

Cepas de *Vibrio parahaemolyticus* que causan necrosis hepatopancreática aguda en camarón cultivado de Sonora, México y su resistencia a antibióticos

Vibrio parahaemolyticus strains causing acute hepatopancreatic necrosis disease in farming shrimp of Sonora, Mexico and their antibiotic resistance

Lucio Galaviz-Silva¹, Ariel Robles-Valdez¹, Ricardo Sánchez-Díaz², José Cuauhtémoc Ibarra-Gamez², Bruno Gómez-Gil³, Zinnia J. Molina-Garza¹

Recibido: 07 de noviembre de 2018.

Aceptado: 09 de julio de 2021.

Publicado: agosto de 2021.

RESUMEN

Antecedentes: Los cultivos de camarón del noroeste de México han presentado epizootias desde el 2013 con pérdidas de más del 80%. Como único antecedente se conoce la enfermedad de la necrosis hepatopancreática aguda (AHPND), causada en Asia por una cepa nueva de *Vibrio parahaemolyticus* (VP-AHPND+) que produce las toxinas PirA y PirB del plásmido pVA1. **Objetivos:** Caracterizar al agente causal de epizootias en granjas, realizar comparaciones genómicas de secuenciación de la región 16S ADNr para identificar la variabilidad entre las cepas y evaluar la resistencia desarrollada contra antibióticos *in vitro*. **Métodos:** Se monitorearon esteros, drenes y granjas del sur de Sonora, colectándose asepticamente muestras de agua, sedimento y camarón. Se realizaron cultivos bacterianos en TCBS y las colonias verdes fueron sembradas en CHROMagar Vibrio. Los aislados patógenos se identificaron por PCR-AP3 específico para la cepa VP-AHPND+. El polimorfismo de las cepas se analizó mediante secuenciación de la región 16S ADNr y la técnica de rep-PCR (GTG)5. La resistencia a antibióticos se realizó con oxitetraciclina, florfenicol, enrofloxacin, magnacina y sulfaclopiridacina-trimetoprim. **Resultados:** Durante el 2013-2014 se aislaron 444 cepas (82 del 2013 y 362 del 2014). Se seleccionaron 83 de estas, de las cuales 16 fueron positivas por PCR. Las secuencias de la región 16S ADNr se compararon con las del banco de genes y se encontró que tienen elevada homología con las de VP-AHPND+ de Sinaloa con diferencias de las Tailandia y China, el polimorfismo ocurre principalmente en 15 secuencias nucleotídicas. Respecto a las pruebas de resistencia a antibióticos se identificaron cepas resistentes a oxitetraciclina y sulfaclopiridacina-trimetoprim. **Conclusiones:** El VP-AHPND+ se identificó como agente causal de la AHPND en granjas de Sonora y presentó polimorfismo entre las cepas las cuales fueron resistentes a antibióticos aplicados regularmente en las granjas.

Palabras clave: camarón, *Litopenaeus vannamei*, síndrome de la mortalidad temprana, *Vibrio parahaemolyticus* AHPND+.

ABSTRACT

Background: Shrimp farms in northwestern Mexico have had outbreaks since 2013 with losses of more than 80%. The only background is the acute hepatopancreatic necrosis diseases (AHPND) originated in Asia for a new strains of *Vibrio parahaemolyticus* (VP-AHPND+) that produce toxins PirA and PirB of the plasmid pVA1. **Goals:** To characterize the causative agent of epizootics in farms; to perform genomic comparisons of sequencing of the 16S rDNA region to identify the variability that occurs in the strains and evaluate the resistance developed against antibiotics *in vitro*. **Methods:** Estuaries, drains, and farms of southern Sonora were monitored; samples of water, sediment and shrimps were aseptically sampled. Bacterial cultures were performed in TCBS and the green colonies were streaked in the selective culture media CHROMagar Vibrio medium. Bacteria were identified by PCR-AP3 specific for the strains VP-AHPND+. Polymorphism of strains

¹ Laboratorio de Patología Molecular y Experimental, Facultad de Ciencias Biológicas, Unidad B, Universidad Autónoma de Nuevo León. Avenida Universidad s/n, Ciudad Universitaria, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, 66455. México

² Laboratorio de Análisis de Sanidad Acuicola (LASA), Instituto Tecnológico de Sonora. Calle 5 de Febrero 818 Sur, col. Centro, Ciudad Obregón, Sonora, 85000. México

³ CIAD, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C., Unidad Mazatlán. Avenida Sábalo Cerritos s/n, Estero del Yugo, Sinaloa, 82112. México

***Corresponding author:**

Zinnia J. Molina-Garza: e-mail: molinazinnia@hotmail.com; lgs12167@yahoo.com

To quote as:

Galaviz-Silva, L., A. Robles-Valdez, R. Sánchez-Díaz, J. C. Ibarra-Gamez, B. Gómez-Gil & Z. J. Molina-Garza. 2021. Cepas de *Vibrio parahaemolyticus* que causan necrosis hepatopancreática aguda en camarón cultivado de Sonora, México y su resistencia a antibióticos. *Hidrobiológica* 31 (2): 111-123.

DOI:10.24275/uam/izt/dcbs/hidro/2021v31n2/Galaviz

were analyzed by sequencing the 16S rDNA region and the rep-PCR (GTG)₅ technique. Antibiotic resistance was examined for oxitetraciclina, florfenicol, enrofloxacin, magnacin, sulfaclopiridacin-trimetoprim and enrofloxacin. **Results:** Throughout 2013-2014, 444 strains were isolated (82 from 2013, and 362 from 2014). Eighty-three were selected, from which 16 were PCR-positives. Sequences from 16S rDNA region were compared with those deposited at GenBank, and a high homology was found with sequences from VP-AHPND+ from Sinaloa with differences of those from Thailand and China, polymorphism occur mainly in 15 nucleotide sequences. Regards to antibiotic resistance tests, strains with resistance to oxytetracycline and sulfachloropyridazine-trimethoprim were found. **Conclusions:** VP-AHPND+ was identified as the causative agent of AHPND in shrimp farms from Sonora and the polymorphism among the strains was confirmed, also antibiotic resistance was found against antibiotics, regularly applied to shrimp farms.

Keywords: bearly mortality syndrome, *Litopenaeus vannamei*, shrimp, *Vibrio parahaemolyticus* AHPND+

INTRODUCCIÓN

El cultivo de camarón es una industria productiva a nivel mundial con un crecimiento exponencial en la última década. El principal estado productor de camarón en nuestro país es Sinaloa con más de 96 mil toneladas, le sigue Sonora con 75 mil toneladas y Nayarit con 17 mil toneladas (García, 2020). En el país existen 1,447 granjas, con un área total de 45,000 hectáreas destinadas al cultivo de camarón; esta actividad es el sustento de miles de habitantes de las costas de Sonora, Sinaloa, Nayarit, Baja California Sur y Tamaulipas, además de otros 11 estados, lugares donde se concentra la producción de 237 mil 647 toneladas (CONAPESCA, 2018; García, 2020).

El mayor problema al que se había enfrentado la camaricultura en el país eran las epizootias causadas por infecciones virales. Dentro de los patógenos que ocasionan las mayores pérdidas a la industria mexicana se encuentran los virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa (IHNV= Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus), del síndrome de Taura (TSV= Taura syndrome virus) y el virus del síndrome de mancha blanca (WSSV=White spot syndrome virus) (Lightner & Redman, 1998; Flegel *et al.*, 2008; Lightner, 2011). Sin embargo, desde el 2009 se presentó en Asia una enfermedad bacteriana emergente llamada síndrome de la muerte temprana (EMS= Early mortality syndrome) o enfermedad de la necrosis hepatopancreática aguda (AHPND= Acute hepatopancreatic necrosis disease), el agente causal es una cepa nueva de *Vibrio parahaemolyticus* (VP-AHPND+) (Flegel, 2012; Tran *et al.*, 2013). La enfermedad EMS/AHPND se propagó en el 2010 hacia granjas del sur de China y la isla de Hainan; para principios de 2011 se había detectado en Vietnam y Malasia (Lightner *et al.*, 2012), lo que ocasionó pérdidas billonarias en producción. En el noroeste de México (Nayarit, Sinaloa y Sonora) se presentaron epizootias severas en el cultivo de camarón desde el 2013 (SENASICA, 2014) las cuales generaron grandes pérdidas de hasta el 80% en la producción en el inicio del cultivo, debido a patologías similares a AHPND (Tran *et al.*, 2013), en México ya existían reportes en Sinaloa (Soto-Rodríguez *et al.*, 2015), donde actualmente continúan las epizootias (CESASIN, 2020). Por consiguiente, el comité Estatal de Sanidad Acuicola del Estado de Sonora A. C. (COAES) reportó pérdidas millonarias, pues si en el 2009 la producción alcanzó 81,423 toneladas, en 2013 solo llegó

a 13,192 toneladas, por lo que se recomendó cerrar las granjas en el siguiente ciclo 2014, aunque ya no es tan grave la enfermedad en la camaricultura, la producción continúa con pérdidas (COAES, 2017). Las estimaciones anteriores del impacto económico acumulativo de AHPND han oscilado entre \$ 8 mil millones de dólares para Asia y \$ 4 mil millones para Estados Unidos (Aranguren-Caro *et al.*, 2020), país donde iniciaron las mortalidades en el 2017 (Dhar *et al.*, 2019).

La enfermedad AHPND se caracteriza por el desprendimiento masivo de los túbulos de las células epiteliales del hepatopáncreas (HP), causada por las toxinas PirA y PirB de V-AHPND+. El diagnóstico preciso se basa en la detección de una región intergénica de PirA para validar la presencia específica del patógeno (Sirikharin *et al.*, 2015). Es importante subrayar la resistencia a antibióticos que han desarrollado algunas cepas de VP-AHPND+ a la oxitetraciclina y tetraciclina relacionada con el gen *tet*, transportado por un plásmido; otros aislados presentan resistencia a las quinolonas, probablemente por la adquisición de plásmidos que median la resistencia a las quinolonas (PMQR) o debido a los cambios en expresión de las bombas de expulsión y porinas que controlan la cantidad de droga en la célula bacteriana (Han *et al.*, 2015; Rortana *et al.*, 2018).

Debido a la importancia que tiene AHPND, los objetivos del presente trabajo fueron (1) identificar los aislados bacterianos de las cepas causantes de epizootias mediante análisis por PCR con los primers AP3 específicos (2) realizar comparaciones genómicas de secuenciación de la región 16S ADN de las cepas colectadas durante los ciclos de cultivo 2013 y 2014 para determinar si el agente causal de las mortalidades atípicas del camarón en las granjas del estado de Sonora son la misma o diferentes cepas de *V. parahaemolyticus* que causa la VP-AHPND+ en Asia; (3) Determinar el perfil genómico con elementos de PCR palindrómicos extragenómicos repetitivos, conocido como rep-PCR, con los primers GTC₅ y (4) evaluar la resistencia de VP-AHPND+ a antibióticos comerciales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio: En el ciclo de cultivo del 2013, los sitios de muestreo fueron nueve, seis de ellos ubicados en la Junta Local de Sanidad Acuicola (JLSA) de Cruz de Piedra en el centro de Sonora (27°57'3" Latitud Norte y 110°40'33" de Longitud Oeste), una en Tobarí (27°03'00" LN y 109°53'00" LO) y dos en Atanasia (26° 47' 2.59" LN y 109° 48' 48.20" LO). Las muestras incluyeron camarón (silvestre y de cultivo), sedimento y agua.

Para las muestras del ciclo 2014 se monitorearon cuerpos de agua (esteros y drenes) circundantes a las granjas que presentaron mortalidad en el ciclo 2013, las localidades son en los esteros de Melagos (27° 09' 46.90" LN, 110° 15' 58.49" LO), Atanasia (27° 08' 08.85" LN, 110° 11' 27.67" LO) y El Riito (26° 47' 2.59" LN, 109° 48' 48.20" LO) (COAES, 2017).

Colecta de muestras: Las muestras se colectaron asépticamente en bolsas estériles (Whirl-pack, Fort Atkinson, Wisconsin) y consistieron en 100 mL de agua y 50 g de sedimento de cada sitio, introduciéndolas en las columnas de agua o esteros adjuntos al área de suministro de las granjas. Éstas se almacenaron en hieleras para transportarlas y analizarlas en el laboratorio como lo recomienda la Norma oficial Mexicana (NOM-230-SSA1-2002). Para la captura de los camarones silvestres o

de cultivo, se utilizó el muestreo dirigido con una atarraya convencional, mediante, en el cual se colectaron organismos con características o signos anormales que presumiblemente estén asociados con alguna enfermedad (OIE, 2013). Para la transportación de los organismos vivos al laboratorio se utilizaron acuarios de plástico limpios con agua del mismo sitio (Joshi *et al.*, 2014).

Análisis bacteriológicos de agua: se sembraron directamente 100 µL de la muestra en placa en el medio de cultivo TCBS (Thiosulfate Citrate Bile Salts Sucrose; DIFCO, BD, México), posteriormente se incubaron por 18 a 24 h a 28 - 30 °C (Gomez-Gil *et al.*, 1998; Soto-Rodríguez *et al.*, 2010). En el caso del sedimento este se mezcló 1:1 con agua marina estéril y se maceró con un mortero, posteriormente se centrifugó para separar las bacterias del sedimento para diluirlas en forma seriadas (10^{-1} - 10^{-6}), sembrándose 100 µL en el medio de cultivo (Galaviz-Silva *et al.*, 2018).

Análisis bacteriológico de postlarvas (PL's): se pesó un gramo de muestra y se maceró en 10 mL de solución salina al 2% estéril, después se sembraron 100 µL en el medio de cultivo TCBS y se incubaron de 18 a 24 h a una temperatura de 28 a 30 °C (Gomez-Gil *et al.*, 1998; Soto-Rodríguez *et al.*, 2010). Para el análisis bacteriológico de HP en

juveniles, se utilizaron pinzas de disección estériles y bajo condiciones asépticas se pesó 1 g de cada uno para macerarse en 10 mL de solución salina al 2% estéril en mortero; de este se cultivaron 100 µL en TCBS y se prosiguió como en el caso de las PL's (Gomez-Gil *et al.*, 1998; Soto-Rodríguez *et al.*, 2010).

Aislamiento y purificación de cepas bacteriológicas: Para la pre-selección de colonias de VP se incluyó únicamente las colonias verdes del agar TCBS (crecimiento típico de *V. parahaemolyticus*) con o sin presencia de bioluminiscencia y se resembró en agar tripticaseína de soya (TSA; DIFCO, BD) + 2% de NaCl y en CHROMagar Vibrio que es un medio diferencial para VP, pero no para VP-AHPND+, donde crece de color malva (CHROMagar, Paris, Francia), el método que se utilizó fue por estria cruzada a una temperatura de 35°C por 24 h (Di-Pinto *et al.*, 2011). Estas cepas de VP fueron agrupadas por área de colecta y tipo de muestra (sedimento, agua, PL's o juveniles), seleccionándose solo una para la identificación definitiva por PCR con primers específicos para VP-AHPND+.

En el 2013 se revisaron 106 casos y en el 2014 fueron 496 (Tabla 1 y 2, respectivamente).

Tabla 1. Aislados bacterianos de *Vibrio parahaemolyticus* (no confirmados AHPND+) en agua, sedimento y camarón del ciclo de cultivo 2013 en tres Juntas Locales de Sanidad Acuícola (JLSA) en el sur de Sonora.

JLSA	Agua (N/P ^a)	Sedimento (N/P)	Larva (N/P)	HP ^b (N/P)	Total (N/P)
Atanasia	8/6*	7/5	5/3*	3/3	23/17
Mélagos	8/5*	5/4*	7/7*	3/3*	23/19
El Riito	5/1	5/2	30/27	20/16	60/46
Total	21/12	17/11	42/37	26/22	106/82

^a (N/P) = (Número de casos/Positivos); ^b HP= Hepatopáncreas. Se marcan con (*) el tipo de muestra donde se detectaron los casos AHPND+.

Tabla 2. Aislados bacterianos de *V. parahaemolyticus* (no confirmados AHPND+) en agua, sedimento y camarón durante el ciclo de cultivo 2014 en 11 Juntas Locales de Sanidad Acuícola (JLSA) en el estado de Sonora.

JLSA	Agua (N/P ^a)	Sedimento (N/P)	Larva (N/P)	HP ^b (N/P)	Total (N/P)
Aquiropo	-	-	-	7/5	7/5
Atanasia	20/16	5/3	10/4	30/28	65/51
Bahía de Kino	4/2	-	1/1	7/6	12/9
Bahía de Lobos	40/30*	20/15*	-	25/22*	85/67
Cruz de Piedra	10/7	10/5	10/1	10/5**	40/18
Mélagos	40/39*	15/10	15/11	70/61*	140/121
El Riito	5/3	5/2	-	10/6	20/11
Santa Bárbara	-	-	5/1	5/1	10/2
Siari	2/2	-	-	-	2/2
Tastiota	10/2	-	-	10/9*	20/11
Tobari	15/13*	10/5	10/4*	30/21	65/43
*Sin definir	10/8	-	-	20/14	30/22
Total	156/122	65/40	51/22	224/178	496/362

^a(N/P) = Número de casos/Positivos; ^b HP = Hepatopáncreas; SM : Sin muestra. Se marcan con (*) el tipo de muestra donde se detectaron los casos AHPND+.

Patogenicidad de las cepas: Las colonias con crecimiento en CHRO-Magar Vibrio y positivas por PCR, fueron inoculadas en camarones de 1 g (Megalavias de Sinaloa, S. de R.L.) para comprobar el segundo y tercer postulado de Koch (El microorganismo debe poder ser extraído y aislado de un organismo enfermo y cultivarse en un cultivo puro y el microorganismo que se ha cultivado en un cultivo debería poder causar la enfermedad una vez introducido en un organismo sano, respectivamente). Se inoculó un grupo de cinco camarones por cada cepa de VP-AHPND+ en acuarios previamente desinfectados y separados en agua marina sintética (35 ‰, Rangen, Buhl, ID, USA); los retos de patogenicidad se realizaron por inmersión por 15 min con cultivos frescos de las cepas (incubados 24 h a 30 °C, a una concentración de 0.5 de la escala de McFarland). Después de la inmersión, los camarones se regresaron al acuario correspondiente junto con el inóculo (Tran *et al.*, 2013). El caldo soya triptocaseína (TSB) estéril + 2 ‰ NaCl se usó como control negativo. El control positivo consistió en el inóculo con la cepa VP-AHPND+ MC32, proporcionada por Ricardo Sánchez Díaz. Los camarones retados en los bioensayos se mantuvieron en observación hasta la manifestación de los signos clínicos de la AHPND (anorexia, nado errático, HP pálido, intestino vacío y letargia (Soto-Rodríguez *et al.*, 2015); de los camarones enfermos se obtuvieron muestras para histopatología y PCR.

Caracterización molecular: La extracción del ADN de las cepas bacterianas obtenidas de estómago, HP, agua y sedimento, se realizó con DNAzol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), según las instrucciones del fabricante. Se utilizaron 100 ng de ADN de las muestras cuantificadas en el espectrofotómetro Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA) disueltas en 50 µL de agua estéril y se conservaron a -20°C hasta su uso (Galaviz-Silva *et al.*, 2018).

Identificación por PCR: Se realizó la identificación de VP-AHPND+ por medio de PCR punto final. El coctel de reacción se preparó con una mezcla de amortiguador 5X, 1.5 mM MgCl₂, 200 µM de cada dNTP, 0.2 µM de cada primer específico (AP3F) - 5'-ATGAGTAACAATATAAACATGAAAC-3' y (AP3R) - 5'-21 GTGGTAATAGATTGACAGAA-3', 3 µL de ADN de la muestra y 1 U de Taq polimerasa GoTaq (Promega, Madison, WI), para tener el volumen final de 25 µL con agua bidestilada (H₂O) (Sirikharin *et al.*, 2015). Se utilizó un programa de precalentamiento de 94° por 5 min, seguido de 30 ciclos de desnaturalización de 94° por 30 s, anillamiento de 53°C por 30 s, extensión de 72°C por 40 s y una extensión final de 72 por 5 min en un termociclador (MultiGene thermal cycler, Labnet International, Inc., Edison, NJ). Se obtuvieron productos amplificados de 336 pb observados en un transiluminador de luz UV (Bio-Rad) en geles de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio (Sirikharin *et al.*, 2015).

Análisis genómico de la región 16S rADN: La caracterización molecular del polimorfismo de las cepas se analizó amplificándose la región del gen 16S ADN de las bacterias PCR positivas con los primers: U1F (5'-CTYAAAKRAATTGRCGRRSSC - 3') y U1R (5'-CGGGCGGTGTGTRCAARRSSC-3') (Rivas *et al.*, 2004). Se preparó una mezcla de 25 µL con amortiguador 5X, 1.5 mM MgCl₂, 200 µM de cada dNTP, 0.2 µM de cada primer, ADN de las bacterias (100 ng), 1 U de Taq polimerasa (GoTaq, Promega) y H₂O. El programa de amplificación inició con un ciclo de 95°C por 5 min, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 1 min, alineamiento a 55°C por 2 min y extensión a 72°C durante 1 min con una extensión final a 72°C por 7 min. Los productos se visualizaron en geles de agarosa al 1%, en un transiluminador UV (Bio-Rad). Posteriormente los amplicones fueron purificados con el estuche QIAquick PCR (Qiagen). La secuenciación se realizó en los Servicios Ge-

nómicos de CINVESTAV-LANGEBIO, Irapuato, Guanajuato. La secuencia de los productos amplificados se depositó en el GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) para compararlas con las registradas en el banco de datos y determinar la homología con Blast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). Se elaboró el dendrograma que determina la evolución filogenética y el grado de similitud con las descritas en otras regiones geográficas. Las ramas corresponden a particiones en al menos 500 réplicas por "bootstrap". La distancia evolutiva se computó con el método "p-distance" y son el número de diferencia en las bases por sitio, involucrándose a 17 secuencias de nucleótidos. El análisis se realizó con Mega 7 (Saitou & Nei, 1987).

Variabilidad de las cepas por rep-PCR - (GTG)₅: Para discriminar entre cepas PirA+ seleccionadas por PCR, se utilizó la técnica de rep-PCR (GTG)₅, la cual se basa en la amplificación de secuencias palindrómicas repetidas intercaladas en el ADN. Se preparó una mezcla de 25 µL para PCR con amortiguador 5X Taq Green (Promega), 25 mM MgCl₂, 25 mM desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTPs), 25 µM del primer (GTG)₅ 5'-GTGGTGGTGGTGGT-3', H₂O, ADN (100 ng/µL) y 1 U de ADN polimerasa (GoTaq, Promega). La amplificación comenzó con una pre desnaturalización a 95°C (7 min), seguido por 4 ciclos de 95°C (2 min), 36°C (2 min) y 72°C (2 min), más 30 ciclos de 95°C (1 min), 50°C (1 min) y 72°C (1 min). La elongación final fue a 72°C por 5 min. Las muestras se analizaron visualmente en electroforesis de geles de agarosa al 1.5% en 1X TBE (Tris Borato EDTA), a 100 V por 1 h y 30 min y de estos se seleccionaron las cepas con perfiles o patrones de bandas diferentes (Matsheka *et al.*, 2005).

Resistencia a los antibióticos: Los antibióticos comerciales AVIMEX (Cd. De México, México) utilizados para los antibiogramas fueron: Oxiblen (Oxitetraciclina: OXD), Flor-blend (Florfenicol: FLD), Enro-blend (Enrofloxacin: EBD), Magna-mix (Magnacina: MGX), Tri-mex (Sulfaclopiridacina y Trimetoprim: TX) y Aviflox (Enrofloxacin: AFX). El grado de sensibilidad se estableció de acuerdo al diámetro de inhibición: muy sensible (>17 mm), sensible (12-16 mm), intermedio (8-11 mm) y resistente (≤ 12-17 mm, según el antibiótico), de acuerdo al criterio establecido de CLSI (2005a; 2005b) ajustándose la turbidez de la suspensión bacteriana a 0.5 de la escala de McFarland en el medio de cultivo Mueller Hinton (DIFCO, DB) con 2% de NaCl por triplicado para cada antibiótico y bacteria evaluada (Yano *et al.*, 2014).

Análisis estadístico: Para el análisis de datos de antibiogramas, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) simple para comparar entre las variables analizadas, con pruebas de rangos múltiples y la prueba de (LSD) Fisher con el Paquete estadístico STATISTICA Versión 5.0.

RESULTADOS

Análisis bacteriano: De los muestreos en los esteros y en granja de camarón se aislaron colonias verdes característica en el crecimiento de VP en el agar TCBS (se ignoraron las colonias amarillas). Estas colonias se ordenaron según el tipo de muestra y localidad, agrupándose en 82 aislados en los ciclos de cultivo del 2013; la mayoría provino de El Riito con 46 cepas aisladas, 27 de larvas, 16 de HP, 2 de sedimento y una de agua (Tabla 1). Las muestras analizadas de granjas de cultivo en las JLSA durante el ciclo de cultivo 2014 ascendieron a 362 cepas de VP, la mayoría de Mélagos (121), Bahía de Lobos (67), Atanasia (51) y Tobarí (43) sumando en ambos años 444 muestras procesadas (Tabla 2).

Todas estas cepas se resembraron en el medio de cultivo CHROMagar Vibrio y 186 presentaron características para VP con coloración malva, de los cuales se seleccionaron 83 cepas que representa el 18.6%; se descartaron aquellas que se repetían el lugar de procedencia y mismo tipo de muestra (PL's, juveniles, sedimento o agua) para la identificación por PCR para VP-AHPND+ con el método AP3.

Identificación por PCR: Las cepas positivas por PCR fueron 16, mostrando los amplicones de 336 pb (Fig. 1), la procedencia de las muestras (agua, sedimento, PL's o juveniles) y la localidad donde fueron obtenidas se describen en la Tabla 3.

Se obtuvieron nueve cepas VP-AHPND+ de HP de camarones (HP y PL's) de granjas que presentaban epizootias. De las muestras de agua se recuperaron otros cinco aislados y dos de sedimento en los estanques.

Caracterización bioquímica de las cepas: El perfil bioquímico de las cepas VP-AHPND+ muestra tres grupos diferentes. En la Tabla 3 se enlistan el grupo de cepas que mostraron el mismo perfil bioquímico y PCR positivo a AP3. El segundo grupo presenta diferencias por fermentar la ramnosa y una cepa fue positiva a ornitina. El tercer grupo muestra un perfil idéntico a la cepa de referencia de ATCC 17802 de *V. parahaemolyticus* AHPND -, el segundo y tercer grupo fueron descartados en el proceso de preselección de crecimiento en CHROMagar Vibrio.

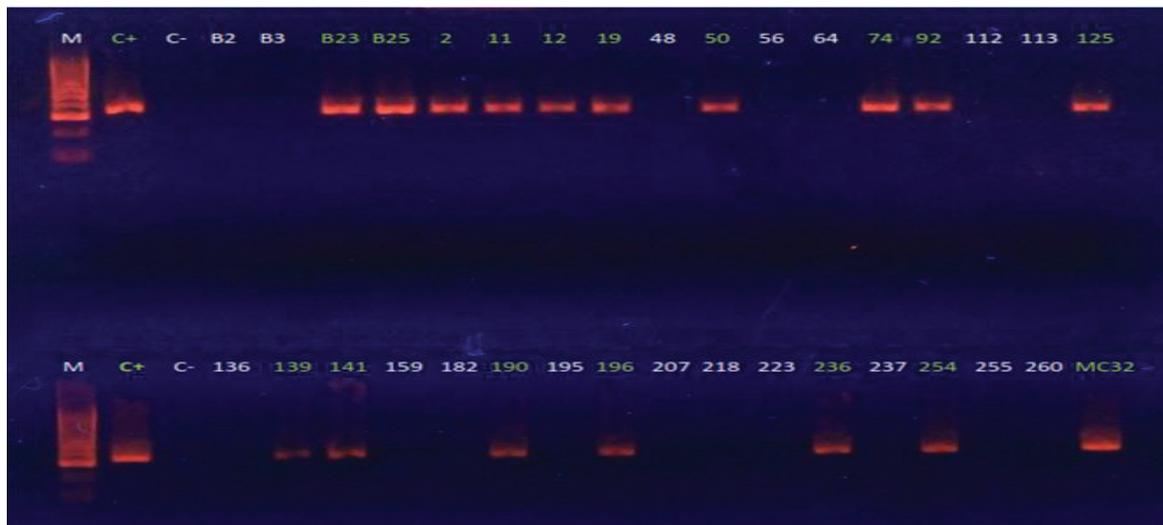


Figura 1. Cepas AHPND+ con primer AP3, cepas positivas con amplicones de 336 pb

Tabla 3. Cepas positivas para VP-AHPND+ por localidad y tipo de muestra

CLAVE	Localidad	Ciclo de cultivo	Muestra	PCR AP3	Número de acceso al GenBank
Vp-B25	Tóbari		Agua	+	MH091005.1
Vp-D2	Bahía de Lobos		Sedimento	+	MH091006.1
Vp-D11F	Tóbari		Larva	+	MH091007.1
Vp-D12F	Atanasia		Larva	+	MH091008.1
D19F	Mélagos		Sedimento	+	MH091009.1
D50	Bahía de Lobos		HP	+	MH091010.1
D74F	Mélagos		Larva	+	MH091011.1
D92	Cruz de Piedra		HP	+	MH091012.1
D125	Bahía de Lobos		Agua	+	MH091013.1
D139	Cruz de Piedra		HP	+	MH091014.1
D141	Mélagos		HP	+	MH091015.1
D190	Mélagos		HP	+	MH091016.1
D196F	Atanasia		Agua	+	MH091017.1
D236pF	Tastiota		HP	+	MH091018.1
D254	Mélagos		Agua	+	MH091019.1
D266	Mélagos		Agua	+	MH091021.1

Secuenciación de la región 16S ADNr: Las secuencias de la región 16S ADNr de las cepas aisladas de Sonora se depositaron en el GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) con los números de acceso citados en la Tabla 3. En el análisis evolutivo se definen tres grupos (Fig. 1): Las primeras que se originaron en Tailandia (3HP y 5HP) y China que

surgieron en el 2009 (Fig. 2A) y se caracterizan por tener 15 secuencias (Fig. 2B) diferentes de nucleótidos en las regiones analizadas que enmarcan el polimorfismo de la región 16S ADNr y separan el origen evolutivo; en la segunda rama se separan las cepas de Sonora descritas en este trabajo y luego las Sinaloa.

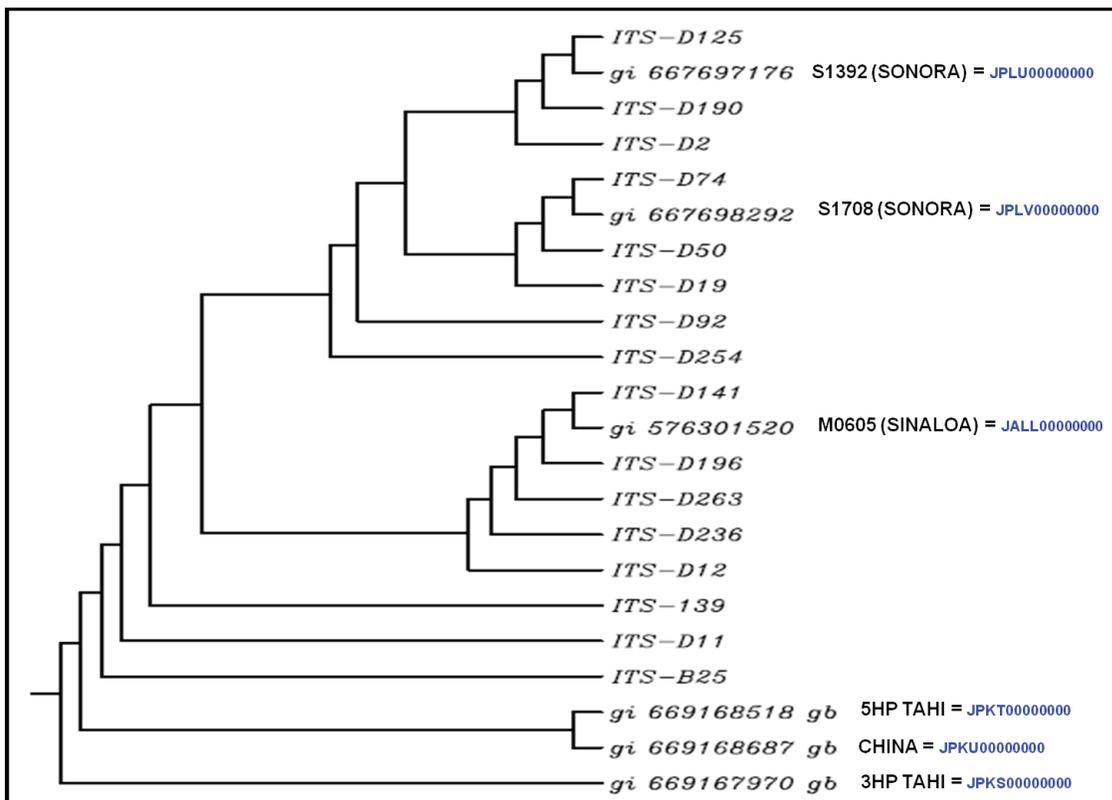


Figura 2A. Relación evolutiva de las tasas: (A) La historia evolutiva fue inferida con el método NJ (Neighbor-Joining) con 500 réplicas, indicándose la distancia de las cepas asiáticas, las de Sinaloa y Sonora.

REGIÓN	5HP-THAI (2013)	3HP-TAHI (2013)	CHINA (2013)	SINALOA (2013)	SONORA (2013)	CEPAS - ITS (SONORA 2014)
18,692 - 18,693	TC	CA	TC	AC	TC	--
18,710 - 18,711	TC	TT	TC	GT	--	--
18,733 - 18,736	TAT	GTG	TAT	TGG	GAA	GGG
18,776 - 18,777	AT	TT	AT	AA	CC	AA
18,810 - 18,813	TGG	TCA	TGG	CAA	CAA	TTT
18,866 - 18,868	TGT	ATT	TGT	CGT	CTT	TTT
18,940 - 18,942	GAA	GTT	GAA	GCA	CTG	GGG
18,969 - 18,977	TAGACGAAT	AATCCTAGG	TAGACGAAT	AGTCCAGA	AAATCTTGT	GGGCGTAAA
18,993 - 19,001	ACACTATGG	SSTGAGTGG	ACACTATGG	TGCTGGTAA	TGTTCTTGA	GGTTTGTTA
19,009 - 19,013	TAGAG	GAACC	TAGAG	GCAGT	TGGGT	CAGAT
19,045 - 19,053	CGCTGTGAT	TAAGGTGAA	CGCTGTGAT	TGCAGCGAT	CACATCAAT	CAACCTCGG
19,437 - 19,446	TGTATTTACT	TGCTCGCGCA	TGTATTTACT	CGAAAGTAAT	CCAGTGTAAG	TGGTTTAATT
19,477 - 19,886	AGGGTACTT	GCTCTCGCTC	AGGGTACTT	ATTCTAACA	GCGTGTACTG	ACTCTTGACA
19,518 - 19,525	CTACGTTG	TTTCTCTT	CTACGTTG	TCATTCTT	TAATGGTG	ATGGATTG
19,555 - 19,561	GCCTCTC	GCGCTCA	GCCTCTC	ACGCTCT	GTGGCAC	GTGCTGC

Figura 2B. El análisis evolutivo involucró 15 secuencias de nucleótidos que marcan el polimorfismo de las cepas. Todas las posiciones que contenían espacios vacíos (gaps) fueron eliminados. Había un total de 825 posiciones en la hoja de datos. El análisis evolutivo se realizó con MEGA7.

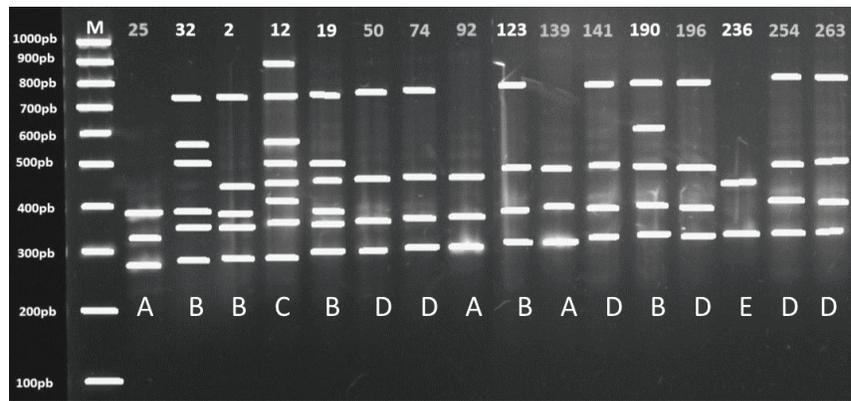


Figura 3. Perfil de amplicones para las cepas de VP-AHPND+ donde se utilizó la técnica de rep-PCR (GTG)₅, la cual se basa en la amplificación de secuencias palindrómicas repetidas intercaladas en el ADN, la lectura del gel se realizó con el software GelAnalyzer 2010.

Variabilidad de cepas por PCR - (GTG)₅: El análisis demuestra que existe polimorfismo entre las cepas de estudio representado primero por cinco grupos (A, B, C, D y E) que muestran el mismo perfil de amplicones (Fig. 3). La distribución de las cepas, el lugar de procedencia y la cantidad de cepas por JLSA muestra que la mayor variabilidad de las cepas VP-AHPND+ ocurrió en el sur de Sonora, donde se obtuvieron la mayoría de las cepas identificadas en el presente estudio, con una mayor variedad de biotipos, esto se debe a que se encuentran la mayor concentración de granjas de cultivo de camarón en el estado, de las 11 JLSA que se muestrearon, solo en 6 JLSA se obtuvieron las cepas de VP-AHPND+. En cuatro JLSA al sur de estado se identificaron 15 cepas positivas, dos cepas para el centro y una para el norte de Sonora (Fig. 4).

Resistencia a los antibióticos: Los resultados de los antibiogramas con los antibióticos comerciales muestran que algunas cepas presentan un mayor grado de inhibición o resistencia a algún antibiótico (Fig. 5). En la Tabla 4 y Fig. 5 se registran los diámetros para todas las cepas evaluadas, incluso también con la cepa de referencia ATCC y MC32. Todas las cepas presentan diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los halos de inhibición de los antibióticos evaluados, las cepas mostraron mayor sensibilidad a EVD, FLD, AFX y MGX. Doce cepas (75 %) presentaron resistencia a OXD, con halos de inhibición de 7 a 12 mm, (Fig. 5 y 6). En la Tabla 4 se muestran diferencias significativas entre las cepas en la inhibición con EBD, FLD, MGX y AFX. El 62.5 % (10 cepas) presentaron resistencia al antibiótico TX sin mostrar halos de inhibición.

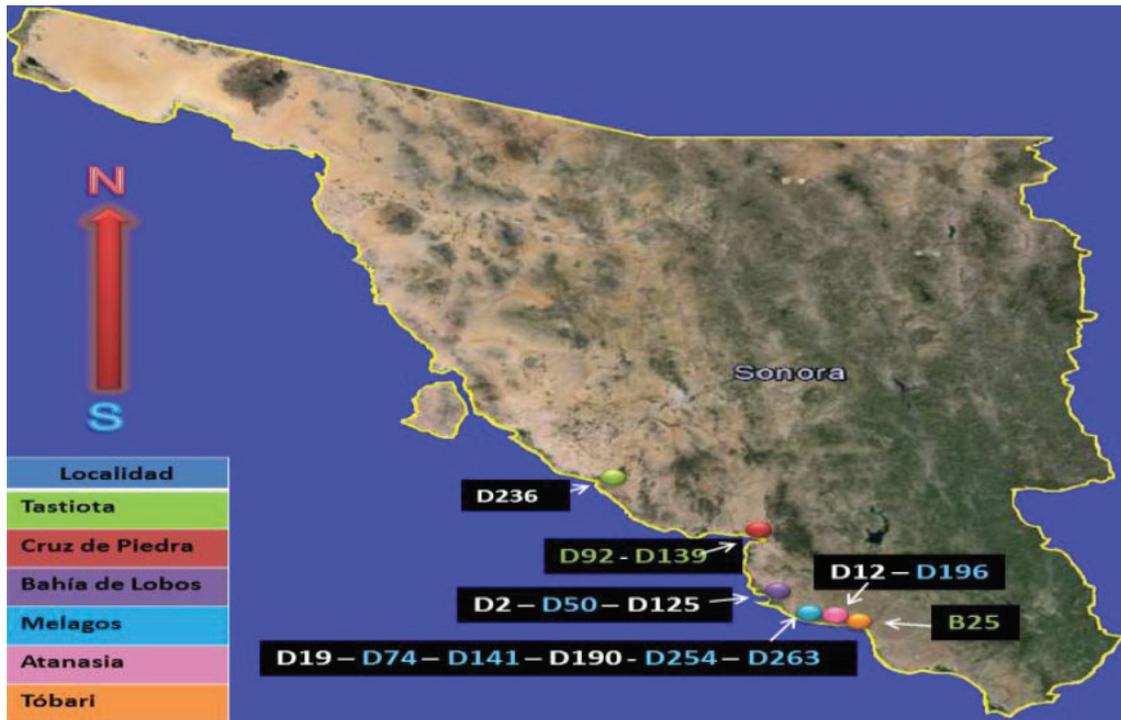


Figura 4. Distribución de las cepas positivas a AHPND en el estado de Sonora.

Tabla 4. Antibiogramas de las cepas AHPND+ de Sonora.

Cepas	Antibiogramas (halos de inhibición en mm)					
	OXD	EBD	FLD	MGX	TX	AFX
ATCC	24	22	30	26	22	22
B25	12*	26	31	20	0*	28
D2	12*	24	29	19	0*	26
D11F	7*	22	30	22	26	26
D12F	8*	22	30	22	26	23
D19F	10*	24	29	19	0*	25
D50	10*	26	30	20	0*	27
D74F	12*	25	31	21	0*	25
D92	24	21	28	19	21	22
D125	12*	27	31	24	0*	26
D139	23	22	29	19	21	22
D141	11*	25	31	22	0*	26
D190	12*	25	32	21	0*	26
D196F	24	24	30	23	19	24
D236pF	25	25	30	19	21	24
D254	10*	25	30	20	0*	26
D266	12*	23	29	18	0*	24
MC32	9*	22	29	22	0*	23
\bar{X}	15 ^A	24 ^B	30 ^C	21 ^D	9 ^E	25 ^B

* = Resistente; OXD= Oxitetraciclina; EBD= Enrofloxacin; FLD= Florfenicol; MGX= Magnacina; TX= Sulfacloropiridacina y Trimetoprim; AFX= Aviflox, Enrofloxacin.

□: Letras distintas presentaron diferencias significativas ($P < 0.05$).

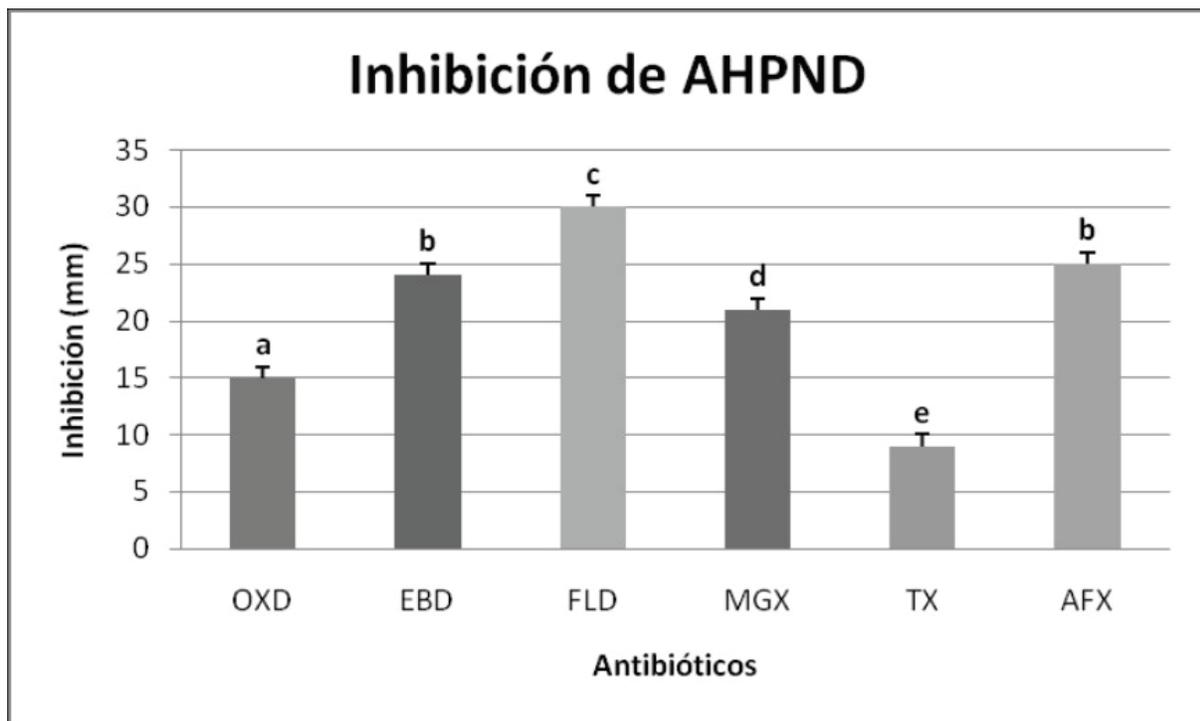


Figura 5. Diámetro de inhibición (mm) de los antibióticos contra las cepas AHPND+. Letras distintas presentaron diferencias significativas ($P < 0.05$).

Patogenicidad de las cepas: Los retos con los camarones infectados demostraron la patogenicidad de las 16 cepas de VP-AHPND+ con variación en el periodo de incubación de la enfermedad y mortalidad, reconociéndose dos grupos principales; el grupo de los aislados Vp-B25, Vp-D2, Vp-D11, Vp-12F, D19F y D50 causaron signos clínicos a partir de las 8 horas de post infección con mortalidad que inició a las 18 h; en cambio, los retos con las cepas del segundo grupo (D74F, D92, D125, D139, D141, D190, D196F, D236pF, D254 y D266) mostraron signos clínicos a las 25 h con mortalidad inicial a las 72 h. Los signos de los ejemplares con AHPND incluyeron inicialmente nado errático, letargia, el intestino vacío y HP pálido (Fig. 7). Los resultados histopatológicos demuestran los túbulos hepatopancreáticos con infiltración hemocítica, necrosis epitelial, masas bacterianas dentro del lumen y descamación del epitelio de los túbulos HP (Fig. 8).

DISCUSION

De acuerdo al primer objetivo de este estudio, los análisis bacterianos en CHROMagar y por PCR con el método AP3 (Sirikharin *et al.*, 2015) confirman la presencia de VP-AHPND+ en Sonora, lo cual se reafirma por los reportes de la presencia del patógeno en el vecino estado de Sinaloa (Soto-Rodríguez *et al.*, 2015). El agente etiológico se distribuyó en muestras de agua, sedimento y camarón, tanto en las áreas de afuera, así como en el interior de las granjas de cultivo, debido a que VP es comúnmente encontrado en el medio ambiente marino aunado a que la bacteria es altamente patógena, porque contiene un plásmido fácilmente transmisible a otras cepas (Hastuti & Desrina, 2016) e incluso otras especies de bacterias como *V. harveyi* (Muthukrishnan *et al.*, 2019) *V. owensii* (Liu *et al.*, 2015), *V. campbellii* (Dong *et al.*, 2017) y *Vibrio punensis* (Restrepo *et al.*, 2018). Estos plásmidos expresan genes PirA y PirB que codifican las toxinas proteínicas (12.7 kDa and 50.1 kDa) que lisan el hepatopáncreas del camarón y le causan la muerte (Kondo *et al.*, 2014). Los aislados de VP-AHPND+ de agua y sedimento explican la alta recurrencia de epizootias de AHPND en las granjas de camarón, al ser contaminadas con el medio ambiente local (Yang *et al.*, 2019), debido a que las PL's son certificadas como negativas por los laboratorios de diagnóstico recomendados por los Comités de Sanidad Acuicola locales. Estos resultados subrayan la importancia de mejorar los programas de buenas prácticas de manejo incluyendo uso de reservorios de agua tratada antes de la siembra (FAO, 2014).

En el transcurso de la identificación se descartaron las colonias amarillas que crecen en TCBS por ser de otras especies de *Vibrio* (*V. cholerae*, *V. alginolyticus*) aunque son muy comunes en el agua de mar por ser halófilicos, y además de ser cepas habituales y oportunistas en estómago e intestino de camarón, encontrándose frecuentemente en la fase tardía de la enfermedad junto con las cepas patógenas AHPND+ que crecen en colonias de color verde (Soto-Rodríguez *et al.*, 2015).

Los signos clínicos macroscópicos e histopatológicos que causaron las cepas AHPND+ concuerdan con las que se describe en las cepas de Asia y América, así como la variabilidad en el tiempo en que se presentan los signos y el tiempo de sobrevivencia que oscila de 4 a 10 horas (cepas M0904 y M06-07) ó 2-4 días (BpShHep31 y BpShHep 24) (Tran *et al.*, 2013; Soto-Rodríguez *et al.*, 2015; Sirikharin *et al.*, 2015; Muthukrishnan *et al.*, 2019). Las comparaciones genómicas de secuenciación de la región 16S ADNr de las cepas colectadas durante los ciclos de cultivo 2013 y 2014 indican que fueron diferentes las cepas de *V.*



Figura 6. Halos de inhibición de la cepa B25 a los antibióticos (EBD, MGX, OXD, TX).

parahaemolyticus que causaron la VP-AHPND+, respaldado así mismo por los análisis de “DNA fingerprint”, incluso se ha demostrado que la virulencia depende de la cepa, densidad, ruta de infección, tiempo de exposición, edad y condición del camarón (Soto-Rodríguez *et al.*, 2015; Muthukrishnan *et al.*, 2019) como en otras especies de *Vibrio* (Alday-Sanz *et al.*, 2002). Así como las cepas de Sinaloa y Tailandia presentan elevada diversidad de polimorfismo en las cepas patógenas de *V. parahaemolyticus*, algunas con la máxima virulencia entre las 7-10 h con mortalidades del 50% y las menos virulentas con mortalidades a las 17 h en los retos experimentales (Joshi *et al.*, 2014; Soto-Rodríguez *et al.*, 2015). En nuestros resultados se diferencian de las cepas de Tailandia, China y el Noreste de México (Sinaloa y Sonora) con base en las secuencias de la región 16S ADN, lo cual concuerda con reportes recientes que reconocen tres cladas filogenéticas basado en la alineación de secuencias nucleotídicas del plásmido pVA1 que hospedan (Latinoamericana, Asiática y Cosmopolita), diferenciándose en la ausencia del transposón Tn3 en la clada Asiática y además, algunas deleciones (pérdida de secuencias de ADN o nucleótidos) en la región *pirAB* encontrada en las cepas Latinoamericanas (González-Gómez *et al.*, 2020).

La evaluación de la resistencia a antibióticos del agente causal *in vitro*, mediante pruebas de inhibición de VP-AHPND+, demostró que se han desarrollado cepas con resistencia a OXD y TX. Las variaciones de inhibición obtenidas con el OXD pueden ser debido a que este antibiótico es el más utilizado en el cultivo de camarón en México, donde los antibióticos más comunes para contrarrestar las enfermedades producidas por bacterias del género *Vibrio* son OXD, FLD, trimetoprim-sulfametoxazol, saraoxacina (SARA) y EBD (Santiago *et al.*, 2009). Existen escasos reportes de resistencia de VP-AHPND+ en México que reportan dos cepas resistentes a ampicilina, OXD y tetraciclina (Han *et al.*, 2015). Los aislados de VP-AHPND+ de China han presentado perfiles de resistencia múltiple a antibióticos como amikacina, gentamicina, tetraciclina, y ciprofloxacina (Yang *et al.*, 2019). Este trabajo confirma los resultados de Han *et al.* (2015) de la resistencia a OXD, aumentando así la lista de cepas resistentes y reportamos por primera ocasión la resistencia a TX. Aunque también se presentaron cepas sensibles, se sugiere que la aplicación de fármacos requiere de un abordaje cuidadoso, con el fin de no incurrir en la generación de nuevas resistencias (Varela-Mejía & Alfaro-Mora, 2018). Por ende, lo más

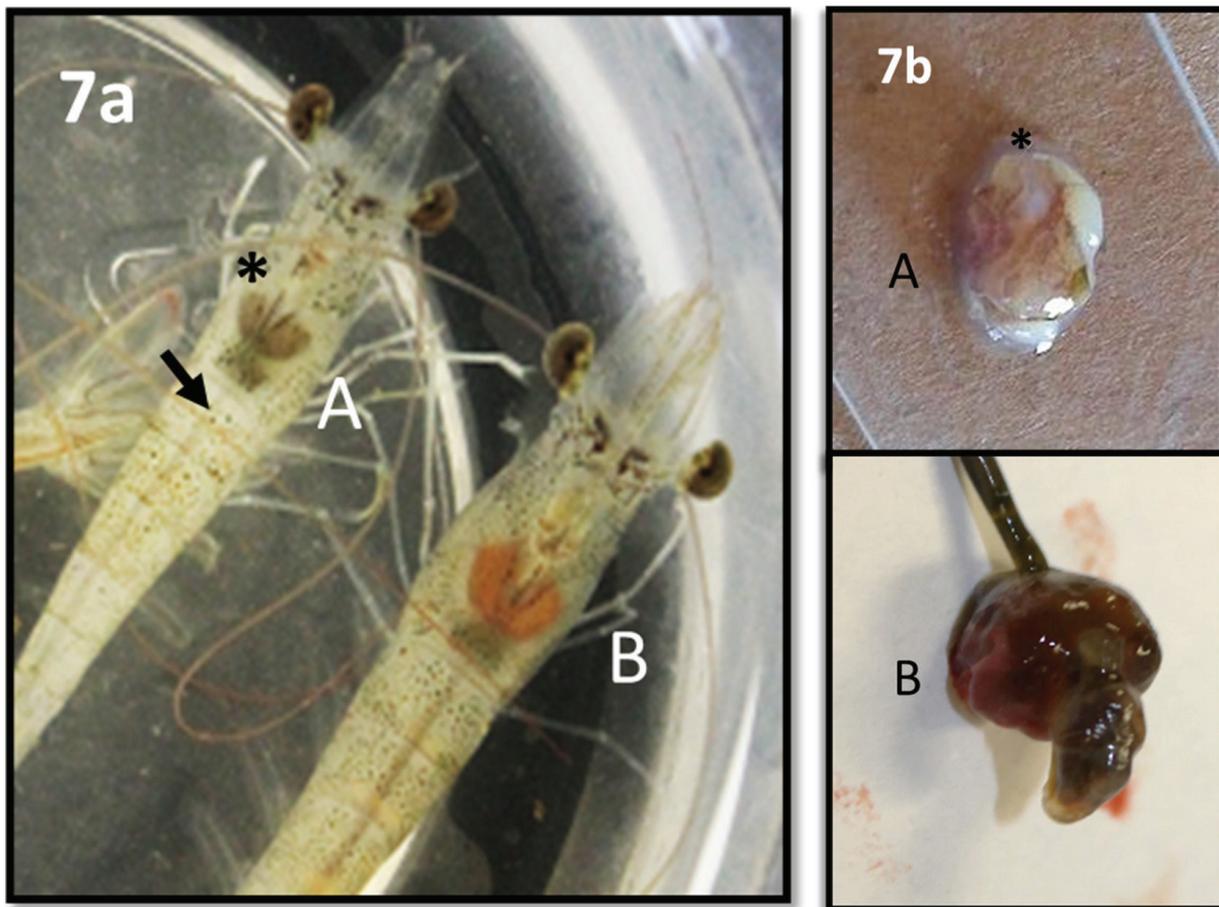


Figura 7. Signos macroscópicos característicos de la infección con las cepas VP-AHPND+. (7a) con Hepatopáncreas pálido (A, asterisco) e intestino vacío (flecha) infectado experimentalmente y (7b) HP pálido (A), disectado para histopatología. Los ejemplares sanos muestran HP rojo, del grupo control y control negativo (B).

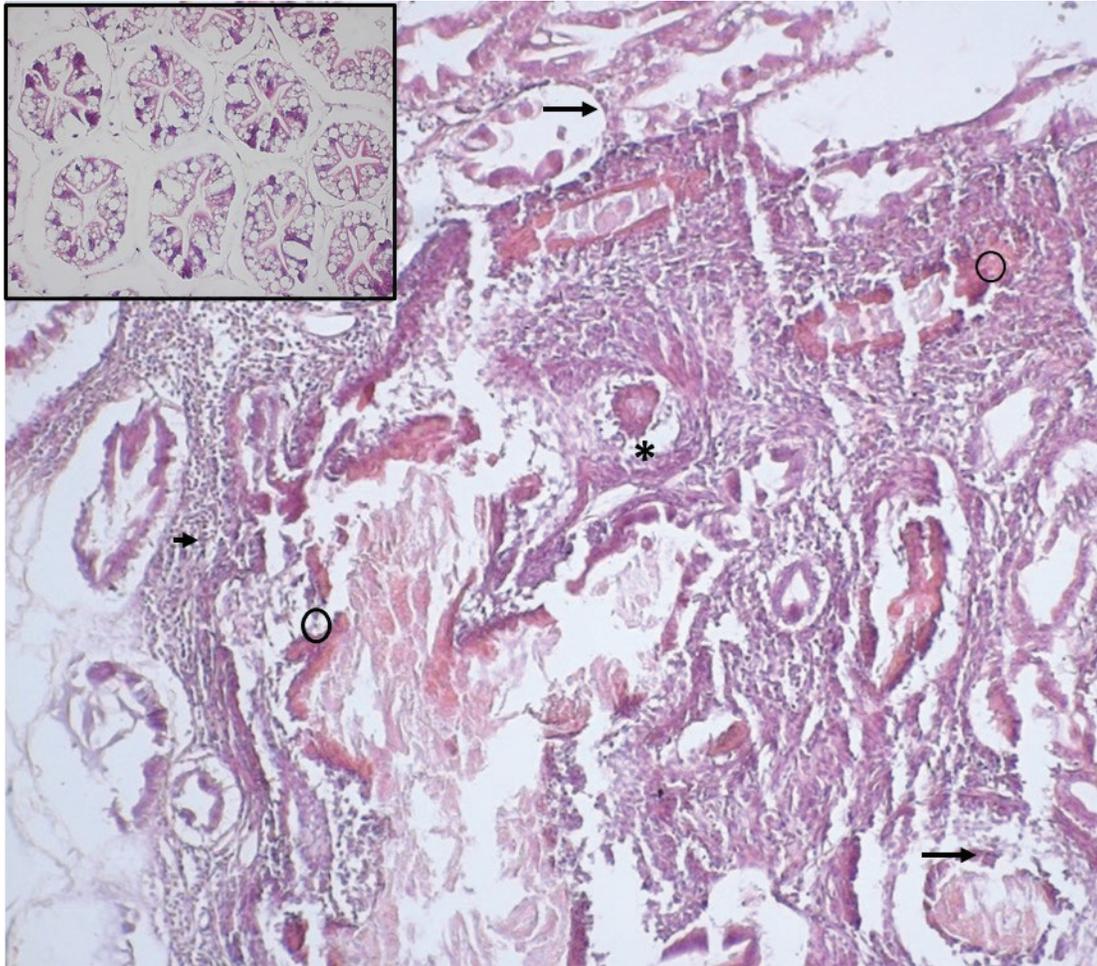


Figura 8. Histopatología del hepatopáncreas (HP) de camarones infectados con VP-AHPND+. Túbulos del HP con infiltración hemocítica (flecha corta), necrosis en epitelio tubular (flecha larga), lumen tubular con masas de bacterias patógenas (*) y lumen con descamación del epitelio de los túbulos del HP (circulo). En el recuadro, corte histológico del control negativo con los túbulos sanos (vacuolas lipídicas y lumen de túbulos libres de infección).

recomendable es minimizar el uso de antibióticos considerado como un último recurso en operaciones de cultivo de camarón. De acuerdo a la Norma Oficial Mexicana de Emergencia NOM-EM-05-PESC-2002 en la camaronicultura nacional, se prohíbe el uso de cloranfenicol y de furazolidona para la prevención y tratamiento de enfermedades y cualquier tratamiento con antibióticos treinta días antes de realizar la cosecha (Chávez-Sánchez & Higuera-Ciapara, 2003).

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca proporcionada para el Doctorado en Ciencias con acentuación en Nutrición y Tecnologías de Alimentos para Organismos Acuáticos para Ariel Robles Valdez. El proyecto fue financiado por INFRA-CONACyT con el proyecto 2015-253336 y CONACyT-FOINS (N° 3157) "Evaluación de la actividad antagonista de bacterias aisladas de ecosistemas marinos contra *Vibrio parahaemolyticus*, agente causal de la enfermedad de la Necrosis Hepatopancreática Aguda (AHPND) en cultivos de camarón".

REFERENCIAS

- ALDAY-SANZ, V., A. ROQUE & J. F. TURNBULL. 2002. Clearing mechanisms of *Vibrio vulnificus* biotype I in the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Diseases of Aquatic Organisms* 48: 91-99. DOI: 10.3354/dao048091.
- ARANGUREN-CARO, L. F., H. N. MAI, B. NOBLE & A. K. DHAR. 2020. Acute hepatopancreatic necrosis disease (VP_{AHPND}), a chronic disease in shrimp (*Penaeus vannamei*) population raised in latin America. *Journal of Invertebrate Pathology* 174: 107424.
- CESASIN (COMITÉ ESTATAL DE SANIDAD ACUÍCOLA DE SINALOA). 2020. Información Sanitaria 2020. Disponible en línea en: <https://cesasin.mx/programa-macrustaceos/#estatsanit> (consultado el 06 enero 2021).
- CLSI (CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE). 2005a. *Methods for Antimicrobial Disk Susceptibility Testing of bacteria isolated from aquatic animals; proposed guideline. CLSI document M42-P*. Clinical and Laboratory Standards Institute, USA. 39 p.

- CLSI (CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE). 2005b. *Methods for broth dilution susceptibility testing of bacteria isolated from aquatic animals; proposed guideline. CLSI document M49-P*. Clinical and Laboratory Standards Institute, USA. 43 p.
- CONAPESCA (COMISIÓN NACIONAL DE PESCA Y ACUICULTURA). 2018. Cultivo de camarón, producción acuícola de calidad. Disponible en línea en: <https://www.gob.mx/conapesca/articulos/cultivo-de-camaron-produccion-acuicola-de-calidad?idiom=es> (consultado el 19 octubre 2018).
- COSAES (COMITÉ DE SANIDAD ACUÍCOLA DEL ESTADO DE SONORA, A.C.). 2017. Informe final sanidad camarón. Disponible en línea en: https://docs.wixstatic.com/ugd/e56b21_b08ea49c19074c97993c9c9622d263f5.pdf (consultado el 15 mayo 2018).
- CHÁVEZ-SÁNCHEZ, C. & I. HIGUERA-CIAPARA. 2003. Manual de buenas prácticas de producción acuícola de camarón para la inocuidad alimentaria. SAGARPA, SENASICA. Mazatlán, México. 97 p.
- DHAR, A. K., P. PIAMSOMBOON, L. F. ARANGUREN-CARO, S. KANRAR, R. ADAMI-JR & Y. S. JUAN. 2019. First report of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) occurring in the USA. *Diseases of aquatic organisms* 132 (3): 241-247.
- DI-PINTO, A., V. TERIO, L. NOVELLO & G. TANTILLO. 2011. Comparison between thiosulphate-citrate-bile salt sucrose (TCBS) agar and CHROMagar Vibrio for isolating *Vibrio parahaemolyticus*. *Food Control* 22: 124-127.
- DONG, X., H. WANG, P. ZOU, J. CHEN, Z. LIU, X. WANG & J. HUANG. 2017. Complete genome sequence of *Vibrio campbellii* strain 20130629003S01 isolated from shrimp with acute hepatopancreatic necrosis disease. *Gut Pathogens* 9 (31): 1-5. DOI: 10.1186/s13099-017-0180-2.
- FAO (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION). 2014. *El estado mundial de la pesca y la acuicultura*. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, Roma. 274 p.
- FLEGEL, T. W. 2012. Historic emergence, impact and current status of shrimp pathogens in Asia. *Journal of Invertebrate Pathology* 110: 166-173.
- FLEGEL, T. W., D. V. LIGHTNER, C. F. LO & L. OWENS. 2008. Shrimp disease control: past, present and future. In: Bondad-Reantaso, M. G., C. V. Mohan, M. Crumlish & R. P. Subasinghe (eds.). *Diseases in Asian Aquaculture VI*. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, Philippines, pp. 355-378.
- GALAVIZ-SILVA, L., J. IRACHETA-VILLARREAL & Z. J. MOLINA-GARZA. 2018. *Bacillus* and *Virgibacillus* strains isolated from three Mexican coasts antagonize *Staphylococcus aureus* and *Vibrio parahaemolyticus*. *FEMS Microbiology Letters* 365: fny202. DOI:10.1093/femsle/fny202
- GARCÍA, F. 2020. Producción de camarón crece para alimentar a México. *Revista Divulgación Acuicola*. Disponible en línea en <http://divulgacionacuicola.com.mx/blog/2020/12/15/produccion-de-camaron-crece-para-alimentar-a-mexico/> (consultado el 8 de enero 2021).
- GOMEZ-GIL, B., L. TRON-MAYÉN, A. ROQUE, J. F. TURNBULL, V. INGLIS & A. L. GUERRA-FLORES. 1998. Species of *Vibrio* isolated from hepatopancreas, haemolymph and digestive tract of a population of healthy juvenile *Penaeus vannamei*. *Aquaculture* 163:1-9.
- GONZÁLEZ-GÓMEZ, J. P., S. SOTO-RODRIGUEZ, O. LÓPEZ-CUEVAS, N. CASTRO DEL CAMPO, C. CHAIDEZ & B. GOMEZ-GIL. 2020. Phylogenomic analysis supports two possible origins for Latin American Strains of *Vibrio parahaemolyticus* associated with Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND). *Current Microbiology* 77 (12): 3851-3860. DOI:10.1007/s00284-020-02214-w.
- HAN, J. E., L. L. MOHNEY, K. F. J. TANG, C. R. PANTOJA & D. V. LIGHTNER. 2015. Plasmid mediated tetracycline resistance of *Vibrio parahaemolyticus* associated with acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in shrimps. *Aquacultur Reports* 2:17-21. DOI:10.1016/j.aqrep.2015.04.003
- HASTUTI, M. S. & DESRINA. 2016. Current status of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) and other transboundary diseases of farmed shrimps in Indonesia. In: Pakingking-Jr, R. V. E., G. T. de Jesus-Ayson & B. O. Acosta (eds.). *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*. Southeast Asian Fisheries Development Center Aquaculture Department Tigbauan, Iloilo, Makati City, Philippines, pp. 37-43.
- JOSHI, J., J. SRISALA, V. H. TRUONG, I. T. CHEN, B. NUANGSAENG, O. SUTHIENKUL, C. F. LO, T. W. FLEGEL, K. SRITUNYALUCKSANA & S. THITAMADEE. 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.
- KONDO, H., S. TINWONGGER, P. PROESPRAIWONG, R. MAVICHAK, S. UNAJAK, R. NOZAKI & I. HIRONO. 2014. Draft genome sequences of six strains of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from early mortality syndrome/acute hepatopancreatic necrosis disease shrimp in Thailand. *Genome Announcements* 2: e00221-14
- LIGHTNER, D. V. 2011. Virus diseases of farmed shrimp in the Western Hemisphere (The Americas). *Journal of Invertebrate Pathology* 106: 110-130.
- LIGHTNER, D. V. & R. M. REDMAN. 1998. Shrimp diseases and current diagnostic methods. *Aquaculture* 164: 201-220.
- LIGHTNER, D.V., R. M. REDMAN, C. R. PANTOJA, B. L. NOBLE & L. TRAN. 2012. Early mortality syndrome affects shrimp In Asia. *Global Aquaculture Advocate*. January/February 15(1): 40.
- LIU, L., J. XIAO, X. XIA, Y. PAN, S. YAN & Y. WANG. 2015. Draft genome sequence of *Vibrio owensii* strain SH-14, which causes shrimp acute hepatopancreatic necrosis disease. *Genome Announcements* 3(6):e01395-15.
- NOM-EM-05-PESC-2002 (NORMA OFICIAL MEXICANA). 2002. Que establece los requisitos y medidas para prevenir y controlar la dispersión de enfermedades de alto impacto y para el uso y aplicación de antibióticos en la camaronicultura nacional. Diario Oficial de la Federación. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación México, D.F. Julio 19.
- NOM-230-SSA1-2002 (NORMA OFICIAL MEXICANA). 2002. Salud ambiental. Agua para uso y consumo humano. Requisitos sanitarios que se deben cumplir en los sistemas de abastecimiento públicos y priva-

- dos durante el manejo del agua. Procedimientos sanitarios para el muestreo. Disponible en línea en: <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/230ssa102.html> (consultado el 18 agosto 2018).
- MATSHEKA, M. I., A. J. LASTOVICA, H. ZAPPE & B. G. ELISHA. 2005. The use of (GTG)₅ oligonucleotide as an RAPD primer to type *Campylobacter concisus*. *Letters in Applied Microbiology* 42: 600-605.
- MUTHUKRISHNAN, S., T. DEFOIRD, M. Y. INA-SALWANYA, F. M. YUSOFF, M. SHARIFF, S. I. ISMAIL & I. NATRAH. 2019. *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio harveyi* causing Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND) in *Penaeus vannamei* (Boone, 1931) isolated from Malaysian shrimp ponds. *Aquaculture* 511: 734227. DOI:10.1016/j.aquaculture.2019.734227
- OIE (OFICINA INTERNACIONAL DE EPIZOOTIAS). 2013. Capítulo 1.4. Vigilancia de la Sanidad de los Organismos Acuáticos. Código Sanitario para los Animales Acuáticos. Disponible en línea en: <http://www.oie.int/es/normas-internacionales/codigo-acuatico/acceso-en-linea/> (consultado el 24 julio 2018).
- RESTREPO, L., B. BAYOT, S. ARCINIEGAS, L. BAJAÑA, I. BETANCOURT, F. PANCHANA & A. REYES-MUÑOZ. 2018. PirVP genes causing AHPND identified in a new *Vibrio* species (*Vibrio punensis*) within the commensal Orientalis clade. *Scientific reports* 8: 13080. DOI:10.1038/s41598-018-30903-x
- RIVAS, R., E. VELAZQUEZ, J. L. ZURDO-PIÑEIRO, P. F. MATEOS & E. MOLINA. 2004. Identification of microorganisms by PCR amplification and sequencing of a universal amplified ribosomal region present in both prokaryotes and eukaryotes. *Journal of Microbiological Methods* 56: 413-426. DOI:10.1016/j.mimet.2003.11.007
- RORTANA, C., W. WAJJWALKU, V. BOONYAWIWAT, C. HRIANPREECHA, S. THONGRATSAKUL & P. AMAVISIT. 2018. Antimicrobial resistance and pirAB-like profiles of *Vibrio parahaemolyticus* in Pacific white shrimp. *Agriculture and Natural Resources* 54: 377-381. DOI:10.1016/j.anres.2018.10.010
- SANTIAGO, H., A. ESPINOSA & M. C. BERMÚDEZ. 2009. Uso de antibióticos en la camaronicultura. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas* 40: 22-32.
- SAITOU, N. & M. NEI. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees MEGA 7. *Molecular Biology and Evolution* 4: 406-425.
- SENASICA (SERVICIO NACIONAL DE SANIDAD, INOCUIDAD Y CALIDAD AGROALIMENTARIA). 2014. Conferencia: "Síndrome de la mortalidad temprana (EMS) del camarón". Disponible en línea en: <https://www.gob.mx/senasica/prensa/conferencia-sindrome-de-la-mortalidad-temprana-ems-del-camaron> (consultado el 06 enero 2021).
- SIRIKHARIN, R., S. TAENGCHAIYAPHUM, P. SANGUANRUT, T. D. CHI, R. MAVICHAK, P. PROESPAIWONG, B. NUANGSAENG, S. THITAMADEE, T. W. FLEGEL & K. SRITUNYALUCKSANA. 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. DOI:10.1371/journal.pone.0126987
- SOTO-RODRIGUEZ, S. A., B. GOMEZ-GIL & R. LOZANO. 2010. Density of *Vibrios* in hemolymph and hepatopancreas of diseased pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, from Northwestern Mexico. *Journal of the World Aquaculture Society* 41: 76-83
- SOTO-RODRIGUEZ, S. A., B. GOMEZ-GIL, R. LOZANO-OLVERA, M. BETANCOURT-LOZANO & M. S. MORALES-COVARRUBIAS. 2015. Field and experimental evidence of *Vibrio parahaemolyticus* as the causative agent of acute hepatopancreatic necrosis disease of cultured shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in northwestern Mexico. *Applied Environmental Microbiology* 81:1689-1699. DOI:10.1128/AEM.03610-14
- TRAN, L., L. NUNAN, R. M. REDMAN, L. L. MOHNEY, C. R. PANTOJA, K. FITZSIMMONS & D. V. LIGHTNER. 2013. Determination of the infectious nature of the agent of acute hepatopancreatic necrosis syndrome affecting penaeid shrimp. *Diseases of Aquatic Organisms* 105: 45-55.
- VARELA-MEJÍA, A. & R. ALFARO-MORA. 2018. Revisión sobre aspectos farmacológicos a considerar para el uso de antibióticos en la camaronicultura. *Revista de Investigación en Perú* 29: 1-14. DOI:10.15381/rivep.v29i1.14186
- YANG, Q., X. DONG, G. XIE, S. FU, P. ZOU, J. SUN & J. HUANG. 2019. Comparative genomic analysis unravels the transmission pattern and intra-species divergence of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND)-causing *Vibrio parahaemolyticus* strains. *Molecular Genetics and Genomics* 294: 1007-1022. DOI: 10.1007/s00438-019-01559-7
- YANO, Y., K. HAMANO, M. SATOMI, I. TSUTSUI, M. BAN, D. AUEUMNEOY. 2014. Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Vibrio* species related to food safety isolated from shrimp cultured at inland ponds in Thailand. *Food Control* 38: 30-36.