

CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE VIRUS DEL SÍNDROME DE LAS MANCHAS BLANCAS Y DE BACTERIAS *Vibrio* COLECTADOS EN PENEIDOS SILVESTRES DE PERÚ

GENETIC CHARACTERIZATION OF THE WHITE SPOT SYNDROME VIRUS AND *Vibrio* BACTERIA ISOLATED FROM WILD PENAEID SHRIMP POPULATIONS IN PERU

Beder Ramírez^{1,*} 

Mervin Guevara¹ 

Alberto Ordinola-Zapata² 

¹ Instituto del Mar del Perú, Laboratorio Costero de Tumbes, Perú.

² Universidad Nacional de Tumbes, Facultad de Ingeniería Pesquera y Ciencias del Mar, Tumbes, Perú.

*Correspondencia. E-mail: bramirez@imarpe.gob.pe

Recibido: 30-06-2025, Aceptado: 10-11-2025, Publicado: 26-11-2025

RESUMEN

Debido a que los langostinos silvestres son potenciales fuentes de enfermedades infecciosas, la vigilancia sanitaria en estas poblaciones es importante para prevenir el riesgo de brotes en los centros de cultivo. En este trabajo, se analizaron langostinos silvestres de las especies *Litopenaeus vannamei* y *Litopenaeus stylirostris* provenientes de ambientes colindantes a los centros de cultivo en el norte del Perú, con el objetivo de caracterizar genéticamente al virus del síndrome de las manchas blancas (WSSV) y a bacterias *Vibrio* relacionadas con la enfermedad de la necrosis hepatopancreática aguda (AHPND), que son dos de los principales patógenos que causan enfermedades a los langostinos en cultivo. En una cepa del WSSV se analizó los marcos de lectura abierta (ORF) 75, 94, 125, 14/15, y 23/24, logrando detectar que los ORF 75, 94 y 125 están formados respectivamente por 6, 3 y 2 unidades repetitivas de tipo VNTR, mientras que los ORF 14/15 y 23/24 presentaron deleciones de ADN de 5138 pb y 11110 pb, respectivamente. En cuatro cepas de *Vibrio* relacionadas con la AHPND se secuenciaron 14 genes, lográndose identificar a tres cepas como *Vibrio parahaemolyticus* y una como *Vibrio campbellii*, mediante el secuenciamiento de los genes *16S ARN*, *rpoB*, *rpoA*, *recA* y *pyrH*; mientras que, con los genes *pirA*, *pirB*, *toxR*, *luxR*, *tdh*, *trh*, *tetB* y dos genes para proteasas, se logró caracterizar la variabilidad de sus factores de patogenicidad en las cuatro cepas de *Vibrio* analizadas. La detección de variantes genéticas en los patógenos evaluados proporciona una base sólida para estudios epidemiológicos y para el desarrollo de estrategias de manejo que mitiguen su impacto en la acuicultura de langostinos.

PALABRAS CLAVE: WSSV, *Vibrio*, AHPND, ORF, genotipos, patogenicidad

ABSTRACT

Since wild shrimp can serve as reservoirs for infectious agents, ongoing health surveillance of these populations is essential to prevent disease outbreaks in aquaculture systems. This study analyzed wild specimens of *Litopenaeus vannamei* and *Litopenaeus stylirostris* collected from coastal environments adjacent to shrimp farms in northern Peru, with the objective of genetically characterizing the white spot syndrome virus (WSSV) and *Vibrio* species associated with acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND)—two of the most critical pathogens affecting cultured shrimp worldwide. In one WSSV strain, five open reading frames (ORFs 75, 94, 125, 14/15, and 23/24) were examined. ORFs 75, 94, and 125 consisted of six, three, and two variable number tandem repeat (VNTR) units, respectively, while ORFs 14/15 and 23/24 exhibited DNA deletions of 5,138 bp and 11,110 bp. For *Vibrio* isolates associated with AHPND, fourteen genes were sequenced. Phylogenetic analysis identified three strains as *Vibrio parahaemolyticus* and one as *Vibrio campbellii*, based on the sequences of 16S rRNA, *rpoB*, *rpoA*, *recA*, and *pyrH*. In addition, the presence and variability of virulence factors were characterized through the analysis of *pirA*, *pirB*, *toxR*, *luxR*, *tdh*, *trh*, *tetB*, and two protease genes, revealing distinct pathogenicity profiles among the four isolates. The identification of genetic variants in both WSSV and *Vibrio* strains provides valuable insight into their molecular diversity and lays the groundwork for epidemiological studies and the development of biosecurity and management strategies aimed at reducing their impact on shrimp aquaculture.

KEYWORDS: WSSV, *Vibrio*, AHPND, ORF, genotypes, pathogenicity

1. INTRODUCCIÓN

Los brotes de enfermedades en especies en cultivo suponen un riesgo significativo para la industria acuícola, ya que causan un elevado impacto económico (CAIN, 2022). Uno de los factores que facilita el desarrollo de estas enfermedades, es el contagio desde especies silvestres que actúan como reservorios de patógenos (WALKER & WINTON, 2010). Su propagación en los sistemas de cultivo se ve favorecida por su capacidad para infectar a una gran variedad de especies silvestres (CHANG *et al.*, 2011) y establecerse como parte de las enfermedades endémicas.

Entre las medidas de control para disminuir el riesgo de propagación de los patógenos a partir de especies reservorio, destacan la identificación de dichas especies (NIELSEN *et al.*, 2023), la implementación de barreras para excluirlas (TURKMEN & TOKSEN, 2010) y la caracterización molecular de los patógenos (FOURNIER *et al.*, 2014). En conjunto, estas medidas favorecen una adecuada aplicación de vigilancia sanitaria.

Como parte de los programas de vigilancia sanitaria desarrollados por el Instituto del Mar del Perú (IMARPE) se ha detectado que las especies silvestres de langostinos de lugares cercanos a las zonas de cultivo del norte, presentan diferentes patógenos que afectan a los langostinos en cultivo (ALFARO AGUILERA *et al.*, 2010; RAMÍREZ *et al.*, 2020a). Actualmente, las investigaciones se han enfocado en el virus del síndrome de las manchas blancas (WSSV por sus siglas en inglés) y dos especies de bacterias del género *Vibrio* relacionadas con la enfermedad de la necrosis hepatopancreática aguda (AHPND por sus siglas en inglés) los que vienen siendo caracterizados molecularmente, con la finalidad de mejorar la comprensión de estos patógenos.

Actualmente, se conoce que la principal característica molecular del WSSV, está en el tamaño de su genoma, que tiene aproximadamente 300 kb distribuidos en una doble cadena de ADN circular (YANG *et al.*, 2001; VAN HULTEN *et al.*, 2001). No obstante, los genomas del WSSV analizados en diferentes países del mundo presentan variantes en su tamaño (RAMOS-PAREDES *et al.*, 2017; TANG *et al.*, 2013). Las principales variantes genéticas

1. INTRODUCTION

Disease outbreaks in aquaculture species represent a major threat to the global aquaculture industry due to their substantial economic consequences (CAIN, 2022). One of the main factors contributing to the emergence and persistence of these diseases is the transmission of pathogens from wild populations that act as natural reservoirs (WALKER & WINTON, 2010). Their spread in farming systems is further facilitated by the broad host range of many pathogens, enabling infection across multiple wild species and the subsequent establishment of endemic diseases (CHANG *et al.*, 2011).

To mitigate the risk of pathogen transmission from reservoir hosts, several control measures have been proposed, including the identification of carrier species (NIELSEN *et al.*, 2023), the implementation of exclusion barriers (TURKMEN & TOKSEN, 2010), and the molecular characterization of the pathogens involved (FOURNIER *et al.*, 2014). Combined, these approaches strengthen aquatic animal health surveillance and contribute to more effective biosecurity management.

As part of the aquatic health surveillance programs led by the *Instituto del Mar del Perú* (IMARPE), wild penaeid shrimp species inhabiting areas adjacent to shrimp farms in northern Peru have been found to harbor pathogens that also affect farmed populations (ALFARO AGUILERA *et al.*, 2010; RAMÍREZ *et al.*, 2020a). Current studies have focused on two major pathogens: the white spot syndrome virus (WSSV) and bacteria of the genus *Vibrio* associated with acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND). Molecular characterization of these pathogens aims to improve understanding of their genetic diversity, transmission dynamics, and epidemiological significance.

The WSSV genome is a circular, double-stranded DNA molecule approximately 300 kb in length (YANG *et al.*, 2001; VAN HULTEN *et al.*, 2001). Nevertheless, comparative genomic

del WSSV están relacionadas con deleciones del genoma en los marcos de lectura abierta (ORF) 14/15 y 23/24, así como con las repeticiones en tándem de número variable (VNTR) ubicados en los ORF 75, 94 y 125, que presentan un número diferente de unidades repetitivas (UR) (MARKS *et al.*, 2004; DIEU *et al.*, 2004).

Respecto a las bacterias del género *Vibrio* que causan la enfermedad de la AHPND, la principal característica es la presencia de dos genes (*pirA* y *pirB*) que codifican para proteínas homólogas a las toxinas *Photorhabdus insect-related* (Pir) las que fueron descritas inicialmente en *Photorhabdus* sp. (TRAN *et al.*, 2013). Estos genes se encuentran en un plásmido de ADN de aproximadamente 70 kb y están flanqueados por elementos genéticos transponibles que frecuentemente alteran la secuencia de estos genes y la patogenicidad de las bacterias. Entre las especies de *Vibrio* en las cuales se han detectado estos genes, se encuentran *V. parahaemolyticus* (TRAN *et al.*, 2013; RAMÍREZ *et al.*, 2020b), *V. harveyi* (KONDO *et al.*, 2015), *V. campbellii* (HAN *et al.*, 2016; VICENTE *et al.*, 2020), *V. owenssii* (LIU *et al.*, 2018) y *V. punensis* (RESTREPO *et al.*, 2018).

Adicionalmente a los genes *pirA* y *pirB*, los vibrios también pueden tener otros genes que influyen en su capacidad patogénica, entre estos destacan *toxR* y *luxR* (MUTHUKRISHNAN *et al.*, 2022) que son capaces de regular la activación de otros genes al actuar como factores de transcripción; los genes *tdh* y *trh* que producen hemolisinas de importancia en salud pública (LETCHUMANAN *et al.*, 2014) y el gen *tetB* que les confiere la capacidad de resistir a diversos antibióticos de la familia de las tetraciclinas, entre ellos a tetraciclina, minociclina y doxiciclina (CABELLO *et al.*, 2013).

Considerando que una adecuada vigilancia sanitaria, requiere el conocimiento de las características moleculares de los patógenos (STÄRK *et al.*, 2019) en este trabajo, se evaluaron diferentes marcadores moleculares, con la finalidad de caracterizar genéticamente al WSSV y bacterias del género *Vibrio* relacionadas con la AHPND, que fueron aislados en langostinos silvestres en la costa norte de Perú.

analyses have revealed notable size variation among WSSV strains from different regions worldwide (RAMOS-PAREDES *et al.*, 2017; TANG *et al.*, 2013). The most frequent genetic variations are associated with deletions in open reading frames (ORFs) 14/15 and 23/24, as well as with variable number tandem repeats (VNTRs) located in ORFs 75, 94, and 125, which differ in the number of repetitive units they contain (MARKS *et al.*, 2004; DIEU *et al.*, 2004).

In the case of *Vibrio* species responsible for AHPND, pathogenicity is primarily determined by the presence of the *pirA* and *pirB* genes, which encode proteins homologous to the *Photorhabdus insect-related* (Pir) toxins initially described in *Photorhabdus* spp. (TRAN *et al.*, 2013). These genes are located on a ~70 kb plasmid flanked by transposable elements, which can alter gene sequences and modulate bacterial virulence. The *pirA* and *pirB* genes have been identified in *V. parahaemolyticus* (TRAN *et al.*, 2013; RAMÍREZ *et al.*, 2020b), *V. harveyi* (KONDO *et al.*, 2015), *V. campbellii* (HAN *et al.*, 2016; VICENTE *et al.*, 2020), *V. owenssii* (LIU *et al.*, 2018), and *V. punensis* (RESTREPO *et al.*, 2018).

Besides *pirA* and *pirB*, other genes contribute to the pathogenic potential of *Vibrio* species. Notably, *toxR* and *luxR* act as transcriptional regulators that modulate the expression of virulence-associated genes (MUTHUKRISHNAN *et al.*, 2022); *tdh* and *trh* encode hemolysins with implications for public health (LETCHUMANAN *et al.*, 2014); and *tetB* confers resistance to multiple tetracycline antibiotics, including tetracycline, minocycline, and doxycycline (CABELLO *et al.*, 2013).

Recognizing that effective health surveillance depends on a detailed understanding of pathogen molecular characteristics (STÄRK *et al.*, 2019), the present study applied a set of molecular markers to genetically characterize WSSV and *Vibrio* species associated with AHPND isolated from wild penaeid shrimp along the northern coast of Peru.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Colecta de muestras

Los patógenos analizados en este trabajo se aislaron de ejemplares silvestres de *Litopenaeus vannamei* y *Litopenaeus stylirostris* (Tabla 1) recolectados en investigaciones llevadas a cabo por el Laboratorio de Sanidad Acuícola (LSA) del IMARPE en diferentes años en canales de marea del manglar de zonas próximas a los campos de cultivo de las provincias de Zarumilla y Tumbes, ubicadas en las coordenadas indicadas en la Tabla 1 y la Figura 1.

2. MATERIALS AND METHODS

Sample Collection

The pathogens analyzed in this study were isolated from wild specimens of *Litopenaeus vannamei* and *Litopenaeus stylirostris* (Table 1). The samples were collected during field investigations conducted by the IMARPE's Aquatic Animal Health Laboratory over different years in tidal channels of mangrove ecosystems located near shrimp farming areas in the provinces of Zarumilla and Tumbes, northern Peru. The geographic coordinates of each collection site are provided in Table 1 and Figure 1.

Tabla 1.- Datos de las muestras colectadas en este trabajo

Table 1. Details of wild shrimp samples collected in this study

Especie	Peso (g)	Canal de marea (Coordenadas geográficas)	Año de colecta	Código de cepa aislada	Tipo de Patógeno
<i>L. stylirostris</i>	8,7	Soledad (3°27'32,0"S; 80°18'32,1"O)	2016	746_WSSV	WSSV
<i>L. stylirostris</i>	4,4	Bendito (3°27'00,0"S; 80°19'02,8"O)	2018	Ls_Be	<i>Vibrio</i> (pirAB+)
<i>L. vannamei</i>	7,6	Algarrobo (3°28'13,7"S; 80°17'53,8"O)	2018	Lv_Alg	<i>Vibrio</i> (pirAB+)
<i>L. vannamei</i>	0,8	Bendito (3°27'00,0"S; 80°19'02,8"O)	2018	Lv_Be	<i>Vibrio</i> (pirAB+)
<i>L. vannamei</i>	0,34	Alcalde (3°31'23,2"S; 80°26'58,1"O)	2018	Lv_Alc	<i>Vibrio</i> (pirAB+)



Figura 1.- Ubicación de los canales de marea de manglar donde fueron colectadas las muestras de langostinos silvestres. P1: Algarrobo, P2: Soledad, P3: Bendito y P4: Alcalde

Figure 1. Location of the mangrove tidal channels where wild shrimp samples were collected. P1: Algarrobo, P2: Soledad, P3: Bendito, and P4: Alcalde

Caracterización genética de WSSV

La cepa WSSV aislada, fue caracterizada contabilizando el número de las variaciones de los UR de 45 y 57 pb que existen en el ORF 75 y de 54 y 69 pb en los ORF 94 y 125, respectivamente. Adicionalmente, se evaluó el tamaño de las deleciones de ADN que se encuentran en los ORF 14/15 y 23/24, con respecto a las cepas de referencia TH-96-II (Accesión: AY753327.1) y Taiwán (Accesión: AF440570).

Para analizar cada uno de los marcadores de variabilidad genética del WSSV, se extrajo una muestra de ADN de WSSV a partir del tejido branquial de langostino, utilizando el método dodeciltrimetilamonio bromuro/bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB-DTAB) de acuerdo con lo descrito por RAMÍREZ *et al.* (2024). La calidad y concentración del ADN fue medido en un equipo Nanodrop (*Thermo Fisher Scientific*) considerando un rango aceptable de índice de absorbancia (A_{260}/A_{280}) entre 1,7 y 2,0 (TEARE *et al.*, 1997). La detección y amplificación de las regiones del ADN del WSSV fueron realizadas mediante la PCR en un equipo termociclador 9800 Fast (*Applied Biosystem*), la reacción de la PCR estuvo compuesta por 1 μ L del ADN extraído (50-100 ng/ μ L), 1 μ L de cada iniciador (Tabla 2) *forward* y *reverse* de 5 μ M (0,2 μ M de concentración final), 9,5 μ L de agua libre de nucleasas y 12,5 μ L del kit Dream Taq Green PCR (*Thermo Scientific*). La programación del termociclador para las PCRs, consistió en una des-

Genetic Characterization of WSSV

The isolated WSSV strain was genetically characterized by analyzing the number of variable repeat units (VRUs) of 45 and 57 bp in ORF75, and 54 and 69 bp in ORFs 94 and 125, respectively. In addition, the sizes of DNA deletions present in ORFs 14/15 and 23/24 were determined relative to the reference strains TH-96-II (Accession: AY753327.1) and Taiwan (Accession: AF440570).

For the analysis of each genetic variability marker, WSSV DNA was extracted from shrimp gill tissue using the cetyltrimethylammonium bromide/dodecyltrimethylammonium bromide (CTAB-DTAB) method, following the protocol described by RAMÍREZ *et al.* (2024). DNA quality and concentration were assessed with a Nanodrop spectrophotometer (*Thermo Fisher Scientific*), ensuring an absorbance ratio (A_{260}/A_{280}) within the acceptable range of 1.7–2.0 (TEARE *et al.*, 1997). Amplification of WSSV DNA regions was performed by PCR using a 9800 Fast thermocycler (*Applied Biosystems*). Each 25 μ L reaction included 1 μ L template DNA (50–100 ng/ μ L), 1 μ L each of forward and reverse primers (5 μ M; final concentration 0.2 μ M; Table 2), 9.5 μ L nuclease-free water, and 12.5 μ L DreamTaq Green PCR Master Mix (*Thermo Scientific*). The PCR thermal profile

Tabla 2.- Iniciadores utilizados para la detección del WSSV y evaluación las regiones de ADN variables

Table 2. Primers used for WSSV detection and analysis of variable DNA regions

Nombre	Secuencia 3' – 5'	*Th (°C)	**Tp (s)	Referencia
146F1	ACTACTAACTTCAGCCTATCTAG	62	90	Lo <i>et al.</i> (1996)
146R1	TAATGCGGGTGTAATGTTCTTACGA			
146F2	GTAAC TGCCCTTCCATCTCCA	62	60	
146R2	TACGGCAGCTGCTGCACCTTGT			
WO75-F	GTGAAGCAGTATCTCTAACACCAG	62	60	
WO75-R	GGTGCGTAAAAGAAGTCGAGATC			
WO94-F	CGGTGTGCTGTTAGCCCGTGC	62	60	RAMOS-PAREDES <i>et al.</i> (2017)
WO94-R	GTATATGGCATCATGGCACCAC			
WO125-F	CAGAAAATTGTTGTCCCTGTCTC	60	75	
WO125-R	CCCCTTTTCTAGTTCCATGTCTTC			
VR14/15-screen-F	GAGATGCGAACCCTAAAAG	50	90	DIEU <i>et al.</i> (2004)
VR14/15-screen-R	ATGGAGGCGAGACTTGC			
VR23/24-CM-F	CAGATAATGCAAACACGAGACAC	51	120	DIEU <i>et al.</i> (2011)
VR23/24-TV-R	ATGATTGTATTCGTCGAAGG			

*Th: temperatura de hibridación, **Tp: tiempo de polimerización

naturalización inicial de 95 °C por 5 minutos, 40 ciclos de 95 °C por 30 segundos, una temperatura de hibridación (Th) por 30 segundos, 72 °C por un tiempo de polimerización (Tp) y una polimerización final a 72 °C por 5 minutos, la Th y Tp variaron de acuerdo al tipo de iniciador y sus valores se describen en la Tabla 2.

Los productos amplificados en las PCRs fueron visualizados por electroforesis en un gel de agarosa (Merck) al 1,5% utilizando Sybr Safe 1X (Invitrogen) como agente intercalante y TAE 1X (Merck) como tampón de electroforesis y luego fueron secuenciados por la empresa MacroGen. Las secuencias obtenidas de ADN, fueron editadas y alineadas mediante el programa MEGA7 y comparadas mediante el programa BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) con secuencias disponibles en la base de datos del GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>).

Caracterización genética de vibrios relacionados con la AHPND

Las cepas bacterianas, fueron caracterizadas mediante la secuenciación parcial y análisis de diferentes genes relacionados con su filogenia (16S ARNr, *rpoB*, *rpoA*, *pyrH* y *recA*) y con factores de patogenicidad, considerando los genes relacionados con la enfermedad de la AHPND (*pirA* y *pirB*), con los factores de transcripción (*toxR* y *luxR*), con las hemolisinas (*tdh* y *trh*), con las proteasas (serina y metalo-proteasas) y con la resistencia a antibióticos del grupo de tetraciclinas (*tetB*). El aislamiento, se realizó en los medios microbiológicos tiosulfato citrato bilis sacarosa (TCBS) Oxoid y Chromatic *Vibrio* (Liofilchem) por 24 horas a 35 °C, utilizando una muestra de 20 mg del hepatopáncreas de langostinos. A las cepas bacterianas aisladas se les extrajo el ADN empleando DTAB/CTAB de acuerdo con lo descrito por RAMÍREZ *et al.* (2020b).

Los análisis de PCR, electroforesis y secuenciación, fueron realizados de modo similar a lo descrito para el WSSV, variando únicamente en el tipo de iniciadores utilizados, que en este caso estuvieron dirigidos contra secuencias específicas en el genoma de las bacterias del género *Vibrio*. Los iniciadores se describen en la Tabla 3.

consistió de una inicial denaturación a 95 °C por 5 min, seguido por 40 ciclos de 95 °C por 30 s, temperatura específica de annealing (Th) por 30 s, y 72 °C por un tiempo de extensión (Tp), concluyendo con una extensión final a 72 °C por 5 min. Annealing and extension parameters varied by primer pair and are detailed in Table 2.

Amplicons were resolved by electrophoresis on 1.5% agarose gels (Merck) stained with SYBR Safe (1X; Invitrogen) in 1X TAE buffer (Merck). Successfully amplified products were purified and submitted for bidirectional Sanger sequencing at MacroGen Inc. The obtained DNA sequences were edited and aligned using MEGA7, and their identities were verified through BLAST searches (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) against publicly available sequences in the GenBank database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>).

Genetic Characterization of *Vibrio* Strains Associated with AHPND

The bacterial isolates were characterized through partial sequencing and analysis of several genes related to phylogeny — 16S rRNA, *rpoB*, *rpoA*, *pyrH*, and *recA*— as well as genes associated with virulence, including *pirA* and *pirB* (AHPND-related toxins), *toxR* and *luxR* (transcriptional regulators), *tdh* and *trh* (hemolysins), serine and metalloproteases, and *tetB* (tetracycline resistance). Bacteria were isolated from 20 mg of shrimp hepatopancreas using TCBS agar (Oxoid) and Chromatic *Vibrio* agar (Liofilchem), incubated for 24 h at 35°C. Genomic DNA was extracted using the CTAB/DTAB method as described by RAMÍREZ *et al.* (2020b).

PCR, electrophoresis, and sequencing procedures followed the same protocols as those used for WSSV, except for the specific primers targeting *Vibrio*-related sequences (listed in Table 3).

Tabla 3.- Iniciadores utilizados para la caracterización molecular de cepas de *Vibrio* relacionadas con la AHPND

Table 3.- Primers used for molecular characterization of AHPND-related *Vibrio* isolates

Gen	Secuencia de iniciador <i>Forward</i>	Secuencia de iniciador <i>Reverse</i>	Th* (°C)	Tp* (seg)	Tamaño de producto (pb)	Referencia
16s ARNr	AGAGTTTGATYMTGGCTCAG	GNT ACC TTG TTACGACTT	52	90	1508	Weisburg <i>et al.</i> (1991)
<i>rpoB</i>	AACATCGGTCTGTCAACTC	ACACCCTTGTTACCGTGACGACC	55	75	1523	Ki <i>et al.</i> (2009)
<i>rpoA</i>	ATGCAGGGTTCTGTDACAG	GHGGCCARTTTTCHARRCGC	55	90	931	Thompson <i>et al.</i> (2005)
<i>PyrH</i>	GTRAABGCNGMYARRTCCA	ATGASNACBAAYCCWAAACC	55	60	599	
<i>RecA</i>	TGARAARCARTTYGGTAAAGG	TCRCCNTTRTAGCTRIACC	55	75	783	
<i>pirA</i>	TGACTATTCTACGATTGGACTG	CACGACTAGCGCCATTGTTA	60	30	284	Han <i>et al.</i> (2015a)
<i>pirB</i>	TGATGAAGTGATGGGTGCTC	TGTAAGCGCCGTTTAACTCA	60	30	392	
<i>pirAB</i>	GCACCGTAAATTTTCAGGTT	CGTTGCAATCTAAGACATAG	50	135	2020	Phiwsaiyaet <i>al.</i> (2017)
<i>tetB</i>	TTGCGGGAATTTGGCCTATCAATT	GTTGAGACGCAATCGAATTCGGTAT	58	30	103	Han <i>et al.</i> (2015b)
<i>toxR</i>	ATACGAGTGGTTGCTGTCATG	GTCTTCTGACGCAATCGTTG	63	30	368	Kim <i>et al.</i> (1999)
<i>luxR</i>	TCAAGATTGCAAGAGACCTCG	AGCAAACACTTCAAGAGCGA	55	30	84	Defoirdt <i>et al.</i> (2007)
Me-pro	CTGAACGACGCCATTATTT	CGCTGACACATCAAGGCTAA	53	30	201	Ruwandeepika <i>et al.</i> (2011)
Se-pro	TGCACGACCAGTTGCTTTAG	AAGTGGTCGTGAGCAATCC	55	30	232	
<i>tdh</i>	GTAAGGTCTCTGACTTTGGAC	TGGAATAGAACCTTCATCTCACC	58	30	269	Bej <i>et al.</i> (1999)
<i>trh</i>	TTGGCTTCGATATTTTCAGTATCT	CATAACAAACATATGCCCATTTCCG	58	45	500	

*Th: Temperatura de hibridación en °C y Tp: Tiempo de polimerización de la PCR en segundos

Evaluación de resistencia antimicrobiana de cepas de *Vibrio* aisladas

Los ensayos de antibiograma se realizaron en agar Mueller-Hinton (Merck) de acuerdo a la metodología descrita por AGUIRRE CHANTA *et al.* (2021) utilizando discos 30 µg de antibióticos comerciales disponibles localmente (Emarin SDA) y de uso relacionado con actividades acuícolas: Oxitetraciclina (OTC), enrofloxina (EEE), florfenicol (FFC) y sulfametoxazol con trimetoprima (SXT). Las cepas de *Vibrio* fueron activadas en 10 mL de caldo triplicasa soya (TSB) (Oxoid) por 24 h y se estandarizó sus densidades de forma aproximada a $1,5 \times 10^8$ UFC/mL. Antes de ser inoculada en el medio Mueller-Hinton, se colocaron los discos separados por una distancia adecuada y los resultados fueron registrados después de 24 h de incubación a 35 °C.

Desafío experimental con cepas de *Vibrio* aisladas

La prueba de desafío se realizó mediante sumersión de acuerdo a lo descrito por RAMÍREZ *et al.* (2020b) considerando por cada una de las cuatro cepas de *Vibrio* un tratamiento de tres réplicas, conformadas por 15 langostinos de $1,93 \pm 0,23$ g de peso y mantenidos en acuarios de 15 litros a una temperatura de $28,09 \pm 0,38$ °C controlada mediante termostatos. El inóculo bacteriano utilizado para el desafío fue de aproximadamente $4,74 \times 10^7$ UFC/mL de cada cepa y la mortalidad de los langostinos fue registrada hasta las 72 h post-infección.

Antimicrobial Susceptibility Testing of *Vibrio* Isolates

Antibiotic susceptibility tests were performed on Mueller-Hinton agar (Merck) following the procedure of AGUIRRE CHANTA *et al.* (2021). Commercial antibiotic discs (30 µg; Emardin SDA) commonly used in aquaculture were tested: oxytetracycline (OTC), enrofloxacin (EEE), florfenicol (FFC), and sulfamethoxazole-trimethoprim (SXT). *Vibrio* cultures were activated in tryptic soy broth (TSB; Oxoid) for 24 h, adjusted to approximately 1.5×10^8 CFU/mL, and inoculated onto agar plates. Antibiotic discs were placed at appropriate distances, and inhibition zones were measured after 24 h of incubation at 35 °C.

Experimental Challenge with *Vibrio* Isolates

Infection challenges were conducted by immersion following RAMÍREZ *et al.* (2020b). Each of the four *Vibrio* isolates was tested in triplicate groups of 15 shrimp (1.93 ± 0.23 g) maintained in 15 L aquaria at 28.09 ± 0.38 °C, regulated with thermostats. The bacterial inoculum was approximately 4.74×10^7 CFU/mL for each strain, and shrimp mortality was monitored for 72 hours post-infection.

3. RESULTADOS

Caracterización genómica de WSSV

Los ensayos de la PCR amplificaron productos de 1431, 988, 435, 545 y 616 pb, respectivamente en los ORF 14/15, 23/24, 75, 94 y 125 (Fig. 2). El análisis de las secuencias de estas regiones de ADN permitió detectar un total de siete UR en el ORF 75, tres repeticiones del UR de 54 pb en el ORF 94 y dos repeticiones del UR de 69 pb en el ORF125. La secuencia del producto amplificado en el ORF 14/15 carece de 5138 pb de ADN en comparación con la cepa TH-96-II (Accesión: AY753327.1) mientras que en el ORF 23/24 la ausencia de ADN detectada fue de 11110 pb, en comparación con la cepa Taiwán (Accesión: AF440570). Las variaciones de UR en los ORF 75 y 125, son diferentes a las detectadas en un trabajo anterior de RAMÍREZ *et al.* (2024) en langostinos de cultivo colindantes a los canales de marea del presente estudio (Tabla 4).

3. RESULTS

Caracterización genómica de WSSV

PCR assays successfully amplified fragments of 1431, 988, 435, 545, and 616 bp corresponding to ORFs 14/15, 23/24, 75, 94, and 125, respectively (Fig. 2). Sequence analysis of these genomic regions revealed the presence of seven repeat units (RU) within ORF 75, three 54 bp RUs in ORF 94, and two 69 bp RUs in ORF 125. The amplified fragment of ORF 14/15 exhibited a 5138 bp deletion compared to strain TH-96-II (Accession: AY753327.1), while ORF 23/24 showed an 11,110 bp deletion relative to the Taiwan strain (Accession: AF440570). The RU patterns detected in ORFs 75 and 125 differed from those reported by RAMÍREZ *et al.* (2024) in farmed shrimp collected from tidal channels adjacent to the sampling sites of this study (Table 4).

Tabla 4.- Número de Unidades repetitivas (UR) de los ORF 75, 94 y 125 del ADN de WSSV de langostino silvestre colectado en canales de marea del manglar de Tumbes.

*ND: No determinado debido a la amplificación por la PCR de dos productos diferentes

** Cepas de WSSV utilizadas como referencia

Table 4.- Number of repetitive units (RU) in ORFs 75, 94, and 125 of WSSV DNA obtained from wild shrimp collected in the mangrove tidal channels of Tumbes.

ND: Not determined due to the amplification of multiple PCR products
Reference WSSV strains are marked with double asterisks

Tipo de hospedero de WSSV	ORF 75			ORF 94		ORF 125		Referencia
	UR de 45 pb	UR de 57 pb	Producto de PCR (pb)	UR de 54 pb	Producto de PCR (pb)	UR de 69 pb	Producto de PCR (pb)	
Langostinos silvestres	5	1	435	3	545	2	616	Este trabajo
	* ND	*ND	600 y 700 aprox.	*ND	650 y 700 aprox.	3	685	
	6	2	537	1	437	* ND	900 y 1200 aprox.	
Langostinos de cultivo	5	2	492	3	545	3	685	RAMÍREZ <i>et al.</i> (2024)
	6	2	537	1	437	3	685	
	6	2	537	1	437	4	754	
	6	2	537	1	437	7	962	
	6	2	537	1	437	9	1100	
	6	2	537	1	437	13	1376	
Cepa TH**	12	3	865	6	707	4	754	
Cepa CN**	15	4	1057	12	1031	6	892	DIEU <i>et al.</i> (2004)
Cepa TW **	21	5	1384	6	707	6	892	

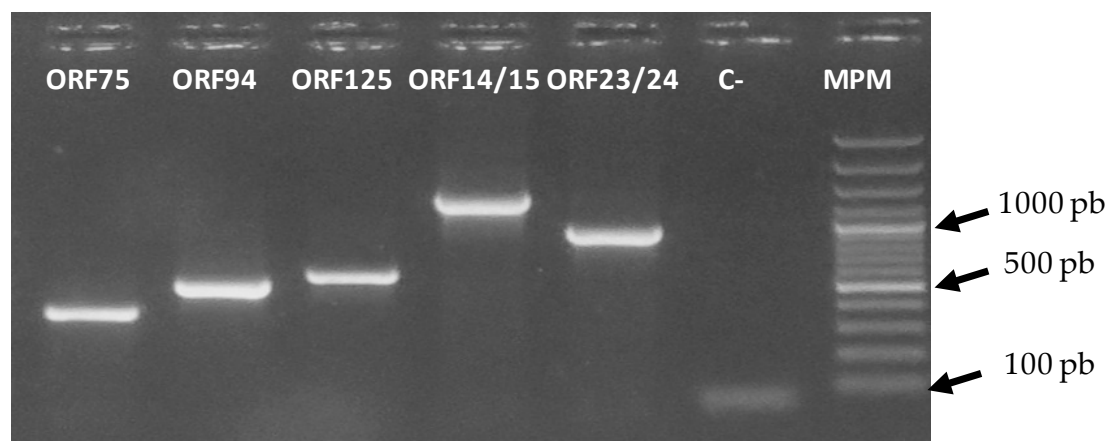


Figura 2.- Productos de la PCR amplificados en los ORF 75, 94, 125, 14/15 y 23/24 del ADN del WSSV detectado en un langostino silvestre del manglar de Tumbes.
C-: Control negativo, MPM: Marcador de peso molecular

Figure 2. PCR Amplicons from ORFs 75, 94, 125, 14/15, and 23/24 of WSSV DNA Detected in a Wild Shrimp from the Tumbes Mangrove.
C-: Negative control, MPM: Molecular weight marker

Caracterización genómica de vibrios relacionados con la AHPND

Las secuencias obtenidas con los iniciadores dirigidos a los genes *16S* ARN, *rpoB*, *rpoA*, *recA* y *pyrB* en tres cepas de *Vibrio* (Lv_Alc, Lv_Be y Lv_Alg) aisladas en este trabajo, están relacionadas filogenéticamente a *V. parahaemolyticus*, mientras que la cuarta cepa (Ls_Be) a *V. campbellii* (Tabla 5). Las colonias bacterianas identificadas como *V. parahaemolyticus* presentaron un color verde y malva, respectivamente en los agares TCBS y Chromogénico para *Vibrio*, el color de la colonia de la cepa de *V. campbellii* también fue verde en el agar TCBS, en cambio en el agar cromogénico para *Vibrio* fue crema con centro ligeramente verde (Fig. 3).

La PCR dúplex, dirigida a regiones parciales de los genes *pirA* y *pirB*, resultaron positivas en las cuatro cepas de *Vibrio* con productos respectivos de 284 y 392 pb; sin embargo, la PCR dirigida a una región de 2020 pb dentro de las cuales se encuentran las regiones completas de los genes *pirA* y *pirB*, fueron negativas (Fig. 4) en dos cepas de *V. parahaemolyticus* (Lv_Alg y Lv_Alc), los cuales causaron una baja mortalidad en langostinos (*L. vannamei*) desafiados experimentalmente (4 y 9 %) en comparación al 98 y 93 % alcanzado con las cepas Lv_Be (*V. parahaemolyticus*) y Ls_Be (*V. campbellii*).

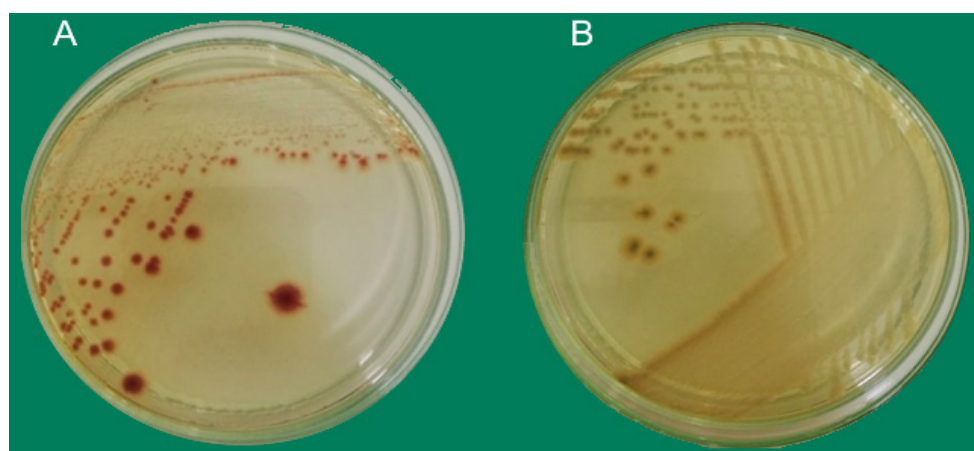
Genomic Characterization of AHPND-Related *Vibrio* Strains

Sequences obtained with primers targeting the *16S* ARN, *rpoB*, *rpoA*, *recA*, and *pyrB* genes from three *Vibrio* isolates (Lv_Alc, Lv_Be, and Lv_Alg) showed close phylogenetic relationships to *V. parahaemolyticus*, while a fourth isolate (Ls_Be) was affiliated with *V. campbellii* (Table 5). Colonies identified as *V. parahaemolyticus* appeared green on TCBS agar and mauve on Chromogenic *Vibrio* agar, while *V. campbellii* colonies were green on TCBS agar and cream-colored with a faint green center on Chromogenic *Vibrio* agar (Fig. 3).

Duplex PCR assays targeting partial regions of *pirA* and *pirB* genes yielded positive results in all four *Vibrio* isolates, producing amplicons of 284 and 392 bp, respectively. However, PCR assays amplifying a 2020 bp region encompassing both complete *pirA* and *pirB* genes were negative in two *V. parahaemolyticus* isolates (Lv_Alg and Lv_Alc). These two isolates caused low mortality (4% and 9%) in experimentally challenged *Litopenaeus vannamei*, compared with 98% and 93% mortality caused by isolates Lv_Be (*V. parahaemolyticus*) and Ls_Be (*V. campbellii*), respectively (Fig. 4).

Tabla 5.- Identificación mediante análisis filogenético de las cepas de *Vibrio* (AHPND+) aisladas de langostinos silvestres de los canales de marea del manglar de TumbesTable 5.- Phylogenetic identification of AHPND-positive *Vibrio* isolates recovered from wild shrimp collected in the mangrove tidal channels of Tumbes

Cepa	Canal de marea	Gen	Tamaño de secuencia (pb)	Similitud	Cepa alineada del GenBank	N° Accesoión
Lv_Alg	Algarrobo	16S ARNr	1492	99%	<i>V. parahaemolyticus</i> FORC_071	CP023485.1
		rpoA	946	99%	<i>V. parahaemolyticus</i> FORC_071	CP023485.1
		rpoB	1146	99%	<i>V. parahaemolyticus</i> 20130629002S01	CP020034.1
		recA	816	99%	<i>V. parahaemolyticus</i> FORC_023	CP012950.1
		pyrH	590	99%	<i>V. parahaemolyticus</i> BB22OP	CP003972.1
Lv_Be	Bendito	16S ARNr	1488	99%	<i>V. parahaemolyticus</i> FORC_071	CP023485.1
		rpoA	945	99%	<i>V. parahaemolyticus</i> FORC_071	CP023485.1
		rpoB	1134	99%	<i>V. parahaemolyticus</i> 20130629002S01	CP020034.1
		recA	817	99%	<i>V. parahaemolyticus</i> FORC_023	CP012950.1
		pyrH	590	100%	<i>V. parahaemolyticus</i> BB22OP	CP003972.1
Ls_Be	Bendito	16S ARNr	1489	99%	<i>V. campbellii</i> 170502	CP033134.1
		rpoA	938	100%	<i>V. campbellii</i> BoB-53	CP026321.1
		rpoB	1152	99%	<i>V. campbellii</i> LA16-V1	CP021145.1
		recA	810	100%	<i>V. campbellii</i> LA16-V1	CP021145.1
		pyrH	588	99%	<i>V. campbellii</i> 170502	CP033134.1
Lv_Alc	Alcalde	16S ARNr	1493	99%	<i>V. parahaemolyticus</i> FORC_071	CP023485.1
		rpoA	939	99%	<i>V. parahaemolyticus</i> FORC_071	CP023485.1
		rpoB	1337	99%	<i>V. parahaemolyticus</i> 20130629002S01	CP020034.1
		recA	774	99%	<i>V. parahaemolyticus</i> FORC_023	CP012950.1
		pyrH	590	99%	<i>V. parahaemolyticus</i> BB22OP	CP003972.1

Figura 3.- Cultivo en Chromatic *Vibrio* Agar (Liofilchem) de la cepa aislada de langostinos de cultivo. A: Colonias representativa de las cepas de *V. parahaemolyticus*. B: Colonias de la cepa de *V. campbellii*Figure 3. Growth on Chromatic *Vibrio* Agar (Liofilchem) of Isolates from Farmed Shrimp. A: Representative colonies of *V. parahaemolyticus* strains. B: Colonies of the *V. campbellii* strain

Los ensayos de la PCR dirigida a los marcadores moleculares relacionados con patogenicidad en *Vibrio* presentaron variaciones de acuerdo a la cepa y el tipo de gen evaluado (Fig. 5). Para el gen *toxR* se amplificó un producto aproximado de 368 pb en las tres cepas de *V. parahaemolyticus* (Lv_Alc, Lv_Alg y Lv_Be); en los genes *luxR*, *Me-pro* y *Se-*

PCR assays targeting molecular markers associated with *Vibrio* pathogenicity showed strain-specific amplification patterns (Fig. 5). The *toxR* gene (~368 bp) was detected in all three *V. parahaemolyticus* isolates (Lv_Alc, Lv_Alg, and Lv_Be), whereas only the *V. campbellii* isolate (Ls_Be) was positive for

pro solamente la cepa de *V. campbellii* (Ls-Be) resultó positiva, con productos de PCR de 84, 201 y 232 pb, respectivamente, mientras que las cuatro cepas de *Vibrio* fueron negativas por PCR para los genes de hemolisinas termoestables (*tdh* y *trh*).

luxR, *Me-pro*, and *Se-pro*, yielding products of 84, 201, and 232 bp, respectively. All four isolates were negative for the *tdh* and *trh* hemolysin genes.

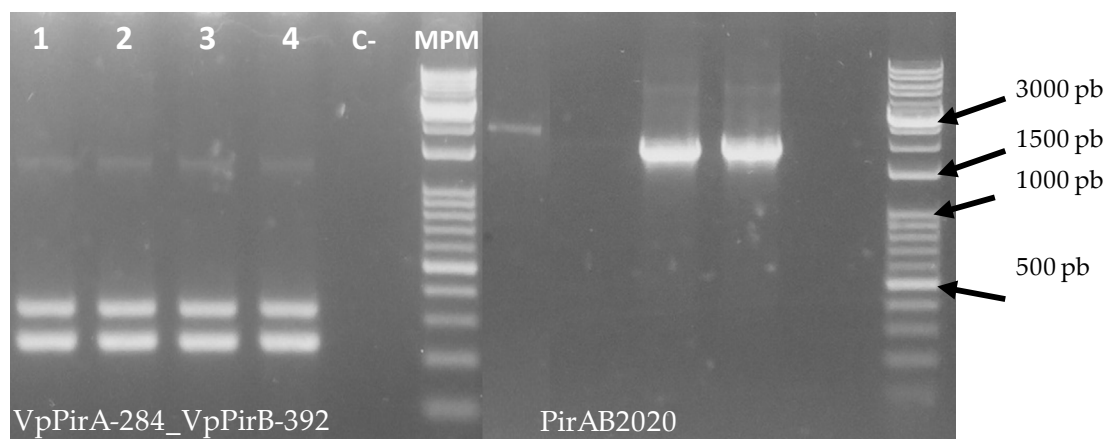


Figura 4.- Productos de la PCR amplificados con los iniciadores VpPirA284, VpPirB392 y PirAB2020, en las cepas de *Vibrio* aisladas de langostinos silvestres de los canales de marea del manglar de Tumbes. 1: cepa LvAlg, 2: LvAlc, 3: LsBe, 4: LvBe, C-: Control negativo y MPM: Marcador de peso molecular

Figure 4. PCR Amplicons Generated with Primers VpPirA284, VpPirB392, and PirAB2020 from *Vibrio* Strains Isolated from Wild Shrimp in Tidal Channels of the Tumbes Mangrove. 1: LvAlg strain, 2: LvAlc strain, 3: LsBe strain, 4: LvBe strain, C-: Negative control, MPM: Molecular weight marker

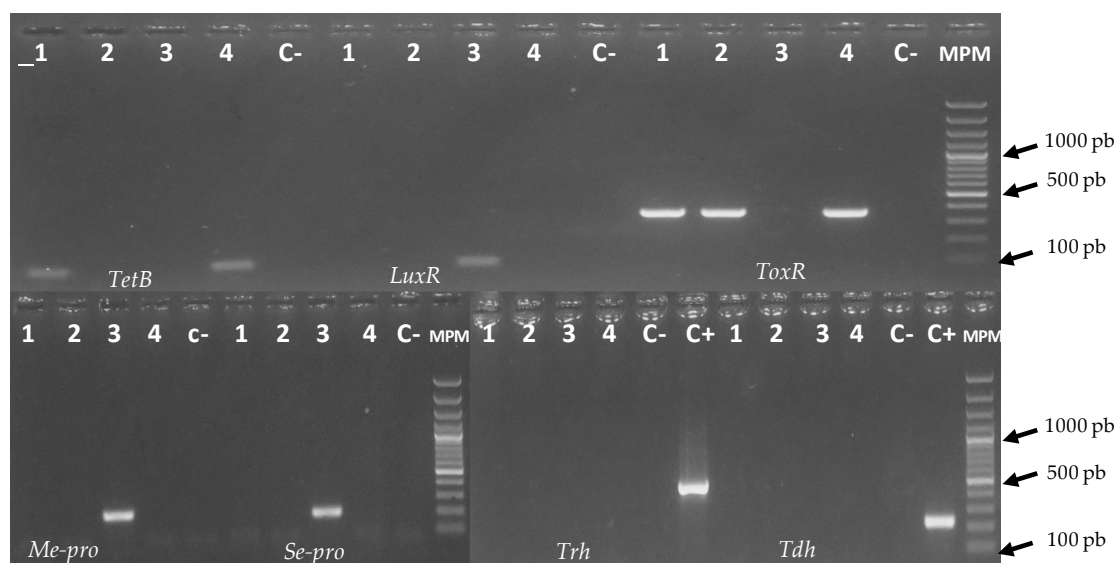


Figura 5.- Productos de la PCR amplificados con los iniciadores específicos para los genes *TetB*, *LuxR*, *ToxR*, *Me-pro*, *Se-pro*, *Trh* y *Tdh* en las cepas de *Vibrio* aisladas de langostinos silvestres de los canales de marea del manglar de Tumbes. 1: cepa LvAlg, 2: LvAlc, 3: LsBe, 4: LvBe, C-: Control negativo, C+: control positivo y MPM: Marcador de peso molecular. En los genes *Trh* y *Tdh* se consideró control positivo para validar los resultados negativos de todas las muestras analizadas

Figure 5. PCR products amplified with specific primers for the *TetB*, *LuxR*, *ToxR*, *Me-pro*, *Se-pro*, *Trh*, and *Tdh* genes in *Vibrio* strains isolated from wild shrimp collected in the mangrove tidal channels of Tumbes.

1: strain LvAlg, 2: LvAlc, 3: LsBe, 4: LvBe, C-: negative control, C+: positive control, and MWM: molecular weight marker. Positive controls were included for the *Trh* and *Tdh* genes to validate the negative results obtained in all analyzed samples

Los ensayos de PCR desarrollados con los iniciadores específicos al gen *tetB*, el cual está relacionado con la resistencia bacteriana, frente a los antibióticos de tetraciclinas, produjeron un producto de aproximadamente 100 pb en dos cepas de *V. parahaemolyticus* (Lv_Alq y Lv_Be). Mediante ensayos de antibiograma (Fig. 6) se corroboró que estas 2 cepas fueron resistentes a oxitetraciclina (OTC) y sensible a enrofloxacin (EEE), florfenicol (FFC) y sulfametoxazol con trimetoprima (SXT).

PCR assays with primers targeting the *tetB* gene—associated with bacterial resistance to tetracyclines—produced an ~100 bp product in two *V. parahaemolyticus* isolates (Lv_Alq and Lv_Be). Antibiotic susceptibility testing (Fig. 6) confirmed that these isolates were resistant to oxytetracycline (OTC) but sensitive to enrofloxacin (EEE), florfenicol (FFC), and sulfamethoxazole-trimethoprim (SXT).

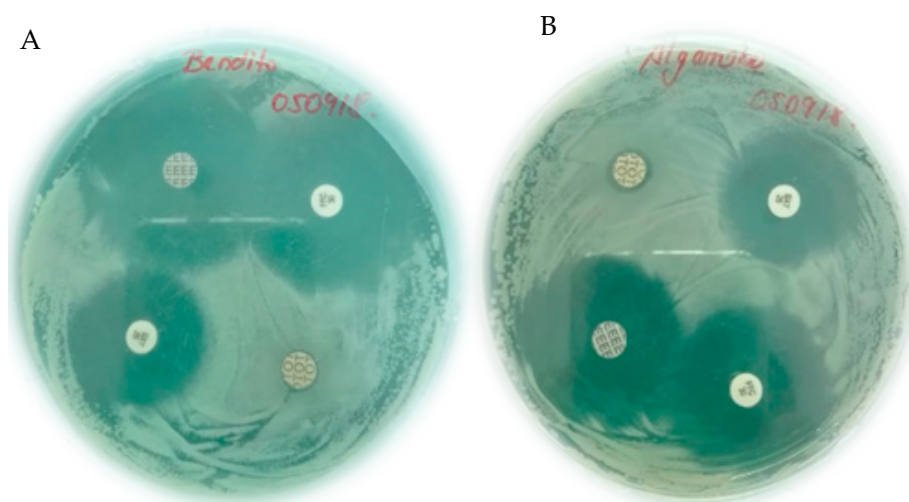


Figura 6.- Placas de cultivo microbiológico con ensayos de antibiograma. A: Cepa Lv_Be y B: Cepa Lv_Alq, EE: disco con antibiótico Enrofloxacin, FFC: florfenicol, SXT: sulfametoxazol con trimetoprima y OTC: oxitetraciclina

Figure 6. Microbiological culture plates showing antibiotic susceptibility (antibiogram) assays. A: strain Lv_Be and B: strain Lv_Alq. EE: enrofloxacin disk, FFC: florfenicol, SXT: sulfamethoxazole with trimethoprim, and OTC: oxytetracycline

4. DISCUSIÓN

El presente estudio permitió caracterizar genéticamente variantes del virus del síndrome de las manchas blancas (WSSV) y de *Vibrio* spp. en langostinos silvestres (*Litopenaeus vannamei* y *Litopenaeus stylirostris*) de la costa norte de Perú, destacando diferencias significativas en comparación con cepas reportadas previamente en langostinos de cultivo. Estas variaciones genéticas podrían estar influenciadas por factores ecológicos que afectan a las poblaciones silvestres, como la interacción con otros patógenos o las fluctuaciones ambientales como los cambios bruscos en la temperatura y salinidad, que pueden inducir estrés en el hospedero, modulando su susceptibilidad y actuando como presión selectiva que influye en la diversidad genética del WSSV (WALKER & WINTON, 2010). Se ha documentado que la temperatura es un factor crí-

4. DISCUSSION

This study genetically characterized variants of the white spot syndrome virus (WSSV) and *Vibrio* spp. in wild populations of *Litopenaeus vannamei* and *L. stylirostris* along the northern coast of Peru. Significant genetic differences were observed compared to previously reported strains from farmed shrimp. These genetic variations may be influenced by ecological factors affecting wild populations, such as interactions with other pathogens or environmental fluctuations in temperature and salinity, which can induce host stress, alter susceptibility, and act as selective pressures shaping WSSV genetic diversity (WALKER & WINTON, 2010). Temperature, in particular, is a critical regulator of viral replication and disease progression, as deviations from the

tico que regula la replicación viral y la progresión de la enfermedad, donde fluctuaciones fuera del rango óptimo pueden alterar la dinámica del patógeno y favorecer variantes genéticas (RAHMAN *et al.*, 2006). Por lo tanto, el ambiente dinámico del ecosistema marino costero podría ser un driver clave en la evolución y la estructura genética poblacional del WSSV en hospederos silvestres.

La caracterización genética de las cepas de WSSV obtenidas en langostinos silvestres evidenció la presencia de variaciones en las unidades repetitivas en los marcos de lectura abierta (ORF) 75, 94 y 125, además de deleciones significativas en los ORF 14/15 y 23/24, en comparación a las cepas de WSSV inicialmente descritas. Estas diferencias, particularmente, la menor cantidad de repeticiones en los ORF 75 y 125, son notoriamente distintas a las encontradas en cepas de WSSV previamente detectadas en cultivos de langostinos en la misma región geográfica (RAMÍREZ *et al.*, 2024) por lo que podrían utilizarse como marcadores moleculares para identificar las rutas de transmisión durante un brote de la enfermedad.

En comparación con la cepa de referencia del WSSV de Taiwán (WANG *et al.*, 1995), el ORF 75 de las cepas de WSSV analizadas en este trabajo, tienen alrededor de 15 UR menos, evidenciando la predisposición del WSSV a disminuir el número de UR en esta región de ADN durante su dispersión entre sus hospederos. En algunas variantes del WSSV, esta disminución es aún más acentuada, llegando a tener un máximo de tres UR en cepas de Madagascar, Mozambique y Arabia Saudita (TANG *et al.*, 2013), de cuatro UR en una cepa de Korea (K-LV1, Acceso: JX515788) y de cinco UR en una cepa de Vietnam (DIEU *et al.*, 2004).

Considerando que las variaciones en el ADN del WSSV podrían estar relacionadas con cambios en la patogenicidad del virus (MARKS *et al.*, 2004; DIEU *et al.*, 2004), la identificación de estas variantes genéticas del WSSV refuerza la necesidad de estudios epidemiológicos más detallados que determinen la ruta de propagación y su impacto potencial en los cultivos de langostinos.

Las especies de *Vibrio parahemolyticus* y *V. campbellii*, que contienen los genes *pirA* y *pirB*, han sido reportadas para esta zona geográfica en langostinos de cultivo (*Litopenaeus vannamei*) (RAMÍREZ *et al.*, 2020b; VICENTE *et al.*, 2020; LÓPEZ-LANDAVERY *et al.*

optimal range can modify pathogen dynamics and promote genetic variants (RAHMAN *et al.*, 2006). Therefore, the dynamic coastal marine environment may play a key role in driving the evolutionary patterns and population structure of WSSV in wild hosts.

Genetic characterization of WSSV isolates from wild shrimp revealed variations in the number of repeat units (RUs) within open reading frames (ORFs) 75, 94, and 125, as well as notable deletions in ORFs 14/15 and 23/24 compared to early reference strains. These differences—particularly the reduced number of repeats in ORFs 75 and 125—contrast with WSSV strains previously identified in farmed shrimp from the same region (RAMÍREZ *et al.*, 2024). Such genetic markers could be useful for tracing viral transmission pathways during outbreaks.

Compared with the reference Taiwanese WSSV strain (WANG *et al.*, 1995), the isolates analyzed in this study contained approximately 15 fewer RUs in ORF 75, indicating a trend toward RU reduction during viral dissemination among hosts. Some WSSV variants exhibit even greater reduction, with as few as three RUs in strains from Madagascar, Mozambique, and Saudi Arabia (TANG *et al.*, 2013), four RUs in a Korean strain (K-LV1; GenBank accession: JX515788), and five RUs in a Vietnamese strain (DIEU *et al.*, 2004).

Because WSSV DNA variability has been linked to changes in viral pathogenicity (MARKS *et al.*, 2004; DIEU *et al.*, 2004), identifying these genetic variants underscores the need for more comprehensive epidemiological studies to determine transmission routes and assess potential risks to shrimp aquaculture.

Vibrio parahemolyticus and *V. campbellii* strains carrying *pirA* and *pirB* genes have previously been reported in farmed *L. vannamei* from this region (RAMÍREZ *et al.*, 2020b; VICENTE *et al.*, 2020; LÓPEZ-LANDAVERY *et al.*, 2024). Here, we expand their known distribution to wild *L. vannamei* and *L. stylirostris*. The *Vibrio* strains isolated in this study—three *V. parahemolyticus* and one *V. campbellii*—showed genetic variation in the

al., 2024). En este trabajo, ampliamos su distribución en las especies silvestres *L. vannamei* y *L. stylirostris*. Las cepas de *Vibrio* aisladas en este estudio, tres de las cuales pertenecen a *V. parahaemolyticus* y una a *V. campbellii*, mostraron variabilidad genética en los genes *pirA* y *pirB*, los cuales están relacionados con la patogenicidad de la enfermedad de la necrosis hepatopancreática aguda (AHPND).

Es importante destacar que dos de las cepas de *V. parahaemolyticus* presentaron perfiles genéticos inusuales en los ensayos de la PCR, debido que resultaron positivos para pequeñas regiones de los genes *pirA* y *pirB* pero amplifica un producto de mayor tamaño al esperado (Lv_Alg) o es negativa (Lv_Alc) para toda la región de ADN que contiene ambos genes y los cuales podrían estar relacionados con una disminución en su virulencia, ya que no se observó mortalidad significativa en ensayos de infección experimental. Resultados similares fueron reportados por PHIWSAIYA *et al.* (2017) en cepas de *Vibrio* de Vietnam con mutaciones a nivel de los genes *pirA* y *pirB* afectando su capacidad para causar la AHPND.

La presencia de cepas de *Vibrio* con variantes genéticas en los genes *pirA* y *pirB*, causa una variabilidad de resultados mediante la PCR dirigido a regiones de ADN cortas con los iniciadores VpPirA-284 y VpPirB-392 (HAN *et al.*, 2015a), AP4F2/R2 (DANGTIP *et al.*, 2015) y VpPirA (HAN *et al.*, 2015a), por lo que se recomendaría realizar una confirmación de resultados utilizando iniciadores que comprendan la región completa de los genes *pirAB* como los iniciadores PirAB2020 (PHIWSAIYA *et al.*, 2017).

Adicionalmente, a los genes *pirA* y *pirB*, el nivel de patogenicidad de los vibrios causantes de la AHPND, también está regulado por la concentración bacteriana (DABU *et al.*, 2015), la producción de biopelículas (SOOWANNAYAN *et al.*, 2019) y el funcionamiento del sistema de *quorum sensing* (LIN *et al.*, 2022) en los cuales intervienen en diferente medida los genes *toxR* y *luxR* (MUTHUKRISHNAN *et al.*, 2022). La detección del gen *toxR* en las cuatro cepas de *Vibrio* analizadas en este trabajo, indicaría la ausencia de una relación directa entre la presencia del gen *toxR* y la AHPND, debido que el gen fue detectado también en cepas que no causan la AHPND. En el gen *luxR*, también se observó la ausencia de la relación entre su presencia y la AHPND, pero su presencia a nivel de especie sí estuvo relacionada debido a que fue detectado solo en la cepa de *V. campbellii*, sugiriendo alguna variabilidad en el ADN de *V. parahaemolyticus*.

pirA and *pirB* genes, which are associated with the pathogenicity of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND).

Interestingly, two *V. parahaemolyticus* strains exhibited atypical PCR profiles: one strain (Lv_Alg) yielded a larger-than-expected amplification product for partial *pirA/pirB* regions, while another (Lv_Alc) was negative for the complete *pirAB* region. These patterns may indicate reduced virulence, consistent with the lack of significant mortality in experimental infections. Similar findings were reported by PHIWSAIYA *et al.* (2017) in *Vibrio* strains from Vietnam carrying *pirA/pirB* mutations that impair their ability to cause AHPND.

The presence of *Vibrio* strains with *pirA/pirB* genetic variants can lead to variable PCR outcomes when short DNA regions are targeted with primers such as VpPirA-284 and VpPirB-392 (HAN *et al.*, 2015a), AP4F2/R2 (DANGTIP *et al.*, 2015), and VpPirA (HAN *et al.*, 2015a). Therefore, confirmatory assays using primers covering the full *pirAB* region, such as PirAB2020 (PHIWSAIYA *et al.*, 2017), are recommended.

Beyond the *pir* genes, the pathogenic potential of AHPND-causing vibrios is also influenced by bacterial density (DABU *et al.*, 2015), biofilm formation (SOOWANNAYAN *et al.*, 2019), and quorum-sensing systems (LIN *et al.*, 2022), involving regulatory genes such as *toxR* and *luxR* (MUTHUKRISHNAN *et al.*, 2022). The detection of *toxR* in all four *Vibrio* strains analyzed suggests no direct link between its presence and AHPND, as the gene was found in both pathogenic and non-pathogenic isolates. Similarly, *luxR* was not directly associated with AHPND, though it was found exclusively in the *V. campbellii* strain, suggesting possible genomic divergence within *V. parahaemolyticus*.

In addition to their pathogenic effects on shrimp health, *Vibrio* species also pose risks to human health, as some strains produce thermostable hemolysins (TDH and TRH) responsible for acute gastroenteritis (LETCHUMANAN *et al.*, 2014). Fortunately, the *Vibrio* strains isolated here

Los vibrios, además de causar un importante impacto en el estado sanitario de los langostinos, también representan una amenaza importante para la salud humana debido a que algunas cepas pueden producir hemolisinas termoestables (TDH y TRH), las cuales provocan gastroenteritis aguda en las personas (LETCHUMANAN *et al.*, 2014). Afortunadamente, las cepas de *Vibrio* aisladas en esta investigación carecen de los genes patógenos *tdh* y/o *trh*, lo que sugiere un menor riesgo de enfermedad por el consumo de langostinos que puedan contener este tipo de cepas de *Vibrio*. En lo que respecta a los estudios de vibrios con los genes *tdh* y/o *trh*, se ha detectado una baja incidencia de este tipo de cepas en muestras ambientales relacionadas con langostinos (GÁMEZ-BAYARDO *et al.*, 2021), sin embargo, dada su importancia es necesario mantener un constante monitoreo.

Un hallazgo de particular relevancia fue la detección de genes de resistencia a antibióticos en dos cepas de *V. parahaemolyticus*. Estas cepas mostraron resistencia a la oxitetraciclina (OTC), lo que plantea una preocupación sobre el uso inadecuado de antibióticos en el entorno acuícola y su impacto en las poblaciones bacterianas silvestres. La presencia de cepas de *Vibrio* resistentes al antibiótico OTC, en la zona norte de Perú han sido descritas anteriormente en langostinos de cultivo (AGUIRRE CHANTA *et al.*, 2021; CALIZAYA *et al.*, 2023). En este trabajo, ampliamos la distribución de este tipo de cepas de *V. parahaemolyticus*, también en langostinos silvestres de los canales de marea, cercanas a las zonas de cultivo. Este resultado está en línea con estudios previos que señalan el aumento en la resistencia a antibióticos en bacterias del género *Vibrio* (CABELLO *et al.*, 2013). Además, determinamos que una de estas cepas (Lv-Be) posee los genes *pirA* y *pirB* de forma completa, lo que le confiere la capacidad de producir la AHPND. Dado el impacto negativo que la resistencia a los antibióticos puede tener en la acuicultura, es crucial implementar medidas más estrictas para regular su uso y promover la investigación en terapias alternativas, como el uso de bacteriófagos o probióticos.

La identificación de variantes genéticas del WSSV y *Vibrio* spp. en langostinos silvestres subraya la importancia de monitorear continuamente las poblaciones silvestres que podrían actuar como reservorios de patógenos. Estos organismos tienen el potencial de transmitir enfermedades a los cultivos de langostinos, lo que podría desencadenar brotes que afecten la producción acuícola.

lacked both *tdh* and *trh* genes, indicating a low risk of foodborne disease associated with shrimp consumption. Previous studies have reported a low prevalence of *tdh/trh*-positive strains in environmental samples linked to shrimp (GÁMEZ-BAYARDO *et al.*, 2021), though continued surveillance remains essential.

A particularly relevant finding was the detection of antibiotic resistance genes in two *V. parahaemolyticus* strains, both resistant to oxytetracycline (OTC). This raises concerns regarding antibiotic misuse in aquaculture and its ecological impact on wild bacterial populations. The presence of OTC-resistant *Vibrio* in northern Peru has been previously reported in farmed shrimp (AGUIRRE CHANTA *et al.*, 2021; CALIZAYA *et al.*, 2023), and this study extends their presence to wild shrimp inhabiting tidal channels near aquaculture areas. These results align with global trends showing increasing antibiotic resistance among *Vibrio* species (CABELLO *et al.*, 2013). Moreover, one of these resistant strains (Lv-Be) carried complete *pirA* and *pirB* genes, conferring the ability to cause AHPND. Given the serious implications of antibiotic resistance in aquaculture, stricter regulatory measures are needed to control antibiotic use and promote alternative therapeutic strategies such as bacteriophage therapy and probiotics.

Overall, the identification of genetic variants of WSSV and *Vibrio* spp. in wild shrimp highlights the importance of ongoing monitoring of wild crustacean populations, which may act as reservoirs of pathogens capable of transmitting diseases to farmed stocks and triggering outbreaks that threaten aquaculture production.

5. CONCLUSIONS

In wild shrimp inhabiting environments adjacent to aquaculture facilities in northern Peru, a variant of the white spot syndrome virus (WSSV) was identified. This variant contained 6, 3, and 2 VNTR units in ORFs 75, 94, and 125, respectively, along with genomic deletions of 5,138 bp and 11,110 bp in ORFs 14/15 and 23/24.

5. CONCLUSIONES

En langostinos silvestres de ambientes colindantes a los centros de cultivo del norte de Perú, se detectó una variante del WSSV que presenta 6, 3 y 2 unidades repetitivas de tipo VNTR, respectivamente en los ORF 75, 94 y 125 y con deleciones de 5138 pb y 11110 pb, respectivamente, en los ORF 14/15 y 23/24 de su genoma.

En esta misma muestra de langostinos, se detectó la presencia de una cepa de *V. parahaemolyticus* y de *V. campbellii*, que presentan los genes *pirA*, *pirB* de forma completa y son capaces de producir la enfermedad de la necrosis hepatopancreática aguda (AHPND).

Se detectó una cepa de *V. parahaemolyticus* que además de producir la enfermedad de la necrosis hepatopancreática aguda (AHPND) presenta el gen *tetB* que le confiere resistencia al antibiótico OTC.

Todas las cepas de *Vibrio* aisladas durante esta investigación, carecen de los genes patógenos *tdh* y/o *trh*, los cuales están relacionados con la capacidad de las cepas para producir enfermedades en humanos.

La información obtenida en este estudio proporciona una base sólida para desarrollar estrategias de bioseguridad y control de enfermedades más efectivas, tanto para las poblaciones de langostinos de cultivo como para los ecosistemas acuáticos naturales. Además, refuerza la necesidad de implementar políticas de manejo sostenible y de monitoreo epidemiológico que incluyan tanto a poblaciones silvestres como a las de cultivo.

The same shrimp samples also tested positive for *V. parahaemolyticus* and *V. campbellii* strains carrying complete *pirA* and *pirB* genes, both associated with the ability to induce acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND).

Furthermore, one *V. parahaemolyticus* strain possessed the *tetB* gene in addition to *pirA* and *pirB*, conferring resistance to oxytetracycline (OTC) and highlighting potential concerns about antimicrobial resistance in aquatic environments.

All *Vibrio* strains isolated in this study lacked the *tdh* and *trh* genes, which are responsible for the production of thermostable direct hemolysin and TDH-related hemolysin in pathogenic strains affecting humans, suggesting a minimal risk of zoonotic transmission.

The results presented here provide a solid foundation for strengthening biosecurity and disease control strategies in both cultured and wild shrimp populations. They also emphasize the importance of sustainable management practices and continuous epidemiological monitoring that integrates wild reservoirs with farmed systems to mitigate disease transmission risks.

6. REFERENCIAS

- AGUIRRE CHANTA, L. E., SÁNCHEZ-SUÁREZ, H. A. & ORDINOLA-ZAPATA, A. (2021). Resistencia antibiótica en *Vibrio* spp. aislados de camarón blanco *Litopenaeus vannamei*. Alternativas de tratamiento con extractos de *Azadirachta indica* y *Origanum vulgare*. *Rev. Inv. Vet. Perú.*, 32(4), e19386. <https://doi.org/10.15381/rivep.v32i4.19386>
- ALFARO AGUILERA, R., GUEVARA TORRES, M. & GONZALES CHÁVEZ, I. (2010). Prevalencia y distribución de los principales agentes etiológicos que afectan a los langostinos silvestres en Tumbes, Perú. *Rev. peru. biol.*, 17(3), 359-364. <https://doi.org/10.15381/rpb.v17i3.11>
- BEJ, A. K., PATTERSON, D. P., BRASHER, C.W., VICKERY, M. C., JONES, D. D. & KAYSNER, C. A. (1999). Detection of total and hemolysin-producing *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish using multiplex PCR amplification of *tl*, *tdh* and *trh*. *Journal of Microbiology Methods*, 36(3), 215-225. [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(99\)00037-8](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(99)00037-8)
- CABELLO, F. C., GODFREY, H. P., TOMOVA, A., IVANOVA, L., DÖLZ, H., MILLANAO, A. & BUSCHMANN, A. H. (2013). Antimicrobial use in aquaculture re-examined: its relevance to antimicrobial resistance and to animal and human health. *Environmental Microbiology*, 15(7), 1917-1942. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12134>
- CAIN, K. (2022). The many challenges of disease management in aquaculture. *J World Aquac Soc.*, 53, 1080-1083. <https://doi.org/10.1111/jwas.12936>
- CALIZAYA, C. D., REÁTEGUI, E. H., SILVA, J. C., VELAZCO, R., RODRÍGUEZ, L., ANGULO, D. R., LLONTOP, C. A., SALCEDO L. A. & VILLENA, C. A. (2023). Resistencia antimicrobiana en los principales recursos acuícolas de los departa-

- mentos de Tumbes, Piura, San Martín y Puno. *Unicencia*, 37(1), 1-16. <http://dx.doi.org/10.15359/ru.37-1.30>
- CHANG, Y-S., CHEN, T-C., LIU, W-J., HWANG, J-S., KOU, G-H. & LO, C-F. (2011). Assessment of the roles of copepod *Apocyclops royi* and bivalve mollusk *Meretrix lusoria* in white spot syndrome virus transmission. *Mar Biotechnol.*, 13, 909-917. <https://doi.org/10.1007/s10126-010-9352-5>
- DABU, I. M., LIM, J. J., ARABIT, P. M., ORENSE, S. J., TABARDILLO, J. A., CORRE, V. L. & MANINGAS, M. B. (2015). The first record of acute hepatopancreatic necrosis disease in the Philippines. *Aquaculture Research*, 48, 792-799. <https://doi.org/10.1111/are.12923>
- DANGTIP, S., SIRIKHARIN, R., SANGUANRUT, P., THITAMADEE, S., SRITUNYALUCKSANA, K., TAENGCHIYAPHUM, S., MAVICHAK, R., PROESPRAIWONG, P. & FLEGEL, T. W. (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>
- DEFOIRDT, T., MIYAMOTO, C. M., WOOD, T. K., MEIGHEN, E. A., SORGELOOS, P., VERSTRAETE, W. & BOSSIER, P. (2007). The natural furanone (5Z)-4-bromo-5-(bromomethylene)-3-butyl-2(5H)-furanone disrupts quorum sensing-regulated gene expression in *Vibrio harveyi* by decreasing the DNA-binding activity of the transcriptional regulator protein luxR. *Environmental Microbiology*, 9(10), 2486-2495. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2007.01367.x>
- DIEU, B. T. M., MARKS, H., SIEBENGA, J. J., GOLDBACH, R. W., ZUIDEMA, D., DUONG, T. P. & VLAK, J. M. (2004). Molecular epidemiology of white spot syndrome virus within Vietnam. *Journal of General Virology*, 85(12), 3607-3618. <https://doi.org/10.1099/vir.0.80344-0>
- DIEU, B. T. M., VLAK, J. M. & ZWART, M. P. (2011). Effects of extensive and intensive shrimp farming on the genetic composition of white spot syndrome virus populations. En M. G. Bondad-Reantoso, J. B. Jones, F. Corsin & T. Aoki (Eds.), *Diseases in Asian aquaculture VII*. Asian Fisheries Society (pp. 145-156). Asian Fisheries Society. https://www.fhs-afs.net/daa_vii_files/13.pdf
- FOURNIER, P-E., DUBOURG, G. & RAOULT, D. (2014). Clinical detection and characterization of bacterial pathogens in the genomics era. *Genome Medicine*, 6, 114, 1-15. <https://doi.org/10.1186/s13073-014-0114-2>
- GÁMEZ-BAYARDO, S., CASTAÑEDA-RUELAS, G. M., ESPINOSA-PLASCENCIA, A., BERMÚDEZ-ALMADA, M. C. & JIMÉNEZ-EDEZA, M. (2021). Characterization of *Vibrio parahaemolyticus* strains and evaluation of shrimp cultivation conditions in a farm at the northwestern of Mexico, as risk predictors for its adaptation and dissemination. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 49(1), 75-85. <https://www.scielo.cl/pdf/lajar/v49n1/0718-560X-lajar-49-01-0075.pdf>
- HAN, J. E., TANG, K. F., TRAN, L. H. & LIGHTNER, D. V. (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. *Diseases of Aquatic Organisms*, 113, 33-40. <https://doi.org/10.3354/dao02830>
- HAN, J. E., MOHNEY, L. L., TANG, K. F., PANTOJA, C. R. & LITGHNER, D. V. (2015b). Plasmid mediated tetracycline resistance of *Vibrio parahaemolyticus* associated with acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in shrimps. *Aquaculture Reports*, 2, 17-21. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2015.04.003>
- HAN, J. E., TANG, K. F., ARANGUREN, L. F. & PIAMSOMBOON, P. (2016). Characterization and pathogenicity of acute hepatopancreatic necrosis disease natural mutants, pirABvp (-) *V. parahaemolyticus*, and pirABvp (+) *V. campbellii* strains. *Aquaculture*, 470, 84-90. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.12.022>
- KI, J-S., ZHANG, R., ZHANG, W., HUANG, Y-L. & QIAN, P-Y. (2009). Analysis of RNA polymerase beta subunit (*rpoB*) gene sequences for the discriminative power of marine *Vibrio* species. *Microb Ecol.*, 58, 679-691. <https://doi.org/10.1007/s00248-009-9519-7>
- KIM, Y. B., OKUDA, J., MATSUMOTO, C., TAKAHASHI, N., HASHIMOTO, S. & NISHIBUCHI, M. (1999). Identification of *Vibrio parahaemolyticus* strains at the species level by PCR targeted to the *toxR* gene. *Journal of Clinical Microbiology*, 37(4), 1173-1177. <https://doi.org/10.1128/jcm.37.4.1173-1177.1999>
- KONDO, H., VAN, P. T., DANG, L. T. & HIRONO, I. (2015). Draft genome sequence of non-*Vibrio parahaemolyticus* acute hepatopancreatic necrosis disease strain KC13. 17.5, isolated from diseased shrimp in Vietnam. *Genome Announcements*, 3(5), e00978-15. <https://doi.org/10.1128/genomea.00978-15>
- LETCHUMANAN, V., CHAN, K-G. & LEE, L-H. (2014). *Vibrio parahaemolyticus*: a review on the pathogenesis, prevalence, and advance molecular identification techniques. *Frontiers in Microbiology*, 5, 705. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00705>
- LIN, S-J., HUANG, J-Y., LE, P-T., LEE, C-T., CHANG, C-C., YANG, Y-Y., SU, E. C., LO, C-F. & WANG, H-C. (2022). Expression of the AHPND toxins PirA^{VP} and PirB^{VP} is regulated by components of the *Vibrio parahaemolyticus* quorum sensing (QS) system. *International Journal Molecular Sciences*, 23, 2889. <https://doi.org/10.3390/ijms23052889>
- LIU, L., XIAO, J., ZHANG, M., ZHUA, W., XIA, X., DAI, X. PAN, Y., YAN, SH. & WANG, Y. (2018). A *Vibrio owensii* strain as the causative agent of AHPND in cultured shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 153, 156-164. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2018.02.005>
- LO, C-F., LEU, J-H., HO, C-H., CHEN, C-H., PENG, S-E. CHEN, Y-T., CHOU, C-M., YEH, P-Y., HUANG, C-J., CHOU, H-Y., WANG, C-H. & KOU, G-H. (1996). Detection of baculovirus associated with white spot syndrome (WSBV) in penaeid shrimps using polymerase chain reaction. *Diseases of Aquatic Organisms*, 25, 133-141. <https://doi.org/10.3354/dao025133>
- LÓPEZ-LANDAVERY, E. A., URQUIZO-ROSADO, A., SAAVEDRA-FLORES, A., TAPIA-MORALES, S., FERNANDINO, J. I. & ZELADA-MÁZMELA, E. (2024). Cellular and transcriptional response to pathogenic and non-pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* strains causing acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in *Litopenaeus*

- vannamei*. *Fish & Shellfish Immunology*, 148, 109472. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2024.109472>
- MARKS, H., GOLDBACH, R. W., VLAK, J. M. & VAN HULTEN, M. C. (2004). Genetic variation among isolates of *white spot syndrome virus*. *Archives of Virology*, 149, 673–697. <https://doi.org/10.1007/s00705-003-0248-9>
- MUTHUKRISHNAN, S., SHARIFF, M., INA-SALWANY, M. Y., YUSOFF, F. M. & NATRAH, I. (2022). Expression of AHPND toxin genes (pirAB), quorum sensing master regulator gene (luxR) and transmembrane transcriptional regulator gene (toxR) in *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio harveyi* during infection of *Penaeus vannamei* (Bonne, 1931). *Aquaculture*, 551, 737895. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.737895>
- NIELSEN, S. S., ALVAREZ, J., BICOUT, D., CALISTRI, P., CANALI, E., DREWE, J. A., GARIN-BASTUJI, B., GONZALES, J. L., SMITH, C. G., HERSKIN, M., MICHEL, V., MIRANDA, M. A., PADALINO, B., SPOOLDER, H., STAHL, K., VELARDE, A., VILTROP, A., WINCKLER, C., ARZUL, I., ... ROBERTS, H. (2023). Species which may act as vectors or reservoirs of diseases covered by the Animal Health Law: Listed pathogens of crustaceans. *EFSA Journal*, 21(8), e8172. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2023.8172>
- PHIWSAIYA, K., CHAROENSAPSRI, W., TAENGPHU, S., DONG, H. T., SANGSURIYA, P., NGUYEN, G. T., PHAM, H. Q., AMPARYUP, P., SRITUNYALUCKSANA, K., TAENGCHAIYAPHUM, S., CHAIVISUTHANGKURA, P., LONGYANT, S., SITHIGORNGUL, P. & SENAPIN, S. (2017). A natural *Vibrio parahaemolyticus* Δ pirA^{VP}pirB^{VP} Mutant Kills Shrimp but Produces neither Pir^{VP} toxins nor acute hepatopancreatic necrosis disease lesions. *Applied Environmental Microbiology*, 83(16), e00680-17. <https://doi.org/10.1128/AEM.00680-17>
- RAHMAN, M. M., ESCOBEDO-BONILLA, C. M., CORTEEL, M., DANTAS-LIMA, J. J., WILLE, M., ALDAY-SANZ, V., PENSAERT, M. B., SORGELOOS, P. & NAUWYNCK, H. J. (2006). Effect of high-water temperature (33°C) on the clinical and virological outcome of experimental infections with white spot syndrome virus (WSSV) in specific pathogen-free *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, 261, 845–849. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.09.007>
- RAMÍREZ, B., GUEVARA, M., SAAVEDRA Y., MONTOYA, V. & SERNA, M. (2024). Variaciones genotípicas del virus del síndrome de las manchas blancas (WSSV) aislados en langostinos de cultivo de Perú. *Bol Inst Mar Perú.*, 39(1), 79–95. <https://doi.org/10.53554/boletin.v39i1.407>
- RAMÍREZ, B., GUEVARA, M., ALFARO, R., MONTOYA, V., MAI, H., SERNA, M., DHAR, A. & ARANGUREN, L. F. (2020a). A cross-sectional study of shrimp pathogens in wild shrimp, *Penaeus vannamei* and *Penaeus stylirostris* in Tumbes, Peru. *Aquaculture Research*, 52(3), 1118–26. <https://doi.org/10.1111/are.14969>
- RAMÍREZ, B., GUEVARA, M., MONTOYA, V. & SERNA, M. (2020b). 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. <https://hdl.handle.net/20.500.12958/3497>
- RAMOS-PAREDES, J., GRIJALVA-CHON, J. M. & IBARRA-GAMEZ, J. C. (2017). Virulence and genotypes of white spot syndrome virus (WSSV) infecting Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* in north-western Mexico. *Journal of Fish Diseases*, 40(3), 425–435. <https://doi.org/10.1111/jfd.12598>
- RESTREPO, L., BAYOT, B., ARCINIEGAS, S., BAJAÑA, L., BETANCOURT, I., PANCHANA, F. & REYES MUÑOZ, A. (2018). PirVP genes causing AHPND identified in a new *Vibrio* species (*Vibrio punensis*) within the commensal Orientalis clade. *Scientific reports*, 8, 13080. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-30903-x>
- RUWANDEEPIKA, H. A., DEFOIRDT, T., BHOWMICK, P. P., KARUNASAGAR, I., KARUNASAGAR, I. & BOSSIER, P. (2011). *In vitro* and *in vivo* expression of virulence genes in *Vibrio* isolates belonging to the Harveyi clade in relation to their virulence towards gnotobiotic brine shrimp (*Artemia franciscana*). *Environmental Microbiology*, 13(2), 506–517. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2010.02354.x>
- STÄRK, K. D. C., PEKALA, A. & MUELLNER, P. (2019). Use of molecular and genomic data for disease surveillance in aquaculture: Towards improved evidence for decision making. *Preventive Veterinary Medicine*, 167, 190–195. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2018.04.011>
- SOOWANNAYAN, C., CHANDRA, N., YATIP, P., YASMIN, F., KRATAITONG, K., UNAGULA, P., SUETRONGA, S., PREEDANON, S., KLAYSUBAN, A., SAKAYAROJ, J. & SANGTIEAN, T. (2019). *Vibrio* biofilm inhibitors screened from marine fungi protect shrimp against acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND). *Aquaculture*, 499, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.09.004>
- TANG, K. F., GROUMELLE, M. L. & LIGHTNER, D. V. (2013). Novel, closely related, White spot syndrome virus (WSSV) genotypes from Madagascar, Mozambique and the Kingdom of Saudi Arabia. *Diseases of Aquatic Organisms*, 106, 1–6. <https://doi.org/10.3354/dao02645>
- TEARE, J., ISLAM R., FLANAGAN R., GALLAGHER S., DAVIES M. & GRABU C. (1997). Measurement of Nucleic Acid Concentrations Using the DNA Quant and the Gene-Quant. *BioTechniques*, 22, 1170–1174
- TRAN, L., NUNAN, L., REDMAN, R., MOHNEY, L., PANTOJA, C., FITZSIMMONS, K. & LIGHTNER, D. V. (2013). Determination of the infectious nature of the agent of acute hepatopancreatic necrosis syndrome affecting penaeid shrimp. *Diseases of Aquatic Organisms*, 105, 45–55. <https://doi.org/10.3354/dao>
- THOMPSON, F. L., GEVERS, D., THOMPSON, C. C., DAWYNDT, P., NASER, S., HOSTE, B., MUNN, C. 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. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.9.5107-5115.2005>
- TURKMEN, G. & TOKSEN, E. (2010). *Biosecurity and major diseases in shrimp culture*. International Burch University. <https://omeka.ibu.edu.ba/items/show/3144>
- VAN HULTEN, M. C., WITTEVELDT, J., PETERS, S., KLOOSTERBOER, N., TARCHINI, R., FIER, M., SANDBRINK, H., LANKHORST, R. K. & VLAK, J. M. (2001). The white spot syndrome virus DNA genome sequence. *Virology*, 286, 7–22. <https://doi.org/10.1006/viro.2001.1002>
- VICENTE, A., TAENGPHU, S., HUNG, A. L., MORA, C. M., DONGD, H. T. & SENAPIN, S. (2020). Detec-

- tion of *Vibrio campbellii* and *V. parahaemolyticus* carrying full-length pirAB^{VP} but only *V. campbellii* produces Pir^{VP} toxins. *Aquaculture*, 519, 734708. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734708>
- WALKER, P. J. & WINTON, J. R. (2010). Emerging viral diseases of fish and shrimp. *Veterinary Research*, 41(6), 51. <https://doi.org/10.1051/vetres/2010022>
- WANG, C-H., LO., C-F., LEU, J-H., CHOU, C-M., YEH, P-Y., CHOU, H-Y., TUNG, M-C., CHANG, C-F., SU, M-S. & KOU, G-H. (1995). Purification and genomic analysis of baculovirus associated with white spot syndrome (WSBV) of *Penaeus monodon*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 23, 239–242. <https://doi.org/10.3354/dao023239>
- WEISBURG, W. G., BARNS, S. M., PELLETIER, D. A. & LANE, D. J. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of bacteriology*, 173(2), 697–703. <https://doi.org/10.1128/jb.173.2.697-703.1991>
- YANG, F., HE, J., LIN, X., LI, Q., PAN, D., ZHANG, X. & XU, X. (2001). Complete genome sequence of the shrimp white spot bacilliform virus. *Journal of Virology*, 75(23), 11811–11820. <https://doi.org/10.1128/jvi.75.23.11811-11820.2001>