de obtener una cantidad y calidad de ADN adecuados, así como garantizar la eliminación de inhibidores potenciales que dificulten el tratamiento posterior de la molécula. Los métodos tradicionales, desarrollados en la década de los 50's, utilizaban solventes orgánicos para separar a las proteínas del ADN y una vez suspendido en la fase acuosa, aislarlo por precipitación con etanol. Estos métodos requieren preparar soluciones y la extracción puede tomar desde unas horas hasta varios días por los numerosos pasos que deben realizarse. En general, los protocolos tradicionales consisten de cinco etapas principales: homogeneización del tejido, lisis celular, separación de proteínas y lípidos, precipitación y redisolución del ADN (Alejos y col., 2011).

La selección del método de extracción es un paso fundamental en las técnicas moleculares y depende del organismo bajo estudio, el tejido disponible y su estado de conservación, la técnica que se aplicara posteriormente, así como la infraestructura de los laboratorios, los recursos económicos y tiempo para obtener resultados. Independientemente del método seleccionado es recomendable encontrar un equilibrio entre pureza y rendimiento de acuerdo a la aplicación posterior (Alejos y col., 2011).

Los criterios básicos que debería cumplir un método para purificar ADN de cualquier fuente incluyen: extracción eficiente, cantidad de ADN purificado suficiente para las subsiguientes aplicaciones, remoción de contaminantes, calidad y pureza del ADN. La absorción ultravioleta puede ser utilizada para evaluar la pureza del ADN extraído. Para una muestra pura de ADN, la relación entre la absorbancia a 260 y 280 nm (A_{260}/A_{280}) es 1.8 como óptima y con un rango entre 1.6-2.2 como recomendable. Una relación < 1.6 indica que la muestra se encuentra contaminada con proteínas o solventes orgánicos como fenol, lo cual es de suma importancia que la muestra se encuentre lo más íntegra posible para obtener una PCR adecuada y confiable (Dhaliwa y col., 2013).

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se utiliza para la amplificación de una porción del material genético perteneciente a un microorganismo, en este caso el de la BNHP; generando así, miles de copias a partir de una secuencia específica *in vitro*, utilizando diferentes factores como: una Taq ADN Polimerasa, ADN molde, nucleótidos, iniciadores y agua Milli-Q, todo ello se coloca en un tubo, junto con los cofactores que necesite la enzima (Tris-HCl, KCl, MgCl₂) y se someten a ciclos repetidos de calentamiento y enfriamiento que permiten la síntesis del ADN (Louie y col., 2000).

La PCR se desarrolla en 3 etapas: 1) desnaturalización, donde la cadena doble de ADN es separada en dos cadenas sencillas, lo cual se logra a una temperatura de 92°C a 96°C, dependiendo del tipo de enzima que se utilice. 2) Alineación o hibridación, en este paso los iniciadores (primers, oligonucleótidos o cebadores, dos pequeños segmento de ADN) se alinean por complementariedad al templado o ADN_g (uno a una cadena y el otro a la otra) entre temperaturas de 55°C a 65°C, dependiendo ésta última del tamaño y secuencia de los iniciadores. Los iniciadores deben de ser diseñados de tal manera que solo se hibriden con el ADN del organismo que se desee amplificar (en este caso al de la BNHP) y su tamaño generalmente va de 18 a 25 bases. Finalmente, 3) extensión, en esta etapa se activa la enzima ADN polimerasa la cual va a formar la nueva cadena tomando como molde las cadenas sencillas de ADN_g y uno de los extremos del iniciador (3', extendiendo hasta 5'), esta etapa se lleva a cabo a una temperatura de 72°C prácticamente. Después de este primer ciclo, si se partió de una sola cadena doble de ADN se tendrían dos cadenas dobles. Esta amplificación se incrementa en forma geométrica a medida que se repite el número de ciclos, así después de dos ciclos tendríamos cuatro cadenas dobles de ADN, y después de tres, ocho y así sucesivamente, después de treinta ciclos tendríamos una gran cantidad de ADN amplificado para ser visualizado por electroforesis en geles de agarosa (Louie y col., 2000).

Se han desarrollado pruebas de PCR para la BNHP, donde se dispone kits y productos comerciales basados en este método. La PCR aporta una mayor sensibilidad diagnóstica que las técnicas histológicas clásicas de diagnóstico de la BNHP. Además, este método tiene la ventaja de ser aplicable en caso de que tengan que analizarse camarones reproductores de alto valor mediante pruebas no letales (Loy y col., 1996). Para la detección de la BNHP se utiliza fundamentalmente el ARN ribosomal (ARN_r), especialmente el gen constitutivo del 16S ARN_r (Wilson, 1992), ya que actualmente no está taxonómicamente clasificada.

Reacción en cadena de polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR). Se utiliza para la detección y amplificación de ARN. Permite estudiar la expresión de determinados genes (su traducción a proteínas) que son activados ante un estímulo, en este caso la infección por la BNHP. En primer lugar se extrae el ARN total (ARNt) de las células del hepatopáncreas del *L. vannamei* donde se encuentra intracelularmente la BNHP y se separa la fracción correspondiente al ARN mensajero (ARNm). Tras purificarlo el ARN se transcribe a ADN mediante una transcriptasa inversa, por cada molécula de ARNm se sintetiza una molécula de ADN complementario (ADNc) monocatenaria que posteriormente se ha de convertir en bicatenaria utilizando una ADN polimerasa. A partir de aquí se aplica la técnica de PCR lo que permite una detección de la expresión de ARN mensajero (ARNm) mucho más sensible que con Northern blot o con Hibridación *in situ*. La secuencia del fragmento amplificado se determina mediante secuenciación automática de ADN. Existen diversos kits comerciales, como Gene Amp de ARN-PCR (Pekin-Elmer, Alemania) que pueden ser utilizados para RT-PCR (Catasús, 1997; OIE, 2017).

METODOLOGÍA

Los materiales y reactivos utilizados para esta investigación son de calidad grado biología molecular, libres de nucleasas y pirógenos, esterilizados por autoclave de acuerdo a las necesidades y agua grado Milli-Q (18 Ω).

Muestreo de Organismos

Se llevó a cabo un muestreo dirigido en estanques con mortandad elevada de camarones en granjas comerciales del Estado de Sonora de la zona Centro y Sur (Tabla 2), donde se seleccionaron camarones blancos de la especie *L. vannamei* con características de la enfermedad de la necrosis hepatopancreática (NHP), a los cuales se les extrajo el hepatopáncreas, el cual se colocó en un microtubo con 400 μ L de etanol al 70% y se almacenaron a -20°C hasta su posterior análisis.

Tabla 2. Granjas camaronícolas de la zona Centro y Sur del Estado de Sonora muestreadas de Enero a Junio de 2017.

Número de Granja	Zona	Provincia Costera	Número de muestras
1	Sur	Bahía de Lobos	13
2	Sur	Bahía de Lobos	22
3	Centro	Bahía de Kino	22
4	Centro	Bahía de Kino	25
5	Sur	Atanasia	27
6	Sur	Atanasia	10

Extracción de ADNg a partir de Hepatopáncreas de Camarón

Método Gene Clean

Se extrajo ADNg de las muestras de hepatopáncreas utilizando el juego de reactivos Gene Clean (BioQ® Inc., 1101-601), siguiendo el protocolo y especificaciones del fabricante (Anexo 1).

Método Tradicional NaCl Saturado

Se utilizó un segundo método de extracción tradicional con NaCl saturado, buffer de lisis (Anexo 2), cloroformo / alcohol isoamílico, alcohol isopropílico y etanol; siguiendo las especificaciones del protocolo (Anexo 3), a partir de 100 mg de muestra de hepatopáncreas (OIE, 2017).

Cuantificación de ADNg por Espectrofotometría UV-VIS

Para la cuantificación de la concentración (ng / μ L) e integridad del ADNg extraído de las muestras de hepatopáncreas, se utilizó el equipo Multiskang Go (Nanodrop de ThermoScientific), donde se colocaron 2 μ L de muestra en la microplaca por duplicado, la cual fue leída a una relación de absorbancia de 260 / 280 nm.

Detección de la BNHP por PCR

Para el análisis mediante la reacción en cadena de la polimerasa (Anexo 4) se utilizó como templado 1.0 μ L de ADNg obtenido de hepatopáncreas mediante los métodos Gene Clean y NaCl saturado, los cuales se sometieron al equipo de PCR (termociclador) y finalmente se visualizaron los productos de PCR en geles de agarosa al 1.2%.

Se utilizaron los iniciadores NHPUA, los cuales fueron diseñados por Nunan y col. 2008., utilizando la secuencia U65609 Gen Bank, los cuales son: NHPUA/Fw: **5'-CGT TGG AGG TTC GTT CTT CAG T-3'** y NHPUA/Rv: **5'-GCC ATG AGG ACC TGA CAT CAT C-3'**, que generan una ampliación de 379 pares de bases (pb). Todos los reactivos para la PCR se descongelaron y homogeneizaron, cuidadosamente. Se generó una mezcla de reacción de 12.5 μ L en cada tubo, agregando 1.0 μ L del ADNg problema a cada tubo. Una vez preparadas las mezclas, se

centrifugaron los tubos para eliminar burbujas que pudieran interferir con la lectura de la fluorescencia y la solución no se precipitara en el fondo de los tubos (Cornejo y col., 2014).

Para cada reacción de 12.5 μ L. de PCR se emplearon 3.25 μ L de agua grado Milli-Q, 1 μ L de cada primer NHPUA/Fw y NHPUA/Rv a 2.5 mM, 6.25 μ L de JumpStart™ Taq ReadyMix™ (cat. P2893) y 1 μ L de ADNg de hepatopáncreas (extracción Gene Clean y NaCl saturado). Posteriormente, las reacciones se colocaron en el Termociclador Bio Rad T100™ bajo las siguientes condiciones: 1 ciclo 95°C / 2 min, 35 ciclos de 95°C / 30 s, 60°C / 30 s, 72°C / 30 s y un ciclo 60°C / 1 min, 72°C / 2 min y 4°C / ∞ con una duración final de 1 hora 15 min.

Electroforesis en Geles de Agarosa

Los productos de PCR obtenidos se analizaron mediante la técnica de electroforesis (Anexo 5) en geles de agarosa al 1.2% teñidos con 2.5 μ L de SYBR Safe contra el estándar de peso molecular (kb plus DNA ladder invitrogen 10488-090). Se adicionaron 5 μ L de la muestra (productos de PCR) junto con 1 μ L del Blue / Orange 6X loading Dye, posteriormente la electroforesis se corrió en una cámara Mini-Sub@Cell GT (Bio Rad, USA) con buffer TAE IX (40 mM Tris acetato, 1mM EDTA) a voltaje constante (90 Voltios, 250 mA por 30 min). Después, el gel fue colocado en un transiluminador de UV MiniBis Pro DNR Bio-Imaging Systems para posteriormente visualizar las bandas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este trabajo se detectó la presencia de la Bacteria de Necrosis Hepatopancreática (BNHP) en camarón blanco *L. vannamei* en seis granjas del Centro y Sur de Sonora a partir de dos técnicas de extracción de ADNg de hepatopáncreas: Kit Gene Clean y NaCl saturado. Amplificando el gen 16S ARNr de la BNHP mediante la técnica de PCR y observando los productos de amplificación por electroforesis en geles de agarosa.

Extracción con el Kit Gene Clean

Las muestras de hepatopáncreas extraídas con el kit Gene Clean (Tabla 3), mostraron una concentración de 3.36 a 89.71 ng / μ L y una integridad de 1.05 a 1.53, los cuales no son recomendados para ser utilizados en la reacción de PCR, ya que se recomienda una integridad mayor de 1.7 y una concentración de 50 a 100 ng / μ L por reacción para que se lleve a cabo una amplificación confiable del gen de la BNHP.

Tabla 3. Concentración e integridad de ADNg de hepatopáncreas de la granja 1, método de extracción: kit Gene Clean.

Muestra	Concentración (ng / μ L)	Integridad
1	25.29	1.12
2	52.21	1.05
3	61.63	1.15
4	40.20	1.21
5	14.81	1.53
6	3.36	1.26
7	89.71	1.19
8	17.55	1.17
9	23.89	1.23
10	13.99	1.47
11	17.45	1.47
12	56.49	1.33
13	21.39	1.19

Sin embargo, al realizar la detección por PCR a las muestras anteriores (Tabla 3), resultó una muestra de DNAG positiva a la BNHP (muestra número 12) a pesar de la baja integridad y concentración que se obtuvo; es por ello que se extrajeron nuevamente utilizando un segundo método, el del NaCl saturado, enseguida se muestran resultados.

Extracción con el Método de NaCl Saturado

Las muestras extraídas con el método de NaCl saturado (Tabla 4) presentaron una concentración de ADNg de 166.68 a 3311.11 ng / μ L mayores a las obtenidas con el kit Gene Clean. En cuanto a la integridad de las extracciones con este método, se obtuvieron ADNg en un rango de A260 / 280 de 1.17 a 2.24, obteniendo un número mayor de muestras dentro del rango recomendable de integridad a diferencia de las muestras obtenidas con el kit Gene Clean, lo cual podría deberse a que este kit proporciona resultados óptimos de concentración e integridad en las extracciones de células o bacterias obtenidas *in vitro* que de un tejido como el hepatopáncreas de *L. vannamei* que presenta una elevada concentración de pigmentos y lípidos, los cuales pueden interferir al momento de una íntegra extracción o bien en análisis posteriores como en la PCR.

Por lo contrario, las muestras de ADNg que presentaron una mayor concentración e integridad extraídas con el método de NaCl saturado, se atribuyó a la utilización de la solución de cloroformo / alcohol isoamílico (24:1), ya que se ha documentado que esta solución permite eliminar lípidos, pigmentos y componentes de la misma naturaleza (Nunan y col., 2008; OIE, 2017); además de que trazas de lípidos, pigmentos y solución de cloroformo / alcohol isoamílico se eliminaron con lavados de isopropanol absoluto y etanol al 70 %; es por ello que se optó por continuar con este método para las siguientes extracciones. Enseguida se muestran las concentraciones e integridades de las seis granjas analizadas (Tabla 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 12).

Tabla 4. Concentración e integridad de ADNg de hepatopáncreas de la granja 1, método de extracción: NaCl saturado.

Muestra	Concentración (ng/ μ L)	Integridad
1	1410.72	2.05
2	1411.87	1.97
3	1475.72	2.24
4	3285.00	1.48
5	3274.33	1.53
6	3038.99	1.88
7	166.68	1.77
8	3162.16	1.76
9	3311.11	1.17
10	2828.61	2.05
11	3270.24	1.57
12	732.35	1.77
13	3301.39	1.38

Tabla 5. Concentración e integridad de ADNg de hepatopáncreas, método de extracción: NaCl saturado. Granja 2, estanque 19.

Muestra	Concentración (ng/ μ L)	Integridad
1	3020.91	1.43
2	64.47	1.95
3	3040.86	1.51
4	3137.88	1.22
5	3207.50	1.17
6	3204.47	1.75
7	3029.57	1.84
8	976.30	2.13
9	1220.82	2.01
10	3196.78	1.73
11	2320.91	2.06

Tabla 6. Concentración e integridad de ADNg de hepatopáncreas, método de extracción: NaCl saturado. Granja 2, estanque 23.

Muestra	Concentración (ng/ μ L)	Integridad
1	1885.05	1.56
2	81.87	1.53
3	3073.85	1.58
4	1537.69	1.0
5	2737.69	1.74
6	2056.49	2.08
7	3260.14	1.61
8	3307.84	1.41
9	3251.49	1.61
10	1239.47	1.82
11	1988.32	1.45

Tabla 7. Concentración e integridad de ADNg de hepatopáncreas, método de extracción: NaCl saturado. Granja 3, estanque 19.

Muestra	Concentración (ng/ μ L)	Integridad
1	1460.24	2.10
2	2602.36	2.10
3	1869.76	2.15
4	66.97	2.13
5	640.05	2.16
6	2249.86	2.07
7	3131.20	1.86
8	1417.69	2.15
9	651.63	1.90
10	1757.11	2.20
11	1301.35	2.11
12	1534.47	2.19
13	3314.66	1.25
14	450.00	2.18
15	113.65	1.71
16	541.92	1.62
17	1025.10	1.68
18	3367.69	1.04
19	3319.42	1.22
20	1424.13	2.19
21	3342.79	1.04
22	3332.50	1.05

Tabla 8. Concentración e integridad de ADNg de hepatopáncreas, método de extracción: NaCl saturado. Granja 4, estanque 34.

Muestra	Concentración (ng/μL)	Integridad
1	2923.22	2.09
2	3272.07	1.65
3	1184.66	2.19
4	3255.14	1.74
5	3293.70	1.60
6	3302.93	1.49
7	3284.66	1.60
8	3275.43	1.54
9	3267.35	1.48
10	3303.61	1.30
11	3321.11	1.11

Tabla 9. Concentración e integridad de ADNg de hepatopáncreas, método de extracción: NaCl saturado. Granja 4, estanque 93.

Muestra	Concentración (ng/μL)	Integridad
1	2120.34	2.20
2	3220.43	1.71
3	1852.98	2.22
4	1749.90	2.21
5	1451.73	2.22
6	983.08	2.20
7	3011.73	2.02
8	961.35	2.21
9	2364.33	2.20
10	983.75	2.25
11	2057.98	2.18
12	461.73	2.18
13	1925.67	2.15
14	1301.44	2.12

Tabla 10. Concentración e integridad de ADNg de hepatopáncreas, método de extracción: NaCl saturado. Granja 5, estanque 21.

Muestra	Concentración (ng/μL)	Integridad
1	1104.09	2.18
2	2825.82	2.11
3	1982.45	2.20
4	1390.53	2.20
5	3318.12	1.14
6	3306.30	1.32
7	703.71	2.14
8	3170.53	1.94
9	3180.05	1.89
10	3236.44	1.77
11	2402.12	2.16
12	3254.04	1.73
13	2828.08	2.14

Tabla 11. Concentración e integridad de ADNg de hepatopáncreas, método de extracción: NaCl saturado. Granja 5, estanque 49.

Muestra	Concentración (ng/μL)	Integridad
1	3331.01	1.11
2	2719.76	2.15
3	3316.83	1.15
4	3310.00	1.45
5	3317.31	1.13
6	3309.62	1.22
7	3305.58	1.33
8	3306.73	1.30
9	3297.31	1.38
10	3307.45	1.32
11	3058.80	2.03
12	3312.45	1.18
13	3302.93	1.24
14	3210.38	1.17

Tabla 12. Concentración e integridad de ADNg de hepatopáncreas, método de extracción: NaCl saturado. Granja 6, estanque 1.

Muestra	Concentración (ng/ μ L)	Integridad
1	3293.70	1.40
2	3115.91	1.89
3	57.02	2.16
4	1703.27	2.16
5	3343.08	1.10
6	2799.13	1.95
7	3295.77	1.30
8	2566.25	2.13
9	1370.91	2.17
10	1995.43	2.21

Geles de Electroforesis

De las 13 muestras extraídas con el kit Gene Clean, pertenecientes a la granja 1, solo la muestra número 12 resultó positiva a la BNHP, obteniendo una banda de 379 pb en el gel de agarosa (Figura 6) de acuerdo al control positivo de esta bacteria (Nunan y col., 2008; OIE 2017), debido a que los iniciadores utilizados amplifican una región específica de 379 pb correspondientes a la longitud de 1415 pb del gen 16S del ARN ribosomal que pertenece a la BNHP (Loy y col., 1996).

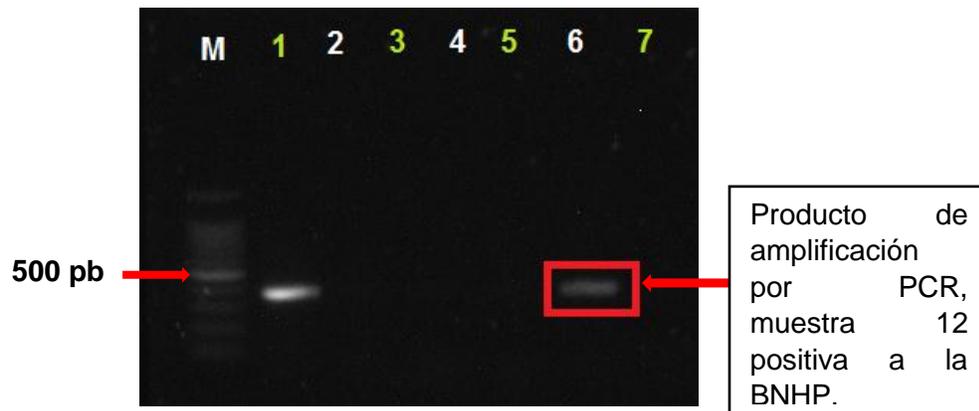


Figura 6. Productos de PCR de las muestras de ADNg de hepatopáncreas de la granja 1 extraídas con el kit Gene Clean. *Carril M: marcador de peso molecular, carril 1: control positivo de la BNHP (379 pb), carril 2: muestra 1, carril 3: muestra 2, carril 4: muestra 3; carril 5: muestra 7; carril 6: muestra 12; carril 7: control negativo.

De las 13 muestras de hepatopáncreas de la granja 1 extraídas con el método de NaCl saturado, dos de éstas resultaron positivas por PCR a la BNHP, la número 9 (Figura 7) y la 12 (Figura 8). Esta última muestra de hepatopáncreas también resultó positiva por PCR, al realizar la extracción de ADNg con el método de Gene Clean, como se mencionó anteriormente. Sin embargo, la muestra de ADNg número 9 extraída con el kit Gene Clean, resultó negativa a BNHP por PCR, debido a que la concentración de ADNg obtenida resultó por debajo de la recomendada por el protocolo de PCR, el cual indica que se requieren de 50 a 100 ng / μ L de ADNg (Nunan y col., 2008; OIE, 2017) para que la reacción resulte sensible ante la amplificación del gen de interés.



Figura 7. Productos de PCR de las muestras de ADN_g de hepatopáncreas de la granja 1 extraídas con el método de NaCl saturado. *Carril M: marcador molecular, carril 1: control positivo de la BNHP (379 pb), carril 2: muestra 4, carril 3: muestra 5, carril 4: muestra 6, carril 5: muestra 8, carril 6: muestra 9, carril 7: muestra 10, carril 8: muestra 11, carril 9: muestra 13.

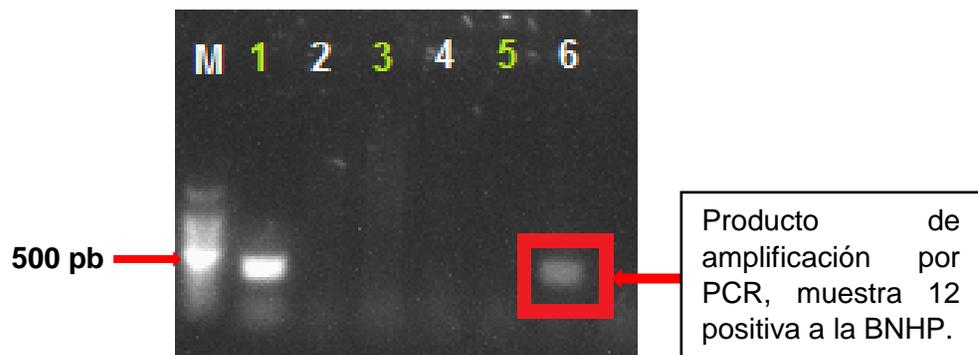


Figura 8. Productos de PCR de las muestras de ADN_g de hepatopáncreas de la granja 1 extraídas con el método de NaCl saturado. *Carril M: marcador molecular, carril 1: control positivo de la BNHP (379 pb), carril 2: muestra 1, carril 3: muestra 2, carril 4: muestra 3; carril 5: muestra 7; carril 6: muestra 12.

De las 22 muestras de hepatopáncreas de la granja 2 extraídas con el método de NaCl saturado: 11 del estanque 19 y 11 del estanque 23, no resultaron positiva a la BNHP por PCR, por lo que se descarta su infección. Sin embargo, de la granja 3, resultaron tres muestras positivas a la BNHP por PCR (muestras de ADN_g 18, 21 y 22), las cuales se pueden visualizar en la Figura 9.

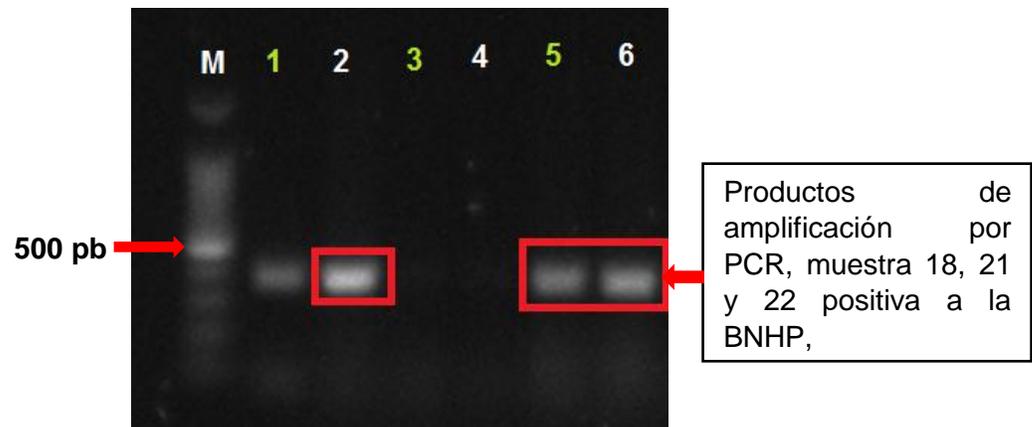


Figura 9. Productos de PCR de las muestras de ADN_g de hepatopáncreas de la granja 3 extraídas con NaCl saturado.* Carril M: marcador molecular, carril 1: control positivo a la BNHP, carril 2: muestra 18, carril 3: muestra 19, carril 4: muestra 20, carril 5: muestra 21, carril 6: muestra 22.

Los productos de PCR generados por las muestras de las granjas 2, 4, 5 y 6 (Tabla 13), resultaron negativos a la BNHP, por lo que el índice de mortalidad de camarones reportada de estos estanques se debió a la infección por otros microorganismos. Por ello, se sugirió la investigación de otras bacterias que afectan al camarón, principalmente las del género *Vibrio* sp. que generan necrosis hepatopancreática aguda (AHPND) y signos macroscópicos semejantes (Lightner y col., 2012).

Tabla 13. Proporción de muestras negativas y positivas a la BNHP por PCR de las seis granjas analizadas.

	Total de muestras analizadas	Muestras negativas a la BNHP	Muestras positivas a la BNHP
Granja 1	13	11	2
Porcentaje (%)	100	84.6	15.4
Granja 3	22	19	3
(%)	100	86.4	13.6
Granja 2, 4, 5 y 6	84	84	0
(%)	100	100	0

Finalmente se analizaron un total de 119 muestras de hepatopáncreas de camarón blanco *L. vannamei*, de seis granjas del Centro y Sur de Sonora de las cuales el 4.2% resultaron positivas a la BNHP (Tabla 14), por lo que se confirmó la presencia de la BNHP en una granja del Centro y otra del Sur de Sonora. Anteriormente, se ha documentado la presencia de BNHP en granjas camaronícolas de la región Sur de Sonora por Ibarra y col. (2007), donde ellos utilizan los iniciadores F27 (5'-**ACATGCAAGTCGAACGCAATAGG-3'**) y R235 (5'-**ACAGATCATAGGCTTGGTAGGCTG-3'**) (Loy y col., 1996) amplificando un producto de PCR de 209 pb de la región específica del gen 16S ARNr de la BNHP. Por otro lado, el Laboratorio de la Universidad de Patología en Acuicultura de Arizona (Nunan y col., 2008) desarrollaron la mejora de un método por PCR (iniciadores y parámetros de la PCR) para detectar la presencia de la BNHP evitando productos de PCR falsos positivos con otras bacterias de origen marino como resultó con el método documentado por Loy y col. (1996) e Ibarra y col. (2007). Además, el Manual de Pruebas de Diagnóstico para los Animales Acuáticos de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE, 2017) reportaron los iniciadores NHPUA/Fw (5'-**CGTTGGAGGTTTCGTCCTTCAGT-3'**) y NHPUA/Rv (5'-**GCCATGAGGACCTGACATCATC-3'**) desarrollados por Nunan y col. (2008) como método de detección de la BNHP, pero sugiriendo que el método de extracción de ADNg sea realizado con kits comerciales como Gene Clean Kit® (MP Biomedicals), QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen), el MagMax™ Nucleic Acid kits (LifeTechnologies) y el Maxwell® 16 Cell LEV DNA Purification Kit (Promega). Cabe mencionar que en este trabajo se utilizaron los iniciadores propuestos por Nunan y col. (2008) pero se

modificó el protocolo de amplificación en el termociclador a 5 ciclos más a lo reportado por Nunan y col., (2008) y la OIE (2017) con el fin de aumentar la cantidad de los productos de PCR y ser mejor visualizados en los geles de agarosa, obteniendo mejores resultados.

Tabla 14. Proporción de muestras negativas y positivas a la BNHP por PCR del número total de muestras analizadas con los métodos de extracción de Gene Clean y NaCl saturado.

	Total de muestras analizadas	Muestras negativas a la BNHP	Muestras positivas a la BNHP
	119	114	5
Porcentaje (%)	100	95.8	4.2
Extraídas con GeneClean	13	12	1
Extraídas con NaCl saturado	106	101	5

CONCLUSIONES

El método de extracción tradicional con NaCl saturado, generó una mayor integridad de ADNg; así como una mayor concentración en comparación con el método Gene Clean.

Se logró la detección de la BNHP causal de mortalidades de camarón *L. vannamei* mediante PCR utilizando los iniciadores NHPUA/Rv y NHPUA/Fw.

Se detectó la presencia de la BNHP en granjas acuícolas localizadas en la zona Centro y Sur del Estado de Sonora, dando aviso de éste resultado a las granjas participantes, lo cual les permitió tomar estrategias oportunas de sanidad contra esta bacteria para un control de la enfermedad que produce (NHP) evitando la mortalidad de los camarones y por consecuente pérdidas económicas para los productores.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alejos Velázquez L.P., Aragón Martínez M.C. y Cornejo R.A. 2011. Extracción y Purificación de ADN. Herramientas moleculares aplicadas en ecología. 1 - 25 pp.
- Allsopp M., Johnston P., Santillo D. 2008. La industria acuícola y de engorde: Un reto de sostenibilidad. Greenpeace Intenacional. Amsterdam, The Netherlands. 24 pp.
- Aranguren L.F., Briñez B., Aragón L., Platz C., Caraballo X. y Salazar M. 2006. Necrotizing hepatopancreatitis (NHP) infected *Penaeus vannamei* female broodstock: Effect on reproductive parameters, nauplii and larvae quality. *Aquaculture*. En prensa.
- Bell T.A. and Lightner D.V. 2008. A Handbook of Normal Penaeid Shrimp Histology. WAS. Aquaculture, Hawaii. 113 pp.
- Bermúdez A., Santiago H., María Luisa; Espinosa P., Angélica; María del Carmen. 2009. Uso de antibióticos en la Camaronicultura. Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas, vol. 40, núm. 3. pp. 22-32.
- Briñez S., Aranguen F. y Salazar M. 2003. Fecal samples as DNA source for the diagnosis of necrotizing hepatopancreatitis (NHP) in *Penaeus vannamei* broodstock. *Dis. Aquat. Org.*, 69, 55–72.
- Catasús, Matías Gulp. 1997. Técnicas Moleculares para la Obtención del ADN y Reacción en Cadena de la Polimerasa. *Rev Exp Patel.* 30: 16-38.
- Cleveland P. Hickman, Larry S. Roberts y Larson Allan. 2002. Principios Integrales de Zoología, Madrid: McGraw-Hill / Interamericana de España, S. A. U.
- Cornejo RA, Alejandra SD, Beatriz RA, Graciela RM. 2014. Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos. 1era ed. México: SEMARNAT. 274 p.
- Dhaliwal Anandika y Carbajal A. 2013. Extracción y purificación de ADN. Rutgers University, New Jersey, United State. ISSN : 2329-5139

- Frelief Paul F., James K. Loy., Patricia Varner, Joe W. Templeton. 1996. Detection of the etiologic agent of necrotizing hepatopancreatitis in cultured *Penaeus vannamei* from Texas and Peru by polymerase chain reaction. Department of Veterinary Pathobiology, Texas A&M University, College Station. Texas 77843-4467, USA. Vol 25. 117-122 pp.
- Godínez-Siordia Daniel Enrique; María Cristina Chávez-Sánchez; Silvia Gómez-Jiménez. 2011. Acuicultura Epicontinental del Camarón Blanco del Pacífico, *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931). Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C Unidad Hermosillo. Tropical and Subtropical Agroecosystems, 14: 55 - 62.
- Guerrero-Olazarán, E., Cab-Barrera, E.L., Galán-Wong, L.J., Viader-Salvadó, J.M. 2004. Biotecnología de proteínas recombinantes para la aplicación en acuicultura. En: Cruz Suárez, L.E., Ricque Marie, D., Nieto López, M.G., Villarreal, D., Scholz, U., González, M. (eds.). Avances en Nutrición Acuícola VII. Memorias del VII Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. Hermosillo, Sonora. México. 16-19 Noviembre, 2004. pp. 245- 258.
- Ibarra G. JC, L Galavíz-Silva, ZJ Molina-Garza. 2007. Distribution of necrotizing hepatopancreatitis bacterium (NHPB) in cultured white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, from Mexico. Ciencias Marinas., v.3, p. 1 - 9.
- Jan, J. y LeBorgne, S. 2001. Uso de técnicas moleculares para realizar estudios de biodiversidad microbiana en ambientes petroleros. BioTecnología 5(3):103-109.
- Lightner DV y Redman RM. 1998. Strategies for the control of viral disease of shrimp in the Americas. Fish Pathology 33: 165-180.
- Lightner, D. V., Redman, R. M., Pantoja, C. R., Tang, K. F. J., Noble, B. L., Schofield, P., Mohny, L. L. 2012. Historic emergence, impact and current status of shrimp pathogens in the Americas. Journal of Invertebrate Pathology 110(2): 139-276.
- Loy JK, Frelief PF, Varner P & Templeton JW. 1996. Detection of the etiologic agent of necrotizing hepatopancreatitis in cultured *Penaeus vannamei* from Texas and Peru by polymerase chain reaction. *Dis Aquat Organ*. 25: 117-122.

- Martínez-Córdova, L.R. 1993. Camaronicultura. AGT Editor, S.A. Centro de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad de Sonora. (CICTUS). Sonora, México .p.p. 48-49,51-52.
- Montemayor-Leal, J., Mendoza-Alfaro, R., AguileraGonzález, C., Rodríguez-Almaraz, G. 2005. Moléculas sintéticas y extractos animales y vegetales como atractantes alimenticios para el camarón blanco *Litopenaeus vannamei*. Revista Aquatic. 22: 1-10.
- Morales CM. 2008. Enfermedades del camarón, detección mediante análisis en fresco e histopatología. Ed Trillas. pp: 23-34, 70-75.
- Morales-Covarrubias María Soledad., R. Lozano Olvera y A. J. Hernández Silva. 2010. Necrotizing hepatopancreatitis in cultured shrimp caused by extracellular and intracellular bacteria. Tilapia & Camarones. No. 5. SLA-2010-ECUADOR. pp. 33-39.
- Nunan ML, Pantoja C, Lightner DV. 2008. Improvement of a PCR method for the detection of necrotizing hepatopancreatitis in shrimp: Department of Veterinary Sciences and Microbiology. Org.80, p. 69-73.
- Nunan ML, Pantoja C, Silvia GJ, Lightner DV. 2013. "*Candidatus* Hepatobacter penaei," an Intracellular Pathogenic Enteric Bacterium in the Hepatopancreas of the Marine Shrimp *Penaeus vannamei* (Crustacea: Decapoda). Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD), v. 79, p. 4.
- [OIE] Organización Mundial de Sanidad Animal. 2017. Manual de las Pruebas de Diagnóstico para los Animales Acuáticos. Capítulo 2.2.5.
- Pérez-Farfante, I. y B.F. Kensley. 1997. Penaeiod and Sergestoid shrimps and prawns of the world, keys and diagnoses for the genera. Paris, In Memoires du Museum National d'Histoire Naturelle, Zoologie, Tomo 175, 235 pp.

Reece, J. B., Urry, L. A., Cain, M. L., Wasserman, S. A., Minorsky, P. V. y Jackson, R. B. 2011. Amplifying DNA: The polymerase chain reaction (PCR) and its use in DNA cloning. San Francisco, CA: Pearson. 10° ed., pp. 414-416.

Rosenberry, B. 2009. Shrimp News International. Consultado en la red mundial <http://www.shrimpnews.com>.

Sambrook J & Russell D W. (2001). Molecular cloning a laboratory manual. Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press. pp: 1.143-1.162.

[UASLP], Laboratorio de Genómica Viral y Humana, Facultad de Medicina. 2008. Preparación de Geles de Agarosa para Electroforesis. Standard Operating Procedures (SOPs) and Creative Commons Attribution (BY) Versión 1.0.

Vielka MG y Jorge CA. 2008. Guía técnica: Patología e inmunología de camarones Penaeidos. 1era. ed. Programa CYTED Red II-D Vannamei, Panamá, Rep. de Panamá. 270 pp.

Wilson KH. New vistas for bacteriologists. Analysis based on comparisons of 16S rRNA sequences provides a rapid and reliable approach to identify humans pathogens. ASM News. 1992; 58: 318-321.

ANEXOS

Anexo 1

Extracción de ADNg con Kit Gene Clean

Seleccionar el kit correcto puede ahorrar tiempo crucial en optimización del kit y ejecución del experimento. Los factores a considerar para seleccionar un kit incluyen: origen de la muestra, método de preparación, uso previsto, contenido húmico, cantidad de muestra, rendimiento, automatización y simplicidad (Dhaliwa y col., 2013).

Material y Equipo

Tubos eppendorf

Micropipetas

Pistilos

Vortex

Centrífuga

Nanodrop

Reactivos

Hepatopáncreas de muestras

Buffer de Lisis

Solución Yodada (Matriz)

Solución de Lavado

Agua Milli-Q

1. Pesar 100 mg de Hepatopáncreas y añadir 400 μ L de Buffer de Lisis.
2. Macerar muestra con pistilos, vortexear por un minuto y centrifugar a 10,000 rpm por 3 min.
3. Transferir 100 μ L de sobrenadante a tubo nuevo y añadir 150 μ L de Solución Yodada (Matriz), Vortex 1 min y centrifugar a 10,000 rpm por un minuto.
4. Decantar sobrenadante y añadir 300 μ L de Solución de lavado, centrifugar a 10,000 rpm por un minuto.

5. Repetir punto anterior dos veces más, decantar sobrenadante y poner a secar pellet por un minuto.
6. Hidratar pellet con 50 μ L de Agua Milli-Q.
7. Medir concentración de ADNg en equipo Nanodrop a una absorbancia de 260 a 280 nm.

Anexo 2

Preparación de Solución de Lisis (Buffer de Lisis)

La solución de lisis permite que las interacciones entre las moléculas que conforman la pared, la membrana celular y nuclear se modifiquen o destruyan permitiendo que los ácidos nucleicos se liberen. Se utilizan soluciones básicas, detergentes o agentes caotrópicos que permiten disolver la membrana celular, así como inhibidores para inactivar las enzimas que degradan el ADN. Muchas soluciones de lisis contienen también EDTA, que forma un complejo con los iones de Mg^{2+} e impide el funcionamiento de las DNAsas (Sambrook *et al.* 1989). Los componentes celulares no solubles como el material fibroso y proteínas que permanecen en solución se separan del ADN por centrifugación. Tanto la homogeneización como la lisis celular son similares en los protocolos tradicionales y comerciales. En la homogeneización mediante agentes químicos, la muestra se mantiene en solución a altas temperaturas en presencia de detergentes, proteasas y agentes caotrópicos que rompen las uniones entre las células o que incluso pueden perforar la membrana celular (Alejos y col., 2011).

Material y Equipo

Matraz Aforado de 100 mL

Báscula

Espátula

Reactivos

NaCl

SDS

Tris-HCl

EDTA

Agua Milli-Q

1. Pesar 0.157 g de Tris-HCl y 0.713 g de EDTA, disolverlos en agua Milli-Q en matraz aforado de 100 mL.
2. Añadir 0.5844 g de NaCl y 1 g de SDS, disolver perfectamente y aforar a 100 mL con agua Milli-Q.
3. Medir pH a 8, adicionar NaOH o HCl si es necesario.

Anexo 3

Extracción de ADNg con el Método Tradicional NaCl Saturado

La obtención de ADN íntegro y puro es una parte fundamental para el buen desempeño de las técnicas utilizadas en biología molecular (Tang *et al.* 2005, Wang *et al.* 2005). Una de las ventajas de utilizar métodos tradicionales es su bajo costo, así como un alto rendimiento (Alejos y col., 2011).

Material y Equipo

Báscula

Micropipetas

Incubadora

Vortex

Congelador

Centrífuga

Tubos eppendorf

Campana de Extracción

Reactivos

Hepatopáncreas de Camarón

Buffer de lisis

Proteinasa K

NaCl saturado

Solución Cloroformo / alcohol isoamílico (24/1)

Alcohol isopropílico

Etanol al 70%

Agua Milli-Q

1. Pesar 100 mg de Hepatopáncreas de las muestras en tubo eppendorf y añadir 400 μ L de Buffer de lisis más 20 μ L de Proteinasa K.
2. Incubar a 65°C por 10 minutos y añadir 200 μ L de NaCl saturado (15 g en 50 mL de agua Milli-Q).

3. Vortexear por 10 s y congelar muestra por 10 min, centrifugar a 10,000 rpm por 15 minutos.
4. Transferir fase transparente a un tubo nuevo y añadir 400 μ L de Solución Cloroformo / alcohol isoamílico en campana de extracción.
5. Vortexear por 10 s y centrifugar a 13,000 rpm por 5 minutos.
6. Tomar con micropipeta fase superficial, transferir a un tubo nuevo y añadir 400 μ L de alcohol isopropílico frío y vortexear por 10 s.
7. Centrifugar a 13,000 rpm por 5 minutos y decantar sobrenadante.
8. Añadir 500 μ L de etanol frío al 70 % y vortexear por 10 s.
9. Centrifugar a 13,000 rpm por 5 min, decantar sobrenadante y poner a secar pellett.
10. Hidratar ADNg con 50 μ L de agua Milli-Q.
11. Almacenar a -20°C .

Anexo 4

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La PCR, es una técnica para generar hasta miles de copias de una determinada región de ADN *in vitro*, depende de una ADN polimerasa termoestable, la *Taq* polimerasa, y requiere de iniciadores de ADN diseñados específicamente para la región de ADN de interés a amplificar. La reacción se somete repetidamente a un ciclo de cambios de temperatura que permiten la producción de muchas copias de la región blanco (Reece y col., 2011). El protocolo a seguir va a depender del uso previsto que se requiera.

Material y Equipo

Tubos para PCR

Micropipetas

Termociclador

Reactivos

Jump Start (Tris-HCl, KCl, MgCl₂, dNTPs, Taq DNA Polimerasa, gelatin, estabilizadores)

Primer NHPUA-Reverse (2.5 mM)

Primer NHPUA-Forward (2.5 mM)

Agua Milli-Q

Muestras DNAg

1. Medir concentración de ADN_g extraído de Hepatopáncreas de Camarón y hacer diluciones correspondientes de cada muestra, con una concentración de 50 a 100 ng / μ L.
2. Hacer pool de reacción con cantidades que dependan del número de muestras a analizar; para una reacción añadir 6.25 μ L de Jump Start, 3.25 μ L de agua Milli-Q, 1 μ L de cada Primer NHPUA (Reverse y Forward) y añadir 1 μ L de ADN_g extraído y purificado, obteniendo un volumen final de 12.5 μ L.
3. Colocar tubos en termociclador, cerrar perfectamente los tubos y verificar que no presenten burbujas de aire, y que se encuentre todo el contenido en la parte inferior.
4. Programar en el termociclador el protocolo de temperatura (Nunan y col., 2008) en base a la siguiente tabla:

Tabla 15. Protocolo de temperatura en Termociclador para PCR.

Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo
Activación de enzimas	95	2 min
Desnaturalización	95	30 s
Alineación	60	30 s
Extensión	72	30 s
Desactivación de enzimas	60	1 min
Desactivación de enzimas	72	2 min
Conservación de productos	4	∞

5. En las etapas de desnaturalización, alineación y extensión repetir por 30 ciclos.
6. Cumplidos los ciclos, los productos de PCR se almacenan a -20°C hasta la observación en electroforesis con geles de agarosa al 1.2%, para visualizar si se llevó a cabo la amplificación del gen a investigar, en este caso el correspondiente a la BNHP

Anexo 5

Electroforesis de Gel de Agarosa al 1.2%

La electroforesis de ácidos nucleicos en gel de agarosa continúa siendo una herramienta imprescindible de la biología molecular para caracterizar, identificar y aislar ADN o ARN. Debido a que el gel de agarosa no es desnaturizante los fragmentos de menor tamaño se mueven con mayor facilidad a través de los poros de la matriz de agarosa mientras que los fragmentos grandes se enfrentan a mayor resistencia y por ende migran lentamente. La migración del ADN en el gel depende del tamaño, carga eléctrica y estereoquímica. El producto de PCR o el ácido nucleico generalmente se mezcla con buffer de carga, los cuales facilitan la visualización y sedimentación del producto de PCR en los pozos para lo cual emplean distintos tipos de colorantes, cada uno de ellos exhibe un patrón de migración diferente (UASLP, 2008).

Reactivos

Agarosa

Buffer TAE 1X (40 mM Tris acetato, 1mM EDTA)

Blue / Orange 6X Loading Dye

Marcador de peso molecular 100pb ADN Ladder

Productos de PCR

Materiales

Matraz

Placa de calentamiento

Micropipetas de 10 μ L y 50 μ L

Base, soportes y peines

Cámara para electroforesis

Fotodocumentador de UV

1. Pesar 0.36 g de Agarosa y mezclar con 30 mL de Buffer TAE (Tris, acetato y EDTA) 1X en un matraz, calentar en placa hasta disolver.
2. Enfriar (no hasta su gelificación) y añadir 2.5 μ L de SYBER Safe, disolver perfectamente.
3. Vaciar en base para electroforesis y esperar 15 min hasta su gelificación.

4. Quitar peines y soportes, colocar en cámara de Voltaje y añadir buffer de carga (buffer TAE 1X) hasta cubrir el gel.
5. Adicionar en pozos 5 μ L de cada muestra (productos de PCR) junto con colorante de migración Blue / Orange 6X contra 2.5 μ L del marcador de peso molecular ADN Ladder.
6. Correr muestras a 90 V, 250 mA por 30 minutos.
7. Observar gel en Fotodocumentador de UV.