

EVALUACIÓN DE LA PATOGENICIDAD DE CEPAS DE *Vibrio* sp. QUE CONTIENEN LOS GENES *pirA* Y *pirB* AISLADOS DE *Penaeus vannamei* DE CULTIVO

EVALUATION OF THE PATHOGENICITY OF *Vibrio* sp. STRAINS CONTAINING THE *pirA* AND *pirB* GENES ISOLATED FROM CULTURED *Penaeus vannamei*

Beder Ramírez¹

Mervin Guevara

Vanessa Montoya

María Serna

RESUMEN

RAMÍREZ B, GUEVARA M, MONTOYA V, SERNA M. 2020. Evaluación de la patogenicidad de cepas de *Vibrio* sp. que contienen los genes *pirA* y *pirB* aislados de *Penaeus vannamei* de cultivo. *Bol Inst Mar Perú*. 35(2): 242-256.- Los vibrios son considerados principales patógenos bacterianos de langostinos. Se han reportado diferentes cepas de *Vibrio parahaemolyticus* que poseen genes *pirA* y *pirB* como causantes de la enfermedad de la necrosis aguda del hepatopáncreas (AHPND). En este trabajo, utilizando muestras de langostinos cultivados en la región Tumbes, se aislaron cinco cepas *V. parahaemolyticus* que son positivas por PCR para los genes *pirA* y *pirB*. Mediante ensayos de infección experimental con cuatro de estas cepas en langostinos de 1,8 ±0,3 g, se logró detectar que dos cepas producen mortalidad y daños histológicos en el hepatopáncreas que son característicos a la AHPND. Sin embargo, también se observó que a pesar que las dos cepas restantes son positivas por PCR para los genes *pirA* y *pirB*, no son patógenas en los langostinos. Estos resultados muestran que las cepas *V. parahaemolyticus* presentes en el cultivo de langostinos de la región Tumbes tienen diferentes patrones de patogenicidad a pesar de ser positivos por PCR para los genes *pirA* y *pirB*, lo que sugiere que existen bacterias con factores adicionales a los genes *pirA* y *pirB* para causar la AHPND.

KEYWORDS: AHPND, experimental infection, histopathology

ABSTRACT

RAMÍREZ B, GUEVARA M, MONTOYA V, SERNA M. 2020. Evaluation of the pathogenicity of *Vibrio* sp. strains containing *pirA* and *pirB* genes isolated from cultured *Penaeus vannamei*. *Bol Inst Mar Peru*. 35(2): 242-256.- *Vibrio* species are considered the major bacterial pathogens affecting shrimps. It has been reported that acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) is caused by different strains of *Vibrio parahaemolyticus* with *pirA* and *pirB* genes. In this paper, we isolated five *V. parahaemolyticus* strains that were positive by PCR for the genes *pirA* and *pirB*, from shrimps cultured in the Tumbes region. We detected that two strains produce mortality and histological damage in the hepatopancreas, characteristic of AHPND, through experimental infection assays with four of these strains in 1.8 ±0.3 g shrimps. Nevertheless, we also observed that although the two remaining strains are positive by PCR for the genes *pirA* and *pirB*, they are not pathogenic in shrimps. These results indicate that *V. parahaemolyticus* strains present in the shrimp culture from the Tumbes region have different patterns of pathogenicity despite being positive by PCR for the genes *pirA* and *pirB*. This suggests that there are bacteria with additional factors to the genes *pirA* and *pirB* to cause AHPN.

KEYWORDS: AHPND, experimental infection, histopathology

1. INTRODUCCIÓN

El langostino blanco (*Penaeus vannamei* Boone, 1935) es una de las principales especies acuícolas del Perú, cuya producción durante el 2017 alcanzó a 27.491,66 toneladas (PRODUCE, 2018) representando 27,37% de la producción acuícola total de ese año. A pesar del crecimiento sostenido que viene teniendo esta actividad durante los últimos años, la aparición de nuevas enfermedades es un factor que pone en riesgo su producción en las diferentes etapas del cultivo.

1. INTRODUCTION

The whiteleg shrimp (*Penaeus vannamei* Boone, 1935) is one of the main aquaculture species of Peru. In 2017, its production reached 27,491.66 tons (PRODUCE, 2018) representing 27.37% of the total aquaculture production of that year. Regardless of the sustained growth of this activity, the appearance of new diseases is a factor that puts at risk its production in the different stages of the culture.

¹ Instituto del Mar del Perú, Laboratorio Costero de Tumbes, Zorritos, Perú. bramirez@imarpe.gob.pe

Entre los patógenos de langostino reportados en el Perú se encuentran agentes intracelulares como el virus del síndrome de la mancha blanca (VSMB), virus de la necrosis hepatopancreática y hematopoyética infecciosa (VNHHI), *Baculovirus penaei* (BP) y *Hepatobacter penaei* (NHP-B). Además, también se reporta frecuentemente infecciones por bacterias oportunistas del género *Vibrio* que causan la enfermedad conocida como vibriosis.

En el contexto mundial, históricamente las enfermedades han generado un fuerte impacto en el cultivo de langostinos causando importantes pérdidas económicas. Respecto a las enfermedades causadas por *Vibrio*, éstas han sido responsables de altas mortalidades con grados de afectación y virulencia variables (AGUIRRE-GUZMÁN *et al.*, 2005; TRUJILLO *et al.*, 2005; SOTO *et al.*, 2010). También, se ha reportado en diferentes países de Asia, Norteamérica (NUNAN *et al.*, 2014) Centroamérica (HAN, TANG & LIGHTNER, 2017) y Sudamérica (RESTREPO *et al.*, 2016) una nueva infección conocida como la enfermedad de la necrosis aguda del hepatopáncreas (AHPND, por sus siglas en inglés) que causa una elevada mortalidad en langostinos durante los primeros 20 a 30 días de cultivo (LIGHTNER *et al.*, 2012).

De acuerdo con TRAN *et al.* (2013) los langostinos infectados con AHPND presentan signos clínicos de flacidez, intestinos vacíos y hepatopáncreas pálido y atrofiado. Estos mismos autores identificaron al agente causal del AHPND en el 2013 como una cepa de *Vibrio parahaemolyticus* mediante bioensayos de inmersión. A partir de entonces, se han reportado nuevas cepas de *Vibrio* capaces de producir la AHPND que en su mayoría son de la especie *V. parahaemolyticus* (GOMEZ-JIMENEZ *et al.*, 2014; KONDO *et al.*, 2014; YANG *et al.*, 2014; RESTREPO *et al.*, 2016) y en menor proporción *V. campbelli*, *V. harveyi* en Vietnam (KONDO *et al.*, 2015) y *V. owensii* en China (LIU *et al.*, 2018).

Todas estas cepas tienen un plásmido que contiene una región codificante para genes de toxinas binarias denominadas *PirA* y *PirB* homólogas de las toxinas *Photobacterium insect-related* (*Pir*). Estas toxinas han sido identificadas como responsables de la infección por AHPND en langostinos (LEE *et al.*, 2015; SIRIKHARIN *et al.*, 2015). De acuerdo con LIGHTNER *et al.* (2012) y TRAN *et al.* (2013) la cepa bacteriana causante de la AHPND ingresa al estómago del langostino y produce las toxinas *PirA* y *PirB* que traspasan las barreras epiteliales del estómago hacia el hepatopáncreas, donde genera un desprendimiento masivo y agudo de las células del

Among the pathogens reported to affecting shrimps in Peru are intracellular agents such as the white spot syndrome virus (WSSV), infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV), *Baculovirus penaei* (BP), and *Hepatobacter penaei* (NHP-B). There are frequent reports of infections caused by opportunistic bacteria of the genus *Vibrio* (vibriosis).

Worldwide, historically diseases have generated a strong impact on shrimp farming causing important economic losses. Regarding the diseases caused by *Vibrio*, these have been responsible for high mortalities with variable degrees of affectation and virulence (AGUIRRE-GUZMÁN *et al.*, 2005; TRUJILLO *et al.*, 2005; SOTO *et al.*, 2010). Also, a new infection known as acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) has been reported in different countries in Asia, North America (NUNAN *et al.*, 2014), Central America (HAN, TANG & LIGHTNER, 2017), and South America (RESTREPO *et al.*, 2016) causing high mortality in shrimp during the first 20-30 days of culture (LIGHTNER *et al.*, 2012).

According to TRAN *et al.* (2013), AHPND-infected shrimp show clinical signs of flaccidity, empty bowels, and pale and atrophied hepatopancreas. These same authors identified, by immersion bioassays, the causal agent of AHPND in 2013 as a strain of *Vibrio parahaemolyticus*. Since then, new *Vibrio* strains capable of producing AHPND have been reported, most of which are *V. parahaemolyticus* (GOMEZ-JIMENEZ *et al.*, 2014; KONDO *et al.*, 2014; YANG *et al.*, 2014; RESTREPO *et al.*, 2016) and to a lesser extent *V. campbelli*, *V. harveyi* in Vietnam (KONDO *et al.*, 2015), and *V. owensii* in China (LIU *et al.*, 2018).

All these strains have acquired a plasmid encoding the binary toxins *PirA* and *PirB*, homologs with the *Photobacterium insect-related* toxins (*Pir*). These toxins have been identified as responsible for AHPND infection in shrimps (LEE *et al.*, 2015; SIRIKHARIN *et al.*, 2015). According to LIGHTNER *et al.* (2012) and TRAN *et al.* (2013), the bacterial strain causing AHPND enters the shrimp stomach and produces the toxins *PirA* and *PirB* that cross the epithelial barriers of the stomach to the hepatopancreas, where it generates a massive and acute detachment of the cells of the tubular epithelium to finally produce tissue necrosis and invasion of opportunistic bacteria.

epitelio tubular para producir finalmente necrosis del tejido e invasión de bacterias oportunistas.

A pesar de los reportes que indican actualmente que otras especies de *Vibrio* diferentes a *V. parahaemolyticus* también contienen los genes *pirA* y *pirB*, la Organización Internacional de Sanidad Animal (OIE, 2016) solo reconoce a *V. parahaemolyticus* como el agente causal de la AHPND. Así mismo, esta institución recomienda para los análisis por PCR el uso de los iniciadores VpPirA (HAN *et al.*, 2015), TUMSAT (TINWONGGER, *et al.*, 2014) y AP4 (DANGTIP *et al.*, 2015) que reconocen y amplifican una región específica de los genes *pirA* y *pirB*.

Adicionalmente a los métodos desarrollados para detectar los genes *pirA* y *pirB* en el plásmido de las cepas de *V. parahaemolyticus* causantes de la AHPND, también se ha desarrollado un método para diferenciar por PCR las cepas de *V. parahaemolyticus* causantes de la AHPND que provienen de Asia y de Centroamérica (HAN, TANG & LIGHTNER, 2017). Este método utiliza como diana una región denominada *Tn3-like transposon* ubicado en el ORF4 del mismo plásmido que contiene los genes *pirA* y *pirB*.

Utilizando los iniciadores de PCR recomendados por la OIE, en el 2017 el Laboratorio de Sanidad Acuícola del IMARPE obtuvo resultados positivos durante un monitoreo sanitario en muestras de langostinos de cultivo obtenidas por el Organismo Nacional de Sanidad Pesquera (SANIPES). Con base en los resultados obtenidos en el 2017, se ejecutó el presente trabajo durante el 2018 en el que se aisló diferentes cepas de *Vibrio* en muestras de tejido del hepatopáncreas de langostino de cultivo para detectar por la PCR la presencia de los genes *pirA* y *pirB* y evaluar su potencial para producir enfermedad en *P. vannamei*.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

Cultivo y aislamiento de bacterias

Las bacterias fueron aisladas de langostinos cultivados en sistema semi-intensivo de las provincias de Tumbes y Zarumilla (Fig. 1), con un peso entre 2 y 22 g, que fueron muestreados en los meses de marzo, abril, agosto y noviembre 2018. Los langostinos seleccionados presentaban flacidez, coloración rojiza de pleópodos e intestino vacío. Estos ejemplares fueron trasladados vivos hasta el Laboratorio de Sanidad Acuícola del IMARPE.

En el laboratorio, cada ejemplar de langostino fue desinfectado externamente con alcohol (75%) y

The World Organization for Animal Health (OIE, 2016) only recognizes *V. parahaemolyticus* as the causal agent of AHPND, despite current reports that other *Vibrio* species also contain the genes *pirA* and *pirB*. Likewise, this institution recommends for PCR analyses the use of the initiators VpPirA (HAN *et al.*, 2015), TUMSAT (TINWONGGER, *et al.*, 2014), and AP4 (DANGTIP *et al.*, 2015) that recognize and amplify a specific region of the genes *pirA* and *pirB*.

In addition to the existing methods developed to detect the genes *pirA* and *pirB*, there is also a method to differentiate by PCR the strains of *V. parahaemolyticus* that cause AHPND from Asia and Central America (HAN, TANG & LIGHTNER, 2017). This method uses as a target a region called *Tn3-like transposon* located in the ORF4 of the same plasmid that contains the genes *pirA* and *pirB*.

In 2017, the IMARPE's Aquaculture Health Laboratory obtained positive results during sanitary monitoring of cultured shrimp samples obtained by the National Fisheries Health Agency (SANIPES in Spanish) by using the PCR initiators recommended by the OIE. Based on these results, this work was carried out in 2018. We isolated different *Vibrio* strains in tissue samples from the hepatopancreas of cultured shrimp to detect the presence of genes *pirA* and *pirB* by PCR and evaluate their potential to produce disease in *P. vannamei*.

2. MATERIAL AND METHODS

Bacterial culture and isolation

We isolated the bacteria from shrimp cultured in a semi-intensive system in Tumbes and Zarumilla (Fig. 1), with a weight between 2 and 22 g. They were sampled in March, April, August, and November 2018. The selected shrimp presented flaccidity, the reddish coloring of pleopods, and an empty bowel. These specimens were transported alive to the IMARPE's Aquaculture Health Laboratory.

Each shrimp specimen was externally disinfected with alcohol (75%) and placed near a burner. While maintaining aseptic conditions, we removed the cephalothorax from five shrimp and placed 30 to 50 mg of hepatopancreatic tissue from each in a 1.5 mL microtube for pool testing.

colocado cerca de un mechero. Manteniendo las condiciones asépticas se removió el cefalotórax de cinco langostinos y en un microtubo de 1,5 mL se colocó de 30 a 50 mg de tejido de hepatopáncreas, de cada uno de ellos, para ser analizados en forma de *pool*. La mezcla de tejido obtenido fue homogenizada con un macerador de propileno estéril, agregando luego 1 mL del medio microbiológico caldo de tripticasa soya (TSB, Oxoid) e incubado durante 24 horas a 30 °C. Transcurrido el tiempo de incubación, 100 µL de este cultivo fue colocado en 900 µL de nuevo medio TSB e incubado nuevamente durante 24 horas a 30 °C. La cantidad restante del primer cultivo fue utilizado para extraer ADN y analizarlo por la PCR para detectar la presencia de los genes *pirA* y *pirB*.

Los cultivos que produjeron resultados positivos por la PCR, fueron diluidos en solución de CINA al 0,85% (Merck) hasta 10⁻⁶. Una alícuota de 100 µL de cada dilución fue cultivada mediante barrido en placas en los medios microbiológicos TCBS (Oxoid) y Chromatic Vibrio (Liofilchem) por 24 horas a 30 °C. En ambos casos se seleccionaron las placas que presentaban colonias separadas para recuperar hasta 50 colonias; seleccionándose las colonias de color verde o sacarosa negativas del medio TCBS y las colonias de color malva del medio Chromatic Vibrio que nuevamente fueron cultivadas mediante estría en nuevas placas con su respectivo medio. Mediante la PCR se identificó a las colonias positivas para los genes *pirA* y *pirB* siendo sub-cultivadas hasta obtener colonias puras.

Then, we added 1 mL of the microbiological medium trypticase soybean broth (TSB, Oxoid) to the mixture and incubated it for 24 hours at 30 °C. After the incubation time, we placed 100 µL of this culture in 900 µL of new TSB medium and incubated again for 24 hours at 30 °C. The remaining amount of the first culture was used to extract DNA and analyze it by PCR for the presence of the *pirA* and *pirB*.

The cultures that produced positive results by PCR were diluted in CINA from 0,85% (Merck) to 10⁻⁶. From each dilution, we cultured an aliquot of 100 µL, through sweeping in plates, in the microbial media TCBS (Oxoid) and Chromatic Vibrio (Liofilchem) for 24 hours at 30 °C. In both cases, we recovered up to 50 colonies from the plates that had separate colonies. The green or sucrose negative colonies of the TCBS medium and the mauve colonies of the Chromatic Vibrio medium were selected and, again, they were cultivated with striae sowing in new plates with their respective medium. Through PCR, we identified the positive colonies for the genes *pirA* and *pirB*, which were subcultured until obtaining pure colonies.

The isolated bacteria strains were stored in freezing at -20 °C in TSB medium with 25% glycerol (Applichem) until their use in subsequent analyses.



Figura 1.- Ubicación de los campos de cultivo de donde se recolectaron las muestras. A1: Campos de cultivos muestreado en la provincia de Tumbes, A2: Campos de cultivo de la provincia de Zarumilla

Figure 1. Location of the fields from which the samples were collected A1: Sampled fields in Tumbes province, A2: Fields in Zarumilla province

Las cepas de bacterias aisladas fueron guardadas en congelamiento a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ en medio TSB con glicerol (Applichem) al 25% hasta su utilización en los análisis posteriores.

Extracción de ADN

Para seleccionar las colonias de interés, durante la etapa de aislamiento se realizó una extracción rápida de ADN por el método de ebullición. Las bacterias del cultivo en el medio TSB fueron recuperadas mediante centrifugación a 12000 g por 2 min, mientras que en el caso de las bacterias de cultivo en placas se recuperó un aproximado de 15 mg de colonias bacterianas con un asa estéril y se colocó en un microtubo de 1,5 mL. En ambos casos se lavó inicialmente con 1 mL de solución salina (0,85%) y luego con 500 μL de solución PBS 1X (Sigma Aldrich). El *pellet* de bacteria fue resuspendido con TE 1X ph 8.0 (Biobasic) y se incubó a $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 10 minutos e inmediatamente se colocó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 5 minutos, se centrifugó a 12000 g por 1 min, se transfirió 10 μL de sobrenadante a un nuevo tubo de 1,5 mL y se agregó 90 μL de agua libre de nucleasas (Ambion). Este ADN fue conservado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, hasta su análisis por la PCR en tiempo real.

Para la identificación y caracterización molecular de las bacterias aisladas, el ADN fue extraído con el método DTAB/CTAB (GUSTINCICH *et al.*, 1991) con modificaciones. Se recogió de una placa de cultivo un aproximado de 15 mg de colonias bacterianas con un asa estéril y se colocó en un microtubo de 1,5 mL que contenía 600 μL de solución DTAB (dodeciltrimetilamonio bromuro (Merck) 8%, NaCl 1,5 M, Tris HCl 100 mM pH 8,8 y EDTA 50 mM (Merck)). Se incubó a $75\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 5 min, se agregó 700 μL de cloroformo (J.T. Baker), se mezcló en vortex y centrifugó a 12000 g por 5 min. Se transfirió 250 μL de sobrenadante a un nuevo microtubo de 1,5 mL que contenía 100 μL de solución CTAB (5% cetiltrimetilamonio bromuro (Merck) y 0,4 M (NaCl) y 900 μL de agua destilada, se mezcló e incubó a $75\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 5 min y centrifugó a 12000 g por 10 min. El sobrenadante fue descartado y se resuspendió el precipitado con 150 μL de solución NaCl al 1,2 M, se incubó a $75\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 5 min y centrifugó a 12000 g por 5 min. El sobrenadante fue transferido a un nuevo microtubo con 300 μL de etanol al 95%, se mezcló y centrifugó nuevamente a 12000 g por 5 min, el precipitado fue lavado con etanol al 75%, secado por 15 min y resuspendido en agua libre de nucleasas (Ambion). El ADN extraído en esta etapa fue conservado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su análisis por PCR simple.

DNA extraction

In the isolation stage, we performed a rapid DNA extraction using the boiling method. Bacteria from the culture in TSB were recovered by centrifugation at $12000\text{ g} \times 2\text{ min}$. We recovered about 15 mg of colonies from the culture in plates with a sterile handle that were placed in a 1.5 mL microtube. In both cases, it was washed with 1 mL of saline solution (0.85%) and 500 μL of 1X PBS solution (Sigma Aldrich). The bacterial pellet was resuspended with 1X TE ph 8.0 (Biobasic) and incubated at $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 10 minutes, then placed at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 5 minutes, centrifuged at 12000 g for 1 min. We transferred 10 μL of supernatant to a new 1.5 mL tube and added 90 μL of nuclease-free water (Ambion). This DNA was stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ until analysis by real-time PCR.

For the identification and molecular characterization of the isolated bacteria, we extracted the DNA with the DTAB/CTAB method (GUSTINCICH *et al.*, 1991) with modifications. Approximately 15 mg of bacterial colonies were collected from a culture plate with a sterile handle and placed in a 1.5 mL microtube containing 600 μL of DTAB solution (dodecyltrimethylammonium bromide (Merck) 8%, NaCl 1.5 M, Tris HCl 100 mM pH 8.8, and EDTA 50 mM (Merck)). Then, we incubated it at $75\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 5 min and added 700 μL chloroform (J.T. Baker). It was vortexed and centrifuged at 12000 g for 5 min. 250 μL of supernatant was transferred to a new 1.5 mL microtube containing 100 μL of CTAB (5% cetyltrimethylammonium bromide (Merck) and 0.4 M (NaCl) solution and 900 μL of distilled water, mixed and incubated at $75\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 5 min and centrifuged at 12000 g for 10 min. The supernatant was discarded and the pellet was resuspended with 150 μL of 1.2 M NaCl solution, incubated at $75\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 5 min, and centrifuged at 12000 g for 5 min. We transferred the supernatant to a new microtube with 300 μL of 95% ethanol, mixed and centrifuged again at 12000 g for 5 min, washed the precipitate with 75% ethanol, dried for 15 min and resuspended in nuclease-free water (Ambion). The DNA extracted at this stage was stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ until analysis by simple PCR.

PCR assays

Real-time PCR assays were performed in a QuantStudio 5 (Thermo Fisher Scientific) on a 10

Ensayos de la PCR

Los ensayos de la PCR en tiempo real fueron realizados en un equipo QuantStudio 5 (*Thermo Fisher Scientific*) en un volumen de 10 μL de reacción, conteniendo 5 μL de *PowerUp SYBR Green Master Mix* (Applied Biosystems), 1 μL de cada iniciador VpPirA-F y VpPirA-R de 5 μM (HAN *et al.*, 2015), 7 μL de agua libre de nucleasas (Ambion) y 1 μL de ADN extraído mediante el método de ebullición. La programación del termociclador fue realizada siguiendo las recomendaciones del kit *PowerUp SYBR Green Master Mix*.

Los ensayos de la PCR simple fueron desarrollados en un equipo *Mastercycler pro 6325* (Eppendorf) en un volumen de reacción de 25 μL que contenía 12,5 μL *HotStarTaq Master Mix 2X* (Qiagen), 1 μL de cada iniciador de 5 μM , 9,5 μL de agua libre de nucleasas y 1 μL de ADN extraído. En estos ensayos se utilizaron en total 9 juegos de iniciadores descritos en la Tabla 1, para amplificar los genes *pirA* y *pirB* (iniciadores TUMSAT-Vp3), relacionar el origen de las cepas de *Vibrio* (Iniciadores MX-345 y Asia-482) e identificar molecularmente cada cepa aislada mediante análisis multilocus (Iniciadores para los genes *16S ARNr*, *rpoA*, *rpoB*, *pyrH* y *recA*).

A excepción de la amplificación de los genes *pyrH* y *recA*, el resto de ensayos de la PCR fueron realizados mediante un ciclo de Pre-PCR a 95 °C por 15 min, 35 ciclos de la PCR a 95 °C por 30 s, una temperatura de hibridación ($T^{\circ}\text{h}$) de acuerdo a cada juego de iniciadores por 30 s y 72 °C por un tiempo de polimerización ($T^{\circ}\text{p}$) de acuerdo a cada juego de iniciadores y finalmente se programó 1 ciclo de polimerización final a 72 °C por 5 minutos. Los valores de $T^{\circ}\text{h}$ y $T^{\circ}\text{p}$ para cada juego de iniciadores son mostrados en la Tabla 1.

La PCR para los genes *recA* y *pyrH* tuvo la misma programación de Pre-PCR y polimerización final descrita anteriormente, pero varió en los ciclos de etapa de PCR, para el gen *recA* fue de 3 ciclos iniciales de 95 °C por 60 s, 55 °C por 135 s y 72 °C por 75 s, seguido de 35 ciclos de 95 °C por 30 s, 55 °C por 105 s y 72 °C por 75 s. Mientras que para el gen *pyrH* fue de 3 ciclos iniciales de 95 °C por 45 s, 55 °C por 120 s y 72 °C por 60 s, seguido de 35 ciclos de 95 °C por 20 s, 55 °C por 60 s y 72 °C por 60 s.

Los productos de PCR obtenidos en estos ensayos de PCR han sido secuenciados en el Laboratorio de Genética de la Sede Central del IMARPE y las secuencias fueron alineadas en la base de datos *GenBank* utilizando el programa *on line* BLAST.

μL reaction volume containing 5 μL of *PowerUp SYBR Green Master Mix* (Applied Biosystems), 1 μL of each 5 μM VpPirA-F and VpPirA-R initiator (HAN *et al.*, 2015), 7 μL of nuclease-free water (Ambion) and 1 μL of DNA extracted by the boiling method. The programming of the thermal cycler was carried out following the recommendations of the *PowerUp SYBR Green Master Mix* kit.

The single PCR assays were developed in a *Mastercycler pro 6325* (Eppendorf) kit in a 25 μL reaction volume containing 12.5 μL *HotStarTaq Master Mix 2X* (Qiagen), 1 μL of each 5 μM initiator, 9.5 μL of nuclease-free water, and 1 μL of extracted DNA. In these assays, we used a total of 9 sets of primers described in Table 1, to amplify the *pirA* and *pirB* genes (TUMSAT-Vp3 primers), to relate the origin of the *Vibrio* strains (MX-345 and Asia-482 primers) and to molecularly identify each isolated strain by multilocus analysis (primers for genes *16S ARNr*, *rpoA*, *rpoB*, *pyrH* y *recA*).

Except for the amplification of *pyrH* and *recA* genes, the rest of the PCR assays were performed by a Pre-PCR cycle at 95 °C for 15 min, 35 PCR cycles at 95 °C for 30 s, a hybridization temperature ($T^{\circ}\text{h}$) according to each set of primers for 30 s and 72 °C for a polymerization time ($T^{\circ}\text{p}$) according to each set of primers. Finally, 1 final polymerization cycle was programmed at 72 °C for 5 minutes. Table 1 shows the values of $T^{\circ}\text{h}$ and $T^{\circ}\text{p}$ for each starter set.

The PCR for the *recA* and *pyrH* genes had the same pre-PCR and final polymerization schedule described above but varied in the PCR stage cycles. For the *recA* gene, it was 3 initial cycles of 95 °C for 60 s, 55 °C for 135 s, and 72 °C for 75 s, followed by 35 cycles of 95 °C for 30 s, 55 °C for 105 s, and 72 °C for 75 s. While for the *pyrH* gene, it was 3 initial cycles of 95 °C for 45 s, 55 °C for 120 s, and 72 °C for 60 s, followed by 35 cycles of 95 °C for 20 s, 55 °C for 60 s, and 72 °C for 60 s.

We have sequenced the PCR products obtained in these PCR assays in the Genetics Laboratory at IMARPE's headquarters and the sequences were aligned in the *GenBank* database using the online software BLAST.

Tabla 1.- Iniciadores utilizados durante los análisis por PCR

Table 1.- PCR primers

Nombre	Secuencia 3' – 5'	producto (pb)	T°h (°C)	T°p (s)	Referencia
TUMSAT-Vp3 F TUMSAT-Vp3 R	GTGTTGCATAATTTTGTGCA TTGTACAGAAACCACGACTA	360	56	30	TINWONGGER <i>et al.</i> , 2014
APA4-F1 APA4-R1	TTGAGAATACGGGACGTGGG GTTAGTCATGTGAGCACCTTC	1269	55	90	DANGTIP <i>et al.</i> , 2015
MX-345F MX-345R	TACCAGCTCTAACAAGGCCA AACGTTCCAAGGAGTCGAGT	345	60	45	HAN <i>et al.</i> , 2017
Asia-482F Asia-482R	TGAACCGTTCCTCATGCTCT TCAAAGCAGCCCAGACAAAC	482	52	45	
8F R1509	AGAGTTTGATYMTGGCTCA GNTACCTTGTTACGACTT	1508	52	90	
rpoA-01-F rpoA-03-R	ATGCAGGGTCTGTDACAG GHGGCCARTTTTCHARRCGC	931	55	90	THOMPSON <i>et al.</i> , 2005
pyrH-02-R pyrH-04-F	GTRAABGCNGMYARRTCCA ATGASNACBAAYCCWAAACC	599	55	60	
recA-01-F recA-02-R	TGARAARCARTTYGGTAAAGG TCRCCNTRTAGCTRACC	783	55	75	
rpoBF1721 rpoBR3202	AACATCGGTCTGATCAACTC ACACCCTTGTTACCGTGACGACC	1523	55	90	

Infección experimental

Estos ensayos fueron realizados a temperatura ambiente ($25,3 \pm 1,4$ °C) y controlada a $30 \pm 0,3$ °C, utilizando 4 cepas de bacterias aisladas. Antes de iniciar la experimentación se aclimataron langostinos de $1,8 \pm 0,3$ g por 7 días en un tanque con 400 L de agua de mar filtrada con sistema Pentair A6000-100 (Aquatic Eco-System) y tratada con UV. En este periodo de tiempo los langostinos fueron alimentados con balanceado de 35% de proteína (Skretting) en 2 raciones diarias (9:00 am y 4:00 pm), los parámetros del agua se mantuvieron a 35‰ de salinidad, temperatura ambiente y oxígeno entre 4 y 4,6 ppm. Durante los ensayos de infección experimental se mantuvieron las mismas condiciones de alimentación, así como los parámetros del agua a excepción de la temperatura del ensayo que fue realizado a temperatura controlada.

Las 4 cepas de *Vibrio* fueron cultivadas durante la noche en medio TSB a 30 °C, a partir del cual se preparó, por triplicado, una solución bacteriana de 150 mL a una concentración aproximada de 1×10^8 UFC/mL utilizando como medio de dilución agua de mar estéril. La estimación de la concentración bacteriana fue realizada previamente mediante lecturas de absorbancia a una densidad óptica de 600 nm de un cultivo en TSB y su correlación con el conteo de colonias en placas de TCBS. En cada una de estas soluciones preparadas, así como también en 150 mL de medio TSB estéril (control negativo) se sumergieron 15 langostinos, por 15 minutos y

Experimental infection

These tests were conducted at room temperature (25.3 ± 1.4 °C) and controlled at 30 ± 0.3 °C, using 4 strains of isolated bacteria. Before starting the experiment, we acclimatized 1.8 ± 0.3 g shrimp for 7 days in a tank with 400 L of filtered seawater with Pentair A6000-100 system (Aquatic Eco-System) and treated with UV. Over this period, the shrimps were fed 35% balanced protein (Skretting) in 2 daily rations (9:00 am and 4:00 pm), the water parameters were kept at 35‰ of salinity, room temperature and oxygen were between 4 and 4.6 ppm. We maintained the same feeding conditions during the experimental infection trials, as well as the water parameters except for the temperature of the trial which was conducted at a controlled temperature.

The 4 *Vibrio* strains were cultured overnight in TSB medium at 30 °C. Then, we prepared a 150 mL bacterial solution in triplicate at a concentration of approximately 1×10^8 CFU/mL using sterile seawater as a dilution medium. The bacterial concentration was previously estimated using absorbance readings at an optical density of 600 nm from a TSB culture and its correlation with the colony count in TCBS plates. We immersed 15 shrimp in each of these prepared solutions, as well as in 150 mL of sterile TSB medium (negative control), for 15 minutes and then transferred them and their medium to a tank

luego fueron transferidos junto con su medio a una pecera a un volumen final 15 litros con agua de mar tratada con UV y evaluadas hasta 72 horas.

Análisis histopatológico

Para estos análisis se recolectaron 3 langostinos antes de la infección experimental (condiciones normales), 3 langostinos moribundos (solo en los tratamientos en el cual se presentó la mortalidad) y después de 72 horas, 3 langostinos de los tratamientos que no presentaron mortalidad incluido el control negativo. El procesamiento histopatológico fue realizado siguiendo las recomendaciones de LIGHTNER (1996) con modificaciones. Las muestras de tejido fueron fijadas con solución Davidson por 48 horas y luego procesadas mediante 2 baños separados de 1 hora cada uno en estaciones de alcohol al 70%, 80%, 95%, alcohol absoluto, xilol y parafina en un procesador de tejidos automático (Leyca). El corte del tejido fue realizado a un grosor de 5 μm en un micrótopo semiautomático (Leyca) y teñido con Hematoxilina y Eosina Y/Floxina B de Harris.

3. RESULTADOS

En total se aislaron cinco cepas de *Vibrio* positivas por PCR con los iniciadores VpPirA, TUMSAT y AP4, los que amplifican una región específica de los genes *pirA* y *pirB*. El cultivo de estas cepas en los medios TCBS y Chromatic Vibrio presentaron colonias de color verde y malva respectivamente (Fig. 2) característicos de *Vibrio parahaemolyticus*. La identificación final de estas cepas como *V. parahaemolyticus* fue confirmada mediante análisis de secuencias multilocus con los genes 16S ARN, *rpoB*, *rpoA*, *recA* y *pyrB* (Tabla 2).

with a final volume of 15 liters with UV-treated seawater, where they were evaluated for up to 72 hours.

Histopathological analysis

We collected 3 shrimps before the experimental infection (normal conditions), 3 dying shrimps (only in the treatments in which mortality occurred) and after 72 hours, 3 shrimps from the treatments that did not present mortality including the negative control. We followed the recommendations of LIGHTNER (1996) with modifications for the histopathological processing. Tissue samples were fixed with Davidson solution for 48 hours and then post-processed by 2 separate baths of 1 hour each in stations of 70%, 80%, 95%, absolute alcohol, xylol, and paraffin in an automatic tissue processor (Leyca). The tissue was cut at a thickness of 5 μm in a semi-automatic microtome (Leyca) and dyed with Harris' Hematoxylin and Eosin Y/Floxin B.

3. RESULTS

We isolated a total of five PCR positive *Vibrio* strains with the primers VpPirA, TUMSAT, and AP4, which amplify a specific region of the genes *pirA* and *pirB*. The culture of these strains in the TCBS and Chromatic Vibrio media showed green and mauve colonies, respectively (Fig. 2) which were characteristic of *Vibrio parahaemolyticus*. Multilocus sequence analysis of the genes 16S ARN, *rpoB*, *rpoA*, *recA*, and *pyrB* confirmed the final identification of these strains as *V. parahaemolyticus* (Tabla 2).

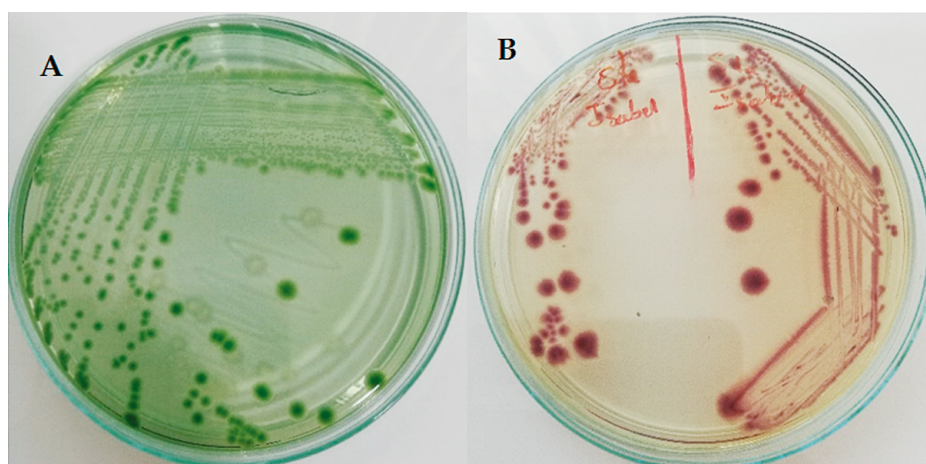


Figura 2.- Cultivo de una cepa representativa de *Vibrio parahaemolyticus* aislada de langostinos de cultivo. A: Cultivo en agar TCBS (Oxoid) y B: Cultivo en Chromatic Vibrio (Liofilchem)

Figure 2. Culture of a representative strain of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from cultured shrimp. A: Culture on TCBS agar (Oxoid) and B: Culture on Chromatic Vibrio (Liofilchem)

De las 4 cepas de *V. parahaemolyticus* que se utilizaron para los ensayos de desafío experimental, se observó que 2 cepas (C-Av7 y C-Av8) son capaces de producir una mortalidad de hasta 100% en los langostinos (Fig. 3) tanto en temperatura ambiente como en temperatura controlada en 30 °C. En ambos experimentos la mortalidad se observó desde las 12 horas post infección (hpi), pero a 30 °C alcanza el 100% entre las 36 y 48 hpi, mientras que a temperatura ambiente fue entre las 36 y 60 hpi.

El examen histopatológico en los langostinos del grupo control negativo mostró que los túbulos y células epiteliales del hepatopáncreas presentan una estructura normal (Fig. 4A), mientras que, el grupo de langostinos expuestos a las cepas en la cual se observó mortalidad mostraron degeneración de los túbulos de forma progresiva desde la zona proximal a la zona distal (Fig. 4B). La zona afectada de los túbulos presentó desprendimiento de las células epiteliales (Fig. 4C, D) y presencia de infiltraciones hemocíticas (Fig. 4E, F). Estos mismos daños histológicos fueron también observados con bacterias *Vibrio* aisladas de langostinos moribundos que fueron expuestos a las cepas C-Av7 y C-Av8.

Of the 4 strains of *V. parahaemolyticus* used for experimental challenge trials, two of them (C-Av7 and C-Av8) were able to produce up to 100% mortality in shrimps (Fig. 3) both at room temperature and at controlled temperature of 30 °C. We observed mortality from 12 hours post-infection (hpi) in both experiments, but at 30 °C, it reached 100% between 36 and 48 hpi, while at room temperature it was between 36 and 60 hpi.

Histopathological examination of the shrimp in the negative control group showed that the tubules and epithelial cells of the hepatopancreas have a normal structure (Fig. 4A), while the group of shrimps exposed to the strains in which mortality was observed showed a progressive degeneration of the tubules from the proximal to the distal area (Fig. 4B). The affected zone of the tubules showed a detachment of the epithelial cells (Fig. 4C, D) and the presence of hemocyte infiltrations (Fig. 4E, F). The same histological damage was also observed with *Vibrio* bacteria isolated from dying shrimp exposed to C-Av7 and C-Av8.

Tabla 2.- Resultados del alineamiento de los productos de PCR obtenidos del ADN de las cepas aisladas en la base de datos de GenBank

Table 2. Results of the alignment of the PCR products obtained from the DNA of the strains isolated in the GenBank database

Cepa	Origen (Provincia y fecha)	Gen	Tamaño se secuencia alineada (pb)	Porcentaje de similitud	Descripción de <i>V. parahaemolyticus</i> alineado del GenBank	
					Cepa	N° Accesoión
C-Tu	Tumbes-marzo	16S ARNr	1493	99%	FORC_071	CP023485.1
		rpoA	939	99%	FORC_071	CP023485.1
		rpoB	1152	99%	20130629002S01	CP020034.1
		recA	815	99%	FORC_023	CP012950.1
		pyrH	590	100%	BB22OP	CP003972.1
C-St	Tumbes-abril	16S ARNr	1491	99%	FORC_071	CP023485.1
		rpoA	938	100%	FORC_071	CP023485.1
		rpoB	1337	99%	20130629002S01	CP020034.1
		recA	763	99%	FORC_023	CP012950.1
		pyrH	590	100%	BB22OP	CP003972.1
C-A7	Zarumilla-agosto	16S ARNr	1496	99%	160807	CP033142.1
		rpoA	939	99%	FORC_071	CP023485.1
		rpoB	1337	99%	FORC_022	CP013248.1
		recA	705	99%	17 RecA	EU051542.1
		pyrH	590	99%	ATCC 17802	CP014046.2
C-A8	Zarumilla-agosto	16S ARNr	1498	99%	160807	CP033142.1
		rpoA	938	100%	FORC_071	CP023485.1
		rpoB	1002	99%	FORC_022	CP013248.1
		recA	735	98%	FORC_023	CP012950.1
		pyrH	591	99%	ATCC 17802	CP014046.2
C-Si	Zarumilla-noviembre	16S ARNr	1493	99%	160807	CP033142.1
		rpoA	938	100%	FORC_071	CP023485.1
		rpoB	1337	99%	FORC_022	CP013248.1
		recA	814	99%	FORC_071	CP023485.1
		pyrH	590	99%	ATCC 17802	CP014046.2

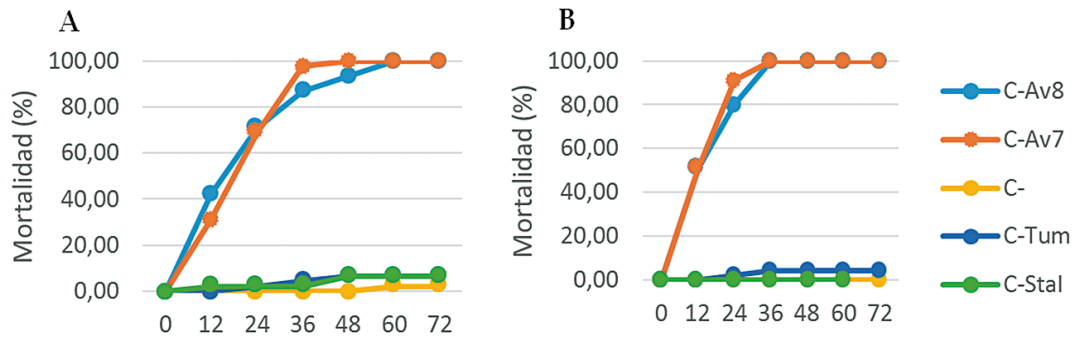


Figura 3.- Mortalidad post infección de *P. vannamei* de $1,8 \pm 0,3$ g con cepas de *V. parahaemolyticus* positivas por PCR para los genes *pirA* y *pirB*. A: Ensayo realizado a temperatura ambiente ($25,3 \pm 1,4$ °C). B: Ensayo realizado a temperatura controlada ($30 \pm 0,3$ °C). C-Av8, C-Av7, C-Tum y C-Stal: Cepas de *V. parahaemolyticus* evaluadas. C-: Control negativo

Figure 3. Post-infection mortality of *P. vannamei* of 1.8 ± 0.3 g with PCR positive for *pirA* and *pirB* genes. A: Test performed at room temperature (25.3 ± 1.4 °C). B: Test performed at controlled temperature (30 ± 0.3 °C). C-Av8, C-Av7, C-Tum, and C-Stal: *V. parahaemolyticus* strains evaluated. C-: Negative control

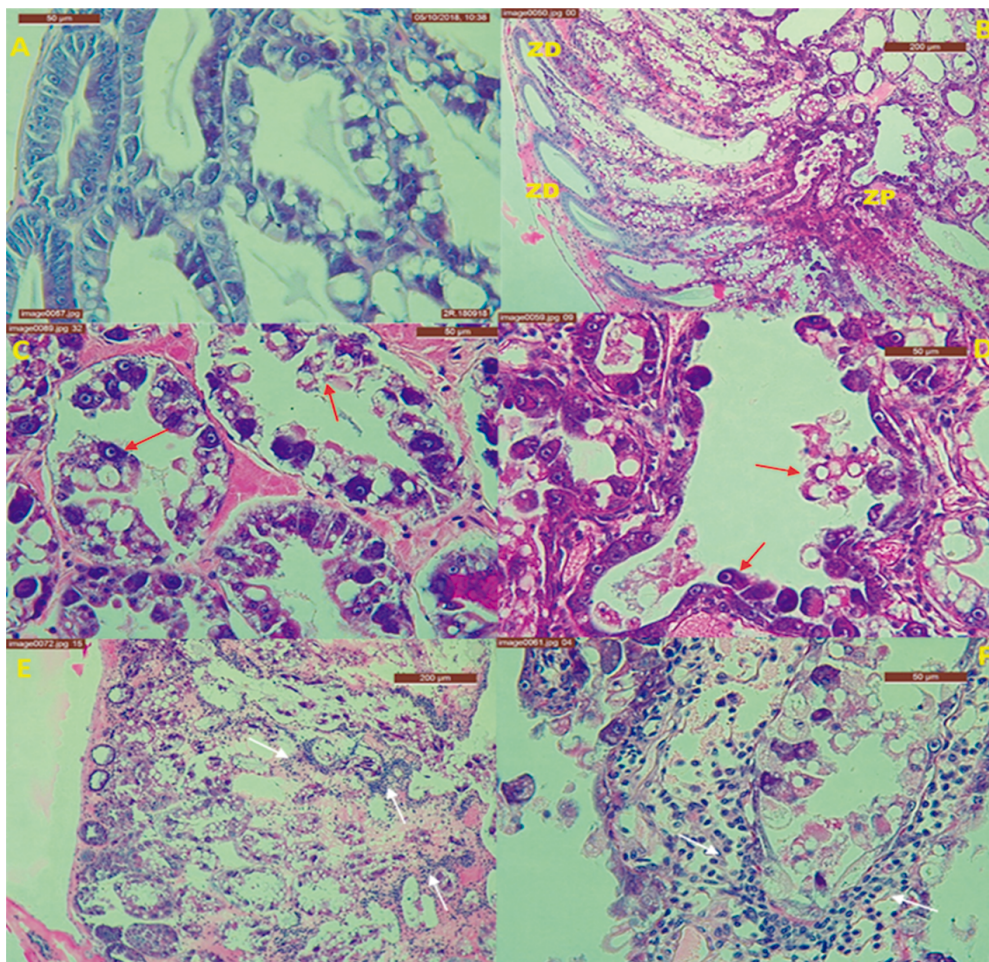


Figura 4.- Cortes histológicos teñidos con Eosina y Hematoxilina de una sección del hepatopáncreas de langostinos infectados experimentalmente. A: langostinos sanos del grupo control sin bacterias. B-F: langostinos infectados con cepas de *V. parahaemolyticus* positivas por PCR para los genes *pirA* y *pirB*. B: Daños de los túbulos del hepatopáncreas desde la zona proximal (ZP) a la zona distal (ZD). C y D: Las flechas de color rojo muestran las células epiteliales que se desprenden de los túbulos. E y F: las flechas de color blanco señalan la presencia de infiltraciones hemocíticas en una sección del hepatopáncreas

Figure 4. Eosin and Hematoxylin stained histological slices of a section of the hepatopancreas of experimentally infected shrimp. A: healthy shrimps from the control group without bacteria. B-F: shrimps infected with PCR positive *V. parahaemolyticus* strains for *pirA* and *pirB* genes. B: Damage to the tubules of the hepatopancreas from the proximal zone (ZP) to the distal zone (ZD). C and D: The red arrows show the epithelial cells that are detached from the tubules. E and F: The white arrows indicate the presence of hemocytic infiltrations in a section of the hepatopancreas

4. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Reportes previos muestran que la AHPND ha causado elevadas mortalidades en el cultivo de langostinos peneidos de Asia y América central y que el agente patógeno corresponde a cepas de *Vibrio* que contienen los genes *pirA* y *pirB*.

En este estudio se logró determinar el nivel de patogenicidad de cuatro cepas de bacterias aisladas de campos de cultivo de la región Tumbes e identificadas como *Vibrio parahaemolyticus* mediante análisis multilocus de una región de los genes *16S ARNr*, *rpoA*, *rpoB*, *recA* y *pyrH*. El ADN de estas bacterias es positivo por la PCR con los iniciadores TUMSAT-Vp3 F/R (TINWONGGER *et al.*, 2014), APA4 (DANGTIP *et al.*, 2015), considerados por la OIE como marcadores moleculares de los genes *pirA* y *pirB* de vibrios que causan la AHPND en langostinos. Sin embargo, solo se observó que 2 de estas cepas producen mortalidad en condiciones experimentales.

Además, de acuerdo a comunicación personal con los profesionales de los campos de cultivo de los cuales se tomaron las muestras, sus producciones presentaron mortalidad acumulada de 20% a 40%, que está dentro del rango normalmente esperado, a diferencia de las mortalidades súbitas y masivas causadas por la AHPND (OIE, 2016), que de acuerdo a KONGRUENG *et al.* (2014) puede exceder el 70% en Tailandia o mayores al 95% en México (NUNAN *et al.*, 2014).

En los tratamientos con las dos cepas que produjo mortalidad, se observó que el 100% de esa mortalidad fue alcanzada entre las 36 a 60 hpi. De acuerdo a la bibliografía consultada, el tiempo post infección que se tarda para alcanzar el 100% de mortalidad es variado. El menor tiempo reportado para este tipo de *Vibrio* ha sido de 12 hpi (FENG *et al.*, 2017), mientras que en algunos casos el 100% de mortalidad se obtuvo a las 96 hpi (TRAN *et al.*, 2013; NUNAN *et al.*, 2014; LEE *et al.*, 2015). Estas variaciones se deberían a las diferentes condiciones en el cual realizan los ensayos de infección experimental. Como ejemplo en este trabajo, se observó que a $30 \pm 0,3$ °C el 100% de mortalidad se alcanza a las 36 hpi, en cambio a temperatura ambiente ($25,3 \pm 1,4$ °C) el porcentaje de mortalidad se obtuvo entre las 48 y 60 hpi.

Independientemente del tiempo post infección, los langostinos moribundos mostraron daños histológicos con los mismos patrones descritos por LIGHTNER *et al.* (2012), TRAN *et al.* (2013) para la AHPND. Los túbulos presentaron degradación desde la zona

4. DISCUSSION AND CONCLUSIONS

Previous reports show that AHPND has caused high mortalities in cultured penaeid shrimps from Asia and Central America and that the pathogen corresponds to *Vibrio* strains containing the genes *pirA* and *pirB*.

We were able to determine the pathogenicity level of four bacterial strains isolated from culture fields of the Tumbes region and identified them as *Vibrio parahaemolyticus* through a multilocus analysis of a region of *16S ARNr*, *rpoA*, *rpoB*, *recA*, and *pyrH*. The DNA of these bacteria is positive by PCR with the primers TUMSAT-Vp3 F/R (TINWONGGER *et al.*, 2014), APA4 (DANGTIP *et al.*, 2015), considered by the OIE as molecular markers of the *pirA* and *pirB* genes that cause AHPND in shrimp. However, only 2 of these strains were observed to produce mortality under experimental conditions.

Also, according to personal communication with the staff of the fields from which the samples were taken, their yields showed accumulated mortality of 20% to 40%, which is within the normally expected range, unlike the sudden and massive mortalities caused by the AHPND (OIE, 2016), which according to KONGRUENG *et al.* (2014) may exceed 70% in Thailand or over 95% in Mexico (NUNAN *et al.*, 2014).

In the treatments with the two strains that produced mortality, we observed that 100% of that mortality was reached between 36 and 60 hpi. According to the consulted bibliography, the post-infection time that takes to reach 100% mortality is varied. The shortest time reported for this type of *Vibrio* was 12 hpi (FENG *et al.*, 2017), while in some cases 100% mortality was obtained at 96 hpi (TRAN *et al.*, 2013; NUNAN *et al.*, 2014; LEE *et al.*, 2015). These variations can be explained by the different conditions under which the experimental infection trials are conducted. As an example, in this work, we observed that at 30 ± 0.3 °C 100% mortality is reached at 36 hpi, while at room temperature (25.3 ± 1.4 °C) the percentage of mortality was obtained between 48 and 60 hpi.

Regardless of the post-infection time, the dying shrimp showed histological damage with the same patterns described by LIGHTNER *et al.* (2012), TRAN *et al.* (2013) for the AHPND. Tubules showed degradation from the proximal to the distal area

proximal a la zona distal con desprendimiento masivo de las células del epitelio. Estos mismos daños histológicos también fueron observados con los desafíos de las bacterias *Vibrio* aisladas de langostinos moribundos que fueron expuestos a las cepas C-Av7 y C-Av8, confirmando así que estas cepas son patogénicas en langostinos y causan signos histopatológicos típicos de la AHPND.

Por otro lado, en este trabajo se observó que, bajo las mismas condiciones de infección experimental, cuatro de las seis cepas aisladas no producen mortalidad en langostinos a pesar que sus ADNs resultan positivos por la PCR para una región específica de los genes *pirA* y *pirB*. El secuenciamiento y posterior alineamiento de los productos de PCR en el ADN de estas cuatro cepas, mostró que los iniciadores TUMSAT-Vp3 (TINWONGGER *et al.*, 2014) amplificaron una región de 360 pb que comprende 322 pb del gen *pirA* y 38 pb antes de este gen. Del mismo modo, los productos obtenidos con los iniciadores AP4 (DANGTIP *et al.*, 2015) amplificaron una región de 1269 pb que comprende a 336 pb de la secuencia completa del gen *pirA*, 12 pb que separa el gen *pirA* del *pirB* y 921 pb iniciales de las 1317 pb que tiene el gen *pirB*.

La ausencia de mortalidad observada en los ensayos de infección experimental con estas cuatro cepas, sugiere que algunas cepas de *Vibrio* de esta región dependen de factores adicionales además de la simple presencia de los genes *pirA* y *pirB* para causar la AHPND en langostinos. Resultados similares han sido reportados por ARANGUREN *et al.* (2017) en dos cepas de *V. parahaemolyticus* denominadas R13 y R14. Estas bacterias fueron aisladas de América Latina y resultaron positivas por PCR para *pirA* y *pirB* pero no produjeron mortalidad en langostinos infectados experimentalmente. KANRAR & DHAR (2018) secuenciaron el genoma completo de la cepa R14 y corroboraron que contiene los genes *pirA* y *pirB*. En otro trabajo FENG *et al.* (2017) también detectaron una cepa de *V. parahaemolyticus* que fue positiva por la PCR para el gen *pirA*, con un nivel de expresión alto de este gen; sin embargo, la mortalidad solo alcanzó el 40% después de 4 dpi a diferencia de otras cepas que produjeron 100% de mortalidad bajo las mismas condiciones experimentales. Además de la presencia de cepas de *Vibrio* positivas a los genes *pirA* y *pirB* con diferentes capacidades patogénicas, también se han reportado cepas que pierden su patogenicidad cuando son cultivadas en los medios sólidos TSA, Agar marino y Agar sangre a diferencia que cuando son cultivadas en el medio líquido TSB (TRAN *et al.*, 2013), sugiriendo una diferencia en el espacio

with the massive detachment of epithelial cells. These same histological damages were also observed with the challenges of *Vibrio* bacteria isolated from dying shrimp that were exposed to C-Av7 and C-Av8 strains, thus confirming that these strains are pathogenic in shrimp and cause histopathological signs typical of AHPND.

On the other hand, we observed that, under the same conditions of experimental infection, four of the six isolated strains do not produce mortality in shrimps despite their DNA being positive by PCR for a specific region of the genes *pirA* and *pirB*. Sequencing and subsequent alignment of PCR products in the DNA of these four strains showed that the primers TUMSAT-Vp3 (TINWONGGER *et al.*, 2014) amplified a 360 pb region comprising 322 pb of the *pirA* gene and 38 pb before this gene. Similarly, the products obtained with the primers AP4 (DANGTIP *et al.*, 2015) amplified a region of 1269 pb comprising 336 pb of the complete sequence of the *pirA* gene, 12 pb separating the *pirA* gene from the *pirB* gene, and 921 pb of the 1317 pb of the *pirB* gene.

The absence of mortality observed in experimental infection trials with these four strains suggests that some *Vibrio* strains from this region depend on additional factors beyond the simple presence of the *pirA* and *pirB* genes to cause AHPND in shrimp. Similar results have been reported by ARANGUREN *et al.* (2017) on two *V. parahaemolyticus* strains called R13 and R14. These bacteria were isolated from Latin America and tested positive by PCR for *pirA* and *pirB* but did not produce mortality in experimentally infected shrimp. KANRAR & DHAR (2018) sequenced the entire genome of the R14 strain and confirmed that it contains the genes *pirA* and *pirB*. In another work, FENG *et al.* (2017) also detected a *V. parahaemolyticus* strain that was positive by PCR for the gene *pirA*, with a high expression level of this gene. However, mortality only reached 40% after 4 dpi unlike other strains that produced 100% mortality under the same experimental conditions. In addition to the presence of *Vibrio* positive strains to the *pirA* and *pirB* genes with different pathogenic capacities, it has also been reported that strains lose their pathogenicity when they are cultured in the solid media TSA, marine agar, and blood agar unlike when they are cultured in the liquid media TSB (TRAN *et al.*, 2013), suggesting a difference in the space

disponible para la señalización de célula a célula de las bacterias cultivadas en medio sólido frente al medio en caldo.

A nivel molecular TINWONGGER *et al.* (2014) observaron por qPCR que el número de copias del plásmido que contiene los genes *pirA* y *pirB* de diferentes colonias variaba a pesar de que todas derivaban de una misma colonia causante del AHPND, lo que hacía sugerir una delección natural de los genes *pirA* y *pirB* debido a transposasas que flanquean estas secuencias. De acuerdo con el manual acuático de la OIE (2016) estas delecciones naturales no afectarían los métodos para la detección cuando se utilice como diana la secuencia de la toxina Pir para detectar cepas de *V. parahaemolyticus* causante de la AHPND, debido a que las cepas que presenten tal supresión darán resultados negativos por más que las bacterias deriven de una cepa causante de la AHPND.

El uso de métodos de la PCR basados en la detección de las secuencias de los genes *pirA* y *pirB* que se ha desarrollado en este trabajo, han permitido detectar que en los campos de cultivo de langostinos de Tumbes existe la presencia de cepas de *Vibrio parahaemolyticus*, que contienen los genes *pirA* y *pirB*, que producen mortalidad en langostinos y causan daños histológicos en el hepatopáncreas característicos a la AHPND. Sin embargo, también se demuestra la presencia de bacterias no patogénicas con resultados positivos por la PCR para los genes *pirA* y *pirB*.

Basándonos en estos resultados es necesario profundizar las investigaciones con las cepas aisladas de *V. parahaemolyticus* patogénicas y no patogénicas para determinar que otros factores además de los genes *pirA* y *pirB* intervienen en la patogénesis de estas bacterias. Así mismo, desarrollar nuevos métodos de la PCR para diferenciar estas cepas evitando tener resultados falsos positivos, sobre todo en muestras de langostinos congelados en el cual no es posible aislar las bacterias.

Agradecimientos

Los autores agradecen a la Dirección General de Investigaciones en Acuicultura del IMARPE por el financiamiento de este proyecto, a las empresas langostineras que permitieron la obtención de muestras de langostinos y a la Dra. Giovanna Sotil del Laboratorio de Genética de la sede central del IMARPE por el apoyo en el secuenciamiento de los productos obtenidos de los ensayos de PCR.

available for cell to cell signaling of the bacteria cultured in solid media versus the medium in broth.

At the molecular level, TINWONGGER *et al.* (2014) observed by qPCR that the number of plasmid copies containing *pirA* and *pirB* from different colonies varied even though they were all derived from the same AHPND-causing colony, which suggested a natural deletion of the *pirA* and *pirB* genes due to transposases flanking these sequences. According to the OIE Aquatic Manual (2016), these natural deletions would not affect detection methods when the Pir toxin sequence is used as a target to detect AHPND-causing *V. parahaemolyticus* strains, because strains with such deletion will be negative even if the bacteria are derived from an AHPND-causing strain.

In this work, the use of PCR methods based on the detection of the sequences of the genes *pirA* and *pirB* has allowed detecting the presence of *Vibrio parahaemolyticus* strains in the shrimp culture fields of Tumbes, which contain the genes *pirA* and *pirB*, which produce mortality in shrimp and cause histological damage in the hepatopancreas, which are characteristic of AHPND. But it also demonstrates the presence of non-pathogenic bacteria with positive PCR results for the genes *pirA* and *pirB*.

Based on these results, further research with pathogenic and non-pathogenic isolated strains of *V. parahaemolyticus* is necessary to determine which other factors besides the genes *pirA* and *pirB* are involved in the pathogenesis of these bacteria. Likewise, we need to develop new PCR methods to differentiate these strains avoiding false-positive results, especially in frozen shrimp samples in which it is not possible to isolate the bacteria.

Acknowledgments

We would like to thank the IMARPE's Directorate-General for Aquaculture Research for funding this project, the shrimp companies that allowed us to obtain samples, and Dr. Giovanna Sotil of the Genetics Laboratory at IMARPE's headquarters for her support in sequencing the products obtained from PCR assays.

REFERENCIAS / REFERENCES

- AGUIRRE-GUZMÁN G, ASCENCIO F, SAULNIER D. 2005. Pathogenicity of *Vibrio penaeicida* for white shrimp *Litopenaeus vannamei*: a cysteine protease-like exotoxin as a virulence factor. *Dis. Aquat. Org.* 67:201-207. doi:10.3354/dao067201.
- ARANGUREN L, PIAMSOMBOON P, TANG K, KANRAR S, DHAR A. 2017. Isolation of novel mutant strains of *Vibrio parahaemolyticus* from pacific white shrimp *Penaeus vannamei* in Latin America that contains AHPND *pirA* and *b* genes but does not cause acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND). World Aquaculture Society Meetings.
- DANGTIP S, SIRIKHARIN R, SANGUANRUT P, THITAMADEE S, SRITUNYALUCKSANA K, TAENGCHIYAPHUM S, ..., FLEGEL T. 2015. AP4 method for two-tube nested PCR detection of AHPND isolates of *Vibrio parahaemolyticus*. *Aquaculture Reports* 2: 158-162. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aqrep.2015.10.002>
- FENG B, LIU H, WANG M, SUN X, PAN Y, ZHAO Y. 2017. Diversity analysis of acute hepatopancreatic necrosis disease-positive *Vibrio parahaemolyticus* strains. *Aquaculture and Fisheries*. 2: 278-285. <https://doi.org/10.1016/j.aaf.2017.10.001>
- GOMEZ-JIMENEZ S, NORIEGA-OROZCO L, SOTELO-MUNDO R R, CANTU-ROBLES V A, COBIAN-GUEMES A G, COTA-VERDUGO RG, ..., OCHOA LEYVA A. 2014. High-quality draft genomes of two *Vibrio parahaemolyticus* strains aid in understanding acute hepatopancreatic necrosis disease of cultured shrimps in Mexico. *Genome Announcements* 2 (4). <http://dx.doi.org/10.1128/genomeA.00800-14.e00800-00814>
- GUSTINCICH S, MANFIOLETT G, SAL G, SCHNEIDER C. 1991. A fast method for High-Quality genomic DNA extraction from whole human blood. *Biotechniques*. 11(3): 298-302.
- HAN J, TANG K, LIGHTNER D. 2017. Genotyping of virulence plasmid from *Vibrio parahaemolyticus* isolates causing acute hepatopancreatic necrosis disease in shrimp. *Dis. Aquat. Organ.* 115:245-251. doi:10.3354/dao02906
- HAN J, TANG K, PANTOJA C, WHITE B, LIGHTNER D. 2015. qPCR assay for detecting and quantifying a virulence plasmid in acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) due to pathogenic *Vibrio parahaemolyticus*. *Aquaculture*. 442: 12-15.
- KANRAR S, DHAR A. 2018. Complete genome sequence of a novel mutant strain of *Vibrio parahaemolyticus* from pacific white shrimp (*Penaeus vannamei*). *American Society for microbiology*. 24(6).
- KI J, ZHANG R, ZHANG W, HUANG Y, QIAN P. 2009. Analysis of RNA polymerase beta subunit (*rpoB*) gene sequences for the discriminative power of marine *Vibrio* species. *Microb Ecol.* 58:679-691. <http://dx.doi.org/10.1007/s00248-009-9519-7>
- 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). <http://dx.doi.org/10.1128/genomeA.00978-15.e00978-00915>
- KONDO H, TINWONGGER S, PROESPRAIWONG P, MAVICHAK R, UNAJAK S, NOZAKI R. *et al.* 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(2). <http://dx.doi.org/10.1128/genomeA.00221-14.e00221-00214>
- KONGRUENG J, YINGKAJORN S, BUNPA N, SERMWITTAYAWONG K, SINGKHAMANAN K, VUDDHAKUL V. 2014. Characterization of *Vibrio parahaemolyticus* causing acute hepatopancreatic necrosis disease in southern Thailand. *J. Fish. Dis.* 38(11): 957-966. doi: 10.1111/jfd.12308
- LEE C, CHEN I, YANG Y, KO T, HUANG Y, HUANG J, ..., LO CH. 2015. The opportunistic marine pathogen *Vibrio parahaemolyticus* becomes virulent by acquiring a plasmid that expresses a deadly toxin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* (34): 10798-10803. doi: <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1503129112>
- LIGHTNER D. 1996. A handbook of shrimp pathology and diagnostic procedures for diseases of cultured penaeid shrimp. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA.
- LIGHTNER D, REDMAN R, PANTOJA R, NOBLE B, TRAN L. 2012. Early Mortality Syndrome Affects Shrimp in Asia. *Global Aquaculture Advocate* (No.1).
- LIU L, XIAO J, ZHANG M, ZHUA W, XIA X, DAI X, ..., WANG Y. 2018. A *Vibrio owensii* strain as the causative agent of AHPND in cultured shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Journal of Invertebrate Pathology*. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2018.02.005>
- NUNAN L, LIGHTNER D, PANTOJA C, GOMEZ-JIMENEZ S. 2014. Detection of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in Mexico. *Dis. Aquatic Organ.* 111(1): 81-86.
- OIE. 2016. Enfermedad de la necrosis hepatopancreática aguda. Capítulo 2.2.1. En: Manual de las pruebas de diagnóstico para los animales acuáticos.
- PRODUCE. 2018. Anuario estadístico Pesquero y Acuicola. Lima, Perú.
- 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. *Genom. Data* 9, 143-144. <http://dx.doi.org/10.1016/j.gdata.2016.08.008>.
- SIRIKHARIN R, TAENGCHAIYAPHUM S, SANGUANRUT P, CHI T D, MAVICHAK R, PROESPRAIWONG P, *et al.* 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 (5), e0126987
- SOTO S A, GOMEZ-GIL B, LOZANO R. 2010. 'Bright-red' syndrome in Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* is caused by *Vibrio harveyi*. *J. Dis. Aquat. Organ.* 92:11-19. doi:10.3354/dao02274
- THOMPSON F, GEVERS D, THOMPSON C, DAWYNDT P, NASER S, HOSTE B, ..., SWINGS J. 2005. Phylogeny and molecular identification of *Vibrios* on the basis of multilocus sequence analysis. *Applied and environmental microbiology*. 71(9): 5107-5115
- TINWONGGER S, PROESPRAIWONG P, THAWONSUWAN P, KONGKUMNERD J, CHAWEEPACK T, MAVICHAK R, ..., HIRONO I. 2014. Development of PCR diagnostic for shrimp acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) strain of *Vibrio parahaemolyticus*. *Fish Pathology*. 49(4): 159-164.

- TRAN L, NUNAN L, REDMAN R, MOHNEY L, PANTOJA C, FITZSIMMONS K, *et al.* 2013. Determination of the infectious nature of the agent of acute hepatopancreatic necrosis syndrome affecting penaeid shrimp. *Dis. Aquatic Organ.* 105 (1): 45-55. <http://dx.doi.org/10.3354/dao02621>
- TRUJILLO T, AGUIRRE-GUZMÁN G, SÁNCHEZ J G, RÁBAGO-CASTRO J. 2005. Patogenicidad de *Vibrio parahaemolyticus* y *Vibrio* sp. en juveniles de camarón blanco del Pacífico (*Litopenaeus vannamei*, Boone, 1931). *Cienc. Mar.* 27:11-18.
- WEISBURG W, BARNS S, PELETIER D, LANE D. 1991. 16S Ribosomal DNA Amplification for Phylogenetic Study. *Journal of bacteriology.* 173(2): 697-703.
- YANG Y, CHEN I, LEE C, CHEN C, LIN S, HOR L, ..., 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 Announcements* 2(5). <http://dx.doi.org/10.1128/genomeA.00816-14.e00816-00814>