

Condiciones de crecimiento de *Vibrio parahaemolyticus* con diferente virulencia causantes de AHPND en camarón



Autores:

Sonia A. Soto-Rodríguez
Rodolfo Lozano-Olvera
Carmen Bolan-Mejía
Karla G. Rendón-Aguilar

Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, AC Unidad Mazatlán en Acuicultura y Manejo Ambiental, Mazatlán, México

ssoto@ciad.mx

V*ibrio parahaemolyticus* (*Vp*) habita en ambientes marinos y estuarinos de diversas salinidades en todo el mundo, se los ha asociado a casos diarreicos en humanos como también están asociados con algunas de las enfermedades más graves en peces bivalvos y camarones peneidos (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación / Organización Mundial de la Salud, 2011), pero solo se han realizado unos pocos estudios sobre aislamientos de *Vp* oportunistas que causan vibriosis en camarón.

Las cepas específicas de *Vp* causan una enfermedad emergente conocida como enfermedad de necrosis hepatopancreática aguda (AHPND), que causó los primeros brotes en China en el año 2009 y se extendió a otros países asiáticos (Red de Centros de Acuicultura en Asia-Pacífico / Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, 2011), así mismo a países latinoamericanos latinoamericanos (Restrepo et al., 2016) y los Estados Unidos (Organización Mundial de la Salud de la OIE, 2017). Las cepas *Vp* que causan AHPND llevan un plásmido pVA1 que codifica una toxina homóloga a la toxina binaria PirAB producida por *Photobacterium luminescens* (Lee et al., 2015).

Existen grandes diferencias entre las cepas *Vp* con respecto a la patogenicidad, las cepas *Vp* patógenas humanas son diferentes de las cepas *Vp* AHPND+ debido a que involucran factores de virulencia específicos. Las cepas

virulentas de *Vp* AHPND+ son las causantes de mortalidades masivas de camarón cultivado; *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* (Boone) y *Penaeus monodon* (Hong, et al., 2016). La enfermedad generalmente afecta al camarón juvenil dentro de los 20-35 días postsiembra. Desde principios del 2013, el patógeno se ha propagado en México (Nunan, et al., 2014) resultando en una disminución significativa (70%) en la producción de camarón en comparación al año 2012 (Anuario Estadístico de Acuicultura, 2013). Actualmente el AHPND sigue siendo un problema para la industria acuícola.

Las lesiones patognomónicas de AHPND indican una descamación severa de las células epiteliales tubulares del hepatopáncreas producida por las toxinas PirAB (Sirikharin et al., 2015; Soto - Rodríguez, et al., 2015). Se han observado varias diferencias entre la virulencia de *Vp* en cepas asiáticas y mexicanas en pruebas de inmersión con camarón juvenil. Algunas cepas de AHPND+ mexicanas causan una mortalidad del 100% dentro de las 17 horas posteriores a la inoculación (p.i.), mientras que otras menos virulentas, no inducen la mortalidad del 100% (Soto-Rodríguez et al., 2015). Además, las cepas mexicanas son más virulentas que las cepas previamente reportadas por Tran et al. (2013), Nunan et al. (2014) y Joshi et al. (2014). Recientemente se ha reportado los genes de *pirA* y *pirB* para las cepas *Vibrio harveyi*, *Vibrio owensii* y *Vibrio campbellii* (Dong et al., 2017; Xiao et al., 2017), indicando la complejidad del

problema. A pesar de esto, hasta la fecha, hay pocos estudios de comparación entre las cepas virulentas y no patógenas en términos del uso de sustratos, susceptibilidad antimicrobiana y condiciones de crecimiento.

Las cepas virulentas de *Vp* en todo el mundo pueden tener una variabilidad fenotípica intraespecífica que les permite vivir en casi cualquier ambiente acuático. Además las cepas *Vp* en el medio ambiente muestran una distribución halofílica y estacional que está directamente relacionada con la salinidad y la temperatura (Johnson *et al.*, 2010; Zimmerman *et al.*, 2007).

Los ambientales del *Vp* se han asociado con altas temperaturas y salinidades, lo que explica su naturaleza ubicua en las áreas tropicales, sin embargo, no se han realizado estudios sobre los patrones de crecimiento de *Vp* en diferentes niveles de pH y aún es incierto cómo los parámetros del agua de mar afecta al crecimiento o a la virulencia del *Vp* que causa AHPND. Los objetivos del presente estudio fueron el evaluar las características fenotípicas (perfiles bioquímicos y fisiológicos), su sensibilidad a antibióticos, cinética de crecimiento y supervivencia bajo varias condiciones de temperatura, salinidad y pH de *Vp* AHPND+ con diferentes grados de virulencia y cepas AHPND-.

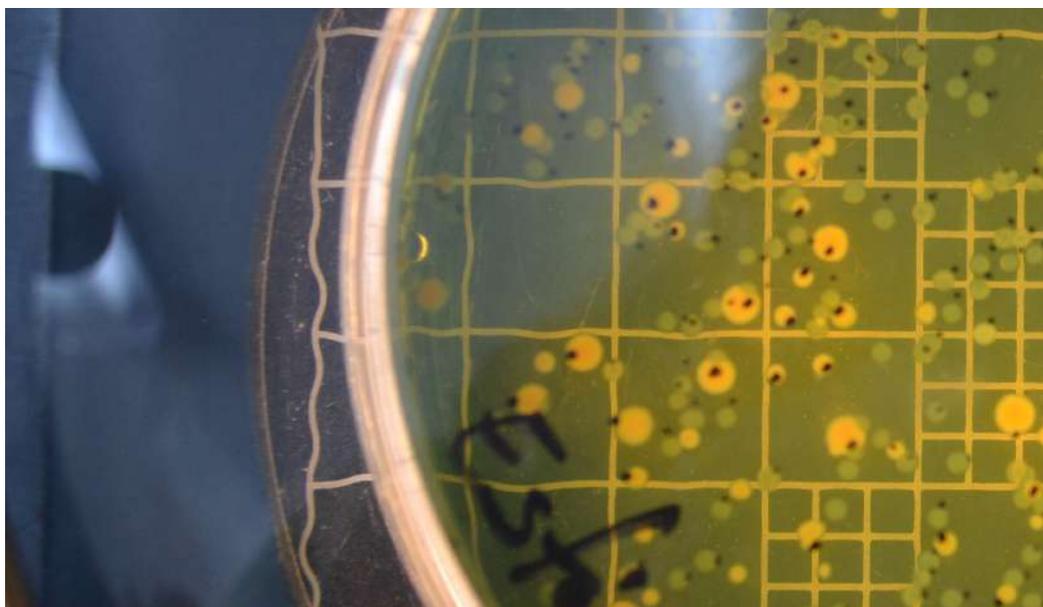
Materiales y métodos

Preparación de Inóculo

La cepa *Vp* AHPND- (M0702-) y las cepas *Vp* AHPND+ (M0904+++ , M0603++ y M0905+) (Soto-Rodríguez *et al.*, 2015) fueron seleccionadas de acuerdo a su grado de virulencia. Todos los medios bacteriológicos y soluciones salinas se suplementaron con NaCl a una concentración final de 2.5% (+).

Perfil bioquímico

Se utilizaron los métodos descritos por Alsina, Blanch (1994), Holt, *et al.*, (1994) para todas las cepas. Las pruebas incluían tinción de Gram, morfología celular, motilidad, enjambre en TSA + (Bioxon), crecimiento en citrato de tiosulfato, agar de sacarosa con sal biliar (TCBS, Bioxon), crecimiento en CHROMagarVibrio (Monterrey, Nuevo León, México), luminiscencia, sensibilidad al agente vibrioestático O/129,



oxidasa, catalasa, prueba O-F, arginina dihidrolasa, ornitina descarboxilasa y lisina descarboxilasa. Producción de ácido indol butírico y sulfhídrico, gas de D-glucosa, reducción de nitrato y nitrito, Voges-Proskauer, ureasa y gelatinasa, también se evaluaron la β-galactosidasa y la acetoina. Se realizó una caracterización adicional utilizando API 20E y API ZYM (bioMerieux, Ciudad de México, México). Todas las cepas se incubaron a 30 °C durante 24-48h.

Susceptibilidad a los antibióticos

Se realizó la prueba de susceptibilidad antimicrobiana de cepas *Vp* mediante un ensayo de difusión en disco de acuerdo a Bauer, Kirby, Sherris y Turck (1966). Los agentes antimicrobianos se analizaron con un Bio-Rad (Hércules, CA), la prueba de sensibilidad multidisco Sensi-Disk antimicrobiana fue realizada con los siguientes agentes antimicrobianos: amikacina, ampicilina, cefalotina, cefotaxima, ceftriaxona, cloranfenicol, gentamicina, netilmicina, nitrofurantoína, carbenicilina, kanamicina, trimetoprima-sulfametoxazol y ciprofloxacina.

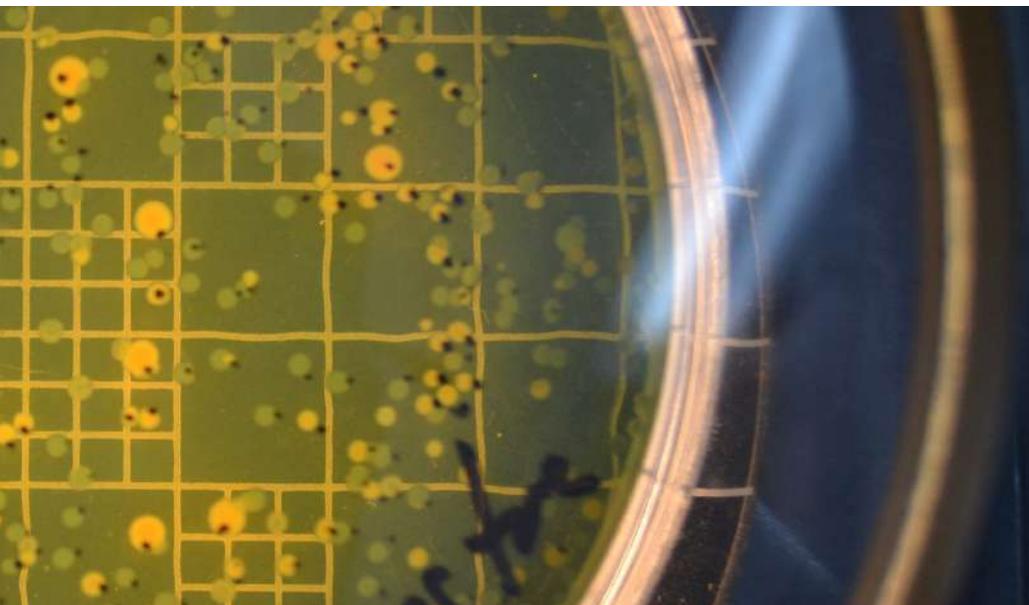
Las pruebas para ácido nalidíxico (Sanofi Diagnostics Pasteur, Ciudad de México, México), oxitetraciclina (Sigma-Aldrich Co., Ciudad de México, México), norfloxacina (Schering-Plough, Ciudad de México, México), nitrofurantoína (Sigma-Aldrich Co.) y florfenicol (Sigma-Aldrich Co.) se llevaron a cabo por separado utilizando un Sensi-

Disc estéril de 6.00-mm (Oxoid, Basingstoke, Inglaterra), según Hindler (1992). Se siguió el método de Hindler (1992), para obtener las concentraciones mínimas (MICS) para las cepas *Vp* de enrofloxacin, norfloxacina, oxitetraciclina (Sinbiotik International SA de CV, Ciudad de México, México) y florfenicol (Cheminova, Ciudad de México, México).

Cinética de crecimiento: ensayos *in vitro* e *in vivo*

La OD600 de la suspensión bacteriana por duplicado se midió a 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 24h p.i., Para determinar el crecimiento de *Vp* en un medio rico en nutrientes (TSB+) se usó la cepa *Vp* AHPND+++ M0904 en su medio natural (agua de mar), y agua de mar con camarones (huésped). Se inocularon por triplicado en 10 ml de TSB+ (M0904/TSB) o 10 ml de agua de mar filtrada (0.45 μm) y esterilizada (M0904/ agua de mar), incluidos los tubos de control sin bacterias. Los tubos se incubaron durante la noche a 0, 0.5, 1, 2, 4, 8, 12 y 24h p.i., se estimaron las UFC/ml totales en agar TCBS (Bioxon). Se realizó un ensayo adicional en matraces de vidrio con 300 ml de agua de mar esterilizada.

Se colocaron tres camarones (con un peso de 1.1 g) en cada matraz por triplicado y se alimentaron con una dieta comercial de proteína al 35%. Luego, los matraces se inocularon con la suspensión bacteriana (M0904/camarón). El grupo control no fue inoculado con bacterias. La medición fue a los 0 min, 20 min y 40 min y a 1, 2, 4, 8, 12 y 24h pi, se colocaron 100 μL en agar TCBS



(Bioxon) para así estimar las UFC/ml colonias verdes y amarillas.

Cinética de crecimiento bajo distintos parámetros ambientales

Para comparar la tolerancia de cepas Vp ante diferentes parámetros ambientales del agua de mar, se cultivaron cepas AHPND+ con distinta virulencia a diferentes temperaturas, salinidades y valores de pH. Las cepas fueron incubadas a 4, 21, 30, 37 y 44 °C; desde 0.0 a 10.0% de NaCl y a valores de pH de 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10, para los cuales se midió el OD600 de 0 a 24h. Todos los experimentos se realizaron por triplicado e incluyeron tubos control sin bacterias. Se obtuvieron gráficos del tiempo de incubación versus OD600 a partir de las condiciones analizadas, y también se analizó el crecimiento exponencial de las cepas incubadas bajo todos los parámetros ambientales de 0 a 20h correspondientes a OD600 > 0.200. Para comparar la cinética de crecimiento entre cepas en las condiciones dadas, se calculó la tasa de crecimiento específica máxima (μ_{max}/h) de acuerdo a Dalgaard y Koutsoumanis (2001), a partir de la fase de crecimiento exponencial.

Análisis estadístico

Primero se analizó toda la data para determinar si se distribuían normalmente, luego se efectuó un análisis posteriori. Para los datos de crecimiento bacteriano, se realizó un análisis estadístico no paramétrico (Kruskal-Wallis), encontrando diferencias

significativas en la prueba post hoc de Dunn. Se usó un análisis de varianza de dos vías para distinguir el efecto de los factores (temperatura, salinidad y pH) y cepa (M0904+++ , M0603++ , M0905+ y M0702-) en μ_{max}/h . Si se encontraban diferencias significativas, se realizaba la prueba post hoc de Fisher. Todos los análisis se realizaron con una significancia de 0.05.

Resultados

Tabla 1. Promedio del halo de inhibición (cm) de las cepas de *Vibrio parahaemolyticus*

Antibiótico	Concentración (mg/mL)	AHPND+			
		M0904+++	M0603++	M0905+	M0702
Ácido nalidíxico	0.05	2.6	2.3	2.5	2.8
Cloranfenicol	1.50	2.4	2.1	2.2	2.3
Cefotaxima	1.50	2.5	1.8	2.1	2.1
Nitrofurantoína	20.00	2.2	1.7	1.9	2.1
Cefalotina	1.50	1.9	1.8	2.0	2.1
Ciprofloxacina	0.25	1.9	1.4	1.8	1.9
Norfloxacina	0.50	1.8	1.3	1.8	1.8
Gentamicina	0.50	1.5	1.5	1.5	1.7
Amikacina	1.50	1.3	1.3	1.2	1.4
TSX	1.25	1.6	1.6	1.6	2.0
Florfenicol	0.30	0.9	1.0	1.1	0.0
Kanamicina	1.50	1.1	1.2	1.3	0.8
Netilmicina	1.50	1.1	1.2	1.1	1.3
Oxitetraciclina	8.00	0.0	1.6	0.0	2.7
Ampicilina	0.50	0.0	0.0	0.0	0.0
Carbencilina	5.00	0.0	0.0	0.0	0.0

Nota: AHPND+: *Vibrio parahaemolyticus* causante de AHPND. AHPND-: *V. parahaemolyticus* no causante AHPND. Abreviaturas: AHPND, enfermedad de necrosis agua del hepatopáncreas; TSX, trimetoprima-sulfametoxazol

Perfil bioquímico

Las células Vp son bacilos gramnegativos móviles, y crecen bien en TSA+. Las colonias en TSA+ eran lisas, circulares, no luminiscentes y no tenían pigmento. Todas las colonias en el agar TCBS eran verdes, pero tenían un fenotipo de color diferente en CHROMagar™ Vibrio. Independientemente del grado de virulencia de la cepa, las colonias eran de color malva y azul marino, el color también dependía del tiempo de incubación. Las cepas tenían una alta diversidad metabólica en características fisiológicas y bioquímicas. Todas las cepas fueron oxidasa, catalasa y lisina descarboxilasa positivas. También fueron analizadas mediante el metabolismo de fermentación/oxidación, siendo negativos en Vogues-Proskauer y ureasa, no produjeron ácido sulfhídrico o gas a partir de glucosa, produjeron acetoina y fueron D-glucosa positivos. Además, las cepas Vp fueron negativas para inositol, melibiosa, ramnosa, sorbitol, sacarosa y triptófano desaminasa. Solo las cepas AHPND+ fueron ornitina descarboxilasa y L-arabinosa positivas. También, la cepa AHPND-M0702 fue arginina dihidrolasa positiva y L-arabinosa negativa. La susceptibilidad al vibriostatic O/129 (10 y 150 μ g) fue variable.

Susceptibilidad a los antibióticos

Independientemente del grado de virulencia,

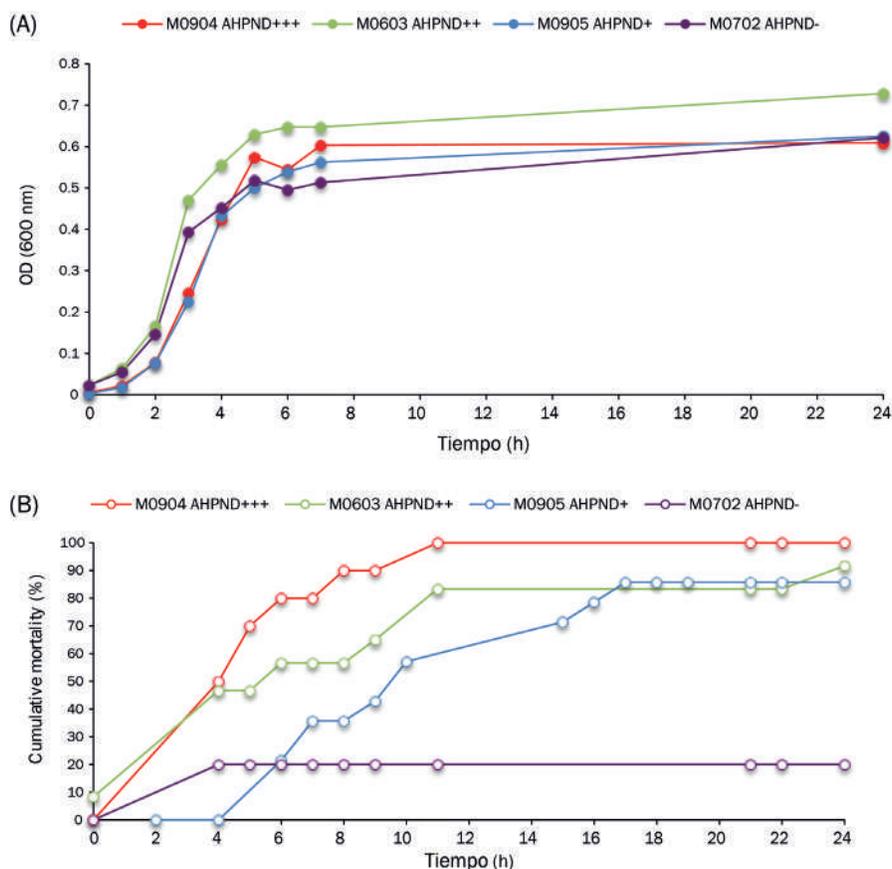


Figura 1.- (a) Cinética de crecimiento de *Vibrio parahaemolyticus* con diferente virulencia (AHPND+) y *V. parahaemolyticus* no patógena (AHPND-), (a) y (b) con el porcentaje de mortalidad acumulada de *Litopenaeus vannamei* inoculado con cepas de *V. parahaemolyticus* a 10⁶ UFC/mL. OD, densidad óptica a 600 nm

todas las cepas mostraron su mayor zona de inhibición al ácido nalidíxico (0.05 mg/mL, Tabla 1). Sin embargo, las cepas fueron resistentes a la ampicilina (0.50 mg/mL) y carbenicilina (5.0 mg/mL), las cepas Vp AHPND- también fueron resistente al florfenicol. Las cepas AHPND+ mostraron baja sensibilidad a la oxitetraciclina (8.00 mg/mL), mientras que las cepas Vp AHPND- no. Para la prueba MIC, se seleccionaron los antibióticos más utilizados en las camaronerías mexicanas. Como se mencionó, se encontró la MIC más baja para enrofloxacin, independientemente del grado de virulencia (de 0.25 a 2.0 µg/mL, Tabla S2). Las cepas virulentas M0904+++ y M0905+ exhibieron las MICs más altas para oxitetraciclina, alcanzando 300 µg/mL.

Cinética de crecimiento: ensayos in vitro e in vivo

Independientemente del grado de virulencia, las cepas comenzaron la fase

de crecimiento exponencial a partir de 1 a 2h de incubación, y después de 7h, todas las cepas de Vp continuaron creciendo (Figura 1a). Sin embargo, la densidad bacteriana no correspondía a su grado de virulencia. Por ejemplo, a las 7 horas p.i., AHPND+ (M0904+++ , M0603++ y M0905+) mostraron una similar OD_{600 nm} = 0.603, 0.647, 0.562, respectivamente; no obstante, causaron diferente mortalidad acumulada (80, 57 y 36%, respectivamente). Además, la OD_{600 pm} = 0.513 de la cepa AHPND-M0702 fue ligeramente más baja que las cepas virulentas y causó una mortalidad acumulada del 20% (Figura 1b).

Cuando se incubó la cepa AHPND+++ M0904 en diferentes medios, se contaron las colonias de *Vibrio* en TCBS de muestras de agua por M0904/TSB+, M0904/agua de mar, M0904/camarón y agua de mar/camarón (grupo control). Las colonias verdes mostraron un crecimiento

exponencial a partir de 0.5h y exhibieron un crecimiento similar en todos los tratamientos de 0 a 8h p.i. (Figura 2). Sin embargo, hubo diferencias significativas entre los tratamientos a las 0.5h (p = .003, n = 3), 1 h (p <.001, n = 3), 12h (p = .004, n = 3) y 24h p.i., (p = .001, n = 3). Todos los tratamientos alcanzaron su nivel más alto de densidad a las 8h p.i., aunque el crecimiento de M0904+++ en TSB fue más rápido (9.95 Log), seguido de M0904/agua de mar (9.52 Log) y M0904/camarón (9.53 Log). Al final del experimento (24h), los camarones inoculados alcanzaron un 78% de mortalidad acumulada y no se observó mortalidad en el grupo control. El camarón moribundo mostró signos macroscópicos típicos de AHPND (hepatopáncreas atrofiado y pálido, intestino vacío, letargo y cromatóforos expandidos).

Cinética de crecimiento a varias temperaturas, salinidades y niveles de pH

Independientemente de la virulencia, las

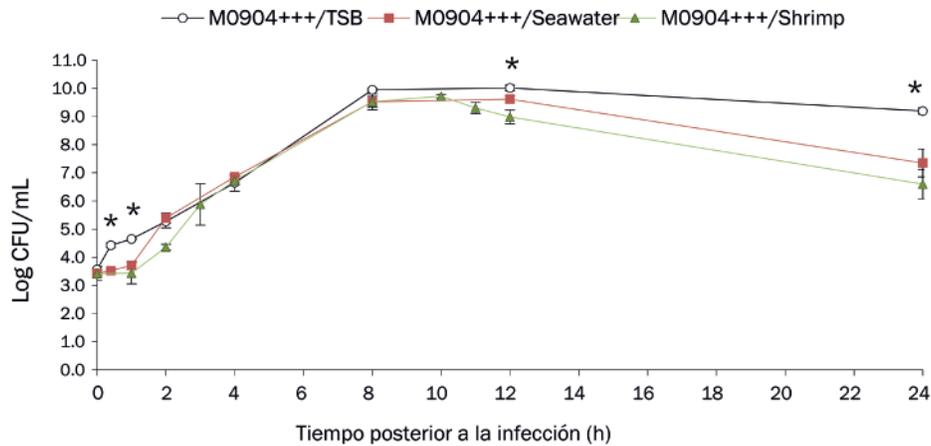


Figura 2.- Crecimiento de colonias verdes (UFC/ml) en TCBS de muestras en agua de cada tratamiento. Los puntos son valores medios y las barras indican SD. Diferencias significativas ($p < .005$, $n = 3$) entre los tratamientos de las 0.5, 1, 12 y 24 horas posinoculación.

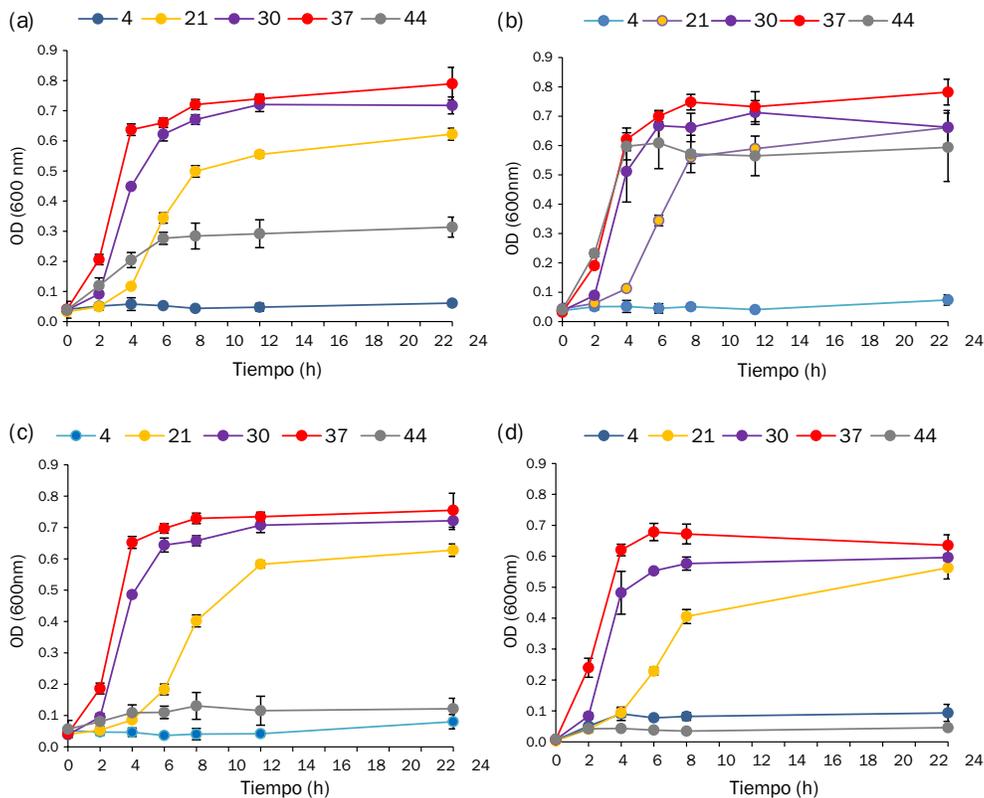


Figura 3.- Cinética de crecimiento de *Vibrio parahaemolyticus* con diferentes grados de virulencia en distintas temperaturas. (a) M0904+++; (b) M0603+++; (c) M0905+ y (d) M0702-. Las barras indican SD ($n = 3$).

cepas Vp incubadas a varias temperaturas mostraron un crecimiento exponencial a partir de las 2h, aunque las cepas AHPND+ en general, mostraron un crecimiento ligeramente mayor que AHPND-M0702 (Figura 3). Sin embargo, todas las cepas crecieron a 4 °C y a 30 y 37 °C, pero las cepas AHPND+ alcanzaron un OD₆₀₀ mayor entre 0.7 y 0.8. A diferencia de la cepa M0702- que tenía una OD₆₀₀ menor

que 0.7. Adicionalmente, solo las cepas más virulentas (M0904+++ y M0603++) crecieron a 44 °C.

Independientemente de la virulencia, ninguna cepa creció al 0.0% de NaCl y todas las cepas mostraron un crecimiento exponencial al 0.5% de NaCl; sin embargo, a partir de 6.0% de NaCl, las cepas exhibieron un retraso en su crecimiento (Figura 4). La

cepa AHPND-M0702 mostró una mayor variabilidad de crecimiento, y la cepa no creció en condiciones extremas de 9.0 y 10.0% de NaCl.

Todas las cepas tuvieron crecimiento a un pH 8-9, y ninguna cepa creció a un pH 4. Las cepas AHPND+ mostraron un mayor crecimiento (OD₆₀₀ fue superior a 0.8) y menos variabilidad que la cepa M0702

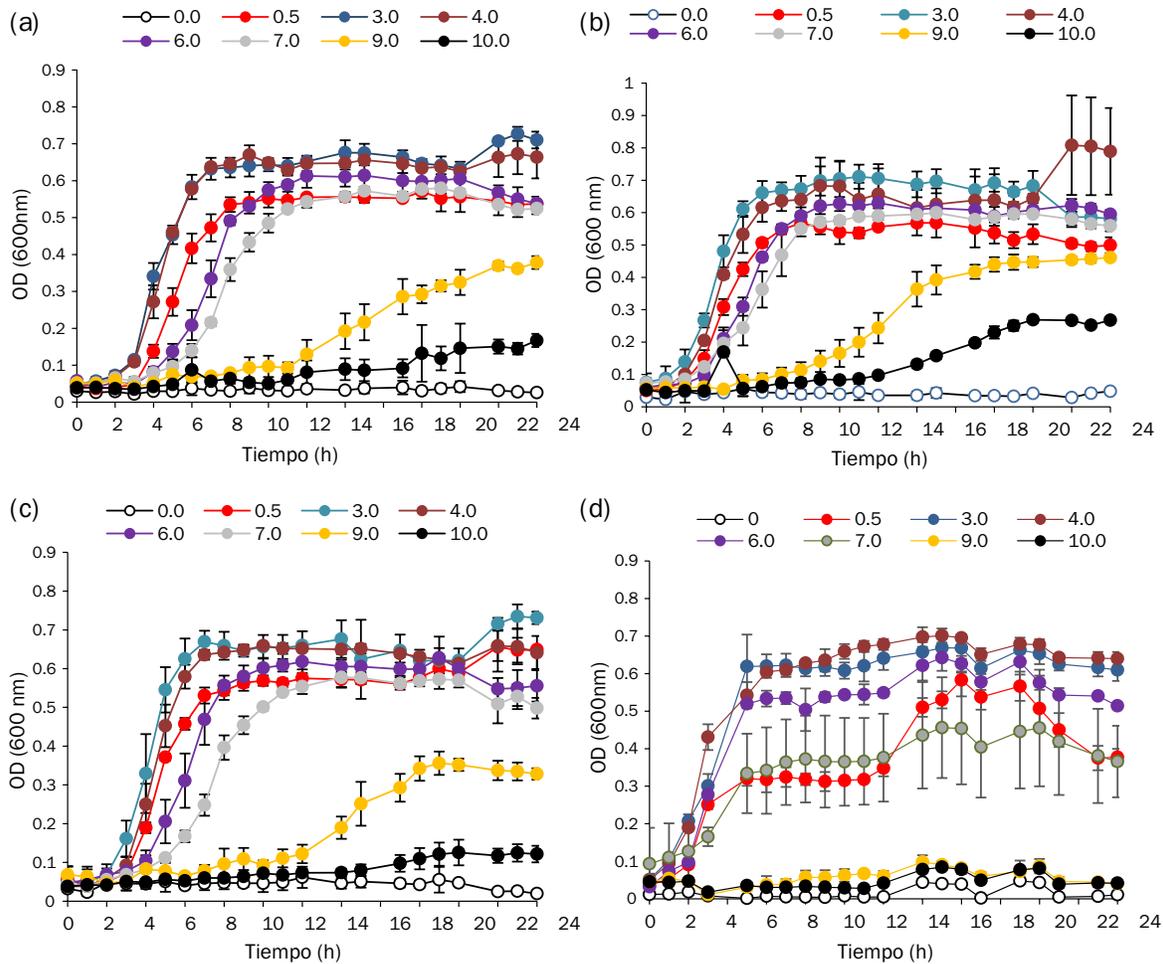


Figura 4.- Cinética de crecimiento de *Vibrio parahaemolyticus* con diferentes grados de virulencia a distintas salinidades. (a) M0904+++; (b) M0603++; (c) M0905+ y (d) M0702-. Las barras indican SD ($n = 3$)

(Figura 5). Es notable que esta cepa mostró un retraso en el crecimiento hasta las 9h y también comenzó a crecer a pH 5 después de las 20h.

Para comparar la tasa de crecimiento entre las cepas *Vp* y relacionar esta tasa con su grado de virulencia, se tuvo que calcular la μ_{max} para cada cepa incubada a varias temperaturas, salinidades y pH, estimando posteriormente las diferencias significativas. Con respecto a la temperatura, el análisis de los datos de μ_{max}/h mostró un efecto significativo con la interacción de la temperatura*cepa ($p < .05$).

No se encontraron diferencias significativas a 4 y 21 °C ($p > .05$, Figura S1), pero a 30 y 37 °C los valores μ_{max}/h de las cepas AHPND+ (M0904+++ , M0603++ y M0905+), fueron evidentemente más bajos ($p < .05$) que la cepa AHPND-M0702. La cepa M0603 a 44

°C presentó los valores más altos de μ_{max}/h , seguido de M0904.

El análisis de los datos μ_{max}/h a diferentes salinidades mostró un efecto significativo para la interacción de la salinidad*cepa ($p < .05$). Las cepas AHPND+ y AHPND- mostraron grandes fluctuaciones en las salinidades. La cepa AHPND- tuvo la mayor μ_{max}/h en comparación con las cepas AHPND+ ($p < .05$), seguida de las cepas AHPND+ M0603++ , M0904+++ y M0905+. Entre las salinidades los valores máximos de μ_{max}/h se registraron en 4.0 y 0.5% de NaCl ($p < 0,05$).

Los resultados del análisis de datos μ_{max}/h con diferentes valores de pH también fueron de importancia para la interacción pH*cepa ($p < .05$). La cepa AHPND- (M0702) tuvo los valores más bajos de μ_{max}/h en la mayoría de los niveles de pH, excepto pH 9 y 10 ($p < .05$, Figura S3). Las cepas con los

valores generales más altos fueron AHPND+ M0603++ , M0904+++ y M0905+ sin diferencias significativas entre ellas ($p > .05$).

Discusión

La mayoría de los artículos científicos sobre *Vp* que causan AHPND se han centrado en el aislamiento, la identificación, los métodos de detección molecular y el genoma completo de las cepas. Hasta la fecha, se tiene poca información sobre las características fenotípicas y los ensayos de sensibilidad a los antibióticos.

No hubo rasgos fenotípicos distinguibles entre las cepas *Vp* AHPND+ y AHPND- con respecto al grado de virulencia. Entre cepas se mostró variabilidad en los rasgos fisiológicos y morfológicos en el uso de sustratos o producción de enzimas. Williams *et al.* (2017) encontraron que una cepa patógena de *Vp* AHPND tuvo un crecimiento

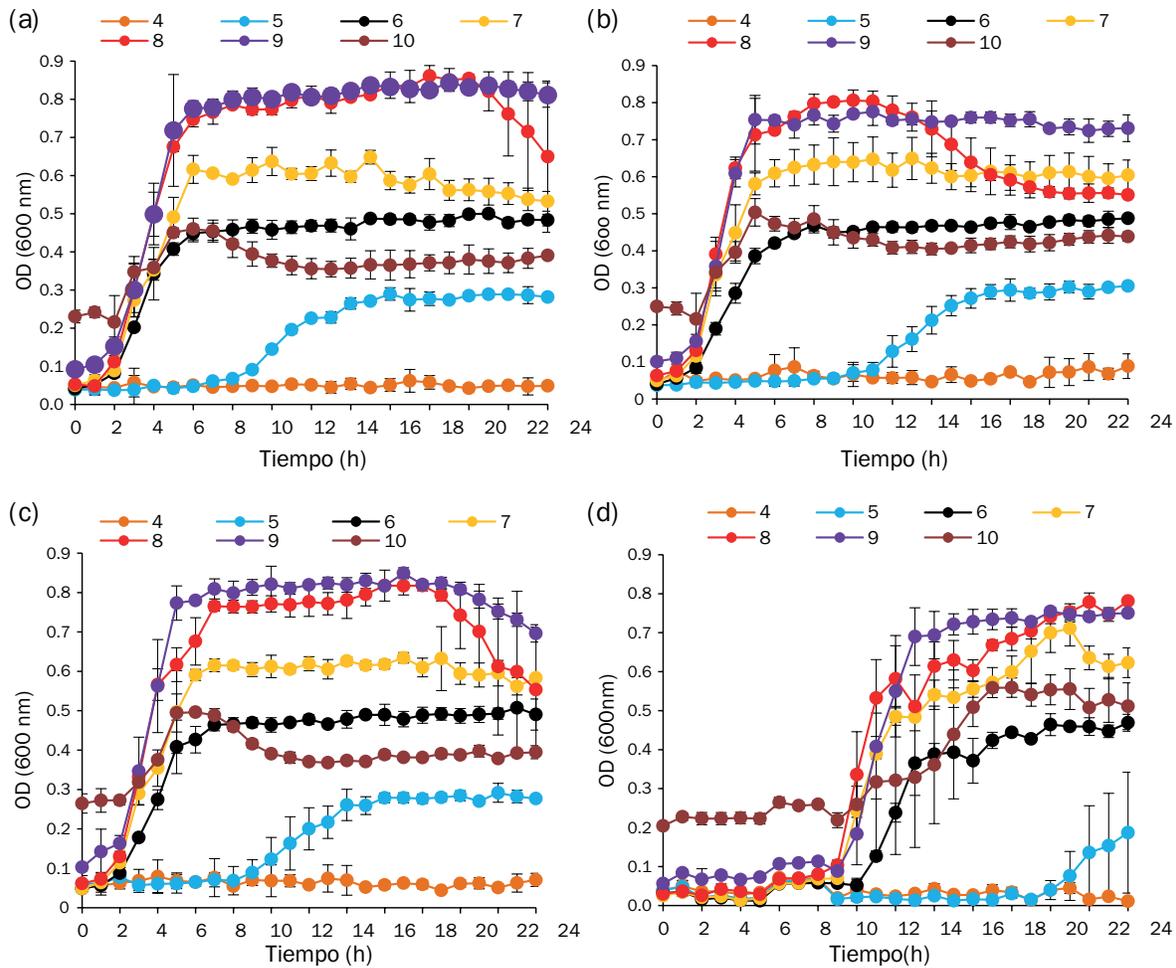


Figura 5.- Cinética de crecimiento de *Vibrio parahaemolyticus* con diferentes grados de virulencia y distintos valores de pH. (a) M0904+++; (b) M0603+++; (c) M0905+; y (d) M0702-. Las barras indican SD (n = 3)

significativamente mejor y utilizó fuentes de nutrientes de manera más eficiente que las otras dos cepas clínicas de *Vp*.

Esta alta diversidad metabólica permitió a las bacterias vivir en una amplia gama de condiciones ambientales acuáticas. Además, este es el primer informe sobre los diferentes colores de fenotipo de *Vp* aislados de camarón afectados con AHPND.

En este estudio, dependiendo del tiempo de incubación, las colonias crecieron en cepas *Vp* en CHROMagar Vibrio demostrando independencia de la virulencia, el típico color malva y azul marino. Por lo tanto, no es práctico usar CHROMagar Vibrio para aislar e identificar aislamientos AHPND+ de los sistemas de camarón, porque puede pasar por alto aislamientos patógenos. Por consiguiente, recomendamos el uso de técnicas de reacción en cadena de polimerasa para identificar adecuadamente

los aislamientos. Tradicionalmente los vibrios se han considerado altamente susceptibles a casi todos los antimicrobianos. Todas las cepas *Vp* de este estudio fueron susceptibles a la mayoría de pruebas de antibióticos, particularmente al ácido nalidíxico, pero el *Vp* fue resistente a la ampicilina y a la carbenicilina previamente reportado de granjas con camarones afectados de AHPND (Kongrueng *et al.*, 2015; Lai *et al.*, 2015).

En este estudio, independientemente del grado de virulencia, la MIC más baja fue para enrofloxacin y las cepas AHPND+ fueron las menos sensibles a la oxitetraciclina. Los vibrios patógenos para camarón mostraron sensibilidad a los antibióticos tradicionalmente utilizados en el cultivo de camarón mexicano, para controlar las infecciones por vibrio (Soto-Rodríguez, *et al.*, 2010). Además, los genomas de las cepas *Vp* AHPND+ aisladas de México y China albergan varios genes *tet*, y el gen que

codifica la resistencia a la lactama β está en cromosomas y plásmidos (Dong *et al.*, 2017; Fu, *et al.*, 2018; Han, *et al.*, 2015). El origen de estos genes de resistencia a los antibióticos puede deberse al uso masivo de antibióticos en instalaciones acuícolas desde la década de 1980 (Cabello, 2006).

El *Vp* AHPND+ no causa una infección por vibriosis típica, sino que las toxinas PirA y PirB en el agua produce una intoxicación aguda en el camarón, de esta manera la mayoría de los antibióticos fallan al no poder controlar el AHPND en las granjas. Es un grave problema para la acuicultura del camarón, el crecimiento a la resistencia de estos antibióticos.

En este estudio no se observó una relación clara entre la densidad bacteriana, medida como densidad óptica y la virulencia de la cepa. La virulencia de *Vp* que causa AHPND posiblemente depende de la concentración

de la toxina PirAB (Tinwongger *et al.*, 2016) o factores intrínsecos de la cepa (Feng, *et al.*, 2017). Para comprender la supervivencia de *Vp* AHPND+, se realizaron ensayos de microcosmos en condiciones estériles y en contacto con camarón.

El crecimiento de la colonia verde al final del experimento (atribuible a la cepa M0904+++) fue mejor en TSB+ en comparación con el agua de mar, y el agua de mar + camarones.

El *Vp* M0904+++ alcanzó la densidad bacteriana más alta (Log 9) porque TSB+ es un medio rico en nutrientes. En experimentos paralelos (datos no mostrados), encontramos que la triptona y la glucosa eran los componentes principales de la TSB utilizada por la bacteria. Sin embargo de 2 a 8 horas el crecimiento bacteriano fue similar entre los tratamientos, posiblemente porque las bacterias aprovechan su versatilidad metabólica para sobrevivir.

Para comparar el crecimiento cinético entre las cepas, el parámetro más importante es μ_{max}/h . Pocos estudios calculan el μ_{max}/h de *Vp* incubado en diversos parámetros ambientales. En este estudio, los valores de μ_{max}/h obtenidos fueron consistentes con la densidad óptica para cada condición de incubación. Independientemente del grado de virulencia, no crecieron cepas de *Vp* a 4 °C, 0% de NaCl y pH 4, por lo que no hubo relación entre la patogenicidad y estos parámetros ambientales.

El crecimiento de *Vp* como para la mayoría de los vibrios, depende de la temperatura y el organismo puede crecer bien entre 15 y 30 °C (Thompson *et al.*, 2004)

En este estudio la temperatura estuvo fuertemente asociada con las densidades de vibrio, todas las cepas crecieron mejor a 30 y 37 °C, pero solo las cepas AHPND+ alcanzaron la densidad más alta por encima del umbral infeccioso y solo estas cepas crecen a 44 °C. En este estudio, las cepas comenzaron su fase exponencial de crecimiento con el 0.5% de NaCl y mostraron una fase de retraso proporcional a la concentración de NaCl.

El μ_{max}/h más alto para AHPND+ varió de 0.5 a 4% de NaCl y para AHPND- fue de 5% de

NaCl, pero solo el *Vp* virulento creció a 10% de NaCl. La media de μ_{max}/h de cepas de *Vp* incubadas a 30 °C y 3.0% de NaCl fue de 0.48 a 0.609/h, 10 veces mayor que la μ_{max} (0.05-0.035/h) informada por Liu *et al.* (2016). Johnson *et al.* (2010) encontraron una relación no lineal cuando las salinidades varían en un rango suficientemente amplio, como se desarrolló en este estudio.

Las fluctuaciones en la salinidad representan un desafío constante para la respuesta al estrés osmótico del organismo, como se observó en este estudio *Vp* puede crecer en el rango de 1-9% de NaCl (Whitaker *et al.*, 2010). Los aislamientos de *Vp* del cultivo de camarón también mostraron una correlación positiva entre la salinidad y la densidad bacteriana (Lekshmy, *et al.*, 2014), lo que sugiere que la salinidad es un factor de crecimiento importante para las bacterias.

Debido a la utilización de una amplia variedad de fuentes de energía, la tasa máxima de crecimiento bacteriano indica que el medio ambiente, como la temperatura y la salinidad del agua de mar, puede afectar el crecimiento de *Vp* (Liu *et al.*, 2016).

La investigación sobre la relación entre el pH y el crecimiento de *Vp* es escasa. En este estudio ninguna cepa *Vp* creció a 4 y todas las cepas crecieron mejor a pH 8-9, independientemente del grado de virulencia y solo las cepas AHPND+ crecieron por encima de pH 5; sin embargo, estas cepas alcanzaron densidades bacterianas más altas. La cepa AHPND- era más sensible al pH que las cepas AHPND+.

En este estudio no se encontraron diferencias significativas en las condiciones de crecimiento entre las cepas *Vp* con diferentes grados de virulencia, aunque se observaron amplias fluctuaciones de crecimiento en la cepa AHPND. Liu *et al.* (2016) informaron que se ha demostrado una variabilidad considerable entre las cepas *Vp* con condiciones más estresantes (por ejemplo, temperaturas y salinidades subóptimas) que dan como resultado respuestas de crecimiento más variables.

La amplia tolerancia de las cepas *Vp* probadas aquí podría ser parte de la aptitud ecológica en conjunto con características metabólicas,

que mejoran la supervivencia, propagación y/o transmisión de microorganismos dentro de un nicho ecológico (Hacker & Carniel, 2001), lo que puede permitirles adaptarse y sobrevivir en casi todos los ambientes marinos-estuarinos donde se encuentran las granjas.

La supervivencia de *Vp* en diferentes ambientes coincide a condiciones específicas, como: diferentes fuentes de carbono y energía, pH del agua y temperatura, incluida la inanición. Chonsin y col. (2016) informaron que las cepas *Vp* AHPND+ adquirieron genes de virulencia AHPND como el plásmido virulento *VpA1*, mediante transferencia horizontal de genes, que convierte la *Vp* no patógena en cepas virulentas. Por lo tanto, se espera que diferentes cepas de *Vp* tengan variaciones en ambos cromosomas y un perfil fenotípico diferente; sin embargo, la cepa AHPND fue más sensible a las condiciones extremas probadas.

Los factores ambientales pueden estimular mecanismos horizontales de transferencia de genes en bacterias. Las cepas AHPND+ crecieron mejor en condiciones de estrés, lo que puede indicar un riesgo de brotes de AHPND y dispersión de enfermedades en zonas tropicales.

Los estudios en condiciones de laboratorio controlan algunas variables presentes en la naturaleza; sin embargo, nos permite identificar posibles variables que podrían afectar el proceso de infección de AHPND durante el cultivo de camarones. Entonces debe haber precaución en los límites de los ensayos *in vitro*. En trabajos futuros, el sustrato de quitina debe agregarse al cultivo bacteriano durante los experimentos para simular la condición •

Este es un extracto del artículo original, para mayor información escriba a:

Sonia A. Soto-Rodriguez
ssoto@ciad.mx