



UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES



FACULTAD DE INGENIERÍA PESQUERA Y CIENCIAS
DEL MAR

ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE
INGENIERÍA PESQUERA

TESIS DE PREGRADO

**IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN
MOLECULAR DEL GÉNERO *Vibrio* EN LA
HEMOLINFA Y HEPATOPÁNCREAS DE
Litopenaeus vannamei EN CULTIVO SEMI-
INTENSIVO EN TUMBES, 2014**

PRESENTADO POR:

Est. JHUNIOR XAVIER OVIEDO CASARIEGO

TUMBES, PERÚ

2014



UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES



FACULTAD DE INGENIERÍA PESQUERA Y CIENCIAS
DEL MAR

ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE
INGENIERÍA PESQUERA

TESIS DE PREGRADO

**IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN
MOLECULAR DEL GÉNERO *Vibrio* EN LA
HEMOLINFA Y HEPATOPÁNCREAS DE
Litopenaeus vannamei EN CULTIVO SEMI-
INTENSIVO EN TUMBES, 2014**

PRESENTADO POR:

Est. JHUNIOR XAVIER OVIEDO CASARIEGO

TUMBES, PERÚ

2014

RESPONSABLES

JHUNIOR XAVIER OVIEDO CASARIEGO

EJECUTOR

Ing. TESSY PERALTA ORTIZ

ASESORA

JURADO DICTAMINADOR

Dr. OSCAR A. MENDOZA NEYRA

PRESIDENTE

Mg. ALBERTO ORDINOLA ZAPATA

SECRETARIO

Ing. JORGE H. CARRASCO CASARIEGO

VOCAL

AGRADECIMIENTO

A Dios, el ser omnipotente que nos brinda su cuidado, y nos ayuda a alcanzar nuestras metas en nuestras vidas.

Al Ing Beder Ramirez, jefe de prácticas del Laboratorio de Biología Molecular por su apoyo y colaboración en las actividades realizadas en la presente tesis.

A mi asesora, Ing Tessy Peralta por su colaboración y a los docentes, M.Sc. Oscar Mendoza, Mg. Alberto Ordinola e Ing. Jorge Carrasco Casariego por sus correcciones y observaciones como jurados de esta tesis.

A los docentes y amigos los cuales me brindaron sus enseñanzas y consejos durante mi formación profesional.

Por ultimo agradezco a mi familia que me ayudaron y brindaron su apoyo en mi formación profesional.

DEDICATORIA

A Dios, por la vida y el cuidado que nos brinda a mí y a mi familia en nuestra vida diaria.

A mi madre Carmen Casariego de Oviedo quien me brinda su amor, su apoyo incondicional y es la persona que ha hecho posible que cumpla esta meta.

A mis hermanas Leydi y maria, a mi hermano José, quienes comparten mi vida diaria y me han ayudado en mi formación profesional.

TABLA DE CONTENIDOS

RESUMEN	12
ABSTRACT	13
I. INTRODUCCIÓN	14
II. MARCO TEÓRICO	15
III. ANTECEDENTES	18
IV. MATERIAL Y MÉTODOS	21
4.1. MATERIALES	21
4.2. MÉTODOS	22
4.2.1.Recolección de la muestra	22
4.2.2.Extracción de hemolinfa y hepatopáncreas	23
4.2.3.Preparación de los medios	23
4.2.4.Aislamiento y cultivo	24
4.2.5.Identificación	25
V. RESULTADOS	29
5.1 Aislamiento de las colonias bacterianas	29
5.2 Calculo de la cantidad de UFC presentes en la hemolinfa y hepatopáncreas.	30
5.3Características morfológicas de las UFC seleccionadas	31
5.4Selección de las UFC más representativas.	32
5.5Amplificación del fragmento del gen 16S ARNr	33
5.6Amplificación de los primer específicos	33
5.6.1Amplificación del primer Tox-R (<i>Vibrio parahaemolyticus</i>)	33
5.6.2Amplificación del primer VA (<i>Vibrio anguillarum</i>)	34
5.7Identificación de las colonias bacterianas a través de las secuencias nucleótidos del gen 16S ARNr.	34
VI. DISCUSIÓN	36
VII. CONCLUSIONES	38
VIII. RECOMENDACIONES	39
IX.REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40
ANEXOS	43

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Reactivos y volumen usados en la PCR	26
Tabla 2. Programación del termociclador para la amplificación del fragmento del gen 16S ARNr.	26
Tabla 3. Programación del termociclador para la amplificación del primer Tox-R.	27
Tabla 4. Programación del termociclador para la amplificación del primer VA.	27
Tabla 5. Crecimiento bacteriano en la hemolinfa y hepatopáncreas en cada placa.	29
Tabla 6. Crecimiento bacteriano por mililitro de hemolinfa y por gramo de hepatopáncreas.	30
Tabla 7. Selección de las UFC de las placas con medio TCBS.	31
Tabla 8. Características morfológicas de las UFC seleccionadas.	31
Tabla 9. Selección de las UFC más representativas.	32
Tabla 10. Bacterias identificadas de las colonias bacterianas seleccionadas.	35

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ubicación de los campos langostineros a partir del cual se extrajo la muestra	22
Figura 2. Amplificación del fragmento del gen 16S ARNr del muestreo 1. 1-11 muestras trabajadas. 12: Control positivo. 13: Control negativo. MPM: Marcador de peso molecular.	33
Figura 3. Amplificación del fragmento del gen 16S ARNr del muestreo 2. 1-17 muestras trabajadas. 18: Control positivo. 19: Control negativo. MPM: Marcador de peso molecular.	33
Figura 4. Amplificación de las muestras trabajadas con el primer Tox-R. 1-11 muestras trabajadas 12: Control positivo. 13: Control negativo. MPM: Marcador de peso molecular. 7 y 11 muestras amplificadas.	34
Figura 5. Amplificación de las muestras trabajadas con el primer VA. 1-11 muestras trabajadas 12: Control positivo. 13: Control negativo.	34
Figura 6. Resultado final de la secuencia de nucleótidos que corresponde a un 99 % de similitud de <i>Vibrio shilonii</i> . Según el programa BLAST de la base de datos del NIH.	48
Figura 7. Resultado final de la secuencia de nucleótidos que corresponde a un 99 % de similitud de <i>Vibrio communis</i> . Según el programa BLAST de la base de datos del NIH.	48
Figura 8. Resultado final de la secuencia de nucleótidos que corresponde a un 99 % de similitud de <i>Vibrio harveyi</i> . Según el programa BLAST de la base de datos del NIH.	48
Figura 9. Resultado final de la secuencia de nucleótidos que corresponde a un 99 % de similitud de <i>Vibrio tubiashii</i> . Según el programa BLAST de la base de datos del NIH.	48
Figura 10. Resultado final de la secuencia de nucleótidos que corresponde a un 99 % de similitud de <i>Vibrio shilonii</i> . Según el programa BLAST de la base de datos del NIH.	49

- Figura 11. Resultado final de la secuencia de nucleótidos que corresponde a un 99 % de similitud de *Vibrio sp.* Según el programa BLAST de la base de datos del NIH. 49
- Figura 12. Resultado final de la secuencia de nucleótidos que corresponde a un 99 % de similitud de *Vibrio sp.* Según el programa BLAST de la base de datos del NIH. 49
- Figura 13. Resultado final de la secuencia de nucleótidos que corresponde a un 99 % de similitud de *Vibrio brasiliensis.* Según el programa BLAST de la base de datos del NIH. 49
- Figura 14. Resultado final de la secuencia de nucleótidos que corresponde a un 99 % de similitud de *Vibrio tubiashii.* Según el programa BLAST de la base de datos del NIH. 50
- Figura 15. Resultado final de la secuencia de nucleótidos que corresponde a un 99 % de similitud de *Vibrio shilonii.* Según el programa BLAST de la base de datos del NIH. 50
- Figura 16. Resultado final de la secuencia de nucleótidos que corresponde a un 99 % de similitud de *Vibrio tubiashii.* Según el programa BLAST de la base de datos del NIH. 50
- Figura 17. Resultado final de la secuencia de nucleótidos que corresponde a un 99 % de similitud de *Vibrio parahaemolyticus.* Según el programa BLAST de la base de datos del NIH. 50

INDICE DE ANEXOS

ANEXO 1. Secuenciación obtenida de las 12 muestras secuenciadas	43
ANEXO 2. Resultado final de la secuencia de nucleótidos de cada una de las muestras trabajadas.	48

IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL GÉNERO *Vibrio* EN LA HEMOLINFA Y HEPATOPÁNCREAS DE *Litopenaeus vannamei* EN CULTIVO SEMI-INTENSIVO EN TUMBES, 2014.

Est. Jhunion Xavier Oviedo Casariego¹
Ing. Tessy Peralta Ortiz²

RESUMEN

La presente investigación tuvo como objetivo identificar y caracterizar bacterias del género *Vibrio* que están presentes en la hemolinfa y hepatopáncreas del *Litopenaeus vannamei* proveniente de un cultivo semi-intensivo en Tumbes. Las muestras se extrajeron de las langostineras Ccoral S.A y Esmeralda, el proyecto se realizó entre noviembre del 2014 y febrero del 2015 en las instalaciones del Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ingeniería Pesquera y Ciencias del Mar en la Universidad Nacional de Tumbes. Se recolectaron 5 ejemplares de *Litopenaeus vannamei* de cada langostinera y a partir de su hemolinfa y hepatopáncreas se realizó un aislamiento bacteriano en agar TCBS. Se aislaron en total 42 cepas bacterianas y de éstas se hizo una extracción de ADN y posterior PCR con primers para el gen 16S ARNr y primers específicos para *Vibrio parahaemolyticus* y *V. anguillarum*. Se secuenció 13 productos de PCR obtenidos del gen 16S ARNr y se identificó mediante alineamiento en la herramienta bioinformática BLAST. Las secuencias obtenidas indicaron que las cepas estuvieron relacionadas con *V. shilonii*, *V. communis*, *V. harveyi*, *V. tubiashi*, *Vibrio sp*, *V. brasiliensis*, *V. parahaemolyticus*. La cepa identificada mediante secuenciación como *V. parahaemolyticus* también fue confirmada por PCR con los primers específicos. Además de ésta, otra cepa identificada como *Vibrio sp* también produjo una amplificación con este juego de primer. Los primers específicos a *V. anguillarum* no produjeron amplificación alguna.

Palabras clave: *Litopenaeus vannamei*, *Vibrio*, identificación molecular, PCR.

Estudiante de la Escuela de Ingeniería Pesquera Acuícola de la Universidad Nacional de Tumbes

²Profesora Asociada de la Facultad de Ingeniería Pesquera y Ciencias del Mar de la Universidad Nacional de Tumbes

Tesis presentada para obtener el título profesional de Ingeniero Pesquero
Universidad Nacional de Tumbes
Facultad de Ingeniería Pesquera y Ciencias del Mar
Escuela Académica Profesional de Ingeniería Pesquera Acuícola
Calle Los Ceibos S/N Puerto Pizarro, Tumbes-Perú
E-mail: xavirgo2908@hotmail.com
2015

IDENTIFICATION AND MOLECULAR CHARACTERIZATION *Vibrio* in the hemolymph and hepatopancreas of *Litopenaeus vannamei* SEMI-INTENSIVE CULTURE IN TUMBES, 2014.

Est. Jhuniór Xavier Oviedo Casariego¹
Ing. Tessy Peralta Ortiz²

ABSTRACT

This research aimed to identify and characterize *Vibrio* present in the hemolymph and hepatopancreas of *Litopenaeus vannamei* from a semi-intensive farming in Tumbes. The samples were extracted from the shrimp companies Ccoral SA and Esmeralda, the project was conducted between November 2014 and February 2015 in the Laboratory of Molecular Biology, Faculty of Fisheries Engineering and Marine Sciences at the National University of Tumbes. 5 specimens of *Litopenaeus vannamei* of each shrimp companies were collected and from their hemolymph and hepatopancreas a bacterial isolation in TCBS agar was performed. 42 bacterial strains were isolated and underwent DNA extraction and subsequent PCR with primers for the 16S rRNA gene and primers specific for *Vibrio parahaemolyticus* and *V. anguillarum*. 13 PCR products obtained with the 16S rRNA gene were sequenced and identified by the BLAST alignment tool bioinformatics. The sequences obtained indicated that the strains were related to *V. shilonii*, *V. communis*, *V. harveyi*, *V. tubiashi*, *Vibrio sp.*, *V. brasiliensis*, *V. parahaemolyticus*. The strain identified by sequencing as *V. parahaemolyticus* was also confirmed by PCR with specific primer. Besides this, another strain identified as *Vibrio sp.* also produced an amplification with this game first. The specific primers did not produce any amplification *V. anguillarum*.

Keywords: *Litopenaeus vannamei*, *Vibrio*, molecular identification, PCR.

Student of the School of Fisheries Aquaculture Engineering, National University of Tumbes
²Associate Professor, Fisheries Engineering and Marine Sciences college, National University of Tumbes

Thesis submitted to obtain the professional title of Fisheries Engineer
National University of Tumbes
Fisheries Engineering and Marine Sciences College Academic Professional School of Fisheries
Engineering Aquaculture
Calle Los Ceibos S / N Puerto Pizarro, Tumbes, Perú
E-mail: xavirgo2908@hotmail.com
2015

I. INTRODUCCIÓN

Uno de los principales problemas que afectan la acuicultura son las enfermedades que ocasionan grandes pérdidas económicas. Las enfermedades son principalmente de origen viral y bacteriano. Entre las especies bacterianas, las Gram negativas son las predominantes del ambiente marino, entre ellas las más importantes son las del género *Vibrio* que se alojan en el tracto digestivo, branquias, hepatopáncreas y cutícula del langostino y ocasionalmente en la hemolinfa. La presencia de estas especies bacterianas junto a otros factores estresantes, desencadena el desarrollo de infecciones, conocido como vibriosis la cual está presente en todo el mundo y en todos los crustáceos marinos, incluido los langostinos, que son los más susceptibles (Morales-Covarrubias 2008).

Entre los métodos de control de éstos patógenos, el monitoreo constante del estado sanitario de los campos langostineros es el más recomendado. En Perú, el monitoreo en campo generalmente, es desarrollado en base a métodos de microbiología tradicional utilizando medios selectivos como el TCBS, si bien éste método permite obtener una visión general de la cantidad de bacterias presentes en la muestra, no es posible tener una identificación específica de las bacterias presentes lo cual no hace posible un manejo adecuado de para el control de éste tipo de patógenos.

Ante las falencias de la microbiología tradicional para el diagnóstico de patógenos bacterianos en el cultivo de langostino, las herramientas moleculares como la PCR se han presentado como una importante alternativa para sustituir al diagnóstico microbiológico. Mediante ésta técnica se amplifica un fragmento del gen 16S ARNr y se secuencian los nucleótidos que lo componen, éstos son contrastados en una base de datos como el GenBank, y por medio del porcentaje de similitud se obtiene una identificación más precisa. Por tal motivo la presente investigación tuvo el objetivo de identificar mediante PCR del gen 16S ARNr a bacterias del género *Vibrio* que están presentes en la hemolinfa y hepatopáncreas del *Litopenaeus vannamei* proveniente de un cultivo semi-intensivo en Tumbes, en el año 2014.

II. MARCO TEÓRICO

La industria del cultivo de langostino en América Latina es una de las mayores fuentes de ingresos en estos países. Inicialmente, se utilizaban poslarvas silvestres capturadas en estuarios y zonas costeras. Sin embargo con la aparición de diversas enfermedades se comenzó a utilizar poslarvas producidas en laboratorio. (Mora y López 2007).

Uno de los principales problemas que afecta la acuicultura son las enfermedades las cuales ocasionan grandes pérdidas económicas. Por lo que la mayor importancia para la solución de este problema es la prevención y control en el cultivo.

Las enfermedades son principalmente de origen viral y bacteriano en langostinos de cultivo en el continente americano, siendo las bacterias Gram negativas las que predominan en el ambiente marino y que constituyen la mayoría de las bacterias que normalmente se presentan en la microflora de los langostinos silvestres y de cultivo. Entre ellas las bacterias más importantes son las del género *Vibrio*, las cuales son consideradas como patógenos oportunistas, localizadas principalmente en el tracto digestivo, branquias, hepatopáncreas y cutícula de langostinos peneidos y ocasionalmente en hemolinfa, y junto a otros factores estresantes, da origen al desarrollo de infecciones tales como vibriosis, hepatopáncreas edematoso y necrótico con un alto grado de vacuolización en las células B en larvicultura y engorda. Estas bacterias del género *Vibrio* causan infecciones letales al interactuar con factores nutricionales, bióticos, abióticos, genéticos e inmunológicos (Morales-Covarrubias 2008).

La vibriosis está presente en todo el mundo y en todos los crustáceos marinos, incluido los langostinos que son los más susceptibles. Las epizootias ocurren en todos los estadios de vida; la infección causa alta mortalidad particularmente en poslarvas y juveniles, los langostinos moribundos son encontrados en la superficie y nadando en las orillas. Los síntomas de la fase inicial de la enfermedad son opacidad muscular y tracto digestivo vacío y en la fase grave, los síntomas son expansión de los cromatóforos, hepatopáncreas

inflamado y luminiscencia. Si la vibriosis afecta el hepatopáncreas ocasiona una lesión conocida como síndrome de bolitas blancas la cual produce necrosis de las células epiteliales de los túbulos y estas células, se separan de la basal, produciéndose depitelialización; las bacterias del género también ocasiona la lesión síndrome de bolitas negras, que se presenta cuando el langostino ha comido y las células presentan pigmentos del alimento y éstas se descaman (Morales-Covarrubias 2008).

Las infecciones ocasionadas por la vibriosis en los laboratorios de producción de postlarvas y en instalaciones de crianza y engorda son ocasionadas por formas bioluminiscentes de *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*, *V. harveyi* y *V. vulnificus* que son las que se reportan con mayor frecuencia y las que se reportan ocasionalmente son *V. damsela* y *V. fluvialis* (Gomez, Roque y Guerra 2001).

Las infecciones denominadas vibriosis, causadas por *Vibrio* en el langostino juvenil, subadulto y adulto son el resultado de trauma físico, condiciones ambientales extremas, secundarias a infecciones causadas por otros patógenos o por formas altamente virulentas y están bien delimitados por células hemocíticas formando cápsulas o tapones, los cuales comúnmente se encuentran melanizados. Las bacterias pueden ser observadas adyacentes a tales lesiones y pueden ser debidas a abscesos focales dentro del hepatopáncreas causado por parásitos, infecciones virales o por causas desconocidas. Otro tipo es la vibriosis sistémica en áreas en donde se cultiva principalmente *L. vannamei* ocasionada por vibrios como *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* y *V. harveyi* (Lightner y Pantoja 2009).

Para la identificación de las especies bacterianas del género *Vibrio* presentes en la hemolinfa y hepatopáncreas del *Litopenaeus vannamei* existen dos opciones, usar técnicas de identificación bioquímica, que no son 100 % precisas o utilizar herramientas moleculares como es la amplificación de un fragmento del gen 16S ARNr mediante la PCR (reacción de la cadena polimerasa) y luego la contrastación contra la base de datos de GenBank, para lograr una identificación más precisa.

La PCR amplifica exponencialmente secuencias de ácido nucleico flanqueadas por los iniciadores específicos para la detección de un patógeno en particular. Dicha amplificación ocurre durante una serie de ciclos de temperatura (Lightner y Pantoja 2009). Un ciclo de PCR consiste de tres etapas básicas, completamente dependientes de la temperatura: (1) Se separan las cadenas de ADN por calentamiento, (2) Se hibridan con un exceso de cebadores de ADN sintético cortos, que flanquean la región que se desea amplificar, (3) el ADN nuevo se sintetiza por polimerización (Nelson y Cox 2005). Luego de repetir los tres pasos unos 25 ó 40 ciclos, el producto amplificado (si se encuentra presente) también conocido como amplicón, es sometido a electroforesis en un gel de agarosa y visualizado al ser expuesto a luz ultravioleta en un transiluminador (Lightner y Pantoja 2009).

Actualmente el uso de secuencias es muy común; se aplicado en análisis de genética de poblaciones y problemas taxonómicos. Este método incluye cuatro pasos: i) Identificar secuencias que tenga la variación necesaria; ii) aislar y purificar un número elevado de la secuencia (ya sea por clonación o amplificación); iii) secuencias; iv) alinear la secuencia. Recientemente se ha introducido la secuenciación automática que la reacción de Fred Sanger pero con fluorescencia en vez de radiactividad, que se detecta por medio de un láser. Cada emisión fluorescente es transmitida como una señal directamente a la computadora donde un programa la interpreta y la codifica como un nucleótido particular. Entre las principales ventajas que tiene la secuenciación de ADN es su alta reproducibilidad y que es codominante, su mayor limitante es su alto costo pero es la mejor alternativa entre los métodos con isotopos radiactivos (Renteria 2007).

III. ANTECEDENTES

Haldar et al. (2011) identificaron bioquímicamente 28 cépas relacionadas a *V. harveyi*; aislados de langostinos enfermos; luego estas cepas fueron seleccionadas al azar para una caracterización adicional por herramientas moleculares. 26 cépas fueron identificadas como *Vibrio campbellii* y dos como *V. harveyi* por análisis de la secuencia de 16S ARNr y los genes uridilato cinasa. PCR multiplex-hemolisina gen basados en especies específicas también confirmó estos resultados.

Felix et al. (2011) aislaron bacterias del género *Vibrio* de 10 individuos de langostino tigre gigante de 10 meses de cultivo, las muestras fueron seleccionadas teniendo en cuenta el comportamiento y condiciones físicas no saludables. La amplificación, secuenciación y análisis de bioinformática se realizó con el uso del gen 16S ADNr. Los resultados de secuenciación del ADN de cada bacteria se compararon en la base de datos del GenkBank. Los resultados mostraron 97 % de homología con *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. harveyi*, *V. shilonii* y *V. vulnificus*.

Longyant et al. (2008) realizaron un estudio inmunohistoquímico utilizando anticuerpos monoclonales específicos para diversos virus del langostino y *Vibrio* spp. en muestras de langostino muerto por causa desconocida con síntomas de rayas negras en los lados laterales del cefalotórax o coloración del cuerpo ahumado. Doce cepas de *Vibrio* spp. aislados de los tejidos de langostino se identificaron con anticuerpos monoclonales diferentes de transferencia de puntos, pruebas bioquímicas y genéticas 16S ARNr. Los resultados revelaron tres grupos de *V. vulnificus* y un grupo de *V. shilonii*. Los cuatro grupos aislados de *Vibrio* spp. eran inmunológicamente y bioquímicamente diferentes. Se demostró que la mortalidad en el langostino se debe a la presencia de *Vibrio* spp.

Liu et al. (2004) aislaron *Vibrio alginolyticus* a partir de langostino (*Litopenaeus vannamei*) enfermo de estanques de cultivo de Taiwán. Seis cepas de *Vibrio* se obtuvieron de langostinos enfermos en 3 granjas, y estas cepas se evaluaron para las características incluyendo la morfología, la fisiología, la bioquímica y la sensibilidad a los antibióticos. Los resultados indicaron que los aislados pertenecían a la misma especie que crecieron en 1 a 8% de NaCl, en 10 a 40 °C y en agar TCBS (tiosulfato citrato bilis sacarosa) y que dieron positivo catalasa, O/F (oxidación /fermentación), la lisina descarboxilasa, gelatinasa y pruebas de citocromo-oxidasa. Identificación de CH003 (1 de 6 aislamientos) se confirmó mediante un ensayo de PCR para *V. alginolyticus* (amplicón esperado 1486 pb). La secuencia de 16S ADNr (GenBank número AY373027) dio 99,9% de identidad de secuencia de *V. alginolyticus* (GenBank número de acceso X74690).

Gopal et al. (2005) estudiaron la aparición de diversas especies de *Vibrio* en agua, sedimentos y muestras de langostino de múltiples entornos de cultivos del este y la costa oeste de la India. La abundancia relativa fue mayor en cultivos de la costa oeste (104 UFC/ml de agua) en comparación con la costa este (102 UFC/ml de agua). *V. Alginolyticus* (3-19 %), *V. parahaemolyticus* (2-13 %), *V. harveyi* (1-7 %) y *V. vulnificus* (1-4 %) fueron las especies de *Vibrio* predominantes identificados por pruebas bioquímicas estándar. La identificación bioquímica de *V. parahaemolyticus*, el otro patógeno humano de las especies mencionadas anteriormente, fue confirmada por PCR dirigida al gen *toxR* y un locus cromosómico de 387 pb específico para esta especie.

Hernández-López et al. (1997) aislaron las bacterias de los géneros *Vibrio*, *Pseudomonas* y *Aeromonas* del intestino de los langostinos marrón aparentemente sanos (*Penaeus californiensis*) cultivados en un estanque llenados por marea. El aislamiento se realizó primero en caldo de mar, a continuación, en medios selectivos (TCBS, cetrimide y MacConkey). La identificación de cepas oxidasa positiva se basa en la característica morfológica y colonial, capacidades bioquímicas, y tolerancia a la salinidad y temperatura. Sistema API 20E y análisis de ácidos grasos también fueron incluidos. Tres bacterias potencialmente patógenas, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio furnissii* y

Pseudomonas putida fueron aisladas e identificados a partir del intestino del langostino sano.

IV. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. MATERIALES

4.1.1 Material biológico

- 10 langostinos *Litopenaeus vannamei*.

4.1.2 Equipos y materiales

- **Materiales:**

- 01 Micropipeta de 100–1000 µl.
- 01 Micropipeta de 20-200 µl.
- 01 Micropipeta de 10-100 µl.
- Puntas con filtro de 100 µl.
- Puntas con filtro de 200 µl.
- Puntas con filtro de 1000 µl.
- 50 Tubos eppendorf de 1,5.
- 50 Tubos eppendorf de 0,2 ml.
- 01 Microplaca de 96 pozos.
- 20 Placas Petri.
- 20 Tubos falcon de 15 – 50 ml.
- 01 Balde de 20 L.
- 20 jeringas de 1 ml.
- 01 Estuche de disección.
- 01 Paquete de algodón.
- 02 Matraz de 500 ml.

- **Equipos:**

- 01 Termociclador marca Thermo Scientific
- 01 Centrifuga marca Sigma modelo 1-15K
- 01 Equipo para baño maríamarca Bionet modelo BM5
- 01 Refrigeradoramarca Lg modelo gm 749 ftca
- 01 Transiluminador
- 01 Cámara fotográficamarca Samsung modelo ES90
- 01 Equipo para electroforesis vertical
- 01 Horno microondasmarca Panasonic modelo NN-S52PE

- 01 Autoclave marca All American modelo 25X-2

– **Insumos:**

- 01 Kit de 100 reacciones para amplificación del gen 16S ARN.
- Medio de cultivo agar tiosulfato citrato bilis sacarosa. (TCBS).
- Medio de cultivo agar tripticasa soya (TSA).
- Solución salina estéril al 0,85%.

4.2. MÉTODOS

4.2.1. Recolección de la muestra

Se recolectaron 10 ejemplares de *Litopenaeus vannamei* de 2 campos langostineras, Ccoral S.A y Esmeralda ubicados en la región Tumbes (Figura 1), considerando 5 individuos por cada campo. Fueron transportados vivos en un balde de 20 L con agua de su estanque hasta el laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ingeniería Pesquera y Ciencias del Mar para su posterior análisis.



Figura 1. Ubicación de los campos langostineros a partir del cual se extrajo la muestra

4.2.2. Extracción de hemolinfa y hepatopáncreas

Para la extracción de la hemolinfa se siguieron los siguientes pasos:

- Se tomó un langostino, se lavó y se desinfectó con algodón empapado con alcohol en la zona del quinto periópodo.
- Usando una jeringa de 1 ml a la que previamente se le ha adicionó anticoagulante en proporción de 2:1, se extrajo la hemolinfa y se agregaron en tubos eppendorf.
- Se realizaron diluciones seriadas hasta 10^{-2} .

Para la extracción del hepatopáncreas se siguió los siguientes pasos:

- Se tomó un langostino, procediéndose a lavar la región del hepatopáncreas con solución salina estéril al 85% y alcohol.
- Se lavó el langostino con solución salina estéril al 0,85% y con alcohol en la región del hepatopáncreas.
- Con una tijera de disección estéril, se cortó el exoesqueleto en la región del cefalotórax, y se extrajo el hepatopáncreas entero, el cual se lavó nuevamente con solución salina estéril al 0,85%.
- Se pesó el hepatopáncreas con la ayuda de la balanza analítica y se colocó en un tubo estéril.
- Se maceró y enrasó con solución salina al 0.85 % a 1 ml. De esta primera dilución se hicieron las demás diluciones seriadas hasta 10^{-2} .

4.2.3. Preparación de los medios

TSA.- Se pesaron 4 g del medio TSA (Marca Oxoid, Inglaterra) para cada 100 ml de agua destilada. La preparación se realizó en un matraz, el cual se selló la boca con papel aluminio y se agitó hasta su dilución total. El matraz con el medio se esterilizó en un autoclave a 121 °C y 15 lb/pulg² por 15 minutos. Se dejó enfriar el medio esterilizado hasta 40 °C y luego fue vertido a las placas a razón de 20 ml aproximadamente de medio por placa. Esta operación se realizó cerca de un mechero para obtener la esterilización del trabajo, el medio de la placa se dejó solidificar para su posterior trabajo.

TCBS.- Se pesaron 8.8 g del medio TCBS (Marca Oxoid, Inglaterra) para cada 100 ml de agua destilada. La preparación se realizó en un matraz, el cual se selló la boca con papel aluminio y se agitó hasta su dilución total. El matraz con el medio se llevó a hervor 3 veces en un microondas. Se dejó enfriar el medio

esterilizado hasta 40 °C y luego fue vertido a las placas a razón de 20 ml aproximadamente de medio por placa. Esta operación se realizó cerca de un mechero para obtener la esterilización del trabajo, el medio de la placa se dejó solidificar para su posterior trabajo.

TSB.- Se pesaron g del medio TSB (Marca Oxoid, Inglaterra) para cada 50 ml de agua destilada. Se prepararon 50 ml en un tubo falcon y se agitó hasta su dilución total. El tubo falcon con el medio se esterilizó en un autoclave a 121 °C y 15 lb/pulg² por 15 minutos. Se dejó enfriar el medio esterilizado y se vertió en tubos eppendorf 1 ml del medio. Esta operación se realizó cerca de un mechero para obtener la esterilización del trabajo.

4.2.4. Aislamiento y cultivo

Cada uno de los tubos con las muestras de la hemolinfa y del hepatopáncreas fueron sembradas individualmente sobre el medio de cultivo Tiosulfato Citrato Bilis Sacarosa (TCBS) y el medio de cultivo Tripticasa Soya Agar (TSA), para la siembra se inocularon 50 µl de cada tubo a la placa y se esparció de forma homogénea con ayuda del asa de Drigalski, para el agar TSA se sembraron las tres diluciones (10^0 , 10^{-1} y 10^{-2}) y para el agar TCBS se sembraron 2 diluciones (10^0 y 10^1) cada placa fue rotulada, se le colocó parafilm y fueron incubadas a temperatura ambiente por 24 horas.

El recuento de colonias se realizó a partir de las 24 horas, el número de unidades formadoras de colonias (UFC) fue calculado por mililitro para las muestras de hemolinfa y por gramo para las muestras de hepatopancreas para las diferentes muestras analizadas en los diferentes medios.

Se seleccionó las colonias más representativas por cada placa y se le tomaron sus características (color, forma y tamaño) y fueron sub-cultivadas en medio TSA para obtener colonias puras, se realizaron 3 purificaciones, cada purificación se realizó tomando una pequeña cantidad con el asa de Coll y sembrando en la placa con el agar TSA con el rayado de estrías. Obtenida la colonia pura se tomó una pequeña cantidad de la colonia y se sumergió en el tubo eppendorf con el medio de cultivo TSB (2 tubos para cada muestra).

4.2.5. Identificación

Se realizó mediante la técnica molecular, consistente en:

4.2.5.1. Extracción de ADN: Se realizó la extracción de ADN para las muestras, siguiendo el protocolo de extracción de ADN bacteriano propuesto por Wilson (1997):

- Se tomó 1 ml de cultivo puro en caldo TSB de cada cepa aislada. Se centrifugó el cultivo por 5 minutos a 10000 rpm y se descartó el sobrenadante.
- Se colocó 567 µl de TE buffer, se adicionó 30 µl de SDS al 10% y 2 µl de proteinasa K de 20 mg/ml. Se homogenizó en el vortex e incubó por 1 hora a 37 °C en baño maría.
- Se adicionó 100 µl de NaCl de 5M y 80 µl de solución CTAB/NaCl. Se mezcló profundamente e incubó por 10 min a 65 °C.
- Se agregó 700 µl de una solución cloroformo/alcohol isoamil (24:1), se homogenizó la muestra invirtiendo el tubo lentamente hasta formar una emulsión. Se centrifugó a 13000 rpm por 5 minutos, se formaron 3 fases dentro del microtubo.
- Se transfirió la fase superior a microtubos nuevos y se agregó un volumen de solución fenol/cloroformo/alcohol isoamil (25:24:1) se homogenizó invirtiendo hasta formar una emulsión y se centrifugó a 13000 rpm por 5 minutos, formándose 3 fases dentro del microtubo.
- Se transfirió la fase superior a un nuevo microtubo y se trató con 2 volúmenes de solución de precipitación (isopropanol al 95%) e incubó a -20 °C por 10 minutos. Se centrifugó a 13000 rpm por 10 minutos. Se eliminó el sobrenadante.
- Se adicionó 500 µl de solución de lavado (etanol al 75%). Se centrifugó a 13000 rpm por 5 minutos y se eliminó el sobrenadante.
- Se dejó secar el sedimento (ADN) con el tubo destapado cerca de un mechero por un máximo de 15 minutos.

- Resuspender el ADN en 100 μ l de solución TE buffer previamente calentada a 65 °C. Se añadió 1 μ l de RNAasa (Pure link) por cada muestra y luego conservado a – 20 °C para su amplificación.

4.2.5.2. Amplificación del gen 16S ARNr.

A las muestras de ADN extraído se les realizó una prueba de PCR dirigida al gen 16S ARNr con el juego de iniciadores reportados por Peu, et al (2006), (27 *Forward* y 1492 *Reverse*). Las pruebas de PCR fue realizada en un volumen de reacción de 25 μ l en un equipo termociclador utilizando el kit de PCR de Thermo Fisher Scientific, EE.UU (tabla1)

Tabla 1. Reactivos y volumen usados en la PCR

Reactivo	Volumen(μ l)
Master mix PCR	12,5
Agua ultra pura (AUP)	10,3
Primer Forward 16S RNA-27F (10 pMol/ μ l)	0,6
Primer Reverse 16S RNA-1492R (10 pMol/ μ l)	0,6
ADN	1,0
Total	25,0

Luego los microtubos con las muestras fueron colocados al termociclador el cual fue programado por 35 ciclos con las siguientes temperaturas:

Tabla 2. Programación del termociclador para la amplificación del fragmento del gen 16S ARNr.

Fase	Temperatura (°C)	Tiempo	Número de ciclos
Pre desnaturalización	94	5 min	1
Amplificación			35
Desnaturalización	94	30 s	
Hibridación	56	45 s	
Polimerización	72	45 s	
Polimerización final	72	5 min	1

4.2.5.3. Amplificación de genes específicos Tox-R y VA

Se utilizaron primer específicos toxR-F: GTCTTCTGACGCAATCGTTG toxR-R: ATACGAGTGGTTGCTGTCATG que amplifica en gel ToxR y son específicos para *Vibrio parahaemolyticus* con un tamaño de 368 pb (Kim et. al., 1999). Así mismo se utilizaron los primer VA1: GCACTGTCCGTCATGCTATC y VA2: CATACGCAGCCAAAAATCAA que son específicos para *Vibrio anguillarum* (Prol, et al. 2008).

La cantidad de reactivos fue igual a lo utilizado en la PCR del gen 16S ARNr y el programa del termociclador fue realizado de acuerdo a las Tabla 3 y 4.

Tabla 3. Programación del termociclador para la amplificación del primer Tox-R.

Fase	Temperatura (°C)	Tiempo	Número de ciclos
Pre desnaturalización	94	5 min	1
Amplificación			35
Desnaturalización	94	45 s	
Hibridación	62	1 min	
Polimerización	72	1 min	
Polimerización final	72	5 min	1

Tabla 4. Programación del termociclador para la amplificación del primer VA.

Fase	Temperatura (°C)	Tiempo	Número de ciclos
Pre desnaturalización	94	5 min	1
Amplificación			35
Desnaturalización	94	45 s	
Hibridación	58	45 s	
Polimerización	72	1 min	
Polimerización final	72	5 min	1

4.2.5.4. Electroforesis

Se realizó en un gel de agarosa al 1,75 %, para lo cual se añadió 2,1 g de agarosa en 120 ml de buffer de tris, ácido acético y EDTA (TAE) a una concentración 1X, el cual se utilizó como tampón de migración, se colocó al microonda por 2 minutos. Se dejó enfriar y posteriormente le agregó 5 µl de bromuro de etidio. La solución fue vertida en una bandeja y se dejó solidificar. Los amplicones para la migración se prepararon mezclando 2 µl de azul de bromofenol (tampón de depósito) y 10 µl de cada amplicón procedente de la PCR y colocadas en los pocillos del gel de agarosa en la cámara de electroforesis. Conjuntamente se hizo migrar un marcador de peso molecular de 10 a 1000 pares de bases (pb). La migración del ADN se realizó a 80 V durante 30 minutos luego este gel con el ADN se colocaron en untransiluminador UVy fueron fotografiados con cámara digital para así determinar la amplificación del fragmento del gen 16S ARNr.

Comprobada la presencia de ADN en los amplicones se prepararon los amplicones en microtubos eppendorf de 0,5 ml junto con los iniciadores universales para el gen 16S ARNr y empacadas en hielo seco han sido enviadas a la empresa Macrogen en la ciudad de New York, Estados Unidos; para realizar la secuenciación de las 2 cadenas de cada producto amplificado.

4.2.5.5. Lectura y análisis de la secuencia

Obtenidas las secuencias de ADN de cada producto amplificado, éstas fueron alineadas con el software libre MEGA 4 y comparadas posteriormente con las secuencias de 16S ADNr que se encuentra en la base de datos de acceso público del GenBank mediante el software Basic Local Alignment Search Tools(BLAST) (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/). Para así buscar las especies o géneros con mayor porcentaje de identificación en las muestras secuenciadas.

V. RESULTADOS

5.1 Aislamiento de las colonias bacterianas

Se realizó el conteo de UFC para cada una de las placas (tabla 5)

Tabla 5. Crecimiento bacteriano en la hemolinfa y hepatopáncreas en cada placa.

MUESTRAS		NUMERO DE UFC				
		TSA			TCBS	
		10 ⁰	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁰	10 ⁻¹
MUESTREO 1	HL1	12	420	390	-	-
	HP1	+	90	215	80	180
	HL2	68	430	440	-	-
	HP2	+	150	380	+	96
	HL3	82	480	460	3	-
	HP3	120	300	180	92	16
	HL4	95	320	290	1	-
	HP4	+	58	320	110	96
	HL5	108	240	460	5	-
	HP5	+	34	280	110	40
MUESTR.EO 2	HL1	20	320	240	-	2
	HP1	+	120	190	55	170
	HL2	8	330	290	-	-
	HP2	140	210	420	85	118
	HL3	65	360	380	4	-
	HP3	+	150	370	48	36
	HL4	42	280	310	-	-
	HP4	+	410	370	+	94
	HL5	93	310	420	-	-
	HP5	114	220	360	86	114

+: Incontable

-: Ausente

5.2 Cálculo de la cantidad de UFC presentes en la hemolinfa y hepatopáncreas.

Se realizó un cálculo del número de UFC presentes en la hemolinfa y hepatopáncreas para las diferentes muestras analizadas en los medios TSA y TCBS. El número de UFC fue calculado por mililitro para las muestras de hemolinfa y por gramo para las muestras de hepatopáncreas (tabla 6)

Tabla 6. Crecimiento bacteriano por mililitro de hemolinfa y por gramo de hepatopáncreas.

MUESTRAS			NUMERO DE UFC				
			TSA			TCBS	
			10^0	10^{-1}	10^{-2}	10^0	10^{-1}
MUESTREO 1	10 ⁴ UFC/ml	HL1	0,024	8,4	78	-	-
		HL2	0,136	8,6	88	-	-
		HL3	0,164	9,6	92	60	-
		HL4	0,19	6,4	58	20	-
		HL5	0,216	4,8	92	100	-
	10 ⁴ UFC/g	HP1	+	4,15	99,08	0,37	8,29
		HP2	+	5,12	129,7	+	3,28
		HP3	0,49	12,2	73,17	0,37	0,65
		HP4	+	3,19	175,8	0,6	5,27
		HP5	+	1,29	106,1	0,42	1,52
MUESTREO 2	10 ⁴ UFC/ml	HL1	0,04	6,4	48	-	0,04
		HL2	0,016	6,6	58	-	-
		HL3	0,13	7,2	76	0,08	-
		HL4	0,084	5,6	62	-	-
		HL5	0,186	6,2	84	-	-
	10 ⁴ UFC/g	HP1	+	11,1	175,9	0,51	15,7
		HP2	0,99	14,79	295,8	0,59	8,31
		HP3	+	11,8	291,3	0,38	2,83
		HP4	+	24,6	221,6	+	5,63
		HP5	0,97	18,6	305,1	0,73	9,66

+: Incontable

-: Ausente

5.3 Características morfológicas de las UFC seleccionadas

Se seleccionaron las UFC de las placas con medio TCBS (tabla 7), se tomaron sus características (color, forma y tamaño) para su purificación (tabla 8).

Tabla 7. Selección de las UFC de las placas con medio TCBS.

	PLACAS	UFC
MUESTREO 1	HP2 10 ⁻¹	1,2,3,4,5
	HP3 10 ⁻¹	6,7,8,9,10
	HP4 10 ⁻¹	11,12,13,14
	HP3 10 ⁰	15,16,17,18
	HL3 10 ⁰	19,20
	HL5 10 ⁰	21,22,23
	HL4 10 ⁰	24
MUESTREO 2	HL1 10 ⁻¹	1
	HP2 10 ⁰	2,3,4
	HP2 10 ⁻¹	5,6,7,8,9
	HP1 10 ⁻¹	10,11,12,13
	HL3 10 ⁰	14,15
	HP4 10 ⁻¹	16,17,18
	HP5 10 ⁰	19,20,21

Tabla 8. Características morfológicas de las UFC seleccionadas.

	UFC	CARACTERISTICAS		
		COLOR	FORMA	TAMAÑO
MUESTREO 1	1	Amarilla	Redonda	Mediana
	2	Amarilla	Irregular	Mediana
	3	Amarilla	Redonda	Pequeña
	4	Amarilla	Irregular	Mediana
	5	Amarilla	Redonda	Mediana
	6	Amarilla	Redonda	Pequeña
	7	Amarilla	Redonda	Mediana
	8	Amarilla	Irregular	Mediana
	9	Amarilla	Irregular	Pequeña
	10	Amarilla	Redonda	Pequeña
	11	Amarilla	Redonda	Pequeña
	12	Amarilla	Irregular	Mediana
	13	Amarilla	Redonda	Pequeña
	14	Amarilla	Redonda	Mediana
	15	Amarilla	Redonda	Grande
	16	Amarilla	Irregular	Pequeña
	17	Verde	Redonda	Pequeña
	18	Verde	Redonda	Pequeña

	19	Amarilla	Redonda	Pequeña
	20	Amarilla	Irregular	Grande
	21	Amarilla	Redonda	Pequeña
	22	Amarilla	Irregular	Mediana
	23	Amarilla	Irregular	Mediana
	24	Verde	Redonda	Pequeña
MUESTREO 2	1	Amarilla	Redonda	Pequeña
	2	Amarilla	Irregular	Mediana
	3	Amarilla	Irregular	Grande
	4	Amarilla	Redonda	Pequeña
	5	Amarilla	Redonda	Pequeña
	6	Amarilla	Irregular	Mediana
	7	Amarilla	Redonda	Mediana
	8	Amarilla	Irregular	Mediana
	9	Amarilla	Irregular	Grande
	10	Amarilla	Redonda	Mediana
	11	Amarilla	Redonda	Pequeña
	12	Amarilla	Redonda	Mediana
	13	Verde	Redonda	Pequeña
	14	Amarilla	Irregular	Grande
	15	Amarilla	Irregular	Pequeña
	16	Amarilla	Irregular	Pequeña
	17	Amarilla	Redonda	Mediana
	18	Amarilla	Irregular	Pequeña
	19	Amarilla	Irregular	Mediana
	20	Amarilla	Redonda	Mediana
	21	Verde	Redonda	Pequeña

5.4 Selección de las UFC más representativas.

Se seleccionaron 13 UFC más representativas para su identificación (tabla 9)

Tabla 9. Selección de las UFC más representativas.

CODIGO	CARACTERISTICAS		
	COLOR	FORMA	TAMAÑO
1 HPI	Amarilla	Redonda	Mediana
2 HP2	Amarilla	Irregular	Mediana
3 HP2	Amarilla	Irregular	Grande
9 HPI	Amarilla	Irregular	Pequeña
10 HP2	Amarilla	Redonda	Mediana
12 HPI	Amarilla	Irregular	Mediana
13 HP2	Verde	Redonda	Pequeña
15 HPI	Amarilla	Redonda	Grande
18 HP2	Amarilla	Irregular	Pequeña
18 HPI	Verde	Redonda	Pequeña
20 HLI	Amarilla	Irregular	Grande
21 HLI	Amarilla	Redonda	Pequeña
21 HP2	Verde	Redonda	Pequeña

5.5 Amplificación del fragmento del gen 16S ARNr

El resultado de la amplificación determinó que si hubo migración en el gel de agarosa, observándose bandas en las muestras de las UFC seleccionadas; esto permitió verificar la presencia del amplicón tal como se observa en la figura 2 y 3.

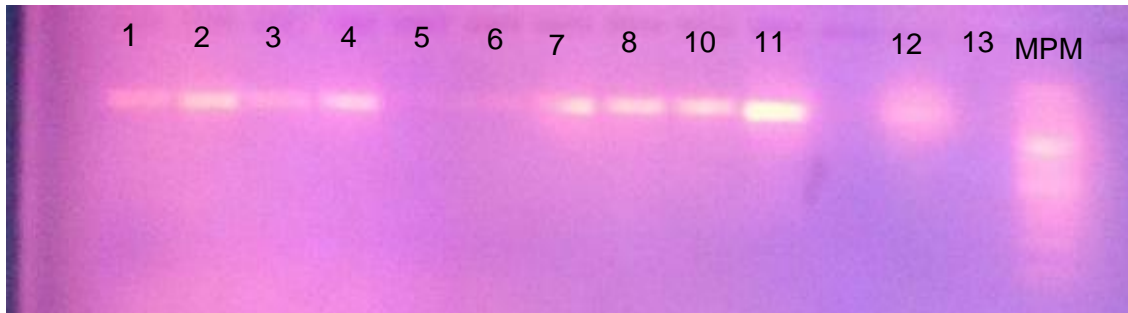


Figura 2. Amplificación del fragmento del gen 16S ARNr del muestreo 1.1-11 muestras trabajadas. 12: Control positivo. 13: Control negativo. MPM: Marcador de peso molecular.

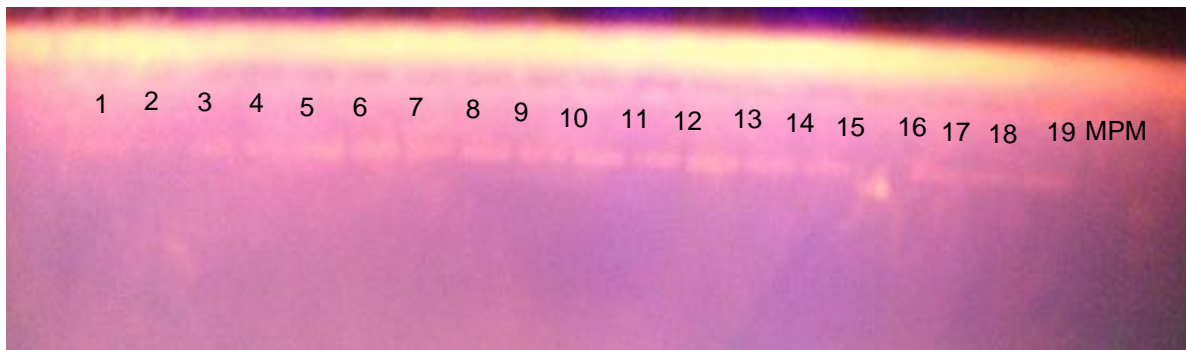


Figura 3. Amplificación del fragmento del gen 16S ARNr del muestreo 2. 1-17 muestras trabajadas. 18: Control positivo. 19: Control negativo. MPM: Marcador de peso molecular.

5.6 Amplificación de los primer específicos

5.6.1 Amplificación del primer Tox-R (*Vibrio parahaemolyticus*)

El resultado de la amplificación determinó que si hubo migración en el gel de agarosa para las muestras con el código 21 HP2 y 13 HP2, lo cual confirma la presencia de *Vibrio parahaemolyticus* tal como se observa en la figura 4.

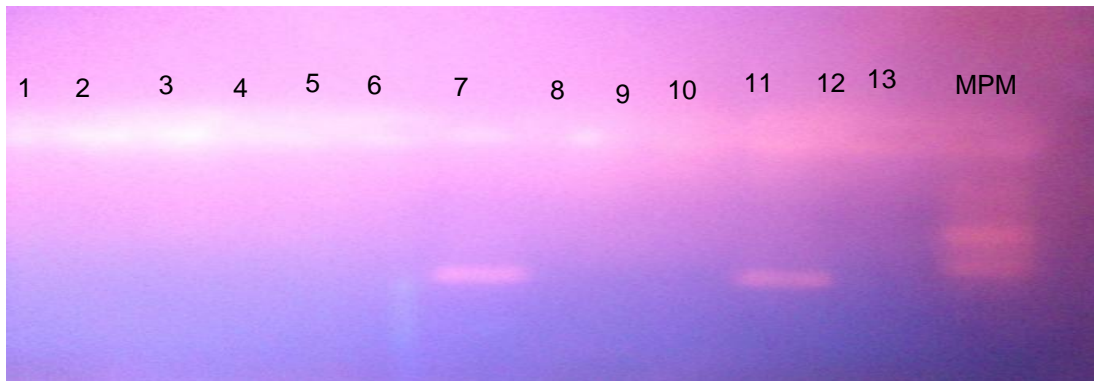


Figura 4. Amplificación de las muestras trabajadas con el primer Tox-R. 1-11 muestras trabajadas 12: Control positivo. 13: Control negativo. MPM: Marcador de peso molecular. 7 y 11 muestras amplificadas.

5.6.2 Amplificación del primer VA (*Vibrio anguillarum*)

El resultado determinó que no hubo migración de las muestras en el gel de agarosa, debido a que no se observó presencia de ADN tal como se observa en la figura 5.



Figura 5. Amplificación de las muestras trabajadas con el primer VA. 1-11 muestras trabajadas 12: Control positivo. 13: Control negativo.

5.7 Identificación de las colonias bacterianas a través de las secuencias nucleótidos del gen 16S ARNr.

La identificación bacteriana para cada una de las colonias bacterianas que fueron seleccionadas y que representaban la muestra trabajada se muestra en la tabla 8.

Tabla 10. Bacterias identificadas de las colonias bacterianas seleccionadas.

CODIGO	RESULTADO	PORCENTAJE DE SIMILITUD
1 HPI	<i>Vibrio shilonii</i>	99 %
2 HP2	<i>Vibrio communis</i>	100 %
3 HP2	<i>Vibrio harveyi</i>	100 %
9 HPI	<i>Vibrio tubiashi</i>	99 %
10 HP2	<i>Vibrio shilonii</i>	99 %
12 HPI	<i>Vibrio sp</i>	99 %
13 HP2	<i>Vibrio sp</i>	99 %
15 HPI	<i>Vibrio brasiliensis</i>	99 %
18 HP2	<i>Vibrio tubiashii</i>	99 %
18 HPI	<i>Vibrio sp</i>	99 %
20 HLI	No alineada	---
21 HLI	<i>Vibrio tubiashii</i>	99 %
21 HP2	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	99 %

VI. DISCUSIÓN

En la presente investigación fue posible identificar molecularmente a las bacterias del género *Vibrio* aisladas del hepatopáncreas y de la hemolinfa de langostinos provenientes de cultivo semi-intensivo. Las cepas de bacterias aisladas tuvieron con una porcentaje de similitud del gen 16S ARNr entre 99 y 100% y estuvieron conformadas por *V. shilonii*, *V. communis*, *V. harveyi*, *V. tubiashii*, *V. brasiliensis*, *V. parahaemolyticus* y *Vibrio sp.*

Varias de estas bacterias también han sido reportadas en otras investigaciones como parte de la flora bacteriana de muchas especies de langostinos, incluso alguna de ellas son causantes de patologías.

De los resultados obtenidos de las 13 cepas secuenciadas, una de las cepas obtenidas a partir del hepatopáncreas, se identificó como *Vibrio harveyi* con un porcentaje de similitud de 100 %. Este tipo de *Vibrio* ha sido muy mencionado en diferentes trabajos que lo reportan como patógeno de peces e invertebrados marinos particularmente de langostinos peneidos. Puede causar la enfermedad conocida como el síndrome del rojo brillante en *Litopenaeus vannamei* del pacífico (Espinoza-Valles et al. 2012, Soto et al. 2012), también infecciones hepatopancreáticas en *Penaeus monodon* (Jiravanichpaisal, Miyazaki y Limsuwan 2011). Además se ha encontrado a diferentes cepas que no necesariamente son patógenos sino que son habitantes naturales del medio acuático marino. Al respecto Gopal et al. (2004) reportó que esta especie de *Vibrio* se encuentra presente entre un 1-7% en la costa marina de la India. Así mismo Haldar et al. (2011) identificó 2 cepas no patógenas de *Vibrio harveyi* a partir de estanques de cultivo.

Se identificaron 2 cepas de *Vibrio shilonii* de las 13 cepas identificadas, estas cepas fueron aisladas del hepatopáncreas del langostino, semejante a Longyant et al. (2008) que identificaron *Vibrio Shilonii* de muestras de langostino muerto por causas desconocidas, usando técnicas moleculares utilizando el gen 16S ARNr, con el cual demostraron que la mortalidad se debía a la presencia de *Vibrio spp.*

Vibrio parahaemolyticus ha sido reportado por Gopal et al. (2005) de langostinos en cultivos de la India, utilizando pruebas bioquímicas estándar y confirmando los resultados con PCR usando los primers específicos toxR. Al

igual que en el presente trabajo, se confirmó con el uso de los primers específicos toxR, el resultado de las muestras que fueron secuenciadas con el gen 16S ARNr.

Vibrio parahaemolyticus es una especie que puede encontrarse en langostinos que no presentan síntomas de enfermedad ya que en el presente trabajo han sido encontradas dos especies de *V. parahaemolyticus*, aisladas del hepatopáncreas de langostinos sin problemas de enfermedad y Hernández-López et al. (1997) también reporta la presencia de *V. parahaemolyticus* en el intestino de langostino sano (*Penaeus californiensis*). Sin embargo, también pueden encontrarse en langostino con comportamiento y características físicas no saludables, como lo menciona Felix et al. (2011).

De los resultados obtenidos, 2 cepas bacterianas con 99% de similitud se identificaron como *Vibrio tubiashii*, estas bacterias son reportadas como bacterias presentes en moluscos bivalvos como las ostras del género *Crassostrea*, causantes de problemas en su cultivo, como menciona Richards et al. (2015) quien reporta 2 cepas de *V. tubiashii* altamente infecciosas en larvas de ostras del pacífico.

VII. CONCLUSIONES

1. Se logró identificar 6 especies de *Vibrio* en las muestras estudiadas, las que estuvieron formadas por: *V. shilonii*, *V. communis*, *V. harveyi*, *V. tubiashi*, *V. brasiliensis*, *V. parahaemolyticus*.
2. La secuenciación confirmó la idoneidad del primer utilizado para amplificar una región específica a *Vibrio parahaemolyticus*.
3. La cantidad de bacterias del género *Vibrio* representaron en total el 16,6% de las bacterias heterótrofas totales cultivables de la hemolinfa y hepatopáncreas del langostino.
4. La mayor carga bacteriana en el langostino se presenta en mayor proporción en el hepatopáncreas en relación con la hemolinfa.
5. De las 13 cepas identificadas, 10 cepas fueron colonias amarillas y 3 cepas fueron colonias verdes.

VIII. RECOMENDACIONES

1. Realizar pruebas in vivo e in vitro para determinar la patogenicidad de las cepas de *Vibrio* aisladas en el presente trabajo, principalmente aquellas que son reportadas como patógenos.
2. Secuenciar la totalidad de las cepas bacterianas aisladas de langostino (*Litopenaeus vannamei*).
3. Diseñar primers específicos para realizar ensayos con las bacterias identificadas.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Espinoza-Valles, L., S. Soto-Rodríguez, R. Edwards, Z. Wang, G. Vora, y B. Gómez-Gila. 2012. Draft Genome Sequence of the Shrimp Pathogen *Vibrio harveyi* CAIM 1792. American Society for Microbiology. p. 2104
- Felix, F., T. Nugroho, S. Silalahi, and Y. Octavia. 2011. Molecular characteristics of *Vibrio* sp causing Black Tiger Prawn (*Penaeus monodon*) Disease in Sumatra and Java shrimp ponds by 16S rDNA Sequencing. *Journal of Agricultural Technology* 7(3):679-694.
- Gomez, B., A. Roque, y A. Guerra. 2001. Enfermedades infecciosas más comunes en la camaronicultura en México y el impacto del uso de antimicrobianos. En *Camaronicultura y medio ambiente*. Ed. Paez, F., 315-345. Mazatlán, México: ICMYL-UNAM.
- Gopal, S., S. Otta, S. Kumar, I. Karunasagar, M. Nishibuchi, I. Karunasagar. 2005. The occurrence of *Vibrio* species in tropical shrimp culture environments; implications for food safety. *International journal of food microbiology* 102(2):151-9.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=The+occurrence+of+Vibrio+species+in+tropical+shrimp+culture+environments%3B+implications+for+food+safety>
- Haldar, S., S. Chatterjee, N. Sugimoto, S. Das, N. Chowdhury, A. Hinenoya, M. Asakura, S. Yamasaki. 2011. Identification of *Vibrio campbellii* isolated from diseased farm-shrimps from south India and establishment of its pathogenic potential in an *Artemia* model. *Microbiology* 157(1):179-88.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20847009>
- Hernández-López, J., T. Gollas-Galván, F. Magallón-Barajas and F. Vargas-Albores. 1997. Isolation of *Vibrio* and *Pseudomonas* from brown shrimp (*Penaeus californiensis* Holmes) intestine. *Rev Latinoam Microbiol.* 39(3-4):109-15.
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Isolation+of+Vibrio+and+Pseudomonas+from+brown+shrimp+\(Penaeus+californiensis+Holmes\)+intestine](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Isolation+of+Vibrio+and+Pseudomonas+from+brown+shrimp+(Penaeus+californiensis+Holmes)+intestine)

- P. Jiravanichpaisala, T. Miyazakia & C. Limsuwan. 2011. Histopathology, Biochemistry, and Pathogenicity of *Vibrio harveyi* Infecting Black Tiger Prawn *Penaeus monodon*. *Journal of Aquatic Animal Health*. 6(1): 27-35
- Lightner, D., y C. Pantoja. 2009. *Manual para el diagnóstico de enfermedades del camarón*. Tucson, USA: United States Department of Agriculture. <http://www.oirsa.org/aplicaciones/subidoarchivos/BibliotecaVirtual/DIAGNOSTICOENFCAMARONUSDA.pdf>
- Liu, CH., W. Cheng, JP. Hsu, JC. Chen. 2004. *Vibrio alginolyticus* infection in the white shrimp *Litopenaeus vannamei* confirmed by polymerase chain reaction and 16S rDNA sequencing. *Dis Aquat Organ*. 61(1-2):169-74 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15584425>
- Longyant, S., S. Rukpratanporn, P. Chaivisuthangkura, P. Suksawad, C. Srisuk, W. Sithigorngul, S. Piyatiratitivorakul and P. Sithigorngul. 2008. Identification of *Vibrio* spp. in vibriosis *Penaeus vannamei* using developed monoclonal antibodies. *Journal of Invertebrate Pathology* 98(1):63-8. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Identification+of+Vibrio+spp.+in+vibriosis+Penaeus+vannamei+using+developed+monoclonal+antibodies>
- Mora, H., y P. Lopéz. 2007. Valoración de la situación sanitaria del camarón *Litopenaeus vannamei* en puerto Morazán, Chinandega. Tesis Médico veterinario. Universidad nacional agraria.
- Morales-Covarrubias, M. 2008. Enfermedades bacterianas. En *Patología e inmunología de camarones penaeidos*. Ed. Morales, V. y J. Cuellar-Anjel, 117-134. Panamá, Panamá: Programa CYTED Red II-D Vannamei. <http://www.rramericas.oie.int/documentos/PATOLOGIA%20E%20INMUNOLOGIA.pdf>
- Nelson, D., y M, Cox. 2005. *Lehninger principios de bioquímica*. 4ta edición. Barcelona, España: Editorial Omega, S.A.
- Peu P., H. Brugere, A. Pourcher, M. Kerouredan, J. Godon, J. Delgenes, y P. Dabert. 2006. Dynamics of a pig slurry microbial community during anaerobic storage and management. *Applied and Environmental Microbiology*. 72(5): 3578-3585.

- Rentería, M. 2007. Breve revisión de los marcadores moleculares. En *Ecología molecular*. Ed. Eguiarte, L., V. Souza, y X. Aguirre, 549-559. México, D.F., México: Editorial Raul Marco del Pont Lelli.
- Richards G., M. Watson, D. Needleman, K. Church y C. Häse. 2015. Mortalities of Eastern and Pacific oyster Larvae caused by the pathogens *Vibrio coralliilyticus* and *Vibrio tubiashii*. *Appl Environ Microbiol* 81(1):292-7. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25344234>
- Wilson K. 1997. *Current protocols in molecular biology*. Australian Institute of Marine Science. Townsville, Australia.

ANEXOS

ANEXO 1. Secuenciación obtenida de las 12 muestras secuenciadas

Secuencia obtenida de la muestra 1HPI

CTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGAAACGAGTTATCTGAACCTTCGGGGGACGATAACGG
CGTCGAGCGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAAATTGCCCTGATGTGGGGGATAACCATTGGAAACGATGGCTAATACCG
CATAATACCTTCGGGTCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTCGCGTCAGGATATGCCTAGGTGGGATTAGCTAGTTGGTGAGG
TAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAAGTACGACACGGTCCAGACTCCT
ACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGG
TTGTAAAGCACTTTTCAGTCGTGAGGAAGGTAGTGTAGTTAATAGCTGCATTATTTGACGTTAGCGACAGAAGAAGCACCGGCTA
ACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGGTGCAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCATGCAGGTGGTTTG
TTAAGTCAGATGTGAAAGCCCGGGGCTCAACCTCGGAATAGCATTGAAACTGGCAGACTAGAGTACTGTAGAGGGGGGTAGA
ATTCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGAAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAGATACTGACACTC
AGATCGCAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTCTACTTGGAGGTTGTGGCC
TTGAGCCGTGGCTTCGGAGCTAACGCGTTAAGTAGACCGCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTAACCTCAAATGAATTGAC
GGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACTCTTGACATCCAGAGAACTT
TCCAGAGATGGATTGTTGCCTTCGGGAACTCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGAAATGTTGGGTTA
AGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCCTGTTTCCAGCACTTCGGGTGGGAACTCCAGGGAGACTGCCGGTGATAAACCGG
AGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGGCCCTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGCATACAGAGGGCG
GCCAACTTGCAGAGTGTAGCGAATCCAAAAAGTGCCTGATGTCGGATCGGAGTCTGCAACTCGACTCCGTGAAGTCGGAA
TCGCTAGTAATCGTGGATCANAATGCCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTGGGC
TGCAAAAAGAAGTAGGTAGTTAACCTTCGGGAGGACGCTTACCCTTTGTGGTTCATGACTGGGGTGAAGTCGTAACCAAGG
TAAC

Secuencia obtenida de la muestra 2 HP2

AGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGAAACGAGTTATCTGAACCTTCGGGGAAACGATAACGGCGT
CGAGCGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAAATTGCCCTGATGTGGGGGATAACCATTGGAAACGATGGCTAATACCGCAT
AATGCCTACGGGCCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTCGCGTCAGGATATGCCTAGGTGGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAA
TGGCTACCAAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAAGTACGACACGGTCCAGACTCCTACG
GGAGCGACAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTG
TAAAGCACTTTTCAGTCGTGAGGAAGGTAGTGTAGTTAATAGCTGCATTATTTGACGTTAGCGACAGAAGAAGCACCGGTA
CCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGGTGCAGCGTTAATCGGAATTAAGTGGCGTAAAGCGCATGCAGGTGGTTTGTAA
AGTCAGATGTGAAAGCCCGGGGCTCAACCTCGGAATAGCATTGAAACTGGCAGACTAGAGTACTGTAGAGGGGGGTAGAATT
TCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGAAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAGATACTGACACTCAG
ATGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTCTACTTGGAGGTTGTGGCCCT
GAGCCGTGGCTTCGGAGCTAACGCGTTAAGTAGACCGCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTAACCTCAAATGAATTGACGG
GGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACTCTTGACATCCAGAGAACTTTC
CAGAGATGGATTGTTGCCTTCGGGAACTCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGAAATGTTGGGTTAA
GTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCCTGTTTCCAGCGAGTAATGTCCGGAACTCCAGGGAGACTGCCGGTGATAAACCGG
AGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGGCCCTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGCATACAGAGGGCA
GCAAGCTAGCGATAGTGTAGCGAATCCAAAAAGTGCCTGATGTCGGATCGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAA
TCGCTAGTAATCGTGGATCAGAATGCCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTGGGC
TGCAAAAAGAAGTAGGTAGTTAACCTTCGGGAGGACGCTTACCCTTTGTGGTTCATGACTGGGTGA

Secuencia obtenida de la muestra 3 HP2

CTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGAAACGAGTTATCTGAACCTTCGGGGAAACGATAACGG
CGTCGAGCGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAAATTGCCCTGATGTGGGGGATAACCATTGGAAACGATGGCTAATACCG
CATAATGCCTACGGGCCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTCGCGTCAGGATATGCCTAGGTGGGATTAGCTAGTTGGTGAGG
TAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAAGTACGACACGGTCCAGACTCCT
ACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGG
TTGTAAAGCACTTTTCAGTCGTGAGGAAGGTAGTGTAGTTAATAGCTGCATTATTTGACGTTAGCGACAGAAGAAGCACCGGCTA
ACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGGTGCAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCATGCAGGTGGTTTG
TTAAGTCAGATGTGAAAGCCCGGGGCTCAACCTCGGAATAGCATTGAAACTGGCAGACTAGAGTACTGTAGAGGGGGGTAGA
ATTCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGAAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAGATACTGACACTC
AGATCGCAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTCTACTTGGAGGTTGTGGCC

TTGAGCCGTGGCTTTCGGAGCTAACGCGTTAAGTAGACCGCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTA AAACTCAAATGAATTGAC
GGGGCCCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACTCTTGACATCCAGAGAACT
TCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACTCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTGAAATGTTGGGTTA
AGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCCTGTTTCCAGCGAGTAATGTCGGGAACTCCAGGGAGACTGCCGGTGATAAACCG
GAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGCATAACAGAGGGC
AGCAAGCTAGCGATAGTGAGCGAATCCCAAAAAGTGCGTCGATGTCGGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGA
ATCGTAGTAATCGTGGATCAGAATGCCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTGGG
CTGCAAAAAGAAGTAGGTAGTTAACCTTCGGGAGGACGCTTACCACCTTGTGGTTCATGACTGGGGTGAAGTC

Secuencia obtenida de la muestra 9 HPI

TCAGATTGAACGCTGGCGGACGGCTAACACATGCAAGTCGAGCGGAAACGACTTAACTGAACCTTCGGGGAACGTTAAGGGC
GTCGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTGGGAAATTGCCCTGATGTGGGGGATAACCATTGGAAACGATGGCTAATACCGC
ATAATAGCTTCGGCTCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCTCTCGCGTCAGGATATGCCAGGTGGGATTAGCTAGTTGGTGAGGT
AAGGGCTACCAAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAAGTGAACACGGTCCAGACTCCTA
CGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGT
TGTAAGTACTTTCAGCAGTGAGGAAGTTCATGCGTTAATAGCGTATGGATTTGACGTTAGCTGCAGAAGAAGCACC GGCTA
ACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGGTGCAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCATGCAGGTGTTTG
TTAAGTCAGATGTGAAAGCCCGGGGCTCAACCTCGAATTGCATTTGAAACTGGCAGACTAGAGTACTGTAGAGGGGGGTAGA
ATTCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGAAGGAATACCGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAGATACTGACACTC
AGATGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTCTACTTGGAGGTTGTGGCC
TTGAGCCGTGGCTTTCGGAGCTAACGCGTTAAGTAGACCGCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTA AAACTCAAATGAATTGAC
GGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACTTTGACATCCAGAGAACTT
TCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACTCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTGAAATGTTGGGTTA
AGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCCTGTTTCCAGCGAGTAATGTCGGGAACTCCAGGGAGACTGCCGGTGATAAACCG
GAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGCATAACAGAGGGC
GGCAACTTTCGAAAAGTGAGCGAATCCCAAAAAGTGCGTCGATGTCGGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGA
ATCGTAGTAATCGTGGATCAGAATGCCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTGGG
CTGCAAAAAGAAGTAGGTAGTTAACCTTCGGGAGAACGCTTACCACCTTGTGGTTCATGACTGGGGTGAAGTC

Secuencia obtenida de la muestra 10 HP2

CGAATCCGACCCAATAGACCANCGTCTTATGTTGCAGACTCCTCATCTTGCTGTGGATCCCNCGACCAAGATCACTGGAGGG
CTGGTACTTTTNGACTCCCCAAATCCCTCGGCGACCAGGACAACTTAAACCNNNNNNNNNNNNGGAGTATTTNAAAGTTTT
TTTNNANCTCAGATTGAACGCTGGCGGACGGCTAACACATGCAAGTCGAGCGGAAACGAGTAACTGAACCTTCGGGGAAC
GTTAACGGCGTCGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTGGGAAATTGCCCTGATGTGGGGGATAACCATTGGAAACGATGGC
TAATACCGCATAATAGCTTCGGCTCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCTCTCGCGTCAGGATATGCCAGGTGGGATTAGTAGTT
GGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAAGTGAACACGGTCCA
GACTCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCCGTGTATGAAGAAGGC
CTTCGGGTTGTAAAGTACTTTCAGCAGTGAGGAAGGTGGGTATGTTAATAGCATACTCATTTGACGTTAGTGCAGAAGAAGCA
CCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGGTGCAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCATGCAG
GTGGTTTGTAAAGTCAGATGTGAAAGCCCGGGCTCAACCTCGGAATTGCATTTGAAACTGGCAAACTAGAGTACTGTAGAGG
GGGGTAGAATTTAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGAAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAGATA
CTGACACTCAGATGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTCTACTTGGAG
GTTGTGGCCTTGAAGCGTGGCTTTCGGAGCTAACGCGTTAAGTAGACCGCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTA AAACTCAA
TGAATTGACGGGGGCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACTTTGACATCT
ACAGAAGCCAGCGGAGACGAGGTGTGCCTTCGGGAACTGTAAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTGAAA
TGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCCTGTTTCCAGCACTTCGGGTGGGAACTCCAGGGAGACTGCCGGTG
ATAAACCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGCATA
AGAGGGCGGCAACTTTCGAAAAGTGAGCGAATCCCAAAAAGTGCGTCGATGTCGGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGA
AGTCGGAATCGTAGTAATCGTGGATCAGAATGCCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTCACACCATGG
GAGTGGGCTGCAAAAAGAAGTGGGTAGTTAACCTTCGGGAGGACGCTTACCACCTTGTGGTTCATGACTGGGGTGAAGTC

Secuencia obtenida de la muestra 12 HPI

AGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGAAACGAGTTATCTGAACCTTCGGGGAACGATAAC
GGCGTCGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAAATTGCCCTGATGTGGGGGATAACCATTGGAAACGATGGCTAATAC
CGCATAATGCCTACGGGCCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTCGCGTCAGGATATGCCTAGGTGGGATTAGCTAGTTGGTGA
GGTAATGGCTACCAAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAAGTGGACACGGTCCAGACTC
CTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCG
GGTTGTAAGCACTTTAGTCGTGAGGAAGGTGAGTGTAAATAGCACTATCATTGACGTTAGCGACAGAAGAAGCACCGG
CTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAGCGTAAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCATGCAGGTGGT
TTGTTAAGTCAGATGTGAAAGCCCGGGGCTCAACCTCGGAATAGCATTGAAACTGGCAGACTAGAGTACTGTAGAGGGGGGT
AGAATTCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGAAGGAATACCGGTGGCGAAGCGGCCCTGGACAGATACTGAC
ACTCAGATGCGAAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTCTACTTGGAGGTTGT
GGCCTTGAGCCGTGGCTTCGGAGCTAACGCGTAAAGTAGACCGCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTAAGTCAAATGAAT
TGACGGGGGCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACTCTTGACATCCAGAG
AACTTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGAACTCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTGTCAGCTCGTGTGTGAAATGTTG
GGTTAAGTCCCACAACGAGCGCAACCCTTATCCTGTTTCCAGCGAGTAATGTCGGGAACTCCAGGGAGACTGCCGGTGATAA
ACCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGCATACAGA
GGGCAGCAAGCTAGCGATAGTAGCGAATCCCAAAAAGTGCCTGATGTCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGT
CGGAATCGTAGTAATCGTGGATCAGAATGCCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCGTCACACCATGGGAG
TGGGCTGCAAAAAGAAGTAGGTAGTTAACCTTCGGGAGGACGCTTACCCTTTGTGGTTCATGACTGGGGTGAAGTCGTA

Secuencia obtenida de la muestra 13 HP2

CTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGAAACGAGTTATCTGAACCTTCGGGGAACGATAACGG
CGTCGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAAATTGCCCTGATGTGGGGGATAACCATTGGAAACGATGGCTAATACCG
CATGATGCCTACGGGCCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTCGCGTCAGGATATGCCTAGGTGGGATTAGCTAGTTGGTGGAG
TAAGGGCTACCAAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAAGTGGACACGGTCCAGACTCCT
ACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGG
TTGTAAGCACTTTAGTCGTGAGGAAGGTAGTGTAGTTAATAGCTGCATTATTTGACGTTAGCGACAGAAGAAGCACCGGCTA
ACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGGTGCAGCGTAAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCATGCAGGTGGTTTG
TTAAGTCAGATGTGAAAGCCCGGGGCTCAACCTCGGAATTGCATTGAAACTGGCAGACTAGAGTACTGTAGAGGGGGGTAGA
ATTCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGAAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCTGGACAGATACTGACACTC
AGATGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTCTACTTGGAGGTTGTGGCC
TTGAGCCGTGGCTTCGGAGCTAACGCGTAAAGTAGACCGCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTAAGTCAAATGAATTGAC
GGGGGCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACTCTTGACATCCAGAGAACTT
TCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGAACTCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTGTCAGCTCGTGTGTGAAATGTTGGGTTA
AGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCCTGTTTCCAGCGAGTAATGTCGGGAACTCCAGGGAGACTGCCGGTGATAAACCG
GAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGCATACAGAGGGC
AGCCAATTGCGAAAAGTGAAGCAATCCCAAAAAGTGCCTGATGTCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGA
ATCGTAGTAATCGTGGATCAGAATGCCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCGTCACACCATGGGAGTGGG
CTGCAAAAAGAAGTAGGTAGTTAACCTTCGGGGGACGCTTACCCTTTGTGGTTCATGACTGGGGTGAAGTCGTA

Secuencia obtenida de la muestra 15 HPI

TATGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGAAACGAGTTAACTGAACCTTCGGGGAACGTT
AACGGCGTCGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTGGGAAATTGCCCTGATGTGGGGGATAACCATTGGAAACGATGGCTAA
TACCGCATAATAGCTTCGGCTCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTCGCGTCAGGATATGCCAGGTGGGATTAGCTAGTTGG
TGAGGTAATGGCTACCAAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAAGTGGACACGGTCCAGA
CTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTT
CGGGTTGTAAGTACTTTCAGCAGTGAAGGAAGGCGGAGTCGTTAATAGCGGCCTCGTTTACGTTAGCTGCAGAAGAAGCACC
GGTAACCTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAGCGTAAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCATGCAGGT
GGTTTGTAAAGTCAGATGTGAAAGCCCGGGGCTCAACCTCGGAATTGCAATTGAAACTGGCAGACTAGAGTACTGTAGAGGGG
GGTAGAATTTAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGAAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCTGGACAGATACT
GACACTCAGATGCGAAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTCTACTTGGAGGT
TGTGGCCTTGAGCCGTGGCTTCGGAGCTAACGCGTAAAGTAGACCGCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTAAGTCAAATG

AATTGACGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACTCTTGACATCCAG
AGAACTTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACTCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTGAAATGT
TGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCCTGTTTCCAGCACTTCGGGTGGGAACTCCAGGGAGACTGCCGGTGATA
AACCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTC AAGTCAATCATGCCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGCATAACG
AGGGCGGCCAACTTGCGAAAGTGAGCGAATCCAAAAAGTGCCTGCTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAG
TCGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGAATGCCACGGTGAATACGTTCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTCACACCATGGGA
GTGGGCTGCAAAAGAAGTGGGTAGTTTAACTTCGGGAGGACGCTACCACTTTGTGGTTCATGACTGGGGTGA

Secuencia obtenida de la muestra 18 HP2

TCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGAAACGACTTAACTGAACCTTCGGGGAACGTTAAGGGC
GTCGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTGGGAAATTGCCCTGATGTGGGGGATAACCATTGGAAACGATGGCTAATACCGC
ATAATAGCTTCGGCTCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCTCTCGCGTCAGGATATGCCAGGTGGGATTAGCTAGTTGGTGAGGT
AAGGGCTACCAAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAAGTGAAGACACGCTCCAGACTCCTA
CGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGT
TGTAAGTACTTTAGCAGTGAAGGAGGTTTCATGCGTTAATAGCGTATAGATTTGACGTTAGCTGCAGAAGAAGCACCGGCTAA
CTCCGTGCCAGCAGCCCGGTAATACGGAGGGTGCAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCATGCAGGTGGTTTGT
TAAGTCAGATGTGAAAGCCCGGGGCTCAACCTCGGAATTGCATTTGAAACTGGCAGACTAGAGTACTGTAGAGGGGGGTAGAA
TTTCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGAAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCTGGACAGATACTGACACTCA
GATGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCGTAAACGATGTCTACTTGGAGGTTGTGGCCT
TGAGCCGTGGCTTTCGGAGCTAACGCGTTAAGTAGACCGCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTAAGTCAAATGAATTGACG
GGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACTCTTGACATCCAGAGAACTTT
CCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACTCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTGAAATGTTGGGTTAA
GTCCCGCAACGAGCGCAACCTTATCCTGTTTCCAGCGAGTAATGTCCGGAACTCCAGGGAGACTGCCGGTGATAAACCGG
AGGAAGGTGGGGACGACGTC AAGTCAATCATGCCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGCATAACAGAGGGCG
GCCAACTTGCGAAAGTGAGCGAATCCAAAAAGTGCCTGCTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAA
TCGCTAGTAATCGTGGATCAGAATGCCACGGTGAATACGTTCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTGGG
TGCAAAAGAAGTAGGTAGTTTAACTTCGGGAGAACGCTTACCACTTTGTGGTTCATGACTGGGGTGA

Secuencia obtenida de la muestra 18 HPI

TAGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGAAACGAGTTAACTGAACCTTCGGGGAACGTTA
ACGGCGTCGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTGGGAAATTGCCCTGATGTGGGGGATAACCATTGGAAACGATGGCTAAT
ACCGCATAATAGCTTCGGCTCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCTCTCGCGTCAGGATATGCCAGGTGGGATTAGCTAGTTGGT
GAGGTAATGGCTACCAAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAAGTGAAGACACGCTCCAGAC
TCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCCGTGTATGAAGAAGGCCTTC
GGGTTGTAAGTACTTTAGCAGTGAAGGAGGTTGGTATGTTAATAGCATACTCATTTGACGTTAGCTGCAGAAGAAGCACCG
GCTAACTCCGTGCCAGCAGCCCGGTAATACGGAGGGTGCAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCATGCAGGTG
GTTTGTAAAGTCAAGTGTGAAAGCCCGGGGCTCAACCTCGGAATTGCATTTGAAACTGGCAAAGTACTGTAGAGGGGG
GTAGAATTTAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGAAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCTGGACAGATACTG
ACACTCAGATGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCGTAAACGATGTCTACTTGGAGGTT
GTGGCCTTGAGCCGTGGCTTTCGGAGCTAACGCGTTAAGTAGACCGCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTAAGTCAAATGA
ATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACTCTTGACATCTACA
GAAGCCAGCGGAGACGAGGTGTGCCTTCGGGAACTGTAAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTGAAATGT
TGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCCTGTTTCCAGCACTTCGGGTGGGAACTCCAGGGAGACTGCCGGTGATA
AACCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTC AAGTCAATCATGCCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGCATAACG
AGGGCGGCCAACTTGCGAAAGTGAGCGAATCCAAAAAGTGCCTGCTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAG
TCGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGAATGCCACGGTGAATACGTTCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTCACACCATGGGA
GTGGGCTGCAAAAGAAGTGGGTAGTTTAACTTCGGGAGGACGCTACCACTTTGTGGTTCATGACTGGGGTGAAGTC

Secuencia obtenida de la muestra 20 HLI

TATGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGAAACGAGTTAACTGAACCTTCGGGGAACGTT
AACGGCGTCGAGCGCGGACGGGTGAGTAATGCCTGGGAAATTGCCCTGATGTGGGGGATAACCATTGGAAACGATGGCTAA
TACCGCATAATAGCTTCGGCTCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTCGCTCAGGATATGCCAGGTGGGATTAGCTAGTTGG
TGAGGTAATGGCTACCAAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACTGGAAGTGAACACGGTCCAGA
CTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCTGTATGAAGAAGGCCTT
CGGGTTGTAAGTACTTTCAGCAGTGAGGAAGGTGTTGGTGTAAATAGCGGTATCATTGACGTTAGCTGCAGAAGAAGCACC
GGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGGTGCAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCATGCAGGT
GGTTTGTAAAGTCAGATGTGAAAGCCCGGGGCTCAACCTCGGAATTGCATTTGAAACTGGCAGACTAGAGTACTGTAGAGGGG
GGTAGAATTTAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGAAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCTGGACAGATACT
GACTCAGATGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTCTACTTGGAGGT
TGTGGCCTTGAGCCGTGGCTTTCGGAGCTAACGCGTTAAGTAGACCGCCTGGGGAGTACGGTGCAGGATTAACACTCAAATG
AATTGACGGGGGCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACTACTCTTGACATCCAG
AGAACTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTGAAATGT
TGGGTTAAGTCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCCTGTTTCCAGCACTTCGGGTGGGAACCTCAGGGGAGACTGCCGGTGATA
AACCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGCATAACAG
AGGGCGGCCAACTTGCAGAGTGAGCGAATCCAAAAAGTGCCTGCTAGTCCGGATCGGAGTCTGCAACTCGACTCCGTGAAG
TCGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGAATGCCACGGTGAATACGTTCCCGGCCTGTACACACCGCCGTCACACCATGGGA
GTGGGCTGCAAAAGAAGTGGGTAGTTAACCTTCGGGGGGGACGCTACCCTTTGTGGTTCATGACTGGGGGTGAAGTCGTA

Secuencia obtenida de la muestra 21 HP2

TCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGAAACGAGTTATCAGAACCTTCGGGGGACGATAACGG
CGTCGAGCGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAAATTGCCCTGATGTGGGGGATAACCATTGGAAACGATGGCTAATACCG
CATGATGCCTACGGCCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTCGCTCAGGATATGCCTAGGTGGGATTAGCTAGTTGGTGAAG
TAAGGGCTACCAAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACTGGAAGTGAACACGGTCCAGACTCCT
ACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGG
TTGTAAAGCACTTTCAGTCGTGAGGAAGGTGGTGTAGTTAATAGCTGCATCATTGACGTTAGCGACAGAAGAAGCACCCGGTA
ACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGGTGCAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCATGCAGGTGGTTTG
TTAAGTCAGATGTGAAAGCCCGGGGCTCAACCTCGGAATTGCATTTGAAACTGGCAGACTAGAGTACTGTAGAGGGGGTAGA
ATTCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGAAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCTGGACAGATACTGACTC
AGATGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTCTACTTGGAGGTTGTGGCC
TTGAGCCGTGGCTTTCGGAGCTAACGCGTTAAGTAGACCGCCTGGGGAGTACGGTGCAGGATTAACACTCAAATGAATTGAC
GGGGGCCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACTACTCTTGACATCCAGAGAACTT
TCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTGAAATGTTGGGTTA
AGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCCTGTTTCCAGCGAGTAATGTCGGGAACCTCAGGGGAGACTGCCGGTGATAAACCG
GAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGCATAACAGAGGGC
AGCCAACTTGCAGAAAGTGAAGCGAATCCAAAAAGTGCCTGCTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGA
ATCGTAGTAATCGTGGATCAGAATGCCACGGTGAATACGTTCCCGGCCTGTACACACCGCCGTCACACCATGGGAGTGGG
CTGCAAAAGAAGTAGGTAGTTAACCTTCGGGGGGGACGCTACCCTTTGTGGTTCATGACTGGGGTGA

ANEXO 2. Resultado final de la secuencia de nucleótidos de cada una de las muestras trabajadas.

1 HPI

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> Vibrio shilonii strain MP-3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2739	2739	99%	0.0	99%	AY911392.1
<input type="checkbox"/> Vibrio shilonii strain VSS-012 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2717	2717	99%	0.0	99%	FJ485944.1

Figura 6. Resultado final de la secuencia de nucleótidos que corresponde a un 99 % de similitud de *Vibrio shilonii*. Según el programa BLAST de la base de datos delNIH.

2 HP2

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> Vibrio sp. MY-2008-U28 partial 16S rRNA gene, isolate U28	2723	2723	100%	0.0	99%	FM957470.1
<input type="checkbox"/> Vibrio sp. MY-2008-U27 partial 16S rRNA gene, isolate U27	2723	2723	100%	0.0	99%	FM957469.1
<input type="checkbox"/> Vibrio communis strain J821 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2717	2717	99%	0.0	100%	JF836185.1

Figura 7. Resultado final de la secuencia de nucleótidos que corresponde a un 99 % de similitud de *Vibrio communis*. Según el programa BLAST de la base de datos delNIH.

3 HP2

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> Vibrio sp. MY-2008-Teta2 partial 16S rRNA gene, isolate Teta2	2732	2732	100%	0.0	99%	FM957462.1
<input type="checkbox"/> Vibrio harveyi strain SW-3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2732	2732	100%	0.0	99%	AY911396.1
<input type="checkbox"/> Vibrio sp. 98CJ11027 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2730	2730	99%	0.0	99%	AF246980.1

Figura 8. Resultado final de la secuencia de nucleótidos que corresponde a un 99 % de similitud de *Vibrio harveyi*. Según el programa BLAST de la base de datos delNIH.

9 HPI

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> Vibrio tubiashii ATCC 19109 chromosome 1, complete sequence	2713	26612	100%	0.0	99%	CP009354.1
<input type="checkbox"/> Vibrio alginifesta gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: NBRC 14665	2708	2708	99%	0.0	99%	AB680645.1
<input type="checkbox"/> Vibrio alginifesta gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: NBRC 14666	2708	2708	99%	0.0	99%	AB680646.1

Figura 9. Resultado final de la secuencia de nucleótidos que corresponde a un 99 % de similitud de *Vibrio tubiashii*. Según el programa BLAST de la base de datos delNIH.

10 HP2

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Vibrio shilonii strain MP-3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2728	2728	89%	0.0	99%	AY911392.1
Vibrio shilonii strain Y99-012 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2717	2717	88%	0.0	99%	FJ485944.1
Vibrio sinobaiensis strain CAIM 752 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2630	2630	89%	0.0	99%	EU043380.1

Figura 10. Resultado final de la secuencia de nucleótidos que corresponde a un 99 % de similitud de *Vibrio shilonii*. Según el programa BLAST de la base de datos delNIH.

12 HPI

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Vibrio sp. MY-2008-U34d partial 16S rRNA gene, isolate U34d	2739	2739	99%	0.0	99%	FM957474.1
Vibrio sp. EF3B-B166 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2728	2728	99%	0.0	99%	KC545338.1
Vibrio sp. MY-2008-U33 partial 16S rRNA gene, isolate U33	2728	2728	99%	0.0	99%	FM957473.1

Figura 11. Resultado final de la secuencia de nucleótidos que corresponde a un 99 % de similitud de *Vibrio sp.* Según el programa BLAST de la base de datos delNIH.

13 HP2

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Vibrio sp. MY-2008-U34d partial 16S rRNA gene, isolate U34d	2739	2739	99%	0.0	99%	FM957474.1
Vibrio sp. EF3B-B166 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2728	2728	99%	0.0	99%	KC545338.1
Vibrio sp. MY-2008-U33 partial 16S rRNA gene, isolate U33	2728	2728	99%	0.0	99%	FM957473.1

Figura 12. Resultado final de la secuencia de nucleótidos que corresponde a un 99 % de similitud de *Vibrio sp.* Según el programa BLAST de la base de datos delNIH.

15 HPI

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Vibrio brasiliensis strain LMG 20546 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2684	2684	98%	0.0	99%	NR_117887.1
Vibrio brasiliensis strain LMG 20546 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2680	2680	99%	0.0	99%	NR_025477.1
Vibrio tubiashii ATCC 19109 chromosome 1, complete sequence	2669	26407	99%	0.0	99%	CP009354.1

Figura 13. Resultado final de la secuencia de nucleótidos que corresponde a un 99 % de similitud de *Vibrio brasiliensis*. Según el programa BLAST de la base de datos delNIH.

18 HP2

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Vibrio tubiashii ATCC 19109 chromosome 1, complete sequence	2700	26527	99%	0.0	99%	CP009354.1
Vibrio alginifesta gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: NBRC 14665	2699	2699	99%	0.0	99%	AB680645.1
Vibrio alginifesta gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: NBRC 14666	2699	2699	99%	0.0	99%	AB680646.1

Figura 14. Resultado final de la secuencia de nucleótidos que corresponde a un 99 % de similitud de *Vibrio tubiashii*. Según el programa BLAST de la base de datos de NIH.

18 HPI

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Vibrio shilonii strain MP-3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2739	2739	99%	0.0	99%	AY911392.1
Vibrio shilonii strain VSS-012 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2717	2717	99%	0.0	99%	FJ485944.1
Vibrio sinoaloensis strain CAIM 752 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2638	2638	99%	0.0	99%	EU043380.1

Figura 15. Resultado final de la secuencia de nucleótidos que corresponde a un 99 % de similitud de *Vibrio shilonii*. Según el programa BLAST de la base de datos de NIH.

21 HLI

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Vibrio tubiashii ATCC 19109 chromosome 1, complete sequence	2667	26588	99%	0.0	99%	CP009354.1
Vibrio sp. LA1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2665	2665	99%	0.0	99%	JF682609.1
Vibrio brasiliensis strain LMG 20546 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2651	2651	99%	0.0	99%	NR_025477.1

Figura 16. Resultado final de la secuencia de nucleótidos que corresponde a un 99 % de similitud de *Vibrio tubiashii*. Según el programa BLAST de la base de datos de NIH.

21 HP2

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Vibrio parahaemolyticus strain 1937 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2723	2723	100%	0.0	99%	KM036061.1
Vibrio parahaemolyticus UCM-V493 chromosome 1, complete sequence	2723	21296	100%	0.0	99%	CP007004.1
Vibrio parahaemolyticus O1:K33 str. CDC K4557 chromosome 1, complete sequence	2717	27084	100%	0.0	99%	CP006008.1

Figura 17. Resultado final de la secuencia de nucleótidos que corresponde a un 99 % de similitud de *Vibrio parahaemolyticus*. Según el programa BLAST de la base de datos de NIH.