



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS  
DEL NOROESTE, S.C.

---

---

Programa de Estudios de Posgrado

**CARACTERIZACIÓN DE LOS GENES DE VIRULENCIA Y  
RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS DE *Vibrio* sp. DE DIFERENTES  
GRANJAS DE CULTIVO.**

**T E S I S**

Que para obtener el grado de

**Maestra en Ciencias**

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales  
(Orientación en Acuicultura)

P r e s e n t a

**Laura Elena Cota Ortega**

La Paz, Baja California Sur, agosto de 2024.

## ACTA DE LIBERACION DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 12:00 horas del día 18 del Mes de Julio del 2024, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos Humanos del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

**"Caracterización de los genes de virulencia y resistencia a antibióticos de *Vibrio* sp. de diferentes granjas de cultivo"**

Presentada por el alumno:

**Laura Elena Cota Ortega**

Aspirante al Grado de MAESTRO EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACIÓN DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACIÓN EN **Acuicultura**

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACIÓN DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.



---

Dr. Eduardo Quiroz Guzmán  
Co-Director de Tesis



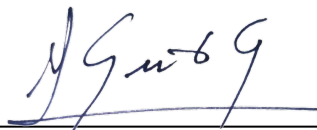
---

Dr. José Luis Balcázar Rojas  
Co-Director de Tesis



---

Dra. Sonia Araceli Soto Rodríguez  
Co-Tutora de Tesis



---

Dra. Alejandra Nieto Garibay,  
Directora de Estudios de Posgrado y  
Formación de Recursos Humanos.



**La Paz, Baja California Sur, a 20 de agosto de 2024.**

Los miembros del comité de tesis del (la) estudiante LAURA ELENA COTA ORTEGA del Programa de Maestría en Ciencias en Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales revisamos el contenido de la tesis y otorgamos el Vo.Bo. dado que la tesis no representa un plagio de otro documento como lo muestra el reporte de similitud realizado:

- Herramienta antiplagio:  
iThenticate
- Filtros utilizados:  
Excluir citas y bibliografías  
Excluir coincidencias inferiores a 12 palabras
- Porcentajes de similitud:  
Máximo 20% para tesis Posgrado  
Se muestra captura de pantalla

### Informe antiplagio Cota Ortega

INFORME DE ORIGINALIDAD

**4%**

ÍNDICE DE SIMILITUD

FUENTES PRIMARIAS

1	<a href="http://cibnor.repositorioinstitucional.mx">cibnor.repositorioinstitucional.mx</a> Internet	290 palabras — 1%
2	<a href="http://hdl.handle.net">hdl.handle.net</a> Internet	62 palabras — < 1%
3	Muhammad Junaid, Jun Wang. "Interaction of micro(nano)plastics with extracellular and intracellular biomolecules in the freshwater environment", <i>Critical Reviews in Environmental Science and Technology</i> , 2021 Crossref	48 palabras — < 1%
4	<a href="http://itzamna.bnct.ipn.mx">itzamna.bnct.ipn.mx</a> Internet	41 palabras — < 1%
5	<a href="http://repositorio.uas.edu.mx">repositorio.uas.edu.mx</a> Internet	38 palabras — < 1%
6	<a href="http://eprints.uanl.mx">eprints.uanl.mx</a> Internet	37 palabras — < 1%
7	Thandavarayan Ramamurthy, Gopinath Balakrish Nair. "Vibrio parahaemolyticus", Elsevier BV, 2023 Crossref	28 palabras — < 1%
8	<a href="http://boletin.invemar.org.co">boletin.invemar.org.co</a> Internet	28 palabras — < 1%

### Firmas del Comité

Dr. Eduardo Quiroz Guzmán

Co-director

Dr. José Luis Balcázar Rojas

Co-director

Dra. Sonia Araceli Soto Rodríguez

Co-Tutora

## **Conformación de Comités**

### **Comité Tutorial**

Dr. Eduardo Quiroz Guzmán  
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.  
Co-Director de Tesis

Dr. José Luis Balcázar Rojas  
Instituto Catalán de Investigación del Agua  
Co-Director de Tesis

Dra. Sonia Araceli Soto Rodríguez  
Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C.  
Co-Tutora de Tesis

### **Comité Revisor de Tesis**

Dr. Eduardo Quiroz Guzmán  
Dr. José Luis Balcázar Rojas  
Dra. Sonia Araceli Soto Rodríguez

### **Jurado de Examen**

Dr. Eduardo Quiroz Guzmán  
Dr. José Luis Balcázar Rojas  
Dra. Sonia Araceli Soto Rodríguez

### **Suplente**

Dr. Ricardo Vázquez Juárez

## Resumen

La acuicultura ha experimentado un crecimiento acelerado en los últimos años, pero la camaronicultura a gran escala ha estado vinculada a problemas ambientales y enfermedades, especialmente en cultivos intensivos. Por ello, el objetivo principal del estudio es comprender los mecanismos de transferencia, así como identificar y caracterizar los genes asociados a la virulencia y resistencia antimicrobiana en *Vibrio* sp. desarrollando herramientas y estrategias de identificación y resolución de problemas relacionados con enfermedades patógenas en acuicultura. En este estudio, se aislaron 10 cepas de *Vibrio* sp. de sistemas de cultivo de *Penaeus vannamei* que mostraban signos de vibriosis, seleccionando 6 cepas resistentes a antibióticos para pruebas adicionales. Las pruebas de susceptibilidad antibiótica revelaron una variabilidad significativa en la resistencia entre las cepas; la cepa T13P mostró una marcada resistencia a la oxitetraciclina (MIC de 256 µg/ml), mientras que la cepa T25 mostró resistencias elevadas al florfenicol (512 µg/ml) y la furazolidona (128 µg/ml). El análisis genómico basado en el gen 16S rRNA identificó una cepa como *V. parahaemolyticus* (T13P) y cinco cepas como *V. diabolicus* (T13N, T25P, T35, T63, T63N). Los análisis de hibridación y comparación genómica mostraron una alta similitud entre las cepas de la misma especie, mientras que el ensamblaje genómico con A5 generó mejores resultados en cuanto al número y longitud de los contigs. Los mapas genómicos revelaron la presencia de diversos genes de resistencia a antibióticos, como el *vanT-vanG* cluster, *vanY-vanB* cluster, *tet(35)*, *TxR*, *bla<sub>CARB-42</sub>*, *bla<sub>CARB-18</sub>*, *rsmA*, *adeF*, *CRP*, *tet(B)* y *tetR*. Además, se identificó un plásmido en la cepa T13P con genes de virulencia y resistencia, con alta similitud a plásmidos de otras cepas del género *Vibrio*. El análisis de profagos mostró la presencia de fagos en la mayoría de las cepas, excepto en T35 y T13N. Los análisis de tipificación multilocus de secuencias (MLST) revelaron relaciones genéticas cercanas entre las cepas mexicanas y cepas de origen chino y asiático, independientemente de la especie analizada.

**Palabras clave:** Resistencia, antimicrobianos, *Vibrio*, *Penneus vannamei*, genomas.

ORCID: 0000-0001-6249-7583

Vo.Bo. Co-Directores de Tesis



---

Dr. Eduardo Quiroz Guzmán



---

Dr. José Luis Balcázar Rojas

## Summary

Aquaculture has experienced rapid growth in recent years, but large-scale shrimp farming has become associated with environmental problems and diseases, especially in intensive farming. The main objectives of this study are to understand the mechanisms of transfer, as well as to identify and characterize genes associated with virulence and antimicrobial resistance in *Vibrio* sp., and to develop tools and strategies for the identification and resolution of issues related to pathogenic diseases in aquaculture. In this study, ten strains of *Vibrio* sp. were isolated from *Penaeus vannamei* culture systems showing signs of vibriosis, with six antibiotic-resistant strains selected for further testing. Antibiotic susceptibility tests revealed significant variability in resistance among the strains, with strain T13P showing marked resistance to oxytetracycline (MIC of 256 µg/ml), while strain T25 exhibited high resistance to florfenicol (512 µg/ml) and furazolidone (128 µg/ml). Genomic analysis based on the 16S rRNA gene identified one strain as *V. parahaemolyticus* (T13P) and five strains as *V. diabollicus* (T13N, T25P, T35, T63, T63N). Hybridization and genomic analyses showed high similarity among strains of the same species, whole genome assembly using A5 yielded better results in terms of contig number and length. Genomic mapping revealed the presence of various antibiotic resistance genes, such as the *vanT-vanG* cluster, *vanY-vanB* cluster, *tet(35)*, *TxR*, *bla<sub>CARB-42</sub>*, *bla<sub>CARB-18</sub>*, *rsmA*, *adeF*, *CRP*, *tet(B)*, and *tetR*. Additionally, a plasmid carrying virulence and resistance genes was identified in strain T13P, showing high similarity to plasmids found in other *Vibrio* strains. Prophage analysis indicated the presence of phages in most strains, except T35 and T13N. Multilocus sequence typing (MLST) analysis revealed close genetic relationships between Mexican strains and strains of Chinese and Asian origin, irrespective of the species analyzed.

**Keywords:** Resistance, antimicrobials, *Vibrio*, *Penneus vannamei*, genomes.

ORCID: 0000-0001-6249-7583

Vo.Bo. Co-Directores de Tesis



---

Dr. Eduardo Quiroz Guzmán



---

Dr. José Luis Balcázar Rojas

## Dedicatoria

A mi prometido, Eduardo, por estar siempre a mi lado, motivándome sobre todo en los momentos difíciles y por creer en mí incluso cuando yo misma dudaba. Tu apoyo incondicional ha sido una de las fuerzas impulsoras detrás de la culminación de esta tesis y de mi vida. Gracias por ser mi compañero, mi confidente y mi inspiración constante.

A mi madre y a mi hermano, por su amor y su fe inquebrantable en mis capacidades. Sus sacrificios, apoyo constante y aliento han sido fundamentales para que yo pueda alcanzar este logro. Gracias por estar ahí en cada paso, brindándome consuelo en los momentos difíciles y celebrando mis éxitos. No tengo palabras suficientes para expresar mi gratitud por todo lo que han hecho por mí.

A mi amiga incondicional, Cindy Dávalos, por tu amistad, apoyo y por estar siempre presente cuando más lo necesitaba. Tu compañía ha sido invaluable en este viaje.

A todos los amigos que hice durante este camino, Josh, Dante y Natalia, por su compañerismo y las innumerables experiencias compartidas. Gracias por formar parte de esta aventura y por hacer de este trayecto algo especial.

Y a mi pulga aventurera, La Quesito, por aguantar a mi lado los desvelos y trabajos hasta tarde. Tu compañía ha sido un consuelo en las noches largas de estudio y trabajo.

Esta tesis es tanto mía como de ustedes, quienes con su amor y apoyo me han ayudado a llegar hasta aquí.

## **Agradecimientos**

Al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. (CIBNOR) y a la Dirección de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos Humanos, por permitirme realizar mis estudios de Maestría y utilizar las instalaciones y recursos para la elaboración de este trabajo.

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencia y Tecnologías (CONAHCYT) por la beca otorgada (No: 828867).

Al Instituto Catalán de Investigación del Agua (ICRA) por permitirme realizar mi estancia de investigación y utilizar sus instalaciones.

A mis Co-directores, el Dr. Eduardo Quiroz Guzmán y el Dr. José Luis Balcázar Rojas, así como a mi Co-tutora, la Dra. Sonia Araceli Soto Rodríguez, por su invaluable apoyo, guía y paciencia durante mis estudios de Maestría.

Al Laboratorio de Microbiología y Biotecnología para la Integración Agroacuícola y Multitrófica de CIBNOR por proporcionarme las bacterias y recursos necesarios para la tesis.

A mis amigos y compañeros de laboratorio, Iraís Ramírez y Bernardo Veyrand, por su apoyo y acompañamiento durante mi tesis.

A Eduardo Contreras, por ser mi mayor apoyo y compañero de vida. Gracias por todo; me faltan palabras para expresar tanto amor y cariño.

A mi madre, Armida Ortega Castro, por motivarme y apoyarme en cada etapa de la vida, y a mi hermano, Omar Lomelí Ortega, por permitirme pasar mi estancia a su lado y apoyarme siempre en todo momento.

A mi amiga Cindy Dávalos, por compartir tantas risas y momentos juntas. A Josh, Dante y Natalia, por su amistad y cariño.



## Contenido

<b>Resumen</b> .....	i
<b>Summary</b> .....	ii
<b>Dedicatoria</b> .....	iii
<b>Agradecimientos</b> .....	iv
<b>Contenido</b> .....	v
<b>Lista de figuras</b> .....	vi
<b>Lista de tablas</b> .....	vi
<b>Glosario</b> .....	ix
<b>1.INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>2.ANTECEDENTES</b> .....	5
2.1 Resistencia a antimicrobianos en vibrios .....	5
2.2 Importancia de los plásmidos en la resistencia a antimicrobianos.....	8
2.3 Plásmidos y la presencia de la toxina pirAB .....	9
<b>3.JUSTIFICACIÓN</b> .....	13
<b>4.HIPÓTESIS</b> .....	14
<b>5.OBJETIVOS</b> .....	15
5.1 Objetivo general .....	15
5.2 Objetivos particulares.....	15
<b>6.MATERIAL Y METODOS</b> .....	16
6.1 Aislamiento de cepas bacterianas presentes en <i>Penaeus vannamei</i> cultivado.....	16
6.2 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI). .....	16
6.3 Aislamiento y secuenciación de ADN genómico de cepas resistentes. ....	17
6.4 Análisis bioinformático.....	17
6.4.1 Ensamblaje, identificación de cambios genéticos y anotación de los genomas. ....	17
6.4.2 Ensamblaje y anotación del genoma.....	18
6.4.3 Análisis de los genomas. ....	19
6.4.4 Análisis y construcción del plásmido pirAB .....	19
6.4.5 Construcción de mapas genómicos .....	20
6.4.6 Análisis MSLT y tipificación molecular.....	20
<b>7.RESULTADOS</b> .....	22
7.1 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) a varios antibióticos en <i>Vibrio</i> sp.....	22
7.2 Análisis genómico.....	22
7.3 Análisis comparativo de ensamblaje genómico.....	25
7.4 Análisis de caracterización genómica de mapas de genoma completo.....	25
7.5 Análisis de profagos y comparación de plásmidos.....	32
7.6 Análisis MLST (Tipificación de Secuencias Multilocus) de cepas de <i>Vibrio</i> .....	34
<b>8.DISCUSIÓN</b> .....	37
8.1 Análisis de identificación .....	37
8.2 Pruebas de susceptibilidad a antimicrobianos .....	37
8.3 Análisis genético de la resistencia a antibióticos .....	39
8.4 Plásmidos y resistencia antibiótica.....	43
8.5 Análisis comparativo de plásmidos .....	45
8.6 Interacción entre plásmidos y profagos en la resistencia antibiótica.....	48
8.7 Análisis MLST y dispersión global de cepas de <i>Vibrio</i> .....	49
<b>9. CONCLUSIONES</b> .....	54
<b>10.LITERATURA CITADA</b> .....	55

## Lista de figuras

<b>Figura 1.</b> Análisis de agrupamiento jerárquico y mapa de calor basado en ANI del genoma completo para los genomas de 6 aislamientos de <i>Vibrio</i> sp., de las cepas analizadas en el estudio.....	24
<b>Figura 2.</b> Análisis comparativo de la calidad del ensamblaje entre diferentes programas para 6 cepas (T13N_S206, T63_S14, T35_S22, T35_S22, T25P_S208, T13P_S205, T63N_S61), evaluando tanto el número de contigs (A) como la longitud de los fragmentos de contig (B). En el gráfico, el color azul claro representa a Skesa, el azul intenso a A5 y el rojo al software SPAdes.....	25
<b>Figura 3.</b> Genoma circular de <i>Vibrio diabolicus</i> . (cepa T13N). Desde el centro hacia afuera, el primer anillo (en azul claro) muestra las secuencias codificantes para proteínas (CDS). El segundo anillo (en verde y morado) ilustra el contenido de GC (+/-). El tercer anillo (en negro intenso) representa el contenido de GC. Las flechas rojas indican genes asociados con la resistencia antimicrobiana (AMR). El último anillo (en morado) marca los profagos, mientras que los segmentos grises representan los contigs/cromosomas.....	26
<b>Figura 4.</b> Genoma circular de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> . (cepa T13P). Desde el centro hacia afuera, el primer anillo (en azul claro) muestra las secuencias codificantes para proteínas (CDS). El segundo anillo (en verde y morado) ilustra el contenido de GC (+/-). El tercer anillo (en negro intenso) representa el contenido de GC. Las flechas rojas indican genes asociados con la resistencia antimicrobiana (AMR). El último anillo (en morado) marca los profagos, mientras que los segmentos grises representan los contigs/cromosomas.....	27
<b>Figura 5.</b> Genoma circular de <i>Vibrio diabolicus</i> . (cepa T25). Desde el centro hacia afuera, el primer anillo (en azul claro) muestra las secuencias codificantes para proteínas (CDS). El segundo anillo (en verde y morado) ilustra el contenido de GC (+/-). El tercer anillo (en negro intenso) representa el contenido de GC. Las flechas rojas indican genes asociados con la resistencia antimicrobiana (AMR). El último anillo (en morado) marca los profagos, mientras que los segmentos grises representan los contigs/cromosomas.....	28
<b>Figura 6.</b> Genoma circular de <i>Vibrio diabolicus</i> (cepa T35). Desde el centro hacia afuera, el primer anillo (en azul claro) muestra las secuencias codificantes para proteínas (CDS). El segundo anillo (en verde y morado) ilustra el contenido de GC (+/-). El tercer anillo (en negro intenso) representa el contenido de GC. Las flechas rojas indican genes asociados con la resistencia antimicrobiana (AMR). El último anillo (en morado) marca los profagos, mientras que los segmentos grises representan los contigs/cromosomas.....	29
<b>Figura 7.</b> Genoma circular de <i>Vibrio diabolicus</i> (cepa T63). Desde el centro hacia afuera, el primer anillo (en azul claro) muestra las secuencias codificantes para proteínas (CDS). El segundo anillo (en verde y morado) ilustra el contenido de GC (+/-). El tercer anillo (en negro intenso) representa el contenido de GC. Las flechas rojas indican genes asociados con la resistencia antimicrobiana (AMR). El último anillo (en morado) marca los profagos, mientras que los segmentos grises representan los contigs/cromosomas.....	30
<b>Figura 8.</b> Genoma circular de <i>Vibrio diabolicus</i> (cepa T63N). Desde el centro hacia afuera, el primer anillo (en azul claro) muestra las secuencias codificantes para proteínas (CDS). El segundo anillo (en verde y morado) ilustra el contenido de GC (+/-). El tercer anillo (en negro intenso) representa el contenido de GC. Las flechas rojas indican genes asociados con la resistencia antimicrobiana (AMR). El último anillo (en morado) marca los profagos, mientras que los segmentos grises representan los contigs/cromosomas.....	31
<b>Figura 9.</b> Perfil de genes relacionados con la resistencia a antibióticos en <i>V. parahaemolyticus</i> (T13P) y <i>V. diabolicus</i> (T13N, T25P, T35, T63 y T63N).....	32

**Figura 10.** Plásmido pT13P de la cepa T13P (*V. parahaemolyticus*) que alberga los genes *pirA* y *pirB*. De afuera hacia adentro, el primer anillo (azul) muestra las proteínas codificantes (CDS), el segundo anillo (negro) denota el contenido de G+C, y el tercer anillo (morado/verde) indica el sesgo de G+C. .... 33

**Figura 11.** Análisis comparativo del plásmido pVA1 de la cepa T13P, que contiene los genes *pirA* y *pirB* (indicados con flechas rojas), junto a otros plásmidos que también contienen los genes *pirA* y *pirB*. Las flechas azules representan las secuencias codificantes de proteínas (CDS), las flechas anaranjadas representan las transposasas IS5, y las flechas verdes representan los transposones Tn3. Las regiones genómicas homólogas entre los plásmidos están resaltadas con sombreado gris..... 34

**Figura 12.** Árbol de expansión mínima del perfil alélico de tipificación multilocus del genoma central de aislados de *V. diabolicus* de este estudio y aquellos obtenidos de estudios previos. Los grupos están coloreados y etiquetados según el país de origen..... 35

**Figura 13.** Árbol de expansión mínima del perfil alélico de tipificación multilocus de cepas de *V. parahaemolyticus* que contienen los genes *pirA* y *pirB* de este estudio y aquellos obtenidos de estudios previos. Los grupos están coloreados y etiquetados según el país de origen. .... 36

**Lista de tablas**

<b>Tabla 1.</b> Concentración mínima inhibitoria (CMI) en $\mu\text{g/ml}$ a varios antibióticos (ENR, enrofloxacina; FZD, furazolidona; FLF, florfenicol; OXI, oxitetraciclina) en <i>Vibrio</i> sp.....	22
<b>Tabla 2.</b> Identificación de cepas en tres bases de datos Blast, EZbio y Cge.....	23
<b>Tabla 3.</b> Análisis de hibridación y comparación de cepas con características genómicas. ....	24

## Glosario

**Acuicultura:** Cultivo de especies acuáticas vegetales y animales en instalaciones controladas, como estanques, tanques o jaulas, con el objetivo de producir alimentos u otros productos comerciales.

**Camaronicultura:** Rama de la acuicultura enfocada en el cultivo y producción de camarones en estanques o instalaciones acuícolas, utilizando técnicas como la siembra de larvas, suministro de alimento y control del ambiente acuático.

**Vibriosis:** Enfermedad bacteriana causada por bacterias del género *Vibrio*, afectando principalmente a organismos acuáticos como peces, moluscos y crustáceos. Puede causar lesiones, septicemia y mortalidad masiva en poblaciones susceptibles.

***Penaeus vannamei*:** Especie de camarón blanco nativa del Pacífico oriental, ampliamente cultivada a nivel comercial en granjas camaronícolas debido a su rápido crecimiento, alta tasa de supervivencia y adaptabilidad a diversos sistemas de cultivo.

**Susceptibilidad antibiótica:** Capacidad de un antibiótico para inhibir el crecimiento o causar la muerte de una cepa bacteriana específica. Se determina mediante pruebas de sensibilidad in vitro.

**Concentración Mínima Inhibitoria (MIC):** Concentración más baja de un antibiótico que inhibe completamente el crecimiento visible de un microorganismo después de una incubación de 24 horas. Se utiliza para determinar la susceptibilidad antibiótica.

**Gen 16S rRNA:** Gen que codifica para el componente ribosómico 16S de la subunidad pequeña del ribosoma bacteriano. Se utiliza como marcador molecular para la identificación y clasificación de especies bacterianas debido a su conservación evolutiva.

**Hibridación:** Proceso de formación de dúplex de ácidos nucleicos mediante el apareamiento de bases complementarias entre dos cadenas de ADN o ARN. Se utiliza en técnicas de biología molecular para detectar secuencias específicas.

**Ensamblaje genómico:** Proceso computacional de ensamblar y ordenar fragmentos de secuencias de ADN obtenidos de la secuenciación de genomas para reconstruir secuencias genómicas completas.

**Contig:** Secuencia de ADN reconstruida a partir de la superposición y ensamblaje de múltiples fragmentos o lecturas de secuenciación que se superponen entre sí.

**Mapa genómico:** Representación visual y anotada de la organización y características de un genoma, incluyendo la ubicación de genes, operones, regiones codificantes y no codificantes, así como otros elementos genéticos.

**Gen de resistencia:** Segmento de ADN que codifica proteínas o mecanismos que confieren resistencia a uno o más antibióticos u otros agentes antimicrobianos a un microorganismo.

**Profago:** Virus bacteriófago que se ha integrado en el genoma de una bacteria huésped, permaneciendo en estado latente hasta que se induce su ciclo lítico para producir nuevas partículas virales.

**Plásmido:** Molécula de ADN extracromosómico capaz de replicarse de forma autónoma dentro de una célula bacteriana. Pueden portar genes que confieren características adicionales, como resistencia a antibióticos o factores de virulencia.

**Análisis MLST:** Tipificación de secuencias multilocus, método de tipificación molecular que caracteriza cepas bacterianas mediante el análisis de secuencias de varios genes seleccionados.

**Patógeno:** Microorganismo capaz de causar enfermedades en otros organismos vivos al invadir sus tejidos y producir toxinas o dañar sus células.

**Virulencia:** Grado de patogenicidad de un microorganismo, es decir, su capacidad para causar enfermedad en un huésped susceptible. Depende de factores como la producción de toxinas, adhesinas y otros mecanismos de invasión y evasión del sistema inmune.

**Resistencia antibiótica:** Capacidad adquirida por un microorganismo para resistir los efectos inhibitorios o letales de uno o más antibióticos, mediante mecanismos genéticos que pueden transmitirse a otras generaciones.

**Transferencia génica horizontal:** Proceso por el cual los genes se transfieren entre organismos, incluso de diferentes especies, a través de mecanismos como la conjugación, transformación o transducción, permitiendo la adquisición de nuevos rasgos genéticos.

**Transposón:** Secuencia de ADN móvil capaz de cambiar de posición dentro del genoma de un organismo mediante un mecanismo de corte y re inserción, frecuentemente asociado con la transferencia de genes de resistencia.

**Clúster génico:** Grupo de genes adyacentes en un genoma que están involucrados en una misma función o ruta metabólica, co-regulados y generalmente transferidos como una unidad.

**Bomba de flujo:** Proteína de membrana presente en bacterias que actúa como un sistema de expulsión, removiendo activamente sustancias tóxicas, antibióticos u otros compuestos del interior de la célula bacteriana, contribuyendo a la resistencia antimicrobiana.

**Tipificación molecular:** Conjunto de técnicas basadas en el análisis de ácidos nucleicos o proteínas que permiten caracterizar y diferenciar cepas bacterianas a nivel molecular, como la electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE), MLST, MLVA, entre otras.

## 1. INTRODUCCIÓN

Durante los últimos años el camarón, como producto alimenticio desempeña un papel fundamental en el comercio global, en los últimos años, ha experimentado un notable aumento en su demanda, acompañado de un incremento significativo en su precio a nivel internacional, impulsando de manera exponencial el crecimiento de las exportaciones de camarón de todo el mundo (Gephart *et al.*, 2023). Sin embargo, este aumento en la demanda también ha planteado desafíos importantes relacionados que se relacionan principalmente con la sostenibilidad y conservación de las poblaciones naturales de camarón, la sobreexplotación del camarón silvestre ha sido una preocupación creciente durante las últimas décadas, debido a los bajos registros en la captura natural, lo que ha generado graves problemas ambientales en muchas regiones costeras a nivel mundial (Figueredo *et al.*, 2020). Ante esta situación y la creciente demanda la acuicultura ha surgido como una alternativa prometedora para abastecer el mercado con camarón de manera más sostenible, sin dejar de satisfacer la demanda global, este cambio ha marcado una evolución significativa en la producción a nivel mundial, pasando de los métodos tradicionales de cultivo a sistemas acuícolas intensivos, más eficientes, controlados y con mayores niveles de procesamiento (Emerenciano *et al.*, 2022).

Para el sector mexicano el cultivo de camarón ha tenido un impacto notable en la economía y el desarrollo de ciertas regiones, especialmente en la costa noroeste del Pacífico, el cual a partir de mediados de la década de 1980, se centró inicialmente en la extracción de la especie *Litopenaeus stylirostris* (Santiago *et al.*, 2009), sin embargo con el tiempo, esta especie fue reemplazada por el camarón blanco *Penaeus vannamei*, debido a su mayor adaptabilidad y rentabilidad en los sistemas de cultivo. En las últimas décadas, México ha sido testigo de una disminución significativa en la captura de camarón silvestre en sus costas mientras que la producción acuícola ha experimentado un crecimiento exponencial (Berlanga-Robles *et al.*, 2022). Por ello el camarón blanco se ha convertido en la especie más ampliamente cultivada en el país, no solo por su valor económico, sino también por su facilidad de manejo y los excelentes resultados que ofrece en términos de producción y adaptabilidad. Para el país los principales productores mexicanos se concentran principalmente en estados como Sonora,



Sinaloa, Baja California Sur, Baja California Norte y Nayarit, los cuales contribuyen de manera significativa a la economía regional y nacional, estas regiones no solo ofrecen condiciones climáticas propicias para el cultivo de camarón, sino que también cuentan con la infraestructura necesaria y la experiencia acumulada para llevar a cabo esta actividad de manera exitosa (Noguera-Muñoz *et al.*, 2021).

Debido a los grandes niveles de procesamiento aunado a las condiciones ideales en los sistemas de producción, el uso de fármacos surgió como una alternativa para controlar el riesgo de infección que cada vez fueron más comunes, pero el uso intensivo y continuado de antibióticos en las últimas décadas ha generado problemas tanto ambientales como de salud pública a nivel mundial. Hoy en día la resistencia a los antimicrobianos es una de las principales consecuencias del abuso a los fármacos, la cual ha propiciado la aparición de cepas bacterianas resistentes que desafían los tratamientos convencionales, complicando el manejo de enfermedades no solo en los organismos acuícolas, sino también en los sistemas acuícolas natura e incluso su aparición en humanos (Bondad-Reantaso *et al.*, 2023). Esta resistencia puede provocar graves impactos en la salud que incluyen alteraciones en la microbiota intestinal humana, que a su vez resultan en cambios metabólicos y en casos extremos, intoxicaciones generalizadas, además, la resistencia a los antibióticos tiene repercusiones significativas en los ambientes acuáticos donde, la persistencia de estos compuestos puede afectar la biogeoquímica de los sedimentos y conducir a la acumulación de residuos químicos nocivos (Miranda *et al.*, 2022).

Estos cambios pueden alterar las comunidades microbianas y la biodiversidad del entorno donde se encuentren, generando problemas ecológicos y reduciendo la calidad del agua y trayendo consigo efectos a largo plazo en la salud de los ecosistemas acuáticos (Lin *et al.*, 2023). En México, algunos de los antibióticos comúnmente utilizados para controlar enfermedades bacterianas en la acuicultura incluyen la oxitetraciclina, florfenicol y enrofloxacin (Estrada *et al.*, 2023). Internacionalmente se recurre también a fármacos como clortetraciclina, quinolonas, ciprofloxacina, norfloxacina, ácido oxolínico, perfloxacina, gentamicina y tiamulina (Chauhan y Punia, 2023), pero la elección y uso de estos antimicrobianos deben ser manejados con extremo cuidado, para evitar la propagación de resistencia antibiótica asegurando que las prácticas de tratamiento no solo sean eficaces, sino

también sostenibles y seguras tanto para el ambiente como para el consumo humano (Ågerstrand *et al.*, 2023).

Sin embargo, el uso excesivo y prolongado de estos antibióticos ha generado una preocupación creciente, la resistencia a los antibióticos es resultado de la capacidad de los microorganismos para evitar y contrarrestar los efectos de los antibióticos (Yang *et al.*, 2020). Dicha resistencia puede ser desarrollada a través de diversos mecanismos a nivel celular, donde cada uno de ellos representa un desafío único para la eficacia de los tratamientos. Uno de estos mecanismos implica la modificación del blanco del antibiótico, donde las bacterias pueden alterar las estructuras celulares específicas las cuales son el objetivo de los antibióticos, impidiendo así que estos últimos presenten acción terapéutica (Zhang y Cheng, 2022). Otro mecanismo común es la disminución de la permeabilidad celular al antibiótico, lo que reduce la cantidad de antibiótico que puede penetrar en la bacteria y, por lo tanto, su disminución su efectividad. Además, algunas bacterias han desarrollado mecanismos de resistencia antimicrobiana, por ejemplo, sistemas de bombas de eflujo, las cuales actúan expulsando activamente los antibióticos, que pueden ser de diferentes familias químicas hacia el exterior de la célula antes de que puedan tener un efecto letal. Otro mecanismo importante es la producción de enzimas que degradan el antibiótico, esto provoca que su efecto se nulifique y por ende su capacidad para inhibir el crecimiento bacteriano o eliminar las bacterias sea inexistente, estas enzimas logran descomponer los antibióticos en componentes inactivos, neutralizando así su efecto terapéutico. De manera general estos mecanismos de resistencia no solo permiten a las bacterias evadir la acción de los antibióticos, sino que también pueden ser transferidos entre diferentes bacterias a través de la transferencia horizontal de genes (Patel *et al.*, 2010; Munita *et al.*, 2016).

El impacto de la resistencia a los antibióticos afecta incluso a nivel genético, alterando incluso a la regulación de la expresión génica y en consecuencia afectando negativamente a procesos cruciales como la transcripción, además de ello cuando la resistencia es adquirida las bacterias pueden intercambiar genes que confieren resistencia con otros organismos mediante procesos como la transferencia horizontal, mecanismos como la conjugación, transducción y transformación, los cuales permiten la rápida propagación de genes de resistencia entre poblaciones bacterianas, debido al flujo constante y activo de genes. Aunado a eso un punto importante de abordar es la relación entre los plásmidos y los profagos, hoy en día se sabe

que los profagos pueden participar activamente en la regulación de genes, los cuales pueden ser activados bajo ciertas condiciones y comenzar a replicarse dentro de la bacteria huésped (Braetz *et al.*, 2023). Durante este proceso los profagos pueden llevar consigo genes de resistencia a los antibióticos, que posteriormente pueden ser transferidos a otros microorganismos a través de la replicación y la lisis celular, esta interacción entre plásmidos y profagos amplifica aún más la capacidad de las bacterias para adquirir y diseminar genes de resistencia, aumentando la complejidad del problema de la resistencia antimicrobiana (Nepal *et al.*, 2023).

Uno de los géneros bacterianos más importantes dentro de los sistemas de cultivo es *Vibrio*, el cual comprende especies patógenas de gran importancia en ambientes acuáticos y marinos, siendo responsables de diversas enfermedades en humanos y organismos acuáticos, la resistencia a los antibióticos en este género representa un desafío significativo debido a su capacidad para adquirir y transferir genes de resistencia a través de mecanismos de transferencia horizontal, varios estudios han documentado la presencia de genes de resistencia a múltiples antibióticos en especies como *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus* y *Vibrio vulnificus*, los cuales se encuentran comúnmente en plásmidos y transposones, facilitando su transferencia a otras cepas y especies (Broberg *et al.*, 2011; Molina-González *et al.*, 2014). Además, se ha observado que, para especies del género, la presencia de profagos desempeña un papel importante en la propagación de la resistencia a los antibióticos, transportando genes de resistencia y contribuyendo a su diseminación entre las poblaciones bacterianas (Hossain *et al.*, 2020).

La especie *Vibrio parahaemolyticus* es una de las más relevantes dentro del género *Vibrio*, la cual es una especie marina patógena de gran importancia en la acuicultura, ya que puede provocar enfermedades graves en diversos organismos acuáticos. Uno de los aspectos más relevantes de su patogenicidad radica en la presencia de los genes *pirAB*, responsables de codificar la toxina PirA/PirB (Xiao *et al.*, 2017), esta toxina es la responsable de la Enfermedad de la Necrosis Hepatopancreática Aguda (AHPND), que resulta en la rápida destrucción de las células del hepatopáncreas, llegando a causar entre un 70% y un 100% de mortalidad, lo que ha resultado en grandes pérdidas económicas desde su aparición (Soto-Rodríguez *et al.*, 2022). La resistencia a los antibióticos en *V. parahaemolyticus* representa un desafío significativo en esta industria debido a su capacidad para adquirir y diseminar genes

de resistencia. Varios estudios han informado sobre la presencia de cepas resistentes a múltiples antibióticos, principalmente contra aquellos comúnmente utilizados en acuicultura, como las tetraciclinas, las quinolonas y los  $\beta$ -lactámicos (Molina-Aja *et al.*, 2002).

La adquisición de genes de resistencia en *V. parahaemolyticus* puede ocurrir a través de diversos mecanismos, incluyendo la transferencia horizontal de genes mediante plásmidos, integrones, transposones y fagos. Estos elementos genéticos móviles actúan como vehículos para la diseminación de la resistencia a los antibióticos, permitiendo que las bacterias adquieran rápidamente nuevos genes de resistencia de otras cepas o especies. Hoy en día se sabe que la presencia de estas cepas resistentes de *V. parahaemolyticus* en granjas acuícolas puede conducir a infecciones difíciles de tratar, altas tasas de mortalidad y pérdidas económicas significativas en la acuicultura. Estas cepas resistentes pueden proliferar rápidamente en los estanques de cultivo, causando brotes de enfermedades que son resistentes a los antibióticos comúnmente utilizados, lo que dificulta el control y el tratamiento de las infecciones (Parthasarathy *et al.*, 2021).

## 2. ANTECEDENTES

Las primeras investigaciones científicas en el estudio de enfermedades que afectan al camarón se remontan al inicio del siglo XX, Angier (1912) llevó a cabo investigaciones pioneras que se centraron en describir los procesos infecciosos generales que afectaban a estos crustáceos. No obstante, estas primeras investigaciones fueron en su mayoría descriptivas y carecieron de un enfoque específico en la capacidad de los agentes antimicrobianos para controlar el crecimiento bacteriano en camarones. No fue sino hasta mitad del siglo (50-60's) donde se realizaron investigaciones relacionadas con la capacidad inhibitoria de crecimiento bacteriano en camarones de cultivo, Waters *et al.*, en 1969 observaron la capacidad del nitrofurano vs la clortetraciclina, registrando para el momento que eran necesarias mayores concentraciones de antibiótico o en su defecto combinación de fármacos para detener el crecimiento bacteriano, siendo la clortetraciclina el antibiótico más eficaz y además de necesitar alrededor de 20 µg para suprimir el crecimiento en el mismo grado.

### 2.1 Resistencia a antimicrobianos en vibrios

Años más tarde se realizaron una de las primeras investigaciones en relación con la causa de altas mortalidades en cultivos de camarón, Karunasagar *et al.*, en 1994 analizaron la causa de muerte masiva de larvas de *Penaeus monodon*, encontrando que *V. harveyi* aislado de las larvas fueron causantes del proceso infeccioso, las cuales estaban ausentes en huevos y nauplios sanos. Los resultados encontrados identificaron a presuntivamente a *V. harveyi* como bacteria resistente a distintos antibióticos a pesar de que estos ya habían sido utilizados previamente en los cultivos y que *V. harveyi* había estado colonizando tanques de larvas desde tiempo atrás. Alderman y Hastings (1998) investigaron el impacto sobre el uso de antibióticos en la acuicultura de camarones, enfocado principalmente en el desarrollo de resistencia y los potenciales riesgos para el consumidor, e incluso analizaron el posible peligro sobre la transferencia genética de dicha resistencia a los consumidores humanos.

Con la llegada de nuevas tecnologías a México, uno de los primeros estudios enfocados en el seguimiento de plásmidos, fue realizado por Molina-Aja *et al.*, (2002) quienes investigaron la presencia de plásmidos y su relación con la resistencia a antibióticos en cepas aisladas de camarones peneidos enfermos, específicamente de órganos y tejidos representativos,

provenientes de brotes y recolectados en varias regiones del noroeste de México. El análisis reportó que el 80% de las cepas sometidas a pruebas, contaban con 11 plásmidos comunes, donde 70% fueron multirresistentes a carbenicilina y ampicilina encontrándose una correlación significativa. Posteriormente Devi *et al.*, (2009) reportan la resistencia a los antibióticos y perfilado de plásmidos de *V. parahaemolyticus* en aislados de granjas camaroneras a lo largo de la costa suroeste de India, probando la susceptibilidad frente a 15 antibióticos antes y después del curado de los plásmidos, revelando que, por encima del 50% de las cepas fueron sensibles a clortetraciclina, cloranfenicol y nitrofurantoína. Mientras que el índice de resistencia a múltiples antibióticos (MAR) era de 0.2, encontrando una relación de aumento proporcional entre la resistencia a los antibióticos y la temporada de monzón, dicha resistencia no varió incluso después de curar los plásmidos con dodecilsulfato de sodio, lo que sugiere en este estudio que la resistencia a los antibióticos en *V. parahaemolyticus* se transmite cromosómicamente.

En las últimas décadas gracias a la nueva era molecular la investigación en torno a la resistencia antimicrobiana avanzó considerablemente, generando trabajos más extensos, selectivos y novedosos con relación a los genes y mecanismos implicados en la transferencia genética, con la aplicación de disciplinas como genómica, metagenómica y transcriptómica. Un trabajo de revisión Valera-Mejías y Alfaro-Mora (2018) analizó aspectos farmacológicos a considerar para el uso de grandes familias de antibióticos en la camaronicultura, examinando la resistencia a los antibióticos como sulfonamidas, tetraciclina, sulfametoxazol/trimetoprima, norfloxacin, ampicilina, clorhidrato de doxiciclina, eritromicina, cloranfenicol y nitrofurantoína, identificando a cinco especies de *Vibrio* con resistencia individual y múltiple a los antibióticos: *Vibrio cholerae* (18,3 %), *V. mimicus* (16,7 %), *V. parahaemolyticus* (10 %), *V. vulnificus* (6,7 %) y *V. alginolyticus* (1,7 %).

Wang *et al.*, (2022) realizaron una investigación más extensa en relación a la secuenciación del genoma completo y análisis de resistencia a los antimicrobianos en cepas aisladas de mariscos cultivados en la provincia de Liaoning, China, de *V. parahaemolyticus* Vp2015094, donde específicamente el plásmido pVp94-1, portaba genes de resistencia a gran número de fármacos, entre ellos a tetraciclinas (*tetB*, *tetM*, *tetR* y *tetC*), aminoglucósidos (*aph(3')-Ib*, *aph(6)-Id*), sulfonamidas (*sul2*), diaminopirimidinas (*dfrA6*), fluoroquinolonas (*qnrVC6*), fenicol (*floR*) y penam (*bla<sub>CARB-19</sub>*), además de ser el plásmido conjugativo con mayor frecuencia de

transferencia. En este mismo año Haifa-Haryani *et al.*, (2022) reportaron la prevalencia, resistencia a los antibióticos y perfilado de plásmidos en aislados de camarones cultivados en Malasia, proporcionando información sobre la prevalencia de *Vibrio sp.* y encontrando que todos los perfiles de susceptibilidad a los antibióticos eran resistentes a la penicilina G (100 %), pero susceptibles a la norfloxacin (96 %), con un total de 125 aislados con plásmidos de pesos moleculares entre 1,0 y 10 kb, detectados entre los aislados resistentes.

Prabina *et al.*, (2023) llevaron a cabo una investigación más específica en relación a la prevalencia de *Vibrios* resistentes, en camarones infectados de *P. vannamei* de dos granjas cultivadas en agua salobre en diversas especies de *Vibrios* (*V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae*, *V. mimicus* y *V. fluvialis*) junto con algunas especies de *Aeromonas* (*Aeromonas hydrophila*, *A. salmonicida* y *Shewanella*), encontraron que *V. alginolyticus* era el aislado más resistente con un índice de resistencia a múltiples antibióticos (MAR) de 0.60, el cual mide la proporción de antibióticos a los que una bacteria es resistente, ayudando a evaluar la gravedad de la resistencia bacteriana. Un valor alto (cercano a 1) indica una resistencia significativa a múltiples antibióticos, mientras que un valor bajo (cercano a 0) indica una resistencia baja. Seguido de *V. mimicus* (0.54) y *V. parahaemolyticus* (0.42), donde específicamente las tetraciclinas, los betalactámicos y las cefalosporinas fueron las clases de antibióticos a los que más resistieron.

Poco después Yu *et al.*, (2023) evaluaron por primera vez la distribución de la población y el riesgo de virulencia y resistencia a los antibióticos de cinco *Vibrios* patógenos en el sistema de cría de camarones blancos (*P. vannamei*) en China. Registrando un total de 418 aislados de los cuales 312 fueron pertenecientes al género *Vibrio*, con una resistencia alta-moderada, donde específicamente para el grupo de las cefoperazonas / florfenicol, las especies más dominantes fueron: *V. alginolyticus*, *V. harveyi*, *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae* y *V. campbellii*. Otro trabajo similar fue realizado recientemente por Haque, *et al.*, (2023) quienes detectaron las especies del género *Vibrio* resistentes a los antimicrobianos en camarones en Bangladesh, registrando que los aislamientos de *Vibrio* mostraron resistencia alta a moderada (92,2 %–15,7 %) a ampicilina, amikacina, cefotaxima, tetraciclina, ceftazidima, gentamicina, ácido nalidíxico, levofloxacin y ciprofloxacina, y baja resistencia (3,9 %) a imipenem, meropenem, cloranfenicol y trimetoprim-sulfametoxazol. Donde específicamente el 52,9 % de los

aislamientos eran resistentes a múltiples fármacos con un índice de resistencia a múltiples antibióticos de 1,0.

## 2.2 Importancia de los plásmidos en la resistencia a antimicrobianos

Los plásmidos son cruciales en la resistencia bacteriana, facilitando la propagación de genes de resistencia (Walas *et al.*, 2023). Los plásmidos R, en particular, desempeñan un papel esencial en esta transmisión de genes de resistencia (Varela-Mejías y Alfaro-Mora, 2018), la transferencia de resistencias múltiples a través de plásmidos representa una preocupación significativa en la quimioterapia bacteriana, ya que puede conducir a la aparición de bacterias resistentes en cualquier ambiente donde las condiciones sean propicias (Alav y Buckner, 2023). Este riesgo subraya la importancia de detectar y monitorear la presencia de plásmidos como parte integral de los programas de vigilancia de la resistencia a los antibióticos (Wang *et al.*, 2022). Diversos estudios han identificado a los plásmidos como un factor crucial en la diseminación de factores de virulencia y resistencia a los antibióticos.

Letchumanan *et al.* (2019) realizaron un estudio comparativo entre los genes de resistencia a diferentes antibióticos y su relación con los plásmidos en camarones y mariscos en Selangor, Malasia, debido al uso extensivo de antibióticos en la acuicultura. Evaluaron la susceptibilidad a 14 antibióticos en 385 aislados de *V. parahaemolyticus*, observándose alta resistencia a ampicilina (85%), amikacina (66.8%) y kanamicina (50.1%), así como a cefalosporinas de tercera generación (cefotaxima 55.8% y ceftazidima 34%). Además, identificaron plásmidos en 338 aislados, con entre 1 y 7 plásmidos diferentes, clasificados en 27 patrones, estos plásmidos incluían diferentes tipos, como los plásmidos de resistencia R y los plásmidos conjugativos. No se encontró correlación entre la cantidad de plásmidos y los patrones de resistencia a los antibióticos; la resistencia era mediada tanto cromosómicamente como por plásmidos, contribuyendo significativamente a la presencia de genes de resistencia

Un análisis más detallado sobre el impacto de los plásmidos y su relación con los genes de resistencia fue realizado por Given y Jalasvuori (2022), quienes analizaron detalladamente las interacciones entre huéspedes bacterianos y 11 plásmidos conjugativos individuales, enfocándose en el impacto sobre los genes de resistencia a los antibióticos. Descubrieron que los plásmidos grandes, que confieren multirresistencia, eran menos aptos en comunidades



bacterianas que también contenían plásmidos más pequeños con menos genes de resistencia. Esto sugiere que limitar el uso de ciertos antibióticos podría aumentar la sensibilidad de las comunidades bacterianas a otros tipos de antibióticos.

Liu *et al.*, en el 2023 realizaron la secuenciación completa del genoma de *V. parahaemolyticus* Vp2015094. El análisis reveló que la cepa Vp2015094 contenía dos plásmidos transmisibles, específicamente el plásmido pVp94-1 contenían los genes de resistencia a los antibióticos (ARG) identificados. Este plásmido confería resistencia a tetraciclinas (*tetB*, *tetM*, *tetR*, *tetC*), aminoglucósidos (*aph(3'')-Ib*, *aph(6)-Id*), sulfonamidas (*sul2*), diaminopirimidinas (*dfrA6*), fluoroquinolonas (*qnrVC6*), fenicoles (*floR*) y betalactámicos (*bla<sub>CARB-19</sub>*), rodeados por genes de transposasa. El plásmido pVp94-1 demostró ser conjugativo, con una alta frecuencia de transferencia, y los transposones fueron señalados como responsables de la difusión de los ARG. En el mismo año Xu *et al.*, (2023), analizaron la resistencia a quinolonas mediada por plásmidos (PMQR) en *Vibrio* sp., enfocándose en el gen *qnrS*, el cual codifica para una proteína conocida como QnrS, que se une a la ADN girasa y a la topoisomerasa IV, protegiéndolas de la inhibición por quinolonas. Registraron que de 1,811 aislados de *Vibrios* transmitidos por alimentos, 34 (1.88%) albergaban el gen *qnrS*, predominando el alelo *qnrS2*. Las bacterias portadoras de *qnrS* mostraron resistencia no solo a la ampicilina, sino también a varios otros antibióticos, el análisis genético reveló la presencia de diversos elementos de resistencia, donde el gen *qnrS2*, en particular, se encontró tanto en el cromosoma bacteriano como en plásmidos, algunos de los cuales tenían la capacidad de ser conjugativos. Los plásmidos de tipo pAQU, específicamente aquellos conjugativos que portan *qnrS2*, demostraron facilitar la resistencia a ciprofloxacina y cefalosporinas. Concluyeron que la transmisión de estos plásmidos entre *Vibrio* sp. podría acelerar la aparición de patógenos multirresistentes (MDR).

### **2.3 Plásmidos y la presencia de la toxina pirAB**

En la investigación actual, existe un amplio número de estudios enfocados en los plásmidos que portan la toxina pirAB, especialmente en bacterias del género *Vibrio*. Estos trabajos exploran tanto la estructura y función de los plásmidos involucrados como la naturaleza y efectos de la toxina pirAB en los hospederos afectados por estas bacterias. Dong *et al.* (2019) destacaron que el plásmido pVA1 causante de la enfermedad de necrosis hepatopancreática aguda (AHPND) puede transferirse horizontalmente de bacterias patógenas a no patógenas.

Para ello, analizaron cepas patógenas de *V. parahaemolyticus*, *V. campbellii*, *V. owensii*, y *V. vulnificus* causantes de AHPND. Encontraron que todas las bacterias *Vibrio* causantes de AHPND (VAHPND) poseen un plásmido altamente homólogo (tipo pVA1) de aproximadamente 70 Kb que porta los genes que codifican para la toxina PirAB. Este tipo de plásmido de virulencia (pVA1) es un plásmido conjugativo, lo que facilita su transferencia entre diferentes cepas bacterianas, demostraron que el plásmido pVA1 puede transferirse de Vp AHPND a bacterias no patógenas y volverlas altamente patógenas. Construyeron un plásmido pVPGX1-Cmr (un plásmido tipo pVA1) añadiendo un gen de resistencia al cloranfenicol como marcador en un *V. parahaemolyticus* causante de AHPND (Vp2S01), en resultado la cepa de *V. campbellii* receptora adquirió el plásmido tipo pVA1 y produjo ARN y proteínas PirABvp. Los camarones infectados con las bacterias transconjugantes, mostraron signos macroscópicos típicos y lesiones histológicas de AHPND. Estos resultados demostraron la transferencia conjugativa de un plásmido tipo pVA1 de AHPND, proporcionando información oportuna para explicar el aumento de especies de bacterias del género *Vibrio* causantes de AHPND. En el mismo año, Dong *et al.*, (2019) realizaron un análisis similar, pero en esta ocasión demostraron que el mismo plásmido pVA1 en camarones, podría transferirse horizontalmente entre especies de *Vibrio*, para ello realizaron estudios de laboratorio confirmando la transferencia horizontal del plásmido tipo pVA1 desde una cepa de *V. campbellii* causante de AHPND (VcAHPND-3S01) a una cepa de *V. owensii* no causante de AHPND (Vo-VC2W). El análisis ANI reveló que Vo-VC2W está estrechamente relacionado con la cepa de *V. owensii* XSBZ03 aislada de corales en el Mar de China Meridional. Sin embargo, los genes pirABvp en el plásmido transferido fueron inestables y se perdieron tras dos pases subcultivos. Las secuencias del plásmido tipo pVA1 en AHPND-Vc3S01 y  $\Delta$ pirABvpVo-VC2W eran altamente homólogas (99.9% idénticas), indicando que el plásmido adquirido por *V. owensii* provino de la cepa AHPND- *V. campbellii*. Además, la secuencia completa del genoma mostró que contiene 2 cromosomas y 3 plásmidos.

En el contexto de los estudios sobre el efecto y comportamiento de la toxina existen investigaciones significativas que abordan la presencia y expresión de los genes pirABvp. Por ejemplo, Vicente *et al.* (2019) investigaron la presencia y expresión de los genes pirABvp conferidos por plásmidos en aislamientos de *Vibrio* obtenidos de granjas de camarones sospechosas de AHPND en América del Sur. Se incluyeron 51 aislados bacterianos, de los cuales 3 resultaron positivos para los genes pirABvp mediante PCR anidada AP4. Dos de estos

aislados fueron identificados como *V. parahaemolyticus* y uno como *V. campbellii*. Solo *V. campbellii* expresó ARNm pirABVp y produjo las toxinas PirAVp y PirBVp, mientras que los aislamientos de *V. parahaemolyticus* no lo hicieron. Experimentos adicionales demostraron que *V. campbellii* y los aislamientos atípicos de *V. parahaemolyticus* (36 y 43) eran patogénicos para los camarones, causando los signos característicos de AHPND. Estos hallazgos indican que algunos aislamientos de *Vibrio* con genes pirABVp intactos pueden ser positivos en PCR pero no producir toxinas AHPND, subrayando la importancia de investigar la expresión de pirABVp a nivel transcripcional y traduccional, y realizar bioensayos para confirmar la cepa de *Vibrio* causante de AHPND. Más tarde Muthukrishnan *et al.* en el 2019 evaluaron la Transferencia Horizontal de Genes (HGT) de la enfermedad de necrosis hepatopancreática aguda (AHPND) que transforma los genes pirA y pirB desde de *V. parahaemolyticus* positivas para AHPND a especies no-AHPND y no-*Vibrio*, identificadas como *Algoriphagus* sp. (cepa NBP). Encontraron que la HGT de los genes pirA y pirB de *V. parahaemolyticus* a *Algoriphagus* sp., mostró una eficiencia del 80-91% a un temperatura de prueba de 30°C y 40°C, los resultados encontrados en aplicación de camarones probado con cepas de *Algoriphagus* sp. positivas para pirA y pirB demostraron lesiones patognomónicas típicas de AHPND durante el examen histopatológico, demostrando que los genes pirA y pirB pueden transferirse horizontalmente a especies bacterianas no relacionadas, ampliando el rango de bacterias que pueden causar AHPND en camarones.

Actualmente, se desarrollan trabajos altamente especializados y avanzados en el estudio de los plásmidos portadores de pirAB, incluso se han realizado análisis detallados sobre la complejidad de la toxina y su mecanismo de acción en el hospedero. En este contexto, Victorio-De Los Santos *et al.* (2020) exploraron las características del plásmido pVA1 conjugativo que codifica la toxina binaria PirAvp/PirBvp, obtuvieron proteínas recombinantes pirB (rPirBvp) y pirA (rPirAvp) se observó que el complejo PirABvp y rPirBvp mostraron actividad hemaglutinante hacia eritrocitos de rata, mientras que rPirAvp careció de esta capacidad, entre los diferentes monosacáridos y disacáridos probados solo GalNH<sub>2</sub> y GlcNH<sub>2</sub> pudieron inhibir la hemaglutinación del complejo PirABvp y rPirBvp. La desialilación de los eritrocitos aumentó la actividad hemaglutinante, confirmando que Gal o Gal (β1,4) GlcNAc son los principales ligandos para PirABvp. La actividad de aglutinación del complejo PirABvp y rPirBvp no depende de cationes, ya que la adición de Mg<sup>2+</sup> o Ca<sup>2+</sup> no mostró efecto sobre la capacidad de la proteína. Estos hallazgos sugieren firmemente que la subunidad PirBvp

funciona como una lectina, formando parte del complejo PirA/PirBvp y parece tener un papel activo en la patogenicidad bacteriana.

### 3. JUSTIFICACIÓN

El camarón blanco del Pacífico (*Penaeus vannamei*) es la especie más ampliamente cultivada a nivel mundial, siendo uno de los productos más consumidos en la dieta de la población. Su captura ha disminuido considerablemente en las últimas décadas, lo que ha llevado a que la acuicultura se convierta en la alternativa más eficaz para satisfacer la demanda actual, sin embargo, uno de los mayores retos que enfrenta la industria camaronera son las mortalidades masivas causadas por agentes patógenos, que incluyen virus y bacterias extremadamente dañinos. Por lo que el uso de sustancias químicas que inhiben el crecimiento bacteriano es esencial en los sistemas de producción, siempre y cuando se utilicen en concentraciones adecuadas. Aunque existen sustancias alternativas al uso de antibióticos tradicionales, su costo elevado hace prácticamente imposible su uso en las dosis necesarias, esto ha llevado a un aumento en la prevalencia de genes de resistencia en los Vibrios patógenos, causando pérdidas devastadoras en la industria camaronera y el fracaso de cosechas enteras (Mejías y Navarro, 2014). La resistencia antimicrobiana en Vibrios patógenos se ha convertido en un problema crítico, estudios previos han identificado diversos genes responsables de esta resistencia, como los genes que codifican para betalactamasas y bombas de eflujo, los cuales son frecuentemente transferidos a través de plásmidos y otros elementos genéticos móviles, estos mecanismos de transferencia y transformación genética facilitan la propagación de la resistencia entre diferentes cepas y especies bacterianas, incrementando la dificultad de controlar las infecciones en los cultivos acuícolas.

Por lo que actualmente es de suma importancia generar nuevo conocimiento sobre una de las principales problemáticas de los sistemas productores, que nos permita conocer las relaciones intraespecíficas de las cepas que causan virulencia y resistencia. En este estudio, se evaluarán los principales genes implicados en la resistencia a los antibióticos en cepas aisladas de bacterias que muestran signos clínicos. La innovación mediante técnicas avanzadas y el desarrollo de herramientas bioinformáticas contribuirán al conocimiento de la relación entre las diferentes zonas de cultivo afectadas por la vibriosis, ayudando a estandarizar prácticas y mejorar la resiliencia de la industria camaronera frente a estos desafíos patógenos.

#### **4. HIPÓTESIS**

Se espera que las cepas aisladas presenten diversos grados de resistencia a las distintas familias de antibióticos, compartiendo genes de resistencia y virulencia principalmente a través de la transferencia horizontal.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1 Objetivo general

Identificar los genes *pirA* y *pirB* vinculados a la virulencia, así como los genes implicados en la resistencia antimicrobiana en especies de *Vibrio* sp.

### 5.2 Objetivos particulares

- Realizar el aislamiento de bacterias potencialmente resistentes a antibióticos presentes en los sistemas de cultivo de camarón blanco *Penaeus vannamei*.
- Determinar la concentración mínima inhibitoria de cada aislado a diferentes antibióticos empleados en acuicultura.
- Obtener la secuencia del genoma completo de las cepas bacterianas previamente identificadas como resistentes.
- Identificar los cambios genéticos mediante herramientas bioinformáticas de cada una de las cepas.
- Realizar la construcción de mapas genómicos e identificación del genoma central.

## 6. MATERIAL Y METODOS

### 6.1 Aislamiento de cepas bacterianas presentes en *Penaeus vannamei* cultivado

Las bacterias empleadas en el presente estudio se aislaron de tanques de engorda de camarón que presentaban signos clínicos de vibriosis, incluyendo lesiones en la cutícula, úlceras en el exoesqueleto, decoloración, melanosis en branquias, apéndices y hepatopáncreas (Saad El-Deen y Elkamel, 2020). Para ello, se recolectaron muestras de agua, sedimento y organismos con el propósito de evaluar la presencia de bacterias heterótrofas aerobias, facultativas totales y *Vibrios*. Cada muestra se concentró reuniendo aproximadamente 10 organismos en 500 mL de agua del mismo tanque. Las muestras se transportaron al laboratorio en bolsas estériles dentro de una hielera para mantener constante su temperatura y se analizaron aproximadamente 60 minutos después de la recolección. En el laboratorio, se tomaron porciones de cada muestra, incluyendo hepatopáncreas, estómago y tubo digestivo, las cuales se homogeneizaron en tubos estériles con 10 mL de solución salina al 2.5% de NaCl. Posteriormente, se realizaron diluciones decimales (hasta  $10^{-5}$ ) y se sembraron por triplicado 100  $\mu$ L de cada dilución en placas de Agar soya tripticaseína (TSA) suplementado con 2.5% de NaCl y en placas de Tiosulfato, diseñado para el aislamiento de bacterias heterótrofas aerobias y facultativas totales, así como en placas de Agar Tiosulfato-Citrato-Bilis-Sacarosa (TCBS), específicamente formulado para el aislamiento de *Vibrio*. Las colonias resultantes se aislaron y purificaron mediante re-siembra en TSA con 2.5% de NaCl, asegurando su homogeneidad y consistencia, para finalizar se realizó la caracterización según su tinción de Gram, forma, tamaño y resistencia a diversos antibióticos. Las cepas bacterianas se ajustaron a una densidad óptica de 1 a 600 nm ( $DO_{600nm}=1$ ) utilizando un Biophotometer Eppendorf. Además, se contó el número de unidades formadoras de colonias (UFC) después de cada dilución serial en 2.5% de NaCl en placas de Agar Soya Tripticaseína (TSA) suplementado con 2.5% de NaCl.

### 6.2 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI).

Las pruebas de susceptibilidad a los antibióticos se determinaron mediante el método de microdilución en caldo según las directrices del CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2007). Para determinar las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de cada aislado se probaron cuatro tipos de antibióticos de utilidad en los sistemas de cultivo: enrofloxacina (ENR), furazolidona (FZD), florfenicol (FLF) y oxitetraciclina (OXI). Para esto, se



preparó un stock inicial de 500 µl de cada antibiótico, en medio de cultivo (TSB), asegurando su esterilidad mediante filtración con filtros de 0.22 micras. Posteriormente, se realizaron diluciones seriadas al 50%, comenzando con una alta concentración del antibiótico para obtener una serie de concentraciones decrecientes (1024, 512, 256, 128, 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1 µg/ml). Finalmente, en una placa de 96 pozos se añadieron 70 µl de medio de cultivo y 70 µl de las diluciones del antibiótico a cada pocillo, con sus respectivos controles de cada una de las cepas (TSB+bacteria) y de esterilidad (TSB). Se agregaron 10 µl del inóculo bacteriano seguido de medio de cultivo y de las diluciones a cada pocillo. La placa se incubó a 37°C (temperatura óptima para bacterias de importancia clínica) durante 24 horas en agitación. Posteriormente, se midió la absorbancia (nm) de cada pocillo para determinar el crecimiento bacteriano mediante un lector de placa Multiskan™ GO. Debido a su perfil de resistencia, se decidió secuenciar las cepas utilizadas.

### **6.3 Aislamiento y secuenciación de ADN genómico de cepas resistentes.**

La extracción del ADN de los seis aislados previamente seleccionados se llevó a cabo mediante el uso del kit de purificación de ADN genómico Wizard™ de Promega (Promega). Para inicial se midió la concentración y pureza del ADN extraído mediante un espectrofotómetro NanoDrop 2000c (Thermo Scientific, EUA), mientras que su integridad se evaluó mediante un gel de agarosa al 1%. Una vez realizado se prepararon las bibliotecas de ADN utilizando el kit Nextera XT (Illumina, San Diego, CA, EE. UU.) siguiendo las instrucciones proporcionadas por el fabricante. Para finalizar se realizó la secuenciación del genoma se llevó a cabo utilizando la plataforma Illumina MiSeq con un protocolo paired-end de 2 x150 pb y 300 ciclos.

### **6.4 Análisis bioinformático**

#### **6.4.1 Ensamblaje, identificación de cambios genéticos y anotación de los genomas.**

El proceso de detección de cambios genéticos en cepas bacterianas comenzó con la identificación de las especies presentes en cada genoma, esta identificación se llevó a cabo utilizando tres plataformas de análisis distintas: BLAST+ (v2.12.0), Ezbiolab Biosciencie, Inc USA (Yoon *et al.*, 2017), y CGE. Las secuencias resultantes fueron sometidas a un proceso de filtrado de calidad predefinido utilizando Cutedap (v3.4), durante este proceso, se eliminaron los adaptadores presentes en las secuencias y se aplicaron parámetros de recorte y filtrado,

incluyendo la eliminación de lecturas de baja calidad con un valor mínimo de longitud aceptada de 100 nucleótidos y un umbral mínimo de calidad de 20. Además, se utilizó el software Diamond (v2.0.6) para un filtrado adicional y búsquedas de similitud específicas, centrándose en la detección de los genes *pirA* y *pirB*. Para lograr esto, se emplearon bases de datos indexadas en Diamond (v2.0.6) y se configuraron parámetros específicos, como un porcentaje mínimo de cobertura de consulta del 80 (--query-cover) y un porcentaje mínimo de identidad del 80 (--id).

#### **6.4.2 Ensamblaje y anotación del genoma.**

Se realizó el ensamblaje de cada genoma utilizando tres programas de software: SPAdes v3.12.0 (Prjibelski *et al.*, 2020), donde se utilizaron tres valores de k-mer para el ensamblaje: 21, 33 y 55; se estableció un umbral de cobertura de 10 (--cov-cutoff) y se empleó un esquema de puntuación Phred con un desplazamiento de 33. Para A5-miseq, se fijó un umbral de cobertura de 10 (--cov-cutoff) y un tamaño mínimo de contig de al menos 500 nucleótidos; además, se seleccionaron tres valores de k-mer para el ensamblaje: 21, 31 y 55, utilizando el mismo esquema de puntuación Phred con un desplazamiento de 33. Por último, para el software Skesa 2.3.0, se utilizó un valor del 1% para las secuencias consideradas contaminantes (--vector\_percent), se estableció un tamaño mínimo de contig de 200 pb (--min\_contig\_lgth) y se estableció una cobertura mínima requerida de x3 (--min\_contig\_cov). La corrección de errores se llevó a cabo en los tres programas de software mencionados como parte integral del proceso de ensamblaje. Estos se realizaron tanto en la plataforma Galaxy (v23.2. rc1 galaxy.eu) como en un servidor local (cluster) para comparar los resultados, determinando la calidad y confiabilidad de los ensamblajes generados.

Las pruebas de calidad detalladas se realizaron utilizando el software Quast (v5.1.0) con parámetros estándar, incluyendo un tamaño de genoma estimado de 4000000 (--est-ref-size), un porcentaje mínimo de identidad del 95.0 (--min-identity) y una longitud mínima de contig de 500. Para finalizar, se dividieron los andamios (--split-scaffolds) y se especificó el uso de un genoma grande (--large). Una vez obtenidos los archivos de salida, se compararon las métricas para cada ensamblaje generado por los tres programas de software diferentes, incluidos datos como el número de contigs, contigs fragmentados y sus longitudes, lo que permitió determinar qué software proporcionó los mejores resultados en el análisis. Para finalizar, se

realizó la anotación para identificar genes de resistencia y proteínas presentes en todos los genomas, utilizando el pipeline del NCBI (Tatusova *et al.*, 2016).

### **6.4.3 Análisis de los genomas.**

Después de realizar el ensamblaje de los genomas, se procedió a comparar las cepas mediante la hibridación de sus genomas en la plataforma EZbiolab y el cálculo de la Identidad Promedio de Nucleótidos (ANIm) utilizando el software PyANI v0.2.12 (<https://pypi.org/project/pyani/>) (Average Nucleotide Identity). En EZbiolab, se evaluaron criterios como el porcentaje de similitud, la cobertura entre secuencias génicas medida en pares de bases (pb) y la longitud total de los genomas también medida en pares de bases (pb), analizando individualmente la similitud entre los genomas. Posteriormente, mediante PyANI, se realizaron comparaciones entre los genomas de las cepas utilizando el método MUMmer (ANIm) (-m ANIm) (Maximal Unique Matches) para calcular la identidad promedio. Esta comparación generó valores de ANIm que representan el porcentaje de nucleótidos idénticos entre los genomas, este proceso genera resultados robustos cuando el par de genomas comparados comparte un alto grado de similitud. Para finalizar, se creó un mapa de calor (-g) utilizando Python a partir de la matriz de similitud con los valores de ANIm previamente calculados. Finalmente, el mapa resultante fue editado y ajustado utilizando Inkscape version 1.1.

### **6.4.4 Análisis y construcción del plásmido pirAB**

La reconstrucción del plásmido pVA1 se llevó a cabo mediante la identificación y ensamblaje del genoma de la cepa T13 de *V. parahaemolyticus*, utilizando los contigs 37, 95, 73 y 45 como componentes clave. Este proceso fue confirmado por el software MAUVE para garantizar la precisión y la integridad de la reconstrucción. Inicialmente, se elaboró un mapa detallado del plásmido mediante la plataforma Proksee (<https://proksee.ca/>), en este mapa, se seleccionaron genes de especial interés y se enriqueció con información adicional sobre el porcentaje de guanina-citosina y guanina-citosina skew (+/-). Esta incorporación de datos aporta una visión más exhaustiva y detallada de la composición genética y estructural del plásmido reconstruido. Para el análisis comparativo, se utilizaron los plásmidos pLA16-2 de la cepa *Vibrio campbellii* LA16-V1 (número de acceso GenBank CP021148.1) y pVPM09043 de la cepa *Vibrio parahaemolyticus* M0904 (número de acceso GenBank CP133895.1) como puntos

de referencia. Se empleó el software Easyfig v 2.2.5, siguiendo el protocolo establecido por Sullivan *et al.* (2011), para generar una figura que ilustra la comparación entre el plásmido reconstruido y los plásmidos de referencia. Esta comparación permitió realizar una evaluación detallada de las similitudes y diferencias entre las secuencias plasmídicas.

#### **6.4.5 Construcción de mapas genómicos**

Se construyeron los mapas genómicos completos para cada uno de los genomas analizados, esto se realizó utilizando la plataforma Proksee, donde previamente se cargaron genomas individualmente anotados de NCBI para cada cepa y para la reconstrucción del plásmido pVA1. Estos mapas generados fueron editados utilizando herramientas como CARD, con el fin de incorporar genes de resistencia antimicrobiana (AMR). Durante este proceso, se seleccionaron genes y proteínas específicas de interés, se analizó el porcentaje de guanina-citosina, se examinó el sesgo de guanina-citosina (+/-) y se investigaron profagos para determinar su presencia o ausencia. Cada mapa resultante se guardó y descargó en formato .svg para análisis posteriores.

#### **6.4.6 Análisis MSLT y tipificación molecular.**

Posterior a la identificación de los aislados como *V. parahaemolyticus* y *V. diabolicus*, se llevó a cabo un análisis de MLST con el objetivo de identificar y caracterizar cada cepa, así como comprender la diversidad genética y la distribución geográfica, además de analizar las relaciones genéticas entre las mismas. Para el análisis se utilizó el software Ridom™ SeqSphere+ versión 9.0, empleando tablas diseñadas para la comparación de 10 loci (dnaE, gryB, recA, dtdS, pntA, pyrC y tnaA), previamente validados en el análisis inicial de Tipificación Multilocus de Secuencias (MLST) en *V. parahaemolyticus* y *V. diabolicus*. Estos loci fueron seleccionados por su capacidad para proporcionar una alta resolución genética y permitir la diferenciación precisa entre cepas dentro de cada especie. Se desarrolló un esquema de MLST específico para *V. parahaemolyticus*, incorporando 30 genomas de referencia procedentes de países como China, Japón, Malasia, México, Filipinas, Corea del Sur, Tailandia y Vietnam. Estos genomas mostraron predominantemente la presencia del locus pirAB, lo cual es relevante para estudios epidemiológicos y de evolución genética. Para *Vibrio diabolicus*, los genomas de referencia fueron obtenidos de países como Australia, Brasil, China, Colombia, India, México,

Republica de Mauricio, Tailandia y de la Dorsal del Pacífico Oriental, proporcionando una muestra representativa de la diversidad geográfica de esta especie. Los genomas en formato FASTA fueron importados al software Ridom SeqSphere, donde se creó un nuevo proyecto. Se seleccionaron los loci específicos (*recA*, *gryB*, *dnaE*, *pntA*, *dtdS*, *pyrC* y *atpA*) y se realizó un alineamiento automático de las secuencias de estos genes para cada cepa. Posteriormente, el software asignó secuencias alélicas y llevó a cabo un análisis de MLST para determinar el tipo de secuencia correspondiente a cada cepa, proporcionando así una caracterización detallada y comparativa de la diversidad genética. Además, se generó y editó un árbol filogenético separado para cada especie, permitiendo una visualización clara de las relaciones evolutivas entre las cepas de *V. parahaemolyticus* y *V. diabolicus*. Este análisis filogenético facilitó la interpretación de los resultados del MLST y proporcionó insights sobre la estructura genética y las relaciones evolutivas dentro de cada especie bacteriana.

## 7. RESULTADOS

Se aislaron un total de 10 cepas del hepatopáncreas de camarón blanco *P. vannamei*, del sedimento y de la columna de agua en sistemas de cultivo que mostraban signos de vibriosis. De estas cepas se utilizaron 6 para las pruebas de sensibilidad a antimicrobianos (Tabla 1), aquellas que mostraron una menor respuesta a los antibióticos seleccionados: T35 (ID: SAMN37672057), T25P (ID: SAMN37672056), T63 (ID: SAMN37672058), T13N (ID: SAMN37672054), T63N (ID: SAMN37830366) y T13P (ID: SAMN37672055).

### 7.1 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) a varios antibióticos en *Vibrio* sp.

Los resultados del perfil de susceptibilidad antibiótica de diversas cepas de *Vibrio* sp., basados en la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) expresada en  $\mu\text{g/ml}$  para los antibióticos enrofloxacina (ENR), furazolidona (FZD), florfenicol (FLF) y oxitetraciclina (OXI), revelan una significativa variabilidad en la susceptibilidad antibiótica entre las cepas estudiadas (Tabla 1). Específicamente, la cepa T13P exhibe baja susceptibilidad a la oxitetraciclina, con un MIC de  $256 \mu\text{g/ml}$ , mientras que la cepa T25 muestra resistencias particularmente elevadas al florfenicol y la furazolidona, con MICs de  $512 \mu\text{g/ml}$  y  $128 \mu\text{g/ml}$ , respectivamente. En contraste, la enrofloxacina demuestra ser más efectiva, especialmente frente a la cepa T25, donde el MIC registrado es de tan solo  $4 \mu\text{g/ml}$ .

**Tabla 1.** Concentración mínima inhibitoria (CMI) en  $\mu\text{g/ml}$  a varios antibióticos (ENR, enrofloxacina; FZD, furazolidona; FLF, florfenicol; OXI, oxitetraciclina) en *Vibrio* sp.

Cepas	ENR	FZD	FLF	OXI
T13N	16	8	8	32
T13P	8	8	32	256
T25	4	128	512	128
T35	8	512	512	256
T63	16	128	128	32
T63N	8	256	256	256

\*Concentración en CMI ( $\mu\text{g/ml}$ ) ENR, enrofloxacina; FZD, furazolidona; FLF, florfenicol y OXI; oxitetraciclina.

### 7.2 Análisis genómico

El análisis genómico basado en el genoma completo y el gen 16S rRNA permitió la identificación precisa de diversas cepas bacterianas. Se identificó una cepa como *V. parahaemolyticus*: T13P (ID: SAMN37672055). Las cepas T13N (ID: SAMN37672054), T25P (ID:

SAMN37672056), T35 (ID: SAMN37672057), T63 (ID: SAMN37672058) y T63N (ID: SAMN37830366) (NZ\_JAWJYE000000000.1) se identificaron como *V. diabolicus*, con un porcentaje de similitud del 91-100% según los resultados de EZbio, Cge y Blast. En contraste, la cepa T13P fue clasificada como *V. parahaemolyticus* con un 100% de precisión en todas las plataformas utilizadas (Tabla II).

El análisis de hibridación y comparación entre las cepas incluyó valores de OrthoANlu (%) y las longitudes de los genomas A y B en bp, así como la longitud promedio alineada y la cobertura de cada genoma A y B en porcentaje (Tabla III). Se observó una mayor similitud en las comparaciones entre las cepas de la misma especie (T13N-T25P, T13N-T35, T13N-T63, T25P-T35, T25P-T63, T35-T63), siendo menos evidente en las comparaciones que involucran a la cepa T13P con el resto de las cepas. El mapa de calor (-g) (Fig.1) representa visualmente los datos, utilizando una escala de colores que va desde azul (mayor simetría) hasta rojo (menor simetría). Se destaca que las cepas T13N, T25P, T35, T63 y T63N muestran una alta y consistente coincidencia, representada por tonos más azules, mientras que la cepa T13P se diferencia claramente como única en su género.

**Tabla 2.** Identificación de cepas en tres bases de datos Blast, EZbio y Cge.

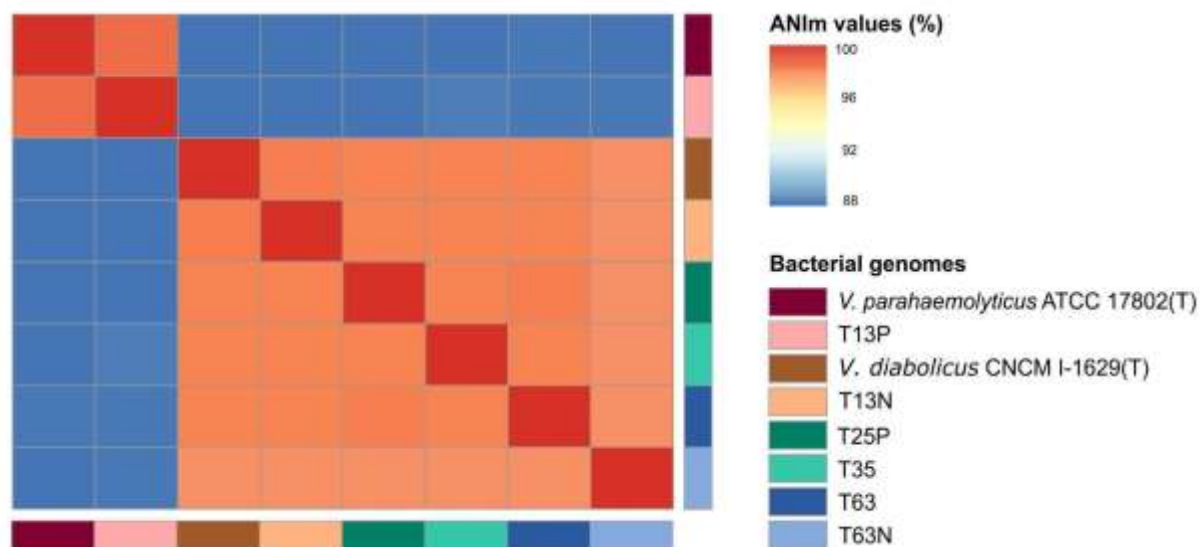
Cepas	Blast	Ezbio	Cge
<b>T13N</b>	<i>Vibrio alginolyticus</i> (91%)	<i>Vibrio diabolicus</i> (100%)	<i>Vibrio diabolicus</i>
<b>T13P</b>	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> (100%)	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> (100%)	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
<b>T25P</b>	<i>Vibrio diabolicus</i> (100%)	<i>Vibrio diabolicus</i> (100%)	<i>Vibrio diabolicus</i>
<b>T35</b>	<i>Vibrio diabolicus</i> (99%)	<i>Vibrio diabolicus</i> (100%)	<i>Vibrio diabolicus</i>
<b>T63</b>	<i>Vibrio diabolicus</i> (100%)	<i>Vibrio diabolicus</i> (100%)	<i>Vibrio alginolyticus</i>
<b>T63N</b>	<i>Vibrio diabolicus</i> (97.88%)	<i>Vibrio diabolicus</i> (100%)	<i>Vibrio diabolicus</i>

\* Los porcentajes indicados reflejan la similitud encontrada con diversas especies del género *Vibrio*.

**Tabla 3.** Análisis de hibridación y comparación de cepas con características genómicas.

Cepas	OrthoANIu value (%)	Genome A length (bp)	Genome B length (bp)	Average aligned length (bp)	Genome A coverage (%)	Genome B coverage (%)
<b>T13N-T13P</b>	84.44	4,961,280	5,479,440	2,850,895	57.46	52.03
<b>T13N-T25P</b>	98.09	4,961,280	4,941,900	3,589,745	72.36	72.64
<b>T13N-T35</b>	98.09	4,961,280	5,164,260	3,584,396	72.25	69.41
<b>T13N-T63</b>	98.11	4,961,280	5,066,340	3,384,474	68.22	66.80
<b>T13P-T25P</b>	84.38	5,479,440	4,941,900	2,881,517	52.59	58.31
<b>T13P-T35</b>	84.71	5,479,440	5,164,260	2,798,365	51.07	54.19
<b>T13P-T63</b>	84.47	5,479,440	5,066,340	2,800,595	51.11	55.28
<b>T25P-T35</b>	98.06	4,941,900	5,164,260	3,386,602	68.53	65.58
<b>T25P-T63</b>	98.08	4,941,900	5,066,340	3,611,215	73.07	71.28
<b>T35-T63</b>	98.06	5,164,260	5,066,340	3,461,104	67.02	68.32

\*Se presenta la comparación detallada entre diferentes cepas, destacando valores de OrthoANIu (%), longitudes de los genomas A y B en bp, longitud promedio alineada y la cobertura de cada genoma A y B en porcentaje.

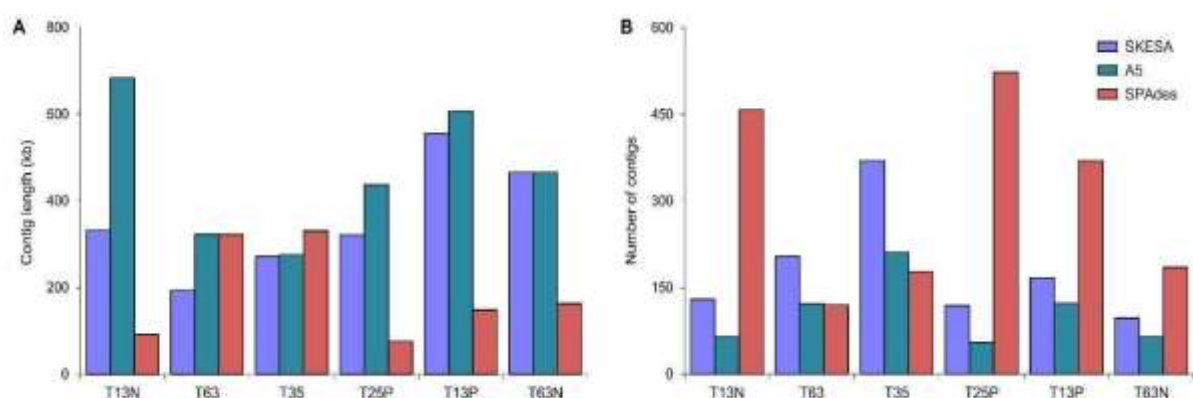


**Figura 1.** Análisis de agrupamiento jerárquico y mapa de calor basado en ANI del genoma completo para los genomas de 6 aislamientos de *Vibrio* sp., de las cepas analizadas en el estudio.



### 7.3 Análisis comparativo de ensamblaje genómico.

En cuanto a los resultados del análisis genómico, representados en la Fig.2, se observó que con el software A5 género mejores ensamblajes con el menor número de contigs y los contigs más extensos en la mayoría de los genomas analizados. Específicamente, para el genoma T13N\_S206, se observa que A5 produjo 65 contigs con una longitud por fragmento más grande de 683,844 pares de bases, en contraste con Skesa y Spades que generaron 130 contigs y 458 contigs respectivamente, con tamaños de contigs más limitados. De manera similar, para otros genomas como T63\_S14, T25P\_S208, T13P\_S205 y T63N\_S61, el software A5 también proporcionó un menor número de contigs y con mayores longitudes por fragmento en comparación con Skesa y Spades.

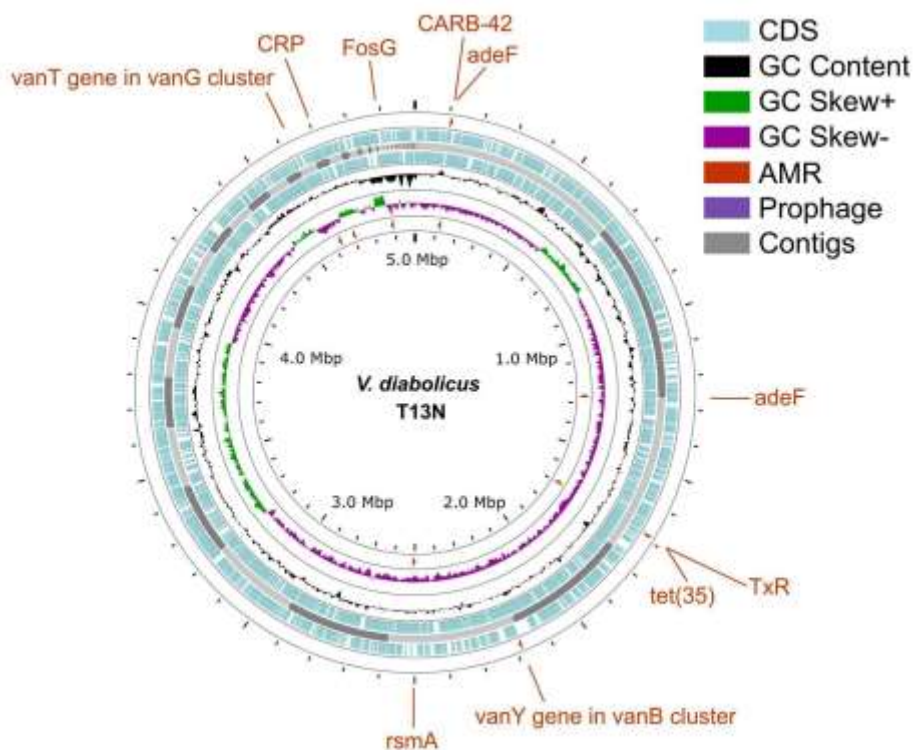


**Figura 2.** Análisis comparativo de la calidad del ensamblaje entre diferentes programas para 6 cepas (T13N\_S206, T63\_S14, T35\_S22, T35\_S22, T25P\_S208, T13P\_S205, T63N\_S61), evaluando tanto el número de contigs (A) como la longitud de los fragmentos de contig (B). En el gráfico, el color azul claro representa a Skesa, el azul intenso a A5 y el rojo al software SPAdes.

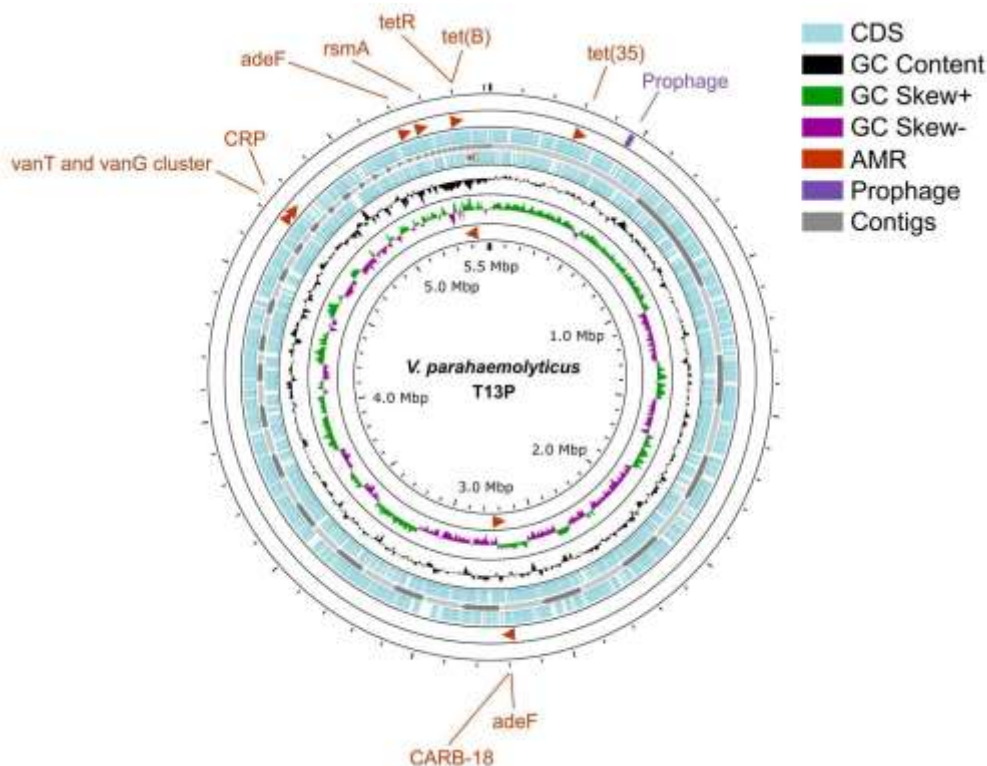
### 7.4 Análisis de caracterización genómica de mapas de genoma completo.

Los mapas de genoma completo (Fig. 3-8) revelaron que tanto T13P como T35 exhibieron la mayor cantidad de genes de resistencia y proteínas relacionadas. Estos incluyen genes de resistencia a vancomicina, tetraciclinas y carbapenémicos, así como genes efectores de bombas de flujo (*TxR*, *rsmA*, *adeF*, *CRP*). Es importante destacar que T13P fue la única cepa que mostró la presencia de los genes que codifican para las proteínas *pirA* y *pirB*. Además, se identificó que todas las cepas analizadas compartían la presencia del cluster VanT y G, siendo

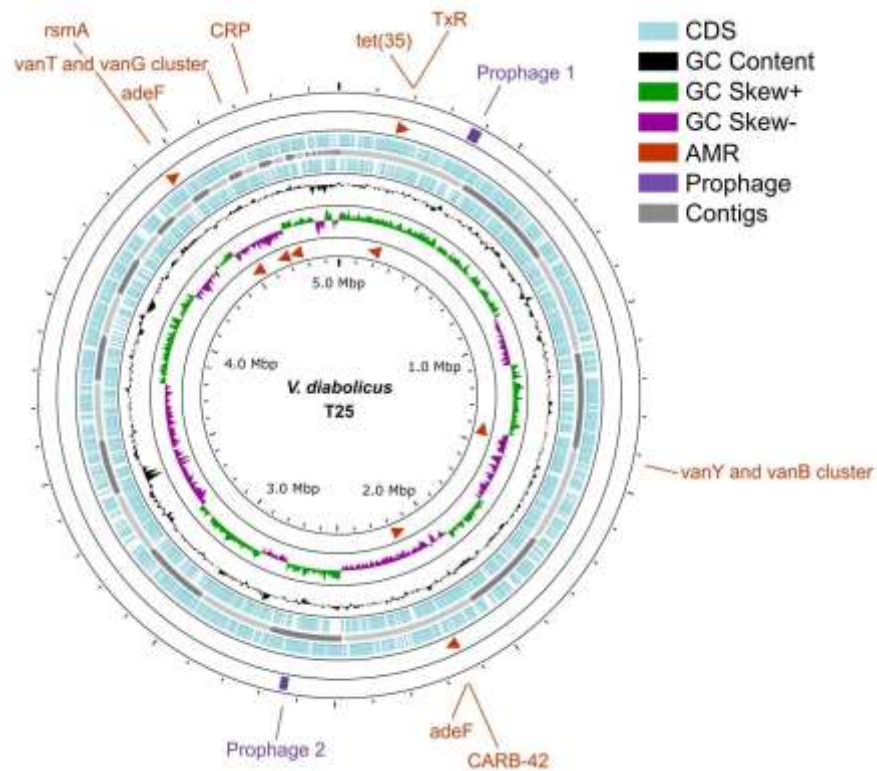
uno de los genes más comunes entre ellas. Los genes relacionados con la resistencia a las tetraciclinas, como *tet(35)*, *tet(B)* y *tetR*, se observaron en múltiples cepas (T13N, T13P, T25, T35, T63, T63N), mientras que el cluster *vanY* y *vanB* se presentó únicamente en las cepas T25, T35 y T63. Asimismo, *TxR* se encontró en múltiples cepas (T25, T35, T63), y genes como *bla<sub>CARB-18</sub>*, *CRP*, *rsmA* y *adeF* se identificaron específicamente en T13P, T35, T63 y T63N. En contraste, *bla<sub>CARB-42</sub>* se detectó únicamente en las cepas T35, T63 y T63N.



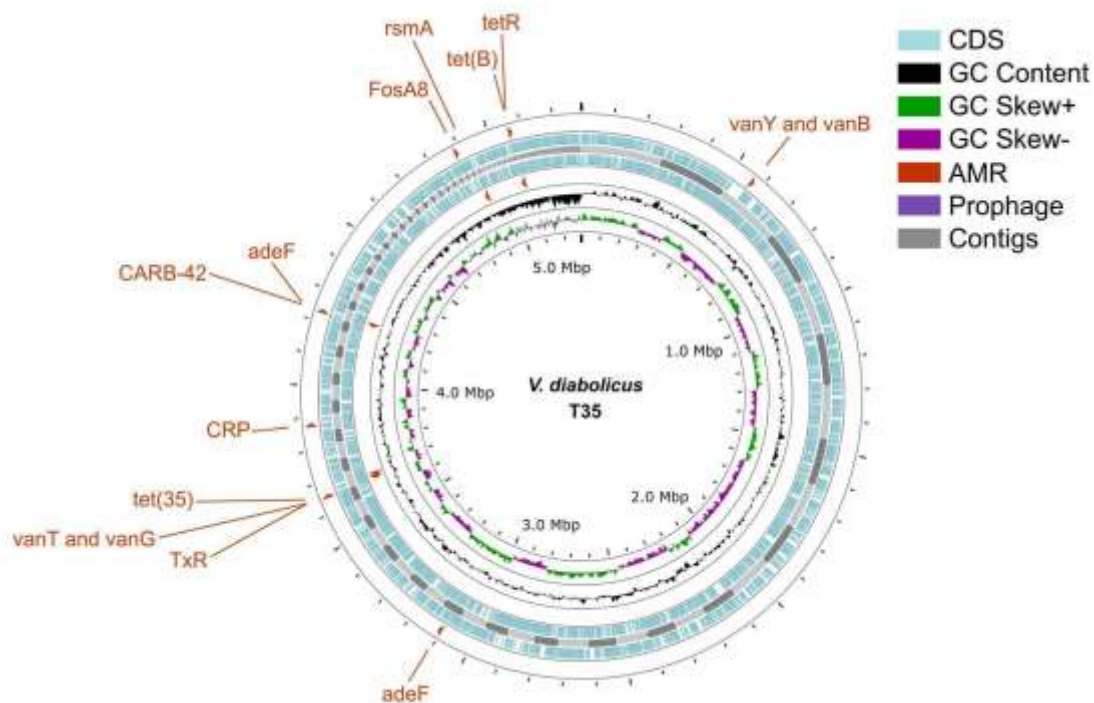
**Figura 3.** Genoma circular de *Vibrio diabolicus*. (cepa T13N). Desde el centro hacia afuera, el primer anillo (en azul claro) muestra las secuencias codificantes para proteínas (CDS). El segundo anillo (en verde y morado) ilustra el contenido de GC (+/-). El tercer anillo (en negro intenso) representa el contenido de GC. Las flechas rojas indican genes asociados con la resistencia antimicrobiana (AMR). El último anillo (en morado) marca los profagos, mientras que los segmentos grises representan los contigs/cromosomas.



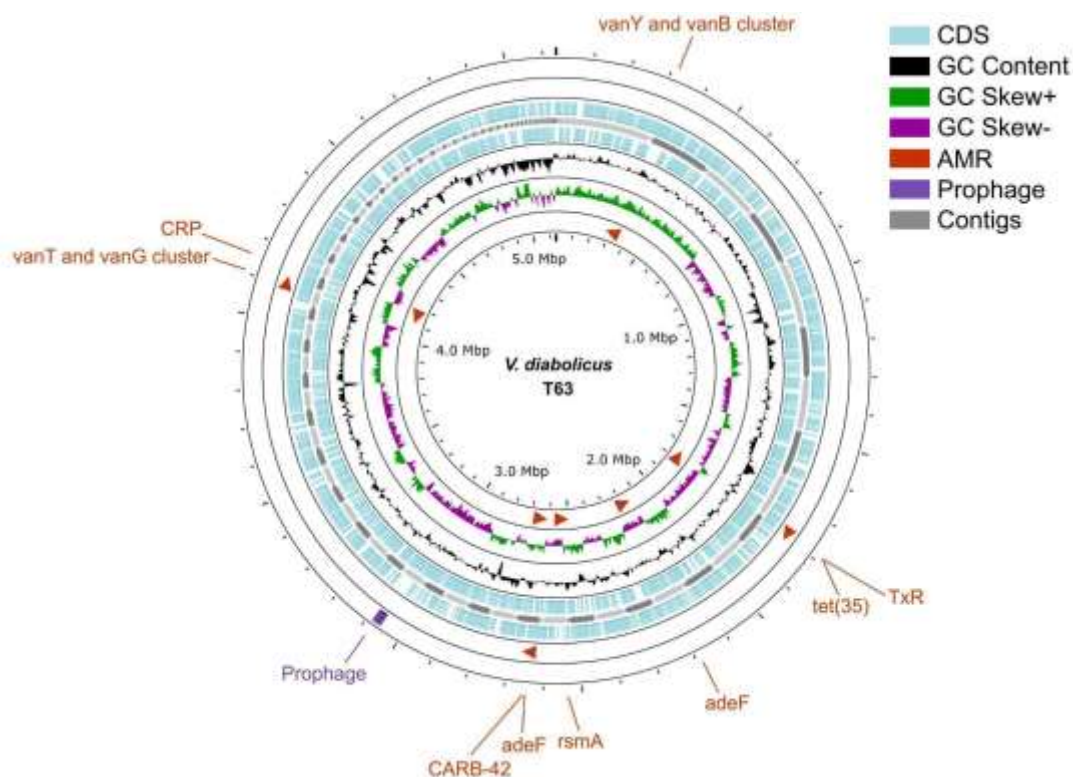
**Figura 4.** Genoma circular de *Vibrio parahaemolyticus*. (cepa T13P). Desde el centro hacia afuera, el primer anillo (en azul claro) muestra las secuencias codificantes para proteínas (CDS). El segundo anillo (en verde y morado) ilustra el contenido de GC (+/-). El tercer anillo (en negro intenso) representa el contenido de GC. Las flechas rojas indican genes asociados con la resistencia antimicrobiana (AMR). El último anillo (en morado) marca los profagos, mientras que los segmentos grises representan los contigs/cromosomas.



**Figura 5.** Genoma circular de *Vibrio diabolicus*. (cepa T25). Desde el centro hacia afuera, el primer anillo (en azul claro) muestra las secuencias codificantes para proteínas (CDS). El segundo anillo (en verde y morado) ilustra el contenido de GC (+/-). El tercer anillo (en negro intenso) representa el contenido de GC. Las flechas rojas indican genes asociados con la resistencia antimicrobiana (AMR). El último anillo (en morado) marca los profagos, mientras que los segmentos grises representan los contigs/cromosomas.

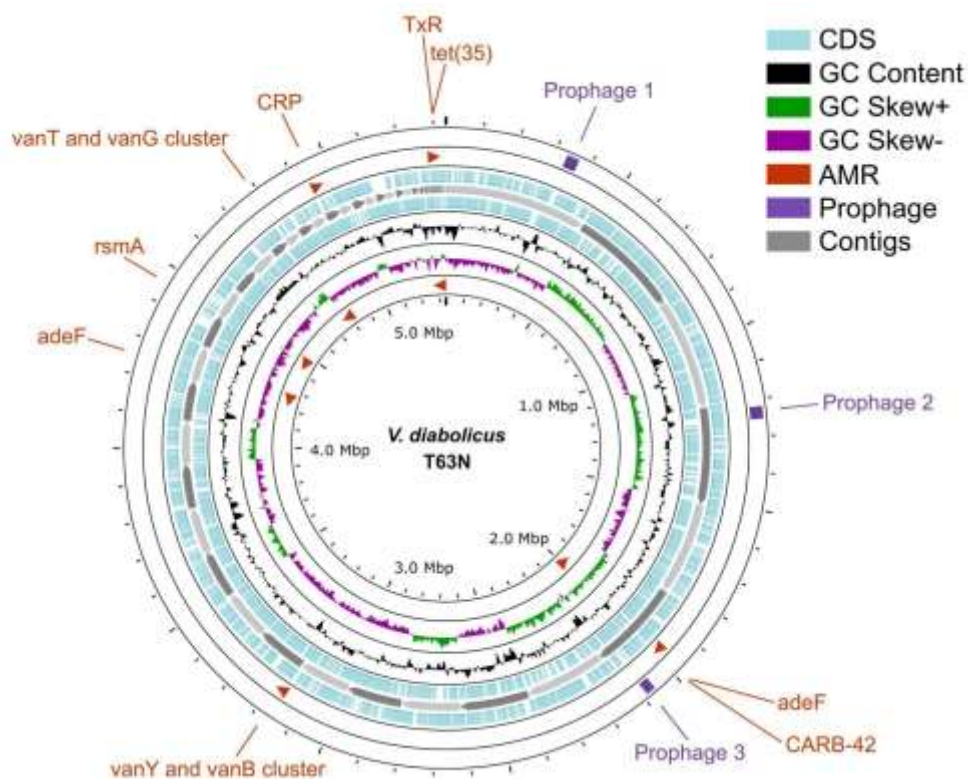


**Figura 6.** Genoma circular de *Vibrio diabolicus* (cepa T35). Desde el centro hacia afuera, el primer anillo (en azul claro) muestra las secuencias codificantes para proteínas (CDS). El segundo anillo (en verde y morado) ilustra el contenido de GC (+/-). El tercer anillo (en negro intenso) representa el contenido de GC. Las flechas rojas indican genes asociados con la resistencia antimicrobiana (AMR). El último anillo (en morado) marca los profagos, mientras que los segmentos grises representan los contigs/cromosomas.

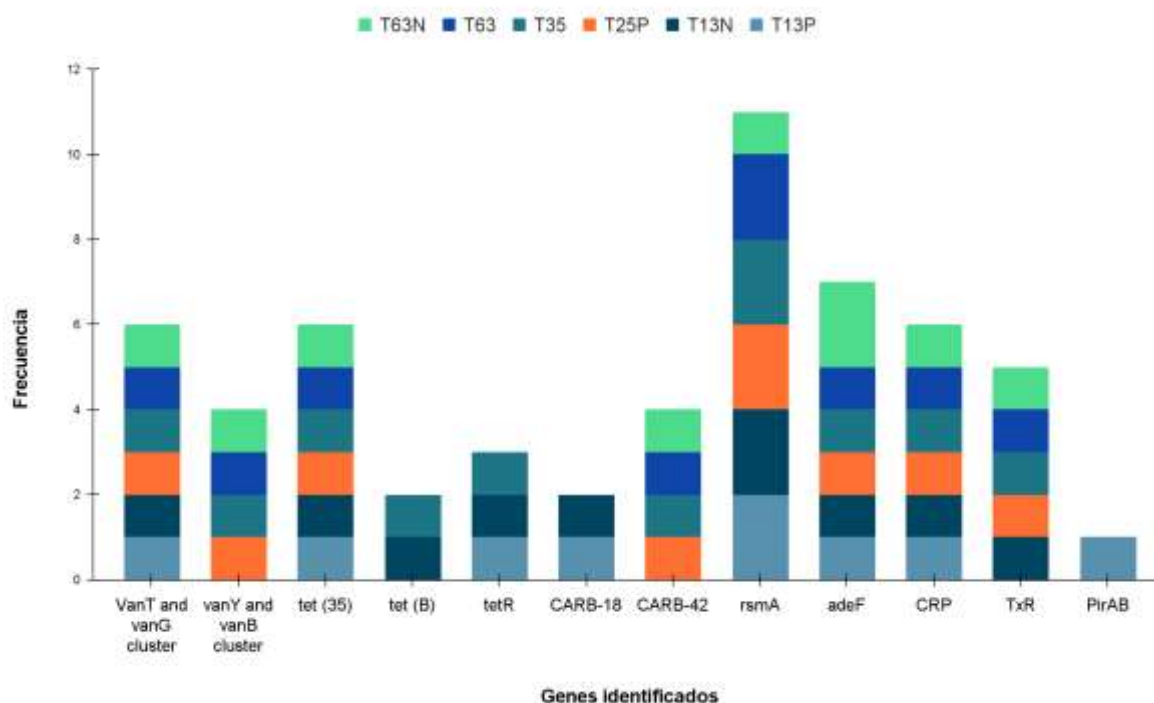


**Figura 7.** Genoma circular de *Vibrio diabolicus* (cepa T63). Desde el centro hacia afuera, el primer anillo (en azul claro) muestra las secuencias codificantes para proteínas (CDS). El segundo anillo (en verde y morado) ilustra el contenido de GC (+/-). El tercer anillo (en negro intenso) representa el contenido de GC. Las flechas rojas indican genes asociados con la resistencia antimicrobiana (AMR). El último anillo (en morado) marca los profagos, mientras que los segmentos grises representan los contigs/cromosomas.





**Figura 8.** Genoma circular de *Vibrio diabolicus* (cepa T63N). Desde el centro hacia afuera, el primer anillo (en azul claro) muestra las secuencias codificantes para proteínas (CDS). El segundo anillo (en verde y morado) ilustra el contenido de GC (+/-). El tercer anillo (en negro intenso) representa el contenido de GC. Las flechas rojas indican genes asociados con la resistencia antimicrobiana (AMR). El último anillo (en morado) marca los profagos, mientras que los segmentos grises representan los contigs/cromosomas.



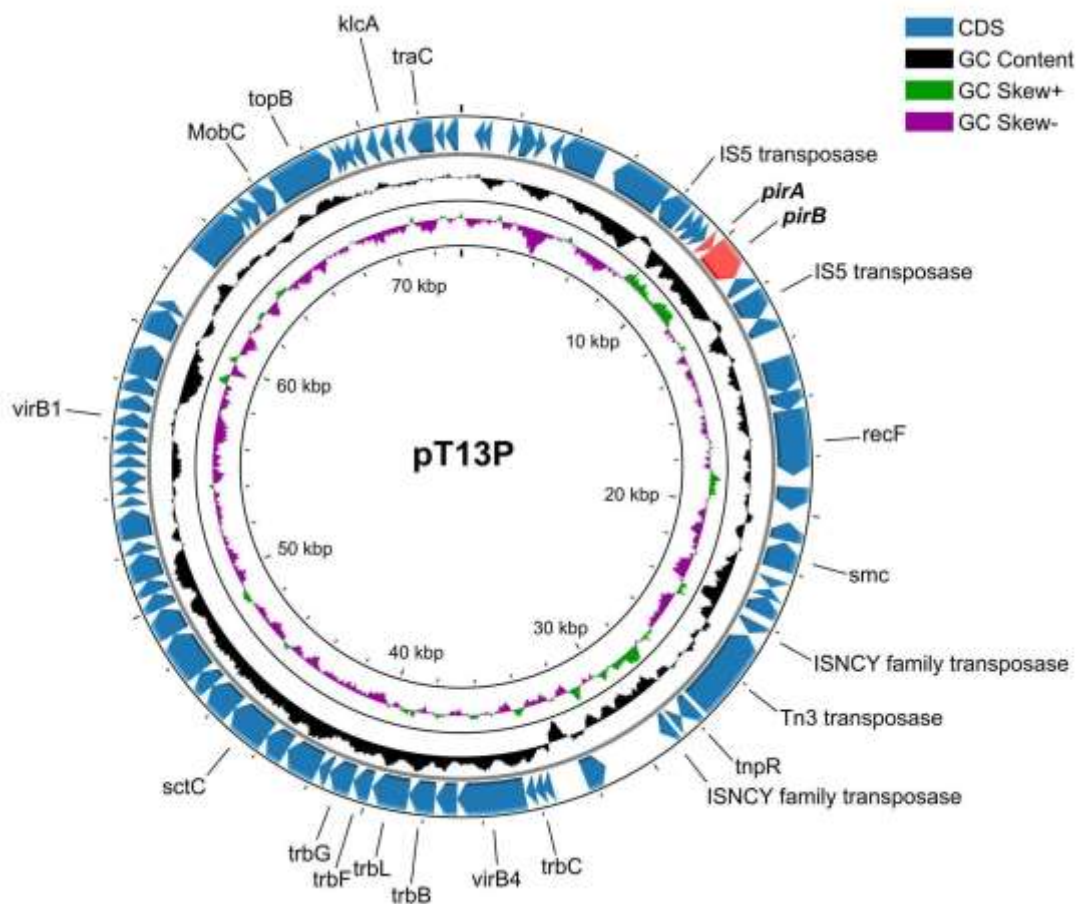
**Figura 9.** Perfil de genes relacionados con la resistencia a antibióticos en *V. parahaemolyticus* (T13P) y *V. cholerae* (T13N, T25P, T35, T63 y T63N).

### 7.5 Análisis de profagos y comparación de plásmidos.

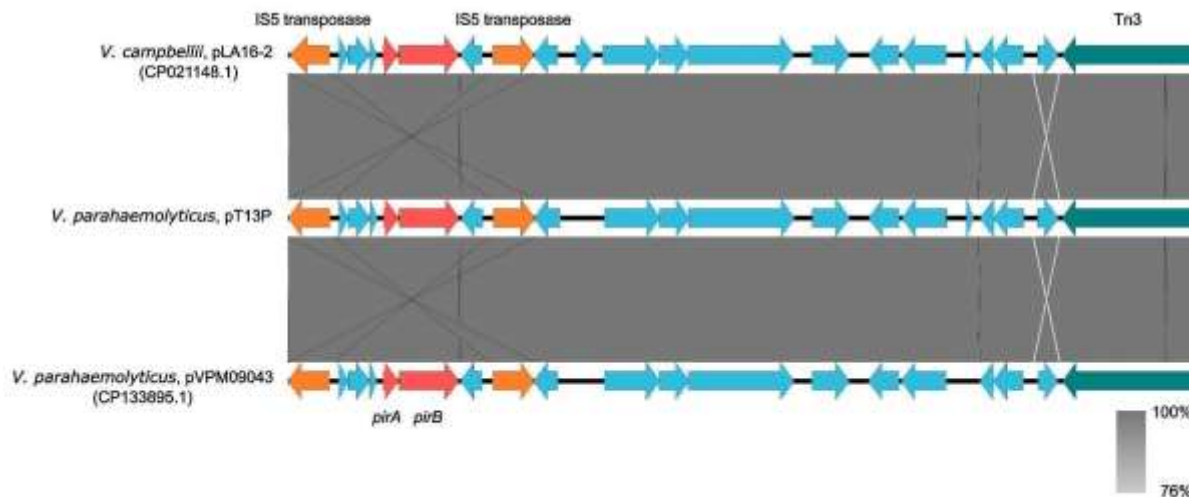
En el análisis de profagos, la mayoría de las cepas (T13P, T25, T63, T63N) exhibieron al menos un profago presente en diversas ubicaciones dentro de sus genomas. Únicamente las cepas T35 y T13N no presentaron indicios o genes relacionados. Respecto a los porcentajes de guanina-citosina, se observaron variaciones mínimas entre las cepas, manteniéndose en valores similares en general. La figura 10 presenta el mapa del plásmido pVA1 de la cepa T13P, que posee un tamaño de 73.4 kb y alberga un total de 82 genes, incluyendo genes de transferencia conjugativa, elementos de inserción, así como los genes de toxinas pirA y pirB. Las búsquedas de homología revelaron que el plásmido pVA1 de la cepa T13P comparte un 99.91% y un 99.86% de identidad de secuencia sobre una cobertura del 100% con los plásmidos pLA16-2 (cepa LA16-V1 de *V. campbellii*, ID: NZ\_CP021150) y pVPM09043 (cepa M0904 de *V. parahaemolyticus*, ID: NZ\_CP133895) (Vandeputte *et al.*, 2024), respectivamente. Además, similar a los plásmidos pLA16-2 y pVPM09043, los genes pirA y pirB (color naranja) están flanqueados por dos transposones de la familia IS5 en direcciones opuestas. La figura 11 muestra el análisis comparativo de plásmidos de diferentes cepas de *Vibrio*: *V. campbellii* (pLA16-2), *V. parahaemolyticus* (pT13P) y *V. parahaemolyticus*



(pVPM09043). En general, los plásmidos exhiben una alta homología genética, incluyendo transposasas IS5 y los genes de virulencia *pirA* y *pirB*. La principal diferencia observada es la ubicación de la transposasa Tn3.



**Figura 10.** Plásmido pT13P de la cepa T13P (*V. parahaemolyticus*) que alberga los genes *pirA* y *pirB*. De afuera hacia adentro, el primer anillo (azul) muestra las proteínas codificantes (CDS), el segundo anillo (negro) denota el contenido de G+C, y el tercer anillo (morado/verde) indica el sesgo de G+C.

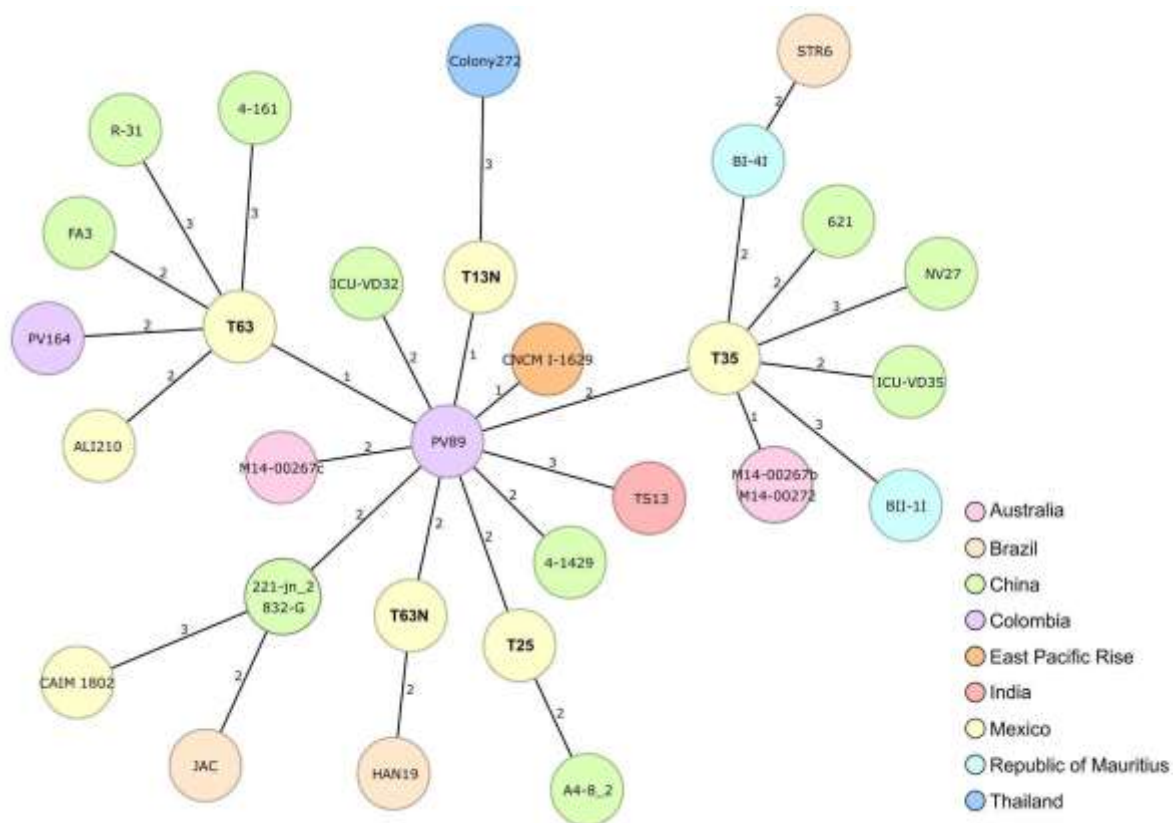


**Figura 11.** Análisis comparativo del plásmido pVA1 de la cepa T13P, que contiene los genes *pirA* y *pirB* (indicados con flechas rojas), junto a otros plásmidos que también contienen los genes *pirA* y *pirB*. Las flechas azules representan las secuencias codificantes de proteínas (CDS), las flechas anaranjadas representan las transposasas IS5, y las flechas verdes representan los transposones Tn3. Las regiones genómicas homólogas entre los plásmidos están resaltadas con sombreado gris.

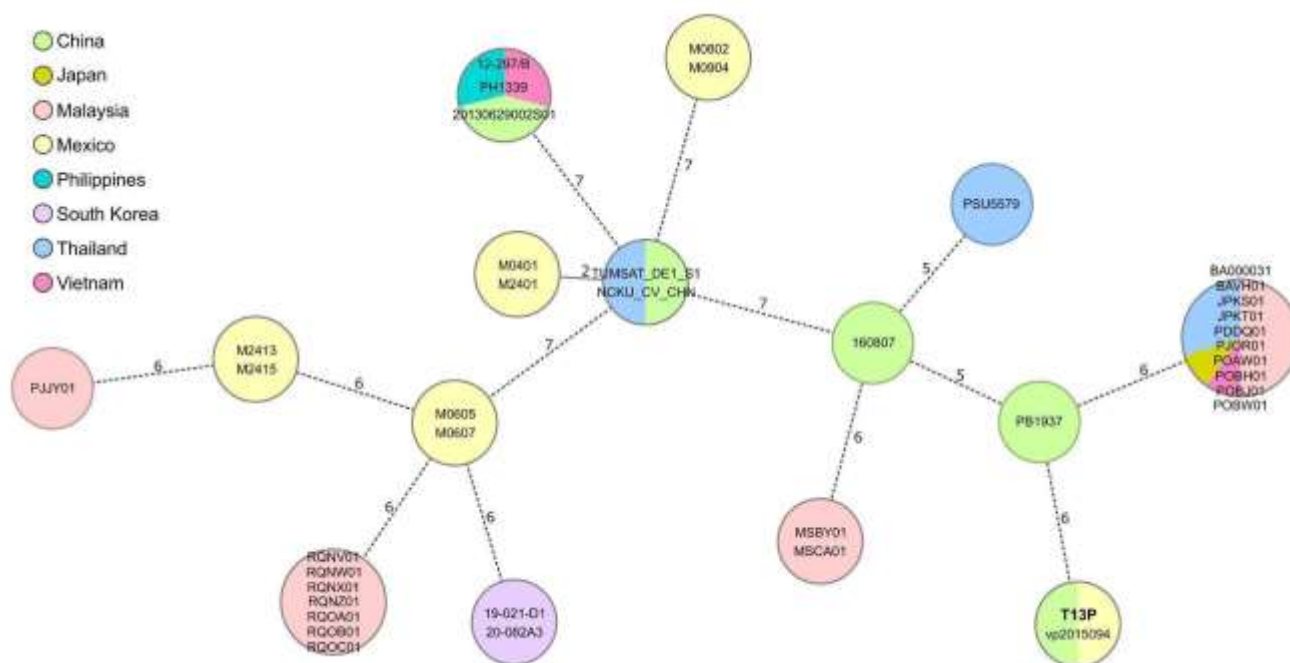
## 7.6 Análisis MLST (Tipificación de Secuencias Multilocus) de cepas de Vibrio.

El análisis MLST (locis: *dnaE*, *gryB*, *recA*, *dtdS*, *pntA*, *pyrC*, *tnaA*), reveló que las cepas de *V. parahaemolyticus* identificadas previamente en sistemas de producción con signos de AHPND en Sinaloa, México (M2413 ID: JAAKZS00, M2415 ID: JAAKZT00, M2401 ID: JAAKZQ00, M0802 ID: JAAIXL00, M0904 ID: JAAIXM00, M0605 ID: JALL01, M607 ID: JAANII00) (González-Gómez *et al.*, 2020) pertenecen a linajes diferentes a los utilizados en este estudio (T13P), que muestra una similitud más cercana a cepas aisladas de China (vp2015094, CP022243 y 160807). Mientras tanto, las otras cepas mexicanas están más estrechamente relacionadas entre sí y con cepas de Filipinas y China (Fig.10). El análisis realizado en cepas identificadas como *V. diabolicus* (Fig.11) (T25, T35, T13N, T63 y T63N) reveló que todas las cepas están directamente relacionadas con la cepa colombiana PV89 (ID: NZ\_JAKNQE010000043) (Pérez-Duque *et al.*, 2021). Sin embargo, individualmente, muestran similitudes diversas con otras cepas. T63 comparte similitud con cepas de origen chino (FA3 ID: NZ\_CP042452, R/31 ID: NZ\_CP063378, 4-161 ID: NZ\_CANMH000000000) (Peng *et al.*, 2020), así como con una cepa de origen colombiano (PV164 ID: NZ\_JAKNQB000000000) (Pérez-Duque *et al.*, 2021). T13N presenta similitud con la cepa tailandesa Colony272 (ID: NZ\_CP078739), T63N con la cepa brasileña HAN19 (ID: NZ\_CAJDZP000000000), y T35 con cepas de origen chino (621 ID:

NZ\_CANLMF000000000, NV27 ID: NZ\_CP085844, ICU-VD35 ID: NZ\_JAPNOV000000000), además de cepas australianas (M14-00267b ID: NZ\_JAKEVT000000000 y M14-0020272 ID: NZ\_JAKJKN010000000) (Peng et al., 2020).



**Figura 12.** Árbol de expansión mínima del perfil alélico de tipificación multilocus del genoma central de aislados de *V. diabolicus* de este estudio y aquellos obtenidos de estudios previos. Los grupos están coloreados y etiquetados según el país de origen.



**Figura 13.** Árbol de expansión mínima del perfil alélico de tipificación multilocus de cepas de *V. parahaemolyticus* que contienen los genes *pirA* y *pirB* de este estudio y aquellos obtenidos de estudios previos. Los grupos están coloreados y etiquetados según el país de origen.

## 8. DISCUSIÓN

### 8.1 Análisis de identificación

Los resultados del proceso de identificación de especies bacterianas son cruciales para comprender la diversidad y clasificación taxonómica de las cepas analizadas (Tindall *et al.*, 2010). En este estudio, se observó una notable consistencia en la identificación (100% ANI) de cinco cepas (T25P, T35, T63, T63N y T13N) como *V. diabolicus* utilizando dos plataformas de análisis bioinformático (Blast y EZbio) (Tabla II). Esta consistencia sugiere una alta probabilidad de que estas cepas realmente pertenezcan a la especie identificada, reforzando la confiabilidad de la identificación taxonómica. Por otro lado, la cepa T13P fue identificada de manera confiable como *V. parahaemolyticus* por ambas plataformas con valores de ANI del 100%. Todas las cepas mostraron altos porcentajes de similitud con la especie asignada, independientemente de la herramienta utilizada. Los resultados del proceso de hibridación de cepas, representados en la Fig.1 a través de un mapa de calor, respaldan los hallazgos del proceso de identificación y proporcionan una visión detallada de la similitud genómica entre diferentes pares de cepas bacterianas. Solo la cepa T13P parecía diferente, destacando una alta similitud genética y sugiriendo una estrecha relación entre las secuencias genéticas de estas cepas. Esta relación podría indicar posibles orígenes comunes o una relación evolutiva cercana, lo que podría tener implicaciones significativas para la función genómica y la adaptabilidad de las cepas analizadas (Konstantinidis y Tiedje, 2004).

### 8.2 Pruebas de susceptibilidad a antimicrobianos

La investigación sobre la resistencia de *Vibrio* sp. a antibióticos revela variaciones significativas en los niveles de resistencia entre diferentes cepas y antibióticos probados, los estudios han demostrado que los aislados de *Vibrio* han exhibido resistencia a diversas familias de antibióticos como la ampicilina, cefotaxima, ceftriaxona y trimetoprim-sulfametoxazol (Xu *et al.*, 2023). La evaluación de la susceptibilidad de diferentes cepas de *Vibrio* a varios antibióticos se llevó a cabo mediante la determinación de la concentración mínima inhibitoria (tabla 1), los resultados obtenidos revelaron variaciones significativas en los niveles de resistencia entre las cepas y los antibióticos evaluados, los valores de CMI para enrofloxacin (ENR) oscilaron entre 4 y 16  $\mu\text{g/ml}$ , observándose el valor máximo de 16  $\mu\text{g/ml}$  en las cepas T13N y T63. Estos hallazgos sugieren que, si bien existe cierta variabilidad, las cepas exhiben

una susceptibilidad relativamente baja a este antibiótico en comparación con otros evaluados. En el caso de especies de *Vibrio*, Soto-Rodríguez *et al.*, (2010) reportaron un MIC promedio de 3.01 µg/ml, obteniendo una concentración mínima para inhibir el crecimiento similar. E incluso estos hallazgos se alinean con el espectro más amplio de actividad antibacteriana de enrofloxacin, ya que ha demostrado eficacia contra diversas especies bacterianas, incluyendo *E. coli*, con valores de CMI tan bajos como 0.25 µg/mL en algunas cepas (De Smet *et al.*, 2020).

En cuanto a la furazolidona (FZD), se observó una amplia variación en los valores de la concentración mínima inhibitoria (CMI), que oscilaron desde 8 µg/ml hasta un máximo de 512 µg/ml en la cepa T35, este rango tan amplio de valores indica una alta variabilidad en la susceptibilidad a la furazolidona entre las diferentes cepas evaluadas. La cepa T35 presentó el mayor nivel de resistencia, seguida por T63N con 256 µg/ml y T25 y T63 con 128 µg/ml. Estos hallazgos resaltan que la furazolidona es el antibiótico frente al cual las cepas de *Vibrio* sp. demostraron la mayor resistencia en este estudio, con valores de CMI generalmente altos independientemente de la cepa analizada. Cabe destacar que si bien, no se han registrado pruebas con furazolidona en especies de *Vibrio*, en el caso de *Helicobacter pylori*, se ha reportado que el valor de CMI para este antibiótico es de aproximadamente 4 µg/ml (Alam, 2017). En relación con el florfenicol (FLF), los valores de concentración mínima inhibitoria (CMI) oscilaron entre 8 y 512 µg/ml. Las cepas T25 y T35 mostraron los niveles más altos de resistencia, con un CMI de 512 µg/ml, seguidas por la cepa T63N con 256 µg/ml. Estos resultados indican una baja susceptibilidad al florfenicol en algunas de las cepas evaluadas, en comparación con análisis previos, Samuelsen *et al.* (2003) reportaron valores mínimos de CMI para florfenicol en diversas especies de *Vibrio* aisladas de bacalao enfermo de 0.5 µg/ml, lo que contrasta notablemente con los resultados obtenidos en el estudio, donde se registraron valores de CMI significativamente más altos. Para otras especies de *Vibrio*, como *Vibrio harveyi*, Soto-Rodríguez *et al.* (2010) reportaron una CMI de 9.33 µg/ml en cepas aisladas de camarones enfermos, esta concentración relativamente baja fue similar a los resultados observados únicamente en la cepa T13N, que mostró la concentración más baja de las cepas analizadas. Las diferencias en la eficacia de los antibióticos, en comparación con estudios previos, podrían atribuirse a varios factores, como la fuente de aislamiento de las cepas y la exposición previa a antibióticos. Sin embargo, los hallazgos sugieren que ciertas cepas de *Vibrio* han desarrollado una susceptibilidad pobre frente a la aplicación de antibióticos como el florfenicol.

Por otro lado, los valores de concentración mínima inhibitoria (CMI) para la oxitetraciclina (OXI) variaron entre 32 y 256  $\mu\text{g/ml}$ . Las cepas T13P, T35 y T63N presentaron el valor más alto, alcanzando 256  $\mu\text{g/ml}$ , lo que sugiere una baja susceptibilidad, aunque moderada en comparación con los niveles observados para la furazolidona y el florfenicol. Estudios previos han demostrado que la oxitetraciclina puede inhibir el crecimiento de especies de *Vibrio* a concentraciones que oscilan entre 120 y 250  $\mu\text{g/ml}$  (Yudiati y Azhar, 2021). Soto Rodríguez *et al.* (2010) reportaron una CMI de 93.01  $\mu\text{g/ml}$  para *Vibrio harveyi* aislado de camarones enfermos, ligeramente menor a los resultados mínimos obtenidos. Sin embargo, es importante considerar que la resistencia a los antibióticos puede variar según las condiciones ambientales y la exposición previa de los microorganismos. Investigaciones realizadas en camarones expuestos a oxitetraciclina han revelado efectos adversos significativos. Además, Uyaguari *et al.* (2009) encontraron que la concentración letal del 50% para este antibiótico en camarones fue de 683.30  $\mu\text{g/ml}$ , observándose también efectos subletales crónicos que impactaron negativamente la población bacteriana intestinal de estos crustáceos.

### **8.3 Análisis genético de la resistencia a antibióticos**

Los resultados del análisis de genes de resistencia a antibióticos, incluida la identificación de genes, revelaron una estrecha interconexión entre las cepas analizadas, proporcionando una visión detallada de la comunicación bacteriana, así como de la resistencia y adaptación de agentes microbianos a diversos ambientes (Bruhn y Spellberg, 2015) (Fig. 3-8). Se identificaron una serie de genes de resistencia y proteínas comunes entre las cepas, sugiriendo la presencia de marcadores genéticos compartidos y posiblemente una relación cercana dentro de la comunidad bacteriana en el lugar de origen. Esto podría influir significativamente en aspectos relacionados con la resistencia y la adaptación, según Allen *et al.* (2009). Estudios previos, como el realizado por Zhang *et al.* (2011), sugieren que los sistemas de cultivo de camarones crean un ambiente propicio para que bacterias como *Vibrio* sp. adquieran resistencia a los antibióticos presentes en el entorno. Estos sistemas permiten que las bacterias proliferen y se adapten debido a factores como la alta densidad de organismos, el uso intensivo de antibióticos y las condiciones específicas de agua y nutrientes que favorecen el crecimiento bacteriano (Alav y Buckner, 2023). Esto resulta en una mayor frecuencia de bacterias resistentes a los antibióticos en los sistemas de cultivo, bajo este contexto, la

transferencia genética horizontal juega un papel crucial, ya que es un proceso que permite la adquisición de material genético de otras células que no son las progenitoras directas. Dicha transferencia facilita la propagación de los genes de resistencia entre diversas especies bacterianas, contribuyendo así al aumento de la resistencia a los antibióticos a nivel global (Michaelis y Grohmann, 2023; Wang *et al.*, 2023).

La resistencia a los antibióticos de diferentes familias de fármacos, especialmente en cepas del género *Vibrio* como *V. parahaemolyticus*, ha sido ampliamente investigada. Nuestros análisis revelaron la prevalencia de genes como tet(35) y tet(B), los cuales producen proteínas que actúan como bombas para expulsar los antibióticos de tetraciclina, lo que les permite a las bacterias resistir estos medicamentos (Zhu *et al.*, 2021) (Fig.9). Cabe destacar que la información identificada en los genomas sobre resistencia a la tetraciclina fue observada en las pruebas de susceptibilidad (Tabla I). Por otro lado, el gen tetR, también identificado en todas las cepas analizadas, regula la actividad de los genes tet(35) y tet(B), manteniendo su expresión baja cuando no hay tetraciclina, pero permitiendo su activación cuando este antibiótico está presente. Esto resulta en un aumento de la resistencia de las bacterias a las tetraciclinas, reforzando así su papel en los procesos infecciosos (Han *et al.*, 2015) (Figuras. 3-6). Investigaciones recientes de Wang *et al.* (2021) corroboraron la presencia de genes como tet(50) y tet(35) en *V. parahaemolyticus*, respaldando los resultados obtenidos.

Con relación a la información disponible sobre *V. diabolis*, la comprensión es limitada; sin embargo, los análisis han revelado la presencia de varios genes asociados con la resistencia a la tetraciclina. Ye *et al.* (2023) también han reportado una amplia variedad de genes relacionados con la resistencia a la tetraciclina en diversas especies de *Vibrio*, incluyendo *V. diabolis*, como tet(34), tet(A), tet(B), tet(M) y tet(E), demostrando así un conjunto completo de genes asociados con esta resistencia. Este hallazgo subraya la estrecha relación entre los signos clínicos agudos de la enfermedad de necrosis hepatopancreática aguda (AHPND, por sus siglas en inglés), que incluyen letargia, anorexia, hepatopáncreas pálido y acuoso, tracto vacío (estómago e intestino) y cromatóforos expandidos (Soto-Rodríguez *et al.*, 2015), con los genes identificados. Además, se ha observado que los antibióticos pertenecientes a la familia de las tetraciclinas pueden jugar un papel significativo en la progresión de la enfermedad, ya que su uso selectivo podría potencialmente promover el desarrollo y la propagación de cepas resistentes del género *Vibrio* en los sistemas de producción de camarones, lo que a su vez



puede aumentar la severidad de la AHPND en estas poblaciones acuícolas (Castellanos *et al.*, 2023). Bajo este contexto, las cepas analizadas fueron aisladas de sistemas de producción que presentaban signos clínicos de AHPND, lo que sugiere una posible relación entre la resistencia y los grupos de antibióticos utilizados. Las cepas AHPND+, principalmente *V. parahaemolyticus*, muestran una tendencia a desarrollar resistencia a múltiples antibióticos, esto se debe en parte a características genéticas propias de estas cepas, incluyendo potencialmente la coadquisición de genes de resistencia junto los genes responsables de la producción de toxinas AHPND (Zhang *et al.*, 2024; Nguyen *et al.*, 2023). La alta virulencia de las cepas AHPND+ lleva a un uso intensivo de antibióticos, aumentando la presión selectiva y fomentando la aparición de cepas (Kumar *et al.*, 2021). Esta combinación de alta patogenicidad y resistencia antimicrobiana complica el tratamiento, ya que los antibióticos efectivos contra cepas no AHPND pueden no ser eficaces contra las cepas resistentes debido a la resistencia antimicrobiana (AMR). El uso excesivo y el mal uso de antibióticos acelera la evolución de cepas resistentes, resultando en bacterias multirresistentes (MDR, resistentes a múltiples clases de antibióticos), extensamente resistentes (XDR, resistentes a casi todas las opciones disponibles excepto algunas) y pandrogresistentes (PDR, resistentes a todos los antibióticos conocidos), que son especialmente difíciles de tratar (Arabestani *et al.*, 2014).

Se identificaron una serie de genes relacionados con la resistencia a vancomicina, que incluyen los clusters vanY y vanB, junto con VanT y el cluster G, en las cepas T25, T35 y T63 (Fig. 5, 6 y 7) todas identificadas como *V. diabolicus*. Sin embargo, la información sobre la presencia de estos genes en cepas del género *Vibrio* es escasa, ya que han sido ampliamente identificados en bacterias Gram positivas, como *Enterococcus*, *Staphylococcus* y algunas cepas de *Bacillus* (Hashimoto *et al.*, 2019). Por lo tanto, su presencia no ha sido documentada previamente en las especies analizadas. En este estudio, no se probó ningún antibiótico particular para confirmar si confieren resistencia a dichos antimicrobianos en las especies analizadas, se sugiere realizar estos análisis en un futuro para comprender mejor la sensibilidad de las cepas frente a los antibióticos. Durante los análisis genómicos realizados, se observó una marcada presencia de los genes *bla*<sub>CARB-18</sub> y *bla*<sub>CARB-42</sub> en todas las cepas de *V. parahaemolyticus* y *V. diabolicus* analizadas (Fig.9). Estos genes están asociados con la resistencia a los carbapenémicos, una clase de antibióticos beta-lactámicos altamente eficaces contra una amplia gama de bacterias, incluso aquellas resistentes a otros tipos de antibióticos como las penicilinas y las cefalosporinas (Turner *et al.*, 2018). Son considerados como último recurso

debido a su amplia actividad y efectividad antimicrobiana (Chiotos *et al.*, 2020). La prevalencia de estos genes en patógenos del género *Vibrio* que incluyen *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus* demuestra la capacidad de las bacterias para degradar una amplia gama de antibióticos  $\beta$ -lactámicos, incluidos los carbapenémicos, lo que complica el tratamiento de las infecciones (Morris *et al.*, 2023). Aunque estos genes de resistencia no son tan prominentes en la literatura como las  $\beta$ -lactamasas NDM, KPC u OXA, su presencia en *V. parahaemolyticus* (T13P) indica una diversificación en los mecanismos de resistencia antimicrobiana. Además, se ha observado que estos genes están directamente relacionados con la resistencia a fluoroquinolonas, fosfomicina, tetraciclina, penicilina y cefalosporina en *V. diabolicus*. Esto señala un panorama de resistencia antimicrobiana complejo y multifacético en especies de *Vibrio*, subrayando la importancia de la vigilancia continua y el desarrollo de enfoques terapéuticos innovadores para controlar estas infecciones (Nava-Soberanes *et al.*, 2021).

La mayoría de las cepas estudiadas poseen el gen *adeF* (Fig. 3-9), fundamental en la resistencia a antibióticos fluoroquinolónicos y tetraciclínicos, codificando un efector de bomba de expulsión de múltiples fármacos (MDR) (Kaviani *et al.*, 2020). Este gen, ampliamente presente en *V. parahaemolyticus*, detectado tanto en cromosomas como en plásmidos conjugativos, facilita su transferencia tanto vertical (de una generación a la siguiente) como horizontal (entre especies no relacionadas) a través de elementos genéticos móviles (Sobecky y Hazen, 2009). Su prevalencia en varias cepas indica su ocurrencia común en comunidades bacterianas (Wang *et al.*, 2022). A pesar de que no se ha reportado previamente en *V. diabolicus*, en este estudio también se identificó el gen *CRP*, posiblemente adquirido mediante transferencia horizontal de genes, el gen *CRP* desempeña un papel crucial en la resistencia a los antimicrobianos en especies de *Vibrio* (*Vibrio cholerae*), codificando a proteínas involucradas en los mecanismos de expulsión de fármacos a través de bombas de eflujo (De *et al.*, 2024) por lo que podría conferir resistencia a diversas familias de antibióticos. Estos resultados sugieren una resistencia generalizada de las cepas a estos antibióticos, la eficacia independiente de los antibióticos en el tratamiento de infecciones en camarones puede depender de varios factores, incluido el tipo de bacteria que causa la infección, la sensibilidad de esa bacteria al antibiótico específico y la dosis administrada (Torres Corral, 2022). Estudios previos, como el de Laganà *et al.* (2011), han informado sobre la resistencia a tetraciclinas y fluoroquinolonas en especies de *Vibrio*, incluido *V. parahaemolyticus*, con variaciones en la

susceptibilidad a estos fármacos entre diferentes cepas y con el tiempo, reflejando el desarrollo continuo de la resistencia (Raharjo *et al.*, 2022).

La resistencia a los antibióticos en bacterias es un fenómeno complejo que involucra múltiples mecanismos genéticos (Dominguez *et al.*, 2023), los genes identificados en el análisis genómico podrían relacionarse directamente con los resultados obtenidos en los ensayos de susceptibilidad (Tabla 1). Específicamente, aquellos genes que codifican bombas de expulsión de múltiples drogas pertenecientes a las familias RND y MFS podrían estar vinculados con la resistencia moderada observada frente a diferentes fármacos. Por ejemplo, los genes tet(35), tet(B) y tetR facilitan la expulsión activa de las tetraciclinas, lo que podría explicar la resistencia moderada a la oxitetraciclina en las diferentes cepas. Por otro lado, los genes reguladores como rsmA y CRP podrían contribuir a la resistencia a múltiples antibióticos al modular la expresión de otros genes involucrados en mecanismos de resistencia, en particular, rsmA podría estar implicado en los altos niveles de resistencia frente a furazolidona y florfenicol, donde se reportaron valores de CMI de hasta 512 µg/ml. Además, la presencia de bombas de expulsión como la codificada por adeF también podría asociarse con la resistencia observada, especialmente frente a aquellos antibióticos donde se reportaron niveles más elevados de resistencia, como furazolidona y florfenicol.

#### **8.4 Plásmidos y resistencia antibiótica**

La resistencia a los antibióticos en *Vibrio* sp. puede ser facilitada por la presencia de plásmidos que contienen genes de resistencia (Wang *et al.*, 2018). Estos genes pueden codificar una variedad de proteínas que contrarrestan los efectos de los antibióticos, desde enzimas que degradan los antibióticos hasta proteínas de bombeo que los expulsan fuera de la célula bacteriana (Lopatkin *et al.*, 2016). La adquisición de plásmidos con estos genes de resistencia permite a las bacterias del género *Vibrio* sobrevivir y multiplicarse incluso en presencia de antibióticos, lo que complica significativamente su tratamiento (Nhung *et al.*, 2020). El análisis genómico realizado para la reconstrucción del plásmido identificado en la cepa T13P de *V.parahaemolyticus* (Fig. 10) reveló la presencia significativa de diversos marcadores genéticos, considerados así debido a sus importantes implicaciones en la biología y patogenicidad de la cepa. Un marcador genético es una secuencia específica de ADN que se utiliza para identificar y rastrear posiciones particulares en el genoma, asociando estas

secuencias con características biológicas específicas (Slack, 2023). Estos genes funcionan como marcadores genéticos porque permiten identificar y caracterizar la cepa T13P, asociar sus secuencias con rasgos específicos de virulencia y resistencia a antibióticos, y comprender mejor la variabilidad genética y los mecanismos de patogenicidad de *V. parahaemolyticus*. Entre estos marcadores se encuentran genes *pirAB*, transposasas (*tn3*, *IS5*), genes relacionados con el sistema de transferencia de plásmidos, la formación y funcionamiento del pilus de conjugación (*TrbC*, *TraC*, *TrbJ*, *TrbN*, *TrbB*, *TrbL*, *TrbG*, *TrbF*) (Shala-Lawrence *et al.*, 2018), genes relacionados con la movilización de plásmidos (*MobB*) (Garcillán-Barcia *et al.*, 2019), la organización y mantenimiento cromosómico (*smc*), genes asociados con el sistema de secreción tipo IV (T4SS) (*virB4* y *virB11*) (Azizimoghaddam *et al.*, 2023), genes asociados con el sistema de secreción tipo III (T3SS) (*sctC*), y un gen asociado con la regulación de la expresión génica (*hns*) (Deng *et al.*, 2017)

Los genes identificados revelan una composición genética con importantes implicaciones en términos de virulencia, diseminación y estabilidad. La presencia de genes asociados al sistema de secreción tipo III (T3SS), como *sctC*, coincide con hallazgos previos que destacan el papel crucial de este sistema en la patogénesis de *V. parahaemolyticus* (Zhang y Orth, 2013). Este sistema comprende numerosos genes, aunque en los plásmidos de virulencia se identifican algunos específicos, como *sctA*, *sctB*, *sctC*, *sctD* y *sctE*, los cuales son fundamentales para la funcionalidad del T3SS y su capacidad de mediación en la virulencia de cepas *V. parahaemolyticus* clínicas (Flacht *et al.*, 2023). De igual manera, la identificación de genes vinculados al sistema de secreción tipo IV (T4SS), como *virB4* y *virB11*, es consistente con estudios que han demostrado la importancia de este sistema en la transferencia horizontal de material genético en otras especies de *Vibrio*, la identificación de genes asociados al sistema de secreción tipo IV (T4SS), como *VirB4* y *VirB11*, se alinea con investigaciones que destacan la importancia de este sistema en la transferencia horizontal de genes entre especies de *Vibrio* realizadas por Ryan *et al.* (2023) y Zakaria *et al.* (2023). Los estudios sobre *V. parahaemolyticus* han demostrado la presencia de un sistema de secreción tipo III distinto (T3SS2) que ayuda a entregar proteínas efectoras a las células hospedadoras, contribuyendo a la patogénesis y adaptación ambiental (Jerez *et al.*, 2023). Adicionalmente, el T4SS en *Clostridioides difficile* se ha implicado en la patogenicidad, con los componentes *VirB4* y *virD4* desempeñando papeles cruciales en el transporte de ADN y proteínas a través de las paredes celulares, sirviendo potencialmente como factores de virulencia (Sorokina, *et al.*, 2021).

Los genes *trb*, *traC* y *mobB* identificados apuntan a una alta capacidad de transferencia génica horizontal en el plásmido identificado de la cepa de *V. parahaemolyticus*, la presencia de genes para la formación del pilus de conjugación (*trb*, *traC*) y movilización de plásmidos (*mobB*) permite adquirir eficientemente material genético exógeno, que incluyen plásmidos y otros elementos móviles, lo que representa una vía crucial para la diseminación de factores de virulencia, resistencia a antibióticos y nuevas capacidades metabólicas entre las poblaciones bacterianas (Xu *et al.*, 2023). Adicionalmente la detección de transposasas (*tn3*, IS5) evidencia el potencial de reorganización genómica, permitiendo la inserción e inactivación de genes, lo cual podría generar diversidad genética para la selección de variantes con mayor capacidad de adaptación (Wang *et al.*, 2023). La presencia de los genes *hns* y *smc*, participan activamente en la regulación transcripcional y organización del cromosoma, estos apuntan a mecanismos relacionados con la modulación de la expresión génica y mantener la integridad del genoma en respuesta a distintos estímulos ambientales (Norfolk *et al.*, 2023), y aunque su papel específico requiere más investigación, su presencia sugiere una capacidad de adaptación por vías distintas a la transferencia horizontal, facilitando de manera exponencial la transferencia y preservación de plásmidos.

### 8.5 Análisis comparativo de plásmidos

El análisis de comparativo del plásmido pT13P de la cepa T13P revela una notable similitud con los plásmidos pLA16-2 (cepa LA16-V1 de *V. campbellii*) y pVPM09043 (cepa M0904 de *V. parahaemolyticus*), con un 99.91% y 99.86% de identidad de secuencia respectivamente, sobre una cobertura del 100% (Fig.11). La alta similitud obtenida entre los plásmidos analizados sugiere una transferencia horizontal frecuente de elementos genéticos entre las especies estudiadas (Low *et al.*, 2023), esto podría también indicar que los plásmidos tienen un origen común, como lo mencionan González-Gómez *et al.* (2020), quienes identificaron que la presencia del transposón Tn3 es indicativa de un posible origen compartido entre cepas mexicanas y tailandesas. En los plásmidos analizados se identificó la presencia de elementos transponibles, como los transposones IS5 y Tn3, representados por flechas rojas y verdes en la Fig.11, estos elementos móviles dentro del genoma pueden desempeñar un papel crucial en la transferencia horizontal de genes y en la adaptación evolutiva de las bacterias (Tokuda *et al.*, 2023), específicamente los transposones IS5 son secuencias de ADN cortas que codifican una enzima llamada transposasa, la cual permite su movilización dentro del genoma (Wedel

*et al.*, 2023). En *Vibrio*, estos elementos pueden insertarse en diferentes sitios del ADN, provocando mutaciones y reorganizaciones genómicas, y así también puntos de diferenciación entre cepas, donde la movilidad de IS5 facilita la transferencia horizontal de genes entre diferentes cepas, este proceso puede llevar a la adquisición de nuevas características, como genes de resistencia a antibióticos o factores de virulencia, lo que a su vez puede mejorar la capacidad de adaptación de las bacterias a nuevos ambientes y hospederos, ya que al insertarse en ubicaciones estratégicas, IS5 puede activar o desactivar genes que contribuyen a la supervivencia en entornos cambiantes, incluyendo ambientes con alta presión de selección por uso de antibióticos (Johnson *et al.*, 2011; Hawkey, 2017; Olsz *et al.*, 2022).

La presencia de elementos móviles identificados en el análisis comparativo como los transposones IS5 y Tn3 son particularmente importantes en bacterias del género *Vibrio*, conocidas por su capacidad de adaptarse rápidamente a diferentes ambientes y hospederos, esto es especialmente relevante en el contexto de la acuicultura, donde los transposones pueden mediar la diseminación de genes de resistencia a antibióticos y de virulencia (Fernández *et al.*, 2023), en relación a la resistencia la capacidad de transportar genes de resistencia es crucial en ambientes acuáticos, donde el uso de antibióticos es común, sobre todo en los sistemas de cultivo donde las condiciones estructurales y de procesamiento facilitan la rápida propagación de resistencia entre las poblaciones bacterianas (Nonaka *et al.*, 2022). Específicamente, las transposasas de tipo Tn3 son más grandes y complejas que los IS5, además las Tn3 suele llevar genes adicionales que confieren resistencia a antibióticos y puede insertarse en diferentes partes del genoma, promoviendo la recombinación genética y la transferencia de genes (Lipszyc *et al.*, 2022). El análisis de la transposasa Tn3 dentro del plásmido pT13P concuerda con estudios previos realizados por Soto-Rodríguez *et al.* (2024) quienes han identificado la presencia de este elemento en plásmidos de *V. campbelli* que contiene los genes *pirA* y *pirB*. Estos estudios mencionan que la presencia de Tn3 marca una diferencia notable: el transposón Tn3 está ausente en las cepas asiáticas pero presente en las cepas latinoamericanas, esto destaca una diferencia clave en la estructura plasmídica entre diferentes regiones geográficas y sugiere que los factores ambientales o la presión selectiva local podrían influir en la composición genética de los plásmidos en distintas poblaciones bacterianas.

Por otra parte, se identificó la presencia de los genes de virulencia *pirA* y *pirB*, que se encuentran en los tres plásmidos mencionados, estos genes se encuentran flanqueados por transposones de la familia IS5 en direcciones opuestas (Fig.11). Esta disposición genética es crucial, ya que estos genes están vinculados con la producción de la toxina binaria PirAB y su movilidad, mediada por transposones IS5, podría promover la diseminación de estos factores de virulencia entre diferentes cepas bacterianas, aumentando de este modo su potencial patogénico (Owaied y Jabur, 2022). La configuración de *pirA* y *pirB*, flanqueados por IS5, no solo facilita su movilidad dentro del genoma, sino que también podría representar un mecanismo eficaz para la transferencia horizontal de estos genes entre diversas cepas, los transposones de la Secuencia de Inserción 5 (IS5) desempeñan un papel crucial en la regulación de la expresión génica. Zhang y Saier (2009) demostraron su capacidad para activar o reprimir genes relacionados con el metabolismo como *glPFk*, *bgIGfB*, *FuCaO* y la virulencia *FlhDc* y *nFSb*. Se ha observado que los elementos IS5 tienden a insertarse en sitios específicos bajo condiciones de estrés, lo que altera los patrones de expresión génica. Por lo tanto, la presencia de estos elementos de inserción podrían influir en la expresión de los genes *pirA* y *pirB*, ya sea a través de su activación o represión (Norfolk y Lipp, 2023), precisamente debido a esta modulación en la expresión puede tener consecuencias significativas en la virulencia de las cepas, puesto que cambios en la expresión de estos genes podrían alterar la interacción de las bacterias con sus hospedadores o la resistencia frente a los mecanismos de defensa del hospedero (Orel *et al.*, 2023). A pesar de la alta conservación global, algunas regiones del plásmido pT13P difieren de las de pLA16-2 y pVPM09043, lo que evidencia la presencia de inserciones, deleciones o reordenamientos específicos en cada uno de estos plásmidos, esta variabilidad sugiere que las cepas que portan estos plásmidos pueden experimentar adaptaciones locales, permitiéndoles adquirir nuevas funciones o eliminar secuencias que ya no son esenciales. Wang *et al.* (2022) resaltaron esta capacidad de adaptación en plásmidos IncR donde se registraron diversos perfiles de genes de resistencia debido a la variación en los módulos accesorios presentes en diferentes plásmidos.

La presencia de plásmidos y el impacto que puede generar en los hospederos ha sido ampliamente documentado en la literatura, específicamente los plásmidos que contienen las toxinas formadas por las proteínas PirA y PirB en *V. parahaemolyticus* han sido analizados por Dong *et al.* (2017), particularmente en aislados de camarón que mostraron altos niveles de mortalidad. También Soto-Rodríguez *et al.* (2022) han demostrado que estas toxinas generan

un efecto citotóxico en el hospedero y posiblemente afectan la microbiota circundante, destacando principalmente el rol dual de la toxina PirABvp. El conocimiento sobre la presencia y función de los plásmidos y las proteínas PirAB en el genoma de esta cepa es crucial para comprender su patogenicidad, Lee et al. (2015) mencionan que la presencia de los genes *PirAB* puede incrementar la virulencia de *V. parahaemolyticus*, especialmente cuando la bacteria adquiere un plásmido específico relacionado con el Síndrome de Necrosis Hepatopancreática Aguda (AHPND), debido a que estos genes son considerados el principal factor de virulencia asociado a la enfermedad. Esto sugiere que la presencia simultánea de los genes *PirAB* y el plásmido relacionado puede potenciar la capacidad patogénica de la bacteria, destacando la importancia de estos elementos en la virulencia. Estos hallazgos resaltan la importancia de comprender la estructura genética de las cepas bacterianas para evaluar su potencial patógeno y su capacidad de resistencia antimicrobiana, particularmente en contextos de afecciones bacterianas en ambientes acuícolas.

### **8.6 Interacción entre plásmidos y profagos en la resistencia antibiótica**

El análisis de profagos (Fig. 3-8) sugiere su presencia en la mayoría de las cepas analizadas, lo que plantea la posibilidad de una interacción con virus-bacterianos, análisis anteriores revelan que muchas especies bacterianas, incluyendo *Vibrio*, albergan profagos dentro de sus genomas (González de Aledo *et al.*, 2023). Los profagos pueden transportar genes de resistencia a los antibióticos en su genoma (Burrus y Waldor, 2004), estos genes pueden ser adquiridos por las bacterias hospedadoras durante la infección y luego integrarse en su genoma, proporcionando a las bacterias la capacidad de resistir los antibióticos específicos codificados por estos genes (Jun *et al.*, 2014). Sin embargo, la ausencia de indicios de profagos o genes relacionados en las cepas T35 y T63 (Fig.6 y 7) destaca una posible diferencia genómica en estas cepas en particular. Aunque los bacteriófagos han sido bien documentados en especies del género *Vibrio* y son comunes en las bacterias, la información específica sobre profagos en *V. parahaemolyticus* y *V. diabolicus* varía dependiendo de la cepa, la ubicación geográfica y otros factores (Yates *et al.*, 2024). No obstante, son de vital importancia ya que pueden llevar genes que codifican toxinas u otros factores de virulencia, lo que puede influir en la patogenicidad de la bacteria hospedera (Plaza *et al.*, 2018). Por lo tanto, los profagos podrían estar actuando como vectores de transferencia horizontal de genes de resistencia a los antibióticos entre las cepas analizadas, Incluso la presencia de profagos y la resistencia a



los antibióticos podrían estar relacionadas debido a procesos de coevolución y selección natural (Takeuchi *et al.*, 2023; Le Roux y Blokesch, 2018), donde las bacterias que adquieren profagos con genes de resistencia a los antibióticos podrían tener una ventaja selectiva sobre las bacterias que no tienen esa capacidad, esto llevaría a una mayor prevalencia de resistencia en la población, promoviendo su adquisición dentro de los sistemas de cultivo (Wozniak *et al.*, 2021).

### **8.7 Análisis MLST y dispersión global de cepas de *Vibrio***

El análisis MLST de las cepas mexicanas identificadas como *V. diabolicus* (Fig. 13) T25, T35, T63, T63N y T13N, incluyó el análisis de los loci: *recA*, *gryB*, *dnaE*, *pntA*, *dtdS*, *pyrC* y *atpA*, con 30 genomas de referencia de diversas partes del mundo, el cual ha revelado conexiones directas con la cepa colombiana Pv89 (ID:PRJNA754786) y otras cepas alrededor del mundo. Esta cepa colombiana fue aislada de muestras ambientales, que incluyen agua de mar (Pérez-Duque *et al.*, 2021), mientras que algunas de las otras cepas, que comparten una gran relación, como cepas asiáticas en su mayoría, fueron aisladas de sistemas de cultivo de organismos como camarón. Estas relaciones genéticas plantean interrogantes sobre los posibles mecanismos que han facilitado la dispersión y la relación genómica, lo que sugiere eventos de migración en el caso de muestras ambientales, de manera natural y mezcla genética entre poblaciones bacterianas de diferentes regiones geográficas (Marquéz Ortíz, 2017). Además, en el caso de muestras con origen en granjas de cultivo de camarón, el papel del comercio internacional y las relaciones comerciales son un punto clave, especialmente entre cepas asiáticas y colombianas. E incluso la formación de clados específicos, como el observado en las cepas T63, podría reflejar patrones evolutivos compartidos entre estas cepas, la relación entre la cepa T63N mexicana y la cepa brasileña HAN19, que fueron aisladas de sistemas de producción de camarón, plantea interesantes interrogantes sobre su origen y posible conexión comercial entre México y Brasil, esta asociación podría reflejar la dinámica de intercambio de recursos genéticos en el ámbito de la acuicultura, donde los movimientos comerciales de especies acuáticas y sus productos son comunes entre países (Bonilla, 2016). La evidencia bibliográfica sugiere que estas cepas podrían tener vínculos con cepas asiáticas, dado que la mayoría de los camarones producidos en Latinoamérica provienen de productores asiáticos que han sido introducidos en la región, esta conexión plantea la posibilidad de una transferencia genética entre las poblaciones de camarones de diferentes regiones, lo que

podría influir en la diversidad genética y la adaptación de estas especies a diferentes condiciones ambientales y prácticas de cultivo (Vilela y Falcão, 2021).

La introducción de camarones de origen asiático en Latinoamérica ha sido un fenómeno ampliamente documentado en la literatura científica (López-Téllez *et al.*, 2020), esta práctica se ha llevado a cabo con el objetivo de impulsar la producción acuícola en la región, aprovechando la experiencia y tecnología desarrollada en países como China y Tailandia, líderes en la producción de camarón a nivel mundial. La posibilidad de una relación entre la cepa T63N mexicana y la cepa brasileña HAN19 también plantea interrogantes sobre la bioseguridad y el manejo de la acuicultura en ambas regiones, donde es importante considerar los riesgos asociados con la introducción de nuevas cepas de patógenos en los sistemas de producción de camarón, así como las medidas de control y prevención necesarias para mitigar estos riesgos (Stentiford *et al.*, 2012). El agrupamiento independiente de la cepa T35 mexicana con cepas de la, China y Australia sugiere eventos de dispersión más amplios que podrían haber ocurrido a través de rutas comerciales oceánicas (Tang *et al.*, 2019). Es crucial considerar el papel del comercio internacional y las relaciones comerciales en la dispersión de estas cepas, lo que podría tener implicaciones significativas en términos de bioseguridad y manejo de enfermedades bacterianas en diferentes regiones.

El análisis de MLST realizado sobre la cepa T13P, identificada como *V. parahaemolyticus* (Fig. 12), incluyó el estudio de 40 genomas de referencia de diversas partes del mundo, con los marcadores genéticos; *dnaE*, *gryB*, *recA*, *dtdS*, *pntA*, *pyrC* y *tnaA*. Este análisis consideró específicamente la presencia o identificación de plásmidos portadores de *pirAB*, incluyendo cepas de origen mexicano (M2413, M215, M0605, M0607, M0401, M2401, M0802, y M0904) analizadas previamente por González-Gómez *et al.* (2020). La cepa T13P mostró una alta similitud con la cepa vp2015094 (ID:PRJNA750876) aislada de mariscos cultivados en la provincia de Liaoning, China, y caracterizada por la presencia del plásmido pVp94-1. Dicho plásmido es portador de varios genes de resistencia a antibióticos (ARGs), incluyendo aquellos que confieren resistencia a tetraciclinas (*tetB*, *tetC*, *tetM*, *tetR*), aminoglucósidos (*aph(3')-Ib*, *aph(6)-Id*), sulfonamidas (*sul2*), diaminopiridina (*dfrA6*), fenicol (*floR*) y *bla*<sub>CARB-19</sub> (resistencia a betalactámicos), según lo reportado por Wang *et al.* (2022). Se observó una alta similitud entre estos genes de resistencia y los identificados en la cepa T13P mediante análisis genómico, lo que sugiere una posible relación genética entre ambas cepas y la presencia compartida de

elementos genéticos asociados con la resistencia a antibióticos. La cepa T13P también muestra una relación cercana con la cepa cp022243, posiblemente con un origen común, ya que esta última fue aislada de brotes de AHPND en camarones cultivados en Zhangpu, China (Fu *et al.*, 2018), a diferencia de las cepas mexicanas que forman grupos independientes. El análisis filogenético reveló que las cepas de origen mexicano están más estrechamente relacionadas con cepas originarias de Malasia, Corea del Sur y Filipinas (Fig. 13) también reportado por González-Gómez *et al.* (2020), lo que indica una diversidad genética significativa entre estas poblaciones de *V. parahaemolyticus*. Análisis anteriores han sugerido que las cepas presentes en América Latina muestran una amplia diversidad genética (Castellanos *et al.*, 2023) e incluso han señalado una ausencia de clados con orígenes precisos, que incluyen a cepas mexicanas y norteamericanas, por lo tanto, la falta de conexión directa entre la cepa analizada en este estudio (T13P) y las demás cepas mexicanas es algo relativamente común. Un ejemplo similar se obtuvo en el estudio de Chonsin *et al.* (2016), donde el análisis filogenético MLST de cepas de *V. parahaemolyticus* de Tailandia mostró una amplia variación genética, similar a la que hemos encontrado. Otro motivo por el cual pueda existir diferencia entre la cepa T13P y el resto de las cepas mexicanas es la posible adquisición de material genético exógeno a través de eventos de transferencia horizontal, como la conjugación bacteriana (San Millan *et al.*, 2015). Este proceso de transferencia de material genético entre bacterias de diferentes linajes podría haber introducido variabilidad genética en la cepa T13P, lo que contribuiría a su divergencia genética inesperada con respecto a otras cepas mexicanas. Este tipo de eventos de transferencia horizontal son comunes en la evolución bacteriana y pueden resultar en la adquisición de genes de resistencia a antibióticos, factores de virulencia y otros elementos que pueden conferir ventajas adaptativas a las bacterias en entornos cambiantes (Garud *et al.*, 2019). La importancia de los transposones en las cepas analizadas radica en su capacidad para promover la movilidad génica y la recombinación genética. La presencia del transposón Tn3 en todas las cepas de América Latina previamente analizadas sugiere que este elemento móvil puede actuar como un marcador distintivo de la región geográfica. Sin embargo, la observación de una relación filogenética más cercana entre la cepa T13P y cepas chinas que con otras cepas mexicanas sugiere una posible variabilidad en la presencia o prevalencia de ciertos transposones entre diferentes regiones geográficas (Partridge *et al.*, 2018). El análisis comparativo mostró que el plásmido de la cepa T13p mostró la presencia del transposón Tn3 y la transposasa IS5, pero había regiones no compartidas entre los plásmidos que podrían influir en la diferencia entre las cepas analizadas. La implicación de

esta diferencia en los transposones apunta hacia una diversidad genética mayor de lo esperado en las cepas analizadas, lo cual podría deberse a la movilidad de estos elementos genéticos (Frost *et al.*, 2005). Esta movilidad podría haber facilitado la transferencia horizontal de genes entre cepas de distintas regiones geográficas, permitiendo la dispersión y la adaptación a nuevos ambientes. Además, esta observación sugiere la posibilidad de interacciones transnacionales que han influido en la evolución y dispersión de estas cepas bacterianas, lo que subraya la complejidad de los procesos evolutivos en el contexto de la microbiología y la epidemiología bacteriana (Carattoli, 2013). Las discrepancias en las estrechas relaciones entre las cepas analizadas plantean interrogantes sobre su origen y las posibles vías de introducción en México, especialmente en el contexto de los brotes de la enfermedad necrosis aguda del hepatopáncreas (AHPND) relacionados con la importación de camarones asiáticos y de Latinoamérica. Posiblemente estos brotes, asociados con *V. parahaemolyticus*, surgieron en 2013, pero el origen exacto sigue siendo desconocido debido a la falta de conexiones genéticas claras entre las cepas de diferentes regiones (Solís *et al.*, 2021). Se plantean varias posibilidades, como la importación de camarones asiáticos, la introducción de cepas asiáticas a través de camarones importados o la dispersión global de cepas mediante prácticas de acuicultura. La divergencia genética observada en la cepa T13P sugiere una posible conexión con una de estas vías de introducción. Se requieren estudios adicionales para comprender completamente los mecanismos subyacentes a la introducción y dispersión de cepas de *V. parahaemolyticus* asociadas con AHPND en México y otras regiones (Fu y Tian, 2017).

Los análisis genómicos de cepas de *V. parahaemolyticus* y *V. diabolica* revelan una compleja interconexión genética y posibles rutas de dispersión a nivel mundial. La diversidad genética observada entre estas cepas, con conexiones genéticas entre regiones geográficas diversas, destaca la influencia de la movilidad y la interacción transnacional en la evolución bacteriana. Además, la presencia de genes de resistencia a antibióticos en algunas cepas plantea preocupaciones adicionales sobre la bioseguridad y el manejo de enfermedades bacterianas en la acuicultura. La necesidad de políticas efectivas de control antimicrobiano se vuelve aún más evidente con la observación de esta resistencia. Las discrepancias en las relaciones genéticas entre cepas sugieren interrogantes sobre el origen y las vías de introducción, especialmente en el contexto de brotes de enfermedades bacterianas. Se requiere una mayor investigación para comprender completamente los mecanismos subyacentes a la introducción

y dispersión de cepas de *V. parahaemolyticus* y *V. diabolicus*, lo que contribuirá a mejorar la gestión de la bioseguridad en la acuicultura y la salud pública a nivel global.

## 9. CONCLUSIONES

- Se aislaron seis cepas bacterianas del género *Vibrio* provenientes de sistemas de cultivo del camarón blanco *Penaeus vannamei*. De estas, cinco fueron identificadas como *V. diabolicus* y una como *V. parahaemolyticus*. Además, la presencia predominante de *V. diabolicus* sugiere una adaptación particular de esta especie a las condiciones ambientales de los cultivos de *P. vannamei*.
- Los resultados del perfil de susceptibilidad antibiótica de las cepas de *Vibrio* sp. muestran una considerable variabilidad en la resistencia a los antibióticos examinados por parte de cepas de prueba. Estos hallazgos respaldan los resultados obtenidos en el análisis genómico, donde se observaron diferencias en la presencia de genes de resistencia entre las cepas.
- Se identificaron diversos genes de resistencia en las cepas analizadas, incluyendo genes de distintas familias como vanT-vanG cluster, vanY-vanB cluster, *tet(35)*, TxR, *bla<sub>CARB-42</sub>*, *bla<sub>CARB-18</sub>*, *rsmA*, *adeF*, CRP, *tet(B)*, y *tetR*.
- Los mapas genómicos construidos revelaron que las cepas mexicanas de *Vibrio* presentan estrechas relaciones genéticas con cepas de origen chino y otras asiáticas, independientemente de la especie analizada.

## 10. LITERATURA CITADA

- Ågerstrand, M., Josefsson, H., Wernersson, A. S., y Larsson, D. J. (2023). Opportunities to tackle antibiotic resistance development in the aquatic environment through the Water Framework Directive. *Ambio*, 52(5): 941-951. <https://doi.org/10.1007/s13280-022-01828-7>
- Alam, M. I. (2017). Formulation and advantages of furazolidone in spray dried and liposomal drug delivery systems. Doctoral dissertation. University of Sunderland, England.
- Alav, I., y Buckner, M. M. (2023). Non-antibiotic compounds associated with humans and the environment can promote horizontal transfer of antimicrobial resistance genes. *Critical Reviews in Microbiology*, 1-18. <https://doi.org/10.1080/1040841X.2023.2233603>
- Alderman, D. J., y Hastings, T. S. (1998). Antibiotic use in aquaculture: Development of antibiotic resistance - potential for consumer health risks. *International Journal of Food Science and Technology*, 33(2): 139-155. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2621.1998.3320139.x>
- Angier, N. (1912). Listening to Bacteria. *Listening*, 4 (52).
- Arabestani, M. R., Karami, M., y Alikhani, M. Y. (2014). Antimicrobial resistance in microorganisms. *Avicenna Journal of Clinical Microbiology and Infection*, 1(1): <https://doi.org/10.17795/ajcmi-19941>
- Azizimoghaddam, Y., Kermanpour, S., Mirzaei, N., Hourii, H., Nabavi-Rad, A., Asadzadeh Aghdaei, H., y Zali, M. R. (2023). Genetic diversity of Helicobacter pylori type IV secretion system cagI and cagN genes and their association with clinical diseases. *Scientific Reports*, 13(1);102-64. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-37166-0>
- Berlanga-Robles, C. A., Fernández, G., Ruiz-Luna, A., Cervantes-Escobar, A., y Castellanos-Tapia, F. (2022). Landscape changes in a critical subtropical coastal wetland in northwestern Mexico: Is shrimp farming a driver of concern? *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 302, 108754. : <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-1777673/v1>
- Bondad-Reantaso, M. G., MacKinnon, B., Karunasagar, I., Fridman, S., Alday-Sanz, V., Brun, E., Le Groumellec, M., Li, A., Surachetpong, W., Karunasagar, I., Hao, B., Dall'Occo, A., Urbani, R., y Caputo, A. (2023). Review of alternatives to antibiotic use in aquaculture. *Reviews in Aquaculture*, 15(4): 1421-1451. <https://doi.org/10.1111/raq.12786>
- Braetz, S., Schwerk, P., Figueroa-Bossi, N., Tedin, K., y Fulde, M. (2023). Prophage Gifsy-1 Induction in Salmonella enterica Serovar typhimurium reduces persister cell formation after ciprofloxacin exposure. *Microbiology Spectrum*, 11(4): e01874-23. <https://doi.org/10.1128/spectrum.01874-23>
- Broberg, C. A., Calder, T. J., y Orth, K. (2011). *Vibrio parahaemolyticus* cell biology and pathogenicity determinants. *Microbes and Infection*, 13(12-13): 992-1001. 10.1016/j.micinf.2011.06.013.
- Bruhn, K. W., Pantapalangkoor, P., Nielsen, T., Tan, B., Junus, J., Hujer, K. M., Wright, M. S., Bonomo, R. A., Adams, M. D., Chen, W., y Spellberg, B. (2015). Host fate is rapidly determined by innate effector-microbial interactions during *Acinetobacter baumannii* bacteremia. *The Journal of Infectious Diseases*, 211(8): 1296–1305. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiu593>
- Burrus, V., y Waldor, M. K. (2004). Shaping bacterial genomes with integrative and conjugative elements. *Research in Microbiology*, 155(5): 376-386. 10.1016/j.resmic.2004.01.012.

- Cain, K. (2022). The many challenges of disease management in aquaculture. *Journal of the World Aquaculture Society*, 53(6). <https://doi.org/10.1111/jwas.12902>
- Carattoli, A. (2013). Plasmids and the spread of resistance. *International Journal of Medical Microbiology*, 303(6-7): 298-304. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2013.02.001>
- Castellanos, A., Restrepo, L., Bajaña, L., Betancourt, I., Bayot, B., y Reyes, A. (2023). Genomic and evolutionary features of nine AHPND positive *Vibrio parahaemolyticus* strains isolated from South American shrimp farms. *Microbiology Spectrum*, 11(4): e04851-22. <https://doi.org/10.1128/spectrum.04851-22>
- Chauhan, N. S., y Punia, A. (2023). Antibiotic pollution and antibiotic-resistant bacteria in water bodies. In: *Degradation of antibiotics and antibiotic-resistant bacteria from various sources*. Academic Press, England, pp. 179-201.
- Chellapandian, H., Aadham, M. S., Jaabir, M., y Jeyachandran, S. (2023). Alarming viral pathogens in shrimp industry and nanotechnology. In: *Nanotechnological approaches to the advancement of innovations in aquaculture*. Springer, Charnp, pp. 115-126. [0.1007/978-3-031-15519-2\\_7](https://doi.org/10.1007/978-3-031-15519-2_7).
- Chiotos, K., Hayes, M., Gerber, J. S., y Tamma, P. D. (2020). Treatment of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae infections in children. *Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society*, 9(1): 56–66. <https://doi.org/10.1093/jpids/piz085>
- Chonsin, K., Matsuda, S., Theethakaew, C., Kodama, T., Junjhon, J., Suzuki, Y., Suthienkul, O., y Iida, T. (2016). Genetic diversity of *Vibrio parahaemolyticus* strains isolated from farmed Pacific white shrimp and ambient pond water affected by acute hepatopancreatic necrosis disease outbreak in Thailand. *FEMS Microbiology Letters*, 363(2): fnv222. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnv222>
- Clinical and Laboratory Standards Institute. (2007). *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; seventeenth informational supplement (M100-S17)*. Wayne, PA: The Institute. United States.
- De Smet, J., Boyen, F., Croubels, S., Rasschaert, G., Haesebrouck, F., Temmerman, R., Rutjens, S., De Backer, P., y Devreese, M. (2020). The impact of therapeutic-dose induced intestinal enrofloxacin concentrations in healthy pigs on fecal *Escherichia coli* populations. *BMC Veterinary Research*, 16, 382. <https://doi.org/10.1186/s12917-020-02608-9>
- De, R., Mukhopadhyay, A. K., Ghosh, M., Basak, S., y Dutta, S. (2024). Emerging resistome diversity in clinical *Vibrio cholerae* strains revealing their role as potential reservoirs of antimicrobial resistance. *Molecular Biology Reports*, 51(1): 409. <https://doi.org/10.1007/s11033-024-09313-y>
- Deng, W., Marshall, N. C., Rowland, J. L., McCoy, J. M., Worrall, L. J., Santos, A. S., Strynadka, N. C. J., y Finlay, B. B. (2017). Assembly, structure, function and regulation of type III secretion systems. *Nature Reviews Microbiology*, 15(6): 323-337. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.33>
- Devi, R., Surendran, P. K., y Chakraborty, K. (2009). Antibiotic resistance and plasmid profiling of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from shrimp farms along the southwest coast of India. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25(11): 2005-2012.
- Domingues, C. P., Rebelo, J. S., Dionisio, F., y Nogueira, T. (2023). Multi-drug resistance in bacterial genomes a comprehensive bioinformatic analysis. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(14): Article 11438. <https://doi.org/10.3390/ijms241411438>
- Dong, X., Bi, D., Wang, H., Zou, P., Xie, G., Wan, X., Yang, Q., Zhu, Y., Chen, M., Guo, C., Liu, Z., Wang, W., y Huang, J. (2017). *pirAB* *vp*-bearing *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio campbellii* pathogens isolated from the same AHPND-affected pond possess highly



- similar pathogenic plasmids. *Frontiers in Microbiology*, 8: 1859. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01859>
- Dong, X., Chen, J., Song, J., Wang, H., Wang, W., Ren, Y., Guo, C., Wang, X., Tang, K. F. J., & Huang, J. (2019). Evidence of the horizontal transfer of pVA1-type plasmid from AHPND-causing *Vibrio campbellii* to non-AHPND *Vibrio owensii*. *Aquaculture*, 502: 123-129. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.01.016>
- Dong, X., Song, J., Chen, J., Bi, D., Wang, W., Ren, Y., Wang, H., Wang, G., Tang, K. F. J., Wang, X., y Huang, J. (2019). Conjugative transfer of the pVA1-type plasmid carrying the pirABvp genes results in the formation of new AHPND-causing *Vibrio*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00195>
- Du, Y., Hu, X., Miao, L., y Chen, J. (2022). Current status and development prospects of aquatic vaccines. *Frontiers in Immunology*, (13). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1040336>
- Emerenciano, M. G., Rombenso, A. N., Vieira, F. D. N., Martins, M. A., Coman, G. J., Truong, H. H., y Simon, C. J. (2022). Intensification of penaeid shrimp culture: an applied review of advances in production systems, nutrition and breeding. *Animals*, 12(3): 236. Doi: <https://doi.org/10.3390/ani12030236>
- Estrada-San Agustín, E., Hernández-López, J., De Blas, I., y Sumano, H. (2023). Survey to evaluate the proficiency in the use of antibacterial drugs in shrimp farming in the state of Sonora, Mexico. *Journal of the World Aquaculture Society*, 54(6): 1624-1643. <https://doi.org/10.1111/jwas.12994>
- Fernandez, M., Shkumatov, A. V., Liu, Y., Stulemeijer, C., Derclaye, S., Efremov, R. G., Hallet, B., y Alsteens, D. (2023). AFM-based force spectroscopy unravels stepwise formation of the DNA transposition complex in the widespread Tn3 family mobile genetic elements. *Nucleic Acids Research*, 51(10): 4929–4941. <https://doi.org/10.1093/nar/gkad241>
- Figueredo, A., Fuentes, J. L., Cabrera, T., León, J., Patti, J., Silva, J., Ron, E., Pichardo, O., Marcano, N. (2020). Bioseguridad en el cultivo de camarones penaeidos: una revisión. *AquaTechnica: Revista Iberoamericana de Acuicultura*, 2(1): 1-22. Doi:10.33936/at.v2i1.2409
- Flacht, L., Lunelli, M., Kaszuba, K., Chen, Z. A., O'Reilly, F. J., Rappsilber, J., Kosinski, J., y Kolbe, M. (2023). Integrative structural analysis of the type III secretion system needle complex from *Shigella flexneri*. *Protein Science*, 32(4). <https://doi.org/10.1002/pro.4595>
- Frost, L. S., Leplae, R., Summers, A. O., y Toussaint, A. (2005). Mobile genetic elements: the agents of open source evolution. *Nature Reviews Microbiology*, 3(9): 722-732. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1235>
- Fu, S., Wang, L., Tian, H., Wei, D., y Liu, Y. (2018). Pathogenicity and genomic characterization of *Vibrio parahaemolyticus* strain PB1937 causing shrimp acute hepatopancreatic necrosis disease in China. *Annals of Microbiology*, 68: 175-184. <https://doi.org/10.1007/s13213-018-1328-0>
- Fu, S., y Tian, H. (2017). Delineating the origins of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from outbreaks of acute hepatopancreatic necrosis disease in Asia by the use of whole genome sequencing. *Frontiers in Microbiology*, 8: 301-332. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02354>
- Garcillán-Barcia, M. P., Cuartas-Lanza, R., Cuevas, A., y De la Cruz, F. (2019). Cis-acting relaxases guarantee independent mobilization of MOBQ4 plasmids. *Frontiers in Microbiology*, 10: 2557. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02557>
- Garud, N. R., Good, B. H., Hallatschek, O., y Pollard, K. S. (2019). Evolutionary dynamics of bacteria in the gut microbiome within and across hosts. *PLOS Biology*, 17(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000102>

- Gephart, J., Gephart, J. A., Bejarano, R. A., Gorospe, K., Godwin, A., Golden, C. D., y Troell, M. (2023). *Globalization of wild capture and farmed aquatic foods*. Authorea Preprints. <https://doi.org/10.22541/essoar.167590829.99780929/v1>
- Given, C., Penttinen, R., y Jalasvuori, M. (2022). Plasmid viability depends on the ecological setting of hosts within a multiplasmid community. *Microbiology Spectrum*, 10(2): e00133-22. <https://doi.org/10.1128/spectrum.00133-22>
- González de Aledo, M., Blasco, L., Lopez, M., Ortiz-Cartagena, C., Bleriot, I., Pacios, O., Hernández-García, M., Cantón, R., y Tomas, M. (2023). Prophage identification and molecular analysis in the genomes of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from critical care patients. *mSphere*, 8: e00128-23. <https://doi.org/10.1128/msphere.00128-23>
- González-Gómez, J. P., Soto-Rodríguez, S., López-Cuevas, O., Castro-Del Campo, N., Chaidez, C., y Gomez-Gil, B. (2020). Phylogenomic analysis supports two possible origins for Latin American strains of *Vibrio parahaemolyticus* associated with acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND). *Current Microbiology*, 77(12): 3851-3860. <https://doi.org/10.1007/s00284-020-02214-w>
- Haifa-Haryani, W. O., Amatul-Samahah, M. A., Azzam-Sayuti, M., Chin, Y. K., Zamri-Saad, M., Natrah, I., y Ina-Salwany, M. Y. (2022). Prevalence, antibiotics resistance and plasmid profiling of *Vibrio* sp. isolated from cultured shrimp in Peninsular Malaysia. *Microorganisms*, 10(9): 1851. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10091851>
- Han, J. E., Mohny, L. L., Tang, K. F., Pantoja, C. R., y Lightner, D. V. (2015). 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>
- Haque, Z. F., Islam, M., Sabuj, A. A. M., Pundit, A., Sarkar, A. K., Hossain, M., y Saha, S. (2023). Molecular detection and antibiotic resistance of *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, and *Vibrio alginolyticus* from shrimp (*Penaeus monodon*) and shrimp environments in Bangladesh. *Aquaculture Research*, 2023. <https://doi.org/10.1155/2023/5436552>
- Hashimoto, Y., Kurushima, J., Nomura, T., Tanimoto, K., Tamai, K., Yanagisawa, H., y Tomita, H. (2018). Dissemination and genetic analysis of the stealthy vanB gene clusters of *Enterococcus faecium* clinical isolates in Japan. *BMC Microbiology*, 18(1): 1-12. <https://doi.org/10.1186/s12866-018-1342-1>
- Hawkey, J. (2017). Dynamics of insertion sequences in bacterial genomes. Doctoral dissertation. Universidad de Birmingham, England. Recuperado de <http://hdl.handle.net/11343/191726>
- Hossain, Z. Z., Farhana, I., Tulsiani, S. M., Begum, A., y Jensen, P. K. M. (2018). Transmission and toxigenic potential of *Vibrio cholerae* in Hilsha fish (*Tenualosa ilisha*) for human consumption in Bangladesh. *Frontiers in Microbiology*, 9: 222. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00222>
- Jerez, S. A., Plaza, N., Bravo, V., Urrutia, I. M., y Blondel, C. J. (2023). *Vibrio* type III secretion system 2 is not restricted to the *Vibrionaceae* and encodes differentially distributed repertoires of effector proteins. *Microbial Genomics*, 9(4): 000973. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000973>
- Johnson, T. J., Shepard, S. M., Rivet, B., Danzeisen, J. L., y Carattoli, A. (2011). Comparative genomics and phylogeny of the IncI1 plasmids: A common plasmid type among porcine enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Plasmid*, 66(3): 144-151. <https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2011.07.003>

- Jun, J. W., Shin, T. H., Kim, J. H., Shin, S. P., Han, J. E., Heo, G. J., De Zoysa, M., Shin, G. W., Chai, J. Y., Park, S. C. (2014). Bacteriophage Therapy of a *Vibrio parahaemolyticus* infection caused by a multiple-antibiotic-resistant O3 pandemic clinical strain. *The Journal of Infectious Diseases*, 210(1): 72-78. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiu059>
- Karunasagar, I., Pai, R., Malathi, G. R., y Karunasagar, I. (1994). Mass mortality of *Penaeus monodon* larvae due to antibiotic-resistant *Vibrio harveyi* infection. *Aquaculture*, 128(3-4): 203-209. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(94\)90309-3](https://doi.org/10.1016/0044-8486(94)90309-3)
- Kaviani, R., Pouladi, I., Niakan, M., y Mirnejad, R. (2020). Molecular detection of *Adefg* efflux pump genes and their contribution to antibiotic resistance in *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. *Reports of Biochemistry y Molecular Biology*, 8(4): 413-418. PMID: 32582800; PMCID: PMC7275827.
- Konstantinidis, K. T., y Tiedje, J. M. (2004). Trends between gene content and genome size in prokaryotic species with larger genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(9): 3160-3165. <https://doi.org/10.1073/pnas.0308653100>
- Kumar, V., Roy, S., Behera, B. K., Bossier, P., y 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>
- Laganà, P., Caruso, G., Minutoli, E., Zaccone, R., y Delia, S. (2011). Susceptibility to antibiotics of *Vibrio* sp. and *Photobacterium damsela* ssp. *piscicida* strains isolated from Italian aquaculture farms. *New Microbiologica*, 34(1): 53-63. Corpus ID: 6404960.
- Le Roux, F., y Blokesch, M. (2018). Eco-evolutionary dynamics linked to horizontal gene transfer in Vibrios. *Annual Review of Microbiology*, 72: 89-110. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-090817-062148>
- Lee, C. T., Chen, I. T., Yang, Y. T., Ko, T. P., Huang, Y. T., Huang, J. Y., Huang, M. F., Lin, S. J., Chen, C. Y., Lin, S. S., Lightner, D. V., Wang, H. C., Wang, A. H.-J., Hor, L. I., y Lo, C. F. (2015). The opportunistic marine pathogen *Vibrio parahaemolyticus* becomes virulent by acquiring a plasmid that expresses a deadly toxin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(34): 10798-10803. <https://doi.org/10.1073/pnas.1503129112>
- Letchumanan, V., Ab Mutalib, N. S., Wong, S. H., Chan, K. G., y Lee, L. H. (2019). Determination of antibiotic resistance patterns of *Vibrio parahaemolyticus* from shrimp and shellfish in Selangor, Malaysia. *Progress in Microbes y Molecular Biology*, 2(1): 10.36877/pmmb.a0000019
- Lin, Z., Deng, Y., Su, W., Wang, Q., Chen, H., Sun, Y., y Feng, J. (2023). Prevalence and distribution of antibiotic resistance in the water environment of sea bass (*Lateolabrax maculatus*) breeding area in spring in South China. *Frontiers in Marine Science*, 10: 1139641. <https://doi.org/10.3389/fmars.2023.1139641>
- Lipszyc, A., Szuplewska, M., y Bartosik, D. (2022). How do transposable elements activate expression of transcriptionally silent antibiotic resistance genes. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(15): 8063. <https://doi.org/10.3390/ijms23158063>
- Liu, W., Ou, P., Tian, F., Liao, J., Ma, Y., Wang, J., y Jin, X. (2023). Anti-*Vibrio parahaemolyticus* compounds from *Streptomyces parvus* based on pan-genome and subtractive proteomics. *Frontiers in Microbiology*, 14: 1218176. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1218176>
- Lopatkin, A. J., Meredith, H. R., Srimani, J. K., Pfeiffer, C., Durrett, R., y You, L. (2017). Persistence and reversal of plasmid-mediated antibiotic resistance. *Nature Communications*, 8(1): 1-11. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00318-9>
- López-Téllez, N. A., Corbalá-Bermejo, J. A., Bustamante-Unzueta, M. L., Silva-Ledesma, L. P., Vidal-Martínez, V. M., y Rodríguez-Canul, R. (2020). History, impact, and status of infectious diseases of the Pacific white shrimp *Penaeus vannamei* (Bonne, 1831)

- cultivated in Mexico. *Journal of the World Aquaculture Society*, 51(2): 334-345. <https://doi.org/10.1111/jwas.12662>
- Low, W. W., Seddon, C., Beis, K., y Frankel, G. (2023). The interaction of the F-like plasmid-encoded TraN isoforms with their cognate outer membrane receptors. *Journal of Bacteriology*, 205(4): e0006123. <https://doi.org/10.1128/jb.00061-23>
- Marqu ez Ortíz, R. A. (2017). Análisis de los elementos genéticos involucrados en la movilización del gen blaNDM-1 en bacterias multirresistentes colombianas. Tesis doctoral. Universidad Nacional de Colombia Sede Bogotá Institutos Interfacultades Instituto de Biotecnología. Colombia.
- Mejías, A. V., y Navarro, N. P. (2014). Síndrome de la Mortalidad Temprana (EMS/AHPNS) en camarones cultivados: Una revisión. *Repertorio Científico*, 17(1): 25-30. Recuperado a partir de <https://revistas.uned.ac.cr/index.php/repertorio/article/view/2563>
- Mell, J. C., Sinha, S., y Redfield, R. J. (2022). Transformation in prokaryotes. En *Reference Module in Life Sciences*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822563-9.00079-2>
- Michaelis, C., y Grohmann, E. (2023). Horizontal gene transfer of antibiotic resistance genes in biofilms. *Antibiotics*, 12(2): 328. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12020328>
- Miranda, C. D., Concha, C., Godoy, F. A., y Lee, M. R. (2022). Aquatic environments as hotspots of transferable low-level quinolone resistance and their potential contribution to high-level quinolone resistance. *Antibiotics*, 11(11): 1487. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11111487>
- Molina-Aja, A., Garcia-Gasca, A., Abreu-Grobois, A., Bolan-Mejia, C., Roque, A., y Gomez-Gil, B. (2002). Plasmid profiling and antibiotic resistance of *Vibrio* strains isolated from cultured penaeid shrimp. *FEMS Microbiology Letters*, 213(1): 7-12. 10.1111/j.1574-6968.2002.tb11278.x.
- Molina-González, D., Alonso-Calleja, C., Alonso-Hernando, A., y Capita, R. (2014). Effect of sub-lethal concentrations of biocides on the susceptibility to antibiotics of multi-drug resistant *Salmonella enterica* strains. *Food Control*, 40: 329-334. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.11.046>
- Morris, J. M., Mercoulia, K., Valcanis, M., Gorrie, C., Sherry, N. L., y Howden, B. (2023). Hidden resistances: How routine whole-genome sequencing uncovered an otherwise undetected *blaNDM-1* gene in *Vibrio alginolyticus* from imported seafood. *Microbiology Spectrum*, 11(11): e04176-22. <https://doi.org/10.1128/spectrum.04176-22>
- Munita, J. M., y Arias, C. A. (2016). Mechanisms of antibiotic resistance. *Microbiology Spectrum*, 4(2). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015>
- Muthukrishnan, S., Defoirdt, T., Shariff, M., Ina-Salwany, M. Y., Md Yusoff, F., y Natrah, I. (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*. <https://doi.org/10.1101/2019.12.20.884320>
- Nava-Soberanes, E., Mendieta-Condado, E. R., Garc s-Ayala, F., Araiza-Rodríguez, A., Aguilera-Perez, P., Alfaro-López, A., y Buelna-Romero, A. G. (2021). Draft genome sequence of first *Vibrio diabolus* in Mexico strain InDRE-D1-M1, an emergent threat. *The Journal of Infection in Developing Countries*, 15(11): 1750-1754. <https://doi.org/10.3855/jidc.13233>
- Nepal, R., Houtak, G., Bouras, G., Ramezanzpour, M., Feizi, S., Shaghayegh, G., Shearwin, K., Psaltis, A. J., Wormald, P.-J., y Vreugde, S. (2023). Prophage acquisition by *Staphylococcus aureus* contributes to the expansion of Staphylococcal immune evasion. *bioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2023.04.27.538627>
- Nguyen, D. A. L., Cheng, L. W., Wang, P. C., y Chen, S. C. (2023). Phenotypic, phylogenetic analysis and pathogenic detection of *Vibrio parahaemolyticus* in farmed *Penaeus*

- vannamei* in Taiwan. *Taiwan Veterinary Journal*, 48(1-2): 35-44. <https://doi.org/10.1142/S1682648523500026>
- Nhung, N. T., Cuong, N. V., Campbell, J., Hoa, N. T., Bryant, J. E., Truc, V. N. T., Kiet, B. T., Jombart, T., Trung, N. V., Hien, V. B., Thwaites, G., Baker, S., y Carrique-Mas, J. (2018). High levels of antimicrobial resistance among *Escherichia coli* isolates from livestock farms and synanthropic rats and shrews in the Mekong Delta of Vietnam. *Applied and Environmental Microbiology*, 84(8). <https://doi.org/10.1128/AEM.03366-14>
- Noguera-Muñoz, F. A., García García, B., Ponce-Palafox, J. T., Wicab-Gutierrez, O., Castillo-Vargasmachuca, S. G., y García García, J. (2021). Sustainability assessment of white shrimp (*Penaeus vannamei*) production in super-intensive system in the municipality of San Blas, Nayarit, Mexico. *Water*, 13(3): 304. <https://doi.org/10.3390/w13030304>
- Nonaka, L., Masuda, M., y Yano, H. (2022). Atypical integrative element with strand-biased circularization activity assists interspecies antimicrobial resistance gene transfer from *Vibrio alfacensis*. *PLOS One*, 17(8): e0271627. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0271627>
- Norfolk WA, Lipp EK. (2023). Use and evaluation of a pES213-derived plasmid for the constitutive expression of gfp protein in pathogenic vibrios: a tagging tool for in vitro studies. *Microbiology Spectrum*, 11(1): e02490-22. <https://doi.org/10.1128/spectrum.02490-22>
- Olasz, F., Szabó, M., Veress, A., Bibó, M., y Kiss, J. (2022). The dynamic network of IS 30 transposition pathways. *PLOS One*, 17(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0271414>
- Orel, N., Fadeev, E., Herndl, G. J., Turk, V., y Tinta, T. (2023). Comparative whole-genome analysis of novel marine *Vibrio campbellii* from pure and non-axenic cultures reveals a unique plasmid. *Research Square*. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-2513960/v1>
- Owaied, H. Q., y Jabur, S. G. (2022). Molecular research of the difference between chromosome and plasmid at harboring some virulence and antibiotic resistance genes in *P. Mirabilis*. *The Egyptian Journal of Hospital Medicine*, 89(2): 7950-7957. <https://doi.org/10.21608/EJHM.2022.277399>
- Parthasarathy, S., Das, S. C., Kumar, A., Chowdhury, G., Miyoshi, S. I., Dutta, S., y Mukhopadhyay, A. K. (2021). Molecular characterization and antibiotic resistance of *Vibrio parahaemolyticus* from Indian oyster and their probable implication in food chain. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 37(8): 145. 10.1007/s11274-021-03113-3.
- Partridge, S. R., Kwong, S. M., Firth, N., y Jensen, S. O. (2018). Mobile genetic elements associated with antimicrobial resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 31(4): 10-1128. <https://doi.org/10.1128/cmr.00088-17>
- Patel, S. J., y Saiman, L. (2010). Antibiotic resistance in neonatal intensive care unit pathogens: mechanisms, clinical impact, and prevention including antibiotic stewardship. *Clinics in Perinatology*, 37(3): 547-563. 10.1016/j.clp.2010.06.004.
- Peng, Y., Han, X., Xu, P., y Tao, F. (2020). Next-generation microbial workhorses: Comparative genomic analysis of fast-growing *Vibrio* strains reveals their biotechnological potential. *Biotechnology Journal*, 15(5). <https://doi.org/10.1002/biot.201900499>
- Pérez-Duque, A., Gonzalez-Muñoz, A., Arboleda-Valencia, J., Vivas-Aguas, L. J., Córdoba-Meza, T., Rodríguez-Rey, G. T., Díaz-Guevara, P., Martínez-Urtaza, J., y Wiesner-Reyes, M. (2021). Comparative genomics of clinical and environmental isolates of *Vibrio* sp. of Colombia: Implications of traits associated with virulence and resistance. *Pathogens*, 10(12): 1605. <https://doi.org/10.3390/pathogens10121605>

- Plaza, N., Castillo, D., Pérez-Reytor, D., Higuera, G., García, K., Bastías, R. (2018). Bacteriophages in the control of pathogenic vibrios. *Electronic Journal of Biotechnology*, 31: 24-33. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2017.10.012>
- Prabina, D., Swaminathan, T. R., Mohandas, S. P., Anjana, J. C., Manjusha, K., y Preena, P. G. (2023). Investigation of antibiotic-resistant vibrios associated with shrimp (*Penaeus vannamei*) farms. *Archives of Microbiology*, 205(1): 41. 10.1007/s00203-022-03376-w.
- Prjibelski, A., Antipov, D., Meleshko, D., Lapidus, A., y Korobeynikov, A. (2020). Using SPAdes de novo assembler. *Current Protocols in Bioinformatics*, 70(1): e102. <https://doi.org/10.1002/cpbi.102>
- Raharjo, H. M., Budiyansah, H., Mursalim, M. F., Chokmangmeepisarn, P., Sakulworakan, R., Madyod, S., Sewaka, M., Sonthi, M., Debnath, P. P., Elayaraja, S., Rung-ruangkijkrui, T., Dong, H. T., y Rodkhum, C. (2022). Distribution of Vibrionaceae in farmed Asian sea bass, *Lates calcarifer* in Thailand and their high prevalence of antimicrobial resistance. *Journal of Fish Diseases*, 45: 1355-1371. <https://doi.org/10.1111/jfd.13667>
- Rao, G. S. (2023). Therapeutic rationalization of antibacterial drug doses in aquaculture by using pharmacokinetic (PK)–pharmacodynamic (PD) indices to contain the antimicrobial resistance. En *Handbook on Antimicrobial Resistance*. Springer, Singapore. pp. 714-727. [https://doi.org/10.1007/978-981-19-9279-7\\_34](https://doi.org/10.1007/978-981-19-9279-7_34)
- Rodriguez-Grande, J., Garcillan-Barcia, M. D. P., de la Cruz, F., y Fernandez, R. (2023). Fundamental parameters governing the transmission of conjugative plasmids. *bioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2023.07.11.548640>
- Rui, Y., y Qiu, G. (2023). Drug Susceptibility Test and Analysis of Quinolone Resistance Genes in *Mycoplasma hyopneumoniae* Vaccine Strains and Field Isolates from China. *Infection and Drug Resistance*, 2075-2087. <https://doi.org/10.2147/IDR.S407579>
- Ryan, M. E., Damke, P. P., y Shaffer, C. L. (2023). DNA transport through the dynamic type IV secretion system. *Infection and Immunity*, 91(7): e00436-22. <https://doi.org/10.1128/iai.00436-22>
- Saad El-Deen, A. G., y Elkamel, A. (2015). Clinical and experimental study on vibriosis in ornamental fish. *Assiut Veterinary Medical Journal*, 61(146-3): 147-153. <https://doi.org/10.21608/avmj.2015.170227>
- Samuelsen, O. B., Bergh, Ø., y Ervik, A. (2003). Pharmacokinetics of florfenicol in cod *Gadus morhua* and in vitro antibacterial activity against *Vibrio anguillarum*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 56(2): 127-133. <https://doi.org/10.3354/dao056127>
- San Millan, A., Santos-Lopez, A., Ortega-Huedo, R., Bernabe-Balas, C., Kennedy, S. P., y Gonzalez-Zorn, B. (2015). Small-plasmid-mediated antibiotic resistance is enhanced by increases in plasmid copy number and bacterial fitness. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59(6): 3335-3341. <https://doi.org/10.1128/aac.00235-15>
- Santiago, M. L., Espinosa, A., y Bermúdez, M. del C. (2009). Uso de antibióticos en la camaricultura. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 40(3): 22-32.
- Shala-Lawrence, A., Bragagnolo, N., Nowroozi-Dayeni, R., Kheyson, S., y Audette, G. F. (2018). The interaction of TraW and TrbC is required to facilitate conjugation in F-like plasmids. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 503(4): 2386-2392. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.06.166>
- Slack, J. (2023). Genes as markers. In *Genes: A very short introduction* (2nd ed., Very Short Introductions). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/actrade/9780192856708.003.0004>
- Sobecky, P.A., Hazen, T.H. (2009). Horizontal gene transfer and mobile genetic elements in marine systems. In: Horizontal Gene Transfer. *Methods in Molecular Biology*. Humana Press. 532. [https://doi.org/10.1007/978-1-60327-853-9\\_25](https://doi.org/10.1007/978-1-60327-853-9_25)

- Solís, M. O., Velázquez, E. V., García, F. E. P., y Velázquez, L. A. (2021). La Necrosis Hepatopancreatitis Aguda que afecta al cultivo de camarones peneidos en México. *Espacio I+ D, Innovación más desarrollo*, 10(28). <https://doi.org/10.31644/IMASD.28.2021.a07>
- Sorokina, J., Sokolova, I., Rybolovlev, I., Shevlyagina, N., Troitskiy, V., Zhukhovitsky, V., y Belyi, Y. (2021). VirB4-and VirD4-like ATPases, components of a putative type 4C secretion system in *Clostridioides difficile*. *Journal of Bacteriology*, 203(21): e00385-21. <https://doi.org/10.1128/JB.00385-21>
- Soto-Rodriguez, S. A., Gomez-Gil, B., Lozano-Olvera, R., Aguilar-Rendón, K. G., y González-Gómez, J. P. (2023). Identification of new *Vibrio campbellii* strains harboring the pVA1 plasmid isolated from *Penaeus vannamei* postlarvae affected by outbreaks of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in Mexico. *Aquaculture*, 579: 740221. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2023.740221>
- Soto-Rodriguez, S. A., Gomez-Gil, B., Lozano-Olvera, R., Betancourt-Lozano, M., y Morales-Covarrubias, M. S. (2015). Field and experimental evidence of *Vibrio parahaemolyticus* as the causative agent of acute hepatopancreatic necrosis disease of cultured shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in northwestern Mexico. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(3): 146-153. <https://doi.org/10.1128/AEM.03610-14>
- Soto-Rodriguez, S. A., Lozano-Olvera, R., Ramos-Clamont Montfort, G., Zenteno, E., Sánchez-Salgado, J. L., Vibanco-Pérez, N., y Aguilar Rendón, 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>
- Stentiford, G. D., Neil, D. M., Peeler, E. J., Shields, J. D., Small, H. J., Flegel, T. W., Vlak, J. M., Jones, B., Morado, F., Moss, S., Lotz, J., Bartholomay, L., Behringer, D. C., Hauton, C., y Lightner, D. V. (2012). Disease will limit future food supply from the global crustacean fishery and aquaculture sectors. *Journal of Invertebrate Pathology*, 110(2):, 141-157. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2012.03.013>.
- Stephen, J., Mukherjee, S., Lekshmi, M., y Kumar, S. H. (2023). Diseases and antimicrobial use in aquaculture. In: *Handbook on antimicrobial resistance: Current status, trends in detection and mitigation measures*. Springer Nature. Singapore. pp. 263-28. [10.1007/978-981-19-9279-7\\_15](https://doi.org/10.1007/978-981-19-9279-7_15)
- Sullivan, M. J., Petty, N., y Beatson, S. A. (2011). Easyfig: A genome comparison visualizer. *Microbiology Research*, 27(7): 1009–1010. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr039> \
- Takeuchi, N., Hamada-Zhu, S., y Suzuki, H. (2023). Prophages and plasmids can display opposite trends in the types of accessory genes they carry. *Proceedings of the Royal Society B*, 290 (2001): 20231088. <https://doi.org/10.1098/rspb.2023.1088>
- Tamae, C., Liu, A., Kim, K., Sitz, D., Hong, J., Becket, E., ... y Miller, J. H. (2008). Determination of antibiotic hypersensitivity among 4,000 single-gene-knockout mutants of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 190(17): 5981-5988.
- Tang, K. F. J., Tran, L. H., Lightner, D. V., y Pham, H. Q. (2015). Development of a nested PCR assay for detection of the shrimp pathogen *Vibrio parahaemolyticus*. *Aquaculture*, 435: 334-339.
- Tang, K. F. J., y Bondad-Reantaso, M. G. (2019). Impacts of acute hepatopancreatic necrosis disease on commercial shrimp aquaculture. *Rev. Sci. Tech.*, 38: 477-490. <https://doi.org/10.20506/rst.38.2.2999>
- Tang, K. F. J., y Bondad-Reantaso, M. G. (2019). Impacts of acute hepatopancreatic necrosis disease on commercial shrimp aquaculture. *Rev. Sci. Tech*, 38: 477-490.



- Tatusova, T., DiCuccio, M., Badretdin, A., Chetvernin, V., Nawrocki, E.P., Zaslavsky, L., Lomsadze, A., Pruitt, K.D., Borodovsky, M., y Ostell, J. (2016). NCBI prokaryotic genome annotation pipeline. *Nucleic Acids Research*, 44(14): 6614-6624. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw569>
- Tindall, B. J., Rosselló-Móra, R., Busse, H., Ludwig, W., y Kämpfer, P. (2010). Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60(1): 249-266. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.016949-0>
- Tokuda, M., Yuki, M., Ohkuma, M., Kimbara, K., Suzuki, H., y Shintani, M. (2023). Transconjugant range of PromA plasmids in microbial communities is predicted by sequence similarity with the bacterial host chromosome. *Microbial Genomics*, 9(6): 001043. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.001043>
- Torres Corral, Y. (2022). Diagnosis, prevention and control of emerging and re-emerging diseases in aquaculture. Tesis Doctoral. Universidad de Santiago de Compostela. España.
- Turner, J. W., Tallman, J. J., Macias, A., Pinnell, L. J., Elledge, N. C., Azadani, D. N., Nilsson, W. B., Paranjpye, R. N., Armbrust, E. V., y Strom, M. S. (2018). Comparative genomic analysis of *Vibrio diabolus* and six taxonomic synonyms: A first look at the distribution and diversity of the expanded species. *Frontiers in Microbiology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01893>
- Uyaguari, M., Key, P., Moore, J., Jackson, K., y Scott, G. (2009). Acute effects of the antibiotic oxytetracycline on the bacterial community of the grass shrimp, *Palaemonetes pugio*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 28(12): 2715-2724. <https://doi.org/10.1897/08-514.1>
- Vandeputte, M., Coppens, S., Bossier, P., Vereecke, N., y Vanrompay, D. (2024). Genomic mining of *Vibrio parahaemolyticus* highlights prevalence of antimicrobial resistance genes and new genetic markers associated with AHPND and tdh+/trh+ genotypes. *BMC genomics*, 25(1): 178. <https://doi.org/10.1186/s12864-024-10093-9>
- Varela-Mejías, A., y Alfaro-Mora, R. (2018). Revisión sobre aspectos farmacológicos a considerar para el uso de antibióticos en la camaronicultura. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 29(1): 1-14. <https://doi.org/10.15381/rivep.v29i1.14186>
- Vicente, A., Taengphu, S., Hung, A. L., Mora, C. M., Dong, H. T., y Senapin, S. (2019). Detection of *Vibrio campbellii* and *V. parahaemolyticus* carrying full-length pirABVp but only *V. campbellii* produces PirVp toxins. *Aquaculture*, 502: 734708. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734708>
- Victorio-De Los Santos, M., Vibanco-Pérez, N., Soto-Rodríguez, S., Pereyra, A., Zenteno, E., y Cano-Sánchez, P. (2020). The B subunit of PirABvp toxin secreted from *Vibrio parahaemolyticus* causing AHPND is an amino sugar specific lectin. *Pathogens*, 9(3): 182. <https://doi.org/10.3390/pathogens9030182>
- Vilela, F. P., y Falcão, J. P. (2021). Analysis of the antimicrobial resistance gene frequency in whole-genome sequenced *Vibrio* from Latin American countries. *Journal of Medical Microbiology*, 70(9): 001428. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.001428>
- Walas, N., Slown, S., Amato, H. K., Lloyd, T., Bender, M., Varghese, V., y Graham, J. P. (2023). The role of plasmids in carbapenem-resistant *E. coli* in Alameda County, California. *BMC Microbiology*, 23(1): 147. <https://doi.org/10.1186/s12866-023-02900-2>
- Wang, M., Jiang, L., Wei, J., Zhu, H., Zhang, J., Liu, Z., Zhang, W., He, X., Liu, Y., Li, R., Xiao, X., Sun, Y., Zeng, Z., y Wang, Z. (2022). Similarities of p1-like phage plasmids and their role in the dissemination of blactx-m-55. *Microbiology Spectrum*, 10: e01410-22. <https://doi.org/10.1128/spectrum.01410-22>



- Wang, Q., Wei, S., Silva, A. F., y Madsen, J. S. (2023). Cooperative antibiotic resistance facilitates horizontal gene transfer. *The ISME Journal*, 17(6): 846-854. <https://doi.org/10.1038/s41396-023-01393-1>
- Wang, R., van Dorp, L., Shaw, L. P., Bradley, P., Wang, Q., Wang, X., Jin, L., Zhang, Q., Liu, Y., Rieux, A., Dorai-Schneiders, T., Weinert, L. A., Iqbal, Z., Didelot, X., Wang, H., y Balloux, F. (2018). The global distribution and spread of the mobilized colistin resistance gene *mcr-1*. *Nature Communications*, 9: 1179. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03205-z>
- Wang, T., Yao, L., Qu, M., Wang, L., Li, F., Tan, Z., Wang, P., y Jiang, Y. (2022). Whole genome sequencing and antimicrobial resistance analysis of *Vibrio parahaemolyticus* Vp2015094 carrying an antimicrobial-resistant plasmid. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 30: 47-49. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2022.05.025>
- Wang, Y., Guo, M., Yang, N., Guan, Z., Wu, H., Ullah, N., y Song, C. (2023). Phylogenetic relationships among tnpb-containing mobile elements in six bacterial species. *Genes*, 14(2): 523. <https://doi.org/10.3390/genes14020523>
- Waters, M. E., y Handy, M. K. (1969). Effect of nitrofurans and chlortetracycline on microorganisms associated with shrimp. *Applied Microbiology*, 17(1): 21-25. <https://doi.org/10.1128/am.17.1.21-25.1969>
- Wedel, E., Bernabe-Balas, C., Ares-Arroyo, M., Montero, N., Santos-Lopez, A., Mazel, D., y Gonzalez-Zorn, B. (2023). Insertion sequences determine plasmid adaptation to new bacterial hosts. *mBio*, 14(3). e03158-22. <https://doi.org/10.1128/mbio.03158-22>
- Wozniak, R. A. F., Fouts, D. E., Spagnoletti, M., Colombo, M. M., Ceccarelli, D., Garriss, G., y Blokesch, M. (2021). Comparative ICE genomics: insights into the evolution of the SXT/R391 family of ICEs. *Journal of Bacteriology*, 203(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000786>
- Xiao, J., Liu, L., Ke, Y., Li, X., Liu, Y., Pan, Y., Yan, S., y Wang, Y. (2017). Shrimp AHPND-causing plasmids encoding the PirAB toxins as mediated by *pirAB*-Tn903 are prevalent in various *Vibrio* species. *Scientific Reports*, 7: 42177. <https://doi.org/10.1038/srep42177>
- Xu, Y., Zheng, Z., Ye, L., Chan, E. W. C., y Chen, S. (2023). Identification and genetic characterization of conjugative plasmids encoding coresistance to ciprofloxacin and cephalosporin in foodborne *Vibrio* spp. *Microbiology Spectrum*, 11(4). e01032-23. <https://doi.org/10.1128/spectrum.01032-23>
- Yang, C., Song, G., y Lim, W. (2020). A review of the toxicity in fish exposed to antibiotics. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology y Pharmacology*, 237: 108840. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2020.108840>
- Yasin, I. S. M., Mohamad, A., y Azzam-Sayuti, M. (2023). Control of fish diseases using antibiotics and other antimicrobial agents. In *Recent advances in aquaculture microbial technology*. Academic Press, England, pp. 127-152. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-90261-8.00010-9>
- Yates, C. R., Nguyen, A., Liao, J., y Cheng, R. A. (2024). What's on a prophage: Analysis of *Salmonella* spp. prophages identifies a diverse range of cargo with multiple virulence- and metabolism-associated functions. *mSphere*, 9(6). <https://doi.org/10.1128/msphere.00031-24>
- Ye, L., Zheng, Z., Xu, Y., Yang, C., Heng, H., Li, F., y Chen, S. (2023). Prevalence and genetic basis of tetracycline resistance in *Vibrio parahaemolyticus* isolates recovered from food products in Shenzhen, China during 2013 to 2021. *Science of The Total Environment*, 902: 166026. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.166026>
- Yu, L. H., Teh, C. S. J., Yap, K. P., Ung, E. H., y Thong, K. L. (2020). Comparative genomic provides insight into the virulence and genetic diversity of *Vibrio parahaemolyticus*

- associated with shrimp acute hepatopancreatic necrosis disease. *Infection genetics and evolution*, 83: 104347. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104347>
- Yu, Y., Tang, M., Wang, Y., Liao, M., Wang, C., Rong, X. y Zhang, Z. (2023). Virulence and antimicrobial resistance characteristics assessment of *Vibrio* isolated from shrimp (*Penaeus vannamei*) breeding system in south China. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 252: 114615. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2023.114615>
- Yudiati, E., y Azhar, N. (2021). Antimicrobial susceptibility and minimum inhibition concentration of *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus*, and *Vibrio harveyi* isolated from a white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) pond. IOP Conference Series: *Earth and Environmental Science*, 763(1): 012025. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/763/1/012025>
- Zakaria, D., Matsuda, S., Iida, T., Hayashi, T., y Arita, M. (2023). Genome analysis identifies a novel type III secretion system (T3SS) category in *Vibrio* species. *Microorganisms*, 11(2): 290. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11020290>
- Zhang, F., y Cheng, W. (2022). The mechanism of bacterial resistance and potential bacteriostatic strategies. *Antibiotics*, 11(9): 1215. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11091215>
- Zhang, F., Zhang, J., Lin, G., Chen, X., Huang, H., Xu, C., y Chi, H. (2024). Antibiotic resistance and genetic profiles of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from farmed Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in Ningde regions. *Microorganisms*, 12(1): 152. <https://doi.org/10.3390/microorganisms12010152>
- Zhang, L., y Orth, K. (2013). Virulence determinants for *Vibrio parahaemolyticus* infection. *Current Opinion in Microbiology*, 16(1): 70-77. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2013.02.002>
- Zhang, L., y Orth, K. (2013). Virulence determinants for *Vibrio parahaemolyticus* infection. *Current Opinion in Microbiology*, 16(1): 70-77. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2013.02.002>
- Zhang, Y. B., Li, Y., y Sun, X. L. (2011). Antibiotic resistance of bacteria isolated from shrimp hatcheries and cultural ponds on Donghai Island, China. *Marine Pollution Bulletin*, 62(11): 2299-2307. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2011.08.048>
- Zhang, Z., y Saier Jr, M. H. (2009). A novel mechanism of transposon-mediated gene activation. *PLOS genetics*, 5(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000689>
- Zhu, Y., Wang, C., Schwarz, S., Liu, W., Yang, Q., Luan, T., Wang, L., Liu, S., y Zhang, W. (2021). Identification of a novel tetracycline resistance gene, *tet(63)*, located on a multiresistance plasmid from *Staphylococcus aureus*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 76(3): 576–581. <https://doi.org/10.1093/jac/dkaa485>