

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA
Facultad de Ciencias y Humanidades



Caracterización de bacteriófagos aislados de cepas de
Vibrio parahaemolyticus de camarón cultivado en Guatemala

Trabajo de graduación en modalidad de tesis presentado por:
Julio Roberto Matute Torres
para optar al grado académico de Licenciado en Bioquímica & Microbiología

Guatemala
2015

Caracterización de bacteriófagos aislados de cepas de
Vibrio parahaemolyticus de camarón cultivado en Guatemala

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA
Facultad de Ciencias y Humanidades

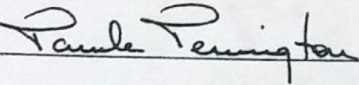


Caracterización de bacteriófagos aislados de cepas de
Vibrio parahaemolyticus de camarón cultivado en Guatemala

Trabajo de graduación en modalidad de tesis presentado por:
Julio Roberto Matute Torres
para optar al grado académico de Licenciado en Bioquímica & Microbiología

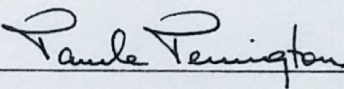
Guatemala
2015

Vo. Bo. :

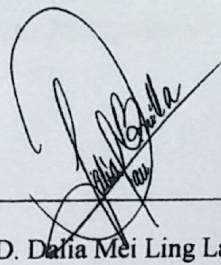
(f) 

PhD. Pamela Marie Pennington Aycinena

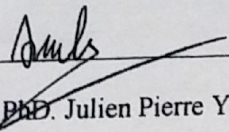
Tribunal Examinador:

(f) 

PhD. Pamela Marie Pennington Aycinena

(f) 

PhD. Dalia Mei Ling Lau Bonilla

(f) 

PhD. Julien Pierre Yves Assali

Fecha de aprobación: Guatemala 3 de diciembre de 2015 /

PREFACIO

Antes que nada, necesito agradecer a quienes hicieron posible este estudio. Primero, mi familia: mis hermanos, mis abuelos, mis tíos y mis primos, quienes siempre me han apoyado y son mi definición de hogar, mis padres, quienes no solo han hecho esto, sino que me han dado todo en esta vida; además mi papá, Jorge Matute M.Sc., fungió como asesor en estadística, y mi mamá, Olga Torres de Matute, M.Sc., quién además fue mi asesora principal y lideró el apoyo que recibí de parte del laboratorio Diagnóstico Molecular. Quiero también hacer un agradecimiento especial a mi hermano Jorge Mario, quien falleció en el 2013, por ser siempre un faro de inspiración en mi vida. A su memoria, y a mi familia, dedico esta tesis.

Al laboratorio Diagnóstico Molecular, debo agradecer su apoyo financiero y el apoyo en momentos críticos por sus colaboradores, en especial de: Marta María Méndez Ruiz, M.Sc., Cecilia Díaz de Mayorga, QB, Jackelline Aguilar, Ana Ruth Méndez, Lorena Max y Evelyn de Paz. También debo agradecer el apoyo que recibí por parte de mi asesora de la Universidad del Valle, PhD. Pamela Pennington, del decano de la facultad, PhD. Adrián Gil y del resto del claustro de B ioquímica y Microbiología de esta institución,

Este estudio nació de los resultados obtenidos a solicitud de una serie de análisis requeridos por una camaronera del Pacífico de Guatemala, por infecciones observadas en estadios jóvenes del cultivo de larvas de camarón. De muchas de las muestras se aisló *Vibrio parahaemolyticus*; hecho que derivó el deseo de buscar una medida de prevención ante lo que se ha vuelto una problemática mundial: el temor al Síndrome de Muerte Temprana en Camarón. Por ello se propuso la búsqueda de bacteriófagos líticos que redujeran la concentración de *Vibrio parahaemolyticus*, tema principal de este trabajo.

ÍNDICE

	Página
Prefacio	viii
Lista de cuadros.....	xii
Lista de figuras.....	xiii
Resumen.....	xv
I. Introducción.....	1
II. Objetivos	2
III. Justificación.....	3
IV. Marco teórico	4
A. Industria camaronera en Guatemala.....	4
B. <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	6
C. Bacteriófagos.....	13
V. Metodología.....	17
A. agrupación de cepas de <i>V. parahaemolyticus</i>	17
B. Aislamiento y purificación de bacteriófagos:.....	18
C. Caracterización de bacteriófagos	21
D. Prueba de cóctel de bacteriófagos	23
VI. Resultados	25

A.	Análisis de epidemiología bioquímica de cepas de <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	25
B.	Enriquecimiento de bacteriófagos a partir de muestras de agua.	26
C.	Cuantificación de bacteriófagos aislados	27
D.	Análisis de velocidad de lisis por bacteriófagos.	28
E.	Análisis de inducción de lisogenia.....	30
F.	Análisis de la extracción por ADNzol del $\phi 1$	31
G.	Análisis de preparación de cócteles de bacteriófagos	32
VII.	Análisis de resultados.....	33
VIII.	Conclusiones	38
IX.	Recomendaciones.....	39
X.	Bibliografía.....	40
XI.	Anexos.....	45
	Glosario	64

LISTA DE CUADROS

	Página
1. Codificación de bacteriófagos utilizada durante todo el estudio.	19
2. Títulos de los catorce bacteriófagos aislados, medidos en ATCC 17802, en triplicado.	27
3. Valores de McFarland finales del análisis de velocidad de lisis de dos cepas de <i>V. parahaemolyticus</i> (ATCC 17802 y 80/3) tratadas con bacteriófagos.....	29
4. Porcentaje de lisis bacteriana obtenido con cada cóctel en las cepas trabajadas.	32
5. Datos originales de análisis de velocidad en cepa 80/3 contra cada bacteriófago, se muestran los datos en valores de estándar McFarland.	60
6. Datos originales de análisis de velocidad en cepa ATCC 17802 contra cada bacteriófago, se muestran los datos en valores de estándar McFarland.	61
7. Resultados de pruebas API20E ® corridas en cada aislado de <i>V. parahaemolyticus</i> . Los ceros denotan un ensayo negativo, los unos, un resultado positivo. La cepa 134/2 es <i>V. cholerae</i> , la cepa 134/1 es <i>V. vulnificus</i>	62
8. Recetas de medios utilizados	63
9. Receta para preparar buffer para bacteriófagos 10X usada.	63

LISTA DE FIGURAS

	Página
1. Estadísticas y estimaciones de la producción de camarón en países latinoamericanos no especializados en la misma (Jory, 2014). En el eje vertical de la Figura se manejan la cantidad de camarón exportado en miles de toneladas métricas.	5
2. Precio internacional para una libra de camarón decapitado, desde abril 2010 hasta enero 2015, en centavos de dólar estadounidense (index Mundi, 2015).	6
3. Diagrama de flujo de procedimiento realizado para enriquecer los bacteriófagos encontrados.	20
4. Mapa de distancias escalonadas multidimensionales Euclidianas entre cepas de <i>V. parahaemolyticus</i> , usando pruebas bioquímicas como parámetros.	25
5. Prueba de puntos de bacteriófagos sobre la cepa 80/3. Fotografía del autor. Los $\phi 1$, $\phi 2$, $\phi 3$, $\phi 4$, $\phi 5$ y $\phi 6$ fueron señalados para facilitar su visualización.	26
6. Gráfico de mortandad de <i>V. parahaemolyticus</i> ATCC 17802 al ser expuesto a fagos seleccionados, medido en cantidad de células según McFarland contra el tiempo.	28
7. Pruebas de inducción de lisogenia, en fagos $\phi 14$ y $\phi 16$. Halos lisogénicos señalados con flechas para facilitar su visualización, fotografía del autor. (Petri de 100mm).....	30
8. Gel de agarosa 0.8% de los productos de extracción del $\phi 1$. En el pozo 1 se corrió la extracción previamente tratada con ADNasa, el pozo 2 tiene una escalera de	

100pb y el pozo 3 tiene la extracción sin ADNasa (se muestra señalado por una flecha). El gel se tiñó con Gel Red.	31
9. Ensayos de cóctel de bacteriófagos. La cepa A es ATCC 17802, la cepa B es 80/3, salvaje; el número romano denota el número de cóctel.....	56
10. Ensayos de cóctel de bacteriófagos. La cepa A es ATCC 17802, la cepa B es 80/3, salvaje; el número romano denota el número de cóctel.....	57
11. Ensayos de cóctel de bacteriófagos. La cepa A es ATCC 17802, la cepa B es 80/3, salvaje; el número romano denota el número de cóctel.....	58
12. Ensayos de cóctel de bacteriófagos. La cepa A es ATCC 17802; el número romano denota el número de cóctel.	59

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue diseñar y desarrollar una terapia con cócteles de bacteriófagos para combatir los altos niveles poblacionales de *V. parahaemolyticus* en los estanques de camarón. Esto se llevó a cabo aislando bacteriófagos de varias muestras de agua de una camaronera ubicada en la Costa del Pacífico de Guatemala y del mar cercano a estas instalaciones. Se realizaron varias pruebas sobre los bacteriófagos y se diseñaron varios cócteles de bacteriófagos que se probaron sobre cinco grupos de cepas distintas, también aisladas de esta camaronera. Se encontraron tres cócteles que servirían los propósitos de evitar la contaminación de la bacteria en camarones. Se necesita terminar de caracterizar los bacteriófagos con secuenciación y microscopía electrónica. Se recomienda comprobar si las cepas de *V. parahaemolyticus* tienen genes de patogenicidad para el camarón.

I. INTRODUCCIÓN

Según la FAO, el cultivo de camarón es una actividad económica importante en América Latina (FAO, 2013). No obstante, esta actividad se enfrenta a una serie de retos como las infecciones virales e infecciones bacterianas. Dentro de las principales infecciones bacterianas que ponen en riesgo la empresa del cultivo del camarón se encuentran las causadas por diversas especies del género *Vibrio*, o vibriosis, que pueden tener un impacto negativo muy importante debido a la elevada mortalidad que provocan (Böer, *et al*, 2013) y las pérdidas económicas concomitantes que ponen en riesgo esta fuente de empleo.

En la actualidad no se recomienda el uso de antibióticos para control de las infecciones por *Vibrio* spp. en el camarón, sino que se recurre al uso de probióticos así como otras estrategias que incrementan la resistencia innata de las larvas de camarón.

Los bacteriófagos son virus de las bacterias que, en la naturaleza cumplen una función natural de control, modulando la población bacteriana. Recientemente, se han estado utilizando bacteriófagos en una variedad de maneras para proteger los microbiomas de ecosistemas y como terapias específicas cuando una población bacteriana posa una amenaza. (Payne & Jansen, 2003; Gill *et al.*, 2006; Hanlon, 2007).

En Guatemala hasta ahora no se han reportado investigaciones sobre ningún trabajo relacionado con bacteriófagos líticos de *Vibrio parahaemolyticus*, aislados de estanques de camarón, en el país. Entonces, con el propósito de aislar y caracterizar bacteriófagos que destruyan células de *V. parahaemolyticus* a través de un proceso lítico se condujo este trabajo de tesis.

II. OBJETIVOS

A. OBJETIVO GENERAL:

Desarrollar un cóctel de bacteriófagos para combatir las poblaciones de *V. parahaemolyticus* encontradas en las camaroneras guatemaltecas.

B. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Aislar bacteriófagos capaces de infectar a *Vibrio parahaemolyticus*, a partir de agua de estanque de camaroneras, así como de agua del mar cercano a las camaroneras muestreadas.
2. Caracterizar cada fago aislado a través de distintas pruebas.
3. Determinar si las poblaciones de *V. parahaemolyticus* aisladas de los estanques, así como de camarones enfermos, representan grupos de cepas bioquímicamente distintas, entre sí.
4. Determinar la plausibilidad de la preparación de un cóctel de fagos.

III. JUSTIFICACIÓN

La vibriosis, causada por grandes poblaciones de bacterias del género *Vibrio* es una enfermedad que afecta a la industria del camarón, sobre todo porque provoca elevada mortalidad en las larvas del camarón. Estas poblaciones también son susceptibles a volverse patógenas al adquirir la virulencia que las haría capaces de causar el Síndrome de Muerte Temprana en Camarón, por lo que son poblaciones bacterianas que es necesario mantener bajo control en cualquier camaronera. El aislamiento, la caracterización y pruebas de susceptibilidad de los bacteriófagos contra bacterias del género *Vibrio* y contra *V. parahaemolyticus* en particular, pueden utilizarse para desarrollar un tratamiento para el síndrome. Siguiendo la misión de esta casa de estudios, el conocimiento científico generado con esta investigación se pondrá al servicio de Guatemala. En este caso, se pondrá al servicio de las industrias camaroneras y de todas las familias que dependen de esta industria para subsistir, proveyéndoles con una posible solución al problema que amenaza su *modus vivendi*.

IV. MARCO TEÓRICO

A. INDUSTRIA CAMARONERA EN GUATEMALA

La industria camaronesa en Guatemala es un sector que crece a una velocidad lenta, debido a los precios competitivos internacionales y a varias enfermedades que afectan la producción del camarón. Hay un total de veintidós fincas de camarón en Guatemala, pero solo hay doce activas. (FAO, 2013) Si se pretende que esta industria siga creciendo y se vea fortalecida ante el mercado internacional, se necesita promover la investigación en el sector, así como la inversión para lograr tecnificar más las fincas y su manejo.

1. Sistemas de acuicultura y distribución utilizados. Guatemala cuenta con siete empresas productoras de camarón (Comisión de Pesca y Acuicultura de Agexport, 2013), la mayoría de ellas dependen de estanques de semi-intensidad. La intensidad de una finca de camarones se referirá a la densidad poblacional de camarones que se maneja en cada estanque de crecimiento. En este caso, una semi-intensidad tiene en promedio 50,000-100,000 camarones post-larva/Ha/cosecha. (Baluyut, 1989; Lucas & Southgate, 2012)

Normalmente, esta clase de sistemas utilizan estanques poco profundos con una mezcla de agua marina y agua dulce. Estos estanques se dividen en estanques de copulación y de maduración. (Baluyut, 1989) Para cosechar los camarones, se tiene la opción de drenar los estanques y utilizar una red al fondo del mismo para recuperar los crustáceos. (Lucas & Southgate, 2012)

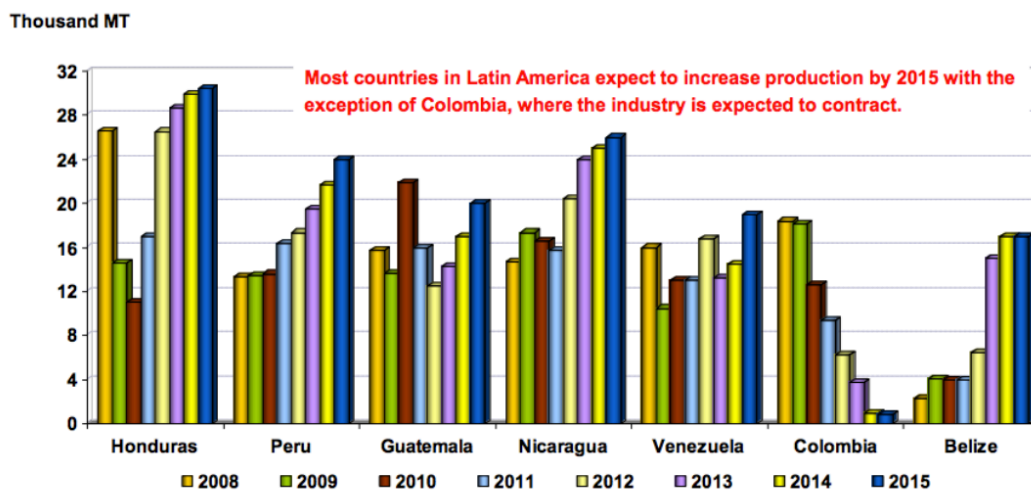
Finalmente, en Guatemala, se tienen camaronas que presentan modelos de negocios con integración vertical (tal es el caso de industrias como Acuamaya). Estas, como tal, manejan todo el sistema de producción de camarones, incluyendo el empaquetado y distribución. Esta compañía, en particular, ha logrado posicionarse en los mercados internacionales de Taiwán y Europa, y presenta bastantes indicios de lograrse adaptar al mercado estadounidense en los próximos años. (Rosenberry, 2014b)

2. Especies utilizadas. Se comercializan dos especies de camarón: *Litopenaeus vannamei* y *Litopenaeus stylirostris* (camarón patiblanco y patiazul, respectivamente). De estos, se reconoce que el primero es un camarón mucho más grande

que el segundo. (Zorriehzahra & Banaederakhshan, 2014) Las diferencias morfológicas permiten acatar necesidades culinarias distintas, lo que los hace muy atractivos para la industria. Estos se cultivan en estanques separados, a manera de evitar la competencia inter-especie por recursos. (Lucas & Southgate, 2012)

3. Producción. Esta industria consta de alrededor de 17, 000 toneladas métricas de producto de exportación anual. Se proyecta que para el 2015 se exportarán alrededor de 20, 000 toneladas métricas. (Jory, 2014) Estas proyecciones permiten apreciar cómo la industria está creciendo y tiene el potencial de poder alcanzar a Honduras y Perú en términos de producción. Esto puede verse en la Figura 1, que compara las producciones de los países latinoamericanos que no se consideran potencias mundiales en términos de producción de camarones. (Jory, 2014)

Figura 1. Estadísticas y estimaciones de la producción de camarón en países latinoamericanos no especializados en la misma (Jory, 2014). En el eje vertical de la Figura se manejan la cantidad de camarón exportado en miles de toneladas métricas.

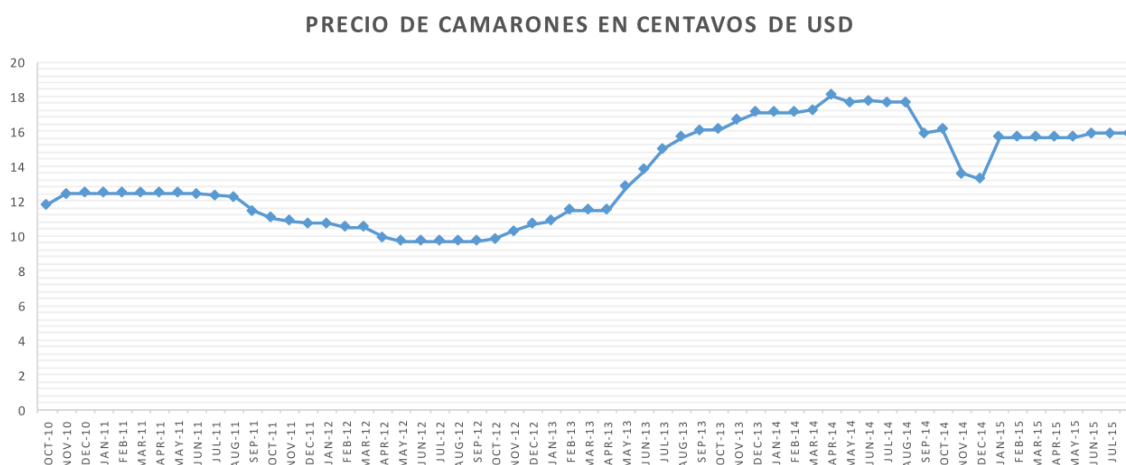


Sources: FAO (2013) for 2008-2011; GOAL (2013) for 2012-2015.

(Fuente: Jory, 2014)

Al relacionar los datos de la Figura 1 con los precios del camarón en el año 2014 (promedio de 17 centavos de dólar estadounidense por libra de camarón (index Mundi, 2015)), se obtiene que la ganancia neta a partir de la producción de camarón rondó alrededor de 6.3 millones de dólares estadounidenses por la exportación del camarón guatemalteco. En la Figura 2, se puede apreciar la variabilidad que ha habido en el precio del camarón decapitado por libra (en centavos de dólar), durante los últimos cinco años. Como puede apreciarse, hubo un alza dramática en el 2013, y, aunque hubo una baja en el precio en el 2014, el precio se ha mantenido mucho más alto que antes del alza inicial del 2013. El factor más importante para este cambio en los precios es el surgimiento del síndrome de muerte temprana (EMS, por sus siglas en inglés), el cual es causado por una cepa patógena de *Vibrio parahaemolyticus*. (Whittaker, 2014)

Figura 2. Precio internacional para una libra de camarón decapitado, desde abril 2010 hasta enero 2015, en centavos de dólar estadounidense (index Mundi, 2015).



(Fuente: index Mundi, 2015)

B. *Vibrio parahaemolyticus*

Una bacteria del género *Vibrio*, que se reconoció por primera vez en Japón en 1956 (Jones, *et al.* 2012), es causante de pérdidas millonarias en la industria de acuicultura (Nunan, Lightner, Pantoja, & Gomez-Jimenez, 2014). También es el contaminante más común en brotes diarreogénicos causados por comida del mar en los países desarrollados.

La primera vez que se describió, se le dio el nombre *Pasteurella parahaemolytica*, y, tras un breve periodo en que se conoció como *Oceanomas parahaemolytica*, llegó a tener su nombre actual. (Jones *et al.*, 2012)

Esta bacteria es parte del género *Vibrio*, el cual agrupa bacterias halofílicas marinas que pueden causar cólera o disentería. Las bacterias de este género se pueden dividir en subgrupos, con los nombres de una especie distintiva del mismo. *V. Parahaemolyticus* pertenece al grupo de *V. harveyi*, el cual también es un patógeno de camarones. (Thompson *et al.*, 2007). Así también, *V. parahaemolyticus* está bastante distanciado de bacterias mucho más patógenas, como *V. cholerae*, esto puede que tenga repercusiones sobre la capacidad patogénica de *V. parahaemolyticus*. Esto puede observarse en la intensidad de las enfermedades gastrointestinales causadas por esta bacteria a comparación de las causadas por *V. cholerae* u otros miembros del género como *V. vulnificus*. (Thompson *et al.*, 2007)

1. Características. *V. parahaemolyticus* es un bacilo, Gram negativo, aeróbico facultativo. La bacteria no es capaz de formar esporas. (Jones *et al.*, 2012) En cuanto a su motilidad, *V. parahaemolyticus* es una bacteria con una fisiología interesante. Se ha reportado que esta bacteria presenta fisiologías distintas dependiendo del ámbito en que se encuentra, a manera de moverse de la manera más eficiente en las condiciones dadas. (McCarter, 1999)

Cuando la bacteria se encuentra en vida libre en un medio acuático, esta presenta una fisiología de nadadora, moviéndose con un solo flagelo monótrico. Sin embargo, cuando se encuentra como parte de un *biofilm* se mueve por *swarming*, utilizando una cantidad de flagelos peritricos. (McCarter, 1999) Otro aspecto que cambia conforme el entorno en donde se desarrolla la bacteria, es el tamaño de la misma.

Cuando *V. parahaemolyticus* se encuentra en vida libre, es normal que esta llegue a medir $\sim 1.5\mu\text{m}$ de largo y $\sim 0.5\mu\text{m}$ de ancho. Mientras, si esta forma parte de un *biofilm*, o nada hasta topar con alguna superficie, la bacteria cesa sus procesos de septación y puede llegar a medir hasta $30\mu\text{m}$ de largo. Es este cese en la septación el que permite el

desarrollo de los flagelos peritricos y, por ende, del movimiento eficiente en sustancias viscosas en modalidad de *swarming*. (McCarter, 1999)

Como otros miembros del género *Vibrio*, *V. parahaemolyticus* es halofílico. Esto se reconoce en que el medio de cultivo selectivo más rico que se le puede proveer es Agar Tiosulfato-Citrato-Sales Biliares (TCBS, por sus siglas en inglés) (Jones *et al.*, 2012). Sin embargo, este medio no es el idóneo para su crecimiento rutinario. En cuanto a un medio nutritivo, se prefiere utilizar Agar Agua Marina. Este último posee todos los nutrientes necesarios para asegurar el crecimiento correcto y rápido de las bacterias. (Roque *et al.*, 2005)

2. Patogenicidad en humanos y camarones. *Vibrio parahaemolyticus* es la bacteria causante del mayor número de casos de intoxicación gastrointestinal por consumo de mariscos contaminados en los países desarrollados (CDC, 2013). Así también, las pérdidas monetarias causadas por muerte de camarones en estanques de camaronerías alrededor del mundo se estiman en billones de dólares (Whittaker, 2014). Es entonces que el estudio de qué permite que esta bacteria produzca su virulencia magnifica su importancia.

a. Síndrome de muerte temprana. El Síndrome de Muerte Temprana (EMS, por sus siglas en inglés), también conocida como Enfermedad de Necrosis Aguda Hepatopancreática (AHPNS, por sus siglas en inglés), es una enfermedad que afecta a las post-larvas de camarones (Tran, *et al.*, 2013). Este síndrome es causado por cepas patógenas de *Vibrio parahaemolyticus*. Se conoció por primera vez en el Asia y a partir de ahí ha llegado a infectar camarones del sudeste de Asia y de América Latina (Nunan *et al.*, 2014).

1) Historia e impacto. EMS es una enfermedad que se reconoció por primera vez en el sur de China, en el año 2009. A continuación, en el 2010, se encontró en la isla Hainan; en el 2011, en Vietnam y Malasia. Se reporta consistentemente en el este de Tailandia desde el 2012. En el 2013 se reportó por primera vez en el hemisferio oeste, en México. (Böer *et al.*, 2013)

AHPNS puede llegar a causar pérdidas de hasta el 80% de una cosecha de camarones, en países enteros. Esta enfermedad se asienta en un estanque criadero cuando se rellena con camarones nuevos. En los peores casos, se reporta hasta el 100% de pérdida de cosecha. (Tran *et al.*, 2013)

Las altas tasas de mortalidad en los camarones significan un golpe fuerte a la industria camaronera. Mundialmente, ha habido una baja en la producción de camarones por esta enfermedad; se puede tomar a Vietnam de ejemplo, donde de 70,000 toneladas métricas producidas en el 2010, se bajó a 30,000 toneladas métricas en el 2013. (Tran *et al.*, 2013)

El impacto económico mundial se puede observar en la Figura 2, en donde se puede observar una abrupta alza en los precios por libra de camarón desde el 2013, una tendencia que se mantuvo relativamente alta en el 2014, a pesar de ligeras bajas. En Vietnam se reportaron pérdidas de 570,000USD en el 2011 y de 7, 200,000USD en el 2012. En México, en el 2013, se reportaron pérdidas de 118, 000,000USD. Estas pérdidas se reflejan en todos los países donde la industria se ha visto afectada, llegando a perderse alrededor de 220 millones de empleos. (Böer *et al.*, 2013)

En los países centroamericanos no se ha reportado la presencia de esta enfermedad. Sin embargo, es probable que no se hayan reportado por la falta de análisis realizados. (Whittaker, 2015) Esto se ve reflejado en aislamiento de *V. parahaemolyticus* en aguas y camarones provenientes de camaroneras. También, en información no publicada, se habla sobre tasas de mortalidad altas en post-larvas de camarones provenientes de estos mismos estanques.

2) Patología y patogénesis. Se discernió que esta enfermedad es causada por una cepa especialmente virulenta de *Vibrio parahaemolyticus* en el 2013 (Nunan *et al.*, 2014). Se ha reportado también que las infestaciones por bacterias del género *Vibrio* suelen ser manejables por una administración eficiente de los estanques de las camaroneras (Whittaker, 2014). Entre los factores de riesgo que fomentan la colonización de estas bacterias en los estanques, están:

- tener estanques con altas densidades poblacionales de camarones
- tener cepas muy sensibles a la bacteria

- alto contenido de sal en el agua marina aledaña a las camaroneras
- falta de un estanque de reserva de agua y falta de tratamiento de aguas en las camaroneras
- falta de atención a los procesos de preparación de los estanques
- mala administración de la comida suplementada a los estanques
- baja concentración de oxígeno en los tanques
- condiciones estresantes durante el transporte de los camarones o durante el almacenamiento de los mismos. (Tran *et al.*, 2013)

EMS provoca una serie de síntomas que desembocan en la muerte de camarones jóvenes. Estos síntomas se provocan por la acción de la bacteria, en tanto que esta se adentra al camarón por vías alimenticias. Una vez colonizado el estómago, la bacteria viaja al hepatopáncreas donde liberará toxinas que fomentarán la necrosis del mismo. (Chaichalearmmongkol & Jargon, 2013)

La colonización del estómago también tiene el efecto secundario de promover la falta de apetito en los camarones. La combinación de falta de nutrientes y la necrosis en el hepatopáncreas debilita el caparazón y hace que el nado cada vez sea más difícil. Esto desemboca en la muerte del camarón afectado en pocos días. (Nunan *et al.*, 2014)

La colonización de camarones por *V. parahaemolyticus* no es un tema desconocido. La misma es causa de vibriosis en humanos. Sin embargo, la capacidad de enfermar y matar al camarón de esta manera ha sido tema de amplia investigación en los últimos años. (Venkateswara-Rao, 1998)

A partir de estas investigaciones, se desarrolla la hipótesis que dicta que la patogenicidad de la bacteria proviene de un bacteriófago lisogénico que permite la producción de la toxina que induce la necrosis del hepatopáncreas del camarón. El modelo de patogenicidad, que se teoriza posee el mismo mecanismo de *V. cholerae* causante de cólera en humanos. (Zorriehzahra & Banaederakhshan, 2014)

La hipótesis de que la capacidad patogénica de esta bacteria proviene de un bacteriófago se abstrae que la toxina está codificada en un plásmido, y fragmentos de estos suelen compartirse con facilidad por medio de bacteriófagos. Sin embargo, hay

muchos otros mecanismos de transferencia horizontal de genes entre bacterias, tales como los pili sexuales y transposones. Esta información, sin embargo, se ha logrado utilizar con éxito para desarrollar técnicas moleculares para la detección rápida de la cepa patogénica de la bacteria en los estanques. (Rosenberry, 2014a)

b. Vibriosis en humanos. La vibriosis en humanos, causada por *V. parahaemolyticus* se reconocerá por su sintomatología: diarrea con agua, náusea, vómitos, fiebre, escalofríos, y dolor abdominal severo. Estos síntomas suelen ocurrir 24h después de la ingesta de la bacteria y suele ser auto-limitante, durando un promedio de tres días. En personas con sistemas inmunes deficientes, esta enfermedad puede ser mucho más fuerte. *V. parahaemolyticus* también puede causar infecciones cutáneas cuando el bacilo entra en contacto con una herida abierta (suele ocurrir cuando se nada en aguas infestadas de la misma). (CDC, 2013)

Se estima que esta bacteria es la causa mayor de intoxicaciones por consumo de mariscos en los países desarrollados. En EEUU se reportan alrededor de 215 casos, de los cuales habrá 30 hospitalizaciones, y alrededor de 1 ó 2 muertes. Sin embargo, se considera que este número está subestimado, dada la capacidad auto-limitante de la enfermedad, y se estima que hay hasta 4,500 casos anuales en ese país. (CDC, 2013)

Los casos de vibriosis suelen seguir las temporadas anuales. Aproximadamente el 70% de los casos se dan entre mayo y octubre, cuando las aguas son más cálidas. Otro factor que influye bastante es la salinidad del agua; cuando se elevan las cantidades de sales en el mar, se eleva la cantidad de casos de vibriosis en las áreas afectadas. (CDC, 2013)

Vibrio parahaemolyticus tiene distintos serotipos que se asocian a la patogenicidad en humanos. La inmunoquímica de esta bacteria ha permitido que se conozcan dos antígenos: O y K. Se conocen trece serotipos O y 71 K. Normalmente, no hay relación serológica entre los brotes de *V. parahaemolyticus* que se reportan. Sin embargo, sí ha habido ciertos serotipos que han causado brotes bastante importantes. (Yeung & Boor, 2004)

El serotipo más importante es el O3:K6. Este se reportó en 1996 en Calcuta, India. Este explicaba alrededor de 80% de los aislados examinados. Tras los estudios iniciales

en la India, se realizó un estudio comparativo con los aislados de *V. parahaemolyticus* provenientes de turistas del sudeste de Asia en Japón. En este caso, se encontró que las cepas indias eran indistinguibles de las cepas en el resto de Asia. (Givens, Bowers, DePaola, Hollibaugh, & Jones, 2014)

Estas cepas, sin embargo, no son las únicas variantes patogénicas que se han encontrado. La patogenicidad de una cepa normalmente se determinará a partir de la presencia o ausencia de factores de virulencia dentro de la bacteria. Estos factores suelen ser móviles en tanto que su presencia podrá ser el producto de transferencia horizontal y vertical de genes entre poblaciones bacterianas. (Yeung & Boor, 2004)

Esta propiedad de transferencia genética se ve fomentada cuando las bacterias residen dentro de un *biofilm*. En estas comunidades bacterianas, el intercambio genético será común. El material genético que pueden adquirir puede estar en la forma de transposones, bacteriófagos lisogénicos, o por pili de conjugación con otras bacterias. (McCarter, 1999)

Entre los factores de virulencia más comúnmente encontrados en *V. parahaemolyticus*, se encuentra la hemolisina directa termostable (TDH). Esta proteína, entre otras cosas, permite reconocer a la bacteria con un agar sangre, puesto que causará β -hemólisis en el mismo. Se ha correlacionado la presencia de este factor con la capacidad de la cepa de causar gastroenteritis en humanos. Este factor afecta las membranas celulares, formando poros que alteran el flujo iónico intercelular. Esta alteración provoca reacciones secretorias en las membranas celulares del epitelio intestinal, lo que produce diarreas severas. (Yeung & Boor, 2004)

Un factor de virulencia muy relacionado al TDH se conoce como TRH (*TDH-related hemolysin*). La mayor diferencia entre TDH y TRH es que la segunda sí es lábil al calor, si se sujeta a 65C por diez minutos, esta pierde su actividad. El mecanismo de acción se considera que, si no es igual en ambas proteínas, es suficientemente similar como para despreciar las diferencias. (Yeung & Boor, 2004)

Un tercer factor de virulencia sería la vibrioferrina. Esta proteína es un sideróforo que le permite a la bacteria proliferar en medios con bajas concentraciones de hierro. Sin embargo, esta proteína también se considera un factor de virulencia puesto que cuando

esta está presente, habrá adherencia más efectiva y mucha más actividad hemolítica. (Yeung & Boor, 2004)

C. BACTERIÓFAGOS

Los bacteriófagos, si se consideran vivos, son la forma de vida más abundante en el planeta. (Skurnik & Strauch, 2006) Serán virus que afectan a bacterias, como tal, comparten todas las características que poseen los virus que afectan a células eucariotas. Los mismos cumplen una miríada de funciones en cuanto a que promueven el intercambio genético entre bacterias y también funcionan como control biológico natural de las mismas. (Sulakvelidze, Alavidze, & Morris, 2001)

1. Historia. El descubrimiento de los bacteriófagos se acredita a Felix D'Herelle, quien los utilizó para tratar casos de infecciones gastrointestinales en niños parisinos en el año 1917. Esto provocó que la investigación y uso de los bacteriófagos incrementara de sobremanera. El auge de la biología de bacteriófagos desapareció tan repentinamente como apareció cuando se descubrió la penicilina y, con ella, de los antibióticos de amplio espectro. (Matsuzaki *et al.*, 2005)

Entonces el uso de bacteriófagos se redujo a una técnica para diferenciar cepas de varias bacterias. No fue sino hasta varias décadas más tarde que los bacteriófagos fueron redescubiertos en el mundo occidental por su potencial bactericida, sobre todo ante la epidemia de resistencias ante antibióticos que cada vez más bacterias presentan. Como tal, los bacteriófagos hoy se están desarrollando como las nuevas armas farmacéuticas contra varias bacterias que cada vez tienen menos susceptibilidad ante los antibióticos de naturaleza química. (Sulakvelidze *et al.*, 2001)

Entre estas nuevas terapias, resalta el uso de un solo bacteriófago que sea capaz de atacar a múltiples cepas bacterianas. Sobre todo, se han estado desarrollando bacteriófagos fibrosos que codifiquen proteínas capaces de atacar cepas de *Staphylococcus aureus* que sean multidrogosresistentes. (Sulakvelidze *et al.*, 2001)

2. Terapia con fagos. La terapia con fagos se refiere al uso de los fagos para eliminar una infección bacteriana. Esta terapia se ha utilizado con éxito desde los años de D'Herelle, sobre todo en el instituto Eliava de Bacteriófagos en Georgia, Europa del Este. Esta terapia se enfoca en usar los fagos aislados de varias cepas de la bacteria patógena y utilizarlos para tratar a la persona enferma con esta bacteria. (Payne & Jansen, 2003)

Para preparar un tratamiento con fagos debe tomarse en cuenta la susceptibilidad de la bacteria ante la infección viral que se propone usar. Esta es la mayor desventaja que presentan los bacteriófagos contra el uso de antibióticos; puesto que se necesita un diagnóstico muy específico para poder utilizar los fagos como agente terapéutico sin necesidad de preparar una mezcla de fagos, conocida como cóctel de fagos. (Gill *et al.*, 2006)

Un cóctel de fagos es una mezcla de distintos fagos que afectan a distintas cepas de una misma bacteria. Esta clase de mezclas se preparan dado el alto grado de especificidad que pueden presentar algunos fagos. (Wright, Hawkins, Änggard, & Harper, 2009) Los cócteles suelen prepararse a partir de las dos clases de fagos que existen:

a. Fagos de amplio espectro. Son bacteriófagos que son capaces de infectar a varias cepas de una bacteria, o, en algunos casos, a más de una bacteria. Los fagos de amplio espectro funcionan así porque al adsorberse a la superficie bacteriana, usarán un receptor altamente conservado en la especie bacteriana, o, incluso, el género taxonómico bacteriano. (Wright *et al.*, 2009)

Estos, en la naturaleza, suelen servir de vehículos de material genético; volviéndose clave en la transferencia horizontal genética entre bacterias. Esto se ve, sobre todo, en bacterias que obtienen su patogenicidad a partir de la infección de un bacteriófago lisogénico. Una de las hipótesis más avanzadas en cuánto a cómo *V. parahaemolyticus* obtiene su capacidad de causar el SMT en camarones es a partir de un bacteriófago. (Payne & Jansen, 2003), mas hace falta estudios que corroboren dicha afirmación.

Esta clase de bacteriófagos también constituye el ideal de la investigación farmacéutica en bacteriófagos: un fago que emule la actividad bactericida de un antibiótico. Esto haría que los mismos se volvieran una alternativa viable ante las

crecientes resistencias en poblaciones bacterianas. (Payne & Jansen, 2003) Es válido decir que se busca ampliar este espectro con modificaciones genéticas que pretenden que un mismo fago tenga receptores para varias cepas de una bacteria altamente patogénica (como lo es *Staphylococcus aureus* resistente a vancomicina), lo que conlleva a que se utilicen fagos que sean constitutivamente más grandes, para soportar la carga genética que se busca imponer dentro, por lo que la gran mayoría de fagos modificados para atacar a más de una cepa suelen ser fagos fibrosos. (Matsuzaki *et al.*, 2005)

b. Fagos de corto espectro. Los fagos de corto espectro son fagos que afectan a una sola cepa (o un grupo muy pequeño de cepas) de una especie. Estos fagos suelen ser utilizados para producir bibliotecas de bacteriófagos para la determinación taxonómica de cepas. Esto se ve mucho, sobre todo para la identificación de *S. aureus*. (Matsuzaki *et al.*, 2005)

Los fagos de corto espectro son los que se han utilizado con más frecuencia para producir los cócteles de bacteriófagos. En el instituto Eliava se acumulan bibliotecas de fagos que atacan a distintas cepas de la misma bacteria. Cuando un paciente es diagnosticado con una bacteria se le administra un cóctel hecho a base de los bacteriófagos que atacan a las cepas que más probablemente estén infectando al paciente. Como tal, se suelen obtener los genes que codifican para los receptores bacterianos de esta clase de fagos para producir los fagos de amplio espectro artificiales. (Sulakvelidze *et al.*, 2001)

c. Uso en biorremediación. La biorremediación es la disciplina que busca restaurar un área después de que esta fuera dañada y su balance ecológico, alterado. Los bacteriófagos pueden ser de mucha utilidad en la biorremediación cuando el agente causal es bacteriano. Ejemplo de estos casos abundan. (Hanlon, 2007; Nakai & Park, 2002; Sulakvelidze *et al.*, 2001)

Uno de estos ejemplos se basa en el uso de bacteriófagos para combatir la eutrofización en varios lagos en Japón. En este caso, utilizaron cianófagos para eliminar las poblaciones de cianobacterias. (Yoshida *et al.*, 2006) La mayor ventaja del uso de esta clase de tratamiento en comparación de otros, es que no hay riesgo de desbalancear la

microbiota nativa del lugar. Esto se debe a que los bacteriófagos tendrán solo el impacto de reducir las poblaciones microbianas que están causando los efectos nocivos en el ambiente, y no deberían causar mortalidad en bacterias comensales del mismo. (Yoshida-Takashima *et al.*, 2012)

V. METODOLOGÍA

A. AGRUPACIÓN DE CEPAS DE *V. parahaemolyticus*

La caracterización de las cepas obtenidas de estanques de camarón o de hemolinfa de camarones enfermos se realizó por medio de pruebas API20E ® de BioMérieux ®. Se realizó una prueba con cada uno de los aislados bacterianos. Los aislados bacterianos se obtuvieron en un muestreo de *Vibrio* en los estanques de una camaronera del Pacífico, realizado en junio y julio de 2014, los cuales se congelaron a -70°C. Para realizar las pruebas de identidad bioquímica, se descongelaron estos aislados y tras obtener una colonia fresca, se sembró en la prueba API20E ®, siguiendo las instrucciones del fabricante y las precauciones de bioseguridad pertinentes.

La agrupación de las cepas consistió en tomar los resultados de estas pruebas y formar una base de datos con los resultados variantes de las pruebas. Las pruebas bioquímicas que se utilizaron para la base de datos fueron las pruebas de: orto-nitrofenil beta-galactosidasa; ornitina decarboxilasa; citrato; Voges-Proskauer; fermentación de sucrosa; fermentación de amygdalina; fermentación de sacarosa; y fermentación de arabinosa.

Los resultados de estas pruebas fueron ingresados para los doce aislados que se tenían (incluyendo la cepa ATCC 17802) al programa SPSS 18.0, para Windows. En este, se corrió un análisis de agrupamiento de escalonamiento multidimensional con distancias Euclidianas. De este, se obtuvo un mapa de distancias bioquímicas entre los aislados. A partir del mapa, se pudo agrupar los aislados en cepas bioquímicas distintas entre sí. Para trabajar los siguientes pasos de la metodología, se seleccionó un aislado de cada cepa reconocida en el mapa.

B. AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE BACTERIÓFAGOS:

Para realizar un tratamiento contra la bacteria *V. parahaemolyticus* en los estanques de camarón fue necesario realizar un aislamiento de bacteriófagos naturales a partir de ocho muestras de agua, las cuales fueron colectadas asépticamente en bolsas de 500mL, de las cuales: dos provinieron del mar, obtenidas detrás de la reventazón (playa de El Sunzo, Santa Rosa, Guatemala); dos, del laboratorio de una camaronera en Candelaria, Santa Rosa, Guatemala; y cuatro, de una finca camaronera localizada en Iztapa, Escuintla, Guatemala. Todo este procedimiento se basó en: van Tuest & Kropinski, 2009; y Alanis Villa, 2014. Todas las recetas de medios y soluciones utilizadas se encuentran en el Anexo 5.

1. Aislamiento y purificación de bacteriófagos de aguas ambientales. Cada muestra de agua fue centrifugada por 25 minutos, a 3,000 x g y temperatura ambiente. Posteriormente el sobrenadante se mezcló con un cultivo de *Vibrio parahaemolyticus* de 6 horas de crecimiento y caldo tripticasa soya con sales. La mezcla fue incubada por una noche a 37C. Es importante mencionar que se utilizaron mezclas de distintas muestras de agua con distintas cepas de *V. parahaemolyticus*, que fueron codificadas para llegar a los dieciséis bacteriófagos que se usaron en todo el estudio.

La codificación usada para el aislamiento y subsiguiente enriquecimiento de los lisados y fagos se diagrama en el siguiente Cuadro (Cuadro 1). Es importante mencionar que se realizó un total de veinte enriquecimientos, dos veces (el primero se codificó con números y el segundo con letras). Los números y letras no mostradas no se muestran en el Cuadro, dado que no fueron mezclas exitosas en las pruebas de puntos realizadas; por lo que no se enriquecieron ni se trato de aislar bacteriófagos de las mismas.

Para determinar qué cepa se mezclaría con qué muestra, se realizó una aleatorización de listas en MS Excel. La razón por la que no se enriquecieron todas las cepas con todas las muestras de agua (lo cual hubiese sido idóneo) fue que se recolectó agua insuficiente para esto.

Cuadro 1. Codificación de bacteriófagos utilizada durante todo el estudio.

Código	Cepa de <i>V. parahaemolyticus</i>	Muestra de agua utilizada (No. muestra)
Φ1	138/1v	Candelaria (2)
Φ2	133/3v	Iztapa, estanque 1 (1)
Φ3	138/4v	Mar (2)
Φ4	138/5v	Mar (2)
Φ5	138/6v	Iztapa, estanque 2 (2)
Φ6	80/3v	Iztapa, estanque 2 (2)
Φ7	134/2v	Candelaria (2)
Φ8	134/3a	Mar (1)
Φ9	73/6v	Iztapa, estanque 1 (2)
Φ14	134/1v	Iztapa, estanque 1 (2)
Φ15	138/2v	Iztapa, estanque 1 (1)
Φ16	126/1v	Mar (1)
Φa	134/2v	Candelaria (2)
Φf	88/3v	Iztapa, estanque 2 (2)

El cultivo se centrifugó después de la incubación. El sobrenadante se filtró a través de un poro de 0.45 μm y fue almacenado con cloroformo y buffer de bacteriófagos 1X a 4C. Posteriormente, se tomó una asada del filtrado y se realizó un inóculo en cajas llenas a medio volumen con agar Müeller Hinton, frías. Luego, con un asa estéril, se realizó un aislado de los bacteriófagos.

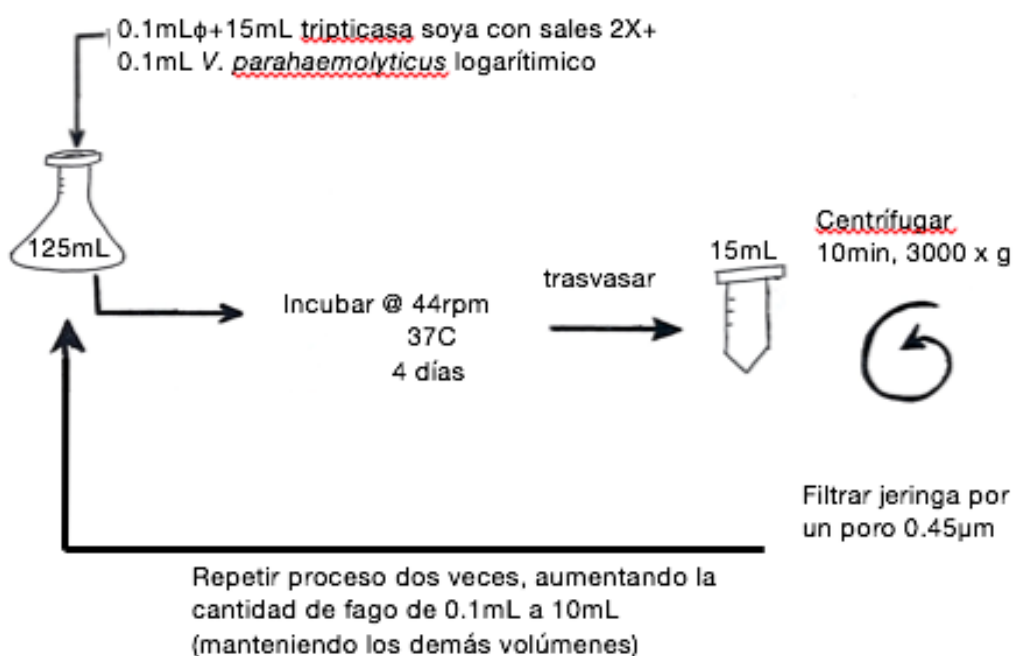
Una vez la caja llegó a temperatura ambiente se vertió una mezcla de agarosa suave (agarosa 3 g/L con tripticasa soya con sales) con cultivo logarítmico de la bacteria sobre la parte de la caja donde se esperaba la menor cantidad de fagos, se dejó polimerizar la agarosa y las cajas se incubaron boca abajo a 37C por 12 horas.

De las placas que se lograron aislar, se tomó con una punta de pipeta que se introdujo a un tubo estéril con 100 μL de buffer de bacteriófagos que luego se incubó por 4 horas a temperatura ambiente, tiempo tras cual se agregó una gota de cloroformo. Este

nuevo aislado se utilizó para repetir el procedimiento de purificación, tres veces, en agar Müeller Hinton para obtener los fagos purificados.

2. Aumento del título del lisado. En un Erlenmeyer de 125 mL, se agregó 0.1 mL de cada uno de los fagos aislados y 15 mL de caldo tripticasa soya con sales de doble concentración. Esto se inoculó con 0.1 mL de *V. parahaemolyticus* ATCC 17802 logarítmico. Se incubó en un baño de María rotatorio a 44 rpm, 37C, 4 días. El cultivo se trasvasó a un tubo cónico estéril y se centrifugó 10 minutos a 3,000 x g. Luego, se filtró por inyección por un poro de 0.45 μ m. Este proceso se repitió dos veces con cada fago, solamente cambiando la cantidad de fago agregado en la segunda y tercera vez, de 0.1 mL aumentándolo a 10mL.

Figura 3. Diagrama de flujo de procedimiento realizado para enriquecer los bacteriófagos encontrados.



3. Determinación del título de bacteriófagos por agar suave. Se hicieron diluciones seriadas desde 10^{-1} hasta 10^{-9} en buffer de bacteriófagos a partir del fago enriquecido, para cada fago. Estas diluciones seriadas se mezclaron con agarosa suave (con tripticasa soya y sales) y 0.5mL de cultivo logarítmico de la cepa ATCC 17802; posteriormente fueron sembrados en cajas de agar Müller Hinton llenas a medio volumen. El procedimiento se repitió hasta tener tres cajas de cada dilución para cada fago. Se utilizaron cajas únicamente con agar y agarosa suave como control negativo y una caja solo con bacterias y agarosa suave como control de crecimiento bacteriano. Las cajas se incubaron a 37°C por toda la noche. Luego de 24-30 horas de incubación se contaron las placas en las cajas Petri cuyo número de placas estaba entre 20 y 200 placas. Para finalizar se utilizó la siguiente ecuación para determinar el título original en el lisado (en unidades formadoras de placas por mililitro, UFP/mL):

C. CARACTERIZACIÓN DE BACTERIÓFAGOS

La caracterización de los bacteriófagos purificados anteriormente consistió en realizar tres pruebas distintas con cada uno de los catorce fagos aislados: una prueba de velocidad de lisis; una prueba de lisogenia; y una prueba de rango de infectividad de cepas de *Vibrio* sp. Tras estas tres pruebas, se realizó una última, pero solo con uno de los fagos más prometedores, esta consistió en una extracción de material genético con ADNzol, para confirmar si el mismo es de ARN o ADN. Todas las recetas de medios y soluciones utilizadas se encuentran en el Anexo 5.

1. Prueba de velocidad de lisis. La prueba de velocidad de lisis consistió en utilizar cultivos de 10 mL logarítmicos (6 horas de incubación a 37°C) de las cepas 80/3 y ATCC 17802 con una densidad de McFarland 4.0. A estos cultivos se les agregaron 500 μ L de cada uno de los catorce fagos. La densidad óptica de cada tubo se midió cada hora, durante ocho horas, utilizando estándares de McFarland para calcular la densidad celular en el cultivo.

2. Prueba de inducción de lisogenia. La prueba de lisogenia consistió en una prueba de agar suave utilizando agarosa 3 g/L en tripticasa soya con sales y cajas de agar Mueller Hinton llenas con medio volumen. Se usaron 500 μ L de cultivo logarítmico de la cepa ATCC 17802 en cada caja, y se agregaron 200 μ L de una dilución 10^{-9} de cada uno de los catorce fagos. Las cajas se incubaron a 37C por ~6 horas, tras lo cual se procedió a apagar la incubadora, dejando que llegara a una temperatura de 24C. Se incubaron las cajas por doce horas más. Tras esto, se procedió a leer las cajas.

Aquellos fagos que lograron realizar placas se les consideró como bacteriófagos resistentes a cambios ambientales. Los fagos que no lograron lisar bacterias se consideraron susceptibles a cambios ambientales. Finalmente las cajas donde se observaron halos de infección, pero sin lisis bacteriana, se consideraron como fagos que inducen lisogenia tras cambios ambientales. Estos fagos fueron descartados para las pruebas de cócteles posteriores.

3. Prueba de susceptibilidad de cepas de *Vibrio* sp. La tercera prueba, fue la prueba de susceptibilidad. En esta prueba, se probó el poder infectivo de cada fago contra un representante de cada cepa. Cada cepa se creció en 10 mL de caldo tripticasa soya con sales hasta llegar a fase logarítmica (6 horas a 37C). Luego, se hicieron diluciones seriadas de cada fago en buffer de bacteriófagos (hasta llegar a la dilución 10^{-9}). En cada tubo se agregaron 10 gotas del cultivo bacteriano y 10 gotas del fago original, así como cada dilución seriada y con cada cepa. A cada tubo se le agregó agarosa suave líquida y se mezcló antes de verterse sobre la caja de agar marino. Se permitió la gelificación y se incubaron las cajas por 24 horas a 37C. Se realizaron tres réplicas para cada caja Petri donde se debieron obtener placas contables (20-200), si la cepa fuera susceptible al fago agregado; de no obtenerse, se consideraba como una cepa resistente a dicho fago. Se utilizó también una cepa de *V. cholerae* y una de *V. vulnificus*, como «outgroup».

4. Extracción de ácidos nucleicos por DNAzol. Esta última prueba consistió en realizar una extracción con DNAzol del bacteriófago ϕ 1. La extracción se hizo en

duplicado, una vez tratando el fago purificado con una enzima ADNasa (a manera de no obtener contaminación por parte de desechos genómicos bacterianos). La réplica no se trató con enzimas, puesto que la contaminación genómica bacteriana funciona como control positivo para el gel de integridad en donde se corroboró el éxito de la extracción.

Para realizar el tratamiento enzimático, se usó la enzima RQ1 Rnase-Free DNase de Promega. Se realizó la reacción con 8 μL de fago purificado, y siguiendo las instrucciones del fabricante. Una vez terminada la reacción, se procedió a la extracción con DNAzol. Para la réplica sin ADNasa, se usó 500 μL de ADNzol con 50 μL del fago purificado (100 μL de DNAzol para los 10 μL de fago tratado con ADNasa, la diferencia en volúmenes utilizados radica en que la muestra tratada con ADNasas tenía un volumen de producto de reacción de 10 μL y se carecía de suficiente enzima para tener un volumen mayor; se trabajó con una muestra de 50 μL con la muestra que no fue tratada enzimáticamente para garantizar una banda visible en el gel).

Tras ser mezclados por inversión, se centrifugaron por 10min a 10,000 x g, a temperatura ambiente. Se procedió a agregar 250 μL de etanol absoluto a la réplica sin tratamiento enzimático y 25 μL a la réplica con ADNasa. Tras tres lavados con etanol al 70%, se resuspendió el material genético en NaOH 8 mM, guardando los extractos a 4C. Una vez terminada la extracción, se corrieron los productos de la misma en un gel de agarosa 0.8% en TAE 1X, previamente tratado con Gel Red, a 70 V, por 3 horas, junto con una escalera de Promega, de 100 pb.

D. PRUEBA DE CÓCTEL DE BACTERIÓFAGOS

La prueba de cóctel de bacteriófagos se basa, esencialmente, en una prueba de agar suave. Se probó cada cóctel contra cada una de las cepas de *Vibrio parahaemolyticus* previamente identificadas. Estas se realizaron en cajas Petri de 5 mL, para ahorrar medio. A cada caja se le agregó 2 mL de agar Müeller Hinton.

Se diseñaron los cócteles utilizando los resultados de la prueba de inducción de lisogenia, seleccionándose solo los bacteriófagos que lograron producir una placa a pesar del cambio de temperatura. También se seleccionaron dos fagos que no provocaron lisogenia y tampoco lisis. Estos dos fagos ($\phi 7$ y $\phi 8$) solo se probaron juntos, no con los demás fagos seleccionados ($\phi 1$, $\phi 3$, $\phi 6$ y ϕa). Los fagos $\phi 7$ y $\phi 8$ fueron los fagos que sobresalieron más en la prueba de velocidad de lisis.

Entonces, en un tubo de 1.5 mL se agregaron 20 μ L de una dilución 10^{-9} de cada fago que correspondiera en el cóctel, 25 μ L de *V. parahaemolyticus* logarítmica, y 1 mL de agarosa suave. Se vertió esta mezcla sobre la caja, se permitió que solidificara y se incubó toda la noche a 37C. Tras esto, se leyeron las cajas. Cada caja pudo tener cuatro resultados posibles: lisis casi completa; placas contables; no-infectividad; o inducción de lisogenia.

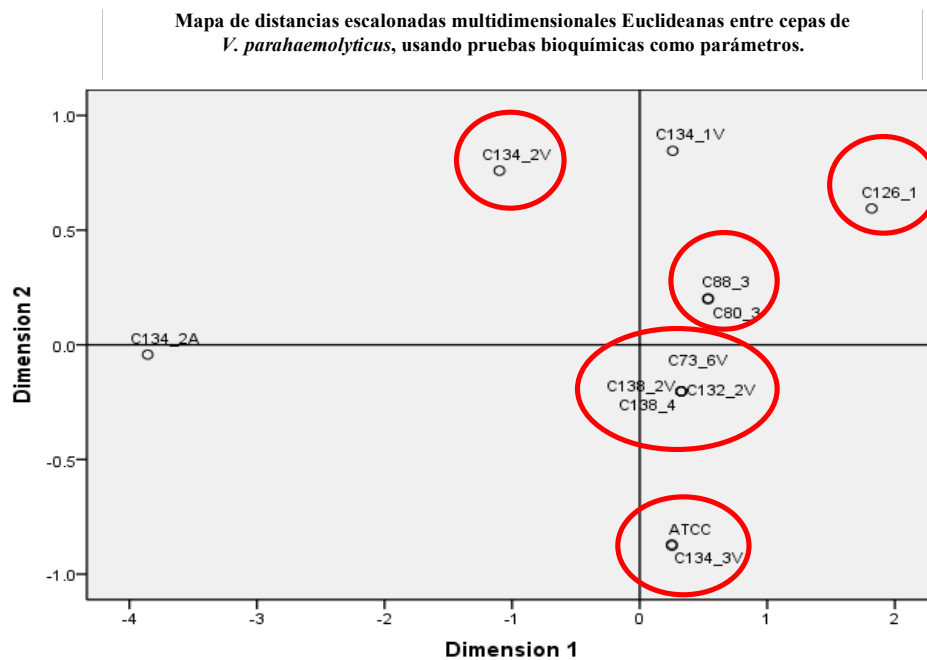
De las cajas con lisis casi completa y las cajas con placas contables, se obtuvieron valores de porcentaje de lisis, dibujando cuadrantes sobre las fotografías de las cajas. En cada cuadrante se discernió si había más lisis que bacteria, marcándolo como lisado o no. La suma total de los cuadrantes lisados se calculó como porcentaje de lisis en esa placa. Todas las recetas de medios y soluciones utilizadas se encuentran en el Anexo 5.

VI. RESULTADOS

A. ANÁLISIS DE EPIDEMIOLOGÍA BIOQUÍMICA DE CEPAS DE *Vibrio parahaemolyticus*

El análisis de las diferencias entre los aislados de *V. parahaemolyticus* se realizó a partir de las puntuaciones que estas obtuvieron en una tira de API20E®. Los resultados de cada prueba se utilizaron para calcular un mapa de cercanía bioquímica entre los aislados, a manera de determinar si constituían o no una cepa distinta de los demás aislados. Este se calculó a través de SPSS 18.0, para Windows. El mapa se visualiza en la Figura 4, en el mismo se puede ver como hay cinco grupos de cepas de *V. parahaemolyticus* (la cepa C134_2A es *V. cholerae* y la cepa C134_1V es *V. vulnificus*; utilizadas como «outgroup»), marcados por círculos en el mapa.

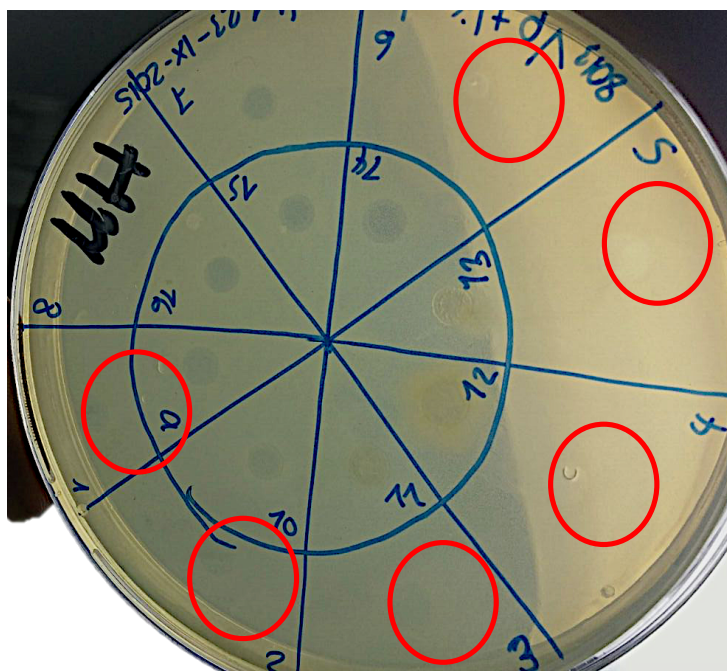
Figura 4. Mapa de distancias escalonadas multidimensionales Euclidianas entre cepas de *V. parahaemolyticus*, usando pruebas bioquímicas como parámetros.



B. ENRIQUECIMIENTO DE BACTERIÓFAGOS A PARTIR DE MUESTRAS DE AGUA.

El enriquecimiento de bacteriófagos se comprobó con una prueba de puntos sobre la cepa 80/3 y la cepa ATCC 17802. A partir de estas primeras pruebas, se determinó con qué mezclas de enriquecimientos para bacteriófagos se trabajaría el resto de los experimentos. Así pues, se descartaron los fagos $\phi 10$, $\phi 11$, $\phi 12$, $\phi 13$, $\phi 17$, $\phi 18$, $\phi 19$ y $\phi 20$; además de los fagos ϕb , ϕc , ϕd , ϕe , ϕg , ϕh , ϕi , ϕj , ϕk , ϕl , ϕm , ϕn , $\phi ñ$, ϕo , ϕp , ϕq , ϕr y ϕs .

Figura 5. Prueba de puntos de bacteriófagos sobre la cepa 80/3. Fotografía del autor. Los $\phi 1$, $\phi 2$, $\phi 3$, $\phi 4$, $\phi 5$ y $\phi 6$ fueron señalados para facilitar su visualización.



Estas descalificaciones se debieron ya fuera a contaminación en los enriquecimientos (se puede ver en la Figura 5, en los fagos $\phi 10$, $\phi 11$, $\phi 12$ y $\phi 13$) o por falta de lisis (el caso

del resto de los enriquecimientos realizados). La significancia de trabajar con la cepa 80/3 es que la misma se aisló de hemolinfa de un camarón, por lo que se sabe que esta cepa en específico es capaz de colonizar el hepatopáncreas de un camarón.

C. CUANTIFICACIÓN DE BACTERIÓFAGOS AISLADOS

La cuantificación de los bacteriófagos se obtuvo a partir de los resultados de las pruebas de agar suave, en diluciones seriadas desde 10^{-1} hasta 10^{-9} . Las concentraciones se basan en los resultados en las cajas sembradas con ATCC 17802. Se pueden ver en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Títulos de los catorce bacteriófagos aislados, medidos en ATCC 17802, en triplicado.

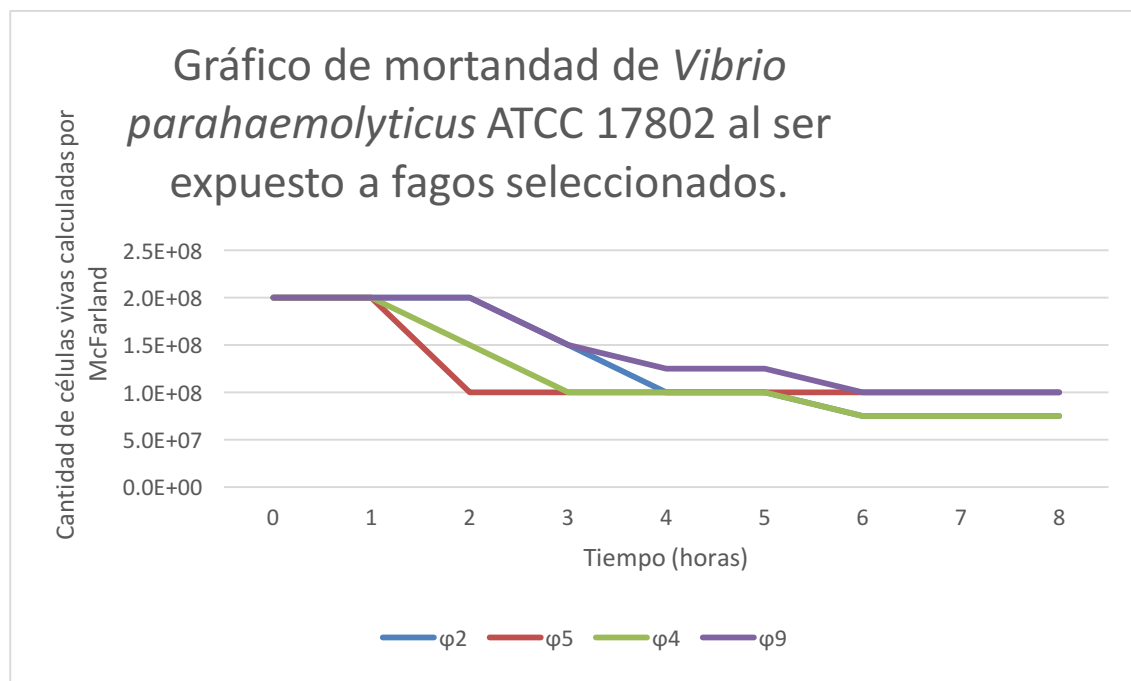
BACTERIÓFAGO	TÍTULO PROMEDIO (*10 ⁹ PFU/ML)	INCERTIDUMBRE/ DESVIACIÓN ESTÁNDAR (*10 ⁹ PFU/ML)
φ1	102.7	±22.1
φ2	36.7	±6.42
φ3	81.0	±7.21
φ4	58.0	±5.57
φ5	43.3	±7.77
φ6	35.7	±3.51
φ7	86.3	±2.08
φ8	74.0	±7.21
φ9	25.7	±4.16
φ14	29.0	±6.24
φ15	44.3	±4.04
φ16	36.7	±3.21
φA	104.0	±10.6
φF	43.7	±13.06

D. ANÁLISIS DE VELOCIDAD DE LISIS POR BACTERIÓFAGOS.

La velocidad de lisis de bacteriófagos es una serie de datos que se obtuvo junto con la metodología para el aumento de título de cada bacteriófago. En la Figura 6, se pueden observar una curva de mortandad de *Vibrio parahaemolyticus* ATCC 17802 al ser expuesta a distintos bacteriófagos por un periodo de ocho horas. Lo que se observa en esta Figura es el comportamiento de varios de los fagos probados.

Una de las cosas que más sobresaltan es que la mayoría de fagos dejaron de tener un comportamiento lítico cuando las poblaciones bacterianas llegaron a $1.0 \cdot 10^8$ células. Claro, hay excepciones contadas, como el $\phi 4$, que logró eliminar células hasta que llegó la población a $0.5 \cdot 10^8$ células. El comportamiento del resto de los fagos se observa en el Cuadro 3.

Figura 6. Gráfico de mortandad de *V. parahaemolyticus* ATCC 17802 al ser expuesto a fagos seleccionados, medido en cantidad de células según McFarland contra el tiempo.



En el Cuadro 3, se pueden observar los valores de densidad óptica (OD, siglas en inglés), según estándares de McFarland, finales de los doce bacteriófagos con los que se realizó el análisis de velocidad de lisis. Es crucial entender que al inicio de este experimento, todos los cultivos se iniciaron con un McFarland de 4.0. Los valores de turbidez son significativamente menores en los cultivos que se realizaron con la cepa ATCC 17802 que aquellos encontrados tras ocho horas en cultivos en la cepa salvaje 80/3, aislada de hemolinfa de camarones.

A su vez, también se realizó una prueba Wilcoxon de rangos con signos para comprobar que los juegos de datos son diferentes entre sí y que hay una diferencia estadística entre la densidad óptica final de la prueba de velocidad de lisis realizada con la cepa 80/3 y la cepa ATCC 17802. Esta prueba tuvo un estadístico de prueba 1 y un valor crítico de 13. Dado que $13 > 1$, se puede rechazar la hipótesis nula y se puede decir que los valores de densidad óptica son significativamente distintos entre sí.

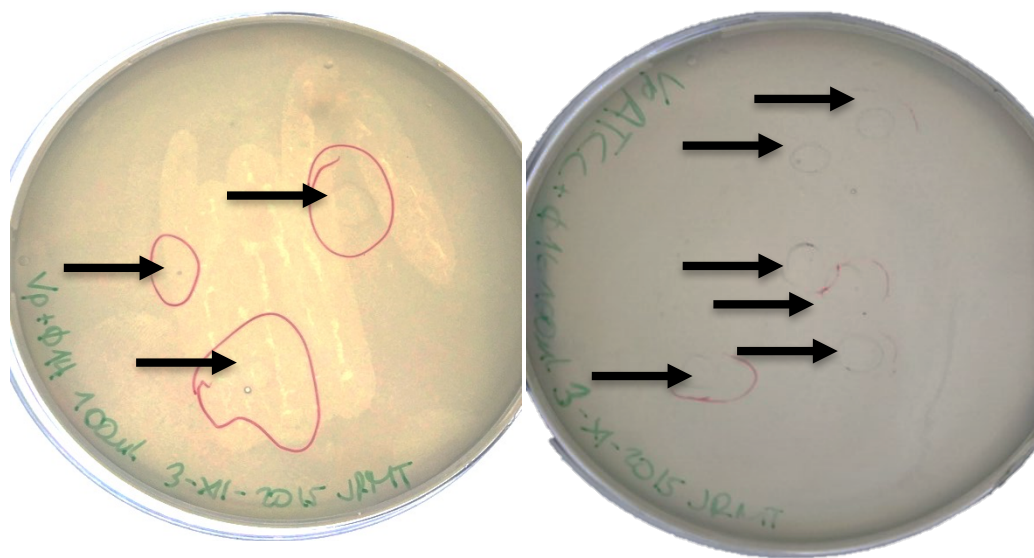
Cuadro 3. Valores de McFarland finales del análisis de velocidad de lisis de dos cepas de *V. parahaemolyticus* (ATCC 17802 y 80/3) tratadas con bacteriófagos.

Fago Cepa	Valor de McFarland final	
	80/3	ATCC 17802
Φ1	3	2
Φ2	3	1.5
Φ3	3	2
Φ4	3	1.5
Φ5	2.5	2
Φ6	2.5	1.5
Φ7	2	2
Φ8	2.5	1.5
Φ9	3	2
Φ14	3	2
Φ15	3	2
Φ16	3	2

E. ANÁLISIS DE INDUCCIÓN DE LISOGENIA.

La inducción de lisogenia en los bacteriófagos aislados se realizó imitando una de las condiciones ambientales que pueden cambiar fácilmente en los estanques de las camaroneras: la temperatura. Durante una prueba de agar suave con catorce fagos, normalmente incubados a 37°C, se apagó la incubadora tras alrededor de seis horas de incubación. Esto permitió que la incubadora llegara a temperatura ambiente. En la Figura 7 se muestran las cajas que presentaron una inducción de lisogenia, en forma de la producción de halos en lugar de placas. Se encontraron halos en los bacteriófagos $\phi 5$, $\phi 9$, $\phi 14$, $\phi 15$ y $\phi 16$.

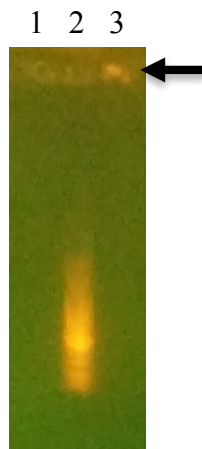
Figura 5. Pruebas de inducción de lisogenia, en fagos $\phi 14$ y $\phi 16$. Halos lisogénicos señalados con flechas para facilitar su visualización, fotografía del autor. (Petri de 100mm)



F. ANÁLISIS DE LA EXTRACCIÓN POR ADNZOL DEL $\phi 1$

El análisis de la extracción del 1 consiste en la lectura del gel presente en la Figura 8. En el mismo se observa la escalera en el pozo 8. En el pozo 9 (réplica de extracción sin tratamiento enzimático), se observa material genético que no logró migrar. Por lo que se puede suponer que consiste en ADN bacteriano. En el pozo 1 se montó la réplica tratada con ADNasa, no se puede observar ninguna banda. Otras cosas que se deben mencionar es que la escalera se ve corrida, lo que puede implicar que la misma ya está vencida.

Figura 6. Gel de agarosa 0.8% de los productos de extracción del $\phi 1$. En el pozo 1 se corrió la extracción previamente tratada con ADNasa, el pozo 2 tiene una escalera de 100pb y el pozo 3 tiene la extracción sin ADNasa (se muestra señalado por una flecha). El gel se tiñó con Gel Red.



G. ANÁLISIS DE PREPARACIÓN DE CÓCTELES DE BACTERIÓFAGOS

Los cócteles se prepararon con los bacteriófagos que se demostraron más líticos en el ensayo de inducción de lisogenia, más dos bacteriófagos elegidos por su alto rendimiento en la prueba de velocidad de lisis, que se probaron solamente entre ellos. En el Cuadro 4, se muestran los porcentajes de lisis bacteriana obtenidos en los ensayos. Los mayores porcentajes de lisis se encuentran en las cepas ATCC 17802 y 80/3 Este ensayo también se realizó con las cepas 126/1, 134/2V, 134/3V y 132/3V, sin obtener resultados más allá de dos cajas lisogénicas y una pequeña cantidad de cajas con muy pocas placas como para contar (≤ 5 placas). Los porcentajes de lisis se obtuvieron haciendo cuadrantes sobre las cajas con placas o lisis, y obteniendo una razón de los conteos totales de estos en cuanto a la eficiencia de la infección viral en esa caja.

Cuadro 4. Porcentaje de lisis bacteriana obtenido con cada cóctel en las cepas trabajadas.

Cóctel (Composición del cóctel)	80/3	ATCC 17802	126/1	134/2	134/3	132/3
I* ($\phi 1 \phi 3 \phi 6 \phi a$)	79.92%	67.64%	0%	L	0%	0%
II ($\phi 1 \phi 3 \phi 6$)	29.74%	0.07%	0%	0%	1.25%	0%
III ($\phi 1 \phi 3$)	53.57%	0.78%	0%	0%	0%	0%
IV* ($\phi 1 \phi 6 \phi a$)	52.21%	66.40%	0%	0.39%	L	0%
V ($\phi 1 \phi 6$)	42.61%	33.22%	0%	0%	0%	0%
VI ($\phi 1 \phi a$)	3.57%	68.65%	0%	0%	0.83%	0%
VII ($\phi 3 \phi 6 \phi a$)	52.83%	47.22%	0%	0.79%	2.08%	0%
VIII ($\phi 3 \phi 6$)	21.51%	15.15%	0%	1.98%	0%	0%
IX ($\phi 3 \phi a$)	48.08%	60.08%	0%	0.35%	0%	0%
X ($\phi 6 \phi a$)	70.17%	66.66%	0%	0%	0.37%	0%
XI ($\phi 7 \phi 8$)	36.51%	0.79%	0%	0%	0%	0%

*Indujo lisogenia en una de las cepas probadas, denotado en el cuadro por una (L).

VII. ANÁLISIS DE RESULTADOS

El principal objetivo de este trabajo fue desarrollar un tratamiento de cóctel de bacteriófagos para controlar infecciones de *V. parahaemolyticus* que dañan los cultivos de camarón. Se probaron once cócteles (v. Cuadro 4), solamente se usaron seis bacteriófagos de los catorce aislados originalmente, dado que las pruebas de caracterización se usaron para descartar bacteriófagos que indujeran lisogenia o tuvieran muy poco efecto lítico. La caracterización también dio indicios acerca de la composición de los virus.

Una de las etapas más importantes de la caracterización fue la extracción que se realizó del fago $\phi 1$. Esta extracción solo se realizó en el $\phi 1$ por ser este el fago que presentó mayor poder lítico y que logró formar placas durante la prueba de inducción de lisogenia (cabe mencionar que cuando se mezcló con otros bacteriófagos sí indujo lisogenia en dos cepas; sin embargo esto no ocurrió en la prueba de inducción de lisogenia donde se probó el bacteriófago por sí solo).

Los resultados de esta extracción se ven en la Figura 9. En el gel solo se puede ver el ADN bacteriano que no fue digerido por ADNasas en el pozo 3, que no corrió, además de la escalera. El carril 1 fue resaltado porque es en este carril en el que se esperaba ver una banda de ADN viral. Tanto en el carril 1 como en el carril 3 no se observa ninguna banda que denote un genoma viral. Lo anterior indica que el fago $\phi 1$ está constituido de ARN, no ADN, o bien la extracción produjo tan poco ADN que este no fue visible en el gel.

Esta sospecha se necesita confirmar con una extracción adecuada que permita ver los ácidos nucleicos relevantes. La caracterización también debe completarse con una secuenciación del genoma viral y con una micrografía electrónica que permita ver la conformación de las proteínas estructurales. No obstante, la falta de una caracterización completa no cohibió el diseño de los cócteles.

La manera como se diseñaron los cócteles dependió de las pruebas de velocidad (v. Figura 7; Cuadro 3) y la prueba de inducción de lisogenia (v. Figura 8). La prueba de inducción de lisogenia sirvió como criterio de selección de dos maneras: dictó cuáles bacteriófagos no se deberían escoger por su propensión a inducir lisogenia ante cambios ambientales y asimismo mostró qué bacteriófagos se deberían escoger por su capacidad de lisar bacterias, a pesar de los cambios ambientales, a los que fueron sujetos los fagos en la prueba de inducción de lisogenia.

A partir de esto, se descartaron los fagos $\phi 5$, $\phi 9$, $\phi 14$, $\phi 15$ y $\phi 16$; se seleccionaron para cócteles los fagos $\phi 1$, $\phi 3$, $\phi 6$ y ϕa . Los restantes cinco fagos fueron seleccionados o descartados por su rendimiento en la prueba de velocidad. Los fagos $\phi 7$ y $\phi 8$ fueron los bacteriófagos que lograron disminuir la turbidez del cultivo logarítmico de *V. parahaemolyticus* durante las ocho horas de lectura (el $\phi 7$ teniendo una turbidez de McFarland 2 en ATTC 17802 y de 2 en 80/3; el $\phi 8$ con 1.5 y 2.5, respectivamente). Esto conllevó a que se seleccionaran estos dos fagos para un cóctel, y se descartaran los fagos $\phi 2$ y $\phi 4$.

Con respecto a la prueba de cócteles, esta se debe interpretar junto con los resultados de la agrupación de las cepas de *V. parahaemolyticus*. De los cinco grupos de cepas de *V. parahaemolyticus*, solo uno fue susceptible al tratamiento con los cócteles (excluyendo el control proveniente del uso de la cepa ATCC 17802). Esto indica que cualquiera de los cócteles propuestos solo sería efectivo en un quinto de las cepas que están reconocidas.

La cepa 80/3 proviene de hemolinfa de camarones enfermos, mientras que las otras cepas provienen de muestras de agua o sedimento de los estanques de la camaronera. Esto podría tomarse como un indicador del comportamiento de esta cepa en particular. Si se pretende tomar acción preventiva contra el Síndrome de Muerte Temprana en

Camarón, es necesario controlar las poblaciones de aquellas cepas más proclives a colonizar al camarón, como lo es la cepa 80/3.

Esta es otra razón por la que se considera exitosa la prueba de diseño de cócteles, dado que cócteles como el III, V y XI, no tuvieron efecto sobre ninguna otra cepa que no fuera la ATCC 17802, o la 80/3. Así también hubo cócteles sujetos a descartarse, ya fuera porque afectaron muchas cepas, o porque indujeron lisogenia en alguna prueba. Los cócteles I y IV, a pesar de tener una gran capacidad lítica, causaron lisogenia en cepas que no debieron haber afectado.

En este punto es importante hacer una aclaración, en tanto que se esperaba que los fagos lisaran la cepa ATCC 17802 porque las fases de enriquecimiento posterior al aislamiento utilizando cepas aleatorias se realizó en esta cepa. Se esperaba que los cócteles fueran líticos en la cepa 80/3 por su capacidad ya comprobada de colonizar hepatopáncreas del camarón, sin embargo, no se buscaba que fueran líticos o inclusive infecciosos en otras cepas, a manera de evitar el contagio con cepas silvestres que constituyen el biofilm del fondo de los estanques.

La inducción de lisogenia es una señal de alerta en cuestiones del diseño de cócteles de bacteriófagos. Esto se debe a que este mecanismo de replicación viral no solo, no causa la muerte del hospedero, sino también puede cambiar la expresión proteica del mismo. En casos como este, la lisogenia pudiera significar que esta cepa podría entonces ser capaz de traspasar genes por estos fagos (haciendo más fácil la adquisición de patogénesis) o bien, promover la selección de resistencia a los fagos.

Los cócteles fueron efectivos contra dos de los seis grupos de cepas que se probaron: ATCC 17802 y 80/3; sin embargo, en ninguno se logró una lisis mayor al 80% (el mayor porcentaje de lisis, 79.92%, se logró en la cepa 80/3, con el cóctel I). El alto porcentaje de lisis obtenida, sin llegar a ser completa, logra cumplir con las expectativas de un cóctel

de bacteriófagos. Esto se debe a que, con un tratamiento como el aquí propuesto, no se busca eliminar completamente del sistema a las bacterias en cuestión; se busca reducir la cantidad poblacional de la bacteria de tal manera que ya no sean un riesgo a la salud del estanque.

Hasta cierto punto, es ventajoso el no eliminar por completo al *V. parahaemolyticus* de los estanques; puesto que se sabe que esta bacteria puede ser comensal del camarón, y puede servir en muchos otros aspectos ecológicos dentro del estanque (Givens *et al.*, 2014). Hasta que se conozcan todas las funciones que esta bacteria tiene en el ecosistema en el que vive, no conviene tomar la decisión de eliminarla totalmente.

De igual manera, se necesita profundizar el conocimiento sobre los bacteriófagos aislados, así como el rol de *V. parahaemolyticus* en la EMS en las camaroneras locales, antes de considerar el uso de uno de los cócteles aquí propuestos en los estanques con camarones. No obstante, se debe tomar en cuenta que los cócteles diseñados y propuestos tienen un gran valor como potencial terapia a un estanque enfermo, y profilaxis de estanques aledaños a estanques enfermos, debido a su poder lítico contra bacterias aisladas de camarones enfermos.

Otros cócteles como el II, VII y el VIII, no se consideran apropiados por tener poder lítico sobre otras cepas. Este poder lítico (por mínimo que sea) implica que sería más fácil que estas cepas seleccionen resistencia sobre los cócteles y la compartan con otras cepas susceptibles por medio de transferencia horizontal de genes (algo muy común entre bacterias que producen biofilms, como *V. parahaemolyticus*).

De esto se concluye que los cócteles III, V y XI (producidos a partir de los fagos $\phi 1$, $\phi 3$, $\phi 6$, $\phi 7$ y $\phi 8$) necesitan ser estudiados más a fondo. Estos estudios deben incluir estudios moleculares como lo son la secuenciación de sus genomas y microscopía electrónica. Sin embargo, en términos más prácticos, estos fagos deben de probarse en

una prueba *in vivo* en una pecera con camarones y *V. parahaemolyticus* para comprobar si el enriquecimiento de los bacteriófagos permite que estos ejerzan un cambio sustancial en las poblaciones de la bacteria, protegiendo al camarón de la enfermedad.

VIII. CONCLUSIONES

1. Los cócteles de bacteriófagos III, V y XI lograron lisar los cultivos de *V. parahaemolyticus* provenientes de hemolinfa de camarón, sin mayores efectos sobre las cepas silvestres.
2. Fue posible aislar bacteriófagos para *V. parahaemolyticus*, tanto de agua de estanques de camarones, como de agua de mar.
3. Hay al menos cinco grupos de cepas de *V. parahaemolyticus* en los estanques de la camaronera muestreada
4. El genoma del bacteriófago $\phi 1$ no pareciera ser de ADN, pero se necesita confirmar esta sospecha.

IX. RECOMENDACIONES

1. Realizar un estudio longitudinal de todo un año sobre las poblaciones bacterianas del género *Vibrio*, encontradas en las camarónicas, a manera de conocer las fluctuaciones genéticas que se dan conforme el paso del tiempo
2. Comprobar la patogenicidad en camarón de las cepas de *Vibrio parahaemolyticus* encontradas por medio de pruebas moleculares (como PCR).
3. Se debe profundizar la caracterización de los bacteriófagos $\phi 1$, $\phi 3$, $\phi 6$, $\phi 7$ y $\phi 8$, a manera de conocer su fisiología, su mecanismo de acción y su genoma.

X. BIBLIOGRAFÍA

- Alanis Villa, A. (2014). *Rapid detection of Vibrio parahaemolyticus using bacteriophage and real time PCR*. Thesis presented to the University of Guelph, MSc in Food Science. Guelph, Ontario, Canada.
- Baluyut, E. A. (1989). *Aquaculture Systems and Practices: A Selected Review*. Rome: FAO. Obtenido de <http://www.fao.org/docrep/t8598e/t8598e00.htm#Contents>
- Böer, S. I., Heinemeyer, E.-A., Luden, K., Erler, R., Gerds, G., Janssen, F., & Brennholt, N. (2013). Temporal and spatial distribution patterns of potentially pathogenic *Vibrio* spp. at recreational beaches of the German north sea. *Microbial Ecology*, 65(4), 1052–1067. doi:10.1007/s00248-013-0221-4
- CDC. (2013). *Vibrio parahaemolyticus*. Retrieved May 13, 2015, from <http://www.cdc.gov/vibrio/vibriop.html>
- Chaichalearmmongkol, N., & Jargon, J. (2013, July 12). Disease Kills Shrimp Output, Pushes U.S. Prices Higher. *The Wall Street Journal*. Obtenido de <http://www.wsj.com/articles/SB10001424127887323998604578565201120674008>
- Comisión de Pesca y Acuicultura de Agexport. (2013). Empresas Productoras de Camarón en Guatemala. Obtenido de <http://www.pescaenguatemala.com/directorio/camaron/>
- FAO. (2013). *National Aquaculture Sector Overview: Guatemala*. Obtenido de http://www.fao.org/fishery/countrysector/naso_guatemala/en
- Gill, J. J., Pacan, J. C., Carson, M. E., Leslie, K. E., Griffiths, M. W., & Sabour, P. M. (2006). Efficacy and pharmacokinetics of bacteriophage therapy in treatment of subclinical *Staphylococcus aureus* mastitis in lactating dairy cattle. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50(9), 2912–8. doi:10.1128/AAC.01630-05
- Givens, C. E., Bowers, J. C., DePaola, A., Hollibaugh, J. T., & Jones, J. L. (2014). Occurrence and distribution of *Vibrio vulnificus* and *Vibrio parahaemolyticus*--potential roles for fish, oyster, sediment and water. *Letters in Applied Microbiology*, 58(6), 503–10. doi:10.1111/lam.12226

- Hanlon, G. W. (2007). Bacteriophages: an appraisal of their role in the treatment of bacterial infections. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 30(2), 118–28. doi:10.1016/j.ijantimicag.2007.04.006
- index Mundi. (2015). Shrimp- Monthly Price. Retrieved May 13, 2015, from <http://www.indexmundi.com/commodities/?commodity=shrimp&months=60>
- Jones, J. L., Lüdeke, C. H. M., Bowers, J. C., Garrett, N., Fischer, M., Parsons, M. B., ... DePaola, A. (2012). Biochemical, serological, and virulence characterization of clinical and oyster *Vibrio parahaemolyticus* isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 50(7), 2343–2352. doi:10.1128/JCM.00196-12
- Jory, D. (2014). Status , Issues and Perspectives of the Global Shrimp Farming Industry : In *Indiana Indoor Shrimp Production: Brainstorming Session* (p. 104).
- Lucas, J. S., & Southgate, P. C. (2012). *Aquaculture: Farming Aquatic Animals and Plants*. Nueva York, EEUU: Jon Wiley & Sons.
- Matsuzaki, S., Rashel, M., Uchiyama, J., Sakurai, S., Ujihara, T., Kuroda, M., ... Imai, S. (2005). Bacteriophage therapy: A revitalized therapy against bacterial infectious diseases. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 11(5), 211–219. doi:10.1007/s10156-005-0408-9
- McCarter, L. (1999). The multiple identities of *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 1(1), 51–57.
- Nakai, T., & Park, S. C. (2002). Bacteriophage therapy of infectious diseases in aquaculture. *Research in Microbiology*, 153(1), 13–18. doi:10.1016/S0923-2508(01)01280-3
- Nunan, L., Lightner, D., Pantoja, C., & Gomez-Jimenez, S. (2014). Detection of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in Mexico. *Diseases of Aquatic Organisms*, 111(1), 81–6. doi:10.3354/dao02776
- Payne, R. J. H., & Jansen, V. a a. (2003). Pharmacokinetic principles of bacteriophage therapy. *Clinical Pharmacokinetics*, 42(4), 315–25. doi:10.2165/00003088-200342040-00002

- van Tuest, R. & Kropinski, A. M. (2009) Bacteriophage Enrichment from Water and Soil. Chapter 2 *En:* Martha RJ Clockie, Andrew M. Kropinski (eds). *Bacteriophages: Methods and Protocols, volumen 1: isolation, characterization and interactions vol 502*. Humana Press, SpringerScience + Business Media. DOI 10.1007/978-1-60327-164-6_2 Springer Protocols.com
- Roque, A., Abad, S., Betancourt-Lozano, M., de la Parra, L. M. G., Baird, D., Guerra-Flores, A. L., & Gomez-Gil, B. (2005). Evaluation of the susceptibility of the cultured shrimp *Litopenaeus vannamei* to vibriosis when orally exposed to the insecticide methyl parathion. *Chemosphere*, 60(1), 126–34. doi:10.1016/j.chemosphere.2005.01.008
- Rosenberry, B. (2014a, March 14). Update on Shrimp Farming in Latin America: Shrimp News Interviews Neil Gervais. *Shrimp News*. Obtenido de <http://www.shrimpnews.com/FreeReportsFolder/NewsReportsFolder/LatinAmericaNeilGervaisIntervie.html>
- Rosenberry, B. (2014b, August 29). Acuamaya Shrimp News Interviews Alexander deBeausset. *Shrimp News*. Obtenido de <http://www.shrimpnews.com/FreeReportsFolder/FarmReportsFolder/Acuamaya.html>
- Skurnik, M., & Strauch, E. (2006). Phage therapy: facts and fiction. *International Journal of Medical Microbiology : IJMM*, 296(1), 5–14. doi:10.1016/j.ijmm.2005.09.002
- Sulakvelidze, a., Alavidze, Z., & Morris, J. G. (2001). Bacteriophage therapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(3), 649–659. doi:10.1128/AAC.45.3.649
- Thompson, C. C., Thompson, F. L., Vicente, A. C. P., & Swings, J. (2007). Phylogenetic analysis of vibrios and related species by means of atpA gene sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57(11), 2480–2484. doi:10.1099/ijs.0.65223-0
- Tran, L. H. (2013). Determination, Characterization, and Control Measures of the Agent Causing Early Mortality Syndrome (EMS) also known as Acute Hepatopancreatic Necrosis Syndrome (AHPNS) in Farmed Penaeid Shrimp. The University of

- Arizona. Obtenido de
<http://arizona.openrepository.com/arizona/handle/10150/312656>
- Tran, L., Nunan, L., Redman, R. M., Mohney, L. L., Pantoja, C. R., Fitzsimmons, K., & Lightner, D. V. (2013). Determination of the infectious nature of the agent of acute hepatopancreatic necrosis syndrome affecting penaeid shrimp. *Diseases of Aquatic Organisms*, 105(1), 45–55. doi:10.3354/dao02621
- Venkateswara-Rao, A. (1998). *Vibriosis in Shrimp Aquaculture*. Andhra Pradesh, India.
- Whittaker, M. (2014, October 23). With EMS here to stay, shrimp farmers must learn to cope. *Undercurrent News*. Obtenido de
<http://www.undercurrentnews.com/2014/10/23/with-ems-here-to-stay-shrimp-farmers-must-learn-to-cope/>
- Whittaker, M. (2015, May 8). Central American shrimp deaths on the rise, but no official link to EMS. *Undercurrent News*. Obtenido de
<http://www.undercurrentnews.com/2015/05/08/central-american-shrimp-deaths-on-the-rise-but-no-official-link-to-ems/>
- Wright, A., Hawkins, C. H., Änggard, E. E., & Harper, D. R. (2009). A controlled clinical trial of a therapeutic bacteriophage preparation in chronic otitis due to antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*; a preliminary report of efficacy. *Clin. Otolaryngol.*, 34, 349–357.
- Yeung, P. S. M., & Boor, K. J. (2004). Epidemiology, pathogenesis, and prevention of foodborne *Vibrio parahaemolyticus* infections. *Foodborne Pathogens and Disease*, 1(2), 74–88. doi:10.1089/153531404323143594
- Yoshida, T., Takashima, Y., Tomaru, Y., Shirai, Y., Takao, Y., Hiroishi, S., & Nagasaki, K. (2006). Isolation and characterization of a cyanophage infecting the toxic cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(2), 1239–47. doi:10.1128/AEM.72.2.1239-1247.2006
- Yoshida-Takashima, Y., Yoshida, M., Ogata, H., Nagasaki, K., Hiroishi, S., & Yoshida, T. (2012). Cyanophage infection in the bloom-forming cyanobacteria *Microcystis aeruginosa* in surface freshwater. *Microbes and Environments / JSME*, 27(4), 350–5.

Obtenido de
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4103541&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

Zorriehzahra, M. J., & Banaederakhshan, R. (2014). Early Mortality Syndrome (EMS) as new Emerging Threat in Shrimp Industry. *Advances in Animal and Veterinary Sciences*, 3(2). doi:10.1056/NEJMra1313875

XI. ANEXOS

1. Información obtenida con SPSS para la agrupación de cepas.

```
ALSCAL
  VARIABLES CEPAS =C88_3 C134_1V C134_2A C126_3 C138_6V C138_1V
C138_2V C138_4 C138_5V C73_CV C80_3
  /SHAPE=SYMMETRIC
  /LEVEL=ORDINAL
  /CONDITION=MATRIX
  /MODEL=EUCLID
  /CRITERIA=CONVERGE(0.001) STRESSMIN(0.005) ITER(30) CUTOFF(0)
DIMENS(2,2)
  /PLOT=DEFAULT ALL
  /PRINT=DATA HEADER.
```

```
VARIABLES
  ON   O   C   V   S   A   A
PG   DC  IT  P  AC  MY  RA
```

Alscal Procedure Options

Data Options-

```
Number of Rows (Observations/Matrix). 11
Number of Columns (Variables) . . . 11
Number of Matrices . . . . . 7
Measurement Level . . . . . Ordinal
Data Matrix Shape . . . . . Symmetric
Type . . . . . Dissimilarity
Approach to Ties . . . . . Leave Tied
Conditionality . . . . . Matrix
Data Cutoff at . . . . . .000000
```

Model Options-

```
Model . . . . . Euclid
Maximum Dimensionality . . . . . 2
Minimum Dimensionality . . . . . 2
```


11 .000

Raw (unscaled) Data for Subject 4

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	.000									
2	.000	.000								
3	6.111	6.111	.000							
4	.000	.000	6.111	.000						
5	.000	.000	6.111	.000	.000					
6	6.111	6.111	.000	6.111	6.111	.000				
7	.000	.000	6.111	.000	.000	6.111	.000			
8	.000	.000	6.111	.000	.000	6.111	.000	.000		
9	.000	.000	6.111	.000	.000	6.111	.000	.000	.000	
.000										
10	.000	.000	6.111	.000	.000	6.111	.000	.000	.000	
.000	.000									
11	.000	.000	6.111	.000	.000	6.111	.000	.000	.000	
.000	.000									

11

11 .000

Raw (unscaled) Data for Subject 5

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	.000									
2	.000	.000								
3	6.111	6.111	.000							
4	.000	.000	6.111	.000						
5	.000	.000	6.111	.000	.000					
6	6.111	6.111	.000	6.111	6.111	.000				
7	.000	.000	6.111	.000	.000	6.111	.000			
8	.000	.000	6.111	.000	.000	6.111	.000	.000		

.000	9	.000	.000	6.111	.000	.000	6.111	.000	.000
.000	10	.000	.000	6.111	.000	.000	6.111	.000	.000
.000	11	.000	.000	6.111	.000	.000	6.111	.000	.000

11

11 .000

Raw (unscaled) Data for Subject 6

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	.000									
2	.000	.000								
3	3.667	3.667	.000							
4	.000	.000	3.667	.000						
5	3.667	3.667	.000	3.667	.000					
6	.000	.000	3.667	.000	3.667	.000				
7	3.667	3.667	.000	3.667	.000	3.667	.000			
8	3.667	3.667	.000	3.667	.000	3.667	.000	.000		
9	3.667	3.667	.000	3.667	.000	3.667	.000	.000	.000	
10	3.667	3.667	.000	3.667	.000	3.667	.000	.000	.000	.000
11	.000	.000	3.667	.000	3.667	.000	3.667	.000	3.667	3.667

11

11 .000

Raw (unscaled) Data for Subject 7

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
--	---	---	---	---	---	---	---	---	---	----

	1	.000							
	2	.000	.000						
	3	6.111	6.111	.000					
	4	.000	.000	6.111	.000				
	5	6.111	6.111	.000	6.111	.000			
	6	.000	.000	6.111	.000	6.111	.000		
	7	.000	.000	6.111	.000	6.111	.000	.000	
	8	.000	.000	6.111	.000	6.111	.000	.000	.000
.000	9	.000	.000	6.111	.000	6.111	.000	.000	.000
.000	10	.000	.000	6.111	.000	6.111	.000	.000	.000
.000	11	.000	.000	6.111	.000	6.111	.000	.000	.000
.000									
	11								
	11	.000							

Iteration history for the 2 dimensional solution (in squared distances)

Young's S-stress formula 1 is used.

Iteration	S-stress	Improvement
0	.62610	
1	.53888	
2	.47723	.06164
3	.46903	.00820
4	.46705	.00198
5	.46665	.00040

Iterations stopped because
S-stress improvement is less than .001000

Stress and squared correlation (RSQ) in distances

(disparities) RSQ values are the proportion of variance of the scaled data

in the partition (row, matrix, or entire data) which
is accounted for by their corresponding distances.

Stress values are Kruskal's stress formula 1.

Matrix	Matrix Stress	Stress	RSQ	Matrix	Stress	RSQ	Matrix	Stress	RSQ
1	.379	.411	.071	2	.000	1.000	3	.403	.102
4	.214			6	.422	.026	7	.392	.159
5	.379	.214							

Averaged (rms) over matrices
 Stress = .36862 RSQ = .25503

ConFiguration derived in 2 dimensions

Stimulus Coordinates

Dimension

Stimulus Number	Stimulus Name	1	2
1	C88_3	-.6322	1.2496
2	C134_1V	.5039	1.2940
3	C134_2A	2.0175	-.3669
4	C126_3	-.7018	1.1169
5	C138_6V	.9847	-1.1341
6	C138_1V	1.5546	.3609
7	C138_2V	-.6107	1.0102
8	C138_4	-.6146	-1.0572
9	C138_5V	-.6825	-1.0218
10	C73_CV	-.7019	-1.0174
11	C80_3	-1.1171	-.4341

Optimally scaled data (disparities) for subject 1

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	.000									
2	2.373	.000								
3	2.373	1.950	.000							
4	1.950	2.373	2.373	.000						
5	1.950	2.373	2.373	1.950	.000					

	6	1.950	2.373	2.373	1.950	1.950	.000		
	7	1.950	2.373	2.373	1.950	1.950	1.950	.000	
	8	1.950	2.373	2.373	1.950	1.950	1.950	1.950	.000
	9	1.950	2.373	2.373	1.950	1.950	1.950	1.950	1.950
.000									
	10	1.950	2.373	2.373	1.950	1.950	1.950	1.950	1.950
1.950	.000								
	11	1.950	2.373	2.373	1.950	1.950	1.950	1.950	1.950
1.950	1.950								

11

11 .000

Optimally scaled data (disparities) for subject 2

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	1	.000								
	2	2.098	.000							
	3	2.098	2.098	.000						
	4	2.098	2.098	2.098	.000					
	5	2.098	2.098	2.098	2.098	.000				
	6	2.098	2.098	2.098	2.098	2.098	.000			
	7	2.098	2.098	2.098	2.098	2.098	2.098	.000		
	8	2.098	2.098	2.098	2.098	2.098	2.098	2.098	.000	
	9	2.098	2.098	2.098	2.098	2.098	2.098	2.098	2.098	.000
.000										
	10	2.098	2.098	2.098	2.098	2.098	2.098	2.098	2.098	2.098
2.098	.000									
	11	2.098	2.098	2.098	2.098	2.098	2.098	2.098	2.098	2.098
2.098	2.098									

11

11 .000

Optimally scaled data (disparities) for subject 3

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
--	---	---	---	---	---	---	---	---	---	----

1.963	10	2.203	2.203	1.963	2.203	1.963	2.203	1.963	1.963
	.000								
2.203	11	1.963	1.963	2.203	1.963	2.203	1.963	2.203	2.203
	2.203								

11

11 .000

Optimally scaled data (disparities) for subject 7

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	.000									
2	1.876	.000								
3	2.492	2.492	.000							
4	1.876	1.876	2.492	.000						
5	2.492	2.492	1.876	2.492	.000					
6	1.876	1.876	2.492	1.876	2.492	.000				
7	1.876	1.876	2.492	1.876	2.492	1.876	.000			
8	1.876	1.876	2.492	1.876	2.492	1.876	1.876	.000		
9	1.876	1.876	2.492	1.876	2.492	1.876	1.876	1.876	.000	
.000										
1.876	10	1.876	1.876	2.492	1.876	2.492	1.876	1.876	1.876	1.876
	.000									
1.876	11	1.876	1.876	2.492	1.876	2.492	1.876	1.876	1.876	1.876
	1.876									

11

11 .000

1. Fotografías de pruebas de cócteles de resultados obtenidos.

Figura 7. Ensayos de cóctel de bacteriófagos. La cepa A es ATCC 17802, la cepa B es 80/3, salvaje; el número romano denota el número de cóctel.

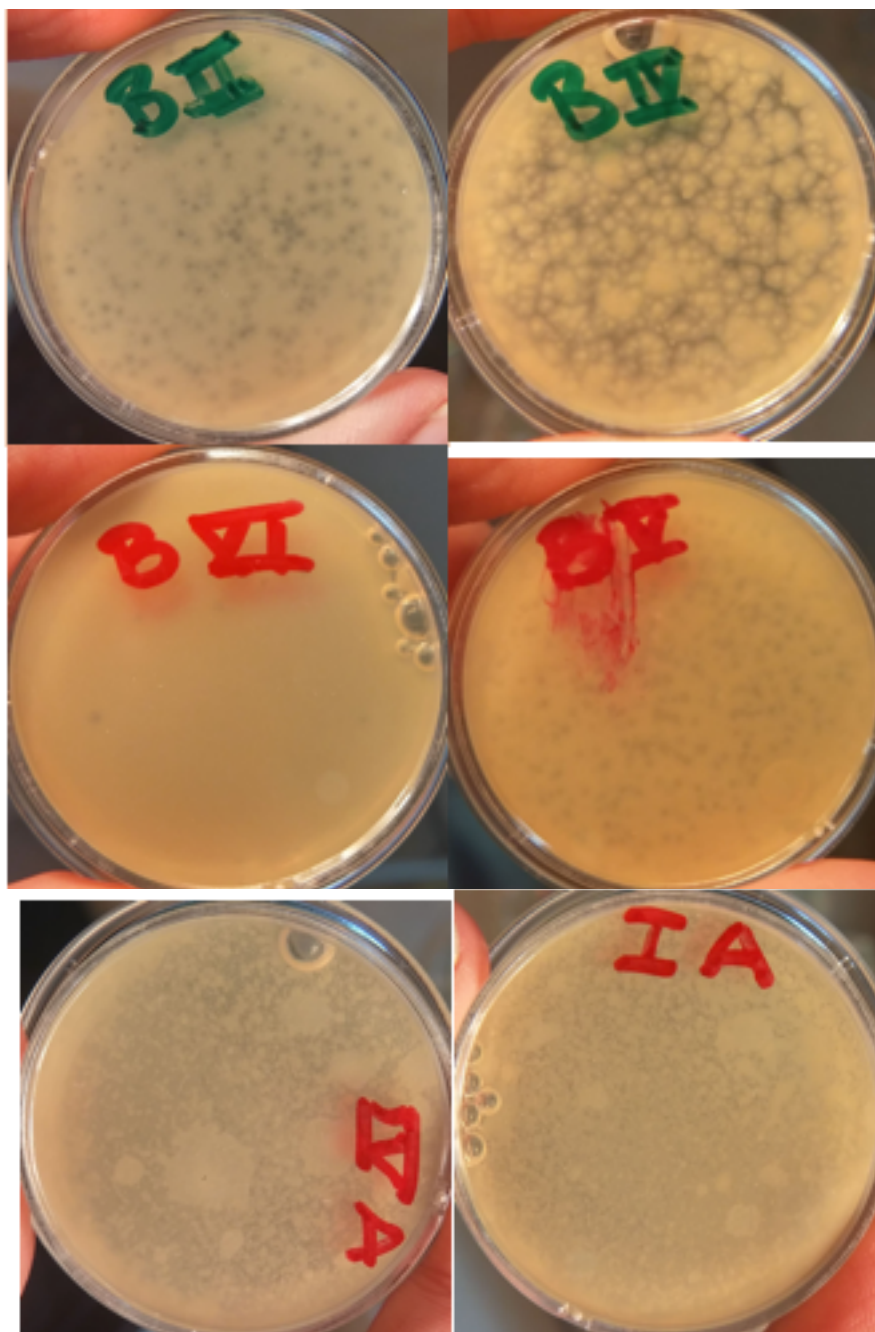


Figura 8. Ensayos de cóctel de bacteriófagos. La cepa A es ATCC 17802, la cepa B es 80/3, salvaje; el número romano denota el número de cóctel.

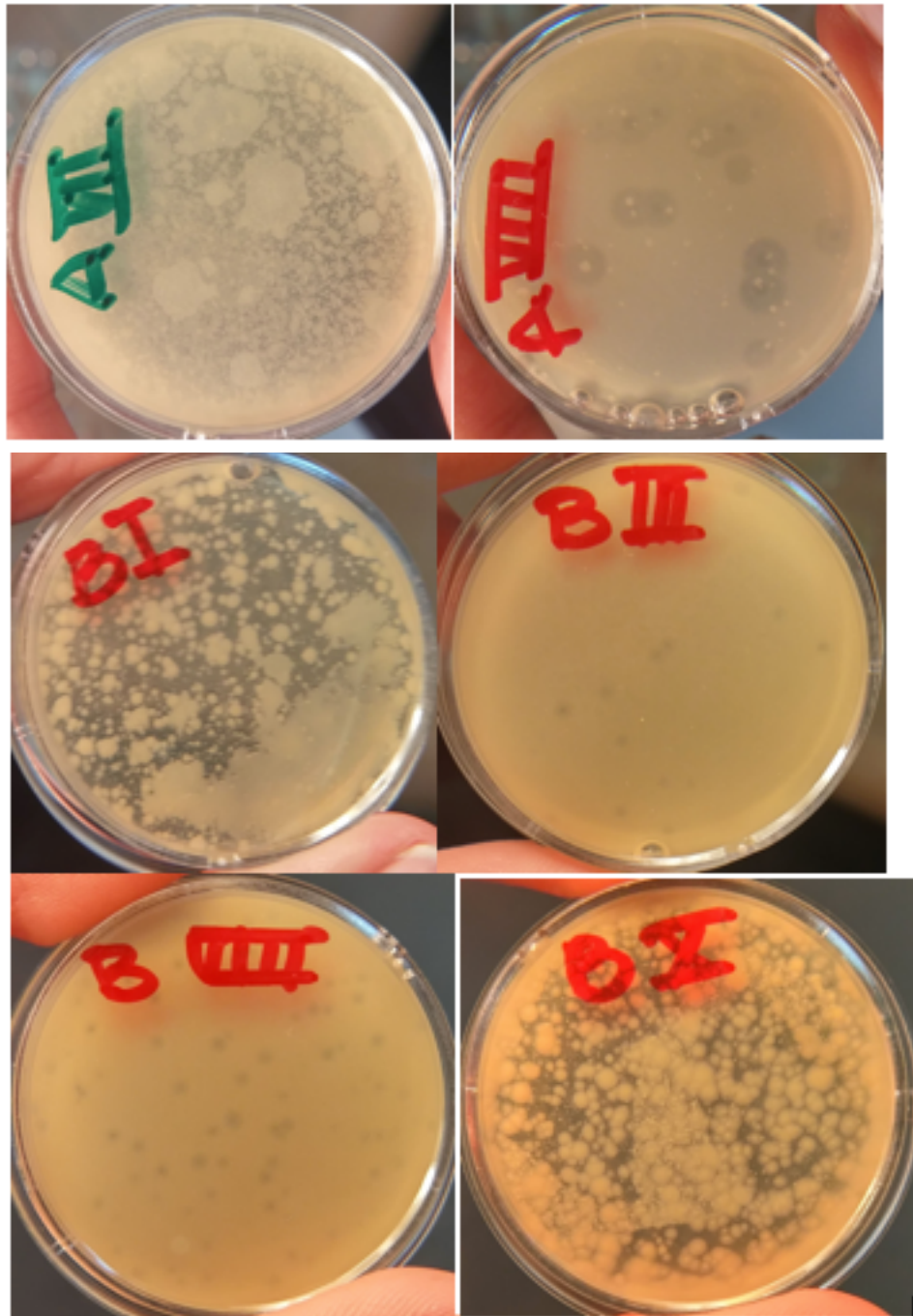


Figura 9. Ensayos de cóctel de bacteriófagos. La cepa A es ATCC 17802, la cepa B es 80/3, salvaje; el número romano denota el número de cóctel.

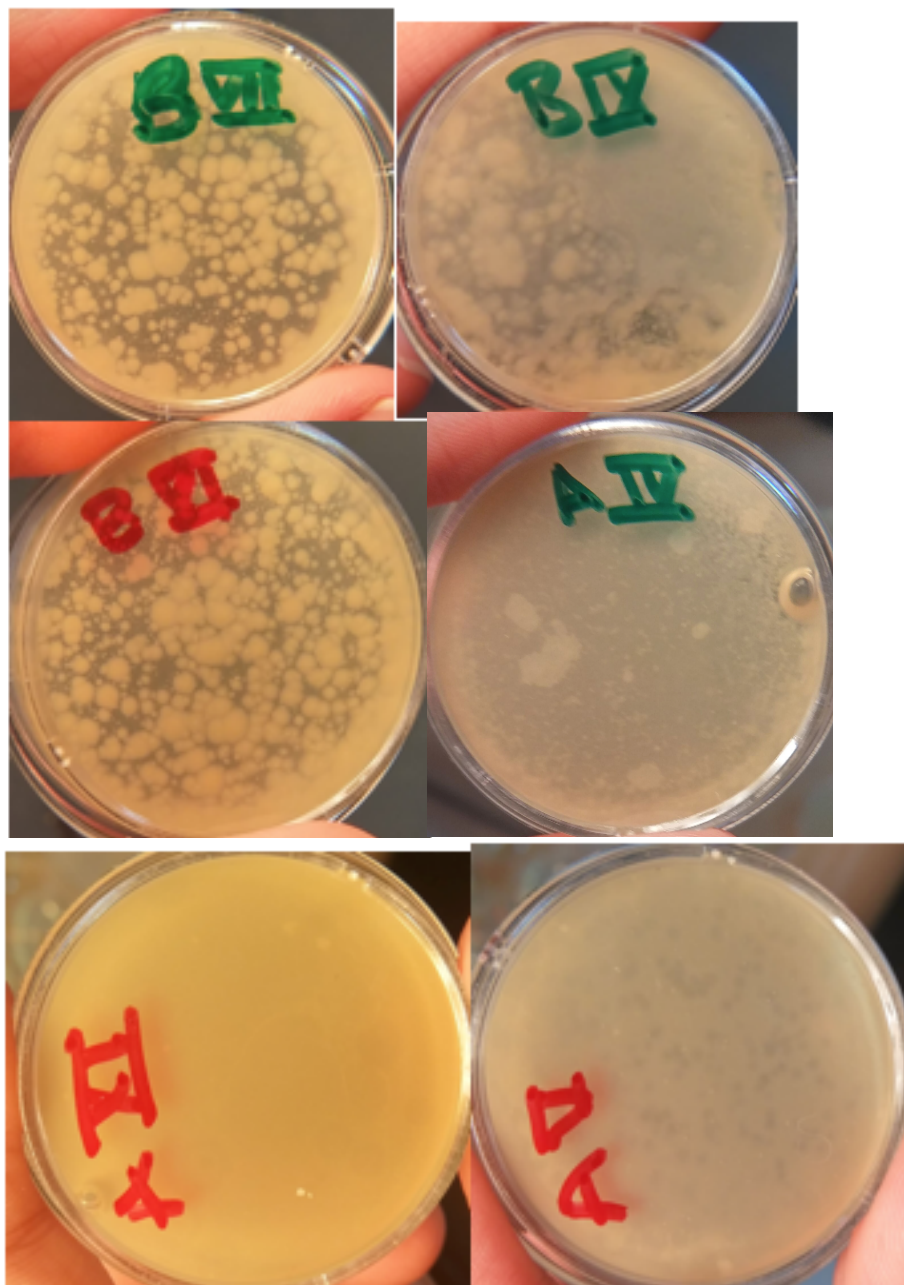
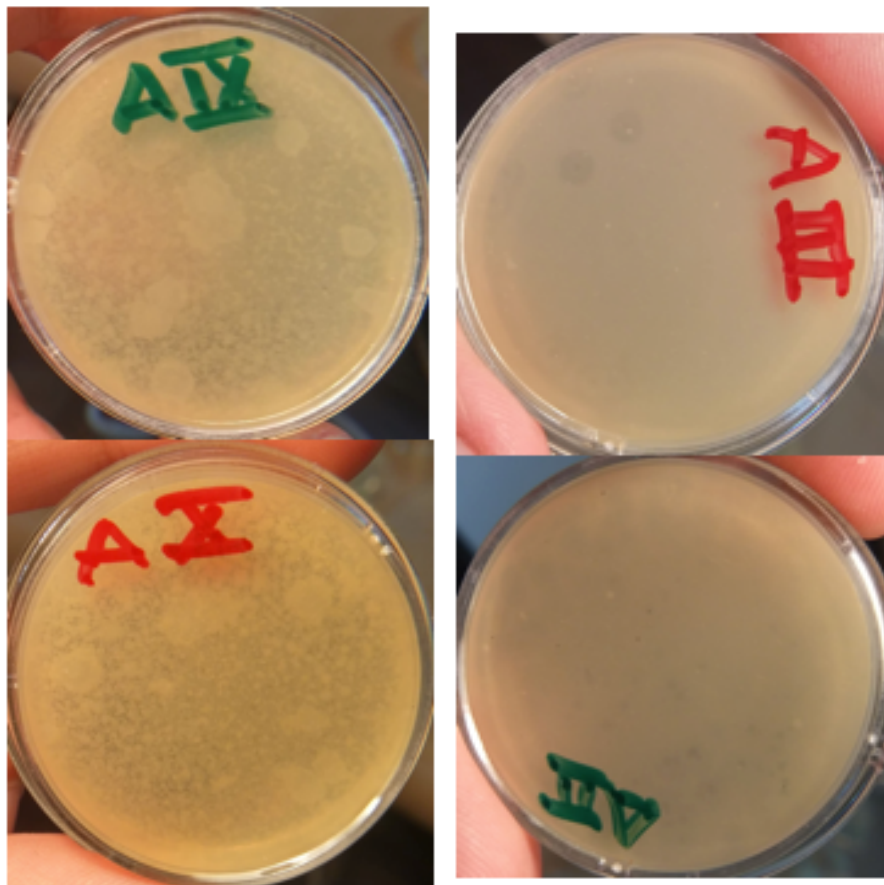


Figura 10. Ensayos de cóctel de bacteriófagos. La cepa A es ATCC 17802; el número romano denota el número de cóctel.



3. Resultados para pruebas API20E ®.

Cuadro 7. Resultados de pruebas API20E ® corridas en cada aislado de *V. parahaemolyticus*. Los ceros denotan un ensayo negativo, los unos, un resultado positivo. La cepa 134/2 es *V. cholerae*, la cepa 134/1 es *V. vulnificus*.

Cepa	ONPG	ODC	CIT	VP	SAC	MEL	AMY	ARA	OX	ADH	LDC	H2S	URE	TDA	IND	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA
88/3	0	1	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0
134/1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0
134/2	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0
126/1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0
134/3	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0
134/2	0	1	0	1	1	0	1	1	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0
138/2	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0
138/4	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0
132/3	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0
73/6	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0
80/3	0	1	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0
ATC	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0

*Nota, las siglas de las pruebas siguen la codificación del sistema API20E ®, de la marca BioMérieux ®.

4. Recetas de medios y soluciones utilizados.

Cuadro 8. Recetas de medios utilizados

Reactivo/medio	Müller Hinton	Tripticasa soya, NaCl 2%, 2mm CaCl ₂ *2H ₂ O, 250mL
Nacl	24g	5g
Extracto de carne	2g	-
Hidrolisado ácido de caseína	17.5g	-
CaCl ₂ *2h ₂ o	-	2g
KCl	0.7g	-
Almidón	1.5g	-
Bacto triptona	-	15g
Bacto soya	-	5g
Agar	17g	-
Agarosa*	-	3g
pH	7.3	7.3

*agregar solo al medio suave, para preparar caldo, obviar.

Cuadro 9. Receta para preparar buffer para bacteriófagos 10X usada.

Reactivo/solución	Buffer de bacteriófagos (100mL)
Tris-Cl	3.152g, ph 7.4
H ₂ O	Aforar a 100mL
NaCl	5.844g
MgSO ₄	2.464g
Indicaciones adicionales	Preparar Tris-Cl, y en esta solución agregar el resto y aforar con agua; para usar, diluir para llegar a 1x; guardar a temperatura ambiente.

GLOSARIO

- Bacteriófago: virus que afecta exclusivamente a bacterias.
- Lisis: destrucción celular, puede ser provocada por una muerte celular natural tras el agotamiento metabólico y daño oxidativo; o puede ser resultado de infecciones intracelulares (*e.g.* virales).
- Lisogenia: ciclo de infección viral en la que el genoma viral se integrará al genoma del hospedero. Normalmente esta clase de ciclos resulta en cambios en la expresión proteica del hospedero. En bacterias, puede llevar a un aumento en patogenicidad.
- Lítico: ciclo de infección viral en la que el virus al ingresar a la célula toma control de la maquinaria metabólica e inicia la replicación de su genoma de forma descontrolada. Esta provoca la expresión de las proteínas necesarias para la producción de viriones nuevos, que romperán la membrana (y cuando aplique, la pared) celular para liberarlos al medio intercelular y poder infectar nuevas células.
- Placa: en ensayos de laboratorio con bacteriófagos, placa se refiere a los pequeños círculos donde no hay crecimiento bacteriano en una caja Petri. Estos constarán como el crecimiento viral en la caja.