



T  
639.543  
D687

# ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DEL LITORAL



FACULTAD DE INGENIERIA MARITIMA Y CIENCIAS DEL  
MAR  
ACUICULTURA

---

## “PRODUCCION DE ANTICUERPOS MONOCLONALES Y DESARROLLO DE INMUNOENSAYOS PARA LA IDENTIFICACION DE UNA CEPA DE *Vibrio alginolyticus* UTILIZADA COMO PROBIOTICO”.

---

TESIS DE GRADO  
Previa obtención del Título de:  
**ACUICULTOR**

Presentada por:  
EDWARD DONOSO GOMEZ

GUAYAQUIL - ECUADOR  
1996

# DEDICATORIA



A MIS PADRES y a mi Hermano:

Por el gran esfuerzo,  
confianza y fé que han  
puesto en mí.

A **Lucía.**

## DECLARACION EXPRESA

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

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



.....  
Edward Donoso Gómez



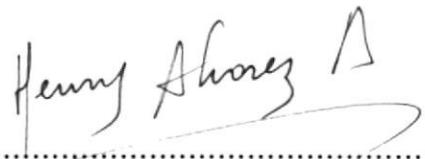
---

Jorge Calderón, Ph.D.  
Presidente del Tribunal  
Director de Tesis



---

Tamara de Ross, M.Sc.  
Miembro Principal



---

Henry Álvarez, Ac.  
Miembro Principal

## AGRADECIMIENTO

Antes de presentar este trabajo deseo dejar constancia de mi agradecimiento a todas aquellas personas que contribuyeron para la realización del mismo:

En primer lugar al Dr. Jorge Calderón, Director del CENAIM (Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas), por las oportunidades que se prestan en el Centro para la realización de trabajos de este tipo.

Para la Dra. Lucía Carrera, por concederme el honor de dirigir esta Tesis y saber guiarme ante las dificultades que presentan trabajos de esta índole, *desde donde tú estés siempre serás mi guía.*

Para el Dr. Olivier Condamines, mi más profunda gratitud por el gran interés demostrado en este trabajo y por el apoyo humano manifestado en la dirección, revisión y corrección del mismo.

A Sonny Mendoza y Philippe Audiot, mis primeros maestros y amigos, jóvenes científicos que con su paciencia y ejemplo supieron iniciarme en el mundo de la investigación y ayudarme cada día a realizar paso a paso este trabajo.

A todo el personal científico del CENAIM, quienes estuvieron en todo momento prestos a ayudarme con toda la buena voluntad del mundo con las dudas e inquietudes que se presentaron durante el desarrollo de mi tesis “.....*Muchas gracias a la equipa*”

A mis compañeros y amigos, con quienes compartimos los buenos y malos momentos la mayor parte del tiempo que convivimos teniendo como objetivo común la realización de nuestros trabajos de tesis.

Como algo muy especial, quisiera dejar constancia de mi admiración y gratitud al Dr. Eric Mialhe, jefe, compañero y amigo que con su gran experiencia científica supo guiar y dirigir este trabajo; gracias por la confianza depositada y por dedicarnos gran parte de tu valioso tiempo. *¡MERCİ BEAUCOUP....CHER AMI ...ERIC!*

A mis profesores de ESPOL, ninguna gran obra es posible sin la edificación de bases sólidas y correctas.

Finalmente, deseo expresar mi gratitud a mi familia. Mis queridos padres Julián y Esther, mi hermano Manuel Francisco y todos mis familiares que sin su ayuda material, moral y humana con la que siempre he contado, nunca hubiera podido elegir este camino.

*Detrás de esta tesis hay muchos años de apoyo, confianza y amor.*

## ABREVIATURAS UTILIZADAS

ACF:	adyuvante completo de Freund
BCIP:	5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato
CBC:	carbonato bicarbonato
CPA:	célula presentadora de antígenos
DMSO:	dimetilsulfoxido
EDTA:	etilen diamino tetra-acético
ELISA:	ensayo inmunosorbente de enzima ligada
HAT:	hypoxantina aminopterin timidina
HGPRT:	hypoxantina guanina fosforibosil transferasa
IFA:	inmunofluorescencia
Ig:	inmunoglobulina
NBT:	nitro blue tetrazolium
NE:	no específico
p-NPP:	p-nitrofenilfosfato
PBS:	tampón fosfato salino
PEG:	polyethylene glicol
SVF:	suero fetal bovino
TA:	temperatura ambiente
TCBS:	agar thiosulfato citrato y sales biliares
TSB:	caldo tripticasa de soya
UV:	ultravioleta

## RESUMEN

Las enfermedades bacterianas son particularmente importantes en los laboratorios tal es el caso del Síndrome de "bolitas" que luego de una fase epidémica se transformó en una endemia a una escala relativamente grande. Esta enfermedad, ocasionada por *Vibrio harveyi*, se mostró difícil de controlar con la ayuda de antibióticos, lo que ha ocasionado la aparición de resistencia y contaminación del medio ambiente.

Una alternativa, iniciada por los productores, fue la de utilizar bacterias de la flora normal para prevenir el desarrollo de la enfermedad, siendo este efecto "probiótico" debido a una capacidad de competición con las bacterias patógenas. Una cepa probiótica de *Vibrio alginolyticus*, denominada Ili, fue aislada y utilizada como probiótico. La falta de herramientas para detectar y cuantificar la cepa probiótica, impidió que la utilización de probióticos supere ciertos problemas para su aplicación, por lo que se hacía indispensable la incorporación de técnicas y metodologías que nos permitan tener un mayor control en el uso de probióticos.

El presente trabajo fue emprendido con el objetivo de preparar anticuerpos monoclonales específicos de la cepa Ili y de desarrollar una inmunopruueba de tipo colony-blot que permita la detección y la cuantificación muy simple, rápida y confiable de esta bacteria entre las poblaciones bacterianas complejas asociadas a las larvas de camarones en condiciones de laboratorio.

Se inmunizaron ratones Balb/c con suspensiones bacterianas previamente sometidas a ciclos de congelación y descongelación. Según la técnica de hibridación linfocitaria, se obtuvieron 447 hibridomas preclonados, de los cuales 118 fueron primeramente seleccionados por dot-blot en base a su reactividad contra Ili. Una segunda operación de selección por dot-blot, utilizando otras cepas bacterianas (*V. alginolyticus*, cepa 158; *V. harveyi*, cepa E22; *Escherichia coli*), permitió seleccionar 13 hibridomas estrictamente específicos de la cepa "Ili" y 3 específicos de *V. alginolyticus*.

Luego del clonaje, se seleccionaron 3 hibridomas (2B6, 2G1 y 12G6) en base a su calidad de crecimiento y a la intensidad de respuesta contra Ili determinada en ELISA.

El anticuerpo monoclonal 2B6 fue subsecuentemente utilizado para desarrollar y optimizar una prueba de tipo colony-blot. Esta inmunopruueba se mostró perfectamente específica y permitió detectar y cuantificar colonias de Ili en cajas de Petri desde la quinta hora de cultivo, mientras que las colonias son todavía invisibles al ojo humano. Esta inmunopruueba colony-blot fue evaluada para el uso de la bacteria probiótica Ili en situaciones experimentales y está en curso de evaluación en laboratorios comerciales.

## INDICE GENERAL

RESUMEN.....	VII
INDICE GENERAL.....	VIII
INDICE DE TABLAS.....	XI
INDICE DE FIGURAS.....	XII
INTRODUCCION.....	XIII
I ANTECEDENTES.....	16
1.1 Enfermedades bacterianas en cultivos de camarón.....	16
1.2 Anticuerpos y antígenos.....	20
1.3 Anticuerpos policlonales.....	27
1.4 Anticuerpos monoclonales.....	29
1.5 Inmunoensayos.....	36
1.5.1 Colony-blot.....	38
1.5.2 Dot-blot.....	40
1.5.3 Inmunofluorescencia.....	41
1.5.4 ELISA.....	43
1.5.4.1 ELISA indirecto.....	43
1.5.4.2 ELISA tipo “sánduche”.....	45
II MATERIALES Y METODOS.....	48
2.1 Cultivo y preparación de diferentes suspensiones de bacterias.....	48
2.1.1 Las bacterias.....	48
2.1.2 Preparación de la suspensión inmunógena.....	49
2.1.3 Inmunización de ratones.....	49
2.2 Producción de anticuerpos monoclonales.....	50



2.2.1 Medios de cultivo.....	50
2.2.1.1 Medio de cultivo celular básico.....	50
2.2.1.2 Medio de cultivo para mielomas.....	51
2.2.1.3 Medio selectivo HAT.....	51
2.2.1.4 Medio selectivo HT.....	52
2.2.1.5 Medio de cultivo para hibridomas .....	52
2.2.2 Hibridación linfocitaria.....	52
2.2.2.1 Preparación del Poyethylene glycol.....	52
2.2.2.2 Preparación de macrófagos.....	53
2.2.2.3 Preparación de mielomas.....	54
2.2.2.4 Obtención de linfocitos.....	55
2.2.2.5 Fusión celular.....	56
2.2.3 Técnica de clonaje.....	58
2.2.4 Producción de anticuerpos en líquido ascítico.....	59
2.2.5 Criopreservación y descongelación de células.....	60
2.3 Métodos de detección del antígeno bacteriano.....	61
2.3.1 Preparación de la suspensión bacteriana utilizada como antígeno para ELISA indirecto.....	61
2.3.2 ELISA indirecto.....	62
2.3.3 Dot-blot.....	63
2.3.4 Colony-blot.....	65
2.3.4.1 Protocolo básico.....	65
2.3.4.2 Protocolo optimizado.....	66
2.3.4.3 Solución substrato.....	67
III RESULTADOS.....	69
3.1 Producción de anticuerpos.....	69
3.1.1 Inmunógeno.....	70
3.1.2 Inmunización de ratones.....	70
3.1.3 Estado de inmunización de los ratones.....	71
3.1.4 Hibridación linfocitaria.....	74
3.1.4.1 Fusión celular F1.....	75
3.1.4.2 Fusión celular F2.....	77
3.1.4.3 Selección de los hibridomas de interés.....	79
3.1.4.4 Clonaje.....	82

3.2 Colony blot.....	87
3.2.1 Desarrollo del protocolo de colony-blot.....	87
3.2.1.1 Tiempo de cultivo bacteriano.....	87
3.2.1.2 Tiempo de permanencia de la membrana sobre el cultivo bacteriano.....	89
3.2.1.3 Condiciones de saturación y lavados.....	91
 CONCLUSIONES.....	 93
 RECOMENDACIONES.....	 97
 ANEXOS.....	 98
 BIBLIOGRAFIA.....	 101

## INDICE DE TABLAS

Tabla 1:	Evaluación del estado de inmunización de los ratones R1 y R2 y de un control no inmunizado (dot-blot).....	72
Tabla 2:	Estado de inmunización del ratón R2 antes y después de la última inyección.....	73
Tabla 3:	Resultados obtenidos durante la Fusión F1 con linfocitos obtenidos del ratón R2.....	76
Tabla 4:	Resultados obtenidos durante la Fusión F2 con linfocitos obtenidos del ratón R1.....	78
Tabla 5:	Hibridomas seleccionados con un dot-blot contra cuatro cepas bacterianas.....	81
Tabla 6:	Porcentaje de crecimiento de los hibridomas clonados.....	83
Tabla 7:	Influencia del tiempo de cultivo en la calidad del revelado de las colonias.....	88
Tabla 8:	Influencia del tiempo de permanencia de la membrana sobre el cultivo bacteriano en la calidad del revelado.....	90
Tabla 9:	Tres condiciones diferentes usadas para tratar diferentes combinaciones entre los tampones de saturación y lavado.....	91

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Estructura básica de las inmunoglobulinas.....	22
Figura 2: Principio esquemático de la cinética de producción de inmunoglobulinas.....	26
Figura 3: Principio de la hibridación linfocitaria.....	30
Figura 4: Selección de los hibridomas después de la operación de hibridación con el medio selectivo HAT.....	32
Figura 5: Partes constitutivas de un inmunoensayo.....	36
Figura 6: Colony blot.....	39
Figura 7: Inmunofluorescencia directa e indirecta.....	42
Figura 8: Principio de ELISA indirecto.....	44
Figura 9: Principio de ELISA "sánduche".....	46
Figura 10: Producción de anticuerpos monoclonales.....	68
Figura 11: Comparación de la señal entre Ili, E22 y control no específico entre los seis clones obtenidos del hibridoma 2G1.....	85
Figura 12: Comparación de la señal entre Ili, E22 y control no específico entre los seis clones obtenidos del hibridoma 12G6.....	85
Figura 13: Comparación de la señal entre Ili, E22 y control no específico entre los seis clones obtenidos del hibridoma 2B6.....	86

## INTRODUCCION

El Ecuador como primer productor de camarón en cautiverio en América Latina ha estructurado toda una actividad económica que integra empresas empacadoras, granjas camaroneras y fuentes de abastecimiento de larvas.

Las larvas pueden ser de dos tipos según su origen: larvas salvajes y larvas de laboratorio. Las larvas salvajes son consideradas bien resistentes y de buena calidad pero su captura ocasiona impacto en el medio y dependencia del mismo. Las larvas de laboratorio, son generalmente menos apreciadas pero son el único sistema de abastecimiento en algunos países, en donde se ha logrado cierta independencia del medio y una reducción del impacto ambiental si se lleva un control adecuado de captura de reproductores.

Uno de los problemas que se presentan en la producción de larvas de laboratorio es el de las enfermedades bacterianas, especialmente vibriosis.

Los vibrios se presentan dominantes entre las cepas aisladas de camarones infectados por bacterias (Cheng, 1989; Huang, 1990). Estas mismas especies de vibrios que afectan a *Penaeus vannamei* pueden causar mortalidades en otras especies de camarones peneidos (Lavilla-Pitogo, 1989).

La utilización de antibióticos en los laboratorios de larvas para controlar infecciones bacterianas ha demostrado no ser eficiente debido al desarrollo de resistencias después de su uso prolongado.

Como una alternativa de control para disminuir el uso de antibióticos, se ha escogido el uso de bacterias consideradas como probióticas, esta práctica actualmente se la realiza en forma empírica sin demostración fiable y sin conocimiento del mecanismo de acción de estas bacterias.

Es necesario por lo tanto desarrollar estudios enfocados a dos niveles principales: primero, en investigación básica para verificar el efecto probiótico y comprender el mecanismo de interacción camarón-patógeno-probiótico; segundo, sobre las cepas probióticas y el modo de empleo en rutina de laboratorios comerciales de larvas.

Para esta doble perspectiva de investigación es imprescindible la producción de herramientas de estudio bajo la forma de reactivos específicos y de pruebas que permitan reconocer las diferentes cepas de bacterias y en particular las consideradas como probióticas. La biotecnología moderna nos presenta técnicas como la hibridación linfocitaria para la producción de anticuerpos monoclonales que puedan ser utilizados en pruebas de inmunodiagnóstico, para este tipo de investigación.

Dentro de la realización de este estudio se describe la preparación de anticuerpos monoclonales dirigidos contra la cepa Ili de *Vibrio alginolyticus* considerada como “probiótica” y la utilización de los mismos para el desarrollo de métodos de inmunodetección y de seguimiento de la cepa probiótica.

## CAPITULO I

### ANTECEDENTES

#### **1.1 Enfermedades bacterianas en cultivos de camarón**

Las enfermedades bacterianas son una seria amenaza para muchas especies de animales marinos cultivados. Los sistemas de cultivo intensivo se caracterizan generalmente por tener altas densidades de siembra y excesiva carga orgánica. En este tipo de sistemas, el balance dinámico natural entre flora bacteriana y los organismos acuáticos cultivados puede ser desequilibrado por pequeños cambios ambientales favoreciendo el desarrollo de microorganismos patógenos, desfavoreciendo la fisiología de las larvas más sensibles.

Estos microorganismos estrictamente patógenos pueden ser introducidos directa o indirectamente a los sistemas de cultivo a través del agua, algas y/o artemia, (Igarashi et al., 1989; y Dehasque et al., 1993). La habilidad para controlar la aparición de enfermedades bacterianas en los cultivos intensivos de larvas de camarones penaeidos es un factor

importante para el éxito de la producción y calidad de la larva en laboratorios comerciales.

La mayoría de las prácticas de manejo para controlar microorganismos se basan en métodos no selectivos como la desinfección del agua (tratamiento con UV, cloro, filtración, etc.), en el uso de algas “limpias”, uso de artemia lavada y otras prácticas de higiene como desinfección de equipos y baños de pie (Mendoza, 1995).

Antibióticos son usados para tratar de controlar las bacterias patógenas o reducir el número total de bacterias (Austin y Austin, 1993). Una de las desventajas en la utilización de los antibióticos es su efecto no específico por el cual son eliminadas además de las bacterias patógenas, bacterias de la flora normal o bacterias “probióticas”. También, el uso de estos antibióticos sin estimar concentraciones letales mínimas, es un hecho favorable para el desarrollo de cepas resistentes. Además, con el uso de antibióticos aparecen problemas de contaminación ambiental asociados con la toxicidad de los químicos y la presencia como trazas de drogas restringidas en tejidos de camarones que van a ser utilizados para consumo humano.

Otra estrategia desarrollada principalmente en cultivos de países asiáticos es la de mantener un equilibrio entre las

bacterias y otros microorganismos en los sistemas de cultivo (Maeda, 1989; Maeda et al., 1992; Gomes 1992).

Una alternativa consiste en el uso de lo que se conoce como bacterias probióticas. Aprovechando los conocimientos sobre la utilización de este tipo de bacterias en otras áreas como en salud humana, en donde los datos de sus beneficios son muy bien documentados; por ejemplo sobre el uso de bacterias digestivas beneficiosas (Gilliland, 1979; Sandine 1979). *Lactobacillus acidophilus* se usa comunmente para controlar y prevenir infecciones por *Escherichia coli* y otros microorganismos patógenos del tracto intestinal de muchos animales terrestres ( Ellinger et al., 1980).

Recientemente han sido citados intentos de uso de bacterias “probióticas” para la acuicultura. En cultivos de peces, Gatesoupe (1991) describió el uso de esporas de *Bacillus sp.* como una herramienta para reducir infecciones bacterianas así como para obtener incrementos significantes en el peso del Turbot *Scophthalmus maximus*. En cultivo de moluscos, Douillet y Langdon (1994) reportaron una cepa bacteriana que incrementa el crecimiento en la ostra del Pacífico *Crassostrea gigas*.

En lo que respecta al cultivo de camarones, se ha identificado una cepa de bacteria de un extracto de suelo que incrementa

la supervivencia y la frecuencia de muda en larvas de *P. monodon* (Maeda y Liao, 1992).

El uso de probióticos en laboratorios comerciales de larvas de camarón *P. vannamei* ha sido reportado por Daniels (1993) y por Garriques y Wyban (1993).

Estudios realizados por Garriques y Arévalo (1994) tuvieron como objetivo aislar cepas bacterianas de *Vibrio alginolyticus* del mar, desarrollar sistemas de cultivo masivo de estas bacterias para luego incorporarlas a los tanques de larvicultura y demostrar cómo esta cepa bacteriana realmente mejora el crecimiento de las larvas en comparación con la profilaxis con antibióticos. Después de realizar infecciones experimentales, dos cepas de *V. alginolyticus* no mostraron efecto patógeno en las larvas, además que no tuvieron ningún efecto negativo sobre la población de algas. Se evidenciaron incrementos en las tasas de sobrevivencia y de crecimiento en las larvas de los tanques en los que se aplicó el probiótico (cepa de *V. alginolyticus*), en comparación con aquellas de los tanques en los que se realizó la profilaxis con antibióticos, demostrando la ventaja del uso de bacterias probióticas.

Garriques y Arévalo (1994) presentan algunas teorías que explican el todavía incierto papel que juegan estos probióticos en sistemas acuícolas:

- Competitividad espacial con bacterias patógenas.
- Mejoramiento de la nutrición por nutrientes esenciales suplementarios.
- Mejoramiento de la digestión por enzimas esenciales suplementarias.
- Eliminación directa de materia orgánica disuelta mediada por la bacteria.
- Producción de sustancias que inhiben el crecimiento de patógenos oportunistas.

El manejo de la flora bacteriana en los sistemas acuícolas por medio de la inoculación de bacterias beneficiosas o “probióticas” es una alternativa viable para asegurar la continuidad de la industria camaronera acuícola. Sin embargo como se ha mencionado anteriormente, poco se conoce sobre las bacterias probióticas y su mecanismo de acción. Para identificar cepas de bacterias probióticas y estudiar sus interacciones con otras bacterias asociadas a camarones, los anticuerpos para inmunodiagnóstico son herramientas muy apropiadas.

## 1.2 Anticuerpos y antígenos

Los anticuerpos constituyen un medio de defensa utilizado por el sistema inmunitario de los vertebrados superiores para

luchar contra la presencia de moléculas extrañas dentro del organismo, estas moléculas extrañas también denominadas antígenos, frecuentemente son microorganismos tales como virus, bacterias o parásitos. Los anticuerpos poseen la propiedad de reconocer tales moléculas extrañas y participar en la eliminación de estas del organismo.

Cada anticuerpo reconoce específicamente un antígeno dado (especificidad) y posee la capacidad de ligarse fuertemente al antígeno (afinidad) para formar el complejo antígeno-anticuerpo (Padlan, 1977). Estas dos propiedades importantes, especificidad y afinidad que caracterizan a la reacción antígeno-anticuerpo pueden ser utilizadas, gracias a la biotecnología, para la producción de herramientas de reconocimiento específico (anticuerpos monoclonales) que permitan luego la detección y la cuantificación de varias moléculas (antígenos) como por ejemplo las proteínas constituyentes de una bacteria.

Los anticuerpos son glicoproteínas globulares genéricamente llamadas *inmunoglobulinas* (Ig, PM 150000) que presentan una estructura común, definida independientemente por Porter y Edelman en los años 1960. En la Fig. 1 se puede apreciar esta estructura de las inmunoglobulinas.

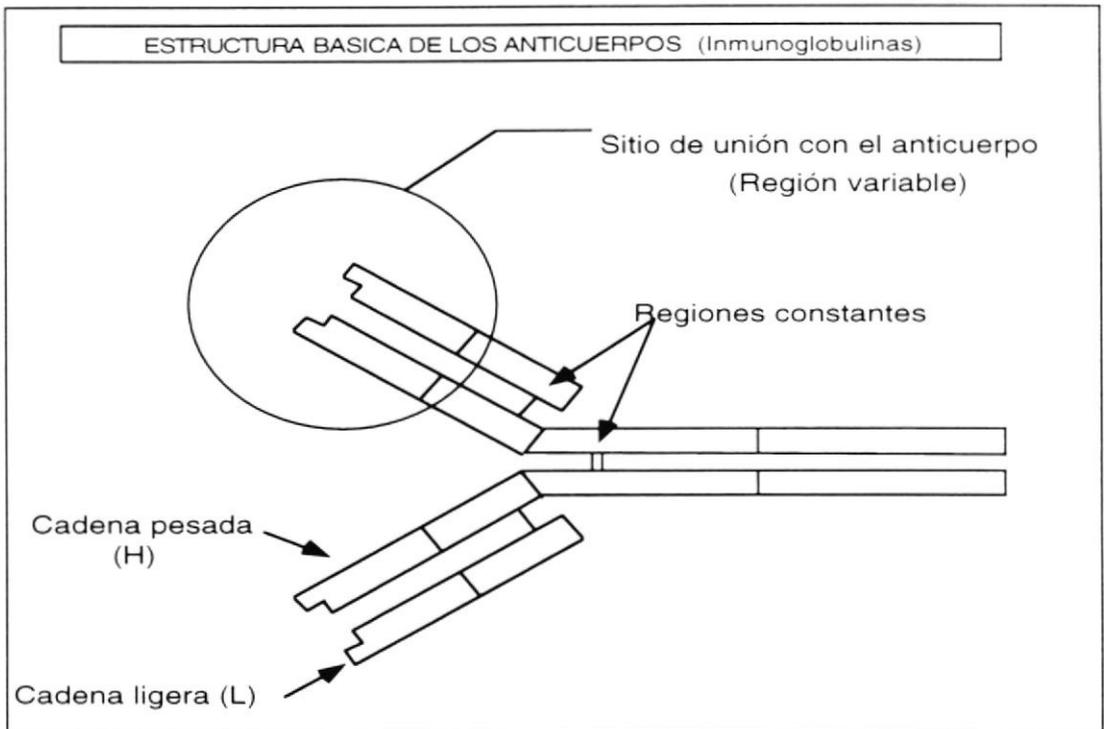


FIGURA 1: Estructura básica de las inmunoglobulinas (anticuerpos).

Comprenden 2 cadenas pesadas H y dos cadenas ligeras L unidas entre sí por puentes disulfuro (S-S). Cada cadena contiene una región constante (C) común en todas las inmunoglobulinas de una misma clase y una región variable (V) diferente entre un anticuerpo y otro. Además, tanto en las cadenas H como en las cadenas L existen subregiones dentro de la región variable (V) de los diferentes anticuerpos donde la variabilidad es máxima y por lo tanto reciben el nombre de regiones hipervariables (hV).

Las regiones variables son las que proporcionan la especificidad a los anticuerpos. Los anticuerpos son divalentes y tienen dos

sitios idénticos de unión con el antígeno.

La especificidad de los anticuerpos para reconocer un antígeno es muy alta, tanto así que es posible distinguir la diferencia entre dos péptidos a nivel de los aminoácidos. Otro ejemplo para ilustrar la alta especificidad de un anticuerpo está dado por el trabajo de Thurnman et al., 1990 referente a la detección específica de un herbicida atrazine (de la familia triazina) y donde es posible de ver que la modificación de sólo un grupo radical etilo en la estructura química del antígeno disminuye dramáticamente el reconocimiento por parte de los anticuerpos.

Los anticuerpos son sintetizados por células especializadas del sistema inmunitario llamadas *linfocitos B*. En los vertebrados existen aproximadamente  $5 \times 10^7$  linfocitos B distribuidos por los tejidos linfoides y también por la sangre circulante.

Cada antígeno induce la producción de anticuerpos contra él, debido a que al ingresar una partícula extraña (virus, bacterias, hongos, etc.), existen células especializadas, como los macrófagos, para englobar o fagocitar dichas partículas extrañas y luego de procesarlas, dividir las en fragmentos que van a presentarse sobre la superficie de estas *células presentadoras de antígenos* (CPA) ligados a una glicoproteína de la membrana (Moller, G. 1978).

Luego de esto, estas *células presentadoras del antígeno* van a asociarse con los linfocitos T (ligándose el complejo glicoproteína-fragmento de antígeno de las CPAs con los receptores de la membrana de los linfocitos T) para llevar a la proliferación de los linfocitos T gracias a la segregación de factores conocidos con el nombre de *interlukinas* (Moller G., 1982).

Al mismo tiempo que sucede la proliferación de los linfocitos T específicos para cada fragmento de antígeno, los linfocitos B también procesan antígenos de la misma manera que las CPAs, es decir que se produce la degradación del antígeno en fragmentos que van a aparecer luego en la superficie de las células (linfocitos B) ligadas a una glicoproteína.

Finalmente, la unión de los linfocitos B con los linfocitos T específicos es el mayor factor de regulación en la producción de anticuerpos ya que este contacto provee de un estímulo que lleva a la proliferación y diferenciación de los linfocitos B y por ende a la producción de anticuerpos específicos, este sistema se puede imaginar como una cerradura (antígeno procesado y presentado por las CPAs a los linfocitos T) ante la cual se presentan millones de llaves (diferentes tipos de linfocitos B maduros con anticuerpos fijados en su membrana) y cuando la buena combinación se encuentra, el linfocito o los

linfocitos B que reconocen el antígeno son activados por segunda vez para empezar a proliferar y secretar anticuerpos específicos en el suero.

Al final de este proceso conocido como *respuesta primaria del sistema inmunitario*, el antígeno es eliminado quedando linfocitos B específicos que sirven como células memoria y que si el mismo antígeno es introducido por segunda vez al organismo, existe la “automática” e inmediata activación de estos linfocitos B adecuados, que producen el anticuerpo “correcto” (Cerotini, et al., 1970). A esta propiedad se denomina el fenómeno de *memoria del sistema inmunitario* y representa el principio básico de la vacunación. Para un proceso de vacunación eficiente es necesario el conocimiento correcto de la cinética de la producción de las inmunoglobulinas (anticuerpos) en los diferentes organismos ya que sólo así es posible determinar el momento apropiado para aplicar los respectivos refuerzos.

El conocimiento correcto de la cinética de producción de las inmunoglobulinas es también importante cuando se realiza la obtención de anticuerpos en animales de laboratorio, para saber cada cuanto tiempo se realizan los refuerzos de la inmunización y cuando se da la mayor respuesta de producción de las inmunoglobulinas. Esta cinética de la producción de anticuerpos tanto en la primera y segunda respuesta se puede apreciar en la figura 2.

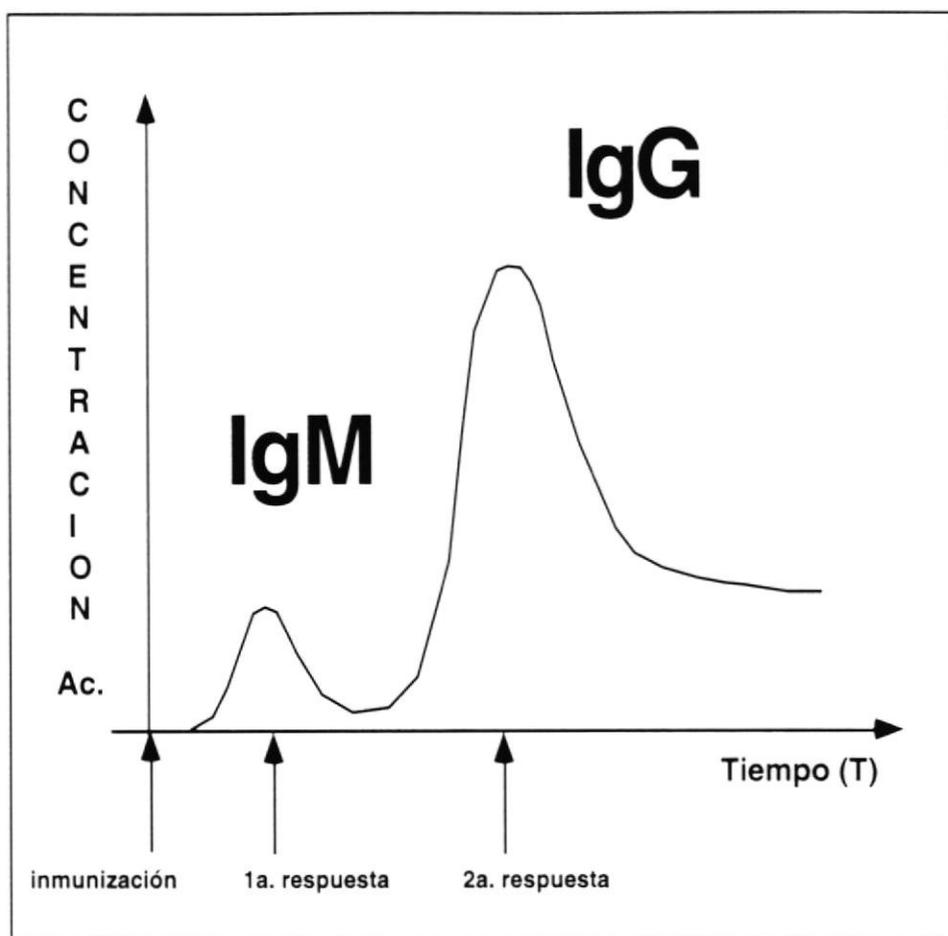


FIGURA 2: Principio esquemático de la cinética de producción de inmunoglobulinas

La característica de los anticuerpos de reconocer específicamente un antígeno los convierte en herramientas útiles en investigación para detección, cuantificación y seguimiento del antígeno, permitiendo diagnósticos rápidos y precisos.

Para la producción de anticuerpos se han desarrollado técnicas

que están basadas en la inyección a animales de experimentación (inmunización) con partículas extrañas (bacterias, parásitos, proteínas, etc.) que actuarán como antigénicas produciendo una respuesta inmune (Muñoz J., 1964). Como consecuencia de esta respuesta inmune, el animal reacciona produciendo anticuerpos específicos contra el antígeno inyectado, estos anticuerpos se pueden utilizar como reactivos para detectar esas mismas partículas en otras muestras.

Dependiendo de la técnica de obtención existen dos tipos de anticuerpos: anticuerpos policlonales y anticuerpos monoclonales.

### **1.3 Anticuerpos policlonales**

Se denomina anticuerpos policlonales a la mezcla de varios tipos de anticuerpos en el suero de los vertebrados superiores resultantes de una respuesta inmune general; el número elevado de clones diferentes que producen cada uno un tipo de anticuerpo son los responsables de esta mezcla de anticuerpos presentes en el inmunosuero que pueden reaccionar con las diferentes estructuras antigénicas del inmunógeno (sustancia con la cual se inmuniza para producir la respuesta inmune).

Dentro de los métodos de producción de anticuerpos, uno de los más simples es el de producción de anticuerpos policlonales, que consiste en inyectar animales de laboratorio *-inmunizar-*, como por ejemplo conejos, cuyes o ratones, con el antígeno contra el cual queremos que se produzcan anticuerpos; un tiempo después de esta inmunización en el suero del animal se encontrará diferentes tipos de anticuerpos cada uno reconocedores específicos de las diferentes estructuras antigénicas que poseía el inmunógeno. Es decir, el sistema inmunitario del animal inmunizado realizó el trabajo de la producción de anticuerpos policlonales.

El antisuero así obtenido contiene cantidades limitadas y también variables de anticuerpos específicos que se caracterizan por la heterogenicidad y su relativamente baja concentración. La poliespecificidad que poseen se debe al número elevado de determinantes o estructuras antigénicas que producen cada una un tipo diferente de anticuerpo.

Las ventajas que presentan los anticuerpos policlonales por la simplicidad de su obtención son: bajo costo de producción, no hay necesidad de usar técnicas complicadas, y su poliespecificidad se puede considerar una ventaja cuando se desea anticuerpos que reconozcan antígenos a un nivel no tan específico, por ejemplo reconocer bacterias a nivel de género y no de especie.

Los anticuerpos policlonales son una solución cuando existe la posibilidad de realizar una inmunización con suspensiones antigénicas altamente purificadas. Recientemente para la acuicultura han sido descritos algunos protocolos de purificación de patógenos de moluscos, protozoarios, rickettsias, etc. muy eficientes permitiendo la posibilidad de producir anticuerpos policlonales altamente específicos (Lewis, 1986; Mialhe et al, 1988; Le Gall y Mialhe, 1992).

#### 1.4 Anticuerpos monoclonales

Las limitaciones del antisuero -suero que posee anticuerpos- en cuanto a baja concentración, poliespecificidad y cantidad limitada de anticuerpos han sido superadas con el desarrollo de técnicas que permiten manipular y cultivar células de mamíferos que sintetizan anticuerpos in vitro.

Kohler y Milstein (1975), desarrollaron una técnica denominada “hibridación linfocitaria” para inmortalizar y cultivar in vitro las células secretoras de anticuerpos (linfocitos B); mediante esta técnica se puede disponer en cantidades ilimitadas de las células productoras de anticuerpos específicos provenientes de un sólo clon de linfocitos B, anticuerpos monoclonales; contrariamente a la mezcla de anticuerpos policlonales presentes en el suero de los animales inmunizados, los anticuerpos monoclonales son homogéneos y reconocen con una especificidad estricta a un sólo determinante o

estructura antigénica de un antígeno determinado.

La hibridación linfocitaria, como técnica de inmortalización de los linfocitos se basa en el siguiente principio: Los *linfocitos B*, células productoras de anticuerpos obtenidas del bazo de animales previamente inmunizados e imposible de cultivar *in vitro*, son fusionados con células *mielomas* mutantes incapaces de producir inmunoglobulinas y de proliferación ilimitada. Figura 3.

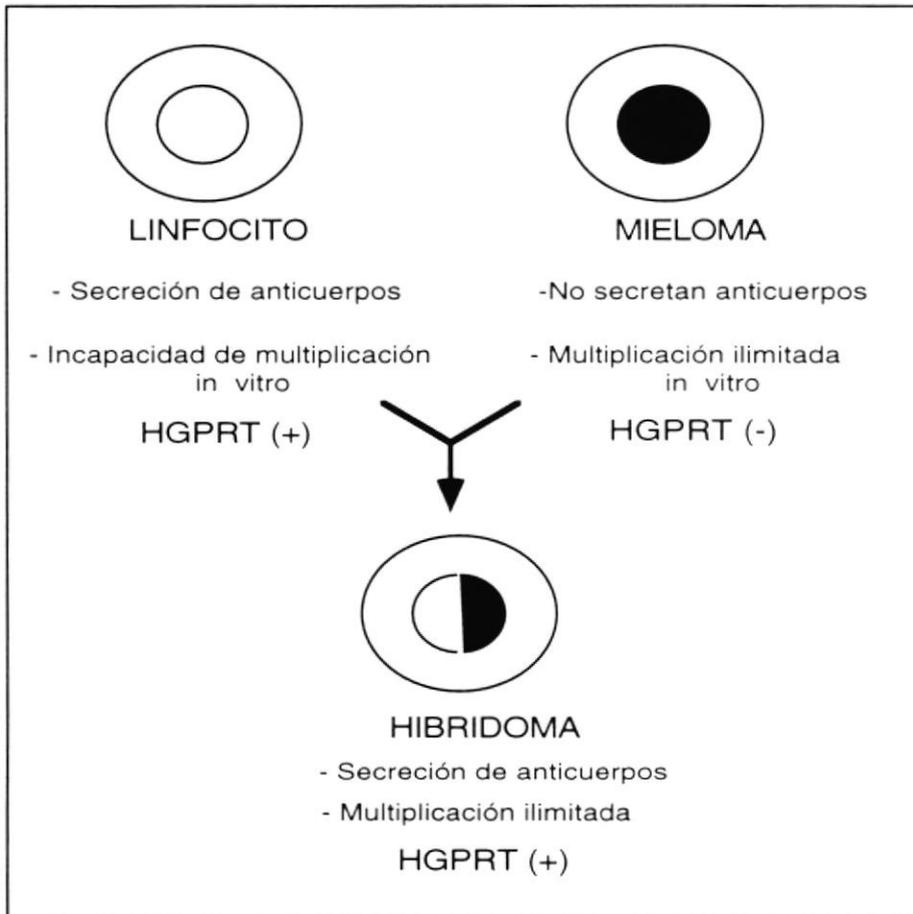


FIGURA 3: Principio de la Hibridación Linfocitaria.

Esta unión se lleva a cabo gracias a la ayuda de un químico, polyethylene glicol -PEG- que fusiona una célula *linfocito* con una célula *mieloma* a nivel de las membranas para formar una sólo célula llamada *hibridoma* que presenta las características de ambas células parenterales: secreción de anticuerpos (de los linfocitos) e inmortalidad (de los mielomas).

Luego de haber realizado la hibridación linfocitaria, habrá en las placas de cultivo varios tipos de células: linfocitos -L- y mielomas -M- que no se fusionaron, linfocitos fusionados con linfocitos -LL-, mielomas fusionados con mielomas -MM- y los hibridomas -ML-. La selección de hibridomas se la realiza gracias a la presencia de una enzima llamada hypoxantina guanina fosforibosil transferasa (HGPRT), presente en los linfocitos y en los hibridomas pero no en los mielomas, lo cual nos permite la utilización de un medio selectivo llamado HAT que contiene hypoxantina aminopterina timidina. La función de la aminopterina en el medio HAT es de bloquear la vía primaria de síntesis de nucleótidos, por lo que en aquellas células que no poseen la enzima HGPRT y por lo tanto carecen de la vía secundaria (mielomas) se impide de esta forma su proliferación. Los linfocitos que no se multiplican *in vitro* son rápidamente suplantados por los hibridomas que poseen la enzima HGPRT, la función de la hypoxantina y de la timidina del medio HAT es la de ser utilizados en la vía secundaria de síntesis de nucleótidos para la producción de hibridomas gracias a la enzima HGPRT que poseen. Figura 4.

CULTIVO	Medio HAT	EXPLICACION
 MIELOMA	M U E R E N	No tienen la posibilidad enzimática de metabolizar Hipoxantina/Timidina Además la Aminoptericina inhibe su crecimiento
 LINFOCITO	M U E R E N	No pueden crecer en cultivos in vitro
 HIBRIDOMA	C R E C E N	Crecen correctamente y Producen anticuerpos

FIGURA 4: Método de selección de los hibridomas después de la operación de hibridación linfocitaria con el medio selectivo HAT.

Además, una vez que tenemos la seguridad de tener hibridomas solamente en las placas de cultivo celular, es necesario realizar una selección de los hibridomas secretores de los anticuerpos que son capaces de reconocer el antígeno de nuestro interés,

es decir, el utilizado para la inmunización, ya que habrá diferentes hibridomas que se han formado a partir de diferentes linfocitos, cada uno secretor de un tipo particular de anticuerpo. Dicha selección se realiza mediante inmunoensayos para reconocimiento de antígenos en los cuales se analiza si en el sobrenadante de cultivo de los hibridomas existe la presencia de los anticuerpos que reconocen el antígeno específico de interés.

Cuando tenemos seleccionados los pozos que contienen los hibridomas de interés, es necesario realizar un clonaje de dichas células, es decir, mediante diluciones límites, se realiza una nueva distribución de los hibridomas en cada pozo de nuevas placas para asegurar que los hibridomas que crezcan en los hoyos de estas nuevas placas de clonaje se originen a partir de una sola célula (clon).

Luego del desarrollo de los hibridomas en las placas de clonaje, es necesario realizar nuevamente la selección de los pozos que poseen los hibridomas de interés, selección que se realiza mediante un inmunoensayo adecuado y que se basa en dos criterios: a) calidad de crecimiento de las células, y b) especificidad en el reconocimiento del antígeno.

Al tener seleccionados los clones de interés, las células son llevadas a cultivo en el medio adecuado en volúmenes sucesivos

cada vez mayores para poder obtener los anticuerpos que se encuentran a baja concentración en el sobrenadante de estos cultivos de hibridomas o realizar la inyección de tales hibridomas en ratones para inducir a la formación de un tumor líquido el cual es rico en anticuerpos monoclonales, este fluido se denomina *líquido ascítico* (Potter M., 1972).

Finalmente, los hibridomas son congelados y mantenidos en nitrógeno líquido, los mismos que cuando sea necesario se van a descongelar para iniciar su cultivo y lograr un nuevo abastecimiento de anticuerpos.

El uso de anticuerpos monoclonales está ampliamente desarrollado en el campo de la salud humana, actualmente son utilizados en la identificación rutinaria de tejidos, para estudios epidemiológicos de microorganismos infecciosos, en la identificación de tumores, identificación y clasificación de poblaciones funcionales de diferentes tipos de linfocitos T.

La utilización de estos anticuerpos en el campo de la acuicultura ha venido tomando mayor fuerza en los últimos años, tanto así que se ha producido anticuerpos monoclonales que identifican patógenos en técnicas de diagnóstico más específicas y sensibles así como también permiten realizar estudios epidemiológicos de dichos patógenos; además, se han producido anticuerpos para poder controlar diversos factores



(de crecimiento e inmunitarios) en peces, moluscos y crustáceos.

El uso de anticuerpos monoclonales en la acuicultura de camarones tiene algunos antecedentes; se han producido anticuerpos monoclonales contra algunas proteínas de la hemolinfa de camarón *P. japonicus* y dos de ellos pueden ser utilizados como marcadores de tipos hemocitarios (Rodríguez et al., 1995); se produjeron anticuerpos monoclonales contra *Vibrio vulnificus* y *V. harveyi* con el propósito de emplearlos en la comparación de diferentes inmunoensayos para detección de vibriosis en camaronas (Song Y. L. et al., 1992); se obtuvo anticuerpos monoclonales para reconocimiento de la cepa S2 de *V. harveyi*, causante de la enfermedad en larvas de camarón conocida como “Síndrome de bolitas” (publicación en preparación).

Una vez que tenemos los anticuerpos, es posible utilizarlos como inmunoreactivos en diferentes técnicas basadas en el hecho de que muchas de las reacciones antígeno-anticuerpo que suceden en el interior del organismo de un animal (in vivo), igualmente pueden llevarse a cabo de manera experimental (in vitro), bajo condiciones controladas de laboratorio para ser utilizadas ampliamente en diagnóstico; a estas técnicas se las conoce con el nombre común de inmunoensayos.

## 1.5 Inmunoensayos

Se basan en la reacción *antígeno-anticuerpo* y se las realiza mediante el uso de inmunoreactivos producidos y marcados en laboratorio.

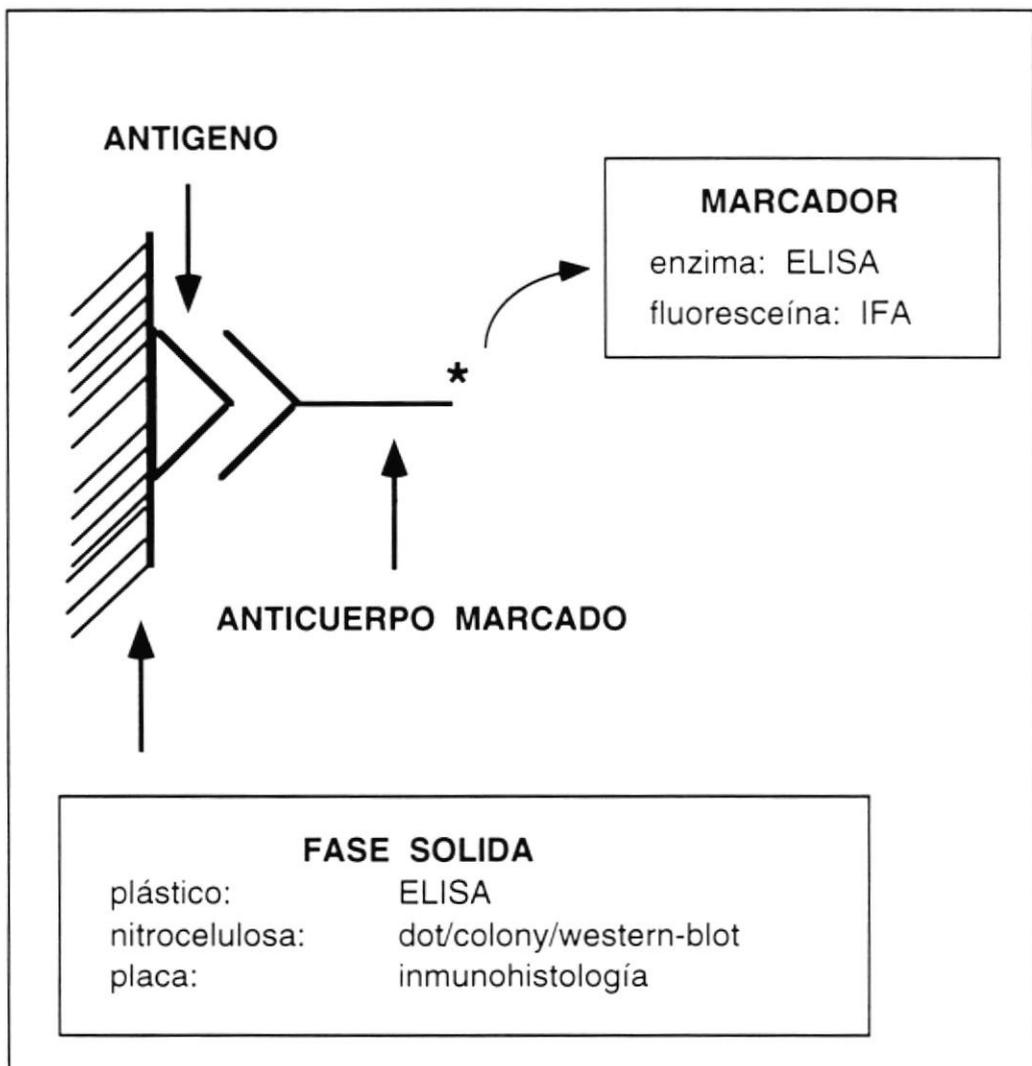


FIGURA 5: Partes constitutivas de un inmunoensayo.

Durante las dos últimas décadas ha habido un incremento en el número, sensibilidad y especificidad de los inmunoensayos desarrollados para detectar y/o cuantificar antígenos y anticuerpos.

Los métodos pueden ser clasificados en función de la fase sólida sobre la que se insolubiliza el antígeno o en función del tipo de marcador utilizado para revelar la reacción antígeno-anticuerpo. Figura 5.

Los principales métodos usados actualmente en acuicultura, serán descritos a continuación con el propósito de discutir para cada uno el interés de su utilización.

Por una parte la detección de bacterias con la ayuda de una técnica denominada colony-blot; por otra, la detección de agentes virales con la ayuda de métodos inmunohistológicos como la inmunofluorescencia (IFA) y por último la cuantificación de factores inmunitarios u hormonales mediante el método denominado ELISA tipo “sánduche”.

Adicionalmente otras dos técnicas particularmente usadas para seleccionar los hibridomas secretores de los anticuerpos de interés son también descritas: primero, dot blot como una alternativa a la técnica de colony blot y segundo, ELISA indirecto.

### 1.5.1 Colony blot

Es una técnica que se utiliza para la detección específica de bacterias. Consiste en realizar la siembra de bacterias en cajas petri sobre medios de cultivo adecuados. Luego en estos cultivos se coloca una membrana de nitrocelulosa sobre las bacterias, siendo esta membrana la fase sólida donde se fija el antígeno.

La membrana es luego incubada con una solución de una proteína irrelevante tal como caseína o albúmina para bloquear cualquier sitio libre sobre la nitrocelulosa en el cual se adhieran proteínas e impedir reacciones inespecíficas que podrían dar resultados falso-positivos. De esta forma toda respuesta se deberá a la reacción antígeno-anticuerpo.

Luego de esto se incuba con el anticuerpo que puede estar previamente marcado con una enzima (método directo). En el caso que este anticuerpo no esté marcado es necesaria la incubación con un segundo anticuerpo marcado con la enzima el cual va a reconocer las regiones constantes del primer anticuerpo y por lo tanto va a reaccionar con él (método indirecto).

Finalmente la presencia de la enzima es revelada mediante el desarrollo de una coloración al incubar con un substrato. Figura 6.

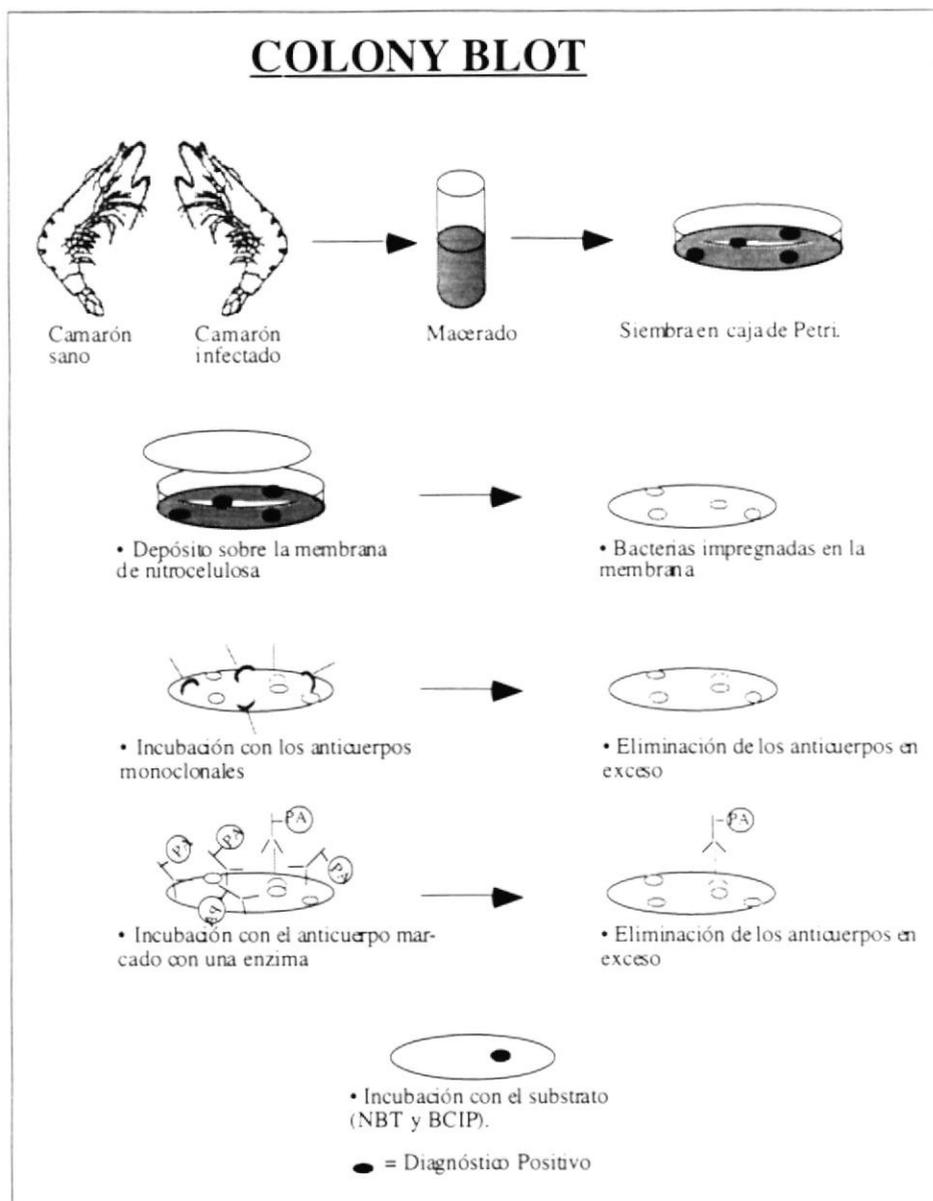


FIGURA 6: Colony blot

Este método es fácilmente aplicable al campo práctico, es un método cuantitativo ya que permite saber el porcentaje de bacterias de la placa que reaccionan con el anticuerpo específico contra una determinada especie de bacteria.

Su principal ventaja es que es un método sensible, específico y rápido (nos permite obtener resultados en 3 ó 4 horas después que se coloca la membrana y la visualización directa sin necesidad de equipo especial de los resultados) comparado con los métodos clásicos de identificación bacteriana (siembra en agares selectivos, identificación bioquímica). Una de las principales desventajas de este método es que es limitado para la detección de bacterias debido a la necesidad del crecimiento de las colonias en las placas de cultivo bacteriano.

### 1.5.2 Dot blot

La técnica de dot-blot también se usa para diagnóstico por medio de la reacción antígeno-anticuerpo. Dot blot ha sido usado para seleccionar anticuerpos monoclonales específicos (Hawkes, 1987) después de realizar una hibridación linfocitaria y además para reconocimiento de agentes virales específicos.

El procedimiento de esta técnica es igual al colony-blot, variando solamente la manera de fijar el antígeno en la membrana para lo cual se disuelve una colonia bacteriana en un buffer líquido antes de su fijación.

### 1.5.3 Inmunofluorescencia

Es una técnica fácil de desarrollar que consiste en la utilización de anticuerpos marcados con fluoresceína y expuestos a rayos UV para la observación de la reacción antígeno-anticuerpo a manera de una coloración fluorescente amarillo-verdosa. Existen dos tipos de inmunofluorescencia directa e indirecta.

La inmunofluorescencia directa consiste en la fijación de la muestra (células, tejidos o microorganismos) conteniendo el antígeno de interés sobre placas de microscopio, esta fijación generalmente se realiza con acetona que incrementa la permeabilidad de la membrana celular y por lo tanto promueve el acceso del anticuerpo al antígeno de la muestra. Anticuerpos marcados con fluoresceína son luego adheridos a las placas e incubados. Las placas son luego lavadas para eliminar anticuerpos que no se han fijado y observadas luego al microscopio de epifluorescencia.

En la inmunofluorescencia indirecta el antígeno sobre la placa reacciona con un anticuerpo dirigido contra él y esta reacción antígeno-anticuerpo es identificada por un anticuerpo fluorescente que reconoce inmunoglobulinas y por ende reconocerá los

anticuerpos que reaccionaron con antígenos específicos (reacción antígeno-anticuerpo). Figura 7.

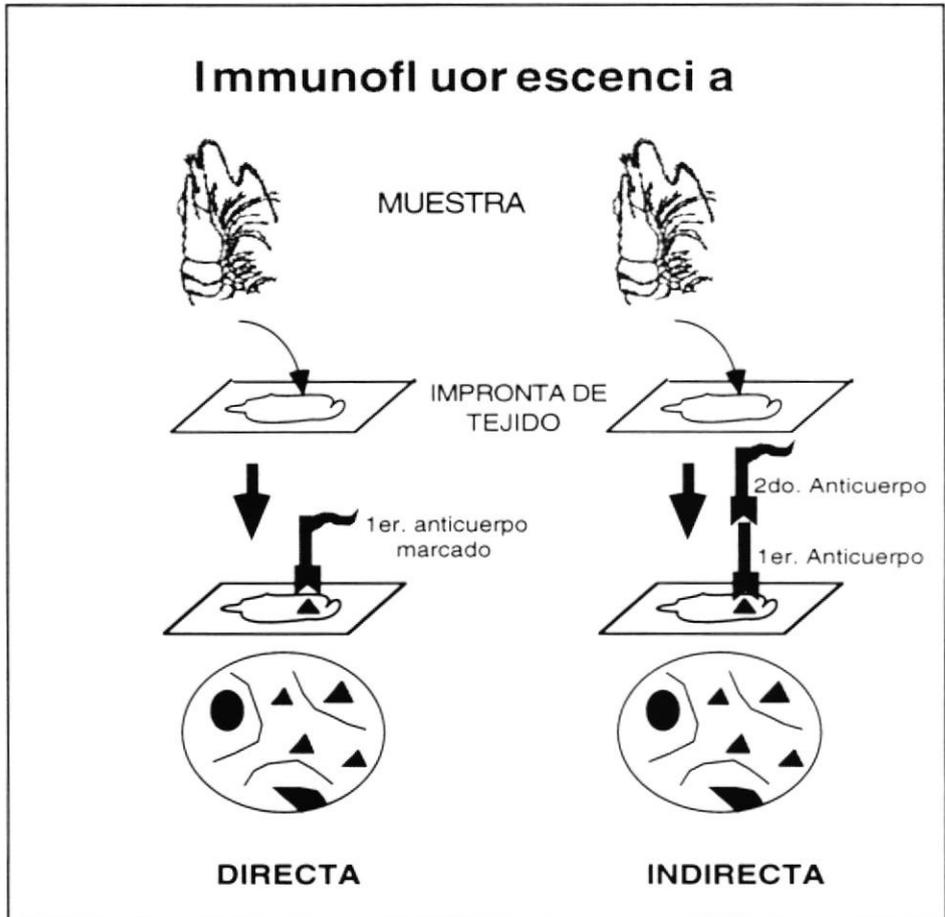


FIGURA 7: Inmunofluorescencia directa e indirecta

Una importante precaución que se debe tener cuando se realiza inmunofluorescencia consiste en la especial atención con la posible interferencia de enzimas endógenas presentes en las muestras y que pueden proporcionar resultados falso-positivos.

#### 1.5.4 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

El ELISA es un método inmunoenzimático cuyo principio básico es la detección de antígenos específicos y la cuantificación ya sea de anticuerpos (ELISA indirecto) o de antígenos determinados (ELISA tipo “sánduche” o ELISA competitivo); la reacción antígeno-anticuerpo es revelada mediante un substrato que reacciona con una enzima que está conjugada al anticuerpo (método directo) o que está conjugada a un segundo anticuerpo que interviene en el ELISA reconociendo el anticuerpo específico (método indirecto).

##### 1.5.4.1 ELISA indirecto

Los anticuerpos específicos reconocen antígenos específicos fijados sobre una placa de ELISA de 96 hoyos, los anticuerpos de detección son ligados a una enzima, la transformación por la enzima de un substrato incoloro en un producto coloreado es cuantificada por medio de espectrofotometría.

Este método es cualitativo, cuantitativo para los anticuerpos, sensible y automatizable aunque presenta el riesgo de interferencia con las

enzimas endógenas presentes en el antígeno, al igual que en la inmunofluorescencia. Fig. 8.

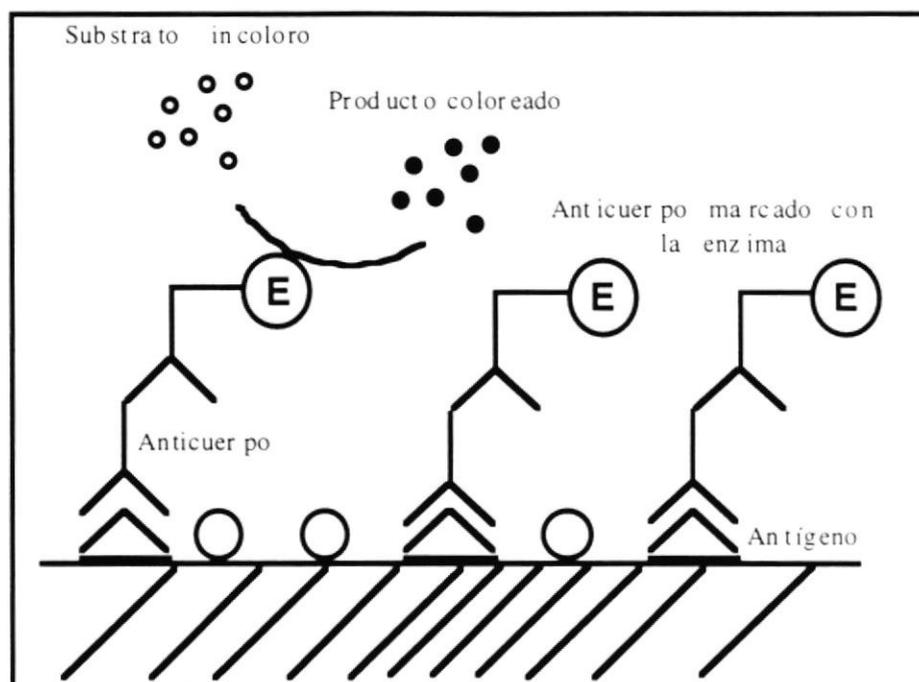


FIGURA 8: Principio de ELISA indirecto

Es un método fácil para selección de anticuerpos así como para detección de antígenos por lo que se lo utiliza mayormente para el proceso de selección de los hibridomas productores de anticuerpos contra antígenos específicos.

Se han usado anticuerpos monoclonales en ELISA para diagnóstico de “Brown Ring Disease” en

la almeja *Tapes philippinarum* (Noël et al,1992). Mediante la técnica de ELISA, enfermedades infecciosas se han diagnosticado en la ostra plana *Bonamia ostreae* (Cochennec et al. 1992).

#### 1.5.4.2 ELISA tipo “sánduche”

Uno de los inmunoensayos más usados es la técnica del ELISA tipo “sánduche” cuyo objetivo principal es de cuantificar el antígeno en muestras desconocidas. El ensayo requiere de dos anticuerpos que se unen a dos diferentes sitios del antígeno, ya sea dos anticuerpos monoclonales, dos anticuerpos policlonales o una combinación de un anticuerpo policlonal con un anticuerpo monoclonal.

Para ejecutar el método de ELISA tipo “sánduche”, un primer anticuerpo es fijado en la fase sólida (placa de ELISA) para luego agregar la muestra desconocida que contiene el antígeno. Las proteínas que no han sido ligadas son eliminadas por medio de lavados para luego adicionar el segundo anticuerpo marcado que se va a fijar al antígeno. Después de los lavados, la reacción es cuantificada midiendo la cantidad del segundo anticuerpo marcado con la enzima.

Esta cantidad de enzima es determinada con la adición de un sustrato. La intensidad de la señal obtenida después de la reacción enzimática es directamente proporcional a la cantidad de antígeno fijado en el primer anticuerpo, figura 9.

Un ELISA tipo "sánduche" fue desarrollado para cuantificar *Vibrio alginolyticus* en la hemolinfa de camarones peneidos (Adams, 1990).

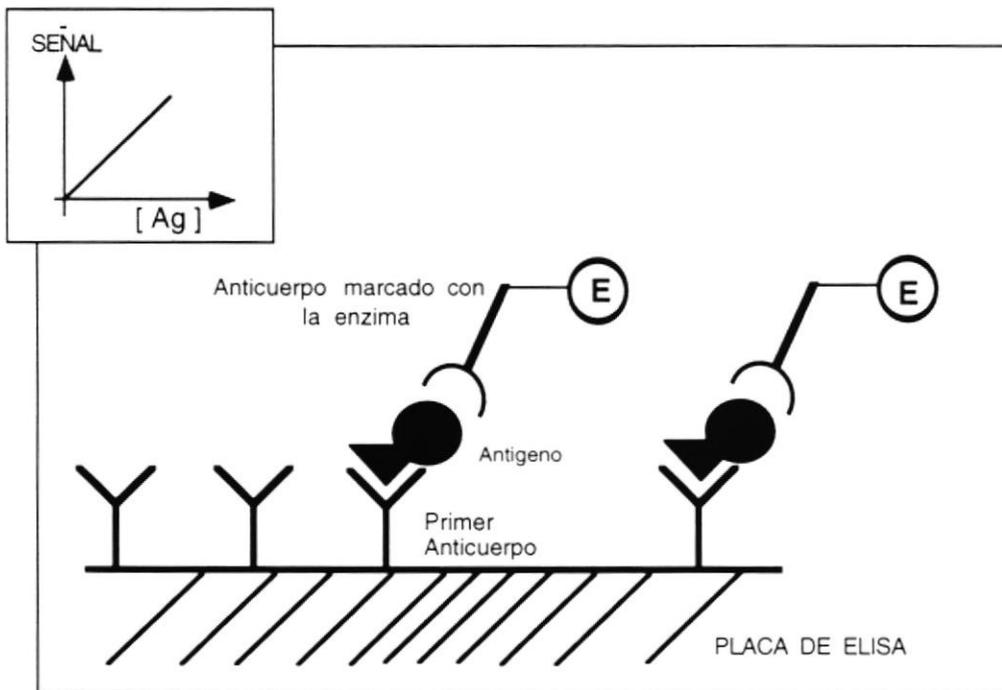


FIGURA 9: Principio de ELISA "sánduche"

Las mayores ventajas de esta técnica son que el antígeno no necesita ser purificado antes de su uso y que el ensayo es muy específico y las mayores desventajas de la misma es que se necesita tener dos anticuerpos que reconozcan un mismo antígeno y que el método no permite la cuantificación de haptenos (pequeña molécula donde sólo un anticuerpo puede fijarse, y que no induce a la producción de anticuerpos en un organismo si es inyectada sólo, es decir que para que se produzcan anticuerpos contra ella debe inyectarse ligada a una molécula mayor).

## CAPITULO II

### MATERIALES Y METODOS

#### 2.1 Cultivo y preparación de diferentes suspensiones de bacterias.

##### 2.1.1 Las bacterias

La cepa de *V. alginolyticus* denominada Ili y utilizada para la inmunización fue aislada e identificada en 1994 por Iliana Morales (Laboratorio de larvas EBISA) de una muestra colectada del Océano Pacífico en las aguas frente al laboratorio de larvas "EBISA". Un estudio sistemático fue llevado a cabo para descartar posible patogenicidad en sistemas de cultivo masivo de larvas.

Las cepas bacterianas utilizadas para el proceso de selección son cepas aisladas e identificadas bioquímicamente en CENAIM: tres cepas de *V. harveyi* (E22, S2 y E119), dos cepas de *V. alginolyticus* (Ili y E158), *Escherichia coli* y *Yersinia spp.*

### 2.1.2 Preparación de la suspensión inmunógeno

Con el propósito de inmunizar los ratones, una suspensión de la bacteria Ili fue preparada de la siguiente manera:

Las bacterias son cultivadas en medio de cultivo líquido Trypticase Soy Broth (TSB) durante 12 horas a 28°C. Las bacterias se centrifugan (300 g, 10 min.) y el precipitado se resuspende en agua destilada. La densidad óptica es ajustada a 0,8 en 550 nm. Un ciclo de congelación y descongelación (-80°C) es realizado con el propósito de romper las membranas bacterianas y dejar en libertad todas las estructuras antigénicas. Se añade un volumen igual de NaCl (1,8%) para obtener una concentración final de 0,9% (0,300 mOsm). Esta preparación fue alicuotada en volúmenes de 500 µl y almacenada a -20°C.

### 2.1.3 Inmunización de ratones

Dos ratones Balb/c hembras fueron inmunizados con la preparación inmunogénica anteriormente descrita. El esquema de inmunización consiste en una primera inyección de 500 µl (3 Vol. Ili/ 1 Vol. adyuvante completo de Freund ACF) inoculada vía

intraperitoneal. Dos inyecciones de 500  $\mu$ l (sin ACF) aplicadas en intervalos de 15 días y una cuarta inyección de 500  $\mu$ l (sin ACF) 30 días después de la tercera.

Doce días antes de la última inyección, se obtuvo suero de cada ratón realizando un sangrado de la cola, este fue examinado mediante el método de inmuno dot-blot (Materiales y Métodos 2.3.3) para controlar y determinar su estado de inmunización. Tres días después de la cuarta inyección, el bazo del ratón seleccionado fue extraído y los linfocitos usados para la hibridación linfocitaria (Materiales y Métodos 2.2.2.4)

## 2.2 Producción de anticuerpos monoclonales

### 2.2.1 Medios de cultivo

#### 2.2.1.1 Medio de cultivo celular básico

Medio RPMI 1640	5,2 g
L-Glutamina	150 mg
Estreptomicina	100 mg
Penicilina	100.000 UI
Hepes (PM 260 g)	2,6 g
Agua destilada	500 ml (V. final)

El pH es ajustado a 7,4 y el medio es filtrado a través de una membrana de 0,22  $\mu\text{m}$ . Este medio es colocado en frascos de 250 ml por 48 horas a 37°C para probar si hay o no contaminación para luego almacenarlo a 4°C.

A este medio se coloca suero fetal bovino (SVF) de complementado 30 min. a 56°C en un porcentaje de 10 a 15% (Vol./Vol.) según el tipo de medio que se va a preparar.

#### **2.2.1.2 Medio de cultivo para mielomas**

Medio básico	500 ml
8 Azaguanina	10 mg
SVF	50 ml (10%)

#### **2.2.1.3 Medio selectivo HAT**

Medio básico	500 ml
Hipoxantina	6,8 mg
Aminopterina	88 mg
Timidina	1,95 mg
SVF	75 ml (15%)

#### 2.2.1.4 Medio selectivo HT

La preparación es igual al medio selectivo HAT pero sin aminopterina.

#### 2.2.1.5 Medio de cultivo para hibridomas

Medio básico	500 ml
SVF	75 ml (15%)

### 2.2.2 Hibridación linfocitaria

La producción de anticuerpos monoclonales se realizó según el método descrito inicialmente por Köhler y Milstein (1975) y modificado por French et al. (1986).

#### 2.2.2.1 Preparación del Polyethylene glycol

El Polyethylene glycol (PEG) de peso molecular 1540 es usado al 40% (Vol./Vol.). Dos gramos de PEG son calentados en un baño de María a 60°C, hasta que el PEG se torne líquido. Tres mililitros de medio básico son adicionados. Esta mezcla es esterilizada por filtración a través de un filtro de 0,22  $\mu\text{m}$ .

El PEG es preparado un día antes de la fusión y es mantenido 24 horas a 37°C dentro del incubador de CO<sub>2</sub> (5%).

#### **2.2.2.2 Preparación de macrófagos**

Los macrófagos presentes dentro de los pozos de cultivo tienen un doble rol, por una parte, de fagocitar las células muertas y los microorganismos eventualmente presentes, y por otra, de secretar factores de crecimiento para las células. Ellos son introducidos dentro de los pozos de cultivo 24 horas antes de la fusión celular.

Los ratones son sacrificados por elongación y ruptura de la columna vertebral. Luego la piel de su abdomen es abierta sin romper el peritóneo para inyectar dentro de la cavidad abdominal 5 ml de medio para hibridoma. La cavidad abdominal es enjuagada por el medio que luego es aspirado teniendo la precaución de no perforar los intestinos. El medio recuperado es centrifugado (250 g, 10 min.) y el sobrenadante es eliminado. Las

células son luego resuspendidas en 10 ml de medio para hibridoma y contadas en una cámara de contaje Malassez.

De un ratón es posible obtener entre 1,5 a  $3 \times 10^6$  macrófagos. Luego las células son repartidas en las placas de cultivo de 96 hoyos a razón de 10.000 a 20.000 células por pozo; para mantenerlas en incubación a 37°C dentro de la incubadora de CO<sub>2</sub> (5%), 24 horas antes de la fusión. Después de este tiempo los macrófagos son activados y adheridos al fondo de los pozos.

### **2.2.2.3 Preparación de mielomas**

Dos líneas de mielomas fueron utilizadas: SP2/O y P3X63Ag8-653.

Los mielomas son cultivados a razón de 100.000 células/ml en medio de cultivo para mieloma a 37°C dentro de la incubadora de CO<sub>2</sub> (5%). El tiempo de duplicación de las células es de 18 horas aproximadamente. Un día antes de la fusión es necesario tener una concentración de 50.000 células/ml para

que estén situados dentro de la fase exponencial de cultivo celular. El medio es renovado regularmente por aspiración del sobrenadante (según el tiempo de renovación de las células).

#### **2.2.2.4 Obtención de linfocitos**

El ratón inmunizado y seleccionado en base a un dot blot del suero, es sacrificado mediante el corte de su cabeza, para eliminar la mayor cantidad de sangre posible. El abdomen del ratón es abierto asépticamente para extraer el bazo de su cavidad peritoneal, El bazo debe ahora colocarse dentro de un homogenizador de tejidos de tipo Dounce con 5 ml de medio base. Todas las manipulaciones deben ser realizadas en condiciones estériles y en hielo para mantener los tubos con el homogenizado a 4°C aproximadamente. El homogenizado es filtrado por una gasa estéril y el líquido obtenido centrifugado a 150 g durante 10 min. a temperatura ambiente. Luego de la eliminación del sobrenadante, el precipitado es resuspendido en 10 ml de medio básico.

El conteo de los linfocitos se lo realiza en una cámara Malassez, previo la dilución de una alícuota con azul de tripano para distinguir las células viables (los linfocitos de mayor talla no deben ser confundidos con los glóbulos rojos).

#### 2.2.2.5 Fusión celular

Una vez que tenemos el número de células totales calculamos el número de linfocitos y mielomas que debemos mezclar para obtener una relación de 3 linfocitos por 1 célula mieloma. Esta mezcla de suspensiones es centrifugada (200 g, 10 min., TA). El sobrenadante es eliminado y al precipitado se le agrega 1 ml de polyethylene glycol 1540 (Materiales y Métodos 2.2.3.1) a 37 °C gota a gota. Colocando el cronómetro en 0'00'' las etapas que deben ser rigurosamente seguidas son:

*t=0'00''* Agregar las 10 primeras gotas de PEG durante 30 segundos (1 gota cada 3 segundos) y el exceso de una sola vez al final de los 30 segundos. Cerrar el tubo.

*t=0'30''* Colocar el tubo en baño de María a 37 °C.

*t=1'30''* Centrifugar (200 g) a temperatura ambiente.

*t=3'00''* Parar la centrifugación.

*t=4'30''* Colocar el tubo en baño de María 37 °C.

*t=6'30''* Agregar 6 ml. de medio completo (medio básico más SVF 10%) a razón de una gota cada 5 seg. más 9 ml de medio completo de una sola vez. Esta suspensión es centrifugada (150 g, 10 min. TA).

El precipitado es resuspendido en 10 ml de medio para hibridomas. Las células son luego repartidas en las placas conteniendo los macrófagos preparados el día anterior a la fusión. Cien microlitros de la suspensión (mielomas/linfocitos) es distribuido razón de 100.000, 50.000 y 25.000 células por pozo. Las placas son mantenidas a 37°C dentro de una incubadora de CO<sub>2</sub> (5%).

Un día después de la fusión, el medio HAT es adicionado a fin de permitir solo el crecimiento de las células híbridas. En cada pozo de cultivo se adiciona 100  $\mu$ l de medio selectivo HAT (2X) a los 100  $\mu$ l iniciales para obtener una concentración final de HAT (1X).

Cinco días después de la fusión, 100  $\mu$ l de sobrenadante de cultivo son reemplazados por el mismo volumen de medio selectivo HAT 1X.

Diez días después de la fusión, 100  $\mu$ l de sobrenadante de cultivo son reemplazados por el mismo volumen de medio selectivo HT.

### **2.2.3 Técnica de clonaje**

Los hibridomas seleccionados en base a su especificidad son clonados por medio de la técnica de diluciones límites. Para ello los hibridomas son repartidos en volúmenes de 200  $\mu$ l de medio a razón de 1; 0,5 y 0,3 célula por pozo.

Después de 10 a 15 días de cultivo, los pozos positivos en crecimiento son examinados mediante la técnica descrita de ELISA indirecto (Materiales y Métodos 2.3.2) para chequear su actividad.

Los hibridomas clonados productores de anticuerpos específicos son cultivados en volúmenes progresivamente aumentados, a fin de disponer de suficientes células (hibridomas) para congelar (Materiales y Métodos 2.2.5) e inocular a los ratones para la producción de anticuerpos monoclonales en líquido ascítico.

#### **2.2.4 Producción de anticuerpos en líquido ascítico**

Con el propósito de obtener una solución de anticuerpos monoclonales a alta concentración,  $5 \times 10^6$  células de hibridomas son inyectados por vía intraperitoneal a cada ratón Balb/c en un volumen de 0,5 ml de medio básico. Quince días antes de esta inyección, 0,5 ml de Pristane(2,6,10,14-tetrametilpentadecanoico) son inyectados a este ratón por vía intraperitoneal. Esta inyección de Pristane favorece a la formación de un tumor líquido denominado líquido ascítico.

El líquido ascítico es tomado por medio de punción intraperitoneal entre 8 a 10 días después de la inyección del hibridoma. El líquido ascítico es centrifugado 250 g durante 10 min. a TA. El sobrenadante que contiene grandes cantidades de anticuerpos es conservado a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### **2.2.5 Criopreservación y descongelación de células**

Las células (hibridomas y/o mielomas) a ser congeladas deben ser centrifugadas (250 g, 10 min., TA) y resuspendidas en SVF conteniendo 7,5% de dimethylsulfoxido (DMSO) (Vol./Vol.), a razón de  $5 \times 10^6$  células por ml. Esta suspensión celular es repartida en ampollas que son colocadas dentro de un recipiente isotérmico en el interior de un congelador a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Con el propósito de hacer una congelación progresiva de 48 hrs. y luego las células son introducidas y conservadas en nitrógeno líquido ( $-180^{\circ}\text{C}$ ).

La descongelación de las células se realiza colocando directamente las ampollas a  $37^{\circ}\text{C}$  y evitando la descongelación total de las células ya que el DMSO es tóxico a esta temperatura. La suspensión de células es entonces inmediatamente depositada

dentro de 15 ml de medio básico y centrifugado (250 g, 10 min., TA) para eliminar el DMSO. El precipitado de las células es resuspendido en 5 ml. de medio adecuado (dependiendo si se descongela mielomas o hibridomas) y colocado en pozos de cultivo de 5 ml conteniendo macrófagos.

## **2.3 Métodos de detección del antígeno bacteriano**

### **2.3.1 Preparación de la suspensión bacteriana utilizada como antígeno para ELISA indirecto**

Las bacterias son cultivadas en 20 ml de medio de cultivo Trypticase Soy Broth (TSB) una noche a 28°C. Se realiza una centrifugación de las mismas a 300 g por 10 min. y el precipitado es lavado con 10 ml de tampón PBS marino (PBS-M) (NaCl 28 g/l; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,2 g/l; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O 2,9 g/l; KCl 0,2 g/l; pH 7,4). La densidad óptica de esta preparación fue ajustada a 0,6 en 550 nm con PBS marino. Se adiciona 20% de glicerol en la suspensión bacteriana. Esta suspensión fue congelada (- 80 °C) y descongelada antes de hacer una centrifugación a 300 g por 10 min. El precipitado fue resuspendido en tampón

carbonato-bicarbonato CBC ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$  1,59 g/l;  $\text{NaHCO}_3$  2,93 g/l; azida de sodio 0,2 g/l; pH 9,6) en un volumen equivalente a los 2/3 del volumen de PBS-M. Se congela nuevamente y se conserva así estas suspensiones que están listas para usar como antígeno en ELISA.

### 2.3.2 ELISA indirecto

Cien microlitros del antígeno bacteriano son colocados en cada uno de los hoyos de las placas de 96 pozos durante una noche a 4°C. Las placas son lavadas tres veces con un tampón PBS ( $\text{NaCl}$  150 mM;  $\text{KCl}$  3 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2,5 mM;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  8,5 mM; pH 7,2) conteniendo 0,1 % (Vol./Vol.) de Tween 20 (PBS-T). Las placas son saturadas 1h/37°C con 200  $\mu\text{l}$  por pozo de una solución bloqueadora (PBS conteniendo 5% (Peso/Vol.) de leche descremada. Luego las placas son lavadas 3 veces con PBS-T y 100  $\mu\text{l}$  del anticuerpo (suero de ratón inmunizado, sobrenadante de cultivo de hibridomas, líquido ascítico) diluído en PBS-T-leche 0.5% (Peso/Vol.) son colocados en las placas e incubados 2h/37°C. Después de tres lavados con PBS-T, 100  $\mu\text{l}$  de un anticuerpo dirigido contra la Ig de ratón y conjugado a la fosfatasa alcalina son

agregados en cada hoyo de la placa a una dilución 1/10.000 en PBS-T-leche 0,5% (Peso/Vol.) para incubar 1h/37°C. Las placas son lavadas tres veces con PBS-T. Cien microlitros del substrato p-NPP (p-NPP 1 mg/l en tampón diethanolamina (5%), pH 9,8) son colocados en cada hoyo e incubados 3 horas a 37°C para realizar la lectura en el lector de ELISA Multiskan a una longitud de onda ajustada a 414 nm.

### 2.3.3 Inmuno dot-blot

Después de 8 horas de haber realizado la siembra bacteriana (bacterias congeladas, muestras de agua, macerado de larvas) en agar TCBS, las diferentes colonias de bacterias son diluidas en 500 µl de PBS. Dos microlitros de esta suspensión bacteriana es depositada en membranas de nitrocelulosa. Las membranas son secadas a temperatura ambiente durante 30 min. Las membranas son lavadas tres veces con un tampón PBS (NaCl 150 mM; KCl 3 mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2,5 mM; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8,5 mM; pH 7,2) conteniendo 0,1 % (Vol./Vol.) de Tween 20 (PBS-T). Las membranas son saturadas 1h/37°C con una solución bloqueadora (PBS conteniendo 5% (Peso/Vol.) de



leche descremada). Luego las membranas son lavadas 3 veces con PBS-T y el anticuerpo (suero de ratón inmunizado, sobrenadante de cultivo de hibridomas, líquido ascítico) diluido 1/1.000 en PBS-T-leche 0,5% (Peso/Vol.) es colocado para incubar cada membrana 1h/37°C. Después de tres lavados con PBS-T, un anticuerpo dirigido contra el anticuerpo de ratón y conjugado a la fosfatasa alcalina es agregado en cada membrana a una dilución 1/10.000 en PBS-T-leche 0,5% para incubar 45 min./37°C. Las membranas son lavadas tres veces con PBS-T para luego incubar con el substrato: 10 ml de tampón fosfatasa alcalina (Na Cl 5,84 g/l; Mg Cl<sub>2</sub> 0,5 g/l; tris base 12,11 g/l; pH 9,5); 33 µl de la solución stock de BCIP (25 mg de 5-Bromo-4-Cloro-3-Indolyfosfato en 0,5 ml de dimethyl-formamida) y 66 µl de la solución stock de NBT (25 mg de Nitro Blue Tetrazolium en 1 ml de agua deionizada) para la revelación de las reacciones positivas. La intensidad de la reacción puede ser apreciada directamente a la vista.

NOTA: Cuando las manchas alcanzan la intensidad deseada la reacción enzimática es detenida lavando la membrana con EDTA 2 mM en PBS.

## 2.3.4 Colony blot

### 2.3.4.1 Protocolo básico

- Realizar un cultivo bacteriano en cajas de Petri con agar TCBS
- Humedecer las membranas con tampón PBS.
- Colocar las membranas (82,5 mm de diámetro, con poros de 0,45  $\mu\text{m}$ ) en la superficie del agar donde se han desarrollado las bacterias y dejar por 30 minutos.
- Colocar la membrana en una caja de Petri vacía, asegurándose que las bacterias estén en la parte superior de la membrana y secar 45 min. la membrana antes de realizar el test.
- Incubar con PBS-leche descremada 5% (peso/Vol.) en una caja de Petri agitando suavemente por 45 min. a temperatura ambiente.
- Realizar 2 lavados de 3 min. c/u con PBS conteniendo 1% (Vol./Vol.) de Tween 20 (PBS-T).
- Depositar el anticuerpo (fluido ascítico a la dilución adecuada en PBS-T-leche descremada 0,5% (Peso/Vol.) ó sobrenadante de cultivo sin diluir) e incubar por 45 min. a temperatura ambiente.
- Realizar 3 lavados de 3 min. con PBS-T.
- Depositar el anticuerpo conjugado (a la fosfatasa alcalina) e incubar por 45 min.: dilución empleada del anticuerpo 1/8000 en PBS-T-leche 0,5 % (Peso/Vol.).
- Realizar 3 lavados de 3 min. con PBS-T.
- Incubar con la solución substrato recientemente preparada.

### 2.3.4.2 Protocolo optimizado

Al protocolo básico descrito anteriormente se necesitó realizar una serie de modificaciones para la adaptación del mismo a nuestras condiciones de trabajo, una vez realizadas las pruebas necesarias se logró un protocolo optimizado descrito a continuación.

- Realizar un cultivo bacteriano en cajas de Petri con TCBS a diluciones de  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  y  $10^{-4}$ . Incubar entre 6 a 8 horas a  $28^{\circ}\text{C}$ .
- Colocar las membranas (82,5 mm de diámetro, con poros de  $0,45\ \mu\text{m}$ ) en la superficie del agar donde se han desarrollado las bacterias y dejar por 5 minutos.
- Colocar la membrana en una caja de Petri vacía, asegurándose que las bacterias estén en la parte superior de la membrana y secar 30 min. la membrana antes de realizar el test.
- Incubar con PBS-leche descremada 5% (peso/Vol.) en una caja de Petri agitando suavemente por 60 min. a temperatura ambiente.
- Realizar 3 lavados de 3 min. c/u con PBS-Tween 20 (0,1%)
- Depositar el anticuerpo (fluido ascítico a la dilución adecuada en PBS-Tween 0,1%-leche 0,5% ó sobrenadante de cultivo sin diluir) e incubar por 60 min. a temperatura ambiente.
- Realizar 3 lavados de 3 min. con PBS-Tween 20 (0,1%)
- Depositar el anticuerpo conjugado (a la fosfatasa alcalina) e incubar por 45 min.: dilución empleada del anticuerpo 1/10.000 en PBS-Tween-0,1%-Leche 0,5 %.
- Realizar 3 lavados de 3 min. con PBS-Tween 20 (0,1%).
- Incubar con la solución substrato recientemente preparada.

### 2.3.4.3 Solución Substrato

Tanto en el protocolo básico como en el protocolo optimizado se emplea la misma solución substrato para revelar la reacción antígeno-anticuerpo, la preparación de la misma se realiza de la siguiente manera:

- BCIP (25 mg de 5-Bromo-4-Cloro-3-Indolyfosfato en 0,5 ml de dimethylformamida).....33 $\mu$ l
- NBT (25 mg de Nitro Blue Tetrazolium en 1ml de agua deionizada).....66  $\mu$ l
- Tampón fosfatasa alcalina (NaCl 5,84 g/l; MgCl<sub>2</sub> 0,5 g/l; Tris base 12,11 g/l; pH 9,5).....10 ml

NOTA: Cuando las manchas alcanzan la intensidad deseada, la reacción enzimática es detenida lavando la membrana con EDTA 2 mM (50 ml de EDTA 0,5 M diluído en 25 ml de PBS).

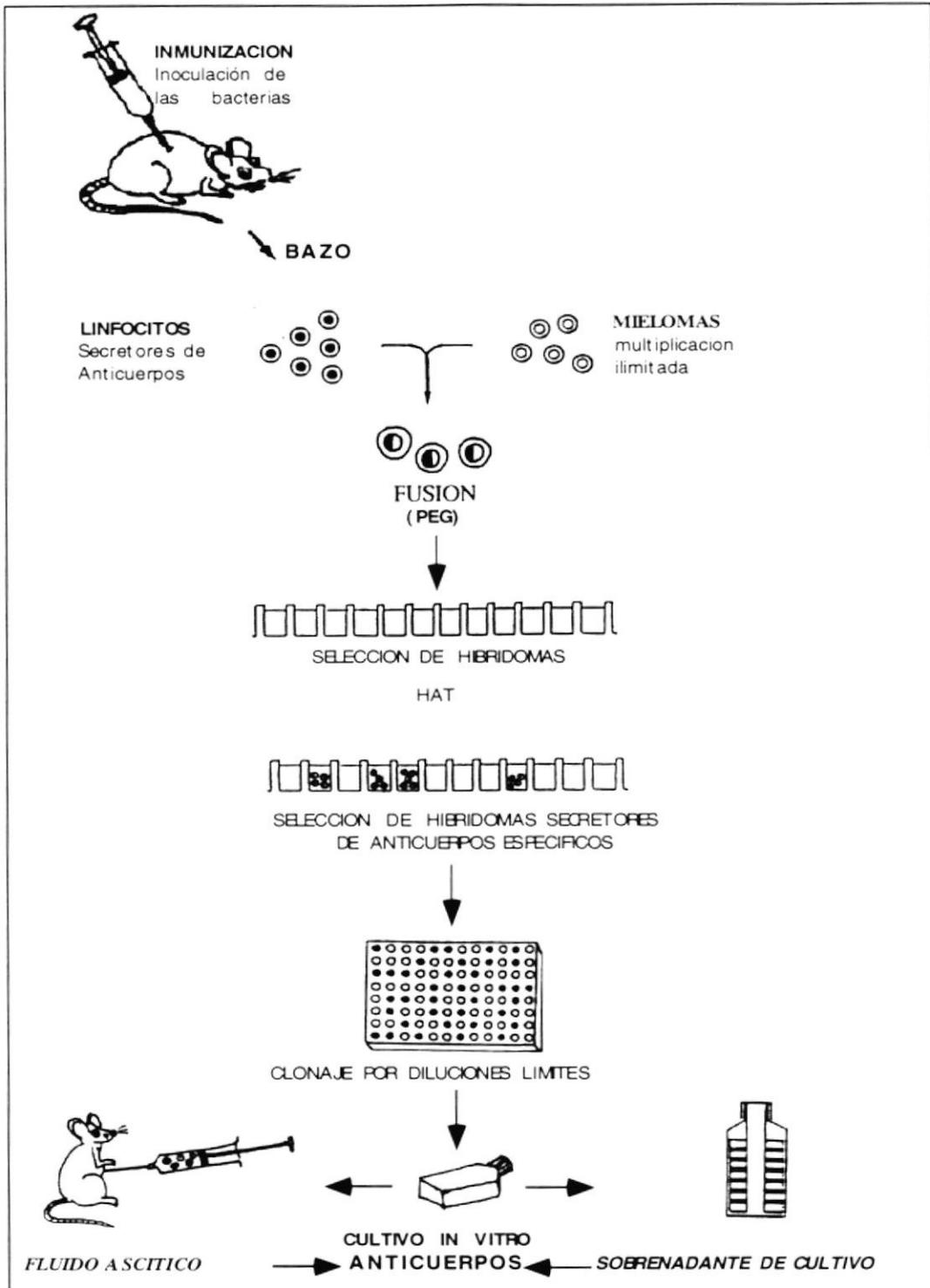


FIGURA 10: PRODUCCION DE ANTICUERPOS MONOCLONALES.

## CAPITULO III

### RESULTADOS

#### 3.1 PRODUCCION DE ANTICUERPOS

Para la realización de este trabajo se realizó la obtención de anticuerpos monoclonales que permitan el reconocimiento de la cepa Ili de *V. alginolyticus* utilizada como probiótico en laboratorios comerciales de larvas de camarón.

El esquema general para la producción de anticuerpos se describe en la Fig. 10, donde observamos que como primer paso para la obtención de anticuerpos se realiza una preparación denominada inmunógeno con la bacteria Ili, con la misma que se va a realizar el proceso de inmunización de los ratones con el propósito de incentivar la producción de anticuerpos específicos contra esta cepa bacteriana, como siguiente paso tenemos la hibridación linfocitaria o fusión, proceso en el que se obtienen los hibridomas (células secretoras de anticuerpos) para luego seleccionar los hibridomas que son de nuestro interés y someterlos a un

clonaje y así obtener anticuerpos provenientes de un sólo clon o célula (anticuerpos monoclonales).

### **3.1.1 Inmunógeno**

La preparación del inmunógeno (Materiales y Métodos 2.1.2) se realiza centrifugando las bacterias Ili que han sido enriquecidas en medio de cultivo TSB para resuspender el precipitado en agua destilada y almacenar en alícuotas de 500 µl. Estas alícuotas son utilizadas en cada una de las inyecciones en el período de inmunización.

### **3.1.2 Inmunización de ratones**

Dos ratones Balb/c (ratones R1 y R2) han sido inmunizados con la preparación descrita anteriormente según el siguiente cronograma:

Día 0: primera inyección de la bacteria Ili con adyuvante completo de Freund (ACF) en un volumen de 500 µl (3Vol. Ili/1Vol. ACF), intraperitoneal, 250 µl a cada lado de la cavidad peritoneal.

Día 15: segunda inyección de la bacteria Ili sin adyuvante en un volumen de 500 µl ; 400 µl intraperitoneal y 100 µl subcutánea.

Día 30: tercera inyección de la bacteria Ili sin adyuvante en un volumen de 500 µl intraperitoneal.

Día 60: cuarta inyección de la bacteria Ili sin adyuvante en un volumen de 500 µl intraperitoneal.

### 3.1.3 Estado de inmunización de los ratones

Antes de realizar la hibridación linfocitaria se realiza una evaluación del estado de inmunización de los ratones con el propósito de escoger el ratón que haya tenido una mejor respuesta al proceso de inmunización.

Los ratones R1 y R2 fueron sangrados por la cola una semana después de la cuarta inyección y su suero fue usado para monitorear mediante la técnica de dot-blot la presencia de anticuerpos. El suero de un ratón no inmunizado permite disponer de un control negativo para determinar la presencia de anticuerpos en el suero de los ratones inmunizados.

Las bacterias utilizadas para el monitoreo fueron: Ili (cepa de *V. alginolyticus* con la cual se inmunizó a los ratones); E158 (cepa de *V. alginolyticus*); E22 (cepa de *V. harveyi* patógena) y *E. coli* (cepa utilizada como control negativo).

Los resultados obtenidos son resumidos en la tabla 1.

Suero	Dilución	Ili	E158	E22	E. coli
	1/1000	+++	+	+	0
Ratón 1	1/3000	+++	0	0	0
	1/10000	++	0	0	0
	1/1000	+++	+	0	0
Ratón 2	1/3000	+++	0	0	0
	1/10000	++	0	0	0
	1/1000	0	0	0	0
R. control	1/3000	0	0	0	0
	1/10000	0	0	0	0

**TABLA 1:** Evaluación del estado de inmunización de los ratones R1 y R2 y de un ratón control no inmunizado con la técnica de dot blot.

*+++:* reactividad fuerte; *++:* reactividad; *+:* baja reactividad; *0:* no reactividad.

En la tabla 1 podemos ver que los dos ratones inmunizados pueden reconocer la cepa Ili. Al contrario, el ratón no inmunizado no puede reconocerla. Además, la cepa 158 y E22 son un poco reconocidas por el ratón R1, sólo el ratón R2 reconoce la cepa 158; estas reacciones son débiles y no se pueden considerar como importantes pero preferimos utilizar para la fusión el ratón R2 que no reconoce la cepa bacteriana E22.

Además hemos chequeado la reactividad del suero del ratón R2 con la técnica de ELISA indirecto (Materiales y Métodos 2.3.2), el suero obtenido antes de la última inyección (AI) y el suero obtenido después de la última inyección (DI) son examinados con la cepa Ili, dos cepas de *V. harveyi* (S2 y E119) y una cepa de *E. coli*. Los resultados obtenidos son resumidos en la tabla 2.

	Ili	S2	E119	E. coli
A. I.	0.75	0.1	0.34	0.24
D. I.	0.98	0.12	0.49	0.34
N. E.	0.08	0.09	0.09	0.08

**TABLA 2:** ELISA indirecto para monitorear el estado de inmunización del ratón R2 antes de la última inyección (AI) y después de la última inyección (DI). Dilución del suero utilizada 1/1000. En los controles no específicos (N.E.) no se coloca el primer anticuerpo.

La tabla 2 muestra que el suero del ratón R2 reconoce específicamente la cepa Ili. Los resultados obtenidos antes y después de la última inyección son superiores a la señal obtenida con la cepa de control *E. coli*.

Por otra parte la señal obtenida con S2 ó E119 (cepas de *V. harveyi* patógenas) corresponden al ruido de fondo producido con este método. Además, puede observarse un pequeño aumento de la señal entre AI y DI, pero debido al hecho de la baja sensibilidad del método es difícil de concluir en un real cambio del estado de inmunización.

#### **3.1.4 Hibridación linfocitaria**

La hibridación linfocitaria para la fusión de los linfocitos (secretores de anticuerpos) obtenidos del bazo del ratón inmunizado, con los mielomas (células de multiplicación ilimitada) se la realizó según el método descrito inicialmente por Köhler y Milstein (1975) y modificado por French et al. (1986) mediante el cual las células son fusionadas con el químico Polyetilenglicol (Materiales y Métodos 2.2.2.1).

### 3.1.4.1 Fusión celular F1

Tres días después de la última inyección, los linfocitos esplénicos del ratón R2 fueron fusionados con células mielomas SP2/0 (Materiales y Métodos 2.2.2.5). El número total de linfocitos usados es de 128 millones y la relación linfocito:mieloma es de 3:1. De esta forma se obtuvieron un total de 170 millones de células aproximadamente cuya distribución en las placas de cultivo celular se la realizó en 2 distintas condiciones en cuanto al número de células por hoyo: 100.000 células por hoyo (F1.1) y 50.000 células por hoyo (F1.2).

Los hibridomas son sometidos a una primera selección según dos criterios: primero, crecimiento de las células y segundo, habilidad para secretar anticuerpos que son capaces de reconocer la cepa Ili por un test de dot-blot.

En esta primera selección se obtuvieron 12 hibridomas que reconocen la cepa Ili de un total de 39 hibridomas entre las diferentes condiciones de la fusión F1. En la tabla 3 se resume los resultados obtenidos.

FUSION	Nº DE CELULAS TOTALES POR POZO	Nº DE POZOS INOCULADOS	Nº DE POZOS CON HIBRIDOMAS	Nº DE HIBRIDOMAS PRODUCTORES DE ANTICUERPOS QUE RECONOCEN LA CEPA "ILI"
F1.1	100.000	1344	31	10
F1.2	50.000	576	8	2

**TABLA 3: Resultados obtenidos durante la fusión F1 con linfocitos obtenidos del ratón R2. Los hibridomas secretores de anticuerpos contra la cepa "Ili" fueron seleccionados mediante la técnica de dot-blot.**

Estos doce hibridomas desafortunadamente sufrieron una contaminación provocada por levaduras lo que nos impidió continuar el trabajo. Los hibridomas contaminados fueron inyectados a ratones en su cavidad peritoneal con el propósito de intentar producir líquido ascítico con alta concentración de anticuerpos pero los ratones murieron y no se logró el objetivo.

#### **3.1.4.2 Fusión celular F2**

Para cumplir nuestro objetivo hemos realizado una segunda fusión (Materiales y Métodos 2.2.2.5) con el ratón R1, durante esta segunda fusión hemos tratado dos tipos de mielomas (SP2/0 y P3X63Ag8-653). Cincuenta y un millones de linfocitos esplénicos del ratón R1 fueron fusionados con 17 millones de células mielomas de tipo SP2/0 (F2A) y 51 millones de linfocitos del mismo ratón R1 son fusionados con 17 millones de mielomas P3X63Ag8-653 (F2B).

Para ambos casos F2A y F2B se realiza tres distintas condiciones en cuanto al número de células por pozo: 100.000 cél./pozo (F2A.1/B.1), 50.000 cél./pozo (F2A.2/B.2) y 25.000 cél./pozo (F2A.3/B.3).

FUSION		Nº DE CELULAS TOTALES POR POZO	Nº DE POZOS INOCULADOS	Nº DE POZOS CON HIBRIDOMAS	Nº DE HIBRIDOMAS PRODUCTORES DE ANTICUERPOS QUE RECONOCEN LA CEPA "ILI"
SP2/0	F2A.1	100.000	384	126	35
SP2/0	F2A.2	50.000	480	82	8
SP2/0	F2A.3	25.000	192	30	7
P3X63Ag8-653	F2B.1	100.000	384	153	47
P3X63Ag8-653	F2B.2	50.000	480	53	21
P3X63Ag8-653	F2B.3	25.000	192	3	0

**TABLA 4:** Resultados obtenidos durante la fusión F2 con linfocitos obtenidos del ratón R1. Los hibridomas secretores de anticuerpos contra la cepa "Ili" fueron seleccionados mediante la técnica de dot-blot.

Los resultados concernientes a la distribución de los hibridomas son recapitulados dentro de la tabla 4, en la misma que observamos que las placas con 100.000 células por pozo para ambos tipos de mielomas fueron las que tuvieron mayor porcentaje de pozos con hibridomas (porcentaje de fusión).

#### **3.1.4.3 Selección de los hibridomas de interés**

El bazo del ratón escogido para la fusión tiene diversos tipos de linfocitos, cada uno secretando diversos tipos de anticuerpos, por lo cual los hibridomas formados a partir de estos linfocitos segregan anticuerpos diferentes siendo necesario por lo tanto seleccionar aquellos pozos que contienen hibridomas que producen los anticuerpos que reconocen la cepa Ili de *V. alginolitycus*.

Los hibridomas son seleccionados según dos criterios: primero, crecimiento de las células y segundo, habilidad para secretar anticuerpos que son capaces de reconocer la cepa Ili mediante un test de dot-blot.

En esta primera selección se obtuvieron 118 hibridomas que reconocen la cepa Ili de un total de 447 hibridomas entre las diferentes condiciones de la fusión F2.

Con los 118 hibridomas primeramente obtenidos, se realiza una segunda selección con igual técnica de dot blot pero con 4 cepas bacterianas para identificar posibles reacciones cruzadas entre tres diferentes cepas de *Vibrios* y una cepa de *Escherichia coli* utilizada como control negativo por ser un género diferente de bacteria.

Estas cepas utilizadas para la selección son: Ili (cepa de *V. alginolyticus* con la cual se inmunizó a los ratones); E158 (cepa de *V. alginolyticus* de patogenicidad incierta); E22 (cepa de *V. harveyi* patógena) y *E. coli* (cepa control negativo).

Los resultados obtenidos se resumen en la tabla 5.

Hibridoma	Ili	158	E22	E.coli
102 hibridomas	+	+/-	+	0
2 B6	+++	0	0	0
2 G1	+++	0	0	0
2 H5	+++	0	0	0
4 E1	++	0	0	0
13 F3	++	0	0	0
13 G6	+++	0	0	0
14 A1	++	0	0	0
14 D4	++	0	0	0
14 G7	++	0	0	0
14 H7	+++	0	0	0
15 B5	++	0	0	0
15 E2	++	0	0	0
15 D11	++	0	0	0
19 G4	+++	+	0	0
12 E6	+++	++	0	0
12 G6	++	++	0	0

TABLA 5: Hibridomas seleccionados mediante el análisis con la técnica de dot-blot de sobrenadantes con 4 cepas de bacterias diferentes: Ili, cepa de *V. alginolyticus* con la cual se inmunizó a los ratones; E158, cepa de *V. alginolyticus* de patogenicidad incierta; E22, cepa de *V. harveyi* patógena y *E. coli* cepa de género diferente utilizada como control negativo. +++: señal muy fuerte; ++: señal fuerte; +: señal; +/-: revelado difuso; 0: ausencia de señal.

Los resultados muestran que hay dos grandes grupos de hibridomas, un grupo mayoritario constituido por 102 hibridomas que reaccionan además de la cepa Ili con la cepa E22 y en ciertos casos con la cepa 158; y un segundo grupo de 16 hibridomas que no reconocen la cepa E22 y *E. coli*.

En este segundo grupo de 16 hibridomas, podemos encontrar un subgrupo de 13 hibridomas que reconocen únicamente la cepa Ili y otro subgrupo de 3 hibridomas que reconocen tanto la cepa Ili como la cepa 158.

Los 16 hibridomas del segundo grupo fueron congelados y conservados en nitrógeno líquido.

Con el propósito de continuar el estudio, los hibridomas 2B6, 2G1 y 12G6 son mantenidos en cultivo para realizar posteriormente un clonaje.

#### **3.1.4.4 Clonaje**

Los hibridomas secretores de anticuerpos de

interés deben ser clonados para asegurar la producción de anticuerpos que provengan de un sólo clon de hibridomas y no de la mezcla de hibridomas que se encuentran originalmente en los pozos de cultivo.

Los hibridomas 2B6, 2G1 y 12 G6 fueron clonados según la técnica de diluciones límites (Materiales y Métodos 2.2.3). Los clones obtenidos fueron seleccionados según dos criterios: a) calidad de crecimiento y b) especificidad, estimada con ELISA indirecto (Materiales y Métodos 2.3.2).

La tabla 6 muestra los resultados obtenidos en las placas de clonaje.

Hibridoma	Pozos inoculados / (c/ml)	Nº máximo de pozos positivos	Nº total de pozos positivos	Porcentaje de crecimiento
2B6	100/0.3 100/0.5 100/1.0	30 50 } 180 100	89	49.5%
2G1	100/0.3 100/0.5 100/1.0	30 50 } 180 100	90	50.0%
12G6	100/0.3 100/0.5 100/1.0	30 50 } 180 100	51	28.3%

**TABLA 6:** Porcentaje de crecimiento de los hibridomas clonados. La fórmula utilizada para el cálculo del porcentaje de crecimiento fue la siguiente:

$$(\text{N}^\circ \text{ de pozos positivos} / \text{N}^\circ \text{ máximo de pozos positivos}) \times 100$$

Para realizar el clonaje, tres tipos de diluciones fueron realizadas: 1, 0.5, 0.3 células por hoyo. Después de 10 días de crecimiento el número de pozos conteniendo hibridomas fue determinado y el porcentaje de crecimiento fue calculado.

Los porcentajes obtenidos son variables y si consideramos un clonaje aceptable con porcentaje variable de 30% a 70%, los 3 hibridomas clonados se encuentran dentro de este rango.

Para examinar la especificidad de los clones de hibridomas obtenidos se realizó un test ELISA indirecto en el que se analiza los sobrenadantes de todos los hibridomas de cada placa de clonaje.

Particularmente se han seleccionado 3 ó 6 clones para cada uno de los 3 hibridomas clonados, las figuras 11, 12 y 13 presentan los resultados obtenidos en ELISA indirecto para cada uno de estos clones.

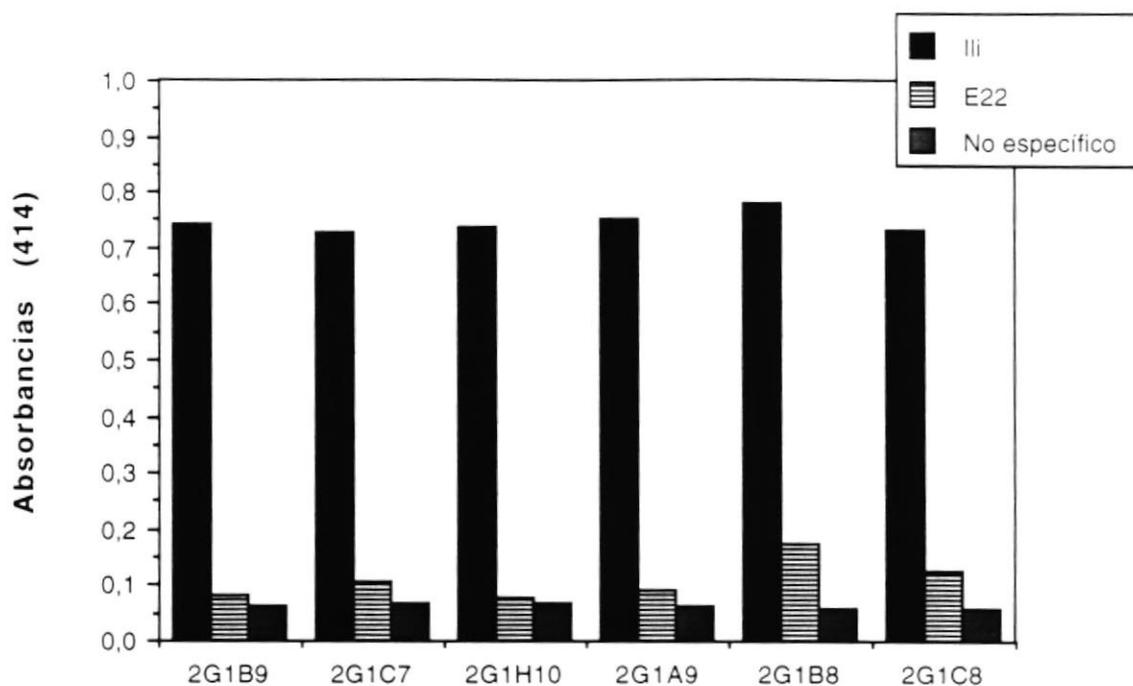


FIGURA 11: Comparación de la señal entre Ili, E22 y control no específico (sin primer anticuerpo) entre los 6 clones obtenidos del hibridoma 2G1.

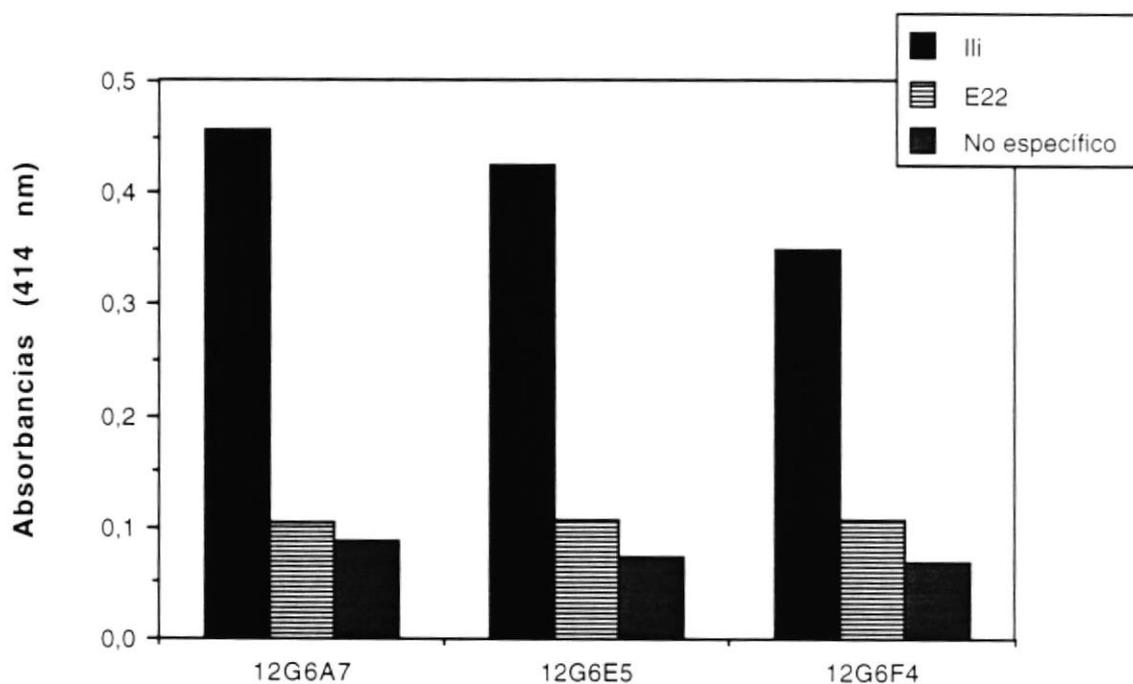


FIGURA 12: Comparación de la señal entre Ili, E22 y control no específico (sin primer anticuerpo) entre los 3 clones obtenidos del hibridoma 12G6.

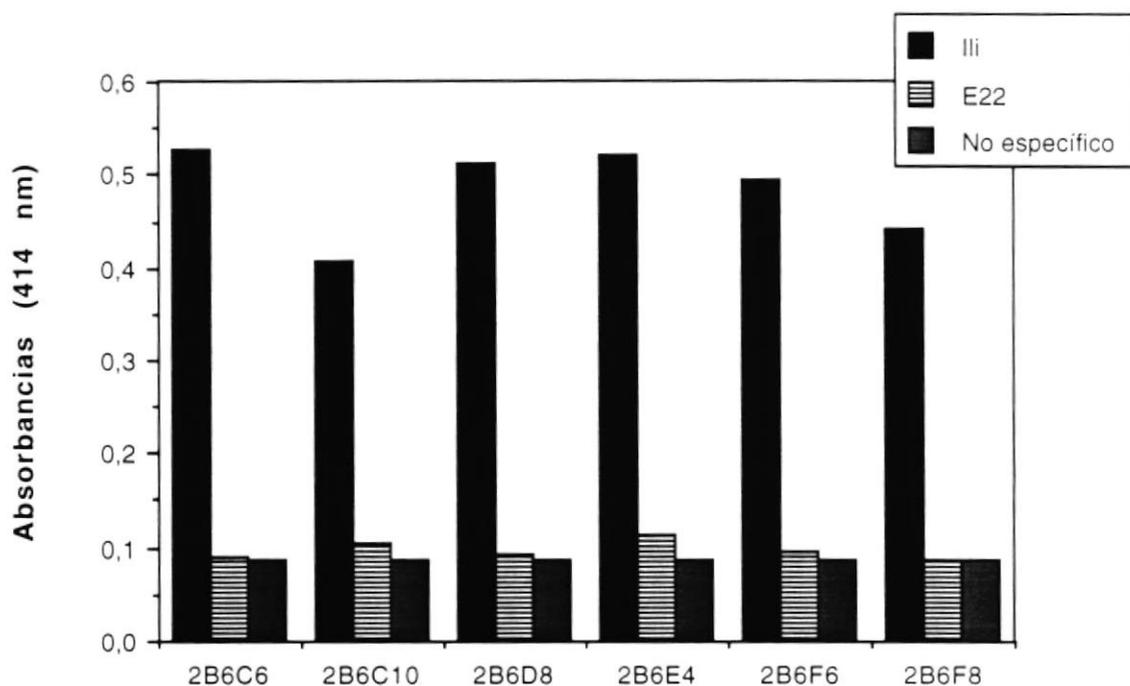


FIGURA 13: Comparación de la señal entre Ili, E22 y control no específico (sin primer anticuerpo) entre los 6 clones obtenidos del hibridoma 2B6.

Se puede observar en estas figuras que cada clon puede reconocer de manera específica la cepa Ili y no E22, siendo las señales obtenidas para la cepa E22 particularmente equivalentes a las señales no específicas.

Con el propósito de obtener una solución rica de anticuerpos, los hibridomas correspondientes a cada clon son inyectados en ratones para la producción de líquido ascítico (Materiales y Métodos 2.2.4). Todos los clones de hibridomas son congelados y conservados en nitrógeno líquido.

## 3.2 Colony blot

Hemos escogido arbitrariamente el anticuerpo 2B6 para desarrollar un método de detección de *V. alginolyticus* de tipo colony-blot por ser éste un método rápido y de fácil ejecución que permite realizar un análisis cuantitativo y cualitativo de colonias de *V. alginolyticus* presentes en una placa de cultivo bacteriano.

### 3.2.1 Desarrollo del protocolo de colony-blot

Un primer protocolo de colony- blot (Materiales y Métodos 2.3.4.1) fue tratado utilizando arbitrariamente el anticuerpo 2B6F6. Diferentes parámetros de este protocolo fueron optimizados.

#### 3.2.1.1 Tiempo de cultivo bacteriano

Diferentes tiempos de cultivo bacteriano antes del depósito de las membranas sobre las placas fueron examinados. La cepa Ili fue sembrada a la dilución  $10^{-2}$  en agar TCBS. Los resultados obtenidos se presentan en la tabla 7.

Tiempo	Número de colonias	Calidad del revelado
4 H	0	0
5 H	6	+
8 H	10	++
12 H	7	Halo/-
24 H	13	Halo/-
48 H	16	Halo/-

TABLA 7: Influencia del tiempo de cultivo en la calidad del revelado de las colonias.

0: ausencia de señal; -: señal muy baja; +: señal; ++: señal fuerte.

Se observa que el anticuerpo identifica las colonias en aquellas placas donde se ha realizado el depósito de la membrana a partir de las 5 horas de cultivo aunque en las membranas depositadas a las 8 horas de cultivo el reconocimiento de las colonias positivas estaba mejor definido.

En las membranas depositadas a partir de las 12 horas de cultivo, el tamaño de las colonias así como la presencia de un gran

halo alrededor de la misma no permite realizar una correcta identificación de las colonias positivas.

El tiempo elegido para cultivo de bacterias antes de colocar la membrana para realizar el colony blot es de 8 horas.

#### **3.2.1.2 Tiempo de permanencia de la membrana sobre el cultivo bacteriano**

Diferentes tiempos de permanencia de la membrana sobre el cultivo bacteriano fueron examinados para observar si este parámetro influía en la calidad del revelado de las colonias positivas.

Las membranas estuvieron en contacto con las bacterias 5, 10, 15 y 30 minutos.

Los resultados obtenidos se resumen en la tabla 8.

Tiempo	Calidad del revelado
5 min.	++
10 min.	++
15 min.	++
30 min.	Ruido de fondo/-

TABLA 8: Influencia del tiempo de permanencia de la membrana sobre el cultivo bacteriano en la calidad del revelado.

++: *señal fuerte*; -: *señal muy baja*.

La calidad del revelado de las colonias fue buena para las membranas que estuvieron en contacto con el cultivo 5, 10 y 15 minutos. Al contrario de la membrana que estuvo colocada sobre el cultivo durante 30 minutos en la cual aparece ruido de fondo que interfiere en la interpretación de las colonias positivas.

Al tratar de desarrollar el colony-blot como método rápido de diagnóstico escogemos el tiempo menor (5 minutos) con el cual la calidad del revelado es adecuada.

### 3.2.1.3 Condiciones de saturación y lavados

Las diferentes condiciones de saturación y de buffers de lavados se presentan en la tabla 9.

Condición	Buffer de saturación	Buffer de lavado	Revelado
A	PBS-leche 10%	PBS-tween 1.0%	++
B	PBS-leche 5%	PBS-tween 1.0%	++
C	PBS-leche 5%	PBS-tween 0.5%	++
D	PBS-leche 5%	PBS-tween 0.1%	++
E	PBS-leche 5%	PBS-tween 0.05%	+
F	PBS-leche 5%	PBS-tween 0.00%	+/-

**TABLA 9:** Seis condiciones diferentes usadas para tratar diferentes combinaciones entre los buffer utilizados para bloquear la membrana antes de colocar el primer anticuerpo y los buffer utilizados para el lavado de las membranas entre cada paso. ++: *buena reacción*; +/-: *revelado difuso*.

La tabla nos indica que no existe diferencia al término del colony-blot en el uso de PBS-leche 5% ó PBS-leche 10% como buffer para el bloqueo de la membrana.

En las diferentes concentraciones de Tween utilizadas en buffer de lavado, se observa mejor definición de los resultados positivos

en aquellas membranas que fueron lavadas con buffer a una concentración de Tween de 0,1% ó mayor mientras que en aquellas membranas en las que no se usa Tween para el buffer de lavado, el revelado es de menor calidad.

La condición D fue elegida para el protocolo optimizado.

En conclusión, durante este trabajo se ha producido 16 hibridomas productores de anticuerpos monoclonales capaces de reconocer específicamente *V. alginolyticus*.

Con anticuerpos provenientes de un clon de uno de estos 16 hibridomas, se ha desarrollado un método de colony-blot que permite detectar la presencia de *V. alginolyticus* en una muestra.

## CONCLUSIONES

La utilización en Ecuador de bacterias probióticas en la larvicultura como en granjas camaroneras se ha desarrollado durante los últimos años. A pesar de este desarrollo importante existe a estos días la carencia de métodos racionales de selección de bacterias probióticas así como de técnicas de detección y cuantificación que permitan un mejor control del uso de cepas probióticas en acuicultura.

La experiencia acumulada durante los últimos quince años en salud humana demuestra el interés de utilizar los anticuerpos monoclonales por una parte, con el fin de detectar y cuantificar diversos antígenos, y por otra parte con el objetivo de realizar el análisis molecular de fenómenos fisiológicos o patológicos.

Este estudio se ha llevado a cabo con el propósito de desarrollar un método inmunológico de detección y cuantificación de bacterias probióticas, en este caso una cepa de *Vibrio alginolyticus*.

Como primera parte se realizó la preparación de anticuerpos monoclonales contra la cepa Ili según el método de hibridación linfocitaria. Luego de inmunizar los ratones con la bacteria, su estado de inmunización fue evaluado mediante un método de dot-blot y ELISA indirecto.

A pesar que las tasas de producción de hibridomas fueron bajas, el protocolo de inmunización fue correcto ya que 32% y 29% de hibridomas secretores de anticuerpos reconocieron la cepa Ili luego de las fusiones F1 y F2 respectivamente.

En la primera fusión (F1) hubo problemas de contaminación con levaduras, demostrando la importancia que debe ser dada en materia de condiciones estériles de trabajo luego de la producción de anticuerpos. Además es imperativo congelar los hibridomas seleccionados a fin de prevenir el riesgo de pérdida debido a una eventual contaminación.

La segunda fusión (F2) permitió seleccionar 16 hibridomas específicos de *V. alginolyticus*. Estos resultados correspondían a dos líneas diferentes de mielomas (SP2/O y P3X63Ag8.653) sin revelar que una línea es mejor que la otra en término de frecuencia de obtención de hibridomas específicos.

En lo que concierne a la etapa de selección de los hibridomas específicos contra la cepa bacteriana Ili se puede decir que los

métodos de dot-blot y ELISA desarrollados fueron convenientes en términos de sensibilidad y especificidad. El dot-blot permitió una evaluación visual directa de la reacción de los anticuerpos.

Las cepas de bacterias utilizadas en el proceso de selección diferencial de los hibridomas fueron escogidos en función de la disponibilidad de bacterias posiblemente asociadas en el medio a la cepa Ili. Este enfoque fue exitoso ya que los hibridomas estrictamente específicos de la cepa Ili fueron obtenidos.

La segunda parte del trabajo consistió en el desarrollo de un método de detección de *V. alginolyticus*.

El colony blot fue escogido como método de detección por ser un método relativamente sencillo, que proporciona información cualitativa y cuantitativa en términos de número y proporción relativa de colonias positivas. Además, una vez que se obtiene el anticuerpo, no se necesita mayormente de equipo para ejecutarlo sino de reactivos que son de fácil adquisición.

Tomando como referencia un protocolo básico de colony-blot, se realizó la optimización de algunos parámetros que se consideran de importancia para el desarrollo del método como por ejemplo el tiempo de crecimiento de las colonias bacterianas en las placas de cultivo antes de colocar las membranas sobre las placas para iniciar el colony-blot.

Mediante el método de colony-blot se puede realizar una visualización directa de los resultados, permitiendo comparar el número de colonias de bacterias lli obtenidas en la caja de Petri y el número de colonias positivas obtenidas en el colony-blot, así se puede establecer un porcentaje de probiótico sobre el número total de bacterias en situaciones naturales o en mezclas correspondiendo a las experimentaciones *in vitro* o *in vivo* sobre las interacciones entre camarón, bacterias patógenas y probióticas.

Este método de colony-blot está actualmente en curso de validación, mediante una evaluación clínica en colaboración con diferentes productores locales a fin de resolver *in situ* los problemas metodológicos inherentes a la utilización en rutina de este tipo de técnica en laboratorios y por otra parte de conocer mejor en términos de sensibilidad y especificidad los límites del método.

Hoy en día se puede considerar que estas nuevas herramientas son esenciales desde el punto de vista aplicada y fundamental para estudiar y controlar los problemas bacteriológicos en la camaronicultura.

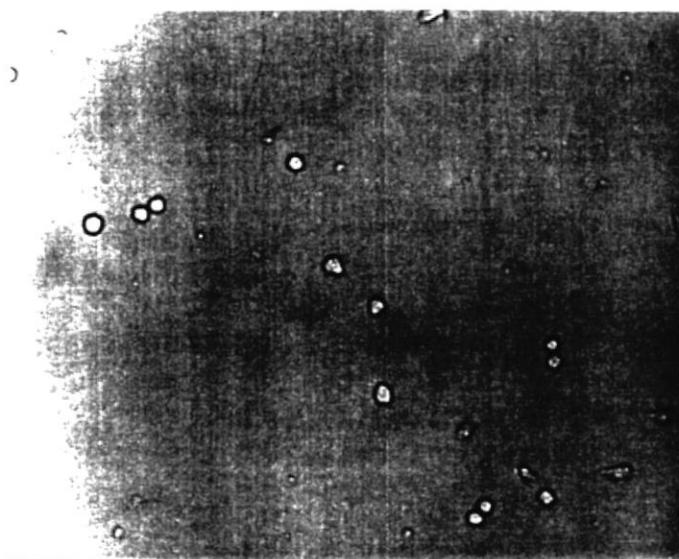
## RECOMENDACIONES

- Los resultados obtenidos en la fusión pueden ser mejorados mediante la utilización del Adjuvante incompleto de Freund durante las tres últimas inyecciones en el protocolo de inmunización.
- Es necesario aumentar las pruebas para probar la especificidad de los anticuerpos examinando los mismos contra un número mayor de cepas bacterianas y especialmente contra cepas consideradas probióticas.
- Es importante realizar mayores estudios sobre el antígeno reconocido con la ayuda de estudios de Western-blot que permiten una mejor caracterización e identificación de las proteínas reconocidas por cada uno de los anticuerpos.
- El trabajo desarrollado se continúa con el análisis a nivel molecular de diferentes mecanismos biológicos que definen el carácter probiótico de una bacteria.
- Es de suma importancia tomar medidas extremas de prevención y control para evitar contaminación del trabajo, en ambientes húmedos como CENAIM es mayor el riesgo de contaminación por hongos o levaduras.

## ANEXO 1

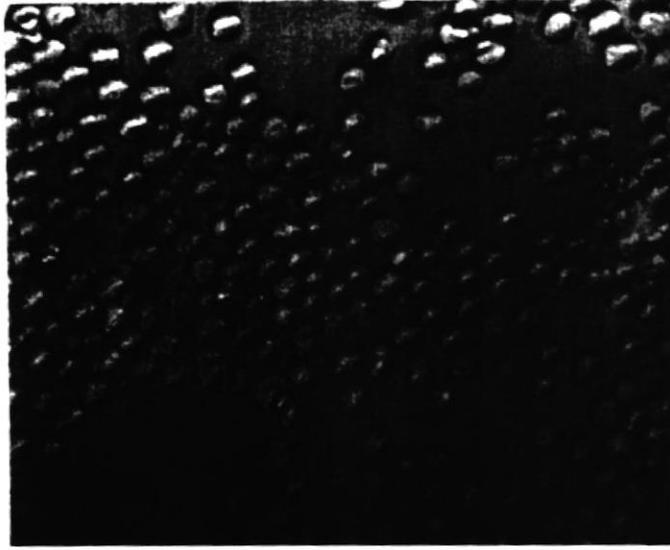


Macrófagos un día después de ser extraídos de la cavidad peritoneal de ratones Balb/c. 20 X. M: macrófagos fijados a la placa; m: macrófagos no fijados aún.

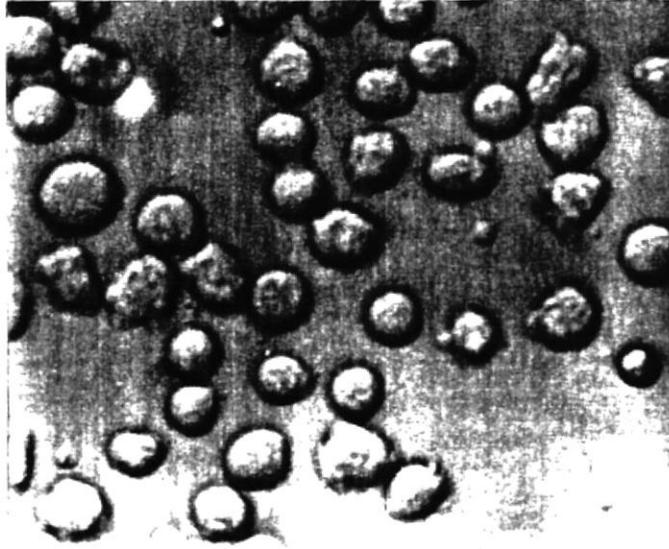


Hibridomas resultantes 10 días después de la fusión F2 (Hibridación Linfocitaria). Se observa el inicio de la división celular. 10 X.

## ANEXO 2

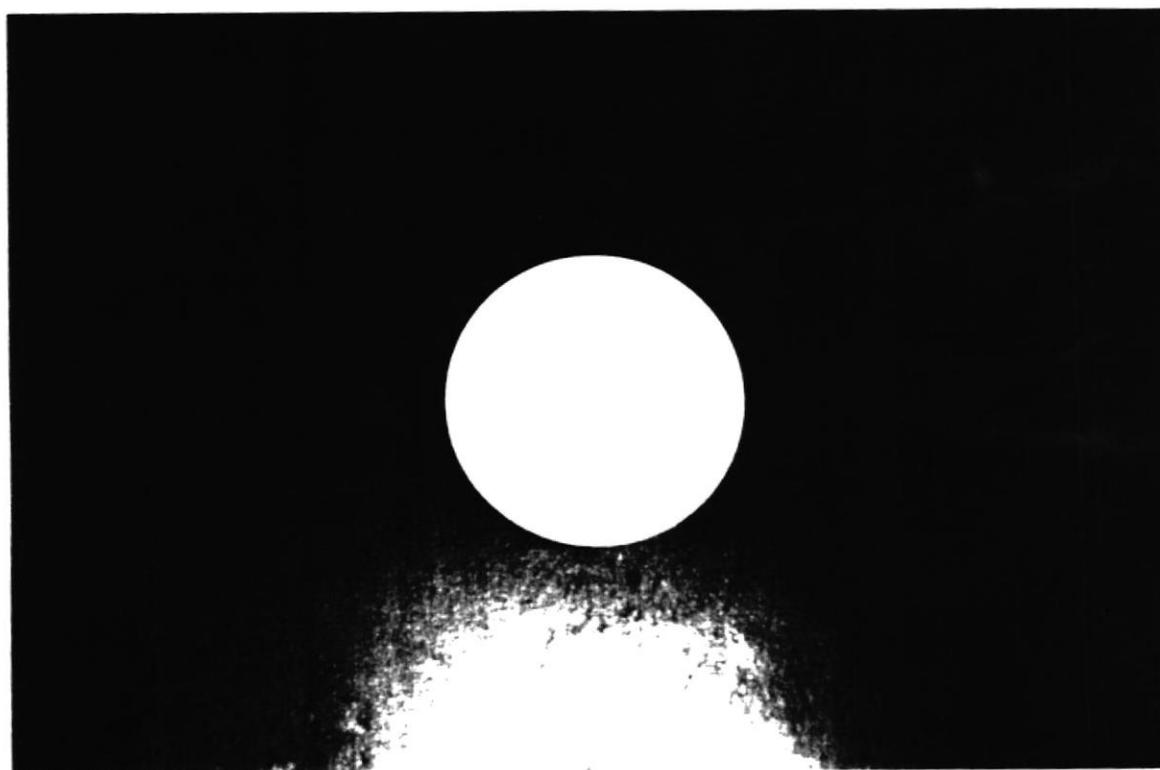


Hibridomas resultantes 30 días después de la fusión F2 (Hibridación Linfocitaria). Se puede apreciar el momento de la división celular. 20 X.



Célula hibridoma 30 días después de la fusión F2 (Hibridación Linfocitaria) en el momento de la división celular. 40 X.

## ANEXO 3



*Colony-blot:* Se observa las colonias de bacterias que han sido reconocidas específicamente por el anticuerpo monoclonal.



BIBLIOTE  
CENTRA

## BIBLIOGRAFIA

1. **Adams, A.** 1990. Detection of *V. parahaemolyticus* biotype alginolytus in Penaeid shrimps using an amplified enzyme linked immunosorbent assay. *Aquaculture*, in press.
2. **Austin, B. and Allen, D.A.** 1982. Microbiology of laboratory-hatched brine shrimp (*Artemia*). *Aquaculture* 26:369-383.
3. **Cerotini, J.C., Trnka, Z.** 1970. The role of persisting antigen in the development of immunological memory. *Int. Arch. Allergy* 38:37.
4. **Cochennec, H., Hervio, D., Panatier, B., Boulo V., Mialhe, E., Rogier, H., Grizel, H., Paolucci F.** 1992. A direct monoclonal sandwich immunoassay for the detection of *Bonamia ostrea* (acetospora) in the haemolymph samples of flat oyster, *Ostrea edulis* (mollusc: Bivalvia). *Dis. Aquat. Org.*, 12: 129-134.
5. **Daniels, V.H.** 1993. Diseases control in shrimp ponds and hatcheries in Ecuador 175-184. *Associacio Brasileira de Criadores de Camarão*, editors. *Proceeding of the IV Simposio Brasileiro sobre el cultivo de camarao*. Joao Pessoa (PB) Brasil.
6. **Desasque, Verdonck M.L., Sorgeloos P., Swings J., Leger P., and Kerster K.** 1993. Determination of the bacterial contamination in live food production systems in marine fish hatcheries in Southern Europe. *Lavens P., Sorgeloos P., Jaspers E., and Ollevier F.* editors. 399-402 *Larvi 91'*. Fish and crustacean larviculture symposium. European Aquaculture Society, special publication N° 15, Ghent, Belgium.
7. **Douillet, P.D., and Langdon, C.J.** 1994. Use of probiotics for the culture of larvae of the Pacific Oyster (*Crassostrea gigas* Thunberg). *Aquaculture* 119:25-40.
8. **Edelman, G.M.** 1970. The structure and function of antibodies. *Sci. Am.* 223(2):34.

9. **Ellinger, D.K., Muller, L.D., and Glantz, P.J.** 1980. Influence of feeding fermented *Colostrum* and *Lactobacillus acidophilus* on fecal flora of dairy calves. *Journal of Dairy Science* 63:478-482.
10. **Engvall, E., and Perlmann, P.** 1971. Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry* 8: 871.
11. **French, D., Fischberg, E., Buhls, S., Scharff, M.D.** 1986. The production of more useful monoclonal antibodies. I. Modifications of the basic technology. *Immunol. Today* 11:344-346.
12. **Garriques, D., and Wyban** 1993. Up to date advances on *Penaeus vannamei* maturation, nauplii and postlarvae production 217-234. Associacio Brasileira de Criadores de Camarão, editors. Proceeding of the IV Simposio Brasileiro sobre el cultivo de camarão. Joao Pessoa (PB), Brasil.
13. **Garriques, D., and Arevalo, G.** 1995. An evaluation of the production and use of a live bacterial isolate to manipulate the microbial flore in the commercial production of *Penaeus vannamei* postlarvae in Ecuador. The World Aquaculture Society. Browdy, C.L. y Hopkins, J.S. pp 53-59
14. **Gatesoupe, F.G.** 1991. *Bacillus sp.* spores: A new tool against early bacterial infection in turbot larvae. *Scophthalmus maximus* 409-411. Lavens P., Sorgeloos P., Jaspers E., and Ollevier F. editors. Larvi 91'. Fish and crustacean larviculture symposium. European Aquaculture Society, special publication N° 15, Ghent, Belgium.
15. **Gilliland, S.E.** 1979. Beneficial interrelationships between certain microorganisms and humans: candidates organisms for use as dietary adjuncts. *Journal of Food Production* 42:164.
16. **Gomes, L.A.** 1992. Zen and the art of aquafarming, a close look at Taiwanese aquaculture practices. *World Aquaculture* 23(3):18-26.
17. **Hawkes, R.** 1987. A dot-immunoblotting assay for monoclonal and other antibodies, *Analytical Biochemistry* 119:142-147.

18. **Igarashi, M.A., Sugita, H. and Deguchi, Y.** 1989. Microflora associated with eggs and nauplii of *Artemia salina*. *Nippon Suisan Gakkaishi* 55(11):2045.
19. **Kingsbury, D.T., Falkow, S.** 1985. Rapid detection and identification of infectious agents. Academic Press. New York.
20. **Kohler, G., and Milstein, C.** 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256:495-497.
21. **Lavilla-Pitogo, C.R.** 1988. Isolation and identification of luminous bacteria causing mortalities in *Penaeus monodon* hatcheries in panay. SEAFDEC (Southeast Asian Fisheries Development Center, Philippines) *Asia Aquaculture* 10:9.
22. **Le Gall, G. and Mialhe, E.,** 1992. Purification of rickettsiales-like organisms associated with *Pecten maximus* (Mollusca: Bivalvia): serological and biochemical characterization. *Dis. Acuac. Org.*, 12: 215-220.
23. **Lewis, D.H.** 1973. Response of brown shrimp to infection with *Vibrio sp.* Proceedings of the 4<sup>th</sup> Annual Workshop World Mariculture Society 333-338.
24. **Maeda, M.** 1988. Microorganisms and protozoa as feed in mariculture. In E.B.G. Jones and J.D. Miller, editors. *Progress in Oceanography* 21:31-38.
25. **Maeda, M., and Liao, I.C.** 1992. Effect of bacterial population on the growth of prawn larvae, *Penaeus monodon*. *Bulletin of the National Research Institute of Aquaculture* 21:25-29.
26. **Maeda, M.K., Nogami and Ishabashi, N.** 1992. Utility of microbial food assemblages for culturing a crab, *Portunus trituberculatus*. *Bulletin of the National Research Institute of Aquaculture* 21:31-38.
27. **Mendoza, S.** 1995. Uso de desinfectantes en Acuacultura. Tesis para la obtención del título de Acuacultor. Facultad de Ingeniería Marítima. ESPOL.

28. **Mialhe, E., Bachère, E., Chagot, D., Grizel, H.** 1988. Isolation and purification of the protozoan *Bonamia ostrea*, a parasite affecting the flat oyster *Ostrea edulis*. *Aquaculture* 71: 293-299.
29. **Moller, G.** 1978. Role of macrophages in the immune response. *Transplant Rev.* 40.
30. **Moller, G.** 1982. Interleukins and lymphocyte activation. *Inmunol. Rev.* 63.
31. **Muñoz, J.** 1964. Effect of bacteria and bacterial products on antibody respons. *Adv. Inmunol.* 4:391.
32. **Noel, T., Aubrec, E., Blateau, D., Mialhe, E. and Grizel, H.** 1992. Treatments against the *Vibrio P1*, suspected to be responsible for mortalities in *Tapes philippinarum*. *Aquaculture*, 107:171-174
33. **Padlan, E.A.** 1977. Structural basis for the specificity of antibody-antigen reactions and structural mechanisms for the diversification of antigen-binding specificities. *Per. Biophys.* 10:35.
34. **Porter, R.R.** 1959. The hidrolisis of rabbit g-globulin and antibodies with crystalline papain. *Biochemical Journal* 73:119-126.
35. **Potter, M.** 1972. Inmunoglobulin -producing tumours and myeloma proteins of mice. *Physiol. Rev.* 62:631.
36. **Rodríguez, J., Boulo, V., Mialhe, E., and Bachere, E.** 1995. Characterization of shrimp haemocytes and plasma components by monoclonal antibodies. *American Fisheries Society Special Publication* 18:304-310.
37. **Sandine, W.E.** 1979. Roles of *Lactobacillus* in the intestinal tract. *Journal of Food Protection* 42:259.
38. **Song, Y.L., Lee, S.P., Lin, Y.T. G.H. and Chen C.C.** 1992. Enzyme immunoassay for shrimp vibriosis. *Dis. Aquat. Org.* 14:43-50

39. **Sung, H.H., Song, Y.L., and Kou, G.H.** 1992. Potential uses of bacterin to prevent shrimp vibriosis. *Fish and shellfish immunology* 1:311-312.
40. **Thurman, E.M., Meyer M., Pomes M., Perry, C.A., Schwab A.P.** 1990. Enzyme-linked immunosorbent assay compared with gas chromatography/mass spectrophotometry for the determination of triazine herbicides in waters. *Anal. Chem.* 15: 2043-2048.
41. **Towlin, H., and Gordon, J.** 1984. Immunoblotting and dot immunoblotting-current status and outlook. *Inmunol. Methods* 72:313.