



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA
ESCUELA DE POSGRADO

**“DETECCIÓN DE GENES *PirAB^{Vp}* EN
AISLADOS DEL GÉNERO *Vibrio*
DEL LANGOSTINO *Penaeus*
vannamei DE CENTROS DE
CULTIVO DEL DEPARTAMENTO
DE TUMBES”**

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE
MAESTRO EN SANIDAD ACUÍCOLA**

ANDREA ESTEFANÍA VICENTE VILLANUEVA

LIMA - PERÚ

2019

Asesor

Dr. Armando Hung Chaparro
Decano de la Facultad de Veterinaria y Zootecnia

Dedicatoria

La mayor satisfacción de ejecutar el presente trabajo, es la alegría que genera en mis padres, mi abuela Rosita y mis hermanos, gracias por su amor, su apoyo día con día y ser partícipe siempre de todos mis logros.

A Dios, por hacer posible que siga cumpliendo todas mis metas y sueños.

Agradecimientos

Este estudio fue apoyado por el Centro de Excelencia de Biología molecular y Biotecnología de langostinos “Centex Shrimp”.

Gracias a la Dra. Saengchan Senapin y al Dr. Ha Thanh Dong por todos los conocimientos brindados, apoyo incondicional, paciencia y el cariño recibido durante mi estadía en los laboratorios de Centex Shrimp.

Gracias al Dr. Carlos Shiva, por permitir el uso de los laboratorios de Inocuidad Alimentaria para la realización de cultivos microbiológicos.

Gracias a Marcela Mora y al Dr. Armando Hung por asesorarme y apoyarme durante la ejecución del trabajo de tesis.

Gracias al Programa de Maestría en Sanidad Acuícola, Gestión N° 230- 2015- FONDECYT por proporcionar las facilidades para llevar a cabo este estudio en Centex Shrimp Bangkok- Tailandia.

Tabla de contenidos

Resumen/ Abstract

1. Introducción	1
2. Planteamiento de la investigación	
a. Planteamiento del problema	4
b. Marco teórico	5
c. Justificación del estudio	15
3. Objetivos	16
a. General	
b. Secundarios	
4. Metodología	17
a. Diseño del estudio	
b. Población	
c. Muestreo	
d. Procedimientos y técnicas	
i. Aislamiento bacteriano	
ii. Extracción de ADN	
iii. Detección de la bacteria que contiene los genes que codifican para las toxinas Pir A y Pir B	
a. PCR anidado AP4	
b. PCR Dúplex <i>PirAB</i> ^{Vp}	
c. PCR PirAB-2020 y secuenciamiento	
iv. Detección del plásmido pVA1 o pVPA3-1	

v.	Detección de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> mediante PCR gen <i>ldh</i> (Hemolisina lecitina- dependiente)	
vi.	Análisis de Secuencias Multilocus (MLSA)	
vii.	Examen histopatológico	
e.	Consideraciones éticas	
f.	Plan de análisis	
5.	Resultados	28
a.	Aislamiento bacteriano y extracción de ADN	
b.	Detección de los genes que codifican las toxinas <i>Pir A</i> y <i>Pir B(PirAB^{Vp})</i>	
i.	PCR anidado AP4	
ii.	PCR Dúplex <i>PirAB^{Vp}</i>	
iii.	PCR <i>PirAB-2020</i> y secuenciamiento	
c.	Detección del plásmido pVA1 o pVPA3-1	
d.	Detección de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> mediante PCR gen <i>ldh</i>	
e.	Análisis de Secuencias Multilocus (MLSA)	
f.	Examen histopatológico	
6.	Discusión	35
7.	Conclusiones	41
8.	Recomendaciones	42
9.	Referencias bibliográficas	43

Anexos

Lista de Tablas

- **Tabla 1.** Concentración y pureza de ADN extraído de aislamientos bacterianos.
- **Tabla 2.** Descripción de granjas langostineras y aislados bacterianos.
- **Tabla 3.** Primers usados en el estudio.
- **Tabla 4.** Frecuencia de presencia de genes *PirAB^{Vp}* en aislados de *Vibrio* del langostino blanco *Penaeus vannamei* proveniente de 5 granjas langostineras del departamento de Tumbes en el mes de Enero 2018.
- **Tabla 5.** Resultados PCR AP4 nested, Dúplex PCR, PCR 2020 *PirAB* y PCR gen *ldh* de las granjas 4 y 5 donde se obtuvieron aislados positivos al gen *PirAB^{Vp}*.

Lista de Figuras

- **Figura 1:** Exportaciones de recursos hidrobiológicos procedentes de la actividad acuícola en 2017.
- **Figura 2:** Lesiones características de AHPND. Hepatopáncreas pálido y atrofiado indicativo de AHPND.
- **Figura 3:**
 - Figura 1a: PCR anidado AP4
 - Figura 1 b: PCR Dúplex *pirAB^{Vp}*
 - Figura 1 c: PCR PirAB- 2020
- **Figura 4:**
 - Figura 2a: Prueba de PCR específica para detectar el gen *ldh* de *V. parahaemolyticus*.
 - Figura 2b: Árbol filogenético de MLSA.
- **Figura 5:** Tinción H& E de tejido hepatopancreático de los langostinos pertenecientes a las granjas positivas a los genes *PirAB^{Vp}* (G1 y G2).
- **Figura 6.** Detección mediante PCR de los genes virulentos putativos que codifican los ORFs 70, 75, 78 y 79 localizados en el plásmido pVA1 o pVPA3-1.
- **Figura 7.** Hallazgos histopatológicos de la granja langostinera 4.
- **Figura 8.** Hallazgos histopatológicos de la granja langostinera 5.

Resumen

Una reciente enfermedad emergente en los langostinos peneidos ha venido afectando a la producción de langostinos mundialmente, es la llamada Enfermedad de la Necrosis Hepatopancreática Aguda (AHPND, por sus siglas en inglés, AHPND), que afecta al langostino blanco *Penaeus vannamei*, especie de mayor importancia en el sector langostinero del Perú. Esta enfermedad es causada por cepas de *Vibrio parahaemolyticus* que portan un plásmido con genes que codifican las toxinas binarias *PirAB^{Vp}*. En el presente estudio, se aislaron 51 bacterias recuperadas de langostinos blancos, con signos clínicos inespecíficos de 5 granjas del departamento de Tumbes para el diagnóstico mediante PCR anidado AP4. Tres de 51 aislados (34, 36 y 43) provenientes de 2 granjas resultaron positivos, y confirmados mediante PCR dúplex *PirAB^{Vp}*. La secuencia amplificada fue corroborada mediante secuenciamiento. La identificación del gen *ldh* y el análisis de secuencias multilocus (MLSA) revelaron que los aislados 36 y 43 pertenecen a *V. parahaemolyticus* mientras que el aislado 34 a *V. campbellii*. Por lo tanto, el estudio confirma la presencia de especies de *Vibrio* conteniendo los genes *pirAB^{Vp}* en granjas langostineras de Tumbes. Es necesario realizar más estudios para elucidar si estos aislados tienen un rol patogénico y si están involucrados en la mortalidad de langostinos de cultivo.

Palabras Clave

AHPND, *Vibrio campbellii*, *Vibrio parahaemolyticus*, *pirAB^{Vp}*

Abstract

A recent emerging disease in penaeid shrimp has been affecting the production of shrimp worldwide, is the so-called disease of acute hepatopancreatic necrosis (AHPND), which affects the white shrimp *Penaeus vannamei*, the most important species in the sector shrimp from Peru. This disease is caused by strains of *Vibrio parahaemolyticus* that carry a plasmid with genes that encode binary *PirAB^{Vp}* toxins. In the present study, 51 bacteria recovered from white shrimp were isolated, with nonspecific clinical signs from 5 farms in the department of Tumbes for diagnosis by AP4 nested PCR. Three of 51 isolates (34, 36 and 43) from 2 farms were positive, and confirmed by duplex PCR *PirAB^{Vp}*. The amplified sequence was corroborated by sequencing. The identification of the *ldh* gene and the multilocus sequence analysis (MLSA) revealed that isolates 36 and 43 belong to *V. parahaemolyticus* while isolate 34 to *V. campbellii*. Therefore, the study confirms the presence of *Vibrio* species containing the *pirAB^{Vp}* genes in shrimp farms of Tumbes. Further studies are needed to elucidate if these isolates have a pathogenic role and if they are involved in the cultured shrimps.

Keywords:

AHPND, *Vibrio campbellii*, *Vibrio parahaemolyticus*, *pirAB^{Vp}*, Pir toxin

1. Introducción

El langostino blanco (*Pennaeus vannamei*) es una de la principales especies acuícolas cultivadas en el Perú, además de la concha de abanico (*Argopecten purpuratus*) y la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*). Desde el 2006, la producción de langostinos ha tenido más del 93% de volumen de cosecha en la acuicultura. Según el Ministerio de la Producción - PRODUCE, la producción de langostinos ha sido caracterizada por representar la mayor proporción de especies acuícolas cultivadas y exportadas en el país (Comex Perú, 2018^a).

Existen diversas enfermedades que afectan a los langostinos y su producción en el país, la más común es la vibriosis (Berger, 2004), pero también es importante prestar atención a nuevas enfermedades emergentes en este sector, tales como la Enfermedad de la Necrosis Hepatopancreática Aguda (AHPND). Esta ha afectado dramáticamente a través de pérdidas económicas sobre los principales productores de langostinos alrededor del mundo tales como China (2010), Vietnam (2011), Tailandia (2012), Malasia (2011), México (2013), Filipinas (2015) y EEUU(2017) (Thitamadee *et al.*, 2015; Lightner *et al.*, 2012, Tran *et al.*, 2013, Joshi *et al.*, 2014; de la Pena *et al.*, 2015; Nunan *et al.*, 2014; Soto- Rodriguez *et al.*, 2015 ; Dhar *et al.*, 2017).

Los brotes de AHPND ocurren generalmente dentro de los 35 días en que los estanques de cultivos son sembrados, caracterizándose por la repentina y masiva mortalidad de hasta un 100% (Tithamadee *et al.*, 2015), y Ésta es a causa del desprendimiento masivo de las células epiteliales del túbulo hepatopancreático, considerada la lesión patognomónica de la enfermedad (Lightner *et al.*, 2012). Es considerada una infección por cepas de la bacteria *Vibrio parahaemolyticus* la cual transporta un plásmido de ~69 kb (kilobase) llamado pVA1 o pVPA3-1 que contienen genes que codifican toxinas mortales similares a las toxinas binarias *PirA* y *PirB* de los insectos relacionados al género *Photorhabdus* (Lee *et al.*, 2015; Han *et al.*, 2015). Es por ello que estas toxinas han sido llamadas *pirAB^{Vp}* (Phiwsaiya *et al.*, 2017).

Se ha reportado que las toxinas binarias *PirA* y *PirB* son necesarias para causar las lesiones patognomónicas de AHPND, siendo la principal, el desprendimiento masivo de las células epiteliales del túbulo del hepatopáncreas (Lee *et al.*, 2015; Sirikharin *et al.*, 2015; Han *et al.*, 2017; Phiwsaiya *et al.*, 2017). Sin embargo, se ha registrado la aparición de otras cepas de *Vibrio parahaemolyticus* positivas a AHPND (V_{pAHPND}) mutantes, debido a la interrupción o la eliminación de *pirAB^{Vp}*, lo cual ha afectado el nivel de su patogenicidad (Phiwsaiya *et al.*, 2017; Han *et al.*, 2017).

En los últimos años, se han incrementado los reportes que indican que los genes *pirAB^{Vp}* no están presentes solo en *V. parahaemolyticus* sino también en otras

especies del género *Vibrio* incluyendo *V. harveyi* (Kondo *et al.*, 2015), *V. owensii* (Liu *et al.*, 2015), *V. campbellii* (Dong *et al.*, 2017) y *V. punensis* (Restrepo *et al.*, 2018). Recientemente, estos genes fueron detectados en *Micrococcus luteus* aislado de un langostino *Penaeus vannamei* de una granja en San Blas, México (Durán-Avelar *et al.*, 2018).

El presente estudio tuvo como objetivo detectar bacterias del género *Vibrio* que porten en su interior los genes que codifican para las toxinas *PirAB^{Vp}* en las granjas langostineras ubicadas en los distritos de Tumbes y Zarumilla del departamento de Tumbes, Perú.

2. Planteamiento de la Investigación

a. Planteamiento del Problema

En los últimos años la Enfermedad de la Necrosis Hepatopancreática Aguda (AHPND) ha venido afectando a la producción del langostino blanco *Penaeus vannamei* en el mundo. Esta especie de crustáceos es la más cultivada en el país y la primera especie acuícola más exportada en el Perú. Esta enfermedad ya ha provocado pérdidas económicas a los productores de langostinos a nivel mundial, estimándose pérdidas de hasta 20 billones de dólares en la acuicultura de Asia, llegando a producir 100% de mortalidad en los primeros 35 días de cultivo. Se sabe que la responsable de esta enfermedad es una cepa de *Vibrio parahaemolyticus* que transporta un plásmido conteniendo los genes que codifican las toxinas *Pir A* y *Pir B*, lo cual aumenta la amenaza de la enfermedad en el sector langostinero. En la actualidad no existen controles para monitorear si las larvas de langostinos que ingresan al país portan las cepas de *Vibrio* conteniendo los genes *PirAB^{Vp}*.

b. Marco Teórico

Sector langostinero en el Perú

El langostino blanco *Penaeus vannamei* pertenece a unas de las tres especies acuícolas principales que posee el país, además de la concha de abanico (*Argopecten purpuratus*) y la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mikiss*) desde el año 2006. La acuicultura peruana se orienta principalmente al cultivo del langostino blanco y su mayor actividad está desarrollada en el departamento de Tumbes (Comex Perú, 2018^b).

Según PRODUCE, desde el 2006 el langostino blanco ha representado el mayor volumen de especies exportadas de la acuicultura peruana. En el 2017, se alcanzó una cosecha de 26,768 TM lo que representó el 27 % de las especies acuícolas cultivadas, y en cuanto a las exportaciones; el langostino representó el 79% del total de especies exportadas (26, 493 TM). Los principales destinos de exportación de este producto son EEUU, España y Francia, siendo EEUU el principal mercado con 51.6% de participación (Comex Perú, 2018^b). Las exportaciones de los principales productos acuícolas son langostinos, conchas de abanico y trucha y en el período enero-abril del 2018 se logró un total de \$92.2 millones de los cuales \$70.3 millones que representa un 76% provienen del langostino, \$11.6 millones de truchas (13%) y \$10.4 millones de conchas de abanico (Comex Perú, 2018^b).



Figura 1: Exportaciones de recursos hidrobiológicos procedentes de la actividad acuícola en 2017. Tomado de la página de ComexPerú del Diario Gestión.

En el 2014, en el Perú se suspendió la importación de especímenes y productos de crustáceos (vivos, cocidos, fresco, congelados, etc.), incluido el langostino blanco *Penaeus vannamei*, ante la presencia de AHPND en países cercanos hasta que se implementaran herramientas de diagnóstico molecular que detecten correctamente la cepa patógena *Vibrio parahaemolyticus* considerada en ese tiempo el agente causal de la enfermedad (Ministerio de la Producción, 2014).

En el 2017, la autoridad competente SANIPES realizó un plan de vigilancia sanitaria de recursos hidrobiológicos en donde reportaron haber encontrado

cepas de VP_{AHPND} en langostinos silvestres de los canales de marea del departamento de Tumbes, sin embargo no se confirmó si estas cepas eran patogénicas (SANIPES, 2018^a).

En Marzo del 2018, la autoridad competente en el Perú, el Organismo Nacional de Sanidad Pesquera - SANIPES tomó nuevamente medidas preventivas contra AHPND en el Perú mediante la restricción de la importación de langostinos *Penaeus vannamei* y *Penaeus monodon* en cualquier fase de su ciclo de vida y que procedan de China, Vietnam, Malasia, Tailandia, México, Filipinas y Texas (Estados Unidos), países que han sido notificados ante la OIE por presentar AHPND (SANIPES, 2018^b)

Enfermedad de la Necrosis Hepatopancreática Aguda (AHPND)

En el 2009, se presentaron brotes de una enfermedad inusual que resultaron en severas mortalidades de cultivos de langostinos en China, diseminándose rápidamente a Vietnam en el 2010, en Malasia en el 2011, Tailandia en el 2012, México en el 2013 y EEUU en el 2017 (Thitamadee *et al.*, 2015; Lightner *et al.*, 2012, Tran *et al.*, 2013, Joshi *et al.*, 2014; de la Pena *et al.*, 2015; Nunan *et al.*, 2014; Soto- Rodríguez *et al.*, 2015; OIE, 2017). Estos brotes ocurrieron durante los primeros 35 días de cultivo, es por ello que en un inicio fue llamado Síndrome de la Mortalidad Temprana (EMS), pero este nombre causaba confusión con otras posibles causas de mortalidad temprana en los centros de cultivo, por lo cual fue llamado posteriormente Síndrome de Necrosis

Hepatopancreática aguda (AHPNS) debido al cuadro clínico y los signos que presentaba en el hepatopáncreas del langostino (Sirikharin *et al.*, 2015). Sin embargo, luego se reconoce a una cepa del *Vibrio parahaemolyticus* como agente causante de la enfermedad, y se denominó finalmente Enfermedad de Necrosis Hepatopancreática Aguda (AHPND) (Cuellar *et al.*, 2013).

AHPND es una enfermedad emergente reciente del langostino blanco (*Penaeus vannamei*), aunque también afecta al langostino gigante *Penaeus monodon*. Esta enfermedad ha ocasionado pérdidas económicas entre los productores de langostinos alrededor del mundo, en los países de China, Vietnam, Malasia, Filipinas, México, Tailandia, y USA se caracteriza por mortalidades masivas, hasta un 100% en algunos casos en los estanques afectados, generalmente durante los primeros 35 días de cultivo tras la repoblación de estanques de engorde con post-larva (PL) o juveniles, y pocos días después de los primeros signos de la enfermedad. Los animales juveniles de más edad también podrían estar afectados por AHPND (Thitamadee *et al.*, 2015; Lightner *et al.*, 2012, Tran *et al.*, 2013, Joshi *et al.*, 2014; de la Pena *et al.*, 2015; Nunan *et al.*, 2014; Soto- Rodriguez *et al.*, 2015; OIE, 2017).

Esta enfermedad es de notificación obligatoria para la Organización Internacional de Sanidad Animal OIE, y ya ha sido confirmada en diferentes países desde el 2010, tales como China, Malasia, Vietnam, Tailandia, Filipinas, México y en el 2017 USA (Thitamadee *et al.*, 2015; Lightner *et al.*, 2012, Tran

et al., 2013, Joshi *et al.*, 2014; de la Pena *et al.*, 2015; Nunan *et al.*, 2014; Soto-Rodriguez *et al.*, 2015 ; Dhar *et al.*, 2017), pero aún ningún país de Sudamérica la ha reportado ante la OIE.

Desde el reconocimiento de AHPND se ha estimado una pérdida de más de 20 billones de dólares en la acuicultura de langostinos en Asia (Dhar *et al.*, 2019). En el 2011, China tuvo un 80% de pérdida en la producción de langostinos (Leaño y Mohan 2012), mientras que en Malasia hubo una pérdida significativa en la producción del langostino *P. vannamei* valorada en 100 millones de dólares (FAO, 2013) y una pérdida en la de *P. monodon* valorada en 1.5 trillones VND (Vietnamese Dong). Entre los años 2012 y 2013 en Tailandia disminuyó la producción de langostinos a un 54 % mientras que entre los años 2013 y 2014, la producción de *P.vannamei* y *P.monodon* en Filipinas bajó debido a un brote sospechoso causado por AHPND (Leobert *et al.*, 2015). En Sonora, México, las mortalidades de langostinos de cultivo alcanzaron una tasa de 95% (Nunan *et al.*, 2014). Las ultimas prevalencias de AHPND reportadas son en Malasia con un 5.4% en el año 2015 (Kua *et al.*, 2016) y en Filipinas se reportó un 33% en el 2017 (Dabu *et al.*, 2017).

Los signos clínicos de AHPND son inespecíficos y no poseen valor diagnóstico confirmatorio. Algunos signos clínicos asociados a la presentación de AHPND son: nado errático, crecimiento reducido, textura blanda y áspera de la cutícula,

anorexia, contenido intestinal bajo o vacío, hepatopáncreas atrofiado y pálido, y es común la presencia de parasitosis secundarias (Lightner *et al.*, 2013).



Figura 2: Lesiones características de AHPND. Hepatopáncreas pálido y atrofiado indicativo de AHPND. Fuente: Lightner & T. Flegel (2012)

En cuanto la histopatología de AHPND, se pueden observar tres fases secuenciales denominadas, aguda, intermedia y terminal, las cuales pueden ser identificadas durante la infección de la enfermedad (Pantoja y Lightner, 2014; Varela y Peña, 2016). En la fase inicial de la enfermedad, se encuentran alteraciones que generan pérdida de funcionalidad y desprendimiento de las células F, B y R de los túbulos del hepatopáncreas, una disminución de la mitosis de las células E, disminución de las reservas y la atrofia del hepatopáncreas. En la fase intermedia, se pueden observar bacterias oportunistas como masas bacterianas basófilas, desprendimiento de las células epiteliales e infiltración hemocítica y finalmente en la etapa terminal, se observa la destrucción masiva del hepatopáncreas mediante desprendimiento de las

células epiteliales, infiltración hemocítica severa, melanosis y necrosis multifocal. (Cuellar- Anjel *et al.*, 2012; Varela y Peña, 2016; Pantoja y Lightner, 2014).

***Vibrio parahaemolyticus*, plásmido pVA1 o pVPA3-1 y toxinas PirA y PirB**

Esta enfermedad emergente en los langostinos peneidos es causada por la ingestión de las toxinas *PirA* y *PirB* generadas por un plásmido específico llamado pVA1 o pVPA3-1 transportados por algunas cepas de *Vibrio parahaemolyticus*, una bacteria halófila gram negativa presente en aguas salobres y ambientes marinos. Muchas de estas cepas de *V. parahaemolyticus* no son patogénicas, y algunas causan enfermedades en humanos y animales acuáticos (Restrepo *et al.*, 2018).

El género *Vibrio* comprende alrededor de 30 especies de bacterias que requieren en su mayoría de suplementación de ClNa en los medios para su crecimiento. *V. parahaemolyticus* es una bacteria patógena que puede estar presente tanto en cultivos de langostinos como en agua, sedimentos y en organismos asociados a las pozas de cultivo (Bondad- Reantaso, 2016).

Recientemente se han reportado otras especies del género *Vibrio* que contienen los genes que codifican para las toxinas *PirA* y *PirB* causantes de AHPND, entre ellos *Vibrio harveyi* (Kondo *et al.*, 2015), *Vibrio campbelli* y *Vibrio owensii* (Xiao *et al.*, 2017; Han *et al.*, 2017) entre otros. En el 2017 hubo

evidencias probables que existiría transferencia horizontal de genes *Pir^{vp}* (*PirA* y *PirB*) o del plásmido pVA1 entre las diferentes especies de bacterias *Vibrio*, incrementando potencialmente la complejidad de los agentes causales de AHPND en la industria langostinera (Dong *et al.*, 2017). Posteriormente, en el 2019 se confirma a través de estudios de laboratorio la transferencia horizontal del plásmido pVA1 desde una cepa *V. campbelli* causante de AHPND hacia una cepa *V. owensi* no causante de AHPND (Dong *et al.*, 2019).

Estas toxinas, *PirA* y *PirB*, se identificaron en *Photobacterium luminescens*, bacteria gram negativa, luminiscente en forma de varilla, la cual tiene una relación simbiótica con mosquitos y polillas, esta bacteria pertenece a la familia de las Enterobacterias (Bondad-Reantaso, 2016). Estas toxinas actúan como proteínas binarias, necesarias para provocar la toxicidad en mosquitos y polillas, afectando el epitelio del intestino medio de estos artrópodos con inflamación severa y desprendimiento de las membranas apicales (Blackburn *et al.*, 2006; Ahantarig *et al.*, 2009). La patogenia de langostinos afectados por AHPND muestran una patología similar a la de los insectos afectados por las toxinas *PirA* y *PirB* (Trujillo, 2016). Esta se inicia con la colonización de la cepa patógena *V. parahaemolyticus* en el estómago de los langostinos, donde se liberan las toxinas binarias *PirA* y *PirB*, con capacidad proteolítica causando la muerte de los animales mediante el desprendimiento masivo de las células epiteliales del túbulo del hepatopáncreas, considerada la lesión patognomónica de AHPND. Las células desprendidas pueden presentar en algunos casos

núcleos cuasi normales, no picnóticos, con cariólisis u otras lesiones aparentes (Lightner *et al.*, 2013; Phiwsaiya *et al.*, 2017, Varela-Mejias *et al.*, 2017). Es por ello que estas toxinas se han denominado *PirA^{Vp}* y *PirB^{Vp}* para indicar que se tratan de las toxinas *Pir* en *V. parahaemolyticus* (*Pir^{Vp}*) (Phiwsaiya *et al.*, 2017).

Además, se ha identificado que las toxinas *Pir A* y *Pir B* que afectan a las especies *Photobacterium* están presentes en los cromosomas bacterianos (FM162591.1, FN667742.1 y FO704550.1), mientras que *PirAB^{Vp}* son las únicas toxinas que están codificadas por un plásmido llamado PVA1 o pVPA3-1. (Lee *et al.*, 2015).

El plásmido pVA1 o pVPA3-1 contiene en su interior genes que codifican las toxinas binarias *Pir A* y *Pir B*, las cuales, son producidas y liberadas por las cepas patógenas de *V. parahaemolyticus* que contienen dicho plásmido. Este plásmido tiene una longitud de 69 168 pares de bases (bp) y presenta una carga promedio de 37 copias por célula bacteriana, y contiene 2 genes que producen toxinas, *PirA^{Vp}* (336 bases pares) y *PirB^{Vp}* (13 17 bases pares) que se encuentran localizadas dentro de un fragmento de 3.5kb, flanqueado con repeticiones invertidas de una secuencia que codifica la transposasa (1kb), las cuales basadas en un análisis proteómico codifican proteínas de 13 kDa (kilo Dalton) y 50 kDa respectivamente (Han *et al.*, 2015).

Es importante mencionar, que este plásmido consiste de 92 marcos abierto de lectura u ORF (Open Reading Frame), que codifican las proteínas de movilización, enzimas de replicación, transposasas, proteínas asociadas a la virulencia y proteínas similares a las toxinas *Pir* de la bacteria *Photorhabdus*. Los genes asociados a la virulencia que pueden estar relacionados a la patogenicidad bacteriana son: una tripsina (ORF 70), 4 tipos de proteínas de secreción II y III (ORF 72, 75, 76 Y 79) y una metaloproteasa (ORF 78) (Han *et al.*, 2015).

Según la OIE, los criterios de diagnóstico confirmatorio para la definición de un caso sospechoso de AHPND son los siguientes: mortalidad y signos clínicos compatibles con AHPND, histopatología compatible con AHPND y detección de genes de las toxinas *Pir* por PCR convencional o PCR en tiempo real. Mientras que los criterios para la definición de un caso confirmado de AHPND son la histopatología compatible con AHPND, detección de genes de las toxinas *Pir* en el plásmido pVA1 en *Vibrio parahaemolyticus* por PCR y secuenciación y resultados positivos en bioensayos.

c. Justificación del estudio

La especie *Penaeus vannamei* es una de las más cultivadas a nivel mundial y con amplia demanda en el mercado, esto ha ocasionado que las densidades de cultivo se incrementen y a su vez aparezcan enfermedades. El langostino blanco “*Penaeus vannamei*” es una de las principales especies cultivadas en el Perú, además de la concha de abanico (*Argopecten purpuratus*) y la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*); ésta se considera la más importante por ser la especie más exportada en el país a los principales mercados como España y EEUU. En el Perú, la principal enfermedad que afecta a los langostinos es la vibriosis desde los años 80 y bacterias intracelulares o Rickettsia (HPN) desde los años 90. Después de la aparición del virus de la Mancha blanca en 1999, no se ha reportado epidemia significativa en el sector langostinero. Sin embargo, es necesario tomar atención a la nueva enfermedad emergente Enfermedad de Necrosis Hepatopancreática Aguda (AHPND), la cual ya ha afectado dramáticamente a los principales productores de langostinos en el mundo, tales como China, Vietnam, Tailandia, Malasia, México, Filipinas y USA. Se sabe que las responsables de esta enfermedad son cepas de *Vibrio parahaemolyticus* que han adquirido de manera horizontal un plásmido, que lleva genes en su interior codificantes de las toxinas *PirA* y *PirB*. Es por ello que se considera que la detección de estos genes mediante pruebas moleculares como PCR nos indicaría un posible riesgo de infección en el futuro en el sector langostinero.

3. Objetivos

a. *Objetivo general*

- Detectar molecularmente los genes que codifican para las toxinas *PirA* y *PirB* presentes en las bacterias del género *Vibrio* aislados de langostinos blancos *Penaeus vannamei* desde 5 centros de cultivo langostineros del departamento de Tumbes en el mes de Enero del 2018.

b. *Objetivos específicos*

- Aislar e identificar las bacterias del género *Vibrio* mediante cultivo bacteriano.
- Identificar mediante PCR las especies de *Vibrio* que contiene los genes que codifican para las toxinas *PirA* y *PirB* responsables de AHPND.
- Clasificar filogenéticamente las especies de bacterias del género *Vibrio* que contengan los genes *PirAB^{Vp}*, responsables de AHPND mediante MLSA.
- Detectar los genes de virulencia ORFs 70, 75, 78 y 90 del plásmido pVA1 o pVPA3-1.
-

4. Metodología

a. Diseño del estudio

El presente estudio fue de tipo observacional y descriptivo.

b. Población

Langostinos blancos (*Penaeus vannamei*) de 32 a 100 días de cultivo (post larva y juveniles), enfermos y/o moribundos con signos clínicos sospechosos de enfermedad (nado errático, contenido intestinal vacío o entrecortado, hepatopáncreas pálido y de crecimiento retardado), provenientes de 5 centros langostineros de tipo intensivo en el departamento de Tumbes. Todos los centros refirieron importar semillas provenientes de Ecuador.

c. Muestreo

El muestreo fue de tipo no aleatorio, y el tamaño de muestra fue calculado según lo propuesto por la Guía Técnica de Patología e Inmunología de Camarones Penaeidos, la cual propone seleccionar como mínimo 10 organismos enfermos por estanque que con frecuencia se encuentran en área de la compuerta de salida de los estanques (Morales y Cuéllar- Anjel, 2014).

Se recolectaron 125 langostinos blancos "*Penaeus vannamei*" moribundos y/o enfermos de 32 a 100 días de cultivo desde 5 diferentes granjas langostineras de los distritos de Tumbes y Zarumilla del departamento de Tumbes, en el mes de Enero del 2018 (Tabla 2).

Para el aislamiento bacteriano se recolectaron 85 langostinos (entre 15 a 20 langostinos por centro) y 40 langostinos para el examen histopatológico (entre 5 -10 langostinos por centro).

d. Procedimientos y técnicas

El procesamiento de las muestras para aislamiento bacteriano se realizó en los laboratorios de Nutrición e Inocuidad Alimentaria y Biología Molecular de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (Lima- Perú). La extracción de ADN, las pruebas moleculares y examen histopatológico fue realizado en los laboratorios de Center for Excellence for Shrimp Molecular Biology and Biotechnology "Centex Shrimp" apoyado por la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Mahidol y el Centro Nacional para la Biotecnología e Ingeniería Genética "BIOTEC" (Bangkok- Tailandia).

i. Aislamiento bacteriano

Se introdujo un asa estéril dentro del hepatopáncreas (HP) por cada animal (n=85), y posteriormente fue sembrado en placas conteniendo el medio de cultivo Tiosulfato Citrato Bilis Sacarosa (TCBS) suplementado con 2% de NaCl, los cuales fueron incubados a 30°C por 16 a 24 h (Phiwsaiya *et al.*, 2017). Se utilizó una placa de TCBS por cada hepatopáncreas, seguidamente las placas fueron selladas con papel film y transportadas en un cooler manteniendo la temperatura entre 4°C a 16°C con gel packs, hasta los Laboratorios de Nutrición e Inocuidad Alimentaria y Biología molecular de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (UPCH). Una vez en el laboratorio, para obtener bacterias puras, las colonias individuales fueron resembradas en nuevas placas de TCBS e incubadas a las mismas condiciones. Se seleccionaron 1-2 colonias dominantes ya sean amarillas o verdes (fermentadores de sacarosa o no, respectivamente) y de tipos grandes, pequeños, rugosos, lisas, redondas, etc, por cada placa. Las colonias aisladas fueron suspendidas en caldos de infusión Cerebro-Corazón (BHI) e incubadas a 30°C por 16 horas, luego de ello 150 uL de la suspensión fue colocado en papel filtro Whatman (Sigma-Aldrich, Alemania) (2 cm x 3cm), envuelto en papel aluminio, ambos previamente esterilizados, para el transporte de colonias a los laboratorios de Centex Shrimp.

Para la reactivación de las colonias bacterianas, el papel filtro fue cultivado en medios de cultivo Agar Tripticasa Soya - TSA suplementado con 1.5% de NaCl e incubadas a las mismas condiciones anteriormente mencionadas. Luego de ello, las colonias individuales fueron inoculadas en el medio de Caldo de Soya

Tripticasa (TSB) suplementado con 1.5% de NaCl; e incubados con agitación a 30°C por 16h (Phiwsaiya *et al.*, 2017). La suspensión bacteriana fue preservada mediante adición de glicerol a una concentración final de 15% y almacenada a -80°C.

ii. Extracción de ADN

El ADN genómico fue extraído desde los aislados bacterianos purificados descritos anteriormente, mediante el método de boiling (Phiwsaiya *et al.*, 2017). La suspensión bacteriana en el medio TSB fue centrifugada a 10 000 rpm por 5 minutos, se colectó el pellet, se lavó con 1mL de agua estéril, se centrifugó nuevamente y se colectó el pellet. El pellet celular fue lavado nuevamente con agua estéril y calentado a 95°C por 10 min. El sobrenadante fue colectado como ADN después de la centrifugación, y fue almacenado a -20 °C hasta su uso en los ensayos de PCR. No se utilizó control negativo en la extracción de ADN. La concentración, calidad y pureza de ADN se midió en un espectrofotómetro GeneQuant 100 (Fisher Scientific, Madrid).

iii. Detección de los genes que codifican las toxinas Pir A y Pir B (*PirAB^{Vp}*)

1. PCR anidado AP4

Los primers externos AP4-F1 y AP4-R1 tienen como target o blanco un segmento de 1269 bp, que incluye el gen *ToxA* (921 bp) y un segmento del gen

ToxB (1317 bp) y los primers anidados AP4-F2 y AP4-R2 amplifican un segmento de 230 bp que incluye 209 bp del gen *ToxA* más la secuencia espaciadora de 12 bp y 9 bp que siguen a los genes *ToxB* (Dangtip *et al.*, 2015) (Tabla 3).

En el primer paso, se utilizaron los primers o cebadores AP4-F1 y AP4-R1 (Tabla 3) descritos por Dangtip *et al.* (2015). La reacción de la PCR contenía 1x de buffer 5x PCR Bio Reaction Buffer (PCR BioSystems, Reino Unido) (contiene 3 mM de MgCl₂ y 0.2 mM de dNTPs), 0.25 µM de cada primer, 1 U de Taq DNA polimerasa PCR Bio (PCR BioSystems, Reino Unido) y 2 µL ADN que contenía 100 ng/µL de ADN total, en un volumen final de 20 µL. El protocolo de ciclamiento fue realizado en el termociclador Biometra TOne (Analytik Jena, Alemania), y consistió de 94°C por 2 min, 30 ciclos de 94°C por 30 s, 55 °C por 30 s, 72 °C por 90 s y una extensión final de 72°C por 2 min.

Para el segundo paso, el producto del primer PCR fue utilizado como molde de ADN. Se utilizaron los primers: AP4-F2 y AP4- R2 (Tabla 3) descritos por Dangtip *et al.* (2015) bajo las mismas condiciones. El protocolo de ciclamiento fue 94°C por 2 min, 25 ciclos de 94°C por 20 s, 55°C por 20 s y 72°C por 20 s, con una extensión final de 72°C por 2 min.

Se utilizaron como controles positivos las cepas XN89 de Vietnam (Phiwsaiya *et al.*, 2017) y 5HP de Tailandia (Joshi *et al.*, 2014), estas dos cepas eran cepas de *V. parahaemolyticus* conteniendo los genes *Pir AB^{Vp}*. Las bandas esperadas fueron de 1269 y 230 bp. El producto amplificado fue identificado mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5% en buffer TBE (Tris/Borato/EDTA) con la Tinción Segura de Ácidos nucleicos Red Safe™ (ABC Scientific,USA) utilizando el transiluminador Omega Fluor (Aplegen, USA)

2. PCR Dúplex *PirAB^{Vp}*

Para confirmar la presencia de las toxinas *PirAB^{Vp}*, los aislados positivos mediante el PCR anidado AP4 fueron detectados con Dúplex PCR (Han *et al.*, 2015) utilizando los primers: VpPirA-284F, VpPirA-284R, vpPirB- 392F y VpPirB-392F (Tabla 3).

Se utilizó 1x de Buffer RBC (RBC Biosciences, Taiwan) (incluye 1.5 mM MgCl₂), 0.5mM dNTPs, 0.3 μM de cada primer, 1 U de Taq RBC (RBC Biosciences, Taiwan) y 2 μL de ADN que contiene 100 ng/ μL del ADN total, en un volumen final de 20 μL. El ciclamiento fue 94 °C por 3 min, 35 ciclos de 94 °C por 30 s, 60 °C por 30 s y 72 °C por 30 s, con una extensión final de 72 °C por 7 min. Las bandas esperadas fueron de 284 bp y 392 bp.

3. PCR PirAB-2020 y secuenciamiento

Un tercer PCR PirAB-2020 se utilizó para confirmar la presencia de las toxinas *PirA* y *PirB*, cuyos primers PirAB-2020F/PirAB-2020R (Tabla 3) amplifican la región completa de los genes *PirAB^{Vp}* (Phiwsaiya *et al.*, 2017).

Se realizó el PCR en un volumen final de 20 µL conteniendo: 1x Buffer RBC (RBC Biosciences, Taiwan) (incluye 1.5 mM MgCl₂), 0.25 µM de cada primer, 1 U de taq RBC (RBC Biosciences, Taiwan) y 2 µL de ADN que contenía 100 ng/ µL del ADN total. El ciclamiento de la reacción consistió de 94°C por 5 min, 35 ciclos de 94°C por 40 s, 50°C por 40 s, 72°C por 2 minutos y una extensión final de 72°C por 10 min. Las bandas obtenidas del PCR PirAB2020 bp fueron cortadas y purificadas con el Kit de Purificación Gel/PCR (Favorgen, Taiwan) y enviado a secuenciar a Macrogen, Corea del Sur.

Se trabajó el alineamiento múltiple con las secuencias de los aislados positivos a los genes que codifican para las toxinas *PirA* y *PirB* y la secuencia que fue homóloga mediante BLASTn a través de NCBI utilizando el software Clustal W (1.2.4), para observar el porcentaje de identidad entre secuencias.

iv. Detección del plásmido pVA1 o pVPA3-1

Para comprobar si los aislados bacterianos en el presente estudio contenían el plásmido pVA1 o pVPA3-1, fueron detectados mediante PCR algunos genes putativos de factores de virulencia llamados ORFs 70 (codifica a una proteína

de la familia de la tripsina), 75 (codifica una proteína de secreción tipo II), 78 (codifica la metaloproteasa RseP) y 79 (codifica las proteínas de secreción tipo II y III) localizados en el plásmido. Los primers y condiciones utilizados para este ensayo se realizaron siguiendo el protocolo de Phiwsaiya *et al.* (2017) (Tabla 3). Los controles negativos fueron las reacciones sin ADN y reacciones con extracto de ADN de un aislado de *V. parahaemolyticus* negativo a AHPND llamado S02 utilizado como control negativo (Joshi *et al.*, 2014); donado por Centex Shrimp. Los controles positivos utilizados fueron extractos de ADN del *V. parahaemolyticus* XN89 y un mutante *V. parahaemolyticus* XN87, los cuales portaban el plásmido pVA1 o pVPA3-1 (Phiwsaiya *et al.*, 2017). El resultado se observó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % y las bandas esperadas para los genes ORFs 70, 75, 78 y 79 fueron de 326, 429, 452 y 232 bp respectivamente.

v. Detección de *Vibrio parahaemolyticus* mediante PCR gen *ldh* (Hemolisina lecitina- dependiente)

Solo 23 aislados pertenecientes a las granjas que resultaron positivos a los genes que codifican para las toxinas *Pir A* y *Pir B* (granja 4 y 5), fueron sometidas al PCR gen *ldh* para la detección de *V. parahaemolyticus* utilizando el protocolo descrito por Taniguchi *et al.* (1985). Las condiciones del PCR y los primers utilizados fueron *ldh-F* y *ldh-R* (Tabla 3) (Taniguchi *et al.*, 1985). Se realizó la electroforesis en gel de agarosa al 1.5% en buffer TBE. La banda esperada de

450 bp, fue observada a través de un transiluminador UV Omega Fluor (Aplegen, USA).

vi. Análisis multilocus de secuencias (MLSA)

Se realizó el MLSA para una mejor clasificación filogenética del género *Vibrio* solo a los aislados que resultaron positivos a los genes *PirAB^{Vp}*, siguiendo el protocolo descrito por Pascual *et al.* (2010). Se amplificaron los genes *16S rRNA* (Subunidad pequeña de ARN ribosomal) de 1364 bp (Weisburg *et al.*, 1991), *ropD* (factor sigma ARN polimerasa) de 787 bp y *toxR* (regulador de transcripción de membrana) de 519 bp (Pascual *et al.*, 2010), se utilizaron los primers específicos para dichos genes descritos en la Tabla 3. El producto fue purificado con el Kit de Purificación Gel/PCR (Favorgen, Taiwan) y enviado a secuenciar a Macrogen, Corea del Sur. Las secuencias consenso fueron concatenadas y se construyó el árbol filogenético utilizando UPGMA (Unweighted pair group method with arithmetic mean) y 1000 bootstraps en el programa MEGA7 (Kumar *et al.*, 2016). Se utilizaron secuencias conocidas para compararlas con los aislados en el árbol filogenético, estas fueron: *V. campbellii* CECT 523T (FM202508.1), *V. harveyi* CECT 525T (FM202498.1), *V. parahaemolyticus* CECT 511T (FM202531.1), *V. alginolyticus* CECT 521T (FM202535.1), *V. rotiferianus* LPD 1-1-86 (FM202529.1), *V. natriegens* CECT 526T (FM202530.1) y *V. cholerae* CECT 514T (FM 202539.1).

vii. Examen Histopatológico

El examen histológico se llevó a cabo de manera complementaria al estudio para observar posibles hallazgos compatibles a AHPND, cabe resaltar que las muestras colectadas para este examen no fueron las mismas para el aislamiento bacteriano. Las 40 muestras recolectadas para este examen se fijaron con la solución Davidson (etanol absoluto 95-99%, formaldehído al 37%, ácido acético glacial y agua destilada) mediante la inyección del fijador en el hepatopáncreas del langostino, seguida de la inmersión en esa misma solución fijadora en una relación 10:1 (fijador-muestra) por 24 horas y luego preservadas en alcohol de 70% hasta su procesamiento. Solo se analizaron las muestras de las granjas que resultaron positivas a los genes codificantes de las toxinas *PirAB^{Vp}*. Estas muestras fueron también almacenadas en papeles toalla embebidos de alcohol al 70 %, colocados en bolsas ziplok herméticas y por último colocadas en botellas anti derrame para su envío a Centex Shrimp, Bangkok- Tailandia para el procesamiento histológico de las muestras.

Se realizó el corte del langostino dejando solo la zona del hepatopáncreas (HP) expuesta (debajo de la cabeza y entre el cefalotórax y el abdomen), para luego hacer un corte sagital dividiendo en 2 partes iguales la zona del HP. Estos cortes fueron colocados en un cassette de plástico y lavados en agua por 1 hora. Se realizó el lavado en alcoholes en diferentes grados (70 %, 80 %, 95 % y 100 %) en el procesador de tejidos semicerrado TP1020 (Leica, Alemania),

posteriormente fueron procesados en la unidad de inclusión de parafina y finalmente se prepararon las láminas utilizando la coloración Hematoxilina – Eosina (Bell y Lightner, 1988).

e. Consideraciones éticas

El estudio fue evaluado y aprobado por el Comité Institucional de Ética para Animales de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (código: 101808).

Se tuvieron consentimientos informados para la toma de muestras en cada granja langostinera de donde se recolecten los langostinos, informando al criador y/o dueño del establecimiento el estudio a realizarse.

f. Plan de análisis

Los datos obtenidos fueron presentados en tablas de frecuencia para la presencia de los genes *PirAB^{Vp}* en cada una de las granjas langostineras muestreadas.

8. Resultados

1. Descripción de signos clínicos de langostinos enfermos

Según los productores de langostinos (*P. vannamei*) de las 5 granjas no se observaron casos mortalidades masivas ni súbitas, solo reportaron tener 1% de mortalidad en los estanques de cultivo al momento del muestreo y crecimientos retardados no adecuados en las pozas de producción, a excepción de 2 langostineras que sí presentaron mortalidad de hasta un 60% en la etapa post-larva del cultivo.

Los 125 langostinos seleccionados fueron divididos al azar, 85 para aislamiento bacteriano y 40 para examen histológico. Se encontraban en etapa post-larva y juveniles, de 32 a 100 días de cultivo (85 para aislamiento bacteriano y 40 para examen histológico) se encontraban enfermos y/o moribundos, con signos clínicos inespecíficos sospechosos de enfermedad (crecimiento retardado, nado errático, contenido intestinal discontinuo o vacío y hepatopáncreas pálido) (Tabla 2).

2. Aislamiento bacteriano y extracción de ADN

De los 85 langostinos colectados, se logró aislar en agar TCBS, 51 aislados bacterianos, siendo todos sacarosa negativa (color verde). Todas las colonias

purificadas tuvieron características variables; de tamaño pequeño y grande, de bordes irregulares y lisos y algunas redondas y cremosas.

Tabla 2. Descripción de granjas langostineras y aislados bacterianos

Granja	Descripción	Localización	Aislados bacterianos	Observación
1	42 días de cultivo, 1% mortalidad, intestinos con contenido intestinal discontinuo, HP pálido. (n=15).	Distrito: Zarumilla, Tumbes	n=13 (códigos 1-13) Colonias verdes	<i>pirAB^{Vp-}</i>
2	100 días de cultivo, alta mortalidad en estadio larvario, crecimiento retardado, intestinos vacíos, HP pálido (n=10).	Distrito: Zarumilla, Tumbes	n=6 (códigos 14-19) Colonias verdes	<i>pirAB^{Vp-}</i>
3	32 días de cultivo, 1% mortalidad, langostinos con crecimiento retardado (n=20).	Distrito: Tumbes, Tumbes	n=9 (códigos 20-28) Colonias verdes	<i>pirAB^{Vp-}</i>

4	40 días de cultivo, 1% mortalidad, langostinos con crecimiento retardado, HP pálido(n=20).	Distrito: Tumbes, Tumbes	n=9 (códigos 29-37) Colonias verdes	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Aislado 34 fue <i>V. campbellii pirAB^{Vp+}</i> ▪ Aislado 36 fue <i>V. parahaemolyticus pirAB^{Vp+}</i> ▪ El resto fue <i>pirAB^{Vp-}</i>
5	62 días de cultivo, 60% mortalidad durante etapa PL, crecimiento retardado, HP pálido (n=20).	Distrito: Tumbes, Tumbes	n=14 (códigos 38-51) Colonias verdes	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Aislado 43 fue <i>V. parahaemolyticus pirAB^{Vp+}</i> ▪ El resto fue <i>pirAB^{Vp-}</i>

El método de extracción de ADN utilizado fue adecuado, obteniéndose una recuperación promedio de concentración de ADN de 821.86 ± 379.1 μg totales, con una mediana de 828 μg totales y un promedio de grado de pureza A260/A280 de 1.86 ± 0.11 (Tabla 1).

3. Detección de los genes que codifican las toxinas *Pir A* y *Pir B*(*PirAB^{Vp}*)

a. PCR anidado AP4

Los resultados mostraron que de los 51 aislados de *Vibrio*, 3 fueron positivos (aislados 34, 36 y 43) a los genes que codifican para las toxinas *PirAB^{Vp}*, observándose las bandas esperadas de 1269 y 230 bp. En el aislado 32 se

observó una sola banda de 230 bp, considerándose una muestra sospechosa (Figura 1a).

b. Dúplex PCR

Sólo en los aislados 34, 36 y 43 se detectó la presencia de ambos genes que codifican las toxinas *PirA^{Vp}* y *PirB^{Vp}*, observándose las bandas esperadas de 392 y 284 bp (Figura 1b). El aislado 32 resultó negativo al PCR, indicando la ausencia de *PirAB^{Vp}* en esa muestra.

c. Detección mediante PCR PirAB-2020 y secuenciamiento

Respecto a los resultados del PCR PirAB-2020, el cuál detecta la región completa de los genes que codifican las toxinas *PirA^{Vp}* y *PirB^{Vp}*, los 3 aislados (34, 36 y 43) fueron positivos, observándose la banda esperada de 2020 bp, confirmando así la presencia de los genes *PirAB^{Vp}*. Por otro lado, el aislado 32 fue negativo en este PCR, confirmando la ausencia de los genes *PirAB^{Vp}* en la muestra (Fig. 2b).

En el análisis de secuenciamiento de los productos amplificados del PCR PirAB-2020 bp de los aislados 34, 36 y 43 se observaron secuencias de consenso de 1948 bp que fueron 100% idénticas entre ellas y completamente idénticas a la de los genes de las toxinas *PirAB^{Vp}* del aislado de *V. parahaemolyticus* XN89 de AHPND (número de acceso de GenBank KU145400). La región promotora putativa de los genes que codifican para las

toxinas *PirAB^{Vp}* que contenían la caja 10 (AGTTAACAT) y la caja 35 (TTTCCT) descritos anteriormente (Phiwsaiya *et al.*, 2017) se encontró intacta para los 3 aislados.

4. Detección del plásmido pVA1 o pVPA3-1

Para investigar la presencia del plásmido pVA1 o pVPA3-1 en la bacteria que contiene *PirAB^{Vp}* obtenidos en el estudio, 4 diferentes ORFs (70, 75, 78 Y 79) localizados en el plásmido fueron detectados mediante PCR. Los resultados indicaron que los ORFs evaluados estuvieron presentes en los 3 aislados bacterianos identificados (34, 36 y 43) mediante los tamaños de banda 326, 429, 452 y 232, respectivamente. Los resultados fueron los mismos para los 2 controles positivos utilizados, el aislado *V. parahaemolyticus* XN87 y XN89 previamente analizados. No se observaron bandas para el aislado S02 cepa de *V. parahaemolyticus* negativo para AHPND indicando la ausencia del plásmido pVA1 o pVPA3-1.

5. Detección de *Vibrio parahaemolyticus* mediante *ldh* gene PCR

Se trabajó con un PCR específico para *V. parahaemolyticus* basado en la detección parcial del gen *ldh*, el cual fue realizado en los 23 aislados de las granjas positivas a los genes *PirAB^{Vp}* (4 y 5). Según el producto esperado de 450 bp, solo los aislados 36 y 43 pudieron identificarse presuntamente como *V. parahaemolyticus* (Fig. 3a). Sin embargo este ensayo no pudo identificar la

especie para el aislado 34 debido a la ausencia del producto de 450 bp (Fig. 3a) (Tabla 5).

6. Resultados de Análisis de Secuenciamiento Multilocus (MLSA)

Los fragmentos de genes constitutivos (Housekeeping) de *16S rRNA*, *rpoD* y *toxR* se amplificaron mediante PCR a partir de los aislados 34, 36 y 43 y se enviaron para secuenciación. Las secuencias de consenso de 1350, 778 y 510 bp de cada aislado se concatenaron en un segmento de aproximadamente 2638 bp. Estas secuencias se recuperaron y procedieron de la misma forma para otras especies de *Vibrio* que incluían a *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. natriegens*, *V. harveyi*, *V. campbellii*, *V. rotiferianus* y *V. cholerae* depositadas en la base de datos GenBank publicadas anteriormente (Dong *et al.*, 2017b). El árbol filogenético de MLSA basado en los tres genes concatenados reveló que los aislamientos 36 y 43 correspondían a *V. parahaemolyticus*, mientras que el aislado 34 se agrupó con *V. campbellii* (Fig. 2b). En conjunto, estos resultados indican que las bacterias portadoras de *PirAB^{Vp}* obtenidas de las granjas langostineras del departamento de Tumbes correspondieron a 2 aislados de *V. parahaemolyticus* y uno de *V. campbellii*.

7. Examen Histopatológico

Se realizó la lectura de 15 láminas correspondientes a 2 granjas langostineras (9 láminas de la granja 4 y 6 láminas de la granja 5) de donde se obtuvieron resultados positivos de PCR para detectar los genes *PirAB^{Vp}*. No se observó la

lesión patognomónica de AHPND (desprendimiento masivo de las células epiteliales del túbulo del HP) en ningunas de las muestras de esas 2 granjas.

En el 44% de las láminas examinadas de la granja 4 se observó una mixtura de colapso del epitelio de los túbulos del HP y tejido normal del HP. El resto de muestras conservó la estructura normal del HP (Figura 5).

Por otro lado en la granja 5, donde se reportó antecedentes de mortalidad de hasta un 60 % en etapa de PL, en el 50 % de las láminas (3/6) los principales hallazgos histopatológicos observados fueron el colapso del epitelio de los túbulos del HP, granulomas e infiltración hemocítica (Figura 6).

9. Discusión

En los últimos años los brotes de AHPND han causado graves pérdidas en la producción de langostinos alrededor del mundo, y se conoce que el agente causal de esta enfermedad son cepas de *Vibrio parahaemolyticus* que transporta un plásmido de 69 kb, conteniendo genes que codifican la producción de las toxinas letales *PirAB^{Vp}* (Tran *et al.*, 2013). Aunque en el país no existen reportes de presencia de la enfermedad, en el 2016 se reportó en Sudamérica una cepa de *Vibrio parahaemolyticus* Ba94C2 conteniendo los genes *PirAB^{Vp}* (Restrepo *et al.*, 2016) por lo tanto, el riesgo de que estos genes circulen en el sector langostinero del país es latente.

En Febrero del 2018, la autoridad competente SANIPES, reportó haber encontrado cepas de VP_{AHPND} en langostinos silvestres de los canales de marea del departamento de Tumbes sin embargo, no se confirmaron si estas cepas eran patogénicas (SANIPES, 2018^a). En el presente estudio se logró detectar 2 aislados de *Vibrio parahaemolyticus* (aislado 34 y 43) y un aislado de *Vibrio campbelli* (aislado 36) conteniendo los genes *PirAB^{Vp}* por primera vez en langostinos de cultivo del departamento de Tumbes, obteniéndose un 5.9% de aislados bacterianos *Vibrio* que contienen los genes *PirAB^{Vp}* en el mes de Enero del 2018 (Tabla 4). La relativa baja frecuencia podría deberse a la poca cantidad de muestras recolectadas en las langostineras, debido a limitaciones para la

obtención de muestras por parte de los productores, sin embargo; pese a ello, se logró detectar la presencia de aislados portando el plásmido con los genes *PirAB^{Vp}*.

En China, *Vibrio campbelli* ha sido reportado por contener los genes *PirAB^{Vp}* (Dong *et al.*, 2017), sin embargo este estudio reporta por primera vez una cepa de *V. campbelli* conteniendo los mismos genes en Sudamérica. Se ha reportado anteriormente evidencia de la transferencia horizontal entre genes o plásmidos entre las diferentes especies de *Vibrio* (Dong *et al.*, 2017) e incluso entre otras especies bacterianas (Durán – Avelar *et al.*, 2018), lo que incrementa la complejidad de los agentes causales de AHPND y su amenaza en el sector langostinero. Adicionalmente estos resultados sugieren que la detección de los genes *PirAB^{Vp}* no debe estar enfocada solo en la especie *V. parahaemolyticus* sino también en otras especies de *Vibrio* y/o otras especies bacterianas diferentes de *Vibrio* que estén presentes en el langostino blanco, ya que incluso se han reportado los genes *PirAB^{Vp}* en *Micrococcus luteus* (Durán – Avelar *et al.*, 2018).

Existen estudios que han identificado los genes para las toxinas *pirAB^{Vp}* y varios ORFs localizados en el plásmido pVA1 o pVPA3-1 de aproximadamente 69 kb (Lee *et al.*, 2015; Han *et al.*, 2015). La presencia de los genes putativos de factores de virulencia ORF 70, 75, 78 y 79 indican indirectamente que los tres aislamientos encontrados (34, 36 y 43) en este estudio transportaban el

plásmido pVA1 o pVPA3-1. Por lo tanto, la transferencia horizontal de genes del plásmido de estos aislamientos es probable.

A pesar de que los aislados hallados en el estudio contienen los genes *PirAB*^{Vp} considerados como agentes causales de AHPND no puede confirmarse su expresión ni asociación con la enfermedad y mortalidad. Sería de importancia evaluar la expresión de genes y producción de toxinas de estos aislados en nuevos estudios. Se ha demostrado que ante factores de estrés tales como cambios en el pH y presencia de lodo podrían originar brotes de AHPND (Akazawa y Eguchi, 2017), además de otros factores de estrés como variación en la temperatura y salinidad (Le Moullac y Haffner, 2000; Akazawa y Eguchi, 2017).

Los hallazgos histopatológicos no revelaron el desprendimiento masivo de las células epiteliales de revestimiento de los túbulos del HP que es considerada la lesión patognomónica de AHPND, pero si se encontró una lesión anormal denominada colapso de las células epiteliales de los túbulos del HP en las 2 granjas evaluadas (Joshi *et al.*, 2014). Es importante mencionar que esta lesión ha sido reportada anteriormente en estudios donde se realizó desafío de inmersión en langostinos frente a la cepa mutante *V. parahaemolyticus* XN87 *PirAB*^{Vp+} que ocasionó un 47% de mortalidad (Phiswsaiya *et al.*, 2017) y en animales moribundos que fueron enfrentados a bajas concentraciones de cepas de *V. parahaemolyticus* AHPND⁺ (Joshi *et al.*, 2014), sin embargo, no se puede

determinar la virulencia de estos aislados solo con estos hallazgos histopatológicos, debido a que las muestras para este examen no fueron representativas en cantidad y no se utilizaron los mismos animales destinados para aislamiento bacteriano que para el examen histopatológico, es por ello que se considera necesario realizar pruebas de desafíos de inmersión y/o bioensayos en futuros estudios enfrentando los aislados 34, 36 y 43 a langostinos y así poder identificar su virulencia y patogenicidad.

Adicionalmente, en la granja 5 donde se recolectó animales sobrevivientes a una mortalidad de 60% en su etapa post larva, se observó en la histopatología presencia de granulomas con infiltración hemocítica lo cual puede sugerir un estado crónico de la enfermedad.

Se conoce que uno de los principales factores de riesgo para la diseminación de la enfermedad es el movimiento de langostinos vivos (Bondad- Reantaso y Arthur, 2018). Si bien, según los productores, las semillas importadas desde las 5 granjas muestreadas tuvieron certificación sanitaria desde el Ecuador, no existen registro de controles sanitarios de semillas importadas ni verificación de certificaciones, lo que potencialmente podría conducir al ingreso de agentes patógenos ya sean bacterianos o virales a los cultivos langostineros de Tumbes, a lo que puede sumarse, la ocurrencia de importaciones de semillas de manera irregular. Cabe resaltar que no hay reportes de AHPND en Ecuador, sin embargo se logró identificar una proteína asociada a la enfermedad usando

espectrometría de masas, lo que indica que las cepas encontradas en tal estudio podrían originar AHPND (Saavedra-Olivos *et al.*, 2018). También es importante mencionar que la mayoría de centros de cultivos con sistemas semi-intensivo del departamento de Tumbes utilizan el agua de drenes o canales naturales de agua como afluentes y efluentes en común, por lo que una posible transmisión pudo darse vía natural.

En el estudio se utilizaron 3 pruebas de PCR diferentes con el mismo objetivo de detectar los genes *PirAB^{Vp}* (PCR AP4 anidado, dúplex PCR y PCR 2020 PirAB). En teoría uno de estos métodos debería ser suficiente para el diagnóstico, pero en la práctica se pudo observar que cada uno de estos métodos tiene ventajas y desventajas. PCR AP4 anidado tiene una alta sensibilidad y mayor límite de detección (100fg de ADN) (Dangtip et al., 2015) sin embargo, puede brindar productos no específicos como el caso del aislado 32, considerada en un inicio muestra sospechosa. Por otro lado el PCR dúplex y PCR 2020 Pir AB resulta conveniente debido a que es una prueba de un solo paso pero puede tener una sensibilidad de detección más baja.

Este estudio reporta la presencia de 3 aislados de *Vibrio* que contienen los genes que codifican para las toxinas *pirAB^{Vp}* en langostinos de cultivo a través de pruebas de PCR, sin embargo es necesario realizar más estudios para dilucidar si estos tienen un papel patógeno y están involucrados en la mortalidad de langostinos en los centros de cultivo. Estos resultados nos indican que la

presencia de estos genes puede ser un indicador de riesgo de enfermedad, por tanto se sugiere reforzar la vigilancia sanitaria e implementar estrategias de control y prevención en las langostineras para evitar futuros brotes. Se ha establecido que se puede prevenir el riesgo de diseminación del agente causal mediante movimiento de langostinos peneidos vivos (reproductores o post larva) libres de cepas que contengan los genes *PirAB^{Vp}* mediante el uso del PCR anidado AP4 (Bondad- Reantaso y Arthur, 2018). Por tanto, las técnicas moleculares aplicadas en el estudio podrían ser utilizadas en la vigilancia sanitaria tanto de semillas importadas como de reproductores y corroborar que se encuentren libres de los genes *PirAB^{Vp}* antes de su ingreso, así mismo esta evaluación podría ser aplicada en cuerpos de agua y sedimento de los centros de cultivo langostineros.

10. Conclusiones

- Se reportan en el presente estudio la presencia de aislados de *Vibrio parahemolyticus* y *Vibrio campbellii* que poseen los genes que codifican la producción de las toxinas *PirA* y *PirB* en langostinos de cultivo del departamento de Tumbes.
- Un 5.9% de aislados bacterianos *Vibrio* contenían los genes *PirAB^{Vp}* en el mes de Enero del 2018

11. Recomendaciones

- Evaluar experimentalmente el potencial patogénico de los aislados *PirAB^{Vp}* positivos.
- Determinar la expresión de los genes *PirAB^{Vp}* en los aislados.
- Desarrollar un plan de vigilancia epidemiológica de AHPND en los centros de cultivo langostinero de Tumbes y Piura.
- Verificar las certificaciones sanitarias de las semillas importadas provenientes de Ecuador u otro país mediante pruebas moleculares a fin de evitar el ingreso de patógenos al sector langostinero del país.

12. Referencias bibliográficas

1. Akazawa, N., & Eguchi, M. (2017). Pond sludge and increased pH cause early mortality syndrome/acute hepatopancreatic necrosis disease (EMS/AHPND) in cultured white shrimp. *Borneo Journal of Marine Science and Aquaculture*, 1, 92-96.
2. Bell, T. A., & Lightner, D. V. (1988). A handbook of normal penaeid shrimp histology (No. 595.3843 B4).
3. Berger C., M. Quispe y V. Talavera. Programa Nacional para la Competitividad de la Acuicultura Langostinera en el Perú 2005-2014. Asociación Langostinera Peruana (ALPE). 118 p.
4. Bondad-Reantaso, M. G. 2016. Acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) of penaeid shrimps: global perspective. In *Addressing Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND) and Other Transboundary Diseases for Improved Aquatic Animal Health in Southeast Asia: Proceedings of the ASEAN Regional Technical Consultation on EMS/AHPND and Other Transboundary Diseases for Improved Aquatic Animal Health in Southeast Asia, 22-24 February 2016, Makati City, Philippines* Aquaculture Department, Southeast Asian Fisheries Development Center. pp. 16-23

5. Bondad- Reantaso, M. & Arthur, R.2018.FAO Technical Assistance Efforts to Deal with Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND) of Cultured Shrimps. *Asian Fisheries Science*.31S (2018):01-14.
6. Comex Perú (9 de Febrero del 2018): Exportaciones de langostinos peruanos alcanzan récord. Diario Gestión. Recuperado de: <https://gestion.pe/economia/comexperu-exportaciones-langostinos-peruanos-alcanzan-record-226989>
7. Comex Perú (15 de Junio del 2018). Un repaso a la acuicultura nacional. Diario Gestión. Recuperado de: <https://www.comexperu.org.pe/articulo/un-repaso-a-la-acuicultura-nacional>
8. Cuéllar-Angel, J., Lightner, D. V., & Pantoja, C. 2012. Síndrome de mortalidad temprana o síndrome de necrosis hepatopancreática aguda. *Panorama Acuícola Magazine*, 17, 42-43.
9. Dabu, I. M., Lim, J. J., Arabit, P. M. T., Orense, S. J. A. B., Tabardillo Jr, J. A., Corre Jr, V. L., & Maningas, M. B. B. 2017. The first record of acute hepatopancreatic necrosis disease in the Philippines. *Aquaculture Research*, 48(3), 792-799.
10. Dangtip, S., Sirikharin, R., Sanguanrut, P., Thitamadee, S., Sritunyalucksana, K., Taengchaiyaphum, S., Flegel, T. W. 2015. AP4 method for two-tube nested PCR detection of AHPND isolates of *Vibrio parahaemolyticus*. *Aquaculture Reports*, 2, 158-162.

11. Dhar, A. K., Piamsomboon, P., Aranguren Caro, L. F., & Kanrar, S. 2018. First report of the presence of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in Texas, USA. *Aquaculture America*, Las Vegas, NV.
12. Dong, X., Wang, H., Xie, G., Zou, P., Guo, C., Liang, Y., Huang, J. 2017. An isolate of *Vibrio campbellii* carrying the Pir^{VP} gene causes acute hepatopancreatic necrosis disease. *Emerging microbes & infections*, 6(1), e2.
13. Dong, X., Chen, J., Song, J., Wang, H., Wang, W., Ren, Y., Guo, C., Wang, X., Tang, K. & Huang, J. (2019). Evidence of the horizontal transfer of pVA1-type plasmid from AHPND-causing *V. campbellii* to non-AHPND *V. owensii*. *Aquaculture*, 503, 396-402.
14. Durán-Avelar, Ma. J., Vázquez-Reyes, A., González-Mercado, A. L., Zambrano-Zaragoza, J. F., Ayón-Pérez, M. F., Agraz-Cibrián, J. M. & Vibanco-Pérez, N. 2018. *pirA* and *pirB*-like gene identification in *Micrococcus luteus* strains in Mexico. *Journal of fish diseases*. , 41(11), 1667-1673.
15. Eshik, M. M. E., Abedin, M. M., Punom, N. J., Begum, M. K., & Rahman, M. S. 2017. Molecular Identification of AHPND Positive *Vibrio parahaemolyticus* causing an outbreak in South-West Shrimp Farming Regions of Bangladesh. *Journal of Bangladesh Academy of Sciences*, 41(2), 127-135.
16. Han JE, Tang KF, Tran LH, Lightner DV. . 2015. Photorhabdus insect-related (Pir) toxin-like genes in a plasmid of *Vibrio parahaemolyticus*, the causative agent of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) of shrimp. *Dis Aquat Organ* 113: 33–40.

17. Han, J. E., Tang, K. F. J., Aranguren, L. F., & Piamsomboon, P. 2017. Characterization and pathogenicity of acute hepatopancreatic necrosis disease natural mutants, *PirAB^{Vp}* (-) *V. parahaemolyticus*, and *PirAB^{Vp}* (+) *V. campbellii* strains. *Aquaculture*, 470, 84-90.
18. Joshi, J., Srisala, J., Truong, V. H., Chen, I. T., Nuangsaeng, B., Suthienkul, O., Thitamadee, S. 2014. Variation in *Vibrio parahaemolyticus* isolates from a single Thai shrimp farm experiencing an outbreak of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND). *Aquaculture*, 428, 297-302.
19. Kondo, H., Van, P. T., Dang, L. T., Hirono, I. 2015. Draft genome sequence of non-*Vibrio parahaemolyticus* acute hepatopancreatic necrosis disease strain KC13. 17.5, isolated from diseased shrimp in Vietnam. *Genome announcements*, 3(5), e00978-15.
20. Kua, B. C., Iar, A., Siti Zahrah, A., Irene, J., Norazila, J., Nik Haiha, N. Y. & Teoh, T. P. 2016. Current status of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) of farmed shrimp in Malaysia. In *Addressing Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND) and Other Transboundary Diseases for Improved Aquatic Animal Health in Southeast Asia: Proceedings of the ASEAN Regional Technical Consultation on EMS/AHPND and Other Transboundary Diseases for Improved Aquatic Animal Health in Southeast Asia, 22-24 February 2016, Makati City, Philippines* (pp. 55-59). *Aquaculture Department, Southeast Asian Fisheries Development Center*.

21. Kumar S, Stecher G, Tamura K. 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol Biol Evol.* 33(7):1870-1874.
22. Le Moullac, G., & Haffner, P. (2000). Environmental factors affecting immune responses in Crustacea. *Aquaculture*, 191(1-3), 121-131.
23. Lee, C. T., Chen, I. T., Yang, Y. T., Ko, T. P., Huang, Y. T., Huang, J. Y., Lightner, D. V. 2015. The opportunistic marine pathogen *Vibrio parahaemolyticus* becomes virulent by acquiring a plasmid that expresses a deadly toxin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(34), 10798-10803.
24. Leobert, D., Cabillon, N. A. R., Catedral, D. D., Amar, E. C., Usero, R. C., Monotilla, W. D., Saloma, C. P. 2015. Acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) outbreaks in *Penaeus vannamei* and *P. monodon* cultured in the Philippines. *Diseases of aquatic organisms*, 116(3), 251-254.
25. Lightner, D. V., Redman, R. M., Pantoja, C. R., Noble, B. L., Tran, L. 2012. Early mortality syndrome affects shrimp in Asia. *Global Aquaculture Advocate*, 15(1), 40.
26. Lightner, D. V., Redman, C. R., Pantoja, B. L., Noble, L. M., Nunan, L. T., & Tran, L. 2013. Documentation of an Emerging Disease (early mortality syndrome) in SE Asia & Mexico. OIE Reference Laboratory for Shrimp Diseases, Department of Veterinary Science & Microbiology, School of Animal and Comparative Biomedical Sciences.

27. Liu, L., Xiao, J., Xia, X., Pan, Y., Yan, S., Wang, Y., 2015. Draft genome sequence of *Vibrio owensii* strain SH-14, which causes shrimp acute hepatopancreatic necrosis disease. *Genome announcements*, 3(6), e01395-15.
28. Morales, V., & Cuéllar-Anjel, J. 2014. Guía Técnica de Patología e Inmunología de Camarones. OIRSA, Panamá, República de Panamá. 382 pp.
29. Nunan, L., Lightner, D., Pantoja, C., Gomez-Jimenez, S. 2014. Detection of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in Mexico. *Diseases of aquatic organisms*, 111(1), 81-86.
30. Pantoja, C., & Lightner, D. V. 2014. EMS/AHPND descripción de la enfermedad en Asia y América. Patología e inmunología de camarones penaeidos. Guía técnica. 2da ed. OIRSA (Organización Internacional Regional de Sanidad Agropecuaria), PAN, 172-177.
31. Pascual, J., Macián, M. C., Arahal, D. R., Garay, E., & Pujalte, M. J. 2010. Multilocus sequence analysis of the central clade of the genus *Vibrio* by using the 16S rRNA, recA, pyrH, rpoD, gyrB, rctB and toxR genes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60(1), 154-165.
32. Phiwsaiya, K., Charoensapsri, W., Taengphu, S., Dong, H. T., Sangsuriya, P., Nguyen, G. T., Chaivisuthangkura, P. 2017. A natural *Vibrio parahaemolyticus* $\Delta pirA^{Vp} pirB^{Vp+}$ mutant kills shrimp but produces neither *Pir*^{Vp} toxins nor acute hepatopancreatic necrosis disease lesions. *Applied and environmental microbiology*, 83(16), e00680-17.
33. [PRODUCE] Ministerio de producción del Perú. 2014. Decreto Supremo que suspende importación de especímenes y productos de crustáceos ante la

presencia de “Enfermedad de Necrosis Hepatopancreática Aguda – AHPND” o “Síndrome de Mortalidad Temprana – EMS”. Diario El Peruano. DECRETO SUPREMO N° 005-2014-PRODUCE.

34. Restrepo, L., Bayot, B., Betancourt, I., & Pinzón, A. 2016. Draft genome sequence of pathogenic bacteria *Vibrio parahaemolyticus* strain Ba94C2, associated with acute hepatopancreatic necrosis disease isolate from South America. *Genomics Data*, 9, 143-144.
35. Restrepo, L., Bayot, B., Arciniegas, S., Bajaña, L., Betancourt, I., Panchana, F., & Muñoz, A. R. 2018. *Pir^{Vp}* genes causing AHPND identified in a new *Vibrio* species (*Vibrio punensis*) within the commensal Orientalis clade. *Scientific reports*, 8(1), 13080.
36. [SANIPES]Organismo Nacional de Sanidad Pesquera. 2018. Resolución Directoral N° 214-2018-SANIPES/DHCPA
37. [SANIPES]Organismo Nacional de Sanidad Pesquera. 2018. Informe técnico N° 010-2018- SANIPES/DSNPA^b.
38. Sirikharin R, Taengchaiyaphum S, Sanguanrut P, Chi TD, Mavichak R, Proespraiwong P, Nuangsaeng B, Thitamadee S, Flegel TW, Sritunyalucksana K. 2015. Characterization and PCR detection of binary, Pir-like toxins from *Vibrio parahaemolyticus* isolates that cause acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in shrimp. *Plos One* 10:e0126987.
39. Taniguchi, H. Ohta, H. Ogawa, M., & Mizuguchi, Y. 1985. Cloning and expression in *Escherichia coli* of *Vibrio parahaemolyticus* thermostable direct

- hemolysin and thermolabile hemolysin genes. *Journal of Bacteriology*, 162(2), 510-515.
40. Thitamadee, S., Prachumwat, A., Srisala, J., Jaroenlak, P., Salachan, P. V., Sritunyalucksana, K., Itsathitphaisarn, O. 2016. Review of current disease threats for cultivated penaeid shrimp in Asia. *Aquaculture*, 452, 69-87.
41. Tran, L., Nunan, L., Redman, R. M., Mohny, L. L., Pantoja, C. R., Fitzsimmons, K., Lightner, D. V. 2013. Determination of the infectious nature of the agent of acute hepatopancreatic necrosis syndrome affecting penaeid shrimp. *Diseases of Aquatic Organisms*, 105(1), 45-55.
42. Tun K, Kanrar S, Fitzsimmons KM, McLain JE, Aranguren LF, Oo MT, Kyi HHT, Oo MT, Dhar AK. 2017. Acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*), Pacific white shrimp *Penaeus vannamei*, and fresh water shrimp (*Macrobrachium rosenbergii*). Asia Pacific Aquaculture 2017, Kuala Lumpur, Malaysia, July 25-27.
43. Varela-Mejías, A., Navarro, N. P., & Caro, L. F. A. 2017. Necrosis aguda del hepatopáncreas: una revisión de la enfermedad en *Penaeus vannamei*. *Agronomía Mesoamericana*, 28(3), 735-745.
44. Wangman, P., Chaivisuthangkura, P., Sritunyalucksana, K., Taengchaiyaphum, S., Senapin, S., Pengsuk, C., Sithigorngul, P., Longyant, S. 2017. Development of monoclonal antibodies specific to ToxA and ToxB of *Vibrio parahaemolyticus* that cause acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) *Aquaculture*, 474, 75-81.

45. Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A., Lane, D.J. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* 173, 697-703.

Anexos

Tabla 1. Concentración y pureza de ADN extraído de los aislamientos bacterianos del género *Vibrio*.

Fecha	Muestra	Conc.(ng/ul)	Conc.(ug)	A 260/ A 280
13/03/2018	1	2160	432	1.804
13/03/2018	2	2611	522.2	1.908
13/03/2018	3	6167	1233.4	1.924
13/03/2018	4	4322	864.4	1.921
13/03/2018	5	5740	1148	1.822
13/03/2018	6	1162	232.4	1.855
13/03/2018	7	5537	1107.4	1.877
13/03/2018	8	4722	944.4	1.972
13/03/2018	9	2100	420	1.739
13/03/2018	10	7375	1475	1.845
13/03/2018	11	4610	922	1.847
13/03/2018	12	4414	882.8	1.825
13/03/2018	13	3426	685.2	1.736
13/03/2018	14	3889	777.8	1.846
13/03/2018	15	7035	1407	1.62
13/03/2018	16	462	92.4	1.76
14/03/2018	17	1782	356.4	1.755
14/03/2018	18	2968	593.6	1.872
14/03/2018	19	3084	616.8	1.882
14/03/2018	20	3006	601.2	1.922
14/03/2018	21	4540	908	1.822
14/03/2018	22	2586	517.2	1.871
14/03/2018	23	4834	966.8	1.652
14/03/2018	24	2023	404.6	1.92
14/03/2018	25	1950	390	2.071
14/03/2018	26	2552	510.4	1.585
14/03/2018	27	7273	1454.6	1.46
14/03/2018	28	4141	828.2	1.93
14/03/2018	29	8393	1678.6	1.778
14/03/2018	30	6328	1265.6	1.812
14/03/2018	31	6885	1377	1.84

14/03/2018	32	5730	1146	1.858
14/03/2018	33	4932	986.4	1.922
14/03/2018	34	4396	879.2	1.892
14/03/2018	35	8606	1721.2	1.854
14/03/2018	36	4896	979.2	1.928
14/03/2018	37	2678	535.6	1.908
14/03/2018	38	3087	617.4	1.978
14/03/2018	39	5296	1059.2	1.898
14/03/2018	40	5271	1054.2	1.936
14/03/2018	41	469	93.8	2
14/03/2018	42	3210	642	1.976
14/03/2018	43	4232	846.4	1.88
14/03/2018	44	3934	786.8	1.955
14/03/2018	45	2016	403.2	2.021
14/03/2018	46	5390	1078	1.776
14/03/2018	47	2531	506.2	1.997
14/03/2018	48	4221	844.2	2.003
14/03/2018	49	3616	723.2	1.971
14/03/2018	50	3584	716.8	1.903
14/03/2018	51	3402	680.4	1.964

Tabla 3. Primers usados en el estudio.

Nombre	Secuencias de primers (5'-3')	Target	Tamaño (bp)	Referencia
ldh-F	AAAGCGGATTATGCAGAAG CACTG	V. <i>parahaemolyticus</i> gen <i>ldh</i>	450	Taniguchi <i>et al.</i> , 1985
ldh-R	GCTACTTTCTAGCATTTTCTC TGC			
PirAB-2020F	GCACCGTAAATTTTCAGGTT	Tándem de los genes <i>PirAB^{vp}</i> y una porción de sus regiones upstream (en dirección hacia 5) y downstream (en dirección hacia 3)	2020	Phiwsaiya <i>et al.</i> , 2017
PirAB-2020R	CGTTGCAATCTAAGACATAG			
AP4-F1	ATGAGTAACAATATAAAAC AT GAAAC	PCR AP4 anidado para detectar <i>PirA^{vp}</i> y <i>PirB^{vp}</i> (primers externos que tienen como blanco 1269 bp)	1269	Dangtip <i>et al.</i> , 2015; Sritunyaluksana <i>et al.</i> , 2015
AP4-R1	ACGATTTTCGACGTTCCCCAA			
AP4-F2	TTGAGAATACGGGACGTGG		230	
AP4-R2	GTTAGTCATGTGAGCACCTT C			
VpPirA-284F	TGACTATTCTCACGATTGGA CTG	Dúplex PCR para detectar <i>PirA^{vp}</i> y <i>PirB^{vp}</i>	284	Han <i>et al.</i> , 2015
VpPirA-284R	CACGACTAGCGCCATTGTTA			

VpPirB-392F	TGATGAAGTGATGGGTGCTC		392	
VpPirB-392R	TGTAAGCGCCGTTTAACTCA			
Uni-Bact-F	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	rRNAprocariotica 16S	~1500	Weisburg <i>et al.</i> , 1991
Uni-Bact-R	ACGGHTACCTTGTTACGACT T			
Vibrio-Core- rpoD-F	ACGACTGACCCGGTACGCAT GTAYATGMGNGARATGGGN ACNGT	<i>Gen rpoD</i> de especies de <i>Vibrio</i> .	780	Pascual <i>et al.</i> , 2010
Vibrio-Core- rpoD-R	ATAGAAATA ACCAGA CGT AAGTTNGCYTCNACCATY TCYTTY T			
Vibrio-Core- toxR-F	GANCARGGNTTYGARGTNG AY GAY TC	<i>Gen toxR</i> de especies de <i>Vibrio</i> .	477	Pascual <i>et al.</i> , 2010
Vibrio-Core- toxR-R	TTD KKTGNCNCYN GTV GCDATNAC			
VpORF70-F	CGT TGGCATCGTTCGTGT TG	Proteína de la familia de la tripsina ORF70	326	Phiwsaiya <i>et al.</i> , 2017
VpORF70-R	TACCGTAAGTAGAGCGTTCA			
VpORF75-F	CCGATACAAACTCACCACCA	ORF75 tipo II proteína de secrecion.	429	Phiwsaiya <i>et al.</i> , 2017
VpORF75-R	AGGAGAAGTAGGGCAAAGA C			
VpORF78-F	GATTGGCGTCAGTCAGTTCA	ORF78 Metaloproteasa RseP	452	Phiwsaiya <i>et al.</i> , 2017
VpORF78-R	GCATCGCTTTGCTTT CTTTG			
VpORF79-F	CGCCGCCTGATTGACACCTA	ORF79 tipo II & III proteína de secreción.	232	Phiwsaiya <i>et al.</i> , 2017
VpORF79-R	TGCCAT CCCATTTCCCCGTA			

Tabla 4. Frecuencia de presencia de genes *PirAB^{Vp}* en aislados de *Vibrio* del langostino blanco *Penaeus vannamei* proveniente de 5 granjas langostineras del departamento de Tumbes en el mes de Enero 2018.

Granjas langostineras	N° de aislados bacterianos (%)	Amplificación por PCR de genes <i>PirAB^{Vp}</i>	
		<i>PirAB^{Vp}</i> +(%)	<i>PirAB^{Vp}</i> -(%)
Granja 1	13 (25.5%)	0 (0%)	13 (100%)
Granja 2	6 (11.8%)	0 (0%)	6 (100%)
Granja 3	9 (17.6%)	0 (0%)	9 (100%)
Granja 4	9 (17.6%)	2 (22.2%)	7 (77.7%)
Granja 5	14 (27.5%)	1(7.14%)	13 (92.86%)
Total	51(100%)	3 (5.88%)	48 (94.2%)

Figura 3: PCR anidado AP4 (a), PCR Dúplex *pirAB^{Vp}* (b) y ensayo de PCR que abarca el genoma completo *pirAB^{Vp}* (c) para aislados representativos de Perú. Uno o ambos aislados de VP_{AHPND} XN89 (Vietnam) y 5HP (Tailandia) como control(es) positivo(s) para las pruebas de PCR. Los amplicones esperados del PCR anidado AP4 (1269 y 230 bp), PCR duplex *pirAB^{Vp}* (392 y 284 bp) y el PCR del gen completo *pirAB^{Vp}* (2020 bp) fueron encontrados en 3 de los aislados analizados 34, 36 and 43. M, marcador de ADN (2-log DNA ladder; New England BioLabs); -ve, control negativo sin ADN.

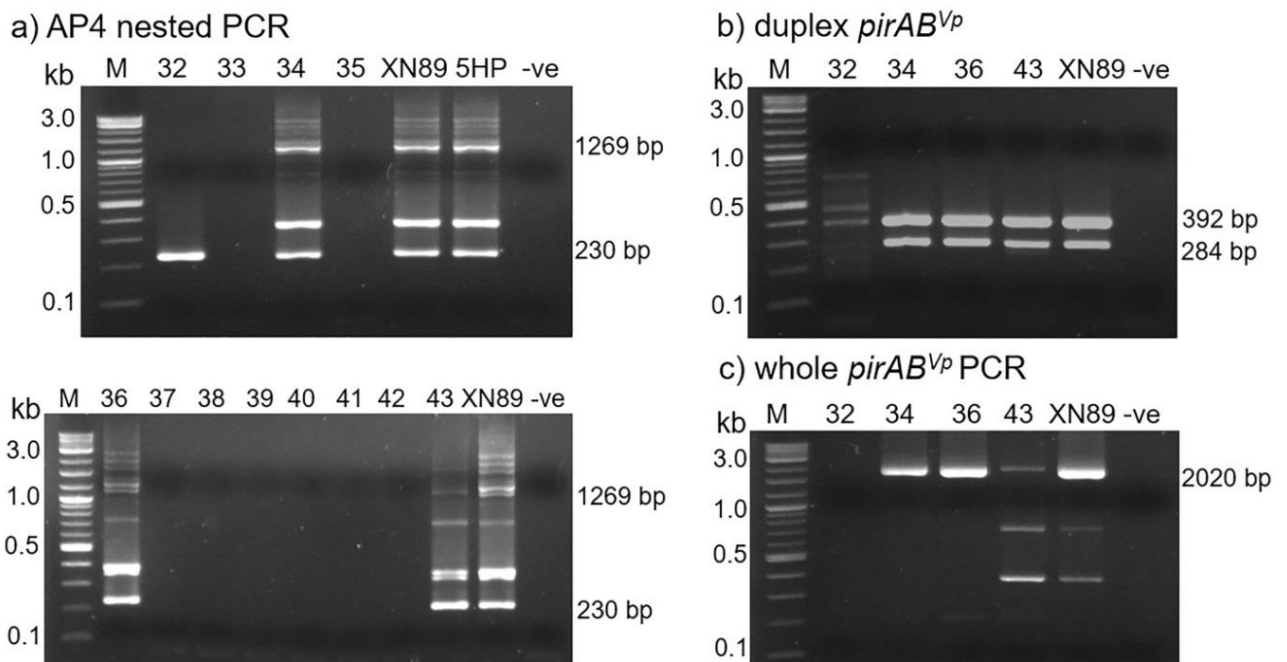


Figura 4: a) Prueba de PCR específica para detectar el gen *ldh* de *V. parahaemolyticus*. Tres aislados de *V. parahaemolyticus* S02, XN87 y XN89 fueron incluidos como controles positivos. Los aislados 36 y 43 resultaron positivos (450 bp) mientras que el aislado 34 fue negativo. M, marcador de ADN (2-log DNAladder; New England BioLabs); -ve, control negativo sin ADN. b) Árbol filogenético de MLSA fue construido basado en 2670 bp de *16S rRNA* (1364 bp), *ropD* (787 bp) y *toxR* (519 bp) con bootstrap de 1000 réplicas (Pascual *et al.*, 2010).

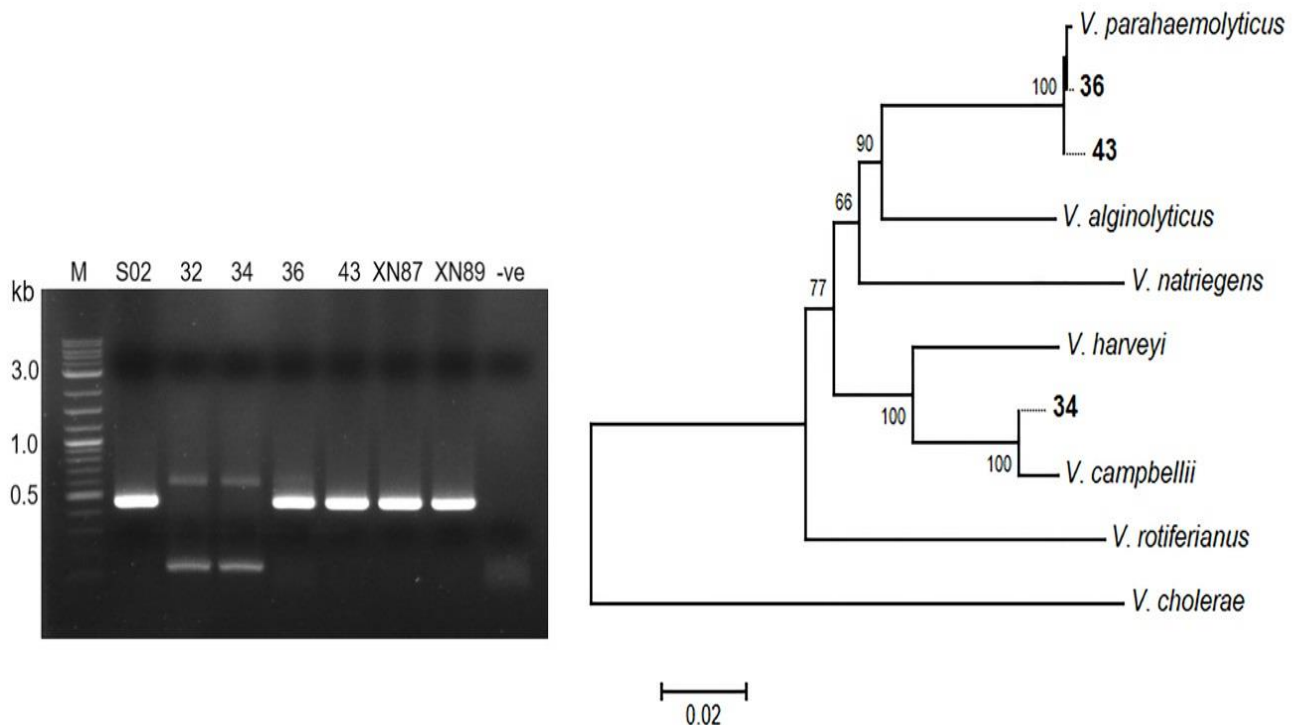


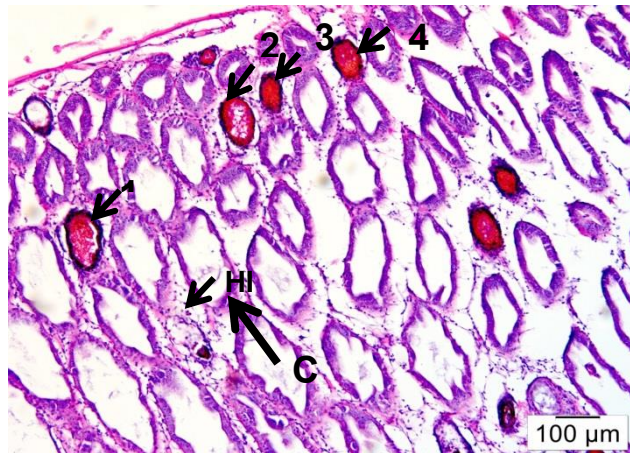
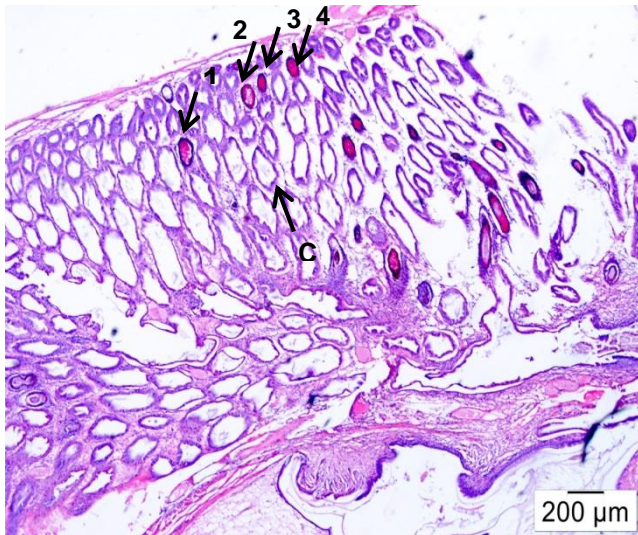
Tabla 5. Resultados PCR AP4 nested, Dúplex PCR, PCR 2020 PirAB y PCR gen *ldh* de las granjas 4 y 5 donde se obtuvieron aislados positivos al gen *PirAB^{Vp}*.

N° de granja	N° de aislado	Amplificación por PCR (AP4, Dúplex PCR, 2020PirAB)	Amplificación por PCR <i>ldh</i>	Descripción
		<i>Pir AB^{Vp+}</i>	<i>V.parahaemolyticus</i> +	
Granja 4	29	-	+	<i>V. parahaemolyticus</i>
	30	-	-	-
	31	-	-	-
	32	-	-	-
	33	-	+	<i>V. parahaemolyticus</i>
	34	+	-	No V. parahaemolyticus <i>PirAB^{Vp+}</i> (<i>V.campbellii</i> al MLSA)
	35	-	+	<i>V. parahaemolyticus</i>
	36	+	+	<i>V. parahaemolyticus PirAB^{Vp+}</i>
	37	-	-	-
	Granja 5	38	-	+
39		-	+	<i>V. parahaemolyticus</i>
40		-	-	-
41		-	-	-
42		-	-	-
43		+	+	<i>V. parahaemolyticus PirAB^{Vp+}</i>
44		-	-	-
45		-	+	<i>V. parahaemolyticus</i>
46		-	+	<i>V. parahaemolyticus</i>
47		-	+	<i>V. parahaemolyticus</i>
48	-	+	<i>V. parahaemolyticus</i>	

49	-	+	<i>V. parahaemolyticus</i>
50	-	+	<i>V. parahaemolyticus</i>
51	-	+	<i>V. parahaemolyticus</i>

Figura 5: Tinción H& E de tejido hepatopancreático de los langostinos pertenecientes a las granjas positivas a los genes *PirAB^{Vp}* (G1 y G2). a) Presencia de granulomas, colapso (C) del epitelio tubular del hepatopáncreas e infiltración hemocítica (HI) No se observe desprendimiento masivo de células del epitelio tubular del HP. b) Las muestras de la G2 presentaron una mezcla de tejido normal (N) y colapsado (C) del epitelio tubular hepatopancreático de la mencionada granja (4/9).

a) G1



b) G2

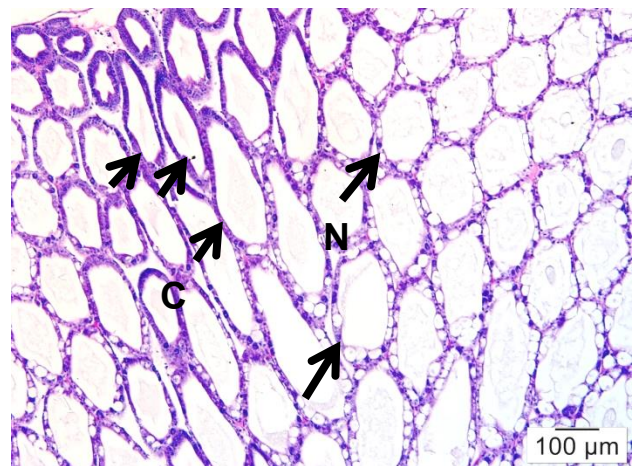
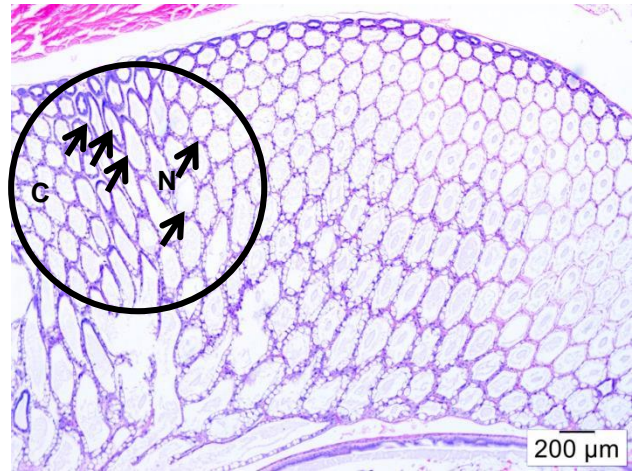


Figura 6. Detección mediante PCR de los genes virulentos putativos que codifican los ORFs 70, 75, 78 y 79 localizados en el plásmido pVA1 o pVPA3-1. Los aislados 34, 36, y 43 fueron obtenidos en este estudio. *V. parahaemolyticus* AHPND⁻ (negativo) S02, *V. parahaemolyticus* mutante XN87, *V. parahaemolyticus* AHPND⁺ XN89, N, control negativo sin ADN, M, marcador de ADN (New England Biolabs).

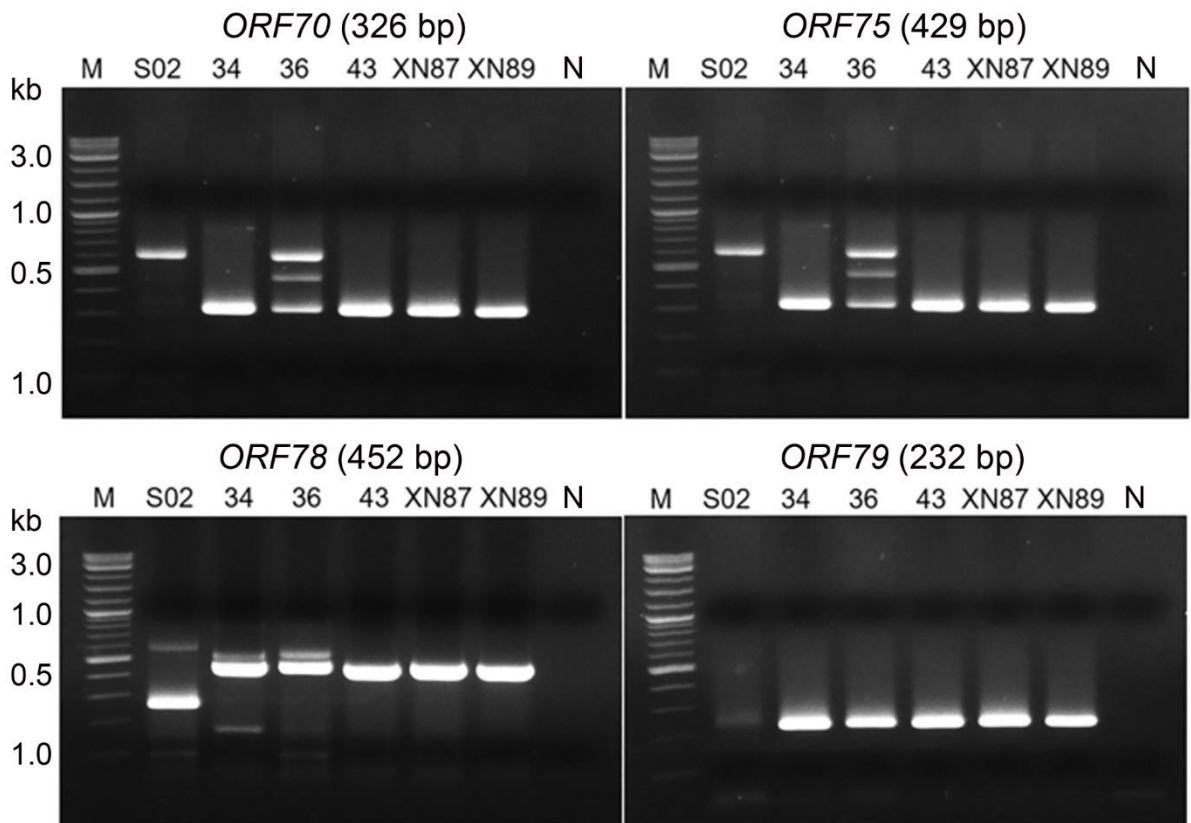


Figura 7. Hallazgos histopatológicos de la granja langostinera 4.

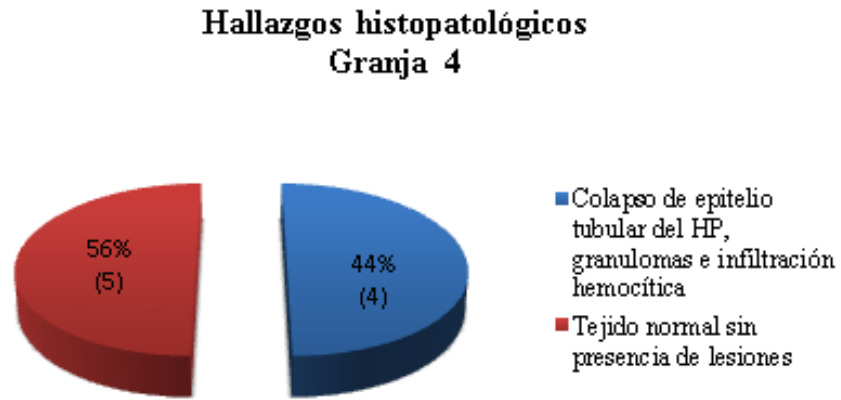


Figura 8. Hallazgos histopatológicos de la granja langostinera 5.

