Ciencia Latina Revista Científica Multidisciplinar, Ciudad de México, México.
ISSN 2707-2207 / ISSN 2707-2215 (en línea), septiembre-octubre 2025,
Volumen 9, Número 5.

https://doi.org/10.37811/cl_rcm.v9i5

DISTANCIAS GENÉTICAS DE PLÁSMIDOS DE VIBRIO SPP AISLADAS DE LANGOSTINOS DE VIDA LIBRE AFECTADOS CON LA ENFERMEDAD AGUDA DE LA NECROSIS DEL HEPATOPÁNCREAS, TUMBES, PERÚ

GENETIC DISTANCES OF VIBRIO SPP PLASMIDS ISOLATED FROM FREE-LIVING SHRIMPS AFECTED BY ACUTE HEPATOPÁNCREAS NECROSIS DISEASE, TUMBES, PERU

María Elena Rodrigo-Rojas
Laboratorio de Investigación en Biología, Universidad Nacional Federico Villarreal Lima, Perú.

Rodolfo Zenaido Velazco-Peña
Laboratorio de Sanidad Acuícola del Callao –SANIPES Lima, Perú.

Fredy Virgilio Salinas-Meléndez
Laboratorio de Investigación en Biología, Universidad Nacional Federico Villarreal Lima, Perú.

Ramsés Salas-Asencios
Grupo de Investigación Bienestar y Salud Global Lima, Escuela Universitaria de Posgrado, UNFV,

DOI: https://doi.org/10.37811/cl_rcm.v9i4.19588

Distancias genéticas de plásmidos de V*ibrio spp* aisladas de langostinos de vida libre afectados con la enfermedad aguda de la necrosis del hepatopáncreas, Tumbes, Perú

María Elena Rodrigo-Rojas[1]
rsalas@unfv.edu.pe
https://orcid.org/0000-0002-1555-4036
Laboratorio de Investigación en Biología, Universidad Nacional Federico Villarreal Lima, Perú.

Rodolfo Zenaido Velazco-Peña
https://orcid.org/0000-0002-2578-8493
Laboratorio de Sanidad Acuícola del Callao – SANIPES Lima, Perú.

Fredy Virgilio Salinas-Meléndez
https://orcid.org/0000-0003-0463-3174
Laboratorio de Investigación en Biotecnología, Universidad Nacional Federico Villarreal Lima, Perú

Ramsés Salas-Asencios
https://orcid.org/0000-0002-4075-1736
Grupo de Investigación Bienestar y Salud Global Lima, Escuela Universitaria de Posgrado, UNFV,
Lima, Perú.

RESUMEN

Se aislaron cepas de *Vibrio spp.* positivas para la toxina PirA-B a partir de langostinos de vida libre provenientes de los estuarios de Tumbes, afectados por la enfermedad aguda de la necrosis del hepatopáncreas (AHPND). De estas cepas, se aislaron cuatro plásmidos conteniendo el gen PirA-B, y se obtuvieron las secuencias nucleotídicas de los mismos. Se realizó un análisis de similitud de dichas secuencias con 7 secuencias de plásmidos similares reportadas en GenBank, con las cuales se realizó un análisis de alineamiento múltiple y cálculo de distancias genéticas. Los resultados muestran que tres de los plásmidos aislados presentan un tamaño promedio de 75.29 kb, y un plásmido presentaba un tamaño menor (37.71 kb). Todos los plásmidos aislados presentaron secuencias nucleotídicas muy similares entre sí y tres presentaban una gran similitud de secuencia con una de las obtenidas de GenBank, con código de acceso CP097860 proveniente de China. Sólo un plásmido de Tumbes presentó mayor divergencia con esta secuencia de referencia.

Palabras clave: AHPND, plásmidos, *Vibrio*, distancias genéticas

[1] Autor principal
Correspondencia: rsalas@unfv.edu.pe

Genetic distances of *Vibrio spp* plasmids isolated from free-living shrimps afected by acute hepatopáncreas necrosis disease, Tumbes, Peru

ABSTRACT

Vibrio spp. strains bearing toxin PirA-B genes were isolated from shrimps of Tumbes estuaries affected by Acute Hepatopancreas Necrosis Disease (AHPND). From these strains, four PirA-B positive plasmids were obtained, three with an average size of 75.29 kb and one with 37.71 kb. These plasmids were sequenced and compaired between them and with seven sequences obtained from Genbank. Results showed a greater similarity between these sequences and with one of GenBank, from China, with accession number CP097860. Only one Tumbes plasmid showed greater divergency with this reference sequence.

Key words: AHPND, *Vibrio*, plasmids, genetic distances.

Artículo recibido 09 agosto 2025
Aceptado para publicación: 13 septiembre 2025

INTRODUCCIÓN

El cultivo de langostinos se ha vuelto una actividad económica muy importante en el norte del Perú, por lo que merece una vigilancia respecto a la prevalencia de enfermedades que puedan disminuir la productividad. Dentro de las patologías que pueden afectar los cultivos de langostinos, la enfermedad de la necrosis aguda del hepatopáncreas (AHPND) genera una tasa de mortalidad que llegó hasta el 100% entre el 2009 y el 2011 en zonas del sudeste de Asia (Varela-Mejías et al., 2017), mientras que en el año 2013 la mortalidad alcanzó un valor de 65% en México (Varela-Mejías y Peña-Navarro, 2014). En el norte del Perú la presencia de bacterias portadoras de genes para la toxina pirA-B ha sido menor al 50% (Velazco et al., 2022), debido a que posiblemente en las poblaciones de América del Sur se genera una fase crónica más que aguda de AHPND (Aranguren et al., 2020).

Han et al. (2015) identificaron un plásmido de 69 kb (al que llamaron pVPA3-1, luego conocido como pVA1) en cepas de *V. parahaemolyticus* que causaban AHPND. El secuenciamiento del plásmido mostró la presencia de 92 marcos de lectura (ORF por sus siglas en inglés), que codificaban además de proteínas de movilidad, enzimas de replicación, transposasas y proteínas de virulencia, los genes para una toxina binaria similar a la que produce la bacteria *Photorhabdus,* un comensal de nemátodos entomopatógenos, por lo que la toxina fue llamada Pir y los dos genes asociados, pirA y pirB. Lee et al. (2015) demostraron que este plásmido puede trasmitirse de una bacteria del género *Vibrio* generadora de AHPND a otra que no genera esta enfermedad y volverla virulenta. De igual forma, Muthukrishnan et al. (2019) detectaron transferencia genética horizontal de genes PirA-B desde cepas de *V. parahaemolyiticus* positivas para AHPND a cepas no productoras de la enfermedad e incluso a especies de géneros diferentes como *Algoriphagus parahaemolyticus* Han et al. (2017) también aislaron e identificaron 4 cepas de *V. campbelli* portadoras del gen PirA-B y generadora de AHPND y Liu et al. (2018) identificaron una cepa de *V. owensii* productora de AHPND en *Litopenaeus vannamei.* Estos resultados sugieren la posibilidad de que los genes para esta toxina se hayan distribuido de manera horizontal entre diversas especies del género *Vibrio*, quizá asociándose a transposones (Xiao et al., 2017). Esta transferencia horizontal podría generar diversidad genética, por lo que el objetivo del presente trabajo es analizar las diferencias genéticas existentes en plásmidos portadores de los genes

PirA-B extraídos de cepas de *Vibrio parahaemolyticus* aisladas de langostinos de vida libre en Tumbes, Perú.

MÉTODOLOGIA

Obtención de Muestras

Se colectaron langostinos de vida libre con síntomas de AHPND (Velazco et al., 2022) en los estuarios cercanos a granjas langostineras de la localidad de Tumbes. Se extrajeron hepatopáncreas de los animales colectados, los cuales fueron homogenizados en morteros utilizando agua peptonada alcalina. Se tomaron 5 mL de cada homogenizado, a partir de los cuales se realizaron cultivos en placas Petri que contenían Agar Tiosulfato, citrato, sales biliares, sacarosa (TCBS, Merck) como medio selectivo específico para el género *Vibrio*. Las placas fueron mantenidas en incubación a 37°C y se realizaron lecturas a las 24 y 48 horas. Las colonias que desarrollaron en el medio TCBS y presentaron características microscópicas del género *Vibrio* (morfología y coloración Gram negativa) fueron resuspendidas en solución salina estéril y centrifugadas a 5000 rpm por 15 minutos. Luego se realizó un segundo lavado finalmente dejándolas en buffer TE 1X a pH 8.0. Se realizó una incubación a 90°C por 10 minutos e inmediatamente se trasladaron estas muestras a -20°C por 5 minutos. Luego, se centrifugaron las muestras a 12000 rpm por 1 minuto, y el sobrenadante fue almacenado a -50° C hasta su utilización posterior. Se procedió a identificar las muestras que presentaban el gen PirA-B mediante la técnica de Nested-PCR (Dangtip et al., 2015).

Secuenciamiento y análisis bioinformático.

De las bacterias seleccionadas del género *Vibrio*, se aislaron plásmidos que contenían los genes para la toxina binaria PirA-B mediante el uso del protocolo **High Pure Plasmid Isolation Kit (**Roche). Se enviaron muestras de cuatro plásmidos a la empresa Umbrella Genomics S.A. (Lima, Perú) para realizar el secuenciamiento mediante el sistema Illumina NovaSeq 6000. Paralelamente, se buscaron secuencias de plásmidos PirA-B positivas en la base de datos de GenBank del National Center for Biotechnology Information (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/). Todas las secuencias en formato FASTA fueron analizadas mediante alineamiento múltiple utilizando el programa Clustal Omega a través del servidor del European Molecular Biology Laboratory (https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/). Las secuencias alineadas fueron luego analizadas mediante el programa MEGA11 (Tamura, Stecher y

Kumar, 2021) para calcular distancias genéticas usando el método de Máxima Verosimilitud Compuesta y generar un árbol filogenético mediante el método de Máxima Verosimilitud y siguiendo el modelo de Tamura-Nei.

RESULTADOS

Análisis de alineamiento múltiple

Se analizaron en total once secuencias de plásmidos, siete de las cuales fueron identificadas en la base de datos GenBank y cuatro fueron de los plásmidos aislados de bacterias del género *Vibrio* presentes en langostinos afectados por AHPND en Tumbes (B1E, A31C, A3B, B1A) La Tabla 1 muestra los tamaños de los plásmidos usados, los cuales fluctúan entre 67089 a 78471 pb, a excepción de un plásmido (B1A) obtenido a partir de las muestras de Tumbes y que presentaba un tamaño menor (37709 pb).

Tabla 1.
Secuencias analizadas en el presente trabajo. Las secuencias marcadas con un asterisco son las muestras de plásmidos provenientes de las cepas aisladas en Tumbes.

Código de Secuencia	Tamaño (pb)
CP065372	67093
AP014860	69078
KM067908	69168
CP020036	69227
KP324996	70452
CP097860	77278
CP083364	67089
B1E*	78471
A31C*	73283
A3B*	74118
B1A*	37709

El alineamiento múltiple mediante el programa Clustal Omega permitió identificar que los plásmidos analizados presentaban una gran variabilidad en cuanto a su secuencia nucleotídica, la cual se puede demostrar al calcular las distancias genéticas (Tabla 2), observándose que los plásmidos obtenidos de las cepas de *Vibrio* aisladas en Tumbes, sólo se encontraban con menor distancia entre sí y con la secuencia del plásmido de accesión CP097860 en Genbank, aislada de cepas de *Vibrio owensii* en China, con solo la excepción del plásmido A3B, con la que se puede observar una distancia relativamente

mayor. La Tabla 2 también muestra distancias relativamente cercanas con dos secuencias más, también provenientes de Asia (Tabla 3) y relativamente cercanas con la secuencia de accesión CP097860. Estos resultados son confirmados por el árbol filogenético correspondiente (Figura 1).

Tabla 2.

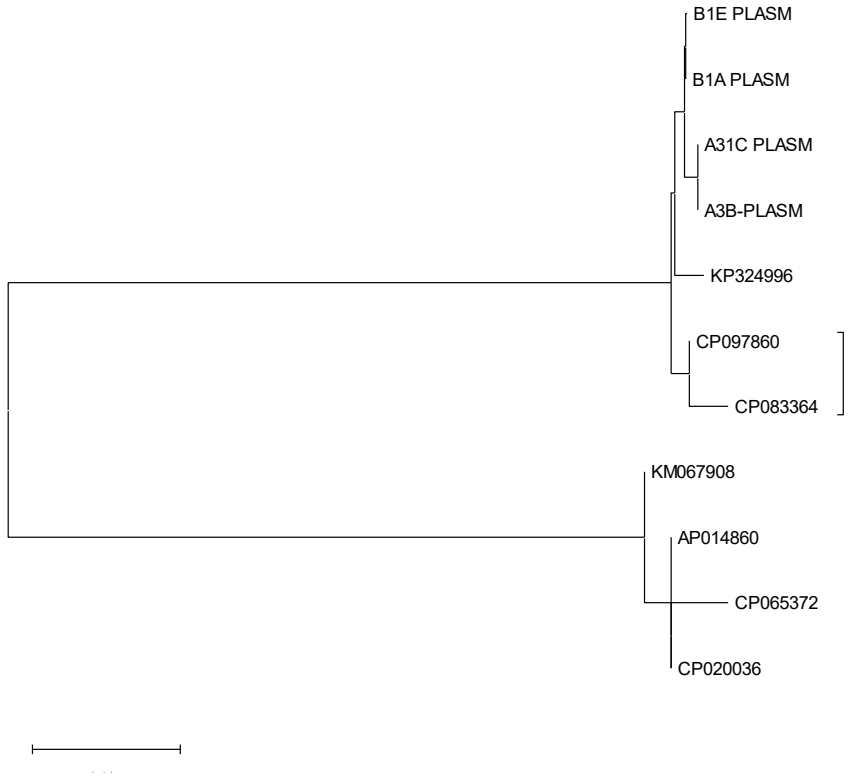
Matriz de distancias genéticas de los plásmidos analizados. En color gris se muestran las distancias genéticas entre los plásmidos provenientes de Tumbes, en color azul se muestran las distancias genéticas entre estos plásmidos con la accesión CP097860 del GenBank, y en color verde con las de otras tres accesiones.

	CP065372	AP014860	KM067908	CP020036	B1E	A31C	A3B	B1A	CP097860	KP324996
CP065372										
AP014860	0.044258									
KM067908	0.053748	0.019996								
CP020036	0.044198	0.000279	0.019832							
B1E	4.633039	4.624457	4.299378	4.632856						
A31C	4.559811	4.578700	4.247131	4.586147	0.008227					
A3B	4.265144	4.296798	3.857295	4.296218	0.000096	0.000147				
B1A	4.169113	4.243249	3.724478	4.256210	0.000085	0.000170	0.000064			
CP097860	4.169605	4.234551	3.754334	4.245985	0.000070	0.000026	0.029798	0.000071		
KP324996	4.519685	4.596273	4.690814	4.604474	0.027897	0.028172	0.028966	0.031065	0.028205	
CP083364	4.622752	4.616766	4.584102	4.625146	0.038219	0.037100	0.021052	0.007465	0.020628	0.050458

Tabla 3.
Origen y microorganismo del que provienen las accesiones con menor distancia respecto a las secuencias de los plásmidos aislados de Tumbes.

Código GenBank	Microorganismo	Procedencia
KP324996	*V. parahaemolyticus*	Tailandia, Vietnam
CP097860	*V. owensii*	China
CP083364	*V. parahaemolyticus*	Corea del Sur

Figura 1.
Árbol filogenético de las 11 secuencias de plásmidos positivos a los genes para la toxina PirA-B utilizadas en el presente trabajo.



DISCUSIÓN

Existen referencias que indican la necesidad de otros factores además de la toxina PirA-B para generar la enfermedad aguda de la necrosis del hepatopáncreas (AHPND). Ramirez et al. (2020) aislaron cinco cepas de *Vibrio parahaemolyticus* positivas por PCR a los genes PirA-B, de las cuales dos cepas produjeron mortalidad y daños histológicos concordantes con la AHPND, pero otras dos no eran patogénicas pese a tener también los genes para la toxina. Ahmed et al. (2022) señalaron que, además del gen para la toxina binaria PirA-B, el plásmido adquiere algunos otros factores de virulencia

relacionados directamente a la patogenicidad. Por lo tanto, se requiere analizar la variabilidad nucleotídica en la secuencia de los genes de estos plásmidos para detectar cambios en la secuencia de los genes para la toxina PirA-B o de otros factores genéticos que podrían estar relacionados con la enfermedad de la AHPND. El presente trabajo muestra resultados iniciales de este tipo de análisis presentando datos de distancias genéticas.

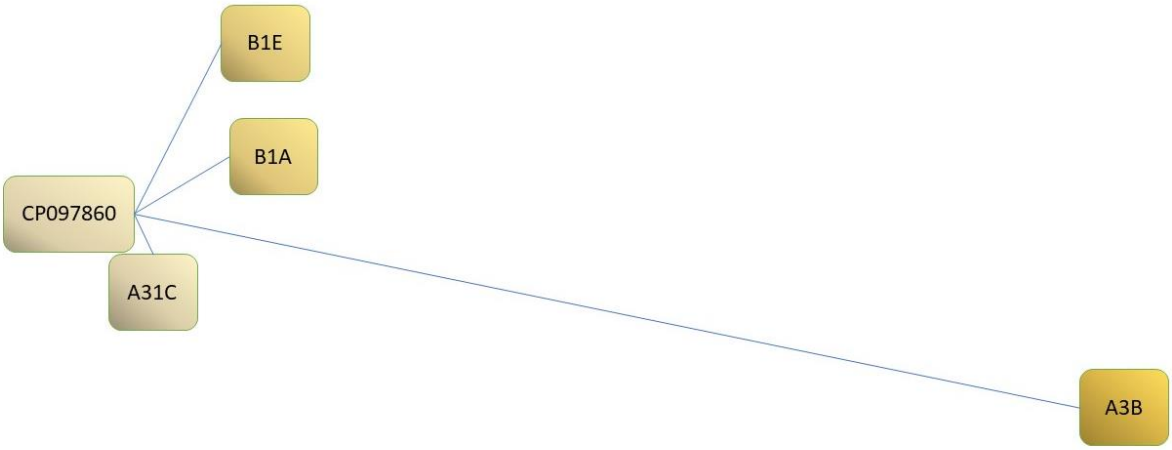
En la toma de muestra se aislaron cepas del género *Vibrio* sin determinar la especie debido a que se sabe que los genes para la toxina PirA-B no están presentes en una sola especie bacteriana, lo que se debería a transferencia genética de tipo horizontal. Dong et al. (2019) demostraron que plásmidos del tipo pVA1 que llevan los genes para la toxina binaria PirA-B, pueden ser transferidos de cepas poseedoras causantes de AHPND a bacterias no patogénicas, a través de mecanismos conjugativos. Esta transferencia horizontal de plásmidos se vería facilitada principalmente entre bacterias estrechamente relacionadas, como las halofílicas *Vibrio parahaemolyticus, V. campbellii* y *V. owensii* que colonizan los mismos nichos marinos (Liu et al., 2018).

En el presente trabajo, se aislaron plásmidos de cepas de *Vibrio* asociadas a langostinos de los estuarios de Tumbes que desarrollaron AHPND, cuatro de los cuales fueron secuenciados, tres con una longitud promedio de 75.29 kb y un rango entre 73 y 78 kb, lo cual está más cercano a la longitud descrita del plásmido PVA1 (Lee et al., 2015). Sin embargo, un cuarto plásmido presentó una secuencia de 37.71 kb (Tabla 1). La Tabla 2 muestra que los plásmidos aislados en Tumbes presentaron una menor distancia genética con el plásmido de accesión CP097860, proveniente de China (Tabla 3), con la única excepción del plásmido A3B, aunque manteniéndose aún cercano al CP097860 que a los otros plásmidos obtenidos de GenBank. Los resultados de las distancias genéticas calculadas estarían dando inferencias respecto al desarrollo filogenético de estos plásmidos (Figura 1) a partir de secuencias de plásmidos de tipo PVA1 provenientes del Asia, como el plásmido de accesión CP097860, lo cual permite considerar qué secuencias corresponden a plásmidos que inicialmente estuvieron asociados a la AHPND en Tumbes, y cómo han ido variando en un camino propio en esta región (Figura 2). Este análisis es factible debido al uso del programa MEGA, el cual utiliza las distancias calculadas como base para la construcción de árboles filogenéticos. Es importante señalar que el único requisito del programa MEGA es el análisis

previo de alineamiento múltiple de las secuencias a usar, el cual puede ser realizado por el mismo programa o por otros programas, como Clustal Omega o MUSCLE (Awe et al., 2023).

Figura 2.

Relaciones evolutivas proyectadas a partir del cálculo de distancias genéticas entre los plásmidos aislados a partir de bacterias positivas a los genes de la toxina PirA-B presentes en los estuarios de Tumbes y la secuencia del plásmido con accesión CP097860 de GenBank.



Pese a las diferencias nucleotídicas que permiten calcular las distancias genéticas, todas las secuencias utilizadas en el presente trabajo provienen de cepas bacterianas generadoras de AHPND, lo que implicaría que los genes responsables de la enfermedad deben estar en todos estos plásmidos, y que las variaciones en cuanto al desarrollo y/o la gravedad de la misma dependerían de la variación de las secuencias dentro de estos genes conservados.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ahmed J, Khan MH, Unnikrishnan S, Ramalingam K. 2021. Acute Hepatopancreases Necrosis Diseases (AHPND) as Challenging Threat in Shrimp. Biointerface Research in Applied Chemistry 12(1): 978-991

Aranguren LF, Mai HN, Noble B, Dhar AK. 2020. Acute hepatopancreatic necrosis disease (*VP* AHPND*),* a chronic disease in shrimp *Penaeus vannamei* population raised in Latin America, Journal of Invertebrate Pathology [Internet], [15 abril 2023]. Disponible en: https://doi.org/10.1016/j.jip.2020.107424

Awe OI, En najih N, Nyamari MN, Mukanga, LB. 2023. Comparative study between molecular and genetic evolutionary análisis tolos using African SARS-CoV-2 variants. Informatics in Medicine Unlocked [Internet], [8 enero 20224]. 36, 101143. Disponible en https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2352914822002805

Dangtip, S., Sirikharin, R., Sanguanrut, P., Thitamadee, S., Sritunyalucksana, K., Taengchaiyaphum, S., Mavichak, R., Proespraiwong, P. y Flegel, T.W. (2015). AP4 method for two-tube nested PCR detection of AHPND isolates of *Vibrio parahaemolyticus*. *Aquaculture Reports*, 2, 158–162. DOI: 10.1016/j.aqrep.2015.10.002

Dong X, Song J, Chen J, Bi D, Wang W, Ren Y, Wang H, Wang G, Tang K, Wang X, Huang J. 2019. Conjugative Transfer of the pVA1-Type Plasmid Carrying then *pirAB*^{vp} Genes Results in the Formation of New AHPND-Causing *Vibrio*. Frontiers in cellular and infection microbiology 9: 195

Han JE, Tang KFJ, Tran LH, Lightner DV. 2015. *Photorhabdus* insect-related (Pir) toxin-like genes in a plasmid of *Vibrio parahaemolyticus,* the causative agent of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) of shrimp. Diseases of aquatic organisms 113: 33–40

Han JE, Tang KFJ, Aranguren LF, Piamsomboon P. 2017. Characterization and pathogenicity of acute hepatopancreatic necrosis disease natural mutants, pirABvp (-) *V. parahaemolyticus*, and pirABvp (+) *V. campbellii* strains. Aquaculture 470: 84–90

Lee CT, Chen IT, Yang YT, Ko TP, Huang YT, Huang JY, Huang MF, Lin SJ, Chen CY, Linh SS, Lightner DV, Wang HC, Wang AHJ, Wang HC, Horb LI, Lo CF. 2015. The opportunistic marine pathogen *Vibrio parahaemolyticus* becomes virulent by acquiring a plasmid that expresses a deadly toxin. PNAS: 112(34): 10798–10803

Liu L, Xiao J, Zhang M, Zhu W, Xia X, Dai X, Pan Y, Yan S, 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

Muthukrishnan S, Defoirdt T, Din M, Yasin I, Yusoff F, Ikhsan N. 2019. Horizontal gene transfer of the pirAB genes responsible for Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND) turns a

non-*Vibrio* strain into an AHPND-positive pathogen. bioRxiv 2019.12.20.884320 [Internet], [4 abril 2023]. Disponible en: https://doi.org/10.1101/2019.12.20.884320

Ramirez B, Guevara M, Montoya V, Serna M. 2020. Evaluación de la patogenicidad de cepas de *Vibrio* parahaemolyticus que contienen los genes *pirA* Y *pirB* aislados de *Penaeus vannamei* de cultivo. Bol Inst Mar Perú 35(2): 242-256

Tamura K, Stecher G, Kumar S. 2021. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 11. Molecular Biology and Evolution 38: 3022-3027

Varela-Mejías A, Peña-Navarro N. 2014. Síndrome de la Mortalidad Temprana (EMS/AHPNS) en camarones cultivados: Una revisión. Repertorio Científico 17(1): 25-30

Varela-Mejías A, Peña-Navarro N, Aranguren-Caro LF. 2017. Necrosis aguda del hepatopáncreas: una revisión de la enfermedad en *Penaeus vannamei*. Agronomía Mesoamericana 28(3): 735-745

Velazco RZ, Rodrigo ME, Salcedo LA, Lazábara ID, Delgado LG, Salas-Asencios R. 2022. Detección molecular de la enfermedad de la necrosis aguda del hepatopáncreas en muestras de langostinos de la región de tumbes. Ciencia Latina Revista Científica Multidisciplinar 6(1): 1478-1491

Xiao J, Liu L, Ke Y, Li X, Liu Y, Pan Y, Yan S, Wang Y. 2017. Shrimp AHPND-causing plasmids encoding the PirAB toxins as mediated by *pirAB*-Tn903 are prevalent in various *Vibrio* species. Nature Scientific Reports 7: 42177. DOI: 10.1038/srep42177