

## CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE BACTERIAS PATÓGENAS ASOCIADAS A ENFERMEDADES EMERGENTES EN CAMARONES *PENAEUS (LITOPENAEUS) VANNAMEI*

Villacís, M.<sup>a</sup>, Bajaan L.<sup>b</sup>, Betancourt I.<sup>b</sup>, Bayot B.<sup>b,c</sup>, Restrepo L.<sup>b,d\*</sup>

<sup>a</sup> Escuela Superior Politécnica del Litoral, ESPOL, Facultad de Ciencias de la Vida, FCV, Campus Gustavo Galindo Km. 30.5 Vía Perimetral, P. O. Box 09-01-5863, Guayaquil, Ecuador

<sup>b</sup> Escuela Superior Politécnica del Litoral, ESPOL, Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas, CENAIM, Campus Gustavo Galindo Km. 30.5 Vía Perimetral, P. O. Box 09-01-5863, Guayaquil, Ecuador

<sup>c</sup> Escuela Superior Politécnica del Litoral, ESPOL, Facultad de Ingeniería Marítima, Ciencias Biológicas, Oceánicas y Recursos Naturales, FIMCBOR, Campus Gustavo Galindo Km. 30.5 Vía Perimetral, P. O. Box 09-01-5863, Guayaquil, Ecuador

<sup>d</sup> Departamento de Ciencias Biológicas, Universidad de los Andes, Bogotá, Colombia

### Resumen

Actualmente, la enfermedad más emergente que golpea mundialmente al cultivo del camarón es la enfermedad de la necrosis hepatopancreática aguda (AHPND), de etiología bacteriana. Las cepas de *Vibrio* spp. positivas para AHPND presentan dos genes localizados en un plásmido que codifican para las toxinas PirA y PirB-like, letales para camarones. El plásmido presenta dos regiones variables, asociadas a la localidad geográfica de origen de los aislados. Una de estas regiones es el transposón tn3-like, reportado en las cepas aisladas en México y no reportado en las cepas de origen asiático. El objetivo de este estudio fue genotipar los aislados bacterianos ecuatorianos positivos a AHPND, por medio de la detección del transposón tn3-like y, determinar mediante pruebas de desafío la relación con virulencia. Muestras de hepatopáncreas de camarones juveniles *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* con signos clínicos de AHPND y de agua fueron colectadas en el 2015 (n = 130), en 53 estanques provenientes de 12 localidades de las provincias de Esmeraldas, Manabí, Santa Elena, Guayas y El Oro. La detección de AHPND se realizó con análisis de PCR anidado, utilizando los iniciadores AP4-F/R. Una muestra (n = 39) de los aislados bacterianos positivos a AHPND fueron categorizados molecularmente, determinando que el 44, 5 y 23 % de los aislados resultaron positivos para los genotipos de México, Asia y genotipo combinado Asia-México, respectivamente, sugiriendo que la introducción de AHPND al Ecuador provino de al menos dos orígenes geográficos distintos. Las pruebas de desafío de camarones (~ 3 g) con aislados bacterianos puros que presentaron los 3 genotipos, mostraron una mortalidad diferencial, lo cual podría estar explicado por el genotipo. Se encontró que las cepas asociadas al genotipo de México presentaron mayores mortalidades acumuladas y menores supervivencias durante el periodo completo de desafío. Este es el primer reporte de genotipado de AHPND en Ecuador y el primer reporte de aislados bacterianos con la característica de genotipos combinado Asia-México.

**Palabras claves:** AHPND/EMS, genotipificación, *Vibrio* spp., plásmido de virulencia, toxinas pirA y pirB-like, transposón Tn3-like, variación geográfica.

## Abstract

Nowadays, the most emerging shrimp-farming disease that hit the world-wide aquaculture industry is the acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND), of bacterial etiology. *Vibrio* spp. AHPND-positive strains has two genes located in a large plasmid that encode the PirA and PirB-like toxins, lethal for shrimps. This plasmid has two variable regions, related with the geographic location of the bacterial origin. One of this genomic variation is the tn3-like transposon, reported in the Mexican isolates, but absent in the Asian isolates. In this study, we genotyped AHPND-positive bacterial isolated in Ecuador, by the detection of the tn3-like transposon, and determining their relationship with virulence. Hepatopancreas shrimp samples of juvenile *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* with AHPND clinical signs and water were collected in 2015 (n = 130) in 53 ponds from 12 locations of Esmeraldas, Manabí, Santa Elena, Guayas and El Oro provinces. The AHPND detection was analyzed with nested PCR, using AP4 F/R primers. A sample (n = 39) of the bacterial isolates of AHPND-positive were characterized by molecular biology analysis. In this form, 44, 5 and 23 % of the isolates were positive for Mexican, Asian and a combined Asian-Mexican genotype, respectively, suggesting that the AHPND introduction in Ecuador came from at least two different geographic origins. The challenge test of shrimp (~ 3 g) using pure bacterial isolates representatives of the three genotypes, showed differential mortalities, which could be explained for the genotype. We found that the bacterial isolates associated with the Mexican genotype showed high accumulate mortalities and low survivals during the whole challenge period. This is the first report of AHPND genotyping in Ecuador and the first report of AHPND bacteria isolate with combined Asia-Mexico genotypes characteristics.

## 1.Introducción

Actualmente, la principal enfermedad emergente que golpea mundialmente a la industria del camarón es el Síndrome de Mortalidad Temprana (EMS), también conocida como enfermedad de la necrosis hepatopancreática aguda (AHPND). Esta enfermedad puede causar hasta el 100% de mortalidad a los pocos días de su aparición (Tran et al., 2013). AHPND fue reportada por primera vez en el año 2009 en China (Tran et al., 2013). En el 2011 se confirmó la presencia de esta enfermedad en Vietnam y Malasia (Lightner et al., 2012). En el 2013, Nunan et al. (2014) determinaron la propagación de AHPND al hemisferio occidental en regiones de México, y en el 2016 se reportó en Sudamérica una cepa bacteriana patógena de AHPND genómicamente similar a las reportadas en el Sudeste de Asia (Restrepo et al., 2016).

La patología de AHPND está ligada a la necrosis tubular e infiltración hemocítica de células del hepatopáncreas en las dos especies de camarón blanco del pacífico *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* y *Penaeus monodon* (Tran et al., 2013). Las bacterias patógenas asociadas a esta enfermedad emergente han sido identificadas como pertenecientes a la familia Vibrionaceae (Tran et al., 2013). Estas bacterias se encuentran en la microflora intestinal normal de peces y crustáceos acuáticos. Sin embargo, algunas especies de esta familia como *Vibrio anguillarum*, *Vibrio harveyi*, y *Vibrio parahaemolyticus* pueden ser patógenas y causar enfermedades bacterianas graves en la fauna marina (Han et al., 2015).

En las cepas patógenas de *Vibrio parahaemolyticus*, positivas para AHPND, se ha identificado dos genes que codifican un homólogo de la toxina binaria PirA y PirB del insecto relacionado *Photorhabdus* (Yang et al., 2014). Estos genes que se encuentran localizados en un plásmido grande, trabajan en conjunto causando la necrosis hepatopancreática de los camarones infectados (Sritunyalucksana et al., 2015) al secretar las toxinas PirA y PirB-like, letales para los camarones *Penaeus* (Han et al., 2015a).

Los plásmidos de virulencia tienen dos regiones variables, que se han encontrado están asociados a la región geográfica de origen de los aislados bacterianos. Estas regiones son el transposón tn3-like (4243 pb) y una pequeña secuencia repetida (SSR) (Han et al., 2015b). La presencia del transposón se ha reportado en las cepas de *V. parahaemolyticus* AHPND-positivas aisladas de México, mientras que los análisis moleculares de las cepas AHPND-positivas del Sureste de Asia han sido negativas para este transposón (Han et al., 2015b).

Restrepo et al. (2016) identificaron que el plásmido de virulencia de la cepa de *V. parahaemolyticus* reportada en Sudamérica presenta un plásmido grande extracromosomal y genes que codifican para las toxinas PirA y PirB-like, al igual que en todas las cepas reportadas positivas para AHPND (Yang et al., 2014; Han et al., 2015). Sin embargo, la secuenciación genética de esta cepa mostró estar más relacionado con las cepas AHPND de Asia, que con las cepas AHPND de México (Restrepo et al., 2016). Las toxinas PirA y PirB-like encontradas en las cepas aisladas de Sudamérica están ligadas a transposones, sugiriendo que es un elemento móvil intercambiable en diferentes poblaciones de *Vibrios* (Restrepo et al., 2016).

El objetivo de este estudio fue genotipar los aislados bacterianos ecuatorianos positivos a AHPND, por medio de la detección del transposón tn3-like y, determinar la relación entre genotipos y virulencia, mediante pruebas de desafío. Los resultados encontrados son importantes para incrementar el entendimiento de la epidemiología de la enfermedad y para generar hipótesis acerca del origen, evolución y propagación del patógeno. El presente estudio es el primer esfuerzo para caracterizar los genotipos circulantes de la bacteria causante de AHPND en Ecuador.

## **2. Materiales y métodos**

### *2.1 Colección y procesamiento de muestras en campo*

130 muestras de: (1) cultivo enriquecido de aislamientos bacterianos (hepatopáncreas y agua; n = 69), aislados bacterianos puros (n = 57) y ADN de hepatopáncreas congelados (n = 4) fueron colectadas en el 2015, en 53 estanques provenientes de 12 localidades de las provincias de Esmeraldas, Manabí, Santa Elena, Guayas y El Oro (Tabla 1). Las muestras de hepatopáncreas provinieron de camarones juveniles *P. vannamei* con signos clínicos de AHPND (intestino vacío, hepatopáncreas blanquecino o pálido, hepatopáncreas atrofiado, anorexia, letargia o nado errático) y estuvieron conformadas por entre 5 y 10 hepatopáncreas, excepto las muestras de hepatopáncreas congelados que fueron analizados individualmente. Las muestras de hepatopáncreas para el aislamiento bacterianos fueron lavadas en el campo con solución salina estéril al 1%, maceradas y homogeneizadas. A partir de este macerado se realizaron dos diluciones seriadas ( $10^{-1}$ ) con solución salina estéril al 1%. Para el enriquecimiento de las bacterias, 100  $\mu$ l de la segunda dilución fue inoculada en caldo tripticosa soya (TSB, BactoTM, Becton, Dickinson and Company,

Maryland, USA) estéril (llenado a 5 ml). Una vez procesados los cultivos bacterianos en el campo, estos fueron transportados hasta las instalaciones del CENAIM en un tiempo máximo de 24 horas.

**Tabla 1.** Provincias, localidad muestreada, número de estanques muestreados por localidad y detalle del tipo de muestra procesada.

Provincia	Localidad muestreada	Número de estanques muestreados	Aislados bacterianos puros	Cultivo enriquecido de aislamientos bacterianos	ADN de hepatopáncreas congelado
Esmeraldas	Chamanga	1	0	1	0
Manabí	Pedernales	8	40	0	0
	Jama	1	0	1	0
	San Vicente	1	0	1	0
	Bahía	1	0	1	0
Guayas	Tenguel	5	0	7	4
	Isla Josefina	17	3	34	0
	Isla Puná	3	11	8	0
	Isla Las Canoas – Isla Escalante	10	3	8	0
Santa Elena	Palmar	2	0	4	0
	Otros	3	0	3	0
El Oro	Machala/Isla Jambelí	1	0	1	0

## 2.2 Extracción de ADN

Para la extracción de ADN, 1000 µl de cultivo bacteriano fueron centrifugados a 8000 RPM por 2 min. La lisis celular se realizó con 500 µl de buffer de lisis (100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8.0 y 1 mM EDTA). La suspensión se incubó con 75 µl de SDS al 10 % por 2 horas a 55 °C. Posteriormente, se eliminó los residuos proteicos y lipídicos con un proceso de extracción con fenol-cloroformo. Para esto, se realizó una extracción con fenol (600 µl), agitando con vortex, centrifugando a 13000 RPM por 10 min y recuperando el sobrenadante. Posteriormente, se añadió 1 volumen de cloroformo-isoamil 24:1, agitando con vortex y centrifugando a 13000 RPM por 10 min. El sobrenadante fue recuperado y el ADN bacteriano fue precipitado por 4 horas a -20 °C con 2.5 volúmenes de etanol frío al 100 % y 0.5 volúmenes de acetato de amonio a 5M. Para la precipitación de ADN, se centrifugó a 13000 RPM por 15 min, eliminando el sobrenadante. El pellet fue lavado dos veces, con 300 µl de etanol al 70% y centrifugado a 10000 RPM por 5 min, eliminando el sobrenadante. Finalmente, el pellet fue secado a 45°C durante 2 horas y re-suspendido en 50 µl de agua Mili-Q.

## 2.3 Detección de AHPND en aislados bacterianos

La detección de AHPND en las 130 muestras se realizó con análisis de PCR anidado, utilizando los iniciadores AP4-F/R desarrollados por Sritunyalucksana et al. 2015 (Tabla 2), que amplifican el 100% de la secuencia del gen *pirA* y el 70% de la secuencia del gen *pirB*, en el plásmido VpA1, presente en *Vibrio* spp. La mezcla de reacción del primer paso de PCR contuvo: buffer PCR (1x), MgCl<sub>2</sub> (3 mM), dNTPs (0.2 mM), iniciadores (0.2 µM), 0.15 U de Taq DNA polimerasa (Invitrogen®), agua Milli-Q y 1 µl de ADN extraído. La mezcla de la reacción del segundo paso de PCR fue igual a la del primer paso, variando en la concentración de los iniciadores y de la Taq

DNA polimerasa (Invitrogen ®) utilizando 0.15 µM y 0.1 U, respectivamente. Las condiciones de amplificación usadas para la detección de AHPND son resumidas en la Tabla 2. Las amplificaciones se realizaron en un termociclador Applied Biosystems. Las alícuotas de los productos de PCR fueron verificados con electroforesis en un gel de agarosa del 1.5% (100 V, por 30 min), conteniendo buffer TBE y suplementado con SYBR® Safe (Invitrogen). La visualización de los productos amplificados se realizó con un trans-iluminados con luz ultravioleta.

#### *2.4 Caracterización molecular de aislamientos bacterianos*

Una muestra (n = 39) de los aislados bacterianos positivos a AHPND fueron categorizados molecularmente, como de tipo mexicano y/o asiático, en base a la presencia o ausencia del transposón Tn3-like, siguiendo la metodología sugerida por Han et al. (2015 b), con los iniciadores MX-345F/R y Asia-482F/R (Tabla 2). El iniciador MX-345F/R amplifica una región corta de 345 pb que incluye la parte inicial de la secuencia del transposón Tn3-like, en el plásmido de la cepa M0605 de origen mexicano; mientras que el iniciador Asia-482F/R amplifica una región de 482 pb, fuera del transposón Tn3-like, dentro del ORF4 del plásmido pVPA3-1 de origen vietnamita. Las condiciones de amplificación están resumidas en la Tabla 2. La mezcla de reacción de PCR contuvo: buffer PCR (1x), MgCl<sub>2</sub> (2.5 mM), dNTPs (0.2 mM), iniciadores (0.2 µM), 0.15 U de Taq DNA polimerasa (Invitrogen ®), agua Milli-Q y ADN extraído. Las condiciones de amplificación son resumidas en la Tabla 2. Las amplificaciones se realizaron en un termociclador Applied Biosystems. Las alícuotas de los productos de PCR fueron verificados con electroforesis en un gel de agarosa del 1.5% (100 V, por 30 min), conteniendo buffer TBE y suplementado con SYBR® Safe (Invitrogen). La visualización de los productos amplificados se realizó con un trans-iluminados con luz ultravioleta.

#### *2.3 Confirmación de genes de virulencia en aislados bacterianos*

Previo al análisis de virulencia, los aislados bacterianos que fueron caracterizados molecularmente con los iniciadores MX-345F/R y Asia-482F/R pasaron por un último proceso de confirmación de la presencia de los genes de virulencia, usando los iniciadores VpirA-284F/R y VpPirB-392F/R (Han et al., 2015 a), que amplifican en forma individual los genes pirA y pirB, respectivamente (Tabla 2). La mezcla de reacción de PCR contuvo: buffer PCR (1x), MgCl<sub>2</sub> (0.6 mM), dNTPs (0.2 mM), iniciadores (0.2 µM), 0.1 U de Taq DNA polimerasa (Invitrogen ®), agua Milli-Q y ADN extraído. Las condiciones de amplificación son resumidas en la Tabla 2. Las amplificaciones se realizaron en un termociclador Applied Biosystems. Las alícuotas de los productos de PCR fueron verificados con electroforesis en un gel de agarosa del 1.5% (100 V, por 30 min), conteniendo buffer TBE y suplementado con SYBR® Safe (Invitrogen). La visualización de los productos amplificados se realizó con un trans-iluminados con luz ultravioleta.

**Tabla 2.** Iniciadores y condiciones de amplificación utilizados para la detección y caracterización molecular de las cepas positivas para AHPND.

Uso	Nombre del iniciador		Secuencia 5'-3'	Condiciones de amplificación			Tamaño del amplicón (pb)	Referencia
				Inicial	Amplificación	Final		
Detección de AHPND	AP4 (Primer paso)	AP4-F1	ATGAGTAACAATATAAAACATGAAAC	94 °C, 2 min	30 ciclos: 94 °C por 30 seg, 55 °C por 30 seg, 72 °C por 90 seg	72 °C por 2 min	1269	(Sritunyalucksana et al., 2015)
		AP4-R1	ACGATTTTCGACGTTCCCAA					
	AP4 (Segundo paso)	AP4-F2	TTGAGAATACGGGACGTGGG	94 °C, 2 min	20 ciclos: 94 °C por 20 seg, 55 °C por 20 seg, 72 °C por 20 seg	72 °C por 2 min	230	
		AP4-R2	GTTAGTCATGTGAGCACCTTC					
Caracterización molecular de AHPND	MX-345	MX-345F	TACCAGCTCTAACAAGGCCA	94 °C, 3 min	35 ciclos: 94 °C por 30 seg, 58 °C por 30 seg, 72 °C por 30 seg	72 °C por 7 min	345	(Han et al., 2015b)
		MX-345R	AACGTT CCAAGGAGTCGAGT					
	Asia-482	Asia-482F	TGAACCGTTCCTCATGCTCT	94 °C, 3 min	35 ciclos: 94 °C por 30 seg, 58 °C por 30 seg, 72 °C por 30 seg	72 °C por 7 min	482	
		Asia-482R	TCAAAGCAGCCCAGACAAAC					
Confirmación de presencia de genes de virulencia	VpirA	VpirA-284F	TGACTATTCTCACGATTGGACTG	94 °C, 3 min	35 ciclos: 94 °C por 30 seg, 58 °C por 30 seg, 72 °C por 30 seg	72 °C por 7 min	284	(Han et al., 2015a)
		VpirA-284R	CACGACTAGCGCCATTGTTA					
	VpirB	VpirB-392F	TGATGAAGTGATGGGTGCTC	94 °C, 3 min	35 ciclos: 94 °C por 30 seg, 58 °C por 30 seg, 72 °C por 30 seg	72 °C por 7 min	392	
		VpirB-392R	TGTAAGCGCCGTTAACTCA					

## *2.5 Análisis de virulencia de los aislados bacterianos*

Solamente los aislados bacterianos cuya presencia de genes de virulencia fue confirmada usando los iniciadores VpirA-284F/R y VpPirB-392F/R fueron considerados para el análisis de virulencia, que se determinó mediante pruebas de desafío. Para el efecto, se escogió 2 aislados que amplificaron para los iniciadores del genotipo de AHPND de Asia (Asia-482F/R), 2 aislados que amplificaron para los iniciadores del genotipo de AHPND de México (MX-345F/R) y 2 de los aislados que amplificaron tanto para los iniciadores del genotipo de Asia, como para los del genotipo de México. Adicionalmente, se utilizó como control positivo, el aislado bacteriano Ba94C2 positivo para AHPND (Restrepo et al. 2016), que ha sido utilizado por CENAIME en varias pruebas de desafío. Así, la prueba de desafío se realizó con 7 aislados bacterianos (6 tratamientos y 1 control positivo).

### *2.5.1 Protocolo de activación y crecimiento de aislados bacterianos*

La activación y crecimiento de los aislados bacterianos utilizados en la prueba de desafío se realizó en forma igual para los 7 aislados bacterianos. Las bacterias fueron activadas en agar TSA con 2% de cloruro de sodio, mediante siembra por extensión en agar, e incubadas por 24 horas a 28 °C, antes de ser transferidas de forma individual a medio líquido soya tripticaseína, que contenía 20 g/L de cloruro de sodio (TSB20). Después de cuatro horas de incubación se registró cada hora la concentración a 620 nm, empleando un espectrofotómetro (Varioskan™ LUX multimode microplate reader, Thermo Fisher Scientific) para obtener la concentración de bacterias de  $5.5 \times 10^8$  UFC/mL (DO620 ~ 0.5). Paralelamente, se realizó una siembra en placas TSA, suplementadas con 2% de ClNa, para corroborar las unidades formadoras de colonia (UFC) por mililitro.

### *2.5.2 Desafío experimental*

Los desafíos se realizaron siguiendo el protocolo de Tran et al. (2013), modificado por Domínguez et al. 2015 (datos no publicados). Brevemente, un total de 1680 camarones (~ 3 g) aclimatados previamente por 3 días, fueron sembrados aleatoriamente en 8 tanques de polietileno, conteniendo 400 L de agua de mar filtrada, a razón de 210 camarones por tanque. Adicionalmente, antes de la aclimatación se colectó 6 camarones del lote inicial de animales para el procesamiento histológico y confirmación de ausencia de infección por AHPND. Siete de los tanques se utilizaron para la infección con los correspondientes inóculos bacterianos de los 6 tratamientos infectados con aislados bacterianos positivos a AHPND (Genotipo Asia = tratamientos T2 y T4; Genotipo México = tratamientos T3 y T5; Genotipos Asia-México = tratamientos T1 y T6) y el control positivo. Un tanque adicional fue utilizado como control negativo. Durante la infección, los inóculos bacterianos de los 6 tratamientos y el control positivo fueron adicionados al agua de los correspondientes tanques. Los camarones permanecieron en esta mezcla por 15 min, luego de lo cual fueron transferidos a acuarios de vidrio (unidades experimentales) conteniendo 40 L de agua de mar filtrada e inóculo bacteriano de  $5.5 \times 10^6$ , a razón de 35 camarones por acuario. Se realizó igual procedimiento con el control negativo, al que no se le inoculó ninguna suspensión bacteriana. En total, se utilizó 6 réplicas para cada tratamiento, control positivo y control negativo, para un

total de 48 unidades experimentales. El diseño experimental del desafío fue completamente aleatorio, con las réplicas de los tratamientos siendo asignadas aleatoriamente a los 48 acuarios. El experimento tuvo una duración de 5 días (= 120 horas), realizándose observación de mortalidad cada 2 horas en los primeros 4 días post-infección, y cada 4 horas en el día 5 post-infección. La calidad de agua se mantuvo durante los 5 días post-infección con abastecimiento de aire constante y recambios diarios del 50% con agua de mar filtrada. La cantidad de alimento suministrada durante los 5 días del desafío fue del 2% de la biomasa de camarones en cada acuario.

### *2.5.3 Verificación de la infección*

Durante el desafío se colectó en forma aleatoria muestras de camarones moribundos, para análisis individual de histología y confirmación posterior de la condición de afectación por AHPND. Estos camarones fueron preservados con solución Davidson AFA (alcohol, formalina, y ácido acético glacial) y los tejidos fueron procesados siguiendo los procedimientos descritos Bell & Lightner (1988), con secciones de tejidos cortadas a 5 mm y teñidos con hematoxilina y eosina Mayer Bennet (H & E). Los tejidos fueron examinados para observación de cambios histopatológicos.

### *2.5.4 Análisis de datos de la virulencia*

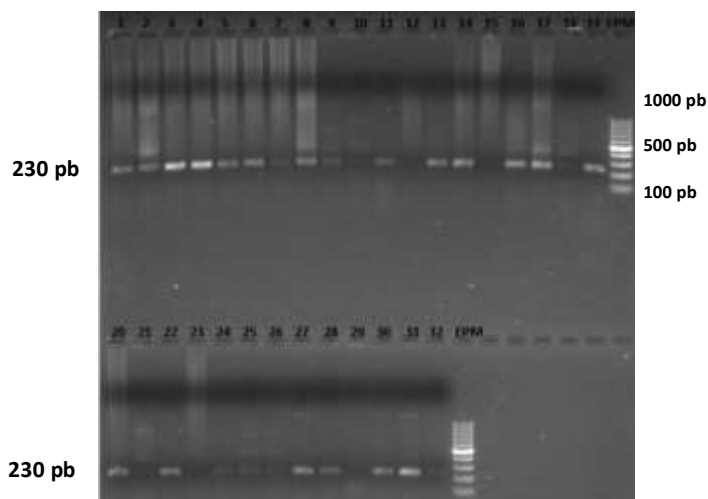
Las mortalidades acumuladas a los 5 días post-infección fueron analizadas mediante el análisis de varianza (ANOVA) de una vía, a un nivel de confianza de 95% para determinar diferencias entre tratamientos. Se verificó las asunciones de normalidad (Prueba de Kolmogorov-Smirnov) y homogeneidad de varianzas (Prueba de Bartlett). En base a este análisis, la mortalidad fue transformada a  $\ln [\sqrt{\text{arcseno}(x)}]$  para homogeneizar las varianzas. La prueba de Tukey fue usada para comparar las medias de los tratamientos cuando la prueba de ANOVA mostró resultados con significancia estadística. Adicionalmente, se realizó un análisis de supervivencias de Kaplan-Meier para estimar diferencias significativas en los tiempos promedios de supervivencia para el periodo completo de 5 días de infección, para los 6 tratamientos infectados. En este análisis, se utilizó la prueba de Breslow para contrastar la hipótesis nula de igual distribución de supervivencia entre tratamientos. Los efectos de los tratamientos (ANOVA), diferencias en la mortalidad acumulada entre tratamientos (Prueba de Bartlett) y diferencia en las distribuciones de supervivencia entre tratamientos (Análisis de supervivencia) fueron considerados significativos a  $p < 0.05$ . El análisis de datos se realizó con el software SPSS.

## **3. Resultados**

### *3.1 Detección, caracterización molecular de aislados bacterianos por PCR y confirmación de detección de genes de virulencia*

Sesenta y ocho muestras de las 130 analizadas resultaron positivas a AHPND, usando los iniciadores AP4-F/R (Figura 1).



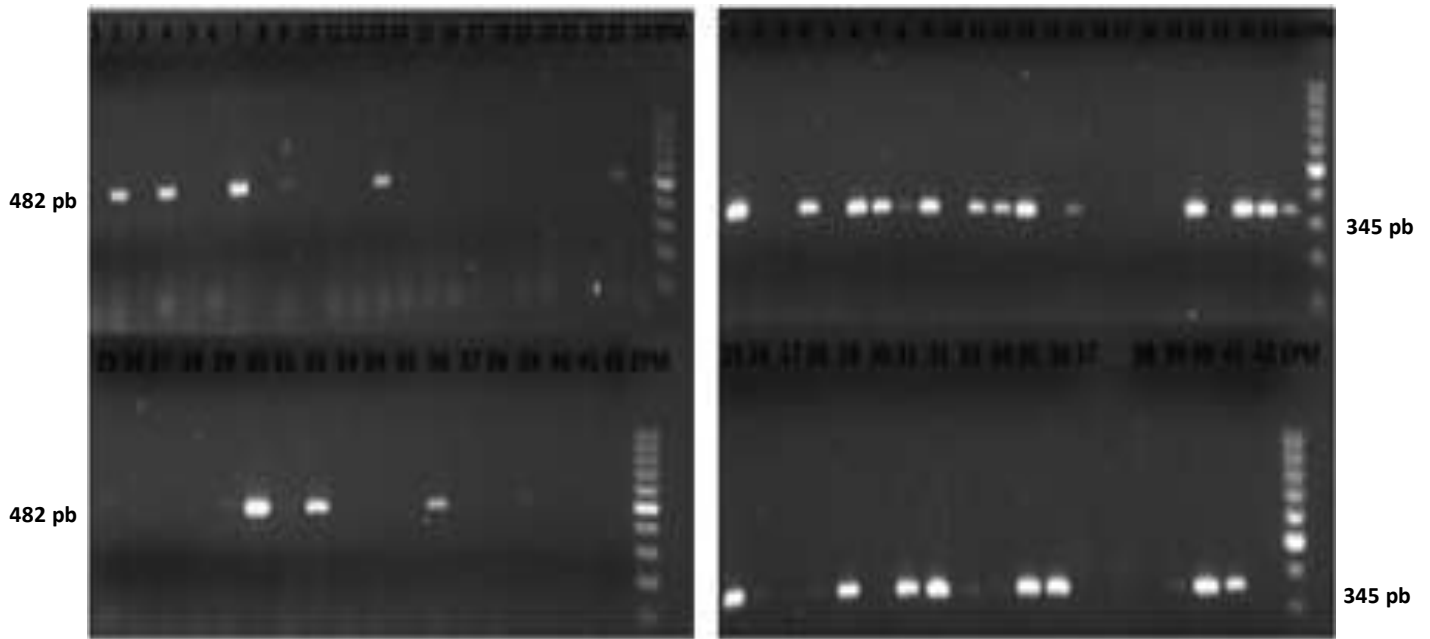


**Figura 1.** Detección de la enfermedad de la necrosis hepatopancreática aguda (AHPND) de aislados bacterianos en muestras colectadas en el Ecuador en el 2015. La figura muestra los productos amplificados (230 pb) del segundo paso de PCR, usando los iniciadores AP4-F/R (Sritunyalucksana et al., 2015).

De las 39 muestras seleccionadas para la caracterización molecular de AHPND, el 44 % (17/39) resultó positivo para el genotipo de México (genotipo M), mientras que el 5 % (2/39) resultó positivo para el genotipo de Asia (genotipo A), y el 23 % (9/39) mostró características moleculares de ambos genotipos (Tabla 3 y Figura 2).

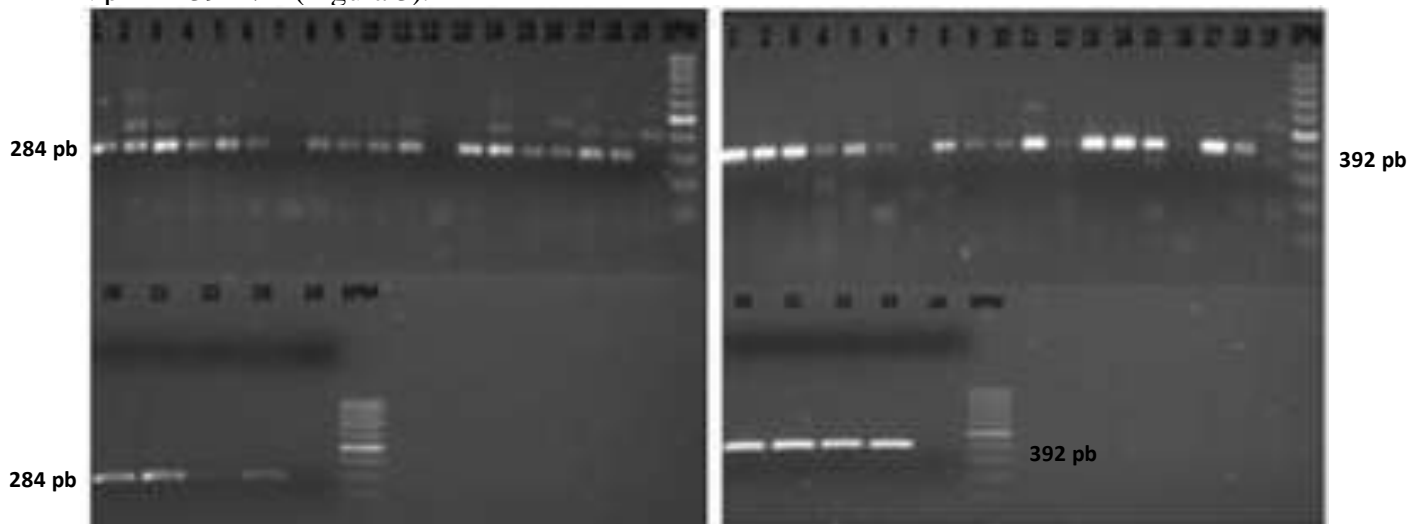
**Tabla 3.** Resultados del análisis de PCR a 39 muestras, utilizando los iniciadores del genotipo de AHPND de Asia (Asia-482F/R) y de México (MX-345F/R)

		Iniciadores MX-345F/R		Total de muestras
		Número de muestras Positivas	Número de muestras Negativas	
Iniciadores Asia-482F/R	Número de muestras Positivas	9	2	11
	Número de muestras Negativas	17	11	28
Total de muestras		26	13	39



**Figura 2.** Caracterización molecular de los aislados bacterianos ecuatorianos positivos a AHPND en base a la región variable del plásmido de *Vibrio* spp. donde se encuentra un transposón Tn3-like. **Izquierda:** Aislados bacterianos que amplificaron una región de 482 pb, fuera del transposón Tn3-like, dentro del ORF4 del plásmido pVPA3-1 de origen vietnamita (Genotipo de AHPND de Asia). **Derecha:** Aislados bacterianos que amplificaron una región de 345 pb, que incluye la parte inicial de la secuencia del transposón Tn3-like, en el plásmido de la cepa M0605 de origen mexicano (Genotipo de AHPND de México).

Veinte y un aislados bacterianos de los 28 que resultaron positivos para al menos un genotipo, resultaron positivos para los genes de virulencia utilizando los iniciadores VpirA-284F/R y VpPirB-392F/R (Figura 3).



**Figura 3.** Confirmación de la presencia de los genes de virulencia en los aislados bacterianos.

**Izquierda:** Amplificación del gen *pirA* mostrando productos amplificados de 284 pb. **Derecha:** Amplificación del gen *pirB* mostrando un producto amplificado de 392 pb.

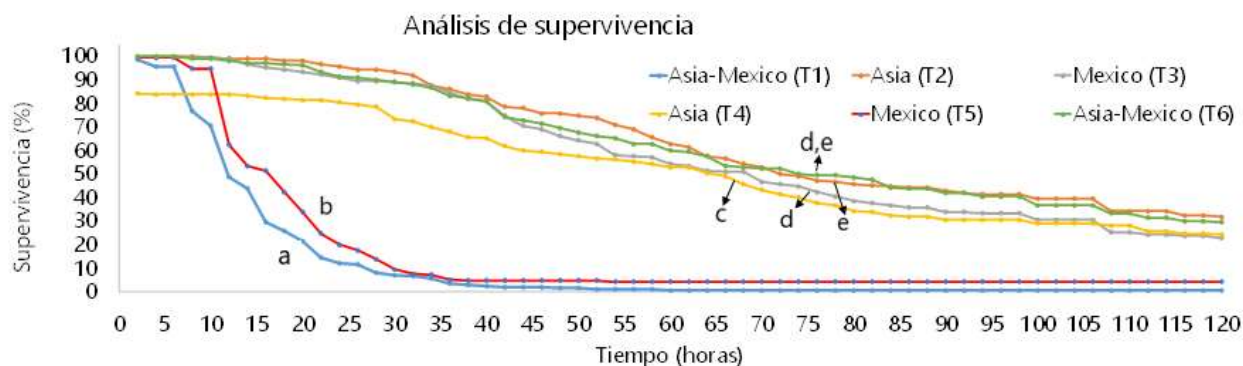
### 3.2 Análisis de virulencia de aislados bacterianos

A los 5 días post-infección, todos los tratamientos mostraron una mortalidad superior al 68 %, donde las mortalidades de los tratamientos T1 y T5 fueron significativamente superiores a las reportadas en los tratamientos T2, T3, T4 y T6 ( $p < 0.001$ ). No se encontró diferencias estadísticas en mortalidad entre los tratamientos T1 y T5 ( $p = 0.98$ ) (Tabla 4). Tampoco se encontró diferencias significativas en la mortalidad de los tratamientos T2, T3, T4 y T6 ( $p > 0.571$ ) (Tabla 4).

**Tabla 4.** Mortalidad acumulada a los 5 días post-infección observada en la prueba de desafío con los aislados bacterianos caracterizados molecularmente como: genotipo Asia, genotipo México y genotipo Asia-México. Se reporta la media  $\pm$  desviación estándar (DE). Los promedios indicados con diferentes letras son significativamente diferentes a  $p < 0.05$ , basado en análisis de varianza de una vía.

Tratamiento	Genotipo	Mortalidad a los 5 días post-infección (%)
T1	Asia - México	99.5 $\pm$ 1.2 b
T2	Asia	68.1 $\pm$ 12.0 a
T3	México	77.1 $\pm$ 8.7 a
T4	Asia	75.7 $\pm$ 12.9 a
T5	México	95.7 $\pm$ 10.5 b
T6	Asia - México	70.5 $\pm$ 6.4 a

Se encontró diferencias significativas entre tratamientos en el tiempo promedio de supervivencia durante los 5 días post-infección ( $p < 0.001$ ), siendo los tiempos de supervivencias promedios (media  $\pm$  desviación estándar) de los animales del tratamiento T1 significativamente inferior al del resto de los tratamientos ( $p < 0.001$ ) (Figura 4 y Tabla 5). En igual sentido, el tiempo de supervivencia promedio de los animales del tratamiento T5 fue significativamente inferior al reportado en los tratamientos T2, T3, T4 y T6 ( $p < 0.001$ ) (Figura 4 y Tabla 5). Mientras que, el tiempo de supervivencia promedio de los animales del tratamiento T4 fue significativamente inferior al reportado en los tratamientos T3, T6 y T2 ( $p < 0.041$ ) (Figura 4 y Tabla 5). No se encontró diferencias significativas en el tiempo de supervivencia entre los tratamientos T3 y T6 ( $p = 0.208$ ), ni entre los tratamientos T2 y T6 ( $p = 0.477$ ) (Figura 4 y Tabla 5). El tratamiento T3 presentó un tiempo de supervivencia promedio significativamente menor comparado con el tratamiento T2 ( $p = 0.045$ ) (Figura 4 y Tabla 5). La figura 4 muestra la curva de supervivencia acumulada para los cinco tratamientos infectados. El control positivo presentó una mortalidad acumulada a los 5 días post-infección igual a  $82.9 \pm 10.1$  %.



**Figura 4.** Supervivencia (media  $\pm$  desviación estándar) acumulada en los tratamientos infectados durante el tiempo completo de infección de 5 días (120 horas). Las curvas indicadas con diferentes letras señalan distribuciones de supervivencia significativamente diferentes a  $p < 0.05$ , basado en análisis de supervivencia de Kaplan-Meier.

**Tabla 5.** Supervivencia promedio durante el periodo completo de 5 días de infección de la prueba de desafío. Se reporta la media  $\pm$  desviación estándar (DE). Los promedios indicados con diferentes letras son significativamente diferentes a  $p < 0.05$ , basado en análisis de supervivencias de Kaplan-Meier.

Tratamiento	Genotipo	Tiempo promedio de supervivencia durante los 5 días de infección (horas)
T1	Asia - México	16.1 $\pm$ 0.8 a
T5	México	22.3 $\pm$ 1.5 b
T4	Asia	64.5 $\pm$ 2.9 c
T3	México	72.9 $\pm$ 2.4 d
T6	Asia - México	77.6 $\pm$ 2.5 d, e
T2	Asia	79.8 $\pm$ 2.4 e

Los camarones moribundos presentaron desprendimiento de las células epiteliales tubulares del hepatopáncreas, con infiltración hemocítica y necrosis en el hepatopáncreas en grado intermedio y severo. Tales lesiones fueron más severas en los animales moribundos de los tratamientos T1 y T5.

#### 4. Discusión

AHPND ha sido reportado cronológicamente en Asia, México y Suramérica (Tran et al., 2013; Lightner et al., 2012; Nunan et al. 2014 y Restrepo et al., 2016). Han et al. (2015b) encontraron que las cepas aisladas en México presentaron el transposón tn3-like; mientras que el transposón estuvo ausente en los aislados provenientes de Asia, variabilidad genómica que ha sido asociado a la región geográfica de origen de las cepas bacterianas. Restrepo et al. (2016), cuando reportó por primera vez para Sudamérica una bacteria causante de AHPND, identificó que la cepa analizada presentaba características genómicas similares a las cepas aisladas en Asia. En el presente estudio, se reporta cepas bacterianas positivas a AHPND con las características moleculares de las cepas aisladas en Asia, confirmando las observaciones de Restrepo et al. 2016. Sin embargo, en el presente estudio, analizando un mayor número de muestras para el mismo sitio geográfico, se reportó adicionalmente, que algunas cepas bacterianas patógenas positivas a AHPND presentaron el transposón tn3-like característico de los aislados mexicanos. Mas aún, en este estudio se encontró que otros aislados bacterianos presentaron una combinación de ambos genotipos asiáticos y mexicanos, lo que sugiere que la introducción de AHPND al Ecuador provino de al menos dos orígenes geográficos distintos. Estos resultados evidencian la presencia de 3 diferentes genotipos circulantes de AHPND en el país, información que es importante para entender la epidemiología de la enfermedad y generar hipótesis acerca del origen y propagación del patógeno.

Los resultados encontrados en este estudio tienen gran importancia para el control transfronterizo de patógenos de especies acuáticas de importancia comercial, dado que el factor que causa mayores pérdidas económicas, por la introducción de patógenos a regiones libres de estos, es el comercio internacional no controlado de animales acuáticos sin control (Alfaro y Guevara, 2012). En particular, la introducción de patógenos emergentes como AHPND puede provocar un alto impacto al bienestar social, a los trabajadores, a la economía de un país, y al mercado internacional (Tran et al., 2013).

El hecho de haber detectado aislados bacterianos con genotipo mixto de Asia-México, lo cual no ha sido reportado en la literatura, sugiere que la bacteria provino originalmente de diferentes localidades geográficas y pudo haber presentado cambios locales o mutó en esta localidad. Esta información es importante para generar hipótesis acerca de la evolución del patógeno. Nuestros resultados podrían ser confirmados mediante un estudio genómico más exhaustivo de análisis de secuencias de las cepas con genotipos distintos. En tal sentido, el hecho de haber encontrado aislados bacterianos que amplificaron para la región de 482 pb, fuera del transposón Tn3-like, dentro del ORF4 del plásmido pVPA3-1 de origen vietnamita, y la región corta de 345 pb que incluye la parte inicial de la secuencia del transposón Tn3-like, en el plásmido de la cepa M0605 de origen mexicano, indica que en estos aislados el transposón se encuentra ubicado en otra región del plásmido. Tal observación deberá ser confirmada posteriormente con análisis de secuenciación de próxima generación (NGS).

Monitoreos de control deberán realizarse para confirmar si existen otros tipos de genotipos circulantes. Este estudio constituye el primer reporte de la existencia de ambos genotipos asiáticos y mexicanos en una misma localidad geográfica y de la existencia de un genotipo combinado Asia-México.

Otro resultado importante de este estudio es que los aislados bacterianos genotípicamente distintos mostraron una mortalidad diferencial en las pruebas de desafío, lo cual podría estar relacionado con diferencias entre los genotipos. Se encontró que las cepas asociadas al genotipo de México presentaron mayores mortalidades acumuladas y menores supervivencias durante el periodo completo de desafío. Bajo este enfoque, una investigación, por ejemplo, de potenciales probióticos, puede usar los distintos aislados bacterianos usados en esta investigación y desafiar los tratamientos a distintas condiciones de virulencia. Un monitoreo que abarque más regiones camaroneras del país podría determinar el genotipo circulante de mayor prevalencia en el país, lo cual podría ser relacionado con una virulencia diferencial.

El presente estudio es el primer esfuerzo para caracterizar los genotipos circulantes de la bacteria causante de AHPND en Ecuador. La información puede ser usada para el desarrollo de métodos de control de la enfermedad, tales como mejoramiento de diagnóstico molecular, utilización de cepas genómicamente distintas en pruebas de desafío para probar potenciales probióticos y otras estrategias de control que incrementen la resistencia o salud del camarón, líneas genéticas resistentes a la enfermedad, entre otros. Este es el primer reporte de aislados y cultivos bacterianos con la característica de genotipos combinados Asia-México.

### **Agradecimientos**

Este trabajo fue financiado por la Secretaría de Educación Superior, Ciencia, Tecnología e Innovación (SENESCYT), en el marco del proyecto de investigación PIC-14-CENAIM-003 “Desarrollo e implementación de métodos de control y prevención de enfermedades en especies acuáticas de uso comercial y uso potencial en maricultura y repoblación”.

### **5. Referencias**

Alfaro R. y Guevara M. (2012). Patógenos introducidos al Perú en post larvas de *Litopenaeus vannamei* importadas. Rev. peru biol. vol.19 no.2 Lima.

Bell T. y Lightner D. (1988). A handbook of normal penaeid shrimp histology. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA.

Han J., Mohny L., Tang K., Pantoja C. y Lightner D. (2015). Plasmid mediated tetracycline resistance *Vibrio parahaemolyticus* associated with acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in shrimps. Aquaculture Reports 2. 17–21.

Han J., Tang K., Tran H. y Lightner D. (2015a). 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. 2015 February 10; 113(1): 33–40. doi:10.3354/dao02830.

Han J., Tang K. y Lightner D. (2015b). Genotyping of virulence plasmid from *Vibrio parahaemolyticus* isolates causing acute hepatopancreatic necrosis disease in shrimp. Dis Aquat Organ Vol. 115: 245–251, 2015 doi: 10.3354/dao02906.

Lightner D., Redman R., Pantoja C., Noble B. y Tran L. (2012). Early mortality syndrome affects shrimp in Asia. *Glob Aquacult Advocate* Jan/Feb 2012: 40.

Nunan L., Lightner D., Pantoja C. y Gomez-Jimenez S. (2014). Detection of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in Mexico. *Dis. Aquat. Organ* 111, 81–86.

Tran L., Nunan L., Redman R., Mohny L., Pantoja C., Fitzsimmons K. y Lightner D. (2013). Determination of the infectious nature of the agent of acute hepatopancreatic necrosis syndrome affecting penaeid shrimp. *Dis Aquat Org* 105: 45–55.

Restrepo L., Bayot B., Betancourt I. y 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, doi: 10.1016/j.gdata.2016.08.00

Sritunyaluksana K., Dangtip S., Sanguanrut P., Sirikharin R., Taengchaiyaphum S., Thitamadee S., Mavichak R., Proespraiwong P. y Fle T. (2015) A two-tube, nested PCR detection method for AHPND bacteria.

Yang Y., Chen I., Lee C., Chen C., Lin S., Hor L., Tseng T., Huang Y., Sritunyaluksana K., Thitamadee S., Wang H., Lo C. (2014). Draft genome sequences of four strains of *vibrio parahaemolyticus*, three of which cause early mortality syndrome/acute hepatopancreatic necrosis disease in shrimp in China and Thailand. *Genome Announc.* 2(5):e00816-14. doi:10.1128/genomeA.00816-14.