

Variaciones nucleotídicas en plásmidos de *Vibrio parahaemolyticus* aislados de langostinos afectados por la enfermedad de la necrosis aguda del hepatopáncreas (AHPND) en Tumbes (Perú)

Nucleotide changes in *Vibrio parahaemolyticus* plasmids isolated from affected shrimp by the acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND) in Tumbes (Peru)

Leslie G. Delgado-Olivares¹, Víctor L. Osorio-Guevara¹, Rodolfo Z. Velazco-Peña², Fredy Virgilio Salinas-Meléndez¹, María E. Rodrigo-Rojas¹ y Ramsés Salas-Asencios¹



RESUMEN

La enfermedad de la necrosis aguda del hepatopáncreas (AHPND) afecta a langostinos, mostrando menores tasas de mortalidad en Sudamérica. En el presente trabajo se analizó la secuencia de nucleótidos de tres plásmidos contenidos en cepas de *Vibrio parahaemolyticus* aisladas de langostinos infectados en Tumbes (Perú) y que se encuentran accesados en la base de datos GenBank. El análisis bioinformático muestra alta similitud con el plásmido pVA1, homología exacta en los genes para la toxina binaria PirAB en dos de los plásmidos analizados y una delección parcial de la región del gen *pirA*^{VP} en el tercero, así como mutaciones en los tres plásmidos en la secuencia de otros genes, cuyos productos podrían estar asociados con la enfermedad.

Palabras clave: AHPND, langostinos, plásmidos, secuenciación, *Vibrio parahaemolyticus*

- 1 Laboratorio de Investigación en Biotecnología, Universidad Nacional Federico Villarreal Lima, Perú. leslie120395@gmail.com ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0869-5834> lvictor0395@gmail.com ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5075-8053> fsalinas@unfv.edu ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0463-3174> mrodrigo@unfv.edu.pe ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1555-4036> rsalas@unfv.edu.pe* ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4075-1736>
- 2 Laboratorio de Sanidad Acuicola del Callao, SANIPES, Lima, Perú. rodolfo.velazco@gmail.com ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2578-8493>

**ABSTRACT**

Although Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND) causes significant shrimp mortality worldwide, lower mortality rates have been reported in South America. This study analyzed the nucleotide sequences of three plasmids from *Vibrio parahaemolyticus* strains isolated from infected shrimp in Tumbes, Peru; all sequences are deposited in the GenBank database. The bioinformatic analysis revealed high similarity to the pVA1 plasmid, with complete sequence homology in the genes encoding the PirAB binary toxin in two of the plasmids and a partial deletion in the *pirA^{VP}* gene in the third. Additionally, all three plasmids harbored mutations in other genes, likely associated with the disease.

Keywords: AHPND, shrimps, plasmids, sequencing, *Vibrio parahaemolyticus*

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de la necrosis aguda del hepatopáncreas (AHPND) es uno de los problemas principales que afectan la acuicultura de camarones en el mundo. Descrita, por primera vez, en China y luego en Vietnam, Malasia y Tailandia, países en donde se observaron tasas de mortalidad de hasta un 100% (Varela-Mejías *et al.* 2017), se determinó que la enfermedad es generada debido a infecciones con cepas de *Vibrio parahaemolyticus* (Tran *et al.* 2013) portadoras de un plásmido de 69 kb (conocido como pVA1) que contiene los genes *pirA^{VP}* y *pirB^{VP}*, responsables para la síntesis de una toxina binaria llamada PirAB (Han *et al.* 2015). Posteriormente, la presencia de la enfermedad ha sido descrita en Norteamérica (Nunan *et al.* 2014; Dhar *et al.* 2019), y en Sudamérica, específicamente en Ecuador y Perú, países en donde se ha descrito una mortalidad mucho menor que en Asia (Velazco *et al.* 2022). Esta baja mortalidad ha sido atribuida a mutaciones como la delección completa

del gen *pirA^{VP}* o inserciones en su región reguladora, eliminando la patogenicidad y generando tasas de supervivencia de hasta el 100% (Aranguren *et al.* 2020a). Estas variaciones genéticas podrían ser la causa de una presentación crónica de la enfermedad (Aranguren *et al.* 2020b). También se han descrito otros factores genéticos asociados a ella y presentes en el mismo plásmido (Wang *et al.* 2020), haciendo sugerente considerar que la variación de las secuencias nucleotídicas de cualquiera de estos genes pueda contribuir a las diferencias en la severidad de la presentación de la enfermedad, aportando evidencia para comprender la dinámica genética y epidemiológica de la AHPND en Sudamérica.

El presente trabajo tuvo como objetivo reportar los cambios en las secuencias nucleotídicas de tres plásmidos de tipo pVA1, contenidos en cepas de *Vibrio parahaemolyticus* aisladas de langostinos afectados por AHPND provenientes de la zona norte del departamento de Tumbes (Perú).

MATERIALES Y MÉTODOS

Para el presente trabajo, se utilizaron tres secuencias completas de plásmidos accedidas en GenBank (códigos de acceso PQ256783, PQ256784 y PQ256786), obtenidas a partir de cepas de *V. parahaemolyticus* aisladas de langostinos de vida libre, afectados por la enfermedad de la necrosis aguda del hepatopáncreas (AHPND), provenientes de las zonas langostineras del norte de Tumbes, Perú (Fig. 1 y Cuadro 1). Con el fin de evaluar la identidad de las secuencias de los plásmidos accedidos, se realizó un alineamiento mediante el programa

BLASTn de forma remota, a través del servidor del National Center for Biotechnology Information (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&BLAST_SPEC=GeoBlast&PAGE_TYPE=BlastSearch), utilizando el algoritmo Megablast y los parámetros establecidos por defecto (tamaño de palabra igual a 28 y umbral esperado de 0.05). Para determinar la identidad de las secuencias de estudio se las comparó en el resultado del alineamiento con la secuencia completa del plásmido pVA1 (código de acceso KM067908), reportado, por primera vez, como asociado a la AHPND (Han *et al.* 2015).

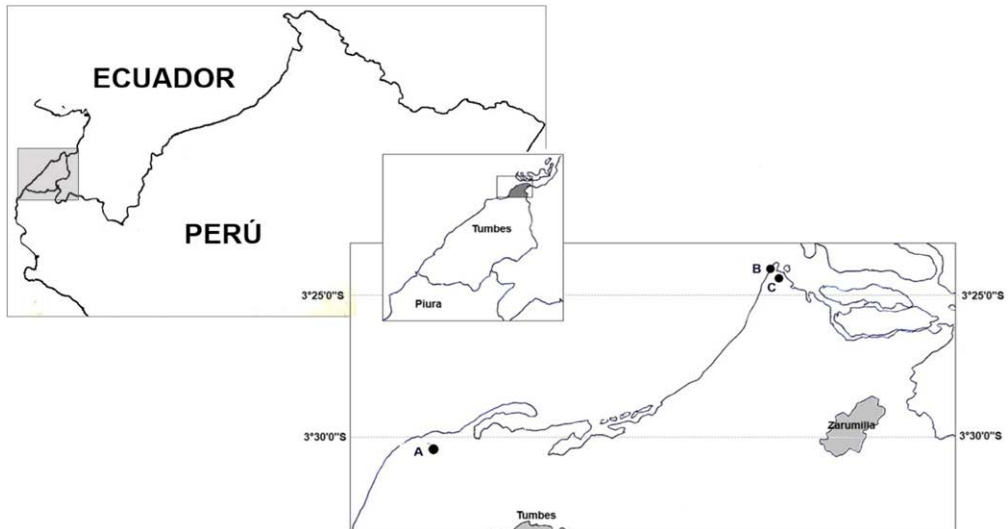


Fig.1. Zonas de captura de langostinos a partir de las cuales se identificaron los plásmidos utilizados en el presente trabajo (A: río Tumbes, B: estero La Envidia, C: estero La Soledad). Como puntos de orientación, se muestra la localización de las ciudades de Tumbes y Zarumilla

Fig.1. Shrimp fishing areas in which plasmids used in this paper were identified (A: Tumbes river, B: La Envidia estuary, C: La Soledad estuary). As reference points, the locations of the cities of Tumbes and Zarumilla are shown

Cuadro 1. Algunas métricas de anotación de los plásmidos secuenciados. Los datos fueron generados con el programa Prokka (Seemann, 2014) y el porcentaje de cobertura se obtuvo mediante análisis con el programa BLAST, utilizando como referencia la secuencia del plásmido pVA1 (código de acceso KM067908; Han *et al.* 2015)

Table 1. Some annotation metrics for the sequenced plasmids. Data was generated using the Prokka software (Seemann, 2014), and query coverage was obtained using BLAST. The sequence of the plasmid pVA1 (accession number KM067908; Han *et al.* 2015) was used for the comparative analysis

Código de acceso GenBank	Zona de muestreo	Tamaño (en miles de pares de bases)	% GC	Porcentaje de cobertura	CDS	Genes
PQ256783	La Soledad	74.118	45.85	94%	112	114
PQ256784	La Envidia	73.283	45.83	94%	97	99
PQ256786	Río Tumbes	78.471	45.94	88%	116	118

La identificación y análisis de secuencias de genes individuales se realizó mediante alineamiento múltiple de las secuencias completas de los plásmidos, usando la función Clustal Omega v. 1.2.4 (Sievers & Higgins, 2018), dentro del programa MEGA v.11.0 (Tamura *et al.* 2021) y comparando las secuencias accedidas con la del plásmido pVA1 (código KM067908), así como con la de los accesos CP028346 y CP028145, que corresponden a la secuencia completa de los plásmidos mutantes naturales denominados R13 y R14, respectivamente, ambos aislados en Latinoamérica y no patogénicos, debido a que portan variaciones nucleotídicas en los genes *pirA^{VP}* y/o *pirB^{VP}* (Aranguren *et al.* 2020a). Todas las secuencias señaladas fueron descargadas de la base de datos GenBank el 23-10-2024 y han sido utilizadas en todo momento bajo formato FASTA.

RESULTADOS

Se analizó la secuencia de tres plásmidos presentes en cepas de *V. parahaemolyticus* aislados de langostinos de vida libre con signos compatibles con AHPND provenientes de la zona langostinera de Tumbes, Perú (Fig. 1). En el Cuadro 1 se resumen algunas características de anotación de esos plásmidos, así como la zona de muestreo y el resultado de la comparación con la secuencia del plásmido pVA1, lo que permite considerarlos como plásmidos similares. En los tres casos, el porcentaje de similitud (no mostrado) fue de 98%, variando el porcentaje de cobertura (Coverage Query) respecto al plásmido de referencia pVA1 (código de acceso KM067908).

El análisis de alineamiento de las secuencias completas de los plásmidos secuenciados, mostró que dos de ellos

(PQ256784 y PQ256786) presentaron, en la región que codifica las subunidades de la toxina binaria PirAB, la misma secuencia de nucleótidos, con las secuencias correspondientes del plásmido de referencia pVA1 y del plásmido R14 (código de acceso CP028145). El plásmido de acceso PQ256783 no mostró homología con el plásmido pVA1 en la región del gen *pirA^{VP}* hasta el nucleótido 280 (Fig. 2). Por otro lado, se realizó también

la identificación de otros genes presentes en los plásmidos secuenciados, mediante alineamiento múltiple con el programa Clustal Omega y tomando como referencia los genes anotados en el plásmido pVA1. Se seleccionaron mutaciones presentes en los tres plásmidos secuenciados y que no se encuentran en el plásmido de referencia, identificándose deleciones, inserciones y sustituciones nucleotídicas (Cuadro 2).

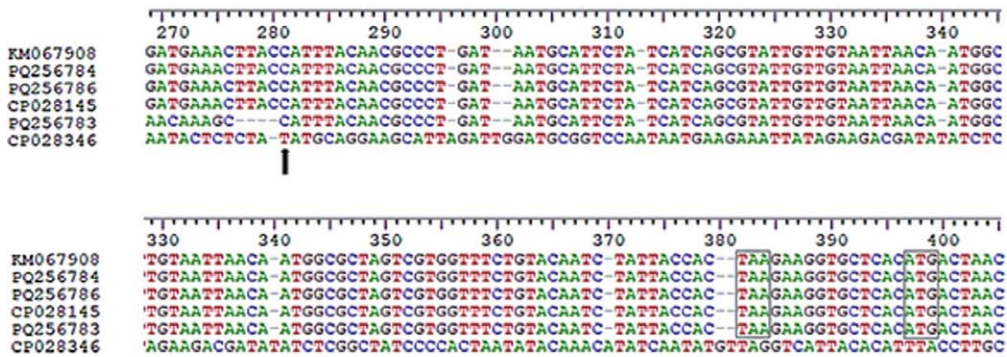


Fig. 2. Comparación de parte de las secuencias del gen *pirA^{VP}* en los plásmidos analizados, así como del plásmido pVA1 (código de acceso KM067908; Han *et al.* 2015) y los plásmidos R13 y R14 (códigos de acceso CP028346 y CP028145, respectivamente; Aranguren *et al.* 2020a). La flecha en la posición 281 señala el punto a partir del cual la secuencia de acceso PQ256783 es similar a las otras secuencias reportadas y a la del plásmido pVA1. El recuadro en la posición 382 muestra la señal de término de traducción de la subunidad PirA^{VP} y el recuadro en la posición 397 muestra el codón de inicio de síntesis de la subunidad PirB^{VP}

Fig. 2. Partial sequence alignment of the *pirA^{VP}* gene from the analyzed plasmids, pVA1 (accession no. KM067908; Han *et al.* 2015), and the R13 and R14 plasmids (accession numbers CP028346 and CP028145, respectively; Aranguren *et al.* 2020a). The arrow at position 281 marks the point from which the nucleotide sequence converges with those of the other plasmids and pVA1. The box at nucleotide 382 indicates the stop codon for PirA^{VP} subunit synthesis, and the box at position 397 indicates the start codon for PirB^{VP} subunit synthesis

Cuadro 2. Mutaciones detectadas en algunos genes presentes en los tres plásmidos secuenciados de *V. parahaemolyticus* en langostinos afectados con AHPND. Ins: inserción, Del: delección, Sus: sustitución

Table 2. Mutations detected in some genes across all three sequenced plasmids of *V. parahaemolyticus* in AHPND-affected shrimp. Ins: insertion, Del: deletion, Sus: substitution

	Mutación	Posible función
Conjugative transfer signal peptidase TraF	Del	Conjugación de plásmidos
TraM recognition domain-containing protein	Del	Conjugación de plásmidos
Type conjugative transfer protein TrbL	Sus	Conjugación de plásmidos
P-type conjugative transfer protein TrbG	Sus	Conjugación de plásmidos
Rpn family recombination-promoting nuclease/putative transposase	Del	Conjugación de plásmidos
ATPase, T2SS/T4P/T4SS family	Del	Secreción
Anti restriction protein	Del	Conjugación de plásmidos
Type II secretion system protein	Ins	Secreción
Type II and III secretion system protein	Sus	Secreción
Hok/Gef family protein	Del	Persistencia bacteriana/lisis celular
Trypsin-like serine protease	Del	Toxicidad celular
Zincin-like metallopeptidase domain-containing protein	Del	Toxicidad celular

DISCUSIÓN

La AHPND, o enfermedad de la necrosis aguda del hepatopáncreas, se asocia directamente a la infección de cepas del género *Vibrio* que portan un plásmido de alrededor de 70 kb, reportado, en primer lugar, como pVA1 (Han *et al.* 2015). Este plásmido contiene dos secuencias genéticas codificantes para una toxina binaria llamada PirAB. Esta toxina ataca dañando directamente el epitelio del hepatopáncreas del langostino. Aunque, además, se ha presentado evidencia que relaciona la enfermedad con cambios de la estructura de la microbiota circundante (Soto-Rodríguez *et al.* 2022), se considera a la presencia

del plásmido portador de los genes para la toxina binaria como el factor principal para el desarrollo de la AHPND, por lo que modificaciones en cualquiera de estos elementos genéticos podría alterar la expresión de la enfermedad.

Los tres plásmidos analizados presentan alta homología con el plásmido pVA1 (Cuadro 1) y presentaron secuencias genéticas codificantes para la toxina binaria, aunque uno de ellos (PQ256783) no mostró homología con el gen *pirA*^{VP} hasta el nucleótido 280 (Fig. 2), resultado que podría ser considerado como producto de una delección parcial en este gen, evento que podría afectar el desarrollo completo de la enfermedad, como ocurre con el plásmido

R13 (acceso GenBank CP028346), reportado como portador de una delección completa de este gen. Los otros dos plásmidos presentaron homología completa para la secuencia de los dos genes presentes en el plásmido pVA1 y con el plásmido R14 (acceso GenBank CP028145), descrito con posibles modificaciones en su región reguladora. Debido a los cambios en sus secuencias nucleotídicas, tanto el plásmido R13 como el R14 han sido descritos como no patógenos (Aranguren *et al.* 2020a), lo que permite considerar que, si una delección completa del gen para una de las subunidades de la toxina no permite la expresión de la enfermedad, delecciones parciales o mutaciones en los sitios reguladores podrían estar relacionadas con la atenuación de la patogenicidad.

Por otro lado, se han identificado mutaciones en los tres plásmidos secuenciados en diferentes regiones genéticas, no asociadas a la producción de la toxina binaria (Cuadro 2), como los genes para los componentes de los sistemas de secreción II, III y IV que participan en diversos mecanismos de patogenicidad. El sistema de secreción II está presente en bacterias Gram negativas (Korotkov *et al.* 2012), el tipo III está presente en cepas pandémicas de *Vibrio parahaemolyticus* (Plaza *et al.* 2021) y el de tipo IV ha sido relacionado a la patogenicidad de cepas de *Vibrio tapetis* (Rahmani *et al.* 2021). La presencia de estas mutaciones compartidas en los tres plásmidos sugiere que, mutaciones en otros genes también

podrían estar relacionadas con la menor letalidad de la enfermedad, observada en las zonas langostineras de Sudamérica. Por lo expuesto, sería recomendable que la vigilancia molecular considere también el análisis de las regiones genéticas descritas en el presente trabajo para confirmar la contribución funcional de sus variaciones con la expresión diferencial de la AHPND en Sudamérica.

CONCLUSIONES

El análisis de las secuencias nucleotídicas de tres plásmidos presentes en aislamientos de *Vibrio parahaemolyticus*, en camarones afectados con la enfermedad aguda de la necrosis del hepatopáncreas en el norte de Tumbes, muestra cambios en las secuencias de los genes para la subunidad PirA^{VP} y la regulación de la síntesis de la subunidad PirB^{VP} de la toxina binaria relacionada con la AHPND, así como las mutaciones en otros genes, en este tipo de plásmidos, los cuales podrían estar relacionadas con la baja mortalidad de la enfermedad en la región.

AGRADECIMIENTOS

El trabajo forma parte del Proyecto desarrollado para el Concurso 2022 de Proyectos de Investigación con incentivos de la Universidad Nacional Federico Villarreal, Lima, Perú.

REFERENCIAS

- Aranguren, L. F., Mai, H. N., Kanrar, S., Cruz-Flores, R. & Dhar, A. K. (2020a). A mutant of *Vibrio parahaemolyticus* *pirAB*_{VP} (+) that carries binary toxin genes but does not cause Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease. *Microorganisms*, 8(10), 1549. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8101549>
- Aranguren, L. F., Mai, H. N., Noble, B. & Dhar, A. K. (2020b). Acute hepatopancreatic necrosis disease (*VP*_{AHPND}), a chronic disease in shrimp *Penaeus vannamei* population raised in Latin America, *J. Invertebr. Pathol.*, 174, 107424. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2020.107424>
- Dangtip, S., Sirikharin, R., Sanguanrut, P., Thitamadee, S., Sritunyalucksana, K., Taengchaiyaphum, S., ... & Flegel, T. W. (2015). AP4 method for two-tube nested PCR detection of AHPND isolates of *Vibrio parahaemolyticus*. *Aquac. Rep.*, 2, 158-162. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2015.10.002>
- Dhar, A. K., Piamsomboon, P., Aranguren Caro, L. F., Kanrar, S., Adami, R. Jr & Juan, Y. S. (2019). First report of Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND) occurring in the USA. *DAO*, 132(3), 241-247. <https://doi.org/10.3354/dao03330>
- Han, J. E., Tang, K. F., Tran, L. H. & Lightner, D. V. (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. *DAO*, 113(1), 33-40. <https://doi.org/10.3354/dao02830>
- Korotkov, K. V., Sandkvist, M. & Hol, W. G. (2012). The type II secretion system: biogenesis, molecular architecture and mechanism. *Nat Rev Microbiol.*, 10(5), 336-351. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2762>
- Kumar, V., Roy, S., Behera, B. K., Bossier, P. & Das, B. K. (2021). Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND): virulence, pathogenesis and mitigation strategies in shrimp aquaculture. *Toxins*, 13(8), 524. <https://doi.org/10.3390/toxins13080524>
- Nunan, L., Lightner, D., Pantoja, C. & Gomez-Jimenez, S. (2014). Detection of Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND) in Mexico. *DAO*, 111(1), 81-86. <https://doi.org/10.3354/dao02776>
- Plaza, N., Urrutia, I. M., Garcia, K., Waldor, M. K. & Blondel, C. J. (2021). Identification of a family of *Vibrio* type III secretion system effectors that contain a conserved serine/threonine kinase domain. *mSphere*, 6(4), e0059921. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00599-21>
- Rahmani, A., Delavat, F., Lambert, C., Le Goic, N., Dabas, E., Paillard, C. & Pichereau, V. (2021). Implication of the type IV secretion system in the pathogenicity of *Vibrio tapetis*, the etiological agent of brown ring disease affecting the manila clam *Ruditapes philippinarum*. *Front. Cel. Infect. Microbiol.*, 11, 634427. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.634427>
- Seemann, T. (2014). Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics*, 30(14), 2068-2069. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu153>
- Sievers, F. & Higgins, D. G. (2018). Clustal Omega for making accurate alignments of many protein sequences. *Protein sci.*, 27(1), 135-145. <https://doi.org/10.1002/pro.3290>
- Soto-Rodriguez, S. A., Lozano-Olvera, R., Ramos-Clamont, G., Zenteno, E., Sánchez-Salgado, J. L., ... & Aguilar, K. G. (2022). New insights into the mechanism of action of PirAB from *Vibrio parahaemolyticus*. *Toxins*, 14(4), 243. <https://doi.org/10.3390/toxins14040243>

- Tamura, K., Stecher, G. & Kumar, S. (2021). MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 11. *Mol. Biol. Evol.*, 38(7), 3022-3027. <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>
- Tran, L., Nunan, L., Redman, R. M., Mohney, L. L., Pantoja, C. R., Fitzsimmons, K. & Lightner, D. V. (2013). Determination of the infectious nature of the agent of Acute Hepatopancreatic Necrosis syndrome affecting penaeid shrimp. *DAO*, 105(1), 45-55. <https://doi.org/10.3354/dao>
- Varela-Mejías, A., Peña-Navarro, N. & Aranguren-Caro, L. F. (2017). Necrosis aguda del hepatopáncreas: una revisión de la enfermedad en *Penaeus vannamei*. *Agron. Mesoam.*, 28(3), 735-745. <https://doi.org/10.15517/ma.v28i3.27788>
- Velazco, R. Z., Rodrigo, M. E., Salcedo, L. A., Lazábara, I. D., Delgado, L. G. & Salas-Asencios, R. (2022). Detección molecular de la enfermedad de la necrosis aguda del hepatopáncreas en muestras de langostinos de la región de Tumbes. *Cienc. Lat.*, 6(1), 1478-1491. https://doi.org/10.37811/cl_rcm.v6i1.1594
- Wang, H. C., Lin, S. J., Mohapatra, A., Kumar, R. & Wang, H. C. (2020). A review of the functional annotations of important genes in the AHPND-causing pVA1 plasmid. *Microorganisms*, 8(7), 996. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8070996>

