



**Centro de Investigación en Alimentos y
Desarrollo, A.C.**

**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE BACTERIÓFAGOS
LÍTICOS PARA EL CONTROL DE *Vibrio parahaemolyticus*
CAUSANTE DE AHPND**

Por:

Alma Karen Orozco Ochoa

TESIS APROBADA POR LA

COORDINACIÓN DE ASEGURAMIENTO DE CALIDAD Y APROVECHAMIENTO
SUSTENTABLE DE RECURSOS NATURALES

Como requisito parcial para obtener el grado de

MAESTRÍA EN CIENCIAS

APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Alma Karen Orozco Ochoa la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias.



Dr. Cristóbal Chaidez Quiroz
Director de Tesis



Dra. Nohelia Castro del Campo
Integrante del comité de tesis



Dr. Bruno Gómez Gil Rodríguez Sala
Integrante del comité de tesis



Dr. Juan Daniel Lira Morales
Integrante del comité de tesis

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en la tesis “Aislamiento y Caracterización de Bacteriófagos Líticos para el Control de *Vibrio parahaemolyticus* Causante de AHPND” es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial de la autora Alma Karen Orozco Ochoa, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita de quien ocupe la titularidad de la Dirección General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del director(a) de tesis.



CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN
ALIMENTACIÓN Y DESARROLLO, A.C.
Coordinación de Programas Académicos



Dr. Pablo Wong González
Director General

AGRADECIMIENTOS

Gracias a CONACYT por el apoyo prestado durante mi posgrado.

Gracias al CIAD por abrirme sus puertas.

Gracias al equipo LANIIA por su apoyo en mi formación, y especialmente al Dr. Cristóbal Chaidez por darme una oportunidad.

A mis amigos de generación, por todo el apoyo brindado; un especial agradecimiento a Jean Pierre González-Gómez, Berenice González-Torres y Jesús Alejandro Osuna-García.

DEDICATORIA

A mis padres, Victoriano y Alma. Por enseñarme a romper las reglas.

A mis hermanos, Victor y Omar. No sería yo sin ustedes.

Este trabajo está dedicado a la memoria de mi tío Luis, que en paz descanse.

CONTENIDO

APROBACIÓN	2
DECLARACIÓN INSTITUCIONAL	3
AGRADECIMIENTOS	4
DEDICATORIA	5
CONTENIDO	6
LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE TABLAS	11
RESUMEN	12
ABSTRACT	13
1. INTRODUCCIÓN	14
2. ANTECEDENTES	16
2.1. Camaronicultura Mundial y Mexicana.....	16
2.1.1. Problemas y Desafíos del Cultivo de Camarón.....	17
2.1.2. Manejo de Enfermedades en la Camaronicultura Mexicana.....	17
2.1.3. Producción Mundial del Camarón.....	19
2.1.3.1. Asia.....	19
2.1.3.2. América Latina: México.....	21
2.1.4. Comercio Internacional del Camarón.....	21
2.1.4.1. Unión Europea (Cosmopolita) y EE. UU.....	22
2.1.4.2. Latinoamérica: México.....	22
2.2. Generalidades. Características del Género <i>Vibrio</i>	23
2.2.1. <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	23
2.2.1.1. Diferentes características de la especie <i>Vibrio parahaemolyticus</i> : genéticas, ecológicas, y bioquímicas.....	26
2.2.1.2. Infecciones asociadas a <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	26
2.2.1.3. Epidemiología de <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	27
2.2.1.4. Brotes de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> asociados al consumo de mariscos.....	27
2.3. La Naturaleza de la Enfermedad de la Necrosis Aguda del Hepatopáncreas (AHPND).....	29
2.3.1. <i>Vibrio parahaemolyticus</i> Identificado como Agente Causal de AHPND.....	30
2.3.1.1. Posibles orígenes de cepas americanas de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> asociadas con AHPND.....	32
2.3.2. Estado Actual de la AHPND.....	32
2.3.2.1. Estrategias de manejo para la prevención y el control de las enfermedades en acuicultura.....	34
2.3.3. Desarrollo de Tratamientos Alternativos en Acuicultura.....	34
2.4. Biología de los Bacteriófagos.....	35

CONTENIDO (continuación)

2.4.1. Estructura y Composición.....	36
2.4.2. Clasificación de los Bacteriófagos.....	37
2.4.3. Ciclos de Vida de los Bacteriófagos.....	38
2.4.3.1. Ciclo lítico.....	39
2.4.3.2. Ciclo lisogénico.....	40
2.4.5. Fagoterapia: Terapia con Bacteriófagos.....	40
2.4.5.1. Relación de los bacteriófagos con la virulencia de <i>Vibrio</i>	41
2.4.6. Vibriofagos marinos: herramienta para combatir infecciones en acuicultura.....	42
3. JUSTIFICACIÓN.....	47
4. HIPÓTESIS.....	48
5. OBJETIVOS.....	49
5.1. Objetivo General.....	49
5.2. Objetivos Específicos.....	49
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	50
6.1. Muestreo.....	51
6.2. Cepas y Condiciones de Crecimiento Bacteriano.....	53
6.3. Aislamiento, Purificación y Propagación de Fagos.....	54
6.4. Ensayo de Titulación de Fagos.....	55
6.5. Rango de Hospederos de Fagos.....	55
6.6. Eficiencia de Siembra en Placa (EOP).....	55
6.7. Ensayos de Estabilidad de Fagos.....	56
6.8. Estabilidad de Supervivencia de Fagos a Diferentes Temperaturas de Almacenamiento.....	56
6.9. Curva de Crecimiento en un Solo Paso.....	57
6.10. Período de Latencia Y Tamaño de Explosión.....	57
6.11. Ensayo de Reducción Bacteriana.....	57
6.12. Precipitación/Purificación del Fago con PEG.....	58
6.13. Morfología de Bacteriófagos. Microscopía Electrónica de Transmisión.....	58
6.14. Extracción del ADN Viral del Fago.....	59
6.15. Análisis Bioinformático.....	60
6.16. Análisis Estadístico.....	61
6.16.1. Ensayos de Estabilidad de Fagos.....	61
6.16.2. Ensayo de Reducción Bacteriana.....	63
7. RESULTADOS.....	64
7.1. Aislar Bacteriófagos de Muestras de Agua de Mar, Sedimentos y Mariscos en Sinaloa, México.....	64
7.2. Caracterizar Biológica, Morfológica Y Genómicamente Bacteriófagos con Actividad Lítica contra Cepas <i>Vp</i> AHPND+.....	65
7.2.1. Ensayo de Titulación de Fagos.....	65

CONTENIDO (continuación)

7.2.2. Rango de Hospederos.....	67
7.2.3. Eficiencia de Siembra en Placa (EOP).....	67
7.2.4. Determinación de la Estabilidad de los Fagos.....	68
7.2.5. Curva de Crecimiento de un Solo Paso.....	69
7.2.6. Prueba de Desafío Bacteriano.....	70
7.2.7. Morfología de Bacteriófagos.....	70
7.2.8. Extracción del ADN Genómico y Secuenciación.....	73
7.2.9. Análisis Básico del Genoma.....	74
7.2.10. Análisis Filogenético y Genómica Comparativa.....	75
7.2.11. Análisis Estadístico.....	80
7.1.11.1. Diseño completamente al azar (dos factores) para ensayo de reducción bacteriana.....	80
7.1.11.2. Diseño completamente al azar (dos factores) para estabilidad a temperatura.....	81
7.1.11.3. Diseño completamente al azar (dos factores) para estabilidad al pH.....	81
8. DISCUSIÓN.....	82
9. CONCLUSIONES.....	87
10. RECOMENDACIONES.....	88
11. BIBLIOGRAFÍA.....	89
12. ANEXOS.....	99

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1	Producción de camarones por región. Fuentes: FAO (2019) y encuestas GOAL (2011 a 2018) para 2010 a 2017; Encuesta GOAL (2019) para 2018 a 2021.....19
2	Producción acuícola de camarones en los principales países productores de Asia. Fuentes: FAO (2019) y encuestas GOAL (2011 a 2018) para 2010 a 2017; Encuesta GOAL (2019) para 2018 a 2021.....20
3	Camarón de la especie <i>Penaeus vannamei</i> . (A, B) Signos evidentes de camarones infectados con AHPND. (C, D) Camarón normal en el grupo de control negativo.....28
4	Etapas de desarrollo de AHPND.....29
5	Representación esquemática del fago.....36
6	Morfortipos de virus procariotas.....37
7	Estructura de un bacteriófago de cola típico (a) y los pasos durante los ciclos de vida lítico y lisogénico del bacteriófago (b).....39
8	Secuencia de trabajo para el aislamiento y caracterización de bacteriófagos líticos para el control de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> -AHPND.....50
9	Sitios de muestro en Sinaloa, México: a) Playa El Maviri – Muestra: Agua de Mar; b) Playa El Maviri – Muestra: Agua de estero; c) Puerto de Topolobampo – Muestra agua de Mar; d) Toma de muestra en bolsa de polietileno con sello hermético y antigoteo estéril; e) Muestra: Ostión con concha; f) Muestra: Almeja chocolate.....51
10	Sitios de muestreo de fagos aislados contra <i>Vp</i> AHPND+.....64
11	Rango de hospedero (Spot test). Calvas formadas por la actividad lítica de: a) fagos M3 y PM1 contra la cepa M2415 <i>Vp</i> AHPND+; b) fagos M9, C2, ALK y M7 contra la cepa M2413 <i>Vp</i> AHPND+; c) fagos M1, M83, C1 y CH1 contra la cepa M2413 <i>Vp</i> AHPND+; y d) fagos ALK contra la cepa M0904 <i>Vp</i> AHPND+.....65
12	Morfología de las placas formadas en una placa de agar de doble capa por (A) M83, (B) M9, (C) M3, (D) C2, (E) ALK y (F) CHI.....66
13	Eficiencia de plaqueo (EOP) de: a) CHI contra la cepa M0904 <i>Vp</i> AHPND+; b) CHI contra la cepa M2411 <i>Vp</i> AHPND+; c) ALK contra la cepa M2401 <i>Vp</i> AHPND+.y d) ALK contra la cepa M2411 <i>Vp</i> AHPND+.....67

LISTA DE FIGURAS (continuación)

Figura	Página	
14	Caracterización biológica de fagos. (A) Estabilidad de los fagos a varias temperaturas. (B) Estabilidad de los fagos a varios valores de pH. Las diferencias significativas en los ensayos de estabilidad se encuentran en CuadroS1 y CuadroS2 en anexos. Los valores son las medias de tres pruebas \pm desviación estándar Caracterización biológica de fagos. (A) Estabilidad de los fagos a varias temperaturas. (B) Estabilidad de los fagos a varios valores de pH. Las diferencias significativas en los ensayos de estabilidad se encuentran en CuadroS1 y CuadroS2 en anexos. Los valores son las medias de tres pruebas \pm desviación estándar.....	69
15	Caracterización biológica de fagos. Curva de crecimiento de un solo paso de bacteriófagos: (A) CHI; (B) ALQ; (C) C2; (D) M3; (E) M9; (F) M83. Los valores son las medias de tres pruebas \pm desviación estándar.....	71
16	Prueba de desafío bacteriano de fagos: (A) CHI, (B) ALK, (C) C2, (D) M3, (E) M9 y (F) M83 a cepas mexicanas de <i>V. parahaemolyticus</i> causantes de AHPND según diferentes MOI (MOI = 1, 0.1, 0.01).....	72
17	Microscopía de transmisión electrónica: (A) ALK, (B) C2, (C) M3, (D) M9, (E) M3 y (F) M83.....	73
18	Comparación del genoma usando Easyfig: (A) vB_VpaS_CHI, vB_VpaS_ALK y vB_VhaS-tm. (B) vB_VpaP_M3, vB_VpaP_C2, vB_VpaP_M9, vB_VpaP_M83 y vB_VpaS_OWB. Las flechas de diferentes colores representan marcos de lectura abiertos predichos con diferentes funciones.....	76
19	(A)Heatmap de VIRIDIC: (A) CHI y ALK. Los valores del porcentaje de identidad oscilan entre 0 (0 %, blanco) y 1 (100 %, verde).....	78
20	(B) Heatmap de VIRIDIC: (B) M3, C2, M83 y M9. Los valores del porcentaje de identidad oscilan entre 0 (0 %, blanco) y 1 (100 %, verde).....	79
21	Árbol filogenético basado en Genome-BLAST Distance Phylogeny (GBDP) de (C) CHI y ALK de M3, C2, M83 y M9 de la familia <i>Siphoviridae</i> . (D) M3, C2, M83 y M9 de la subfamilia <i>Autographiviridae</i>	80
22	Agrupación de información usando el método de Tukey 95% de confianza para el factor de MOI.....	116

LISTA DE CUADROS

Cuadro	Página
1 Principales enfermedades de camarón cultivado.....	18
2 Producción pesquera por especie: ‘camarón’ (Toneladas), en México.....	21
3 Diferentes características y generalidades de la bacteria <i>V. parahaemolyticus</i>	24
4 Estrategias para prevenir y controlar al <i>Vibrio</i> en la acuicultura del camarón.....	28
5 Clasificación taxonómica del orden <i>Caudovirales</i>	29
6 Estudios que abordan temas relacionados con la fagoterapia contra <i>Vp</i> agente causal de la enfermedad de la Necrosis Aguda del Hepatopáncreas (AHPND) en especies de camarón desde 1982 hasta la fecha (los estudios están ordenados cronológicamente)	33
7 Muestras de agua (mar y estero) y mariscos estudiados.....	38
8 Cepas de <i>V. parahaemolyticus</i> utilizadas para el aislamiento de bacteriófagos.....	42
9 Diseño experimental: Temperatura.....	52
10 Diseño experimental: pH.....	53
11 Diseño experimental: Reducción bacteriana.....	62
12 Título de bacteriófagos aislados con actividad lítica contra <i>Vp</i> AHPND+.....	62
13 Resumen de las características de los diferentes fagos aislados en Sinaloa, México....	68
14 Concentraciones de ácido nucleico de fagos de <i>Vp</i> AHPND+.....	74
15 Análisis básico del genoma del fago.....	75
S1 Agrupación de información usando el método de Tukey 95% de confianza para el factor de temperatura.....	99
S2 Agrupación de información usando el método de Tukey 95% de confianza para el factor de pH.....	100
S3 Clasificación funcional de 95 ORF en el genoma vB_VpaS_CHI.....	102
S4 Clasificación funcional de 94 ORF en el genoma vB_VpaS_ALK.....	105
S5 Clasificación funcional de 57 ORF en el genoma vB_VpaP_M83.....	107
S6 Clasificación funcional de 57 ORF en el genoma vB_VpaP_M9.....	110
S7 Clasificación funcional de 58 ORF en el genoma vB_VpaP_M3.....	112
S8 Clasificación funcional de 58 ORF en el genoma vB_VpaP_C2.....	114

RESUMEN

Vibrio parahaemolyticus causa la enfermedad de necrosis hepatopancreática aguda (AHPND) en camarones de cultivo. Debido a que su potencial de daño podría llegar a una tasa de mortalidad del 100%, los bacteriófagos se han convertido en una intervención de control natural prometedora además de los antibióticos, pero es necesario dilucidar múltiples obstáculos antes de su uso completo. En este estudio, se aislaron un total de 10 fagos con actividad lítica frente a *V. parahaemolyticus*, de mariscos (camarón, caracol chino, ostiones, almeja chocolata, pata de mula y calamar), agua de mar y agua de estero en cinco sitios de muestreo en Sinaloa, México; con base a su actividad lítica se seleccionaron 6 de estos fagos, vB_VpaS_ALK, vB_VpaS_CHI, vB_VpaP_M3, vB_VpaP_C2, vB_VpaP_M9 y vB_VpaP_M83, para realizar su caracterización biológica, morfológica y genómica. El rango de hospederos fue determinado evaluando 10 cepas de *V. parahaemolyticus* asociadas a AHPND, donde estos fagos mostraron una actividad lítica frente al 50.0% de los aislados de *V. parahaemolyticus* analizados. Todos los fagos están compuestos por un genoma de ADN de doble cadena con longitudes que oscilan entre 43.268 pb y 57.805 pb. Los seis fagos exhibieron períodos de latencia de 10 a 30 minutos y tamaños de explosión de 34 a 168 partículas virales por célula infectada. Se determinó que el MOI óptimo para la propagación de bacteriófagos era de 0,01 a 1. Sus rangos óptimos de temperatura fueron para ALK y CHI de -80 °C-60 °C y para M3, C2, M9 y M83 de -80 °C-70 °C, con estabilidad al pH de 2-11. No se encontraron genes de ARN de transferencia (ARNt), virulencia o resistencia en ninguno de los genomas y el ciclo de vida de estos fagos fue clasificado como virulento por la plataforma PhageAI. Los análisis filogenéticos y de genómica comparativa asignaron a los fagos M3, C2, M9 y M83 como nuevos miembros del género *Maculvirus*, familia *Autographiviridae*. Mientras que los fagos ALK y CHI fueron asignados como nuevos miembros de la subfamilia *Queuovirinae*, familia *Siphoviridae*. Los resultados obtenidos hasta el momento revelan que la caracterización y el análisis genómico mejorarán aún más nuestra comprensión de la biología y la diversidad de los fagos con el objetivo de aliviar los obstáculos para el uso completo de los fagos.

Palabras claves: Bacteriófagos, *Vibrio parahaemolyticus*, AHPND, caracterización.

ABSTRACT

Vibrio parahaemolyticus causes acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in farmed shrimps. Because their damage potential could be as high as a 100% mortality rate, the bacteriophages have emerged as a promising natural control intervention other than antibiotics, yet multiple roadblocks need to be elucidated before full usage. In this study, six bacteriophages isolated from the seafood samples, seawater, and estuary water in Sinaloa, Mexico, showed a narrow host range among Mexican AHPND-causing *V. parahaemolyticus* strains. All bacteriophages are composed of a double-stranded DNA genome with lengths ranging between 43,268 bp and 57,805 bp. All six phages exhibited latency periods of 10 to 30 min and burst sizes of 34 to 168 viral particles per infected cell. The optimal MOI for bacteriophage propagation was determined to be 0.01 to 1. No transfer RNA (tRNA), virulence, or resistance genes were found in either genome and the life cycle of these phages was classified as virulent by the PhageAI platform. Phylogenetic and comparative genomics analyses assigned phages M3, C2, M9, and M83 as new members to the genus of *Maculvirus*, *Autographiviridae* family, *Caudovirales* order. Whereas, ALK and CHI phages were assigned as new members of the *Queuovirinae* subfamily, *Siphoviridae* family. Results obtained so far reveal that genomic characterization and analysis will further enhance our understanding of phage biology and diversity aiming to ease roadblocks to full usage of phages.

Key words: Phages, *Vibrio parahaemolyticus*, AHPND, characterization, genome analysis

1. INTRODUCCIÓN

La industria del cultivo de camarón es una de las actividades agroindustriales de mayor desarrollo a nivel mundial (Martínez-Córdova y col., 2009). Su importancia económico-productiva sustenta el desarrollo social de muchas regiones del mundo. Sin embargo, uno de los principales problemas que enfrenta son las enfermedades ocasionadas por virus, bacterias y parásitos, siendo las de origen bacteriano las que generan una mayor mortalidad y, por ende, pérdidas económicas, a veces, incalculables (Sánchez-Díaz, 2018; Maldonado-Muñiz, 2020). Las enfermedades bacterianas asociadas a la acuicultura, generalmente son causadas por el género *Vibrio* spp., en su particular por la especie *Vibrio parahaemolyticus* (*Vp*), la cual considera un desafío para la seguridad alimentaria, el desarrollo económico y la salud humana. *Vp* es una bacteria Gram negativa halófila que se ha asociado comúnmente con infecciones en organismos en la acuicultura. En humanos esta bacteria causa brotes de gastroenteritis aguda por la ingestión de mariscos y otros alimentos marinos crudos, mal cocidos o parcialmente cocidos, con riesgo de infecciones sistémicas graves y muerte en población sensible (Rodríguez-Castro, 2012; Hong *et al.*, 2016; Xiao *et al.*, 2017; Yan *et al.*, 2019; FAO, 2020; Thammatinna *et al.*, 2020). Además, esta bacteria ha sido identificada como el agente etiológico de la Enfermedad de la Necrosis Hepatopancreática Aguda (por sus siglas en inglés AHPND), también conocida como Síndrome de Mortalidad Temprana (por sus siglas en inglés EMS), causada por las toxinas PirAB^{Vp}, lo cual aumenta la amenaza de la enfermedad en el sector camaronero (Yang *et al.*, 2020).

La AHPND afecta la producción de camarón en el mundo, esta enfermedad se detectó por primera vez en el año 2009 en países asiáticos y en 2013 en México; uno de los principales países productores de camarón reconocidos en el mundo (Mendoza-Escamilla, 2018; FAO, 2020). Desde entonces, esta enfermedad bacteriana ha provocado pérdidas económicas a la industria acuícola del camarón, estimándose en hasta miles de millones de dólares, llegando a causar 100% de mortalidad en los primeros 35 días de cultivo (Lightner *et al.*, 2012; Thitamadee *et al.*, 2015).

A la fecha, la prevención y el control de este patógeno se ha limitado al uso de desinfectantes y antibióticos en los sistemas de cultivo, sin embargo, estas estrategias han sido ineficientes y estudios previos han reportado la aparición global de nuevas bacterias multirresistentes (Fernández-Espinel *et al.*, 2017). Es por ello que, el uso de bacteriófagos se posiciona como un

área de interés en la acuicultura. De manera tal que, el control de patógenos bacterianos basado en bacteriófagos (terapia con fagos) ha resurgido recientemente como una alternativa prometedora y amigable con el medio ambiente que favorezca la seguridad alimentaria en la región (Huan *et al.*, 2019). No obstante, la aplicación de la terapia de bacteriófagos en la acuicultura es reciente y por ello es necesario generar conocimiento sobre bacteriófagos candidatos para identificar su potencial como agentes de control biológico en el camarón y, con ello, ayudar a minimizar los daños ocasionados por las pérdidas económicas.

En el presente estudio se pretende evaluar la actividad bacteriolítica de bacteriófagos aislados de Sinaloa, México contra *Vp* causante de AHPND para su uso en fagoterapia mediante un aislamiento y caracterización biológica, morfológica y genómica de bacteriófagos con actividad lítica contra cepas *Vp*_{AHPND}.

2. ANTECEDENTES

El cultivo de camarón ha destacado entre los productos alimenticios acuáticos tanto por su alto valor nutritivo como por su alta demanda de consumo al ser característico como un ingrediente base en un sin fin de alimentos preparados de consumo global (Maldonado-Muñiz, 2020). Los primeros experimentos para el cultivo de camarón fueron hechos por el doctor Fuginaga en 1934, pero solo hasta 1959 empiezan a operar las primeras granjas comerciales de cultivo de ciclo completo, lo cual consistió en criar a los organismos desde huevos hasta adultos, proporcionándoles los nutrimentos necesarios y adecuados para su desarrollo. A partir de la década de los 70, países como México, Francia, Estados Unidos, China y Taiwán dominaban las condiciones de cría para muchas especies de camarón de interés económico (Anaya-Rosas, 2005).

Es por ello que, la acuicultura se ha convertido en la actividad agroindustrial de mayor desarrollo a nivel mundial por su importancia económica, con gran proyección futura en el abastecimiento de mariscos en el mundo (Sánchez-Díaz, 2018). Sin embargo, uno de las mayores limitantes para el desarrollo sostenido de esta industria es la aparición de enfermedades infecciosas, donde el estrés causado por la presión de los sistemas de producción intensiva sobre los organismos, su exposición a variaciones ambientales naturales propias de la estación del año e influencia del ambiente costero puede provocar susceptibilidad en los organismos e influir considerablemente en su capacidad de respuesta ante cualquier patógeno o factor abiótico presente. Y cuando existe un desequilibrio en la relación microorganismo-hospedero, ocurre la enfermedad (Del Valle-Herrera, 2016).

2.1. Camaronicultura Mundial Y Mexicana

La producción de camarón en diversos países del mundo se inició alrededor de los años 80, a partir de entonces ha ido creciendo hasta convertirse en la industria que se conoce actualmente (García, 2020). A la fecha, se menciona como principales productores del sureste asiático: India, Vietnam, Indonesia y China, donde se concentra más de 86 % de la producción de camarón de cultivo. Mientras que, en Latinoamérica los principales países productores de camarón cultivado son:

Ecuador (480.000 mil toneladas); México (178,000 mil toneladas), y Brasil (80,000 mil toneladas). Y, de acuerdo con estimaciones de la FAO (2017) se produjeron entre 2.9 y 3.5 millones de toneladas, mientras que para el año 2018 la producción alcanzó casi los 4.0 millones de toneladas con un aumento del 3 al 5% respecto al año 2017, de las cuales del 75 a 80% es producción originada en granjas de la región Asia-Pacífico. No obstante, los propios productores señalan que la cosecha del crustáceo cultivado es un negocio internacional que todavía es incipiente, de bajos márgenes, sujeto a enfermedades y deficiente infraestructura en ciertos países, entre ellos destaca México (Mendoza-Escamilla, 2018).

2.1.1. Problemas Y Desafíos del Cultivo de Camarón

Según la información recolectada en las encuestas aplicadas por GOAL (Global Outlook for Aquaculture Leadership) de 2019 de la Alianza Mundial de Acuicultura, los encuestadores asiáticos identifican claramente que las “enfermedades” son el principal desafío al que se enfrenta la industria acuícola. Los “costos de alimentación” y el “acceso a reproductores libres de enfermedades” se clasificaron como el segundo y el tercer problema más apremiante, respectivamente. En contraste, en Latinoamérica, las “enfermedades” cayeron al séptimo lugar, luego de ser constantemente clasificadas como una de las tres principales afectaciones en los últimos años. El manejo de enfermedades y las prácticas de producción en la industria aparentemente han calmado los temores sobre los patógenos emergentes. En Asia, las “enfermedades” claramente siguen siendo el problema más urgente dado el fuerte impacto de la enfermedad denominada AHPND/EMS y las nuevas enfermedades emergentes en países como la India. Por su parte, en Latinoamérica no se queda atrás en este contexto (Anderson *et al.*, 2020).

2.1.2. Manejo De Enfermedades en la Camaronicultura Mexicana

Las estadísticas no siempre son positivas, pues existen riesgos a los que el cultivo de camarón está

expuesto en cada ciclo de producción, debido a que estos organismos no cuentan con sistema inmune, y por ende no pueden generarse vacunas para su protección. Además, carecen de un sistema que les permita desarrollar resistencia contra las enfermedades emergentes de origen viral, parasitario, y bacteriano. Su sistema de defensa está basado en efectores celulares y humorales, los cuales se conjugan para eliminar microorganismos potencialmente infecciosos, donde los hemocitos juegan el papel de llevar consigo la fagocitosis, remueven partículas extrañas y agentes infecciosos (Rendón y Balcázar, 2003; Maldonado-Muñiz, 2020). De tal manera que, las deficientes prácticas en el manejo de su cultivo constituyen uno de los riesgos principales de que puedan contaminarse con ciertas enfermedades (Cuadro 1).

Y, en este contexto, la camaronicultura mundial y mexicana ya ha sido afectada por diversas enfermedades, siendo las de mayor impacto, el virus de la mancha blanca, el síndrome de Taura y las vibriosis. En 2013, los productores de la región del noroeste del Pacífico mexicano comenzaron a observar camarones moribundos que presentaban signos de palidez y atrofia en hepatopáncreas, característicos de la enfermedad denominada AHPND, por sus siglas en inglés. En ese año, la producción total de camarón se redujo hasta en un 60% en México (Aguilar-Rendón, 2018).

Cuadro 1. Principales enfermedades de camarón cultivado (Maldonado-Muñiz, 2020).

Patógeno	Enfermedad	Impacto México
Virus	Virus de la mancha blanca (WSSV)	+++
	Virus del taura (TSV)	++
	Síndrome de cabeza amarilla (YHV)	?
	CMNV: Mortalidad encubierta	n.d.
	Micronecrosis (IMNV)	n.b.
	Necrosis hipodérmica y hematopoyética (IHHNV)	+
	Baculovirus (BP)	+
Bacterias	Enfermedad de Necrosis Hepatopancreática Aguda (AHPND/EMS)	++++
	Vibriosis	++
	Hepatopancreatitis necrotizante NHP-B	++
Parásitos	EHP: Enteritooanhepatopenei	n.b.

+: grado de impacto; ?: sospecha; n.d.: no detectado; n.b.: no buscado

2.1.3. Producción Mundial del Camarón

2.1.3.1. Asia. Según la encuesta GOAL (Global Outlook for Aquaculture Leadership) de 2019 de la Alianza Mundial de Acuicultura de las tendencias de producción en encuesta a camaroneros de la industria participantes en Asia/Oceanía (43 respuestas), América Latina (39 respuestas) y África (dos respuestas) (Fig. 1), la producción se ha recuperado desde 2015, alcanzando 3.75 millones de toneladas en 2018 y potencialmente 4.0 millones de toneladas en 2021. Cabe señalar que, los datos actuales de la FAO para la producción de camarones en China se han revisado a la baja todos los años de 2009 a 2016. Tailandia debería continuar recuperándose del impacto de la enfermedad AHPND/EMS, aunque a un ritmo lento: se espera que la producción alcance 330,000 mil toneladas en 2021, lo que representa solo el 56% de la cosecha de 2010 (pre-EMS) (Anderson *et al.*, 2019).



Fig. 1: Producción de camarones por región. Fuentes: FAO (2019) y encuestas GOAL (2011 a 2018) para 2010 a 2017; Encuesta GOAL (2019) para 2018 a 2021. Tomado de: Anderson et al. (2020).

2.1.3.2. América Latina: México. La Fig. 2 presenta estimaciones para las principales naciones productoras de América Latina. El desarrollo más importante en la región del Pacífico es el

espectacular crecimiento de la industria ecuatoriana de camarones. Ecuador ha aprovechado plenamente la crisis generalizada de enfermedades en Asia para aumentar las exportaciones a los mercados europeos y asiáticos. Se esperaba que la producción alcanzara 700,000 mil toneladas en 2021, con una tasa compuesta anual (CAGR) del 11.3% entre 2015 y 2020. Este crecimiento haría de Ecuador el tercer mayor productor del mundo después de China y Vietnam. Mientras que, México se ubica como el séptimo productor de camarón a nivel mundial (de los 118 países con actividad camaronera, siendo India el productor líder) con aproximadamente una producción promedio anual de 237 mil 647 toneladas (Cuadro 2). Aunque sufrió pérdidas severas en 2013, la industria mexicana pudo restaurar la producción en 2015. Se espera un mayor crecimiento, con cosechas que alcanzarán 180,000 mil toneladas en 2021 (CAGR de 10.4% durante 2015 a 2021) (Anderson *et al.*, 2015).

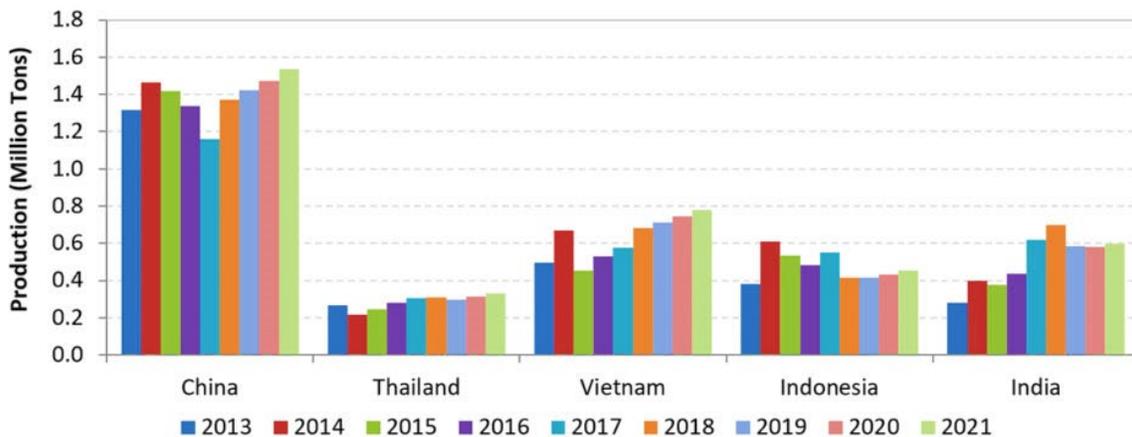


Fig. 2: Producción acuícola de camarones en los principales países productores de Asia. Fuentes: FAO (2019) y encuestas GOAL (2011 a 2018) para 2010 a 2017; Encuesta GOAL (2019) para 2018 a 2021. Tomado de: Anderson *et al.* (2020).

La camaronicultura en México se distribuye de la siguiente manera: Sinaloa destaca como el principal estado productor de camarón con más de 96 mil toneladas, le sigue Sonora con 75 mil toneladas y Nayarit con 17 mil toneladas (SEMARNAT, 2019). Con base a la información recabada por la Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural (SADER), México produjo 247 mil 664 toneladas de camarón en la temporada de captura 2019-2020. En contraste, los datos preliminares

obtenidos de la Comisión Nacional de Acuacultura y Pesca (CONAPESCA), reportaron que las 5 entidades con mayor producción de pesca de camarón fueron Sinaloa, Sonora, Tamaulipas, Nayarit y Baja California Sur, que concentran 92.9% de la producción total del país, durante la temporada de pesca 2019-2020, que concluyó el mes de marzo, Sinaloa produjo 19 mil 551 toneladas de camarón; Sonora 12 mil 579; Nayarit 2 mil 844 toneladas.

Cuadro 2. Producción pesquera por especie: ‘camarón’ (Toneladas), en México

Año	Destino de la producción	Especie	Producción pesquera
1995	Consumo humano directo	Camarón	85,901
1996	Consumo humano directo	Camarón	78,879
1997	Consumo humano directo	Camarón	88,489
1998	Consumo humano directo	Camarón	90,335
1999	Consumo humano directo	Camarón	95,611
2000	Consumo humano directo	Camarón	95,077
2001	Consumo humano directo	Camarón	105,523
2002	Consumo humano directo	Camarón	100,486
2003	Consumo humano directo	Camarón	123,905
2004	Consumo humano directo	Camarón	125,575
2005	Consumo humano directo	Camarón	158,266
2006	Consumo humano directo	Camarón	177,377
2007	Consumo humano directo	Camarón	184,695
2008	Consumo humano directo	Camarón	196,289
2009	Consumo humano directo	Camarón	196,456
2010	Consumo humano directo	Camarón	167,016
2011	Consumo humano directo	Camarón	184,123
2012	Consumo humano directo	Camarón	161,852
2013	Consumo humano directo	Camarón	127,517
2014	Consumo humano directo	Camarón	158,128
2015	Consumo humano directo	Camarón	212,684
2016	Consumo humano directo	Camarón	206,087
2017	Consumo humano directo	Camarón	227,929
2018	Consumo humano directo	Camarón	230,381
2019	Consumo humano directo	Camarón	231,900

Fuente: (SEMARNAT, 2019).

2.1.4. Comercio Internacional del Camarón

2.1.4.1. Unión Europea (Cosmopolita) y EE.UU. De acuerdo con datos de la FAO (2018), el

mercado común de la Unión Europea sigue siendo el mayor importador de camarones del mundo, aunque la demanda no ha mejorado mucho en los últimos años. Las importaciones totales de camarones alcanzaron 817,700 mil toneladas (+2,4%) en 2018, y disminuyeron en España (-2,4%), Francia (-1%) y el Reino Unido (-1,1%). Por primera vez, las importaciones fuera de la Unión Europea de superaron las 600,000 mil toneladas en 2018, suministradas por Ecuador, Argentina, Vietnam, India y Groenlandia. En lo que respecta al mercado de camarones de los EE.UU., se mantuvo en exceso a partir de principios de 2018, el camarón sigue siendo el marisco más popular entre los consumidores estadounidenses. En dicho año, las importaciones del crustáceo hacia EE.UU. ascendieron a 160,000 mil toneladas, suministradas principalmente por China, Vietnam, Tailandia e Indonesia.

2.1.4.2. Latinoamérica: México. La actividad representa el 70% de la producción del producto cada temporada en el Pacífico mexicano (Toledo, 2021). El camarón es el principal producto del sector acuícola y pesquero de México en temas de exportación, ocupando el octavo lugar a nivel mundial. Tan solo en 2018 generó 370 millones de dólares en exportaciones y los principales destinos son EE.UU., Vietnam y Francia (SMATTCOM, 2019).

2.2. Generalidades. Características del Género *Vibrio*

El género *Vibrio* pertenece a la familia *Vibrionaceae* y está constituido por bacilos Gram negativos rectos o curvados, pudiendo observarse formas cocobacilares e incluso cocoides. No esporulados, anaerobios facultativos y crecen mejor en condiciones alcalinas. Son bacterias que se caracterizan por su movilidad, debido a uno o varios flagelos polares y ser generalmente oxidasa-positivos (Pumarola *et al.*, 1997).

Clasificación taxonómica del género *Vibrio*:

- Reino: Bacteria
- Filo: Proteobacteria
- Clase: Gamma Proteobacteria

- Orden: *Vibrionales*
- Familia: *Vibrionaceae*
- Género: *Vibrio*

Los *Vibrio* son característicamente nativos de hábitats marinos, salobres y estuarinos, y aparecen en grandes concentraciones (“blooms”) cuando las aguas aumentan de temperatura 17°C-20°C; a temperaturas bajas los *Vibrios* permanecen en el sedimento de los fondos marinos; su crecimiento es óptimo en pH altos (hasta 9). Contiene más de 130 especies, 12 de ellas patógenas para el ser humano o que han sido aisladas en muestras clínicas y, de éstas, 10 se consideran halófilas. Las principales especies designadas como agentes etiológicos de gastroenteritis por infecciones alimentarias humanas son *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus* y *Vibrio fluvialis*. La especie *Vibrio vulnificus* es la especie que causa bacteriemia con mayor frecuencia, especialmente en pacientes con enfermedades hepáticas y en inmunodeprimidos. Las infecciones de oído debidas a *Vibrio alginolyticus* ocurren preferentemente en pacientes con perforación en la membrana timpánica o con otitis media crónica (García-Bermejo, s/a). En países templados, los *Vibrios* se encuentran presentes en el agua del mar durante todo el año, aunque su concentración experimenta un notable incremento en los meses cálidos a causa de las favorables condiciones ecológicas y del plancton, aumentando su acumulación por moluscos filtradores y otros animales marinos (Rodríguez-Castro, 2012).

2.2.1. *Vibrio parahaemolyticus*

2.2.1.1. Diferentes características de la especie *Vibrio parahaemolyticus*: genéticas, ecológicas, y bioquímicas. *Vibrio parahaemolyticus* es una de las especies más estudiadas del género *Vibrio* debido a su implicación tanto en enfermedades a peces y mariscos como en infecciones alimentarias humanas. Se trata de un microorganismo marino que habita en los estuarios y zonas costeras de mares tropicales y templados. En estos últimos, en el invierno, solo se encuentra en los sedimentos marinos. Es un *Vibrio* estrictamente halófilo moderado. Su papel como agente responsable de gastroenteritis se puso de manifiesto en Japón a principio de la década de los años cincuenta, en relación a un brote asociado al consumo de sardinas. Desde entonces, se ha

identificado como causa frecuente de síndrome diarreico aguda en países en desarrollo y en vías de desarrollo (Pumarola *et al.*, 1997; Dabanch *et al.*, 2009; Rodríguez-Castro, 2012).

Agregando a lo anterior, las generalidades de la bacteria *V. parahaemolyticus* se describen en el cuadro 3.

Cuadro 3. Diferentes características y generalidades de la bacteria *V. parahaemolyticus*

Peligro biológico:	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
Generalidades	Bacteria halófila moderada Bacilo gramnegativo Anaerobio facultativo (tolera el O ₂) Presenta movilidad por flagelos peritricos
Taxonomía	Orden: <i>Vibrionales</i> Familia: <i>Vibrionaceae</i> Género: <i>Vibrio</i> Especie: <i>V. parahaemolyticus</i>
Metabolismo	Metabolismo oxidativo y fermentativo, produce catalasa.
Características generales y bioquímicas:	
Propiedades	Crece en condiciones de salinidad entre 3-8% Crece a una T° entre 10°C - 44°C con una óptima de crecimiento de 35°C - 37°C pH varía de 5 a 11 con un intervalo óptimo de 7.5 a 8.6
Morfología	Tamaño de 1.4-2.6 µm de longitud por 0.5-0.8 µm de diámetro
Características bioquímicas	Fermenta la glucosa sin producción de gas; fermenta manitol, arabinosa y manosa, pero no fermenta sacarosa, lactosa, inositol y ramnosa. Ureasa variable.
Tiempo de generación	Tiempo de generación estimado en 10 a 12 min. A una T° de 37°C se estima entre 8 a 9 min, de tal manera que puede alcanzar concentraciones muy altas en poco tiempo.
Reservorio	Aguas saladas y estuarios En los estanques como biopelículas en sedimentos o existir como bacterias de vida libre Partículas suspendidas Plancton, pescados y mariscos (almejas, ostiones, camarón, calamar y cangrejo) La ecología de este organismo se ve afectada por la temperatura, la salinidad, la turbidez y la presencia de zooplancton, crustáceos y moluscos
Factores de virulencia:	
Toxinas	Su patología para camarones está mediada por una delta-endotoxina llamada toxina Pir La mayoría de las cepas ambientales no son patógenas para el hombre y las cepas patógenas humanas se caracterizan por la

Adherencia	<p>capacidad de producir una hemolisina directa termoestable (TDH) y hemolisina relacionada con la tdh (TRH). Los genes <i>tdh</i> y <i>trh</i> están presentes en islas genómicas que posiblemente hayan sido adquiridas por <i>V. parahaemolyticus</i> por transferencia lateral de genes.</p> <p>Se adhiere a las superficies de quitina (componente estructural de algunos mariscos, como es el caso de la superficie del camarón) sobre ellas incrementa su concentración, pues los nutrientes para su utilización se encuentran más disponibles. Como posible mecanismo de adhesión las bacterias utilizan adhesinas o maquinaria macromolecular (sistemas de secreción, pilis retráctiles, fimbria) para establecer comunicación molecular patógeno/hospedero que provoca inhibición de las funciones celulares y establecimiento de la enfermedad.</p>
Quorum sensing	<p>En poblaciones extremadamente densas, las colonias coordinan la liberación de una potente toxina a través del proceso de quorum sensing. Mediante este mecanismo las bacterias pueden conocer en un ambiente determinado y decidir el momento en el que se va a poner en marcha la expresión de un determinado conjunto de genes con el fin de desarrollar una respuesta concreta y de forma simultánea, como es el caso de la expresión de los factores de virulencia.</p>

Susceptibilidad antimicrobiana:

En términos generales es susceptible a:

- Tetraciclina
- Doxiciclina
- Furazolidona
- Cotrimoxazol
- Cloranfenicol
- Cefalosporinas de tercera generación
- Aminoglucósidos
- Quinolonas

Prevención:

- Mantener la cadena de frío de los alimentos.
- Evitar el contacto de heridas abiertas con aguas o productos posiblemente contaminados.
- Consumir mariscos sólo en lugares públicos autorizados.
- Evitar que se produzca contaminación cruzada.
- Al almacenar congelado el alimento, además de detener el crecimiento de *Vibrio*, disminuye su número; no obstante, se ha descrito que el *V. parahaemolyticus* congelado sobrevive a -18°C durante 7 semanas. Esta bacteria muere a temperaturas inferiores a 5°C y la cocción a temperaturas de 65°C los inactiva.

Fuente: (Zamora-Pantoja *et al.*, 2005; Hernández *et al.*, 2005; Cossart y Pizarro-Cerda, 2006; Dabanch *et al.*, 2009; Karunasagar y Karunasagar, 2018; Lucero-Oleacha, 2020; González-Gómez *et al.*, 2020).

2.2.1.2. Infecciones asociadas a *Vibrio parahaemolyticus* *Vibrio parahaemolyticus* ha sido identificado como un agente causante de problemas a la salud pública. Algunas cepas de esta bacteria son patógenos importantes de especies acuáticas, sin embargo, algunas también pueden afectar a los seres humanos, aunque esta bacteria no forma parte de la microbiota intestinal humana, probablemente es la especie del género *Vibrio* más implicada en las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA's), ya que es responsable de brotes de gastroenteritis aguda en humanos por la ingestión de mariscos y otros alimentos marinos crudos, mal cocidos o parcialmente cocidos (Hernández *et al.*, 2005). Esta bacteria también se puede transmitir por contaminación cruzada, es decir, por ingestión de cualquier alimento que haya tenido contacto con mariscos o agua. Además de la temperatura, existen otros factores como el transporte y/o almacenamiento de productos del mar con condiciones no adecuadas de refrigeración, que también favorecen la proliferación de la bacteria y, por lo tanto, la posibilidad de infectar. La enfermedad alimentaria prevalece más en verano y dura de 2 a 7 días con síntomas principales de diarrea, dolor abdominal, fiebre, vómitos y dolor de cabeza. La FAO estima que la dosis infectiva es del orden de 1×10^4 bacterias por gramo de marisco. Existe riesgo de infecciones sistémicas graves y muerte en población sensible, como son los niños y personas de edad, pacientes inmunocomprometidos y con patología de base. Las infecciones causadas están generalmente vinculadas con serotipos diferentes y grupos genéticos endémicos, en determinadas zonas costeras de producción de pescados y mariscos (Rodríguez-Castro, 2012; Thammatinna *et al.*, 2020).

2.2.1.3. Epidemiología de *Vibrio parahaemolyticus*. Las referencias bibliográficas referentes al tema, indican que la bacteria fue identificada por primera vez como agente de ETA, en Japón el año 1950, en relación a un brote asociado al consumo de sardinas crudas contaminadas (Dabanch *et al.*, 2009). En febrero de 1996 epidemias de gastroenteritis agudas fueron reportadas inicialmente en Calcuta, India asociadas al serotipo O3:K6 y posteriormente en otros tres continentes: África, Europa y América. La primera vez que un serogrupo de *V. parahaemolyticus*, de los más de 71 existentes mostraba potencial pandémico, produciendo epidemias de diarrea aguda acuosa. Una población clonal del serovar patógeno *Vibrio parahaemolyticus* O3: K6 comenzó a extenderse en las aguas costeras, provocando brotes en todo el mundo desde 1996 (Bastías *et al.*, 2010). Aunque tienen potencial para diseminarse entre continentes, no han afectado a una gran proporción de la

población susceptible como lo hace *V. cholerae*, por lo que se ha aceptado su denominación pandémica haciendo alusión a su diseminación continental más que su tasa de ataque (Seas *et al.*, 2010). Actualmente, los novedosos métodos de tipificación y análisis filogenómicos han facilitado el descubrimiento de otros serotipos patógenos y avirulentos que aportan como evidencia que las infecciones causadas por *V. parahaemolyticus* están generalmente vinculadas con serotipos diferentes y grupos genéticos endémicos, en determinadas zonas costeras de producción de pescados y mariscos (Rodríguez-Castro, 2012). Hasta la fecha el clon pandémico ha sido detectado en muchos países y se continúa el estudio mediante genómica comparativa de sus posibles orígenes.

2.2.1.4. Brotes de *Vibrio parahaemolyticus* asociados al consumo de mariscos. El Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC) de EE.UU. estima que sólo se informa uno de cada veinte casos de *V. parahaemolyticus*. Asimismo, los brotes por infecciones por esta bacteria rara vez se notifican en Europa y países de Latinoamérica tal como es el caso de México, con más frecuencia suele ser la responsable de aproximadamente la mitad de los casos de infección bacteriana transmitida por alimentos en Japón, EE.UU. y el Pacífico Sur. Y, ocasionalmente, esta bacteria oportunista también es capaz de infectar a través de una herida abierta que puede provocar sepsis (Rodríguez-Castro, 2012; ACSA-UAB, 2019).

2.3. La Naturaleza de la Enfermedad de la Necrosis Aguda del Hepatopáncreas (AHPND)

La enfermedad de necrosis hepatopancreática aguda (AHPND, por sus siglas en inglés), también conocida como síndrome de mortalidad temprana (EMS, por sus siglas en inglés), es una enfermedad bacteriana emergente en camarones del género *Penaeus* cultivados que ha provocado una reducción mayor del 60% en su producción en todo el mundo. De acuerdo con el Código Sanitario para los Animales Acuáticos de la OIE (Código Acuático, OIE, 2019), las especies que cumplen los criterios de susceptibilidad a AHPND incluyen: camarón patiblanco (*P. vannamei*) y camarón tigre gigante (*P. monodon*) (Yan *et al.*, 2019; FAO, 2020). La enfermedad se informó por primera vez en China en 2009, desde entonces, esta ha afectado dramáticamente a través de

pérdidas económicas estimadas en hasta USD \$1 mil millones anuales sobre los principales productores de camarón alrededor del mundo tales como China (2009), Vietnam (2011), Tailandia (2012), Malasia (2011), México (2013), Filipinas (2015), EEUU (2017), Bangladesh (2017), varios otros países de Latinoamérica (2014-2016), Corea del Sur (2019) y Okinawa Prefecture of Japan (2020). Se sospecha que AHPND está presente, aunque no se informa, en otros países de Asia y América Latina (Lightner *et al.*, 2012, Tran *et al.*, 2013, Gómez-Jiménez *et al.*, 2014; Kondo *et al.*, 2014; de la Peña *et al.*, 2015; Nunan *et al.*, 2014; Soto-Rodríguez *et al.*, 2015; Kumar *et al.*, 2018; Dhar *et al.*, 2019; FAO, 2020).

La AHPND se caracteriza por causar una mortalidad del 40 al 100% después de 24 h de infección, puede ser causada por varias cepas de *Vibrio* spp. debido a que los genes de la toxina pirAB^{VP} que residen en un plásmido que contiene dos grupos de genes de transferencia conjugativa y un gen mobB, que permiten la transferencia horizontal entre especies bacterianas, lo cual ha afectado el nivel de su patogenicidad (Xiao *et al.*, 2017; Dong *et al.*, 2019a, 2019b). Los brotes ocurren generalmente dentro de los 35 días en que los estanques de cultivo son sembrados y causa signos clínicos que incluyen letargo; caparazón blando y oscurecido; intestino medio y estómago vacíos; y, un hepatopáncreas pálido y atrofiado por el desprendimiento masivo de las células epiteliales (Fig. 3), siendo esta última la lesión patognomónica de la enfermedad. Esta característica llevó a que la enfermedad fuera inicialmente referida como síndrome de mortalidad temprana (EMS) y este nombre aún persiste (Lightner *et al.*, 2012; Thitamadee *et al.*, 2015; Hong *et al.*, 2016).

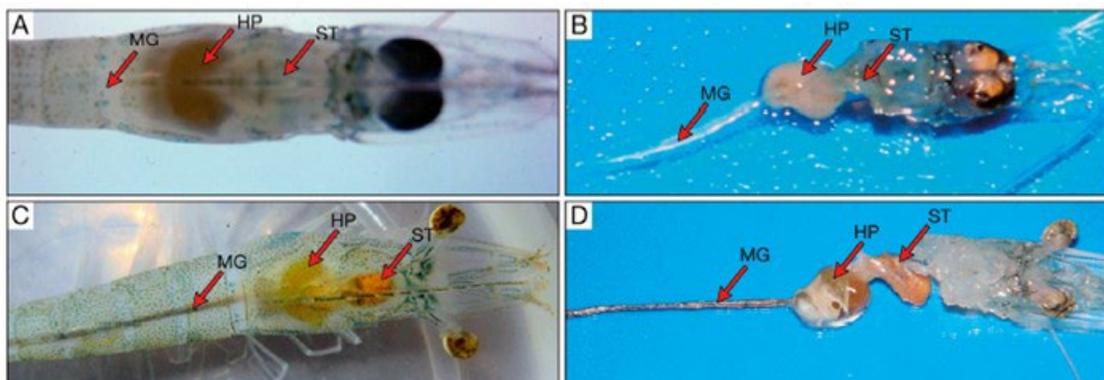


Fig. 3: Camarón de la especie *Penaeus vannamei*. (A, B) Signos evidentes de camarones infectados con AHPND. Hepatopáncreas pálido, atrofiado (HP), y estómago (ST) e intestino medio (MG) vacíos, inducido por bioensayo de inmersión. (C, D) Camarón normal en el grupo de control negativo, que muestra un HP de tamaño normal con color naranja oscuro y estómago e intestino medio llenos. (B) y (D) son individuos disecados de (A) y (C), respectivamente. Tomado de: Tran *et al.* (2013).

Mediante el aislamiento de bacterias de camarones enfermos y estudios de infección de laboratorio, el agente causal se identificó como cepas virulentas de *V. parahaemolyticus* y fue incluido por la OIE como una enfermedad de declaración obligatoria en 2016. Histológicamente, la AHPND se caracteriza por presentar tres etapas de desarrollo, denominadas aguda, intermedia y terminal (Fig. 4). En la fase aguda, el hepatopáncreas infectado muestra desprendimiento de las células epiteliales de los túbulos de la membrana basal y degeneración del epitelio de los túbulos en ausencia de células bacterianas. Durante la fase intermedia se llevan a cabo las melanizaciones de túbulos necrosados, iniciando en las zonas proximales y avanzando hacia las zonas distales, de manera que se inicia la infección bacteriana detectable y continúa el desprendimiento celular. En la etapa terminal, trasciende la destrucción del hepatopáncreas por la acción bacteriana, se presenta una severa infiltración hemocítica intra y extratubular acompañada de melanosis y necrosis, y generalmente se presentan infecciones bacterianas secundarias (Tran *et al.*, 2013; Valera-Mejías *et al.*, 2014; OIE, 2019; FAO, 2020; Aranguren-Caro *et al.*, 2020).

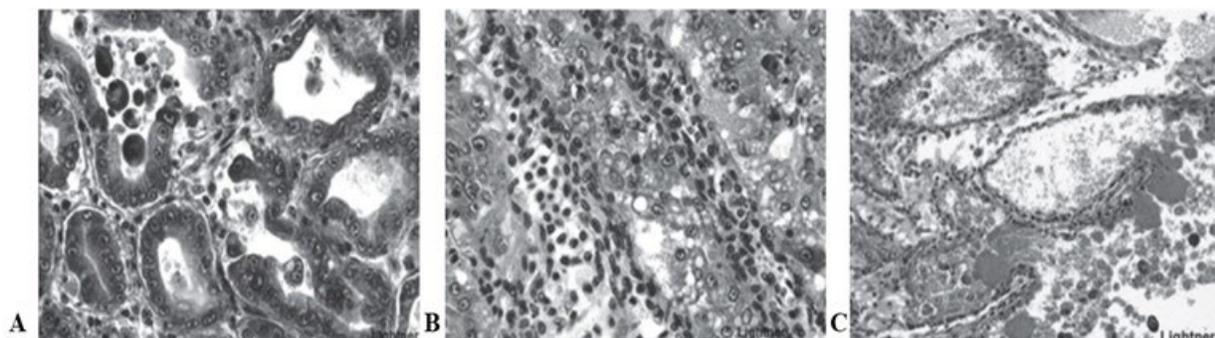


Fig. 4: Etapas de desarrollo de AHPND. (A) Fase aguda. (B) Fase intermedia. (C) Etapa terminal. Fotos de D.V. Lightner. Tomado de: Valera-Mejías *et al.*, (2014).

2.3.1. *Vibrio parahaemolyticus* Identificado como Agente Causal de AHPND

De acuerdo con la FAO (2020), las especies del género *Vibrio* son bacterias gramnegativas con forma de bastón que se encuentran en ambientes marinos y estuarinos en todo el mundo. *Vibrio* spp. se puede encontrar en la superficie del camarón o en el agua circundante y aprovecha las lesiones en el exoesqueleto o el estado de depresión inmunológica para penetrar en los organismos

(Peña-Osorio y Cuéllar-Anjel, 2019). Los genomas de estas *Vibrio* spp. que causan AHPND contienen un plásmido de ~70 kb que alberga genes que codifican las toxinas mortales PirAB^{VP} con similitud estructural con las proteínas PirA (12,7 kDa) y PirB (50,1 kDa) de los insectos relacionados al género *Photorhabdus*, que codifican una delta-endotoxina. El plásmido se denominó pVPA3-1 en Han et al. (2015a) y como pVA1 en Lee et al. (2015). Además de estos genes de toxina, el plásmido también codifica genes de transferencia conjugativa y transposones lo que sugiere la posibilidad de movilización del plásmido en otras cepas o especies (Lee et al., 2015). Estas cepas de *Vibrio* spp. identificadas como agentes causales de AHPND son una parte normal de la microbiota en los estanques de camarones, pero generalmente solo se sabe que son invasores oportunistas secundarios cuando se asocian con enfermedades de estos animales acuáticos. Vp_{AHPND}, se utiliza para referirse al agente causal *V. parahaemolyticus*, que se identificó por primera vez en asociación con AHPND. En los últimos años, se ha incrementado los reportes que indican que los genes PirAB^{VP} no están presentes solo en *V. parahaemolyticus* sino también en otras especies del género *Vibrio* incluyendo *V. harveyi*, *V. owensii*, *V. campbelli* y *V. punensis*. También se ha registrado la aparición de otras cepas de *V. parahaemolyticus* positivas a AHPND (Vp_{AHPND}) mutantes, debido a la interpretación o a la eliminación de PirAB^{VP}, lo cual ha afectado el nivel de patogenicidad. Las cepas no virulentas acarrean un plásmido que carece completamente de genes de toxina, pero posee una secuencia de inserción que podría tener actividad de transposición y ser envuelto en delección y/o inserción de genes de toxina. Se sabe también que la toxina binaria PirAB^{VP} induce la muerte celular a través de la formación de poros en las membranas de las células del camarón, lo que lleva a la degradación de los tejidos y la disfunción de los órganos digestivos. No obstante, el muestreo genómico sugiere que la mayoría de *Vibrio* spp. pertenecen a la especie de *V. parahaemolyticus* que se agrupan dentro del clado *Vibrio harveyi* (Han et al., 2016; Hong et al., 2016; Xiao et al., 2017; Yan et al., 2019; FAO, 2020, Kumar et al., 2020).

2.3.1.2. Posibles orígenes de cepas americanas de *Vibrio parahaemolyticus* asociadas con AHPND. De acuerdo con Restrepo et al. (2016), los aislamientos de la colección geográfica del sudeste asiático y México muestran regiones variables en el genoma del plásmido, lo que indica que, aunque no son iguales, aún conservan los genes de la toxina Pir. En dicho estudio, se reportó por primera vez una cepa patogénica de *V. parahaemolyticus* y dicho análisis genómico reveló que esta

cepa encontrada en América del Sur parece estar más relacionada con el sudeste asiático en comparación con las cepas mexicanas. Hasta la fecha, se han propuesto dos tipos de *V. parahaemolyticus* que albergan pVA1 (pVA1-Vp) según la presencia o ausencia del transposón Tn3: tipo mexicano (Tn3 positivo) y tipo asiático (Tn3 negativo) (Han *et al.*, 2015). En los últimos años, el número de secuencias pVA1-Vp asiáticas en las bases de datos públicas ha aumentado. Sin embargo, solo se han informado cuatro genomas de cepas aisladas de Latinoamérica. Por lo tanto, la mayor parte de la información sobre pVA1-Vp es derivado de los genomas de cepas asiáticas. González-Gómez *et al.* (2020), mencionan que las técnicas como la tipificación de secuenciación multilocus (MLST) y el análisis filogenómico de la alineación del genoma central han impulsado la generación de información sobre las relaciones genéticas entre cepas de pVA1 asiático-Vp. Con base en estas técnicas, recientemente se ha demostrado la diversidad genómica de cepas de *V. parahaemolyticus* relacionadas con eventos AHPND en granjas de Malasia, y también con ello se identificaron 15 genomas nuevos de pVA1-Vp y diferentes linajes entre cepas asiáticas (Fu *et al.*, 2017; Yan *et al.*, 2019). También se sugirió sobre la estructura de pVA1 latinoamericana ha sido escasa hasta hace poco, cuando se publicó el genoma cerrado de la cepa R14. Este genoma consta de dos cromosomas y el plásmido pVpR14_74Kb (tipo pVA1), pVpR14_56Kb y pVpR14_20Kb (Kanrar y Dhar, 2018). Por tanto, González-Gómez *et al.* (2020) afirman la necesidad de más estudios que incorporen una mayor diversidad de cepas, incluidas las cepas aisladas en las Américas, y analizar sus relaciones genéticas. En su estudio más reciente, que representa el análisis filogenómico más sólido e inclusivo de *V. parahaemolyticus* que alberga pVA1 realizado hasta la fecha, proporciona información sobre la epidemiología de AHPND, destacando que la alineación de la secuencia de nucleótidos de los plásmidos pVA1 albergados por las cepas asiáticas y latinoamericanas confirmó que la principal diferencia estructural en el plásmido entre las cepas asiáticas y latinoamericanas es la ausencia del transposón Tn3 en las cepas asiáticas; además de que se encontraron algunas deleciones en la región pirAB en dos de las cepas latinoamericanas, destacando con ello que el diagnóstico de la enfermedad mediante la detección de los genes PirA y PirB es un abordaje inadecuado debido a la inestabilidad de estos genes, cuya patología está mediada por una delta-endotoxina llamada toxina Pir que está codificada por los genes PirA y PirB que se albergan en un plásmido de aproximadamente 70 kb llamado pVA1.

2.3.2. Estado Actual de la AHPND

Desde la aparición de la enfermedad a la fecha se han probado diferentes alternativas de tratamientos como probióticos (caseros y comerciales), antibióticos (enrofloxacin, oxitetraciclina y florfenicol) y otros (tecnologías de cultivo y líneas genéticas); sin embargo, el problema sigue vigente, aunque la producción se ha recuperado aparentemente, en cuanto a la significancia estadística, la aparición de casos de AHPND en granjas es constante. Por ello, se plantea la constante necesidad de establecer estrategias alternativas para tratar de compensar las pérdidas ocasionadas y cumplir con la demanda de producción (Maldonado-Muñiz, 2020).

2.3.2.1. Estrategias de manejo para la prevención y el control de las enfermedades en acuicultura. Tradicionalmente, se ha considerado el uso de antibióticos a través de alimento y el agua de estanque como agente terapéutico en las granjas de acuicultura, lo anterior como medida de control ante las enfermedades bacterianas durante los brotes, el tratamiento para vibriosis ha incluido el uso (con resultados variables) de florfenicol (250 a 300 ppm) y enrofloxacin (200 a 300 ppm), incorporado en alimentos peletizados de camarón y suministrados cada 8 horas durante 10 días (Peña-Osorio y Cuellar-Anjel, 2019). Cuellar-Anjel (2015) señala que la eficacia del tratamiento depende de la detección temprana que se pueda hacer de la enfermedad y del inicio oportuno de la terapia medicada en las granjas de acuicultura.

El uso de antibióticos en concentraciones inefectivas y la consecuente resistencia generada en las bacterias ha favorecido la mortalidad de camarones. Es por ello que, que en los últimos años el uso de varios antibióticos está siendo restringido en varios países aun cuando muchos de ellos como la oxitetraciclina (OTC), tetraciclina, quinolonas, sulfonamidas y trimetoprima están permitidos para uso en acuicultura en Asia. Sin embargo, se asume que el uso de antibióticos en general es problemático. El uso en sistemas abiertos puede provocar la contaminación del medio ambiente y el uso en sistemas cerrados puede matar las bacterias beneficiosas. Además, el uso excesivo de antibióticos genera una fuerte presión selectiva que puede resultar en la transferencia de genes de resistencia asociados con plásmidos o transposones entre especies bacterianas. Ya existe evidencia de cepas de *Vp*_{AHPND} resistentes a los antibióticos; Han et al. (2015) demostraron que nueve cepas de *Vp*_{AHPND} de México y Vietnam eran resistentes a ampicilina, y dos cepas mexicanas eran

resistentes a tetraciclina (30 µg) y OTC (30 µg). En un estudio desarrollado por Soto-Rodríguez et al. (2006) concluyen que el uso de enrofloxacin es de poca utilidad para el tratamiento de larvas de camarón infectadas, ya que deben usarse concentraciones altas (20 µg ml⁻¹) para eliminar los patógenos potenciales *in situ* y esas concentraciones altas son tóxicas para las larvas. Asimismo, en otra investigación desarrollada por Soto-Rodríguez et al. (2015), afirman que la industria de México se vio profundamente afectada debido a la gran escala de mortalidad y la falta de respuesta a los antibióticos comúnmente utilizados en el cultivo de camarón como la enrofloxacin, oxitetraciclina y florfenicol. Por otra parte, también se han modificado pH, salinidad y se han aplicado productos químicos como desinfectantes tal como es el cloro directamente en el agua del estanque que, aunque estos no sean amigables con el ambiente y dejan residuos indeseados, ningún de estos tratamientos ha tenido éxito aparente. Cuando se sospecha que los camarones pudieran estar contaminados con bacterias patógenas, estos suelen ser desinfectados lavándolos con cloro mediante un baño de inmersión. Para que el cloro actúe adecuadamente como desinfectante, el agua que se usa para preparar la solución debe de tener un pH de 6 a 7.5 y es más efectivo a bajas temperaturas. Y la concentración residual que se recomienda para desinfectar camarón para consumo humano es de 10 ppm (partes por millón). Sin embargo, el cloro pierde su poder desinfectante conforme se disuelve el hielo. Por esta razón, es necesario medir constantemente como se encuentra la concentración de cloro y agregar más de ser necesario. (Soto-Rodríguez, 2013; del Valle-Herrera, 2016; Peña-Osorio y Cuéllar-Anjel, 2019; FAO, 2020).

En resumen, ya que se sabe que el uso de antibióticos para controlar estos agentes ha provocado problemas de resistencia a los fármacos y ha dado lugar a restricciones comerciales en los mercados de exportación. La acuicultura del camarón continúa identificando enfoques más efectivos y respetuosos del medio ambiente para mejorar la salud y el rendimiento de los camarones (Cuadro 4).

Cuadro 4. Estrategias para prevenir y controlar al *Vibrio* en la acuicultura del camarón (BIOMIN, s/a).

Estrategia	Descripción
Bioseguridad	La filtración, la desinfección y el saneamiento están entre las prácticas de bioseguridad. Los desinfectantes se pueden utilizar para tratar la fuente de agua como medida de bioseguridad en el criadero y el período de engorde. En el criadero, la vibriosis luminiscente se puede controlar lavando los huevos con yodo o cloro.

Probióticos	<p>Los probióticos son otro medio de control de enfermedades que se emplea en acuicultura. Los probióticos se administran directamente en el agua o a través del alimento. Los probióticos inhiben activamente la colonización de patógenos potenciales en el tracto digestivo mediante la producción de sustancias bactericidas, la competencia por los nutrientes y el espacio y la modulación del sistema inmunitario.</p> <p>Ciertas especies probióticas parecen ser mejores que otras para inhibir el crecimiento del <i>V. parahaemolyticus</i> patógeno. Se ha demostrado que cepas probióticas como <i>Lactobacillus reuteri</i>, <i>Pediococcus acidilactici</i>, <i>Enterococcus faecium</i> y <i>B. subtilis</i> inhiben a <i>V. parahaemolyticus</i>.</p>
Antimicrobianos	<p>Las estrategias para usar antimicrobianos a fin de reducir los efectos del <i>Vibrio</i> (particularmente <i>V. parahaemolyticus</i>) en el sistema digestivo del camarón pueden ayudar a proteger al animal.</p> <p>Se ha demostrado que ciertas mezclas de aceites esenciales y mezclas de ácidos orgánicos son efectivas debido a su potencial inhibidor del <i>Vibrio</i>.</p> <p>Estos compuestos pueden agregarse al alimento para lograr un efecto en el sistema digestivo del animal.</p> <hr/>

2.3.3. Desarrollo de Tratamientos Alternativos en Acuicultura

El uso indiscriminado de antibióticos ha conllevado a la búsqueda de alternativas en el tratamiento de enfermedades bacterianas, entre ellas la aplicación de bacteriófagos, los cuales infectan y destruyen selectivamente bacterias (Fernández-Espinel *et al.*, 2017). Entre las estrategias para prevenir su aparición, se podría considerar el uso de agentes quimioterapéuticos y desinfectantes; sin embargo, estas estrategias tienen efectos secundarios sobre la calidad del camarón en salmuera y el medio ambiente. Como consecuencia, el uso de bacteriófagos (fagos) está ganando interés en la acuicultura (Quiroz-Guzmán *et al.*, 2018).

2.4. Biología de los Bacteriófagos

Los bacteriófagos, también denominados fagos, pertenecen al grupo de los virus y se caracterizan porque son virus que infectan bacterias. Se podría comparar con una especie de parásito intracelular

obligado, en el cual, llevan a cabo su ciclo biológico. Poseen su propio material genético y usan la maquinaria del genoma de la célula hospedadora para replicarse. Son capaces de permanecer largos períodos inactivos hasta que detectan un hospedador e inyectan su material genético, este proceso se denomina infección. El organismo humano está acostumbrado al contacto con los fagos, ya que son consumidos regularmente en los alimentos, son colonizadores habituales del intestino humano y son muy abundantes en el medio ambiente, pues son la forma de vida más numerosa en la Tierra y se calcula que existen 1×10^{31} fagos por litro de agua de mar, lo que representa un excelente mecanismo de control de las bacterias marinas, ya que se produce un equilibrio entre las bacterias que se multiplican y los fagos que destruyen una parte de esa población bacteriana (Ronda *et al.*, 2003; Vispo *et al.*, 2016; FAO, 2020; Millares de la Peña, 2020). No obstante, son sensibles a la mayoría de agentes físicos (deseccación, radiaciones, calor) y químicos (formol, cloroformo), pero son resistentes a la mayoría de los antibióticos (Granados-Pérez y Villaverde-Peris, 2003).

2.4.1. Estructura Y Composición

Los bacteriófagos, o fagos, son virus que contienen ADN o ARN y se replican en las células bacterianas. Poseen un estado intracelular y uno extracelular. En el estado extracelular se denominan viriones y pueden ser considerablemente complejos, mientras que en el estado intracelular su material genético forma parte del genoma del hospedero y se denominan profagos. Los viriones son la partícula viral completa y con capacidad infectante, rodeado de una estructura proteica llamada cápside. La cápside está formada por subunidades estructurales denominadas capsómeros, los cuales se organizan de un modo preciso y repetitivo alrededor del ácido nucleico reconociéndose dos tipos de simetría: helicoidal (semejante a forma de resorte) e icosaédrica, característica de los bacteriófagos. El tamaño de los fagos oscila entre 20 y 200 nm. Algunos fagos son estructuralmente más complejos, sin embargo, se componen de seis partes estructurales (Fig. 5): cabeza, collar (que une la cabeza con la cola), cola (consta de un tubo hueco rodeado de una vaina helicoidal contráctil), placa terminal (al final de la cola, con forma hexagonal), fibras de la cola (fibras largas que salen de la placa) y ganchos (fibras cortas que salen de la placa) (Ronda *et al.*, 2003; Negroni y González, 2017; Millares de la Peña, 2020; Barriosnuevo-Pérez, 2020).

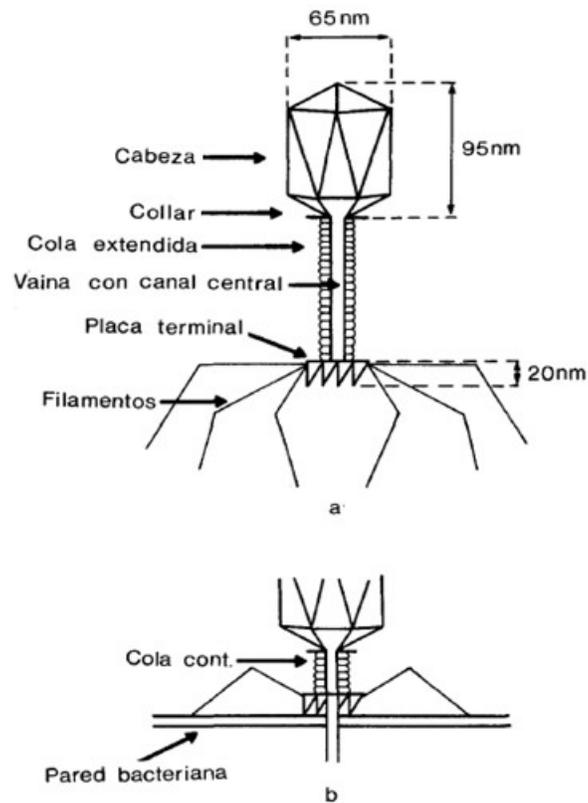


Fig. 5: Representación esquemática de un fago myovirus. a) El virión se encuentra con la cola no contraída y las fibras extendidas, cabe señalar que no todos los fagos tienen esta forma y mecanismo de inyección. b) La cola está contraída, las espículas, fijadas a la pared bacteriana y el canal central, en el interior del citoplasma. Tomado de: Pumarola et al., (1997).

2.4.2. Clasificación de los Bacteriófagos

El Comité Internacional de Nomenclatura de Virus (ICTV, por sus siglas en inglés), clasifica los fagos en atención a su rango de hospedador, características físicas (estructura, tamaño de la cápside y forma), tipo de material genómico (DNA O RNA de cadena simple o doble) y tamaño del genoma (Otero-Carrera, 2019). La mayoría de los fagos descubiertos, se encuentran clasificado en el orden *Caudovirales* (Cuadro 5), ampliamente distribuidos en todos los ecosistemas de la tierra; este orden representa el 96% de todos los fagos conocidos y se caracterizan por agrupar virus con una cabeza icosaédrica, cola y ADN de doble cadena. (Barriosnuevo-Pérez, 2020).

En la taxonomía actual el orden *Caudovirales* que es uno de los más importantes se compone de 14 familias, 73 subfamilias, 927 géneros y 2814 especies. Las tres familias más representativas

están caracterizadas por ser fagos sin membrana lipídica, compuestos de una cabeza con simetría icosaédrica: *Myoviridae* (cola contráctil), *Siphoviridae* (cola larga no contráctil) y *Podoviridae* (cola extremadamente corta). El resto de fagos son cúbicos, filamentosos o fagos pleomórficos con ADN de cadena doble o simple, o bien, con ARN de cadena doble o simple (Fig. 6) (García *et al.*, 2010). Finalmente, respecto al orden *Caudovirales*, cabe señalar que en los últimos años se propusieron dos nuevas familias, *Ackermannviridae* y *Herelleviridae*, en los años 2017 y 2018, respectivamente (Otero-Carrera, 2019). Como ya se mencionó los fagos de cola son las formas morfológicas predominantes. Algunos de estos tienen genomas menores de 10 kb, pero la mayoría son mayores de 15 kb; generalmente los *Siphoviridae* tienen genomas más largos de 20 kb pero no tan largos como los *Myoviridae*, con genomas >125 kb (Ríos-Sandoval, 2019).

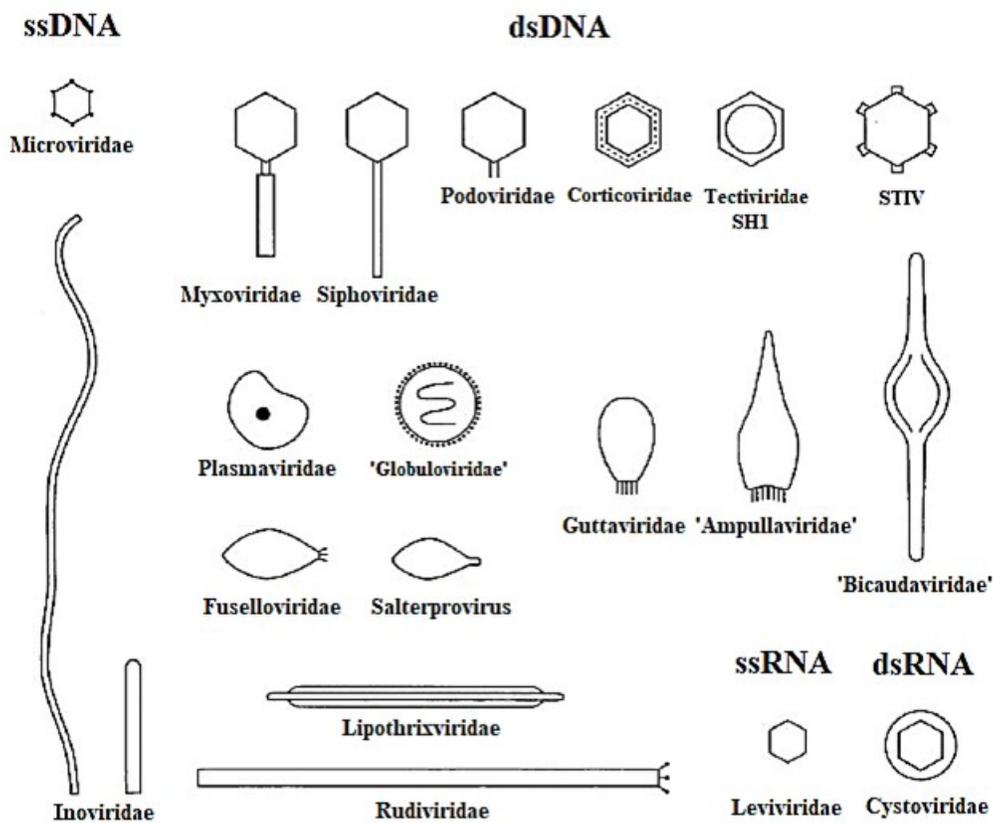


Fig. 6: Morfotipos de virus procariotas. Tomado de: (Ackerman, 2009).

Cuadro 5. Clasificación taxonómica de la clase *Caudoviricetes*

Clase	Familia	Subfamilia	Genero	Especies
	<i>Ackermannviridae</i>			
	<i>Aggregaviridae</i>			
	<i>Assiduviridae</i>			
	<i>Autographiviridae</i>			
	<i>Casjensviridae</i>			
	<i>Chaseviridae</i>			
	<i>Demereciviridae</i>			
	<i>Drexleriviridae</i>			
	<i>Duneviridae</i>			
	<i>Forsetiviridae</i>			
	<i>Guelinviridae</i>			
	<i>Helgolandviridae</i>			
	<i>Herelleviridae</i>			
	<i>Kyanoviridae</i>			
	<i>Madisaviridae</i>			
	<i>Mesyanzhinovviridae</i>			
<i>Caudoviricetes</i>	<i>Molycolviridae</i>	37	493	3601
	<i>Naomviridae</i>			
	<i>Orlajensenviridae</i>			
	<i>Pachyviridae</i>			
	<i>Peduoviridae</i>			
	<i>Pervagoviridae</i>			
	<i>Rountreeviridae</i>			
	<i>Salasmaviridae</i>			
	<i>Saparoviridae</i>			
	<i>Schitoviridae</i>			
	<i>Straboviridae</i>			
	<i>Suolaviridae</i>			
	<i>Vertoviridae</i>			
	<i>Vilmaviridae</i>			
	<i>Winoviridae</i>			
	<i>Zierdtviridae</i>			
	<i>Zobellviridae</i>			

Fuente: (ICTV, 2022)

2.4.3. Ciclo de Vida de los Bacteriófagos

Dependiendo de su estilo de vida, los bacteriófagos pueden desarrollar dos mecanismos distintos: el ciclo lítico o el ciclo lisogénico. Se dividen en fagos virulentos y templados (Fig. 7b). Los fagos virulentos siguen estrictamente un ciclo lítico mediante el cual se multiplican dentro de la célula bacteriana para finalmente lisis la célula y liberar la progenie del fago. Por el contrario, los fagos

templados pueden entrar en el ciclo lisogénico insertando su DNA en el cromosoma bacteriano (profago) donde se replica como parte del genoma del huésped hasta que puede inducirse a entrar en el ciclo lítico (García *et al.*, 2010).

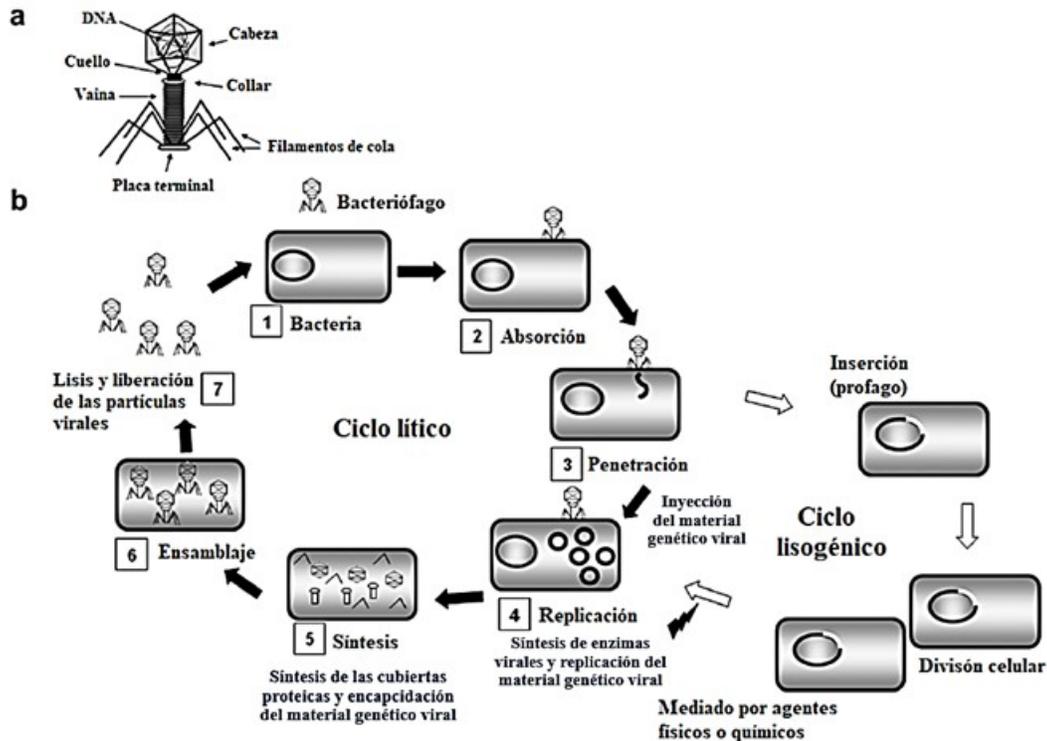


Fig. 7: Estructura de un bacteriófago de cola típico (a) y los pasos durante los ciclos de vida lítico y lisogénico del bacteriófago (b). Los fagos templados pueden seguir el ciclo lisogénico mediante la integración en el genoma del huésped. Después de la infección o activación del profago, el huésped se lisa para liberar la nueva progenie. Modificado de: (García *et al.*, 2010).

2.4.3.1. Ciclo lítico. En el ciclo lítico, los fagos usan las fibras para fijarse a los receptores que se encuentran en la pared de la bacteria que infectarán. La cola del virus libera una enzima, la lisozima del fago, que degrada una porción de la pared bacteriana. Luego, la vaina se contrae y el fago inyecta su ácido nucleico en la bacteria. A continuación, se produce la biosíntesis de los componentes virales, seguida de la maduración donde se ensamblan los nuevos viriones y proteínas de lisis, que, en última instancia, lisan la bacteria huésped. Este último paso lítico es precisamente donde reside la actividad antimicrobiana del fago. Este ciclo se caracteriza por ser de mayor velocidad de propagación, replicación y liberación que el otro ciclo. Por lo general, los fagos que

desarrollan este ciclo son seleccionados para realizar fagoterapia (García *et al.*, 2010; Barriosnuevo-Pérez, 2020).

2.4.3.2. Ciclo lisogénico. En el ciclo lisogénico, el DNA del fago se integra al genoma bacteriano. Este se denomina profago y permanece inactivo. Las células bacterianas hospedadoras se conocen como bacterias lisogénicas o fagos temperados, no destruyen al hospedero después de la adsorción del fago y la penetración del material genético; aquí el material genético del fago se integra al cromosoma del hospedero mediante un evento de recombinación específica de sitio y a continuación se replican como parte del genoma bacteriano. La célula lisogénica resultante puede replicarse indefinidamente, pero puede inducirse a regresar al ciclo lítico con la escisión del ADN del fago del cromosoma (Campbell, 2003; Negroni y González, 2017).

La bacteria lisogénica es inmune a la infección por el fago homólogo al profago que ella vehicula, debido a que éste sintetiza continuamente un represor específico que reprime la expresión de las funciones víricas. Se presenta una lisis espontánea si se interrumpe la síntesis del represor, el profago es separado del cromosoma de la bacteria y se inicia un ciclo lítico que conduce a la lisis de la célula huésped. Por su parte, la inducción consiste en el cambio de estado del profago a fago vegetativo, mediado por agentes físicos o químicos (rayos UVA, rayos X, rayos γ , sustancias reductoras y mutagénicas). La inducción se puede inhibir si se expone la bacteria a la luz del sol. Pero, también existen fagos atemperados no inducibles. En lo que respecta a los fenómenos de transferencia genética, la presencia de un profago que se comporta como un nuevo gen bacteriano puede modificar el genoma de la bacteria, de modo que tenga propiedades diferentes de las que originalmente tenía. Puede afectar a las propiedades bioquímicas, antigénicas y toxigénicas de la bacteria, y su sensibilidad a otros fagos y a la acción quimioterapéuticos y antimicrobianos (Granados-Pérez y Villaverde-Peris, 2003).

2.4.5. Fagoterapia: Terapia con Bacteriófagos

El conocimiento de estos virus se inicia con los estudios de Frederick Twort, bacteriólogo británico,

en el año 1915, al demostrar que: “hay virus que infectan bacterias y las matan”. Pero fue hasta 1917 que el francés Félix d’Herelle, desarrolló, con éxito, protocolos terapéuticos para infecciones digestivas en animales y humanos. Tanto D’Hérelle en 1917 como Twort en 1915, fueron capaces de demostrar placas de lisis que se producían cuando se añadían extractos obtenidos de aguas fecales a cultivos bacterianos apropiados. Se sabe que los bacteriófagos han sido la herramienta base de laboratorio para el desarrollo de las ciencias en virología y en biología molecular (Summer, 2001; Domínguez-Navarrete, 2020; Brives y Pourraz, 2020).

Debido a los problemas del uso de antibióticos, la terapia con fagos se ha convertido en una alternativa prometedora y un método natural para controlar las enfermedades bacterianas. Entre las ventajas de usar fagos para el control de enfermedades, se destaca que el riesgo de que las bacterias lleguen a desarrollar resistencia es menor, afectan solo a las bacterias objetivo, son relativamente económicos y se aplican fácilmente en el campo (administrados a través de alimento o por liberación directa en agua). La terapia con fagos no causa ninguno de los efectos secundarios asociados con el uso de antibióticos. Se han propuesto como un método alternativo dado el historial de éxito en el control de las enfermedades del camarón causadas por *Vibrio* patógeno y ha mostrado potencial para su uso en el control de AHPND, ya que muestran una actividad bacteriolítica efectiva. Asimismo, los fagos son naturales y son más comunes y diversos, y ampliamente distribuidos en el medio ambiente, incluido el agua de mar, no tóxicos para camarones, y también son relativamente baratos. Además, se han utilizado durante muchos años como una alternativa a los antibióticos en varios países, y son un posible tratamiento contra las cepas resistentes a múltiples medicamentos de muchas bacterias (Han *et al.*, 2018; FAO, 2020). Los fagos tienen la capacidad de infectar y destruir bacterias específicas en el estanque. Al igual que los probióticos y los inmunomoduladores, los fagos también inducen la respuesta inmune en los camarones por los restos de *V. parahaemolyticus* lisados con fagos. Y se ha obtenido evidencia de que el cóctel de fagos puede eliminar las bacterias patógenas, incluso si las bacterias desarrollan resistencia contra cualquiera de los fagos del cóctel (Alagappan *et al.*, 2016).

2.4.5.1. Relación de los bacteriófagos con la virulencia de *Vibrio*. La presencia de los bacteriófagos lisogénicos se ha visto como un problema serio, ya que se ha comprobado que en estado lisogénico las bacterias pueden incrementar su virulencia. En el caso específico de *Vibrio* se han aislado fagos

lisogénicos en las cepas de *V. harveyi*, *V. mimicus*, *V. parahaemolyticus* y otras bacterias que se consideran patógenas para el humano y/u organismos cultivados; los cuales se han asociado a la virulencia de sus respectivas cepas. Debido a esto, los fagos lisogénicos generalmente se consideran como vectores de genes indeseables. Inclusive, en trabajos recientes se sugiere que la virulencia de las bacterias que se han reportado altamente patógenas se debe exclusivamente a la presencia de los fagos lisogénicos (Makarov, 2011).

2.4.6. Vibriofagos Marinos: Herramienta para Combatir Infecciones en Acuicultura

Entre los diversos patógenos bacterianos asociados con el entorno de la acuicultura, *Vibrio parahaemolyticus* es un patógeno más importante transmitido por los alimentos afectando a la salud humana y también patógeno para los camarones. Aunque ha existido durante varias décadas, el control de patógenos bacterianos basado en fagos (terapia con fagos) ha resurgido recientemente como una alternativa atractiva debido a la disponibilidad de herramientas modernas de caracterización de fagos y la aparición global de bacterias resistentes a los antibióticos (Dubey *et al.*, 2021). Debido a la aparición de cepas de *V. parahaemolyticus* resistentes a múltiples fármacos, los bacteriófagos se han mostrado prometedores como agentes antimicrobianos que podrían usarse para controlar cepas resistentes a los antibióticos (Tan *et al.*, 2021). En base a diversos estudios previos, se tiene conocimiento de que el uso de bacteriófagos es una alternativa viable como terapia contra patógenos en la acuicultura, y suelen denominarse vibriofagos. Se han desarrollado diversos estudios sobre fagos aislados evaluados como efectivos en el control principal de la enfermedad del camarón cultivado, inhibiendo el crecimiento bacteriano (Cuadro 6).

Cuadro 6. Estudios que abordan temas relacionados con la fagoterapia contra *Vp* agente causal de la enfermedad de la Necrosis Aguda del Hepatopáncreas (AHPND) en especies de camarón desde 1982 hasta la fecha (los estudios están ordenados cronológicamente).

No.	Descripción	Referencia
1	Uno de los primeros trabajos y de importancia sobre vibriofagos marinos, constituyó en el aislamiento de 18 bacteriófagos líticos de agua de mar contra <i>V. parahaemolyticus</i> , y los caracterizaron en cuanto a variantes morfológicas, rango	Koga <i>et al.</i>, (1982)

-
- de especificidad, resistencia a temperaturas elevadas y sensibilidad a solventes, obteniendo solamente fagos de tipo myovirus y siphovirus con rango estrecho de especificidad y sensibles a diversos solventes.
- 2 Estudiaron la aparición y las propiedades de los fagos que infectan esta cepa pandémica de *V. parahaemolyticus* en aguas costeras. Al analizar 143 muestras, se encontraron fagos en 13. Todos los aislamientos se agruparon en un grupo estrechamente relacionado de podófagos con al menos el 90% de identidad de secuencia de nucleótidos en tres genes esenciales, a pesar de orígenes geográficos distantes. Estos bacteriófagos pudieron multiplicarse en la cepa pandémica de *V. parahaemolyticus*, pero el impacto sobre la concentración del hospedador y el crecimiento posterior fue insignificante. Las bacterias infectadas continuaron produciendo el fago, pero no se lisogenizaron. **Bastías et al., (2010)**
 - 3 Examinaron la distribución total de *V. parahaemolyticus* y sus fagos en estanques de camarones, agua de mar, estuario, superficie animal y tejidos. Tomaron ocho cepas identificadas bioquímicamente de *V. parahaemolyticus* (V1, V3-V6, V9, V11 y V12) para estudios de infección adicionales con bacteriófagos. Aislaron un total de cinco bacteriófagos capaces de infectar la cepa de *V. parahaemolyticus* MTCC-451 de todas las muestras. Uno de los bacteriófagos Vp1 aislados del estuario fue capaz de lisar todas las cepas de *V. parahaemolyticus* aisladas. **Alagappan et al., (2010)**
 - 4 Presentan la secuencia completa del genoma del fago Vibrio pVP-1, que pertenece a la familia *Siphoviridae* e infecta a *V. parahaemolyticus* ATCC 33844. **Kim et al., (2012)**
 - 5 Aislaron y secuenciaron completamente un fago específico contra esta bacteria. El fago vB_VpaM_MAR es capaz de lisar el 76% de las cepas de *V. parahaemolyticus* probadas. El análisis bioinformático mostró que el fago MAR está estrechamente relacionado con los fagos VHML, VP58.5 y VP882 de Vibrio y el fago ΦHAP-1 de *Halomonas aquamarina*. **Villa et al., (2012)**
 - 6 Evaluaron la efectividad de la terapia con fagos en la prevención y el control de la vibriosis en *Litopenaeus vannamei*. Introdujeron vibriosis en larvas de camarón con 2×10^6 CFU mL⁻¹ de *V. parahaemolyticus*. Las larvas infectadas se trataron con diferentes dosis de fagos seleccionados y se evaluó su eficacia en diferentes momentos después de su aplicación. Los resultados revelaron que los fagos líticos seleccionados (A3S y Vpms1) son eficaces para reducir la mortalidad causada por *V. parahaemolyticus*. Este estudio proporciona la base para el uso de bacteriófagos en la prevención y el control de *V. parahaemolyticus* en camarones. **Lomelí-Ortega y Martínez-Díaz, (2014)**
 - 7 Evaluaron la eficiencia de cócteles de dos y tres fagos de *V. parahaemolyticus* (VP-1, VP-2 y VP-3) para el control de Vibrio en acuicultura. Todos los fagos fueron eficaces contra *V. parahaemolyticus*, sin embargo, el fago VP-3 fue el más eficaz (reducción adicional de más de 2 log en comparación con los otros dos fagos). El uso de cócteles con dos y tres fagos fue significativamente más efectivo (reducciones de 4 log después de 2 h) que el uso de fagos VP-1 y VP-2 solos (reducciones de 0.8 log después de 2 h), sin embargo, la eficiencia del fago VP-3 fue similar para el fago solo y para el fago en los cócteles (reducción de 3,8 log y 4,2 log para el fago VP-3 solo y en cócteles, respectivamente, después de 8 y 6 h). **Mateus et al., (2014)**
 - 8 Solo se ha encontrado que el fago pVp-1 mata eficazmente Vp_{AHPND}. El fago pVp-1 es muy potente y lisa más del 90% de las cepas de Vp_{AHPND} que se aislaron de los países de Vietnam, México, Costa Rica, Honduras y América Central. **Jun et al., (2016)**

- 9 Aislaron y caracterizaron el *V. parahaemolyticus* y su potencial fago lítico del crecimiento de *Penaeus monodon* mediante la cría en estanques de camarones en Palk Strait, costa sureste de la India. Las características fenotípicas convencionales y la identificación molecular se confirmaron mediante la secuencia de ARNr 16S y para determinar los perfiles de resistencia a antibióticos. El fago lítico aislado (VVP1) fue más específico contra N1A *V. parahaemolyticus* y fue capaz de infectar cepas N7A *V. parahaemolyticus*, N3B y N13B *Vibrio alginolyticus*. Este estudio proporciona la aplicación de fagos como una estrategia útil para prevenir y eliminar o reducir *V. parahaemolyticus* patógeno del camarón en el sistema de acuicultura. **Stalin y Srinivasan, (2016)**
- 10 Tomaron tres fagos (VP1, VP7 y VP9) y *V. parahaemolyticus* patógeno (BG 24) y llevaron a cabo dos conjuntos de experimentos como fagos (individuales y cóctel) dispersos en agua y mezclados con la dieta para controlar la infección por *V. parahaemolyticus* en *Penaeus monodon*. Las aplicaciones de los fagos mostraron resultados prometedores cuando se administraron por vía oral contra la infección por *V. parahaemolyticus*. Esto reveló que el uso de fagos como medida terapéutica y profiláctica para la infección en camarones reduce simultáneamente el patógeno de los mariscos, que causa infección en humanos. **Alagappan et al., (2016)**
- 11 En estudios de infección de laboratorio, los camarones tratados con pVp-1 antes (profilaxis) y después (terapia) de su exposición a *Vp*_{AHPND} mostraron una protección significativa, 25 a 50% de mortalidad, mientras que los grupos de control (no tratados con el fago pVp-1, solo expuestos a *Vp*_{AHPND}) mostró una mortalidad del 100%. **Jun et al., (2018)**
- 12 Para el bacteriófago pVp-1, se analizó su infectividad en 22 cepas de *V. parahaemolyticus*. Este fago pudo infectar el 91% (20 cepas) del *Vp* probado y demostró una fuerte actividad bacteriolítica contra 3 cepas altamente patógenas. **Han et al., (2018)**
- 13 En este estudio, se caracterizaron seis nuevos bacteriófagos específicos de *V. parahaemolyticus* (vB_VpaP_KF1 ~ 2, vB_VpaS_KF3 ~ 6) a nivel molecular. El análisis de similitud genómica reveló que estos seis bacteriófagos podrían dividirse en dos grupos con diferentes características genómicas, agrupaciones filogenéticas y morfologías. Dos grupos de bacteriófagos tenían sus propios genes con diferentes mecanismos de infección, ensamblaje y metabolismo. Sus resultados podrían utilizarse como referencia futura para estudiar la genómica de los fagos o aplicar los fagos en futuros estudios de biocontrol. **Yu et al., (2018)**
- 14 Investigaron el efecto de la terapia con fagos (fagos únicos y cócteles) sobre la eclosión y supervivencia de quistes y nauplios de camarón de salmuera (*Artemia franciscana*) expuestos a cepas patógenas de *V. parahaemolyticus* y *V. harveyi*. Los resultados revelaron que la aplicación de fagos individuales mejoró significativamente ($p < 0,05$) el éxito de la eclosión y la tasa de supervivencia, incluso con una baja multiplicidad de infección (MOI). **Quiroz-Guzmán et al., (2018)**
- 15 Aislaron e identificaron bacteriófagos líticos contra *V. parahaemolyticus* asociado con AHPND. Analizaron sus propiedades biológicas, de muestras de agua de mar de Fujian y México mediante el método de cultivo en agar de doble capa. Utilizaron una cepa de *V. parahaemolyticus* asociada con AHPND como la cepa bacteriana huésped para el aislamiento y la amplificación de fagos. Determinaron el rango de lisis y las propiedades biológicas, incluida la multiplicidad óptima de infección (MOI), la estabilidad térmica, la estabilidad del pH, la estabilidad al ácido peracético y la estabilidad de supervivencia a diferentes temperaturas. Este estudio es el primer informe de bacteriófagos líticos de *Podoviridae* contra **Huan et al., (2019)**

- V. parahaemolyticus* asociado a AHPND en China. Los resultados pueden enriquecer los recursos de los bacteriófagos contra *V. parahaemolyticus* asociado a AHPND y proporcionar una aplicación potencial de fagos como agente de control biológico.
- 16 Aislamiento de un nuevo fago virulento llamado vB_ValP_IME271 (fago designado IME271), que infecta a *V. alginolyticus* y se aisló del agua de mar. El estudio identificó un nuevo bacteriófago lítico *Podoviridae*, que es infeccioso para *V. alginolyticus* y *V. parahaemolyticus*. Este bacteriófago podría potencialmente usarse para controlar las infecciones por *V. alginolyticus* y *V. parahaemolyticus* en animales marinos **Li et al., (2019)**
- 17 Aislaron un fago lítico VP06 de la ostra utilizando *V. parahaemolyticus* como huésped. VP06 es un fago *Siphoviridae* con una cabeza poliédrica y una cola larga. La secuencia genómica de VP06 es similar a las de un fago lítico de *Vibrio vulnificus* SSP002 y un fago templado de *V. parahaemolyticus* vB_VpaS_MAR10, aunque VP06 tiene características distintas en la disposición de CDS y 14 CDS únicos. Este fago lisó el 28,1% de varias cepas de *Vibrio*, y la eficacia del método de enchapado reveló que VP06 era muy eficaz en la lisis de cepas de *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio azureus*, *Vibrio harveyi* y *V. parahaemolyticus*. **Wong et al., (2019)**
- 18 Aislaron un bacteriófago lítico, denominado Vibrio fago vB_VpP_BA6, de las aguas residuales recogidas en Guangzhou, China. Este fago puede representar un agente terapéutico potencial contra *V. parahaemolyticus* resistente a múltiples fármacos. **Yang et al., (2019)**
- 19 En este estudio, evaluaron el uso de bacteriófagos T2A2 y VH5e para controlar diferentes cepas positivas para AHPND (presuntamente identificadas como *V. parahaemolyticus*, Vp_{AHPND}) en condiciones de laboratorio. Corroboraron el efecto lítico de los bacteriófagos T2A2 y VH5e contra diferentes cepas aisladas de brotes de AHPND. Descubrieron que el cóctel de fagos era inofensivo para los organismos. Estos resultados sugieren que vale la pena considerar la mezcla de fagos como una posible medida de control para las cepas AHPND positivas, aunque está claro que se necesitan pruebas adicionales y más extensas, ya que los fagos no se secuenciaron y, por ende, se desconoce si su uso es seguro. **Makarov et al., (2019).**
- 20 Identificaron un vibrofago denominado “Seahorse”. El fago Seahorse se clasificó en la familia *Siphoviridae* debido a su cápside icosaédrica rodeada de fibras de la cabeza y una cola larga no contráctil, pudo infectar al huésped en un amplio rango de pH y temperaturas, y tuvo un período latente relativamente corto (casi 30 min) en el que produjo una progenie de 72 partículas por célula al final de su ciclo lítico. Estas características infecciosas no solo añaden el fago Seahorse a la biblioteca de fagos que se dirigen a Vp_{AHPND}, sino que también lo convierten en un candidato potencial para un agente de control biológico. Desafortunadamente, en un contexto terapéutico, el fago Seahorse no es apropiado para su aplicación debido a la capacidad de entrar en el ciclo lisogénico, lo que hace que el fago no sea seguro para el tratamiento. **Thammatinna et al., (2020)**
- 21 φVP-1 es un fago lítico de *V. parahaemolyticus* que se aisló de una muestra de agua de una granja acuícola con el objetivo de evaluar su potencial como agente de biocontrol y determinar sus propiedades fisicoquímicas y secuencia genómica. El análisis morfológico por microscopía electrónica de transmisión y el análisis filogenético basado en el gen de la subunidad grande de la terminasa mostró que este fago pertenece a la familia *Myoviridae*. Las características genéticas de este nuevo fago sugieren que podría ser aplicable para la terapia con fagos contra cepas patógenas de *V. parahaemolyticus*. **Matamp y Bhat, (2020)**

- 22 Aislaron dos bacteriófagos líticos de las aguas residuales recolectadas en Guangzhou, China, a saber, vB_VpS_BA3 y vB_VpS_CA8. Los presentes resultados indican que CA8 es potencialmente aplicable para el control biológico de *V. parahaemolyticus* resistente a múltiples fármacos. **Yang et al., (2020)**
- 23 Aislaron y caracterizaron un nuevo fago lítico PG07 contra *V. parahaemolyticus*, que pertenecía a la familia *Siphoviridae* y podría considerarse como un nuevo virus similar a T5. PG07 redujo significativamente la mortalidad de camarones desafiados con *V. parahaemolyticus*. Los hallazgos destacan el potencial de PG07 como un agente antibacteriano eficaz para la profilaxis de fagos y terapia de fagos en acuicultura. **Ding et al., (2020)**
- 24 En el presente estudio, aislaron un total de 12 fagos específicos de *V. parahaemolyticus* de 264 muestras de agua recolectadas de granjas de cultivo de camarón salino tierra adentro. Durante el análisis del rango de hospedadores frente a aislados estándar de campo de *V. parahaemolyticus* y otras especies bacterianas, se observó actividad lítica frente al 2,3-45,5% de los aislados de *V. parahaemolyticus* analizados. Estos resultados indican el potencial de la terapia con fagos para el control de *V. parahaemolyticus* en camarones. **Dubey et al., (2021)**
- 25 Aislaron un fago de *V. parahaemolyticus*, vB_VpaP_MGD2, de una almeja (*Meretrix meretrix*) y realizaron la caracterización para evaluar su capacidad potencial para el control biológico. Este es el primer informe de un miembro del género *Zindervirus* que puede infectar a *V. parahaemolyticus*. Estos hallazgos sugieren que vB_VpaP_MGD2 puede ser un agente de control biológico candidato contra (EMS/AHPND) causada por *V. parahaemolyticus* multirresistente en la producción de camarón. **Cao et al., (2021)**
- 26 En este estudio, seis bacteriófagos aislados de las muestras de mariscos demostraron una especificidad de rango de hospedador estrecho que infecta solo a las cepas de *V. parahaemolyticus*. Los resultados de este estudio proporcionaron una comprensión básica de las propiedades fisiológicas y biológicas de los fagos aislados antes de que puedan usarse fácilmente como agente de control biológico contra el crecimiento de *V. parahaemolyticus*. **Tan et al., (2021)**
-

En este estudio se pretende caracterizar biológica, morfológica y genómicamente bacteriófagos con actividad lítica contra cepas de *V. parahaemolyticus* causante de AHPND (*Vp* AHPND+) aislados de muestras de agua de mar, sedimentos y mariscos en Sinaloa, México, a través del uso de procedimientos bacteriológicos, microscopía (electrónica de transmisión) y análisis bioinformático, en la caracterización de fagos con potencial para ser evaluados en terapia de fagos.

3. JUSTIFICACIÓN

La prevalencia de la AHPND en cultivos de camarón en México y a nivel mundial sigue vigente y con incrementos que minan la comercialización del producto. A la fecha, se carece de una estrategia eficaz para el control de *Vibrio parahaemolyticus* causante de la AHPND. Las actividades culturales y el uso indiscriminado de antibióticos están generando más daños que beneficios. El uso de bacteriófagos puede ofrecer una solución alternativa para el control del agente causal de la AHPND y, por consiguiente, minimizar los daños ocasionados por las pérdidas económicas que esta enfermedad ocasiona.

La fagoterapia (terapia de fagos) en acuicultura es reciente, es por ello que, existen múltiples interrogantes sobre su utilización, de tal manera que, es necesario generar conocimiento sobre la caracterización de fagos para identificar su potencial como agentes de control biológico en el camarón. En la actualidad, existen estudios que han aislado y caracterizado biológica, morfológica y genómicamente fagos líticos contra *V. parahaemolyticus* asociado con AHPND y que sostienen que la aplicación de estos puede ayudar a controlar esta especie de *Vibrio* patógeno del camarón y el ser humano en el sistema de acuicultura; sin embargo, en México solo existen pocos estudios que han caracterizado parcialmente fagos con actividad lítica contra cepas Vp_{AHPND} aisladas en el noroeste del país y, por tanto, se carece de un cepario de fagos para aplicaciones en terapia de Vp_{AHPND} .

El presente estudio pretende generar nuevo conocimiento que contribuya como base para evaluar el potencial de aplicación de la terapia con fagos como agentes de control biológico contra *V. parahaemolyticus* mediante la aportación de nuevos fagos que fortalezcan la librería de fagos ya existente. Además, se pretende generar las bases para que en un futuro se pueda ofrecer un producto que cumpla con los requisitos que hoy en día son necesarios; amigable para con el medio ambiente, de fácil producción y que ayude a conservar la seguridad alimentaria.

4. HIPÓTESIS

1. Los bacteriófagos aislados en Sinaloa, México tendrán actividad lítica contra cepas *Vp* AHPND+ y características genéticas (sin genes de resistencia y virulencia) apropiadas para su aplicación terapéutica.
2. La concentración de la multiplicidad de infección 0.1 será el óptimo que generará el título máximo de bacteriófagos para el control de *Vp* AHPND+.
3. Los bacteriófagos con potencial lítico y estables a diferentes condiciones térmicas y fisicoquímicas tendrán un mejor efecto cuanto menor sea la multiplicidad óptima de infección (MOI = 0.01, 0.1 y 1).

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo General

Evaluar el potencial de bacteriófagos líticos aislados en Sinaloa, México para su uso como control biológico contra *Vibrio parahaemolyticus* causante de AHPND.

5.2. Objetivos Específicos

1. Aislar bacteriófagos líticos de *Vibrio parahaemolyticus* a partir de muestras de aguas de mar, de estero y mariscos en Sinaloa, México.
2. Caracterizar biológica, morfológica y genómicamente los bacteriófagos con actividad lítica contra cepas *Vp* AHPND+.
3. Determinar *in vitro* la actividad bacteriolítica de los bacteriófagos líticos seleccionados contra cepas *Vp* AHPND+.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

Para cumplir con los objetivos planteados se desarrollará el siguiente flujo de trabajo:

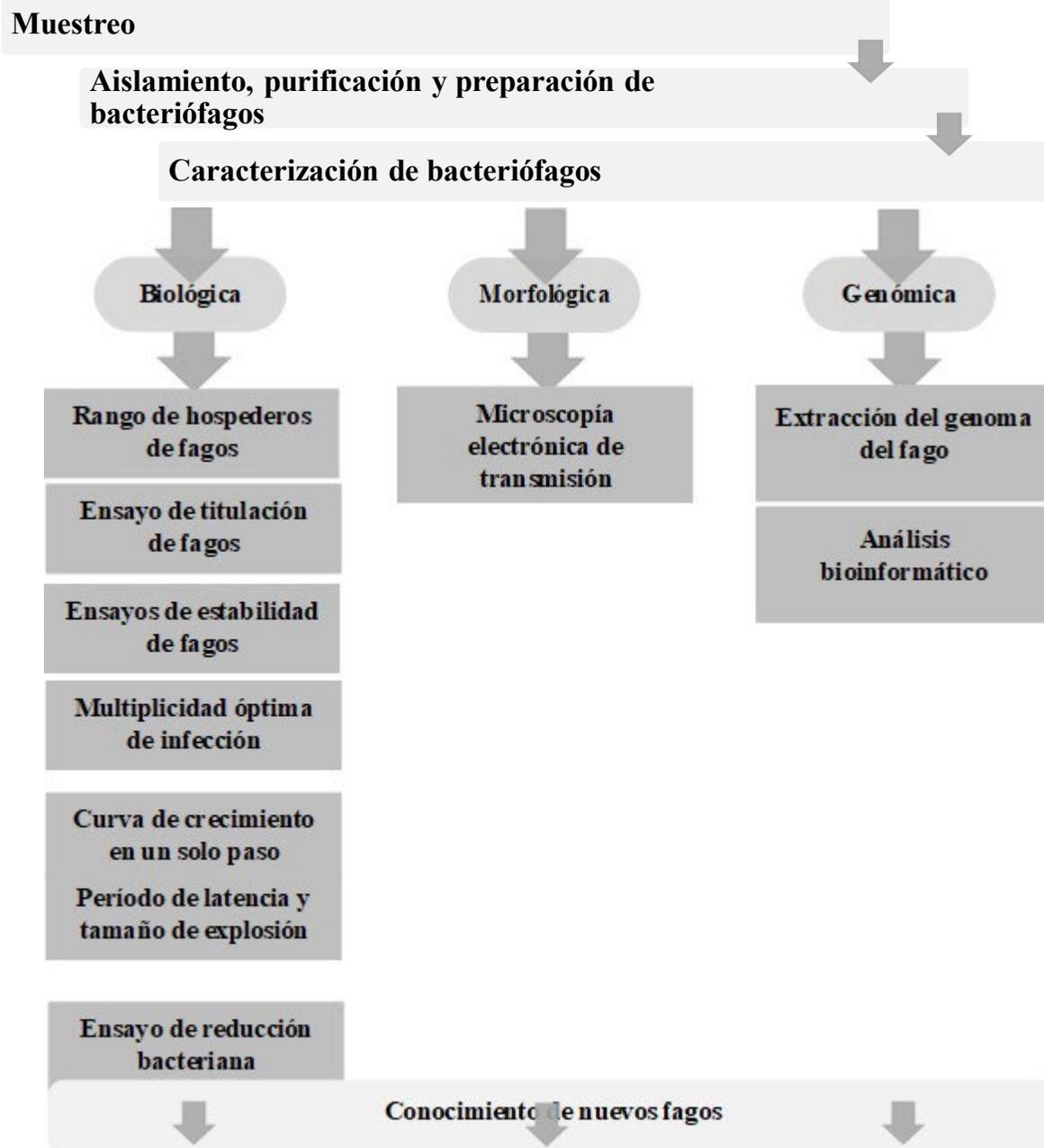


Fig. 8: Secuencia de trabajo para el aislamiento y caracterización de bacteriófagos líticos para el control de *Vibrio parahaemolyticus* causante de AHPND

6.1. Muestreo

Para el aislamiento de bacteriófagos de *V. parahaemolyticus*, se recolectaron 28 muestras de mariscos (almeja chocolate [*Megapitaria squalida*], camarón, ostión con y sin concha, pata de mula, caracol chino, calamar y surimi), agua de mar y de estero (Cuadro 7), en diferentes mercados, playas y puertos de Sinaloa, México. La recolección de las muestras sólidas y líquidas se llevó a cabo durante un período de un mes entre junio y julio de 2021 en los puntos del puerto de Altata, Culiacán, Los Mochis, playa El Maviri y el puerto de Topolobampo (Fig.9). Las muestras se tomaron con bolsas de polietileno con sello hermético y antigoteo estériles y fueron trasladadas en refrigeración al Laboratorio Nacional para la Investigación en Inocuidad Alimentaria (LANIIA) en las instalaciones del CIAD unidad Culiacán.



Fig. 9: Sitios de muestro en Sinaloa, México: a) Playa El Maviri – Muestra: Agua de Mar; b) Playa El Maviri

– Muestra: Agua de estero; c) Puerto de Topolobampo – Muestra agua de Mar; d) Toma de muestra en bolsa de polietileno con sello hermético y antigoteo estéril; e) Muestra: Ostión con concha; f) Muestra: Almeja chocolata.

Cuadro 7. Muestras de agua (mar y estero) y mariscos estudiados

Fuente	Muestra ID	Localización/ Coordenada geográfica	Fuente	Muestra ID	Localización (cont.)/ Coordenada geográfica (cont.)
	(1) A1		Caracol chino	(14) CH1	Los Mochis, Sinaloa, México/ 108°58'46.52"W 25°47'31.99"N
Agua de estero	(2) A2	Altata, Sinaloa, México/ 24°37'43.0"N 107°55'31.6"W	Almeja chocolata	(15) ALK	Los Mochis, Sinaloa, México/ 108°58'46.52"W 25°47'31.99"N
	(3) A3		Ostión sin concha	(16) O1	Los Mochis, Sinaloa, México/ 108°58'46.52"W 25°47'31.99"N
	(4) A4			(17) OC1	Los Mochis, Sinaloa, México/ 108°58'46.52"W 25°47'31.99"N
Agua de estero (canal)	(5) A5	Altata, Sinaloa, México/ 24°37'43.0"N 107°55'31.6"W	Ostión con concha Agua de mar	(18) M1	El Maviri, Sinaloa, México/ 25°34'51.0"N 109°07'16.1"W
	(6) A6			(19) M2	
Agua de mar (muelle)	(7) A7	Altata, Sinaloa, México/ 24°37'43.0"N 107°55'31.6"W	Agua de mar	(20) M3	El Maviri, Sinaloa, México/ 25°34'55.7"N 109°07'05.1"W
	(8) A8		(zona pesquera)	(21) M4	
Camarón (charola cóctel)	(9) C1	Culiacán, Sinaloa, México/ 24°48'21"N 107°27'54"W		(22) M5	
			Agua de estero	(23) M6	El Maviri, Sinaloa, México/ 25°34'55.7"N 109°07'05.1"W
Surimi de cangrejo (charola cóctel)	(10) S1	Culiacán, Sinaloa, México/ 24°48'21"N 107°27'54"W	Agua de estero	(24) M7	El Maviri, Sinaloa, México/ 25°35'43.9"N 109°05'57.3"W
			Agua de estero (estanques)	(25) M83	El Maviri, Sinaloa, México/ 25°36'47.5"N 109°03'55.3"W
Calamar (charola)	(11) CA1	Culiacán, Sinaloa, México/	Agua de estero	(26) M9	Topolobampo, Sinaloa, México/

M0905	Escuinapa, Sinaloa, México	Estómago de camarón
M2401	Angostura, Sinaloa, México	Hepatopáncreas de camarón
M2411	Angostura, Sinaloa, México	Hepatopáncreas de camarón
M2413	Angostura, Sinaloa, México	Hepatopáncreas de camarón
M2415	Angostura, Sinaloa, México	Hepatopáncreas de camarón

6.3. Aislamiento, Purificación Y Propagación de Fagos

El aislamiento de bacteriófagos se realizó de acuerdo con el protocolo de enriquecimiento estándar descrito con algunas modificaciones (Carlson, 2004; Mateus *et al.*, 2014; Thammatinna *et al.*, 2020). Brevemente, se realizó el enriquecimiento de muestras sólidas y líquidas. Para preparar el cultivo bacteriano de muestras sólidas se agregó 5 g de está, en 45 mL de caldo de soja tríptico suplementado con cloruro de sodio al 2.5% (TSB-NaCl al 2.5%) e inoculado con 1 mL de la cepa de interés. Por otra parte, para preparar el cultivo bacteriano de muestras líquidas se agregó 200 mL de está, en 200 mL de caldo de soja tríptico en doble concentración suplementado con cloruro de sodio al 2.5% (TSB 2X-NaCl al 2.5%) e inoculado con 1 mL de la cepa de interés. Cada una de las anteriores se incubó a 80 rpm a 30°C durante 18 h.

A partir de este cultivo, se tomó 30 mL de muestra enriquecida y se centrifugó a 10,000 rpm durante 10 min a 4°C para concentrar la biomasa bacteriana. La muestra concentrada se filtró secuencialmente utilizando membranas de policarbonato de 0.45 µm y luego por 0.22 µm de tamaño de poro. Posteriormente, se realizó la prueba de spot (que consisten en colocar 1 mL de la cepa de interés sobre 3 mL de agar de soja tríptico suplementado con cloruro de sodio al 2.5% (TSA-NaCl al 2.5%) y 10 µL de filtrado fágico. Después, se incubó a 37 °C por 24 h para detectar la presencia de fagos. Cierta transparencia en el área de inóculo indicó la presencia de fago. Y, para recuperar la placa, se realizó la purificación de fagos utilizando el método de agar de doble capa. Brevemente, se sembró por diluciones seriadas con 100 µL de dilución y 1 mL de hospedero en 3 mL de TSA-NaCl al 2.5%. Luego, se incubó las placas durante la noche a 37 °C por 24 h. Las supuestas placas translúcidas se identificaron y se recogieron para resuspenderlas en 1.5 mL de buffer SM. Esta etapa de purificación se repitió 3 veces. Finalmente, el fago purificado se conservó en glicerol al 20% a -80°C.

6.4. Ensayo de Titulación de Fagos

El título de fagos para cada experimento se determinó mediante el método de agar de doble capa como se describió anteriormente con algunas modificaciones (Huan *et al.*, 2019; Yang *et al.*, 2020). En resumen, el filtrado de fagos se diluyó en serie con buffer SM con 100 µL de dilución y 1 mL de hospedero en 3 mL de TSA-NaCl al 2.5%. Posteriormente, para obtener placas de fagos se realizó el método de agar de doble capa, brevemente, para formar placas de fagos más obvias, se utilizó un 0,5% de agar en esta placa superior, al cual se agregó 1 mL del hospedero y 100 µL del fago. La mezcla se vertió en una placa TSA y el cultivo invertido se incubó a 37°C durante 24 h (Fig. 10). Finalmente, para calcular el número de partículas víricas infectivas por mL se utilizó la siguiente fórmula: Título de fagos (PFU/mL) = (número promedio de placas × dilución múltiple × 1000) / recíproco de la dilución utilizada.

6.5. Rango de Hospederos de Fagos

El rango de hospedadores de cada fago purificado se determinó mediante la prueba de spot en las cepas de *Vp* positivas a AHPND previamente descrito con algunas modificaciones por (Carlson, 2004; Mateus *et al.*, 2014; Thammatinna *et al.*, 2020). Brevemente, se colocó 1 mL de cepas en 3 mL TSA-NaCl al 2.5% y 10 µL de fago purificado (10^7 PFU/mL) en los céspedes recién inoculados de los aislados bacterianos y se dejaron secar a temperatura ambiente. Luego, se incubó a 37 °C durante 24 h. La actividad lítica se clasificó como placas de lisis clara (++) , placas de lisis opacas positivas (+) y placas negativas (-) sin zonas claras (Fig. 11).

6.6. Eficiencia de Siembra en Placa (EOP)

La presencia de una zona de lisis fue considerada evidencia de la susceptibilidad al fago. Por lo que, todos los aislados de *V. parahaemolyticus* sensibles al fago en la prueba de Spot fueron

seleccionados para la determinación de la eficiencia de siembra en placa (EOP) por el método de agar de doble capa. Lo anterior con el objetivo de comparar los resultados de dos métodos para determinar con mayor precisión el rango de hospedero de los fagos aislados. Por su parte, el EOP se calculó como la proporción de calvas de lisis producidas en cada cepa susceptible dividida por el número de calvas producidas en *V. parahaemolyticus* (cepa de referencia para el fago en estudio). Y luego se clasificó como: como “H” alta eficiencia ($EOP \geq 0.5$), “M” eficiencia media ($0.1 \leq EOP < 0.5$), “L” eficiencia baja ($0.001 < EOP < 0.1$) e “I” ineficaz ($EOP \leq 0.001$) (Caos *et al.*, 2021).

6.7. Ensayos de Estabilidad de Fagos

Para determinar la estabilidad de fagos se utilizó un protocolo previamente descrito por (Stalin y Srinivasan, 2017) con algunas modificaciones. Se suspendieron 100 μL de fagos en 900 μL de tampón SM (pH 7.5) y se mantuvieron a diferentes temperaturas (30, 40, 50, 60 y 70 °C). Después de 1 h de incubación, se evaluó el título de los fagos por el método de agar de doble capa. Para la determinación de la estabilidad de los diferentes fagos a diferentes niveles de pH, se añadió lisado de fago al tampón SM. Para medir la estabilidad del pH, se agregaron 100 μL de suspensión de fagos a 900 μL de tampón SM con un pH de 2, 3, 5, 7, 9, 11 y 12 respectivamente, y luego se incubaron a 37 °C por 1 hora. El valor de pH del tampón SM se ajustó con soluciones de HCl y NaOH. De manera similar, se enumeró el título de cada fago superviviente utilizando el método de agar de doble capa.

6.8. Estabilidad de Supervivencia de Fagos a Diferentes Temperaturas de Almacenamiento

Para determinar la estabilidad de los fagos bajo diferentes temperaturas de almacenamiento se realizó un método descrito anteriormente con algunos cambios (Huan *et al.*, 2019). Brevemente, se incubaron 100 μL de suspensión de fago (10^7 UFP/ml) a diferentes temperaturas (-80 °C, 25 °C y

4) durante 1 mes. Después del período de incubación, se evaluó el título de fagos por el método de agar de doble capa.

6.9. Curva de Crecimiento en Un Solo Paso

Las curvas de crecimiento de un paso se realizaron de acuerdo con Kropinski (2018), con modificaciones menores. Brevemente, la solución bacteriana se diluyó a 1×10^8 CFU/mL y se centrifugó a $8000 \times g$ durante 5 min. Luego, el sedimento se resuspendió en 1 mL de tampón SM y se mezcló con 100 μ L de fago evaluado a MOI = 0,1 y se incubó durante 15 min a 37 °C. Posteriormente, la mezcla se centrifugó a $12\ 000 \times g$ durante 2 min para eliminar los fagos libres y el sedimento se suspendió en 1000 μ L de TSB. Posteriormente, se descartó el sobrenadante con los fagos no absorbidos y se resuspendió el sedimento en 10 mL de TSB+2,5% NaCl. Finalmente, se recolectaron dos muestras en un tiempo de 0 min, y a una de ellas se le agregó 50 μ L de cloroformo. La mezcla se incubó a 37 °C con agitación (200 rpm), y las muestras se recolectaron cada 10 min durante un período de 80 min y se titularon utilizando el método de doble capa de agar. El experimento se repitió tres veces.

6.10. Período de Latencia Y Tamaño de Explosión

El período de tiempo que mostró un primer aumento significativo en el título se consideró el período de latencia. Mientras que, el tamaño de explosión se calculó con la siguiente fórmula:
Tamaño de explosión = PFU/mL en el período de meseta/número de células infectivas

6.11. Prueba de Actividad Bacteriolítica *In Vitro*

La actividad bacteriolítica in vitro de los fagos CHI, ALK, M3, C2, M9 y M83 se determinó

mediante espectroscopia UV-vis. Además, la cepa utilizada en el experimento fueron las cepas mexicanas de *V. parahaemolyticus* causantes de AHPND M0904 y M2413, como se describió anteriormente con modificaciones menores (Ding *et al.*, 2020). Brevemente, la solución de bacterias se diluyó a 1×10^8 CFU (1 ml) y se agregó a 50 mL de TSB fresco + NaCl al 2,5 %. El fago evaluado se mezcló con el cultivo de *V. parahaemolyticus* a diferentes MOI de 1, 0,1, 0,01 y un grupo control sin fago (0,00), respectivamente, seguido de incubación a 37 °C durante 24 h. El cultivo de *V. parahaemolyticus* sirvió como control positivo. La densidad óptica (DO_{600nm}) del cultivo se midió en los puntos de tiempo indicados (0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8 y 24 h) en un espectrofotómetro UV-vis.

6.12. Precipitación/Purificación del Fago con PEG

Para concentrar el bacteriófago a utilizar en los ensayos de extracción de ADN viral y morfología del fago, se agregó 30 mL de fago a un tubo de centrifuga al cual se le adicionó 7.5 mL de Polietilenglicol PEG-8000/2.5 M NaCl al 20%. Luego, se incubó a -20 °C por 30 min y se centrifugó a 10,000 rpm durante 10 min a 4 °C. Para remover todo el sobrenadante de PEG se utilizó una micropipeta. Después, se resuspendió el fago en 2000 μ L STE (1 mL 1 M Tris [pH=8.0], 0.2 mL 0.5 M EDTA [pH=8.0], 2 mL 5 M NaCl). Se transfirió a un tubo eppendorf y se centrifugó a 10,000 rpm durante 10 min a 4 °C y se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo eppendorf para finalmente calcular el título de este por el método de agar de doble capa previamente descrito (depts.washington, s/a).

6.13. Morfología de Bacteriófagos. Microscopía Electrónica de Transmisión

Los bacteriófagos se visualizaron con tinción negativa mediante un microscopio electrónico de transmisión (TEM) Hitachi H7500 en la Unidad de Microscopía Avanzada del CICESE del Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California siguiendo las indicaciones de la Dra. Gabriela Guzmán. Brevemente, se colocó una gota de bacteriófago

purificado (10^7 UFP/mL) sobre una rejilla de cobre recubierta de carbono y se fijó durante 2 min. La rejilla con la muestra se tiñó negativamente primero con acetato de uranilo al 2% (p/v) durante 2 min, seguido de agua estéril durante 1 min. El exceso de muestra se retiró con un papel de filtro y la rejilla se dejó secar al aire durante 10 min. A continuación, se visualizó la morfología del bacteriófago con un microscopio electrónico de transmisión.

6.14. Extracción del ADN Viral del Fago Y Secuenciación Genómica

Para la extracción de ADN de los bacteriófagos se utilizó la metodología propuesta por Sambrook y Russell (2001), con algunas modificaciones. Para ello, se colocó 1 mL de la suspensión de bacteriófagos concentrados en PEG en un tubo para microcentrífuga de 1.5 mL, en el cual se adicionaron 2 U de DNAasa I (Sigma-Aldrich, EUA) y 2 U de RNAasa A (Sigma-Aldrich, EUA), enseguida fueron incubados a 37 °C durante 30 min. Después de la incubación, se adicionaron 40 μ L de EDTA (Sigma, EUA) 0.5 M (pH=8.0), 2.5 μ L proteinasa K (Qiagen, Alemania) (20 mg mL⁻¹) y 50 μ L de Dodecil Sulfato de Sodio (SDS) (Sigma, EUA) al 10%, mezclándose por inversión de 5-10 veces. Después, los tubos que contenían la mezcla se incubaron a 56 °C durante 2 h. Finalizada la incubación, se agregó un volumen de fenol equilibrado (Sigma-Aldrich, EUA) y se mezcló por inversión hasta que se observó la mezcla completamente emulsificada. Posteriormente, se centrifugó en una microcentrífuga (Eppendorf mini Spin plus, Alemania) a 3,500 \times g durante 10 min a 25 °C. La fase acuosa fue transferida a un tubo para microcentrífuga de 1.5 mL. Posteriormente, se añadió un volumen de fenol equilibrado-cloroformo 1:1 (v/v) (Sigma-Aldrich, EUA) y se repitió la centrifugación bajo las mismas condiciones, este paso se repitió tres veces. Finalizada la centrifugación, se transfirió la fase acuosa a un tubo para microcentrífuga de 1.5 mL y se adicionaron 200 μ L de acetato de sodio 3 M (Sigma-Aldrich, EUA) y el alcohol etílico absoluto (Sigma-Aldrich, EUA) hasta llenar el tubo. Después, se incubó a -20 °C, durante toda la noche. Concluida la incubación, se centrifugó a 15,000 \times g durante 30 min, se decantó el sobrenadante y se adicionó un volumen de alcohol etílico al 70% y de nueva cuenta se centrifugó en una microcentrífuga (Eppendorf mini Spin plus, Alemania) a 15,000 \times g durante 15 min. Después, se decantó el sobrenadante y se dejó secar la pastilla a temperatura ambiente. Finalmente, se adicionaron 20 μ L de agua libre de nucleasas. La concentración y pureza del ADN se verificaron

en un espectrofotómetro NanoDrop 2000c (Thermo Scientific, EUA) y la integridad del mismo se evaluó en un gel de agarosa al 1%. Las bibliotecas de ADN se prepararon con el kit de preparación de bibliotecas Nextera XT (Illumina, San Diego, CA, EE. UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante y la secuenciación del genoma se realizó con la plataforma Illumina MiniSeq (protocolo de extremo emparejado de 2 x150 pb, 300 ciclos).

6.15. Análisis Bioinformático

Las lecturas sin procesar se recortaron con fastp v0.23.0 y se ensamblaron de novo con SPAdes v3.12.0 (Wick, 2021). Después del ensamblaje, se usó BLASTn para comparar las secuencias del genoma completo de los fagos con las de la base de datos NCBI, y se identificaron los fagos con las secuencias más cercanas en GenBank. Los contigs se anotaron utilizando el algoritmo de phannotate en PATRIC v.3.6.12 (<https://www.patricbrc.org/app/Annotation>). Los fagos estrechamente relacionados con CHI, ALK, M3, C2, M9 y M83 se examinaron utilizando un blastn en línea en la base de datos NCBI. Los genes que codifican el ARN de transferencia putativo (ARNt) se predijeron utilizando tRNAscan-SE (Lowe y Chan, 2016). En la búsqueda de genes de resistencia y genes de virulencia fueron examinados por ABRicate v0.8.13. Se utilizó la plataforma de software impulsada por IA PhageAI v0.10.0 (<https://phage.ai/>) para clasificar el estilo de vida de los fagos. Los supuestos marcos de lectura abiertos (ORF) se anotaron utilizando la herramienta de búsqueda de alineación local básica de proteínas (blastp) del servidor NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) basado en una búsqueda de la Base de datos de proteínas no redundantes de NCBI, con una puntuación establecida en > 50 y un valor e de $<1,0 \times 10^{-3}$ (Altschul *et al.*, 1997). Las funciones ORF se volvieron a anotar utilizando Geneious v9.1.8. Para el análisis filogenético, las secuencias de proteínas se alinearon utilizando PATRIC v.3.6.12. Con base en las alineaciones, se evaluaron los genomas de fagos completos utilizando la herramienta web VICTOR (<https://ggdc.dsmz.de/victor.php>) para determinar las relaciones filogenéticas (Meier-Kolthoff y Goker, 2017) e incluyeron árboles filogenéticos inferidos usando el método de filogenia a distancia Genome-BLAST (GBDP). Los árboles se construyeron utilizando el formato Newick que iTOL (<https://itol.embl.de>) utilizó para crear un árbol filogenético. Finalmente, los genomas completos se utilizaron para calcular las similitudes intergenómicas entre los genomas

virales a través de la herramienta web VIRIDIC (Moraru *et al.*, 2020) con la configuración predeterminada de blastn. Se usó Artemis Comparison Tool (ACT) para la comparación con otros fagos en GenBank y la identificación de variaciones de características entre los genomas de fagos, con homología evaluada usando BLASTN (Carver *et al.*, 2005). Y un mapa de comparación del genoma global entre los datos de fagos disponibles en NCBI se visualizó mediante Easyfig v2.2.2 visualization tool (Sullivan *et al.*, 2011).

6.16. Análisis Estadístico

Los experimentos se realizaron por triplicado y los resultados se reportaron como media \pm desviación estándar. Para los experimentos estabilidad de fagos a temperatura y pH, se aplicó un diseño completamente al azar de dos factores y para el ensayo de reducción bacteriana se realizó un diseño completamente al azar de un factor para cada uno de los fagos. El análisis estadístico se realizó utilizando Minitab® 19, Minitab Statistical Software (Minitab, LLC.). Las diferencias de significancia se analizaron mediante el análisis de varianza unidireccional (ANOVA) con la prueba de Tukey y la diferencia mínima de significancia (LSD). La significancia estadística se estableció en $P < 0,05$.

6.16.1. Ensayos de Estabilidad de Fagos

- **Diseño completamente al azar (Dos factores)**
- **Factores:** Bacteriófagos y Temperatura (°C)
- **Niveles de factor:** Bacteriófagos 6 (ALK, M83, CH1, C2, M9, M3) y Temperatura (°C) 9[-80, -20, 4, 25, 30, 37, 50, 60, 70]
- **Unidad experimental:** Placas Petri con cantidad inicial conocida de bacterias *Vp* AHPND+ y fagos
- **Réplicas:** 3
- **Variable de respuesta:** Título de fagos-log PFU/mL

- Prueba de Tukey con $\alpha=0,05$; Prueba de Fisher, diferencia mínima significativa (LSD) con $\alpha=0,05$

Cuadro 9. Diseño experimental: Temperatura

Bacteriófagos	Temperatura (°C)								
	-80	-20	4	25	30	37	50	60	70
ALK	X	X	X	X	X	X	X	X	X
M83	X	X	X	X	X	X	X	X	X
CH1	X	X	X	X	X	X	X	X	X
C2	X	X	X	X	X	X	X	X	X
M9	X	X	X	X	X	X	X	X	X
M3	X	X	X	X	X	X	X	X	X

- **Diseño completamente al azar (Dos factores)**
- **Factores:** Bacteriófagos y pH
- **Niveles de factor:** Bacteriófagos 6 (ALK, M83, CH1, C2, M9, M3) y pH 7(2, 3, 5, 7, 8, 11, 12)
- **Unidad experimental:** Placas Petri con cantidad inicial conocida de bacterias *Vp* AHPND+ y fagos
- **Réplicas:** 3
- **Variable de respuesta:** Título de fagos-log PFU/mL
- Prueba de Tukey con $\alpha=0,05$; Prueba de Fisher, diferencia mínima significativa (LSD) con $\alpha=0,05$

Cuadro 10. Diseño experimental: pH

Bacteriófagos	pH						
	2	3	5	7	9	11	12
ALK	X	X	X	X	X	X	X
M83	X	X	X	X	X	X	X
CH1	X	X	X	X	X	X	X
C2	X	X	X	X	X	X	X
M9	X	X	X	X	X	X	X
M3	X	X	X	X	X	X	X

6.16.2. Ensayo de Reducción Bacteriana

- **Diseño completamente al azar (Dos factores)**
- **Factor:** MOI y Tiempo.
- **Nivel de factor:** MOI 4(Control 0.00, 0.01, 0.1, 1) y Tiempo (0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 24).
- **Unidad experimental:** Placas Petri con cantidad inicial conocida de bacterias *Vp* AHPND+ y fagos
- **Réplicas:** 3
- **Variable de respuesta:** DO_{600nm}
- Prueba de Tukey con $\alpha=0,05$; Prueba de Dunnett con $\alpha=0,05$

Cuadro 11. Diseño experimental: Reducción bacteriana

MOI	Bacteriófago	Tiempo (h)									
		0	1	2	3	4	5	6	8	24	
Control 0.00	CHI, ALK, M3, M9, C2, M83	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
MOI=0.01	CHI, ALK, M3, M9, C2, M83	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
MOI=0.1	CHI, ALK, M3, M9, C2, M83	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
MOI=1	CHI, ALK, M3, M9, C2, M83	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

7. RESULTADOS

7.1. Aislamiento de Bacteriófagos a Partir de Muestras de Agua de Mar, Sedimentos Y Mariscos en Sinaloa, México

Uno de los objetivos del presente estudio fue aislar fagos con actividad lítica contra la bacteria *Vibrio parahaemolyticus* a partir de muestras de agua de mar, sedimentos y mariscos en diversos sitios de Sinaloa, México. En este aspecto, se aislaron 10 bacteriófagos a partir de la evaluación de 28 muestras de mariscos (camarón, caracol chino, ostiones con y sin concha, almeja chocolata, pata de mula y calamar), así como también de agua de mar y de estero en cinco sitios de muestreo en Sinaloa, México, incluidos: el puerto de Altata, Culiacán, Los Mochis, playa El Maviri y el puerto de Topolobampo.

Los 10 fagos se identifican con su nombre común (Fig. 10) de acuerdo a la clasificación de fagos del Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV).



Fig. 10: Sitios de muestreo de fagos aislados contra *Vp* AHPND+.

7.2. Caracterizar Biológica, Morfológica Y Genómicamente Bacteriófagos con Actividad Lítica contra Cepas *Vp* AHPND+

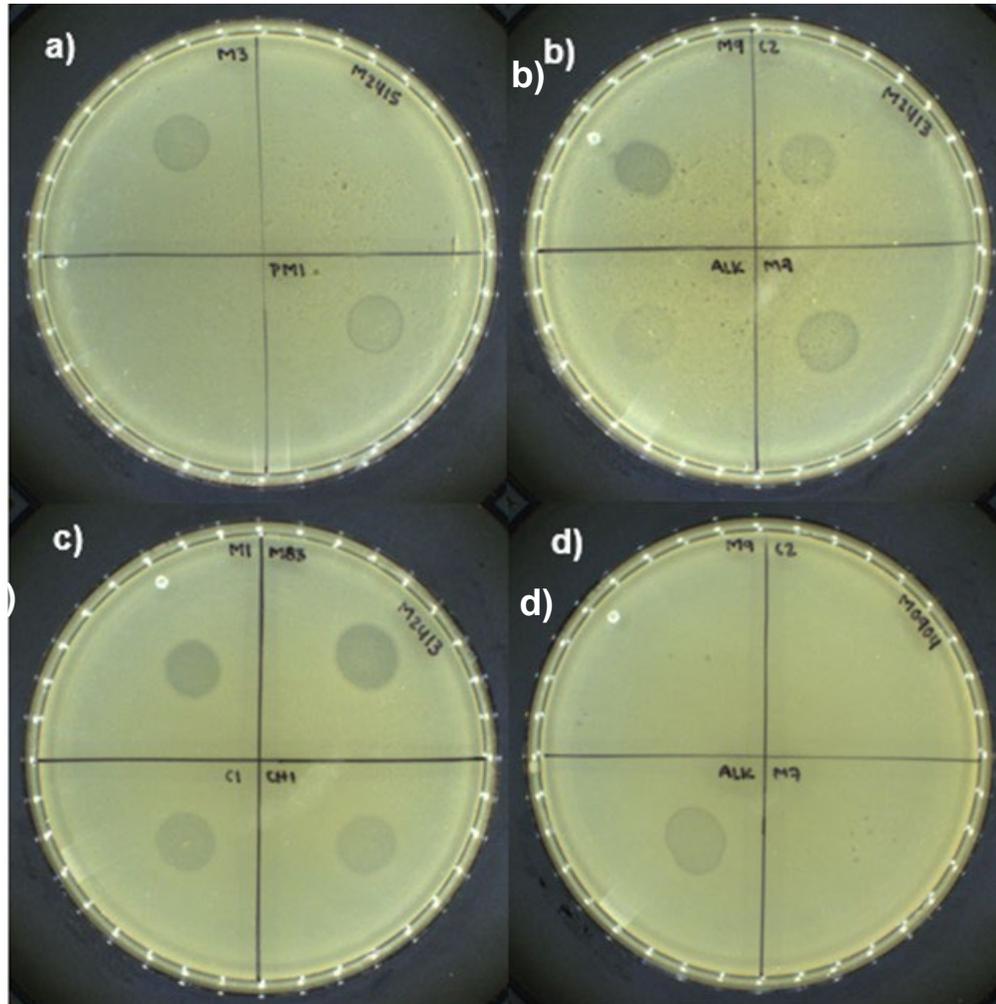


Fig. 11: Rango de hospedero (Spot test). Calvas formadas por la actividad lítica de: a) fagos M3 y PM1 contra la cepa M2415 *Vp* AHPND+; b) fagos M9, C2, ALK y M7 contra la cepa M2413 *Vp* AHPND+; c) fagos M1, M83, C1 y CH1 contra la cepa M2413 *Vp* AHPND+; y d) fagos ALK contra la cepa M0904 *Vp* AHPND+.

7.2.1. Ensayo de Titulación de Fagos

Las placas de lisis observadas en estos fagos fueron claras, uniformes, de forma circular y de tamaño medio aproximadamente de 1 a 2 mm de diámetro (Fig. 12). Con títulos máximos de 10^7 y

10⁸ PFU/mL (Cuadro 12).

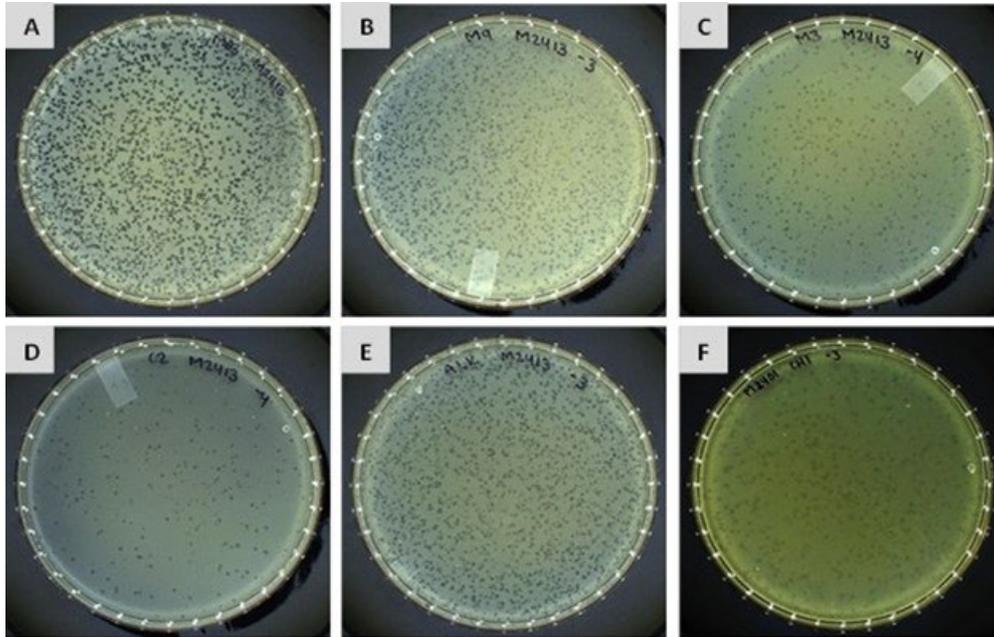


Fig. 12: Morfología de las placas formadas en una placa de agar de doble capa por (A) M83, (B) M9, (C) M3, (D) C2, (E) ALK y (F) CHI.

Cuadro 12. Título de bacteriófagos aislados con actividad lítica contra *Vp* AHPND+

Cepa de fago ID	Fuente	Título (PFU/mL)
M1	Agua de mar	2.0x10 ⁷
M3	Agua de mar	4.3x10 ⁷
M7	Agua de estero	1.8x10 ⁷
M83	Agua de estero	6.0x10 ⁷
M9	Agua de estero	8.3x10 ⁷
C1	Camarón	3.1x10 ⁷
C2	Camarón	6.3x10 ⁷
PM1	Pata de mula	2.1x10 ⁷
CHI	Caracol chino	6.0x10 ⁸
ALK	Almeja chocolata	1.5x10 ⁸

7.2.2. Rango de Hospederos

Los bacteriófagos purificados se ensayaron para determinar su especificidad de rango de hospederos (prueba de Spot). En este sentido, se analizaron un total de 10 cepas de *Vp* AHPND+ para el hospedero de los fagos. En 5 de estos aislados de *Vp* [que representa el 50.0% (5/10)], los fagos formaron placas transparentes a turbias. Los resultados de rango de hospedero fueron clasificados como placas de lisis clara (++), placas de lisis opacas positivas (+) y placas sin zonas claras (-) (Cuadro 10).

7.2.3. Eficiencia de Siembra en Placa (EOP)

Se realizó la EOP con el propósito de determinar con mayor precisión el rango de hospederos de fago (Fig. 13), el cual se calculó dividiendo los PFU (Unidades Formadoras de Placa) promedio en las bacterias de interés por la PFU promedio en la cepa huésped. En este caso, los fagos mostraron una eficiencia de plaqueo alta y media que se clasificó como como “H” alta eficiencia ($EOP \geq 0.5$) y “M” eficiencia media ($0.1 \leq EOP < 0.5$) (Cuadro 13).

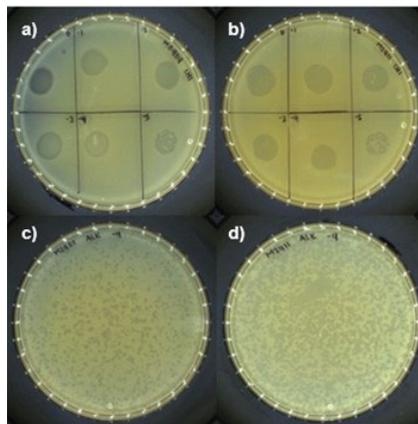


Fig. 13: Eficiencia de plaqueo (EOP) de: a) CHI contra la cepa M0904 *Vp* AHPND+; b) CHI contra la cepa M2411 *Vp* AHPND+; c) ALK contra la cepa M2401 *Vp* AHPND+.y d) ALK contra la cepa M2411 *Vp* AHPND+.

Cuadro 13. Resumen de las características de los diferentes fagos aislados en Sinaloa, México

*Nombre de la cepa <i>Vp</i> AHPND+	Aislamiento		Cepa de fago ID	Fuente	Rango de hospederos (Spot test)EOP ^a										Diámetro de placa (mm) ^b			
	Localidad	Fuente			01*	02*	03*	04*	05*	06*	07*	08*	09*	10*				
⁰¹ M0605	ElDorado, Sin, México	Estómago de camarón	M1	Agua de mar	-	-	-	-	-	-	-	-	++	+	(1.0)H	(0.16)M	1	
⁰² M0607	ElDorado, Sin, México	Hepatopáncreas de camarón	M3	Agua de mar	-	-	-	-	-	-	-	-	++	++	(0.43)M	(1.0)H	1	
⁰³ M0802	Escuinapa, Sin, México	Hepatopáncreas de camarón	M7	Agua de estero	-	-	-	-	+	(0.01)L	-	-	++	+	(1.0)H	(0.27)M	2	
⁰⁴ M0803	Escuinapa, Sin, México	Estómago de camarón	M83	Agua de estero	-	-	-	-	+	(0.02)L	-	-	++	+	(1.0)H	(0.11)M	2	
⁰⁵ M0904	Escuinapa, Sin, México	Hepatopáncreas de camarón	M9	Agua de estero	-	-	-	-	-	-	-	-	++	+	(1.0)H	(0.02)L	1	
⁰⁶ M0905	Escuinapa, Sin, México	Estómago de camarón	C1	Camarón	-	-	-	-	+	(0.02)L	-	-	++	+	(1.0)H	(0.3)M	1	
⁰⁷ M2401	Angostura, Sin, México	Hepatopáncreas de camarón	C2	Camarón	-	-	-	-	-	-	-	-	++	++	(1.0)H	(0.9)H	1	
⁰⁸ M2411	Angostura, Sin, México	Hepatopáncreas de camarón	PM1	Pata de mula	-	-	-	-	-	-	-	-	++	++	(1.0)H	(0.4)M	1	
⁰⁹ M2413	Angostura, Sin, México	Hepatopáncreas de camarón	CHI	Caracol chino	-	-	-	-	++	(0.75)H	-	++	++	-	(1.0)H	-	2	
¹⁰ M2415	Angostura, Sin, México	Hepatopáncreas de camarón	ALK	Almeja chocolata	-	-	-	-	++	(0.43)M	-	++	++	+	(1.0)H	(0.01)L	(0.02)L	2

Abreviaturas:

^a Eficiencia de plaqueo (EOP) se clasificó como “H” alta eficiencia (EOP ≥0.5), “M” eficiencia media (0.1 ≤ EOP < 0.5), “L” eficiencia baja (0.001 < EOP < 0.1) e “T” ineficaz (EOP ≤ 0.001); resultados de rango de hospedero fueron clasificados como (++) placas de lisis claras, placas de lisis opacas positivas (+) y placas sin zonas claras (-)
^b Diámetro de placa obtenido por el método de agar de doble capa usando las cepas *Vp* AHPND+
* Cepas de *Vibrio parahaemolyticus* asociadas a AHPND; enumerada en orden ascendente.

7.2.4. Determinación de la estabilidad de los fagos

Se encontró que los fagos M3, C2, M9 y M83 permanecen estables a -80 °C, 4 °C, 25 °C y mostraron actividad lítica a temperaturas de hasta 70 °C. Por el contrario, los fagos CHI y ALK fueron estables entre -80 °C, 25 °C, 4 °C y 60 °C. Después de 1 h de incubación a 70 °C, su actividad se pierde por completo. Los resultados de la prueba de estabilidad de pH mostraron que la infectividad de ALK, CHI, M3 y M9 se mantuvo en el rango de pH de 2 a 11, pero ya no era activa en condiciones alcalinas como pH 12. En comparación, los fagos M83 y C2 permaneció en el rango de pH de 2 a 9. La estabilidad comienza a disminuir cuando el pH es 9. Los resultados muestran que todos los fagos pueden usarse en ambientes hostiles bajo diferentes temperaturas y condiciones de pH (Fig.14A, 14B).

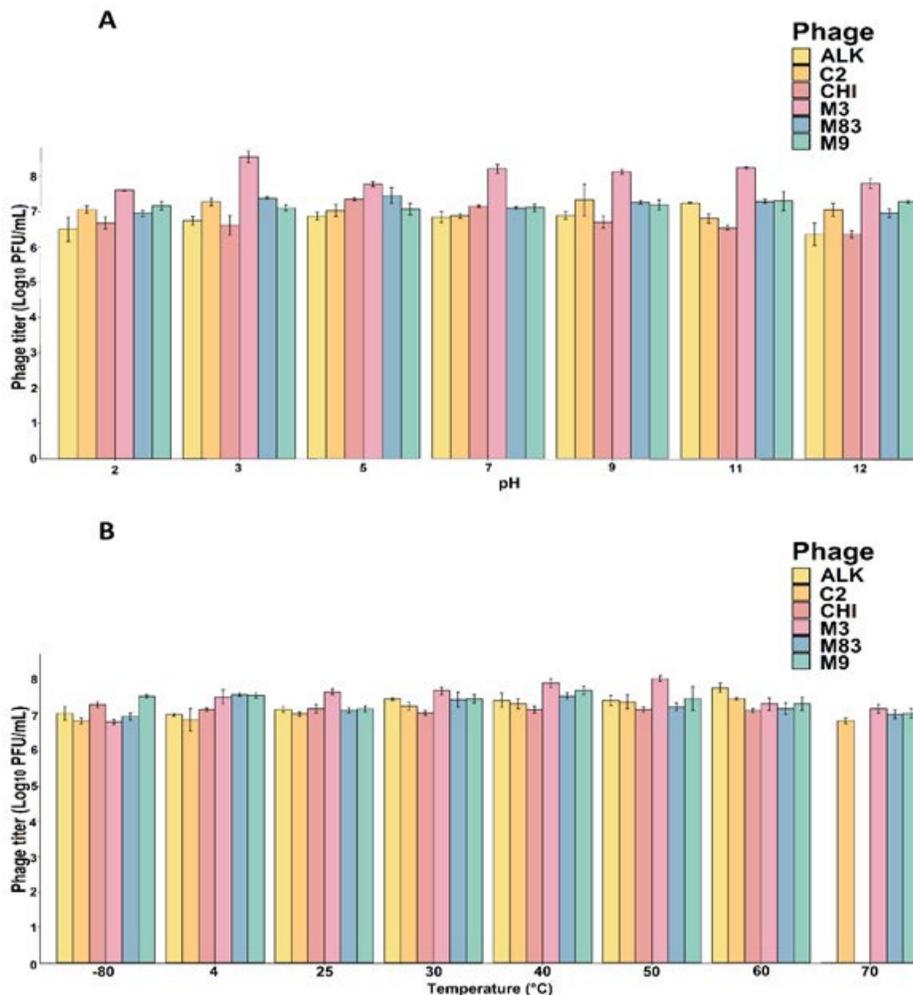


Fig. 14: Caracterización biológica de fagos. (A) Estabilidad de los fagos a varias temperaturas. (B) Estabilidad de los fagos a varios valores de pH. Las diferencias significativas en los ensayos de estabilidad se encuentran en CuadroS1 y CuadroS2 en anexos. Los valores son las medias de tres pruebas \pm desviación estándar.

7.2.5. Curva de Crecimiento de un Solo Paso

A partir de la curva de crecimiento de un paso, los bacteriófagos C2 y CHI mostraron un período de latencia de 20 min, mientras que los bacteriófagos ALK, M83 y M3 mostraron un período de latencia más rápido de 10 min. Además, se observó el bacteriófago M9 con un período de latencia de 30 min (Fig. 15). El tamaño de explosión promedio de los bacteriófagos CHI, ALK, M3, C2, M9 y M83 estimado a partir de la curva de crecimiento de un paso fue de 43, 168, 35, 37, 34 y 35 UFP por célula, respectivamente.

7.2.6. Prueba de Desafío Bacteriano

Las pruebas antibacterianas *in vitro* muestran que los fagos ALK, M3, C2, M9 y M83 pueden inhibir eficazmente el crecimiento de la cepa M2413. Debido al efecto bactericida del fago CHI, puede inhibir eficazmente el crecimiento de M0904. Como se muestra en la Fig. 16, ALK, M3, C2, M9 y M83 tuvieron algunos efectos bactericidas después de incubar durante 3 a 8 h con MOI de 1, 0,1 o 0,01. Por el contrario, CHI tuvo un efecto bactericida dentro de las 2 h. Además, cuanto mayor sea el MOI, mejor será el efecto.

7.2.7. Morfología de Bacteriófagos

Las imágenes de microscopía electrónica de transmisión (Fig. 17) revelaron que los fagos ALK y CHI tenía una cabeza icosaédrica y una cola larga no contráctil lo que sugería que pertenecían a la familia *Siphoviridae*. Según el ICTV, este fago fue designado como vB_VpS_ALK (ALK) y vB_VpS_CHI (CHI). Mientras que, para los fagos C2, M9, M3 y M83 se identificó que tenían una cabeza icosaédrica y una cola, lo que sugería que pertenecían a la familia *Podoviridae*. Según el ICTV este fago fue designado como vB_VpaP_M3 (M3), vB_VpaP_C2 (C2), vB_VpaP_M9 (M9), vB_VpaP_M83 (M83).

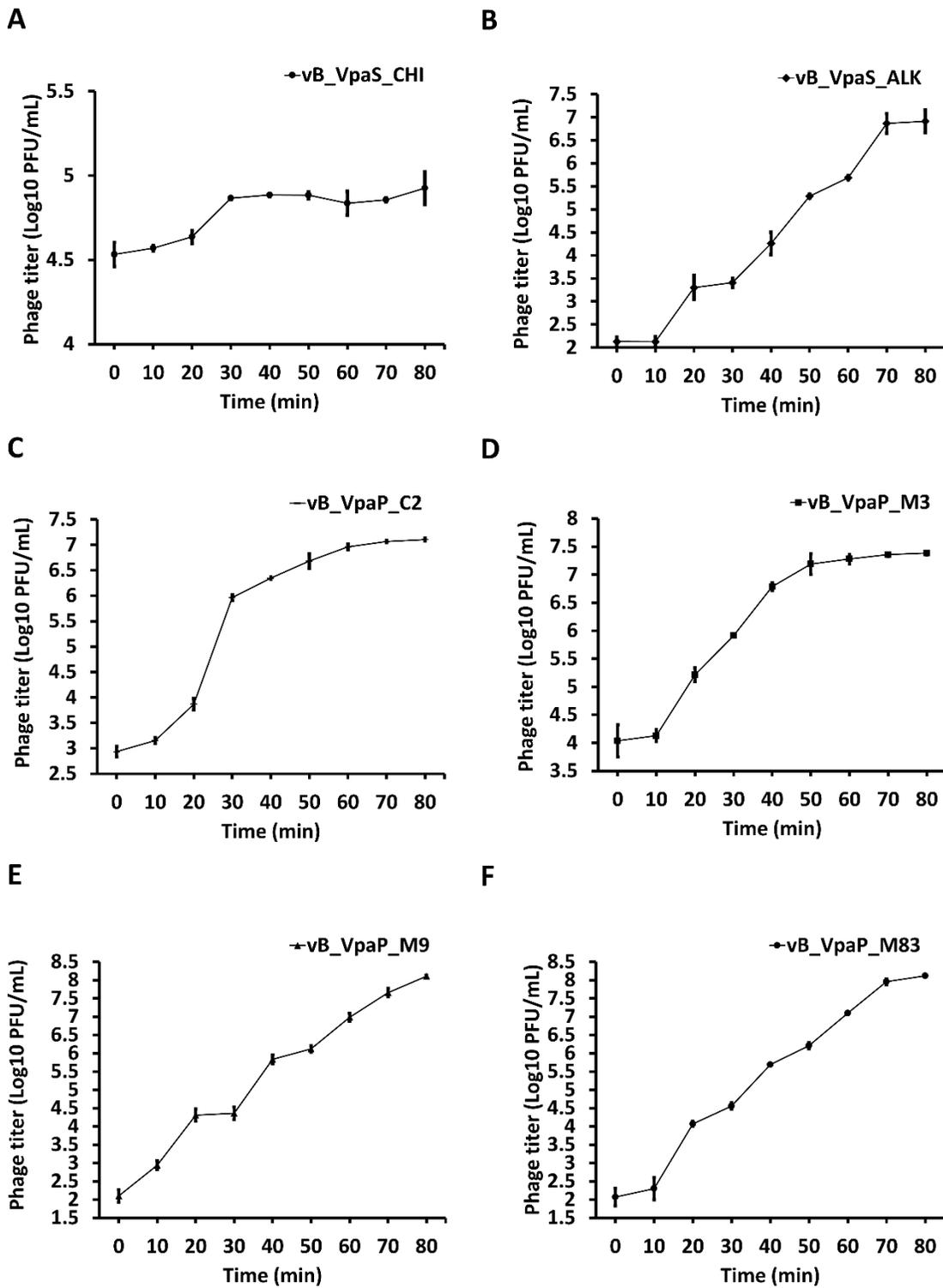


Fig. 15: Caracterización biológica de fagos. Curva de crecimiento de un solo paso de bacteriófagos: (A) CHI; (B) ALQ; (C) C2; (D) M3; (E) M9; (F) M83. Los valores son las medias de tres pruebas \pm desviación estándar.

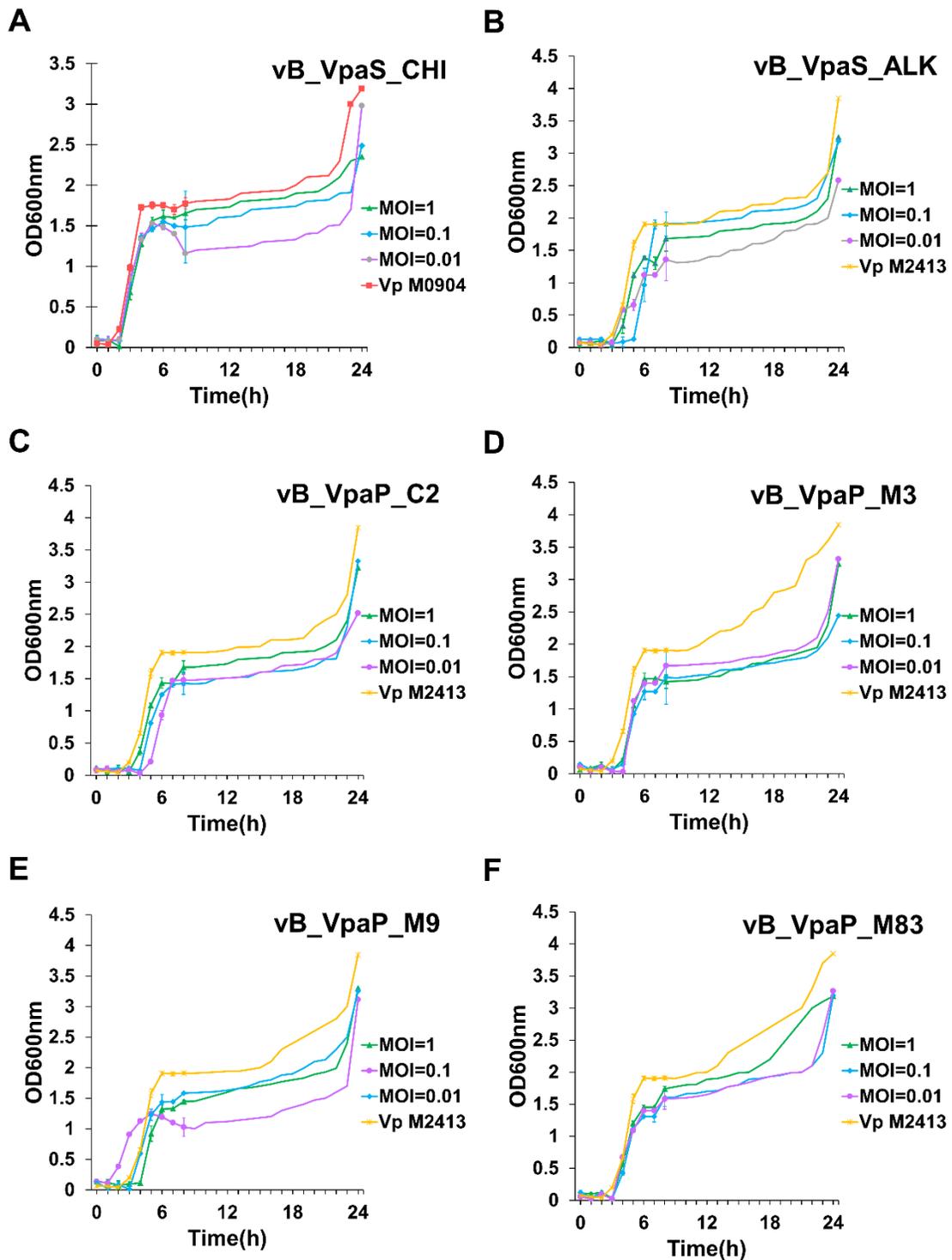


Fig. 16: Prueba de desafío bacteriano de fagos: (A) CHI, (B) ALK, (C) C2, (D) M3, (E) M9 y (F) M83 a cepas mexicanas de *V. parahaemolyticus* causantes de AHPND según diferentes MOI (MOI = 1, 0,1, 0,01). Las diferencias significativas en los ensayos de reducción bacteriana se encuentran en la Fig. 20 en anexos.

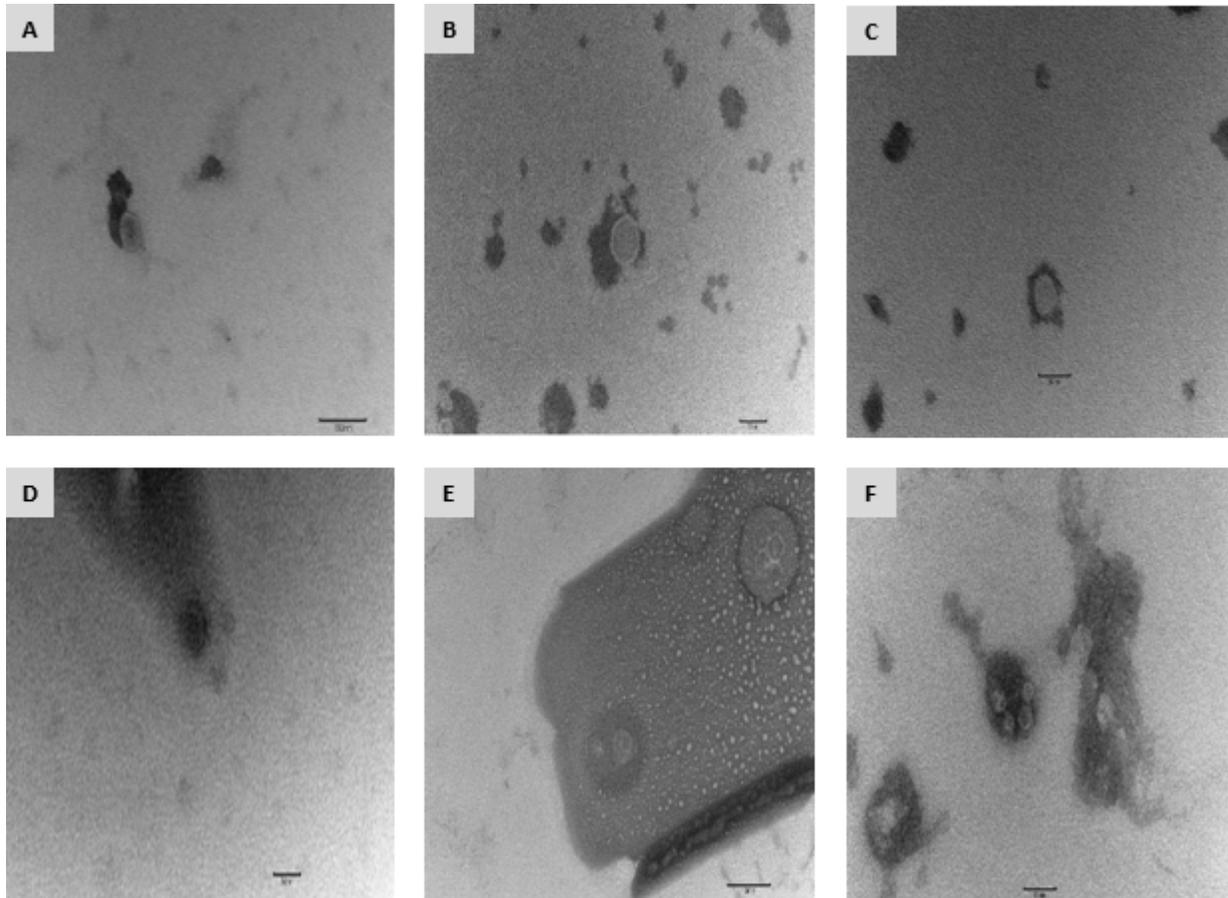


Fig. 17: Microscopía de transmisión electrónica: (A) ALK, (B) C2, (C) M3, (D) M9, (E) M3 y (F) M83.

7.2.8. Extracción del ADN Genómico Y Secuenciación

Las suspensiones de los fagos ALK, CH1, M83, M9, M3 y C2 se concentraron y purificaron para la extracción de ADN genómico como se describió previamente (Sambrook y Russell, 2001). Las concentraciones de ácido nucleico del fago oscilaron entre 9.5 y 156.9 ng/μL (Cuadro 14). Además, Todas las muestras de ácido nucleico de fagos mostraron muy buenas bandas intactas en geles de agarosa, algunas con mínima degradación (Fig. 18). El genoma del fago se secuenció utilizando MiniSeq de Illumina Inc.

Cuadro 14. Concentraciones de ácido nucleico

de fagos de *Vp* AHPND+

Muestra no.	Cepa de fago ID	DNA conc. (ng/ μ L)
1	CHI	43.1
2	M3	44.3
3	M9	52
4	ALK	156
5	C2	43.6
6	M83	9.7
7	PM1	10
8	C1	10.2
9	M7	9.5
10	M1	15.6

*La concentración de ácido nucleico se determinó mediante NanoDrop 2000c Spectrophotometer.

7.2.9. Análisis Básico del Genoma

Todos los fagos tienen un genoma de ADN de doble cadena lineal con longitudes que oscilan entre 43.268 pb y 57.805 pb. Siendo sus contenidos de GC de 45,9% para ALK y CHI, y de 48,8% para M3, C2, M9 y M83 (Cuadro 15). Los genomas de CHI y ALK contenían 95 y 94 ORF putativos, con una longitud promedio de 215 pb y tamaños que oscilaban entre 27 y 934 pb. De la misma manera, se predijeron 57 y 58 ORF putativos en los genomas de los fagos M3, M9, C2 y M83, con una longitud promedio de 273 pb y tamaños que oscilaron entre 30 y 1284 pb. Todos los ORF predichos se dividieron en seis módulos (Fig. 18), incluido el módulo de metabolismo del ADN, el módulo de lisis, el módulo de empaquetamiento, el módulo de estructura, el módulo de funciones adicionales y el resto del módulo de proteínas hipotéticas asignadas (Cuadro S3, S4, S5, S6, S7 y S8 en anexos). No se encontraron genes de ARNt utilizando el programa tRNAscan-SE. En comparación con las bases de datos de ABRicate, no se encontraron genes de virulencia o resistencia a antibióticos en los genomas de ALK, CHI, M3, C2, M9 y M83, lo que indica que se usaría de manera segura para controlar *V. parahaemolyticus*, y se predijo que el estilo de vida del fago es virulento mediante la plataforma PhageAI.

Cuadro 15. Análisis básico del genoma del fago

Nombre del fago	Longitud del genoma (bp)	Contenido GC (%)	ORFs	tRNAs	Genes de resistencia antibióticos	Genes de virulencia
CHI	57,805	45.9	95	0	0	0
ALK	57,805	45.9	94	0	0	0
Tm	59,742	46.6	86	0	0	0
M3	43,446	48.8	58	0	0	0
M9	43,268	48.8	57	0	0	0
M83	43,901	48.8	57	0	0	0
C2	43,494	48.8	58	0	0	0
OWB	43,264	48.7	45	0	0	0

7.2.10. Análisis Filogenético Y Genómica Comparativa

Para investigar las relaciones evolutivas entre los fagos CHI y ALK y otros 15 fagos dentro de la familia *Siphoviridae*, así como entre los fagos M3, C2, M9 y M83 y otros 24 fagos dentro de la familia *Autographiviridae*, se diseñaron dos árboles filogenéticos basados en el genoma completo construido utilizando el método de filogenia a distancia Genome-BLAST (GBDP). La alineación de la secuencia de nucleótidos basada en blastn reveló que 2 fagos tenían una cobertura de secuencia de nucleótidos superior al 70% con CHI y ALK, mientras que las identidades estaban por debajo del 95%, incluido vB_VnaS-AQKL99 (MT795651.1, 89,23% de identidad y 77% de cobertura) y vB_VhaS-tm (KX198614.1, 86,56% de identidad y 81% de cobertura). Para examinar más a fondo la relación entre CHI y ALK con otros 15 vibriofagos de cola larga no contráctil, se calcularon las similitudes intergenómicas entre los genomas virales a través de VIRIDIC con valores predeterminados de blastn. Como valores de identidad, los valores de ANI entre CHI y ALK para otros fagos también estaban por debajo del 95% (Fig. 19A). Como se muestra en el árbol filogenético (Fig. 19C), CHI y ALK estaban más estrechamente relacionados con los cinco fagos, enumerados como vB_VnaS-AQKL99, vB_VhaS-tm, pVco-14, vB_VpS_CA8 y vB_VpS_BA3. Estos análisis mostraron que los fagos CHI y ALK pertenecen a un nuevo género dentro de la familia *Siphoviridae*, incluidos estos cinco fagos que se agruparon en la misma rama.

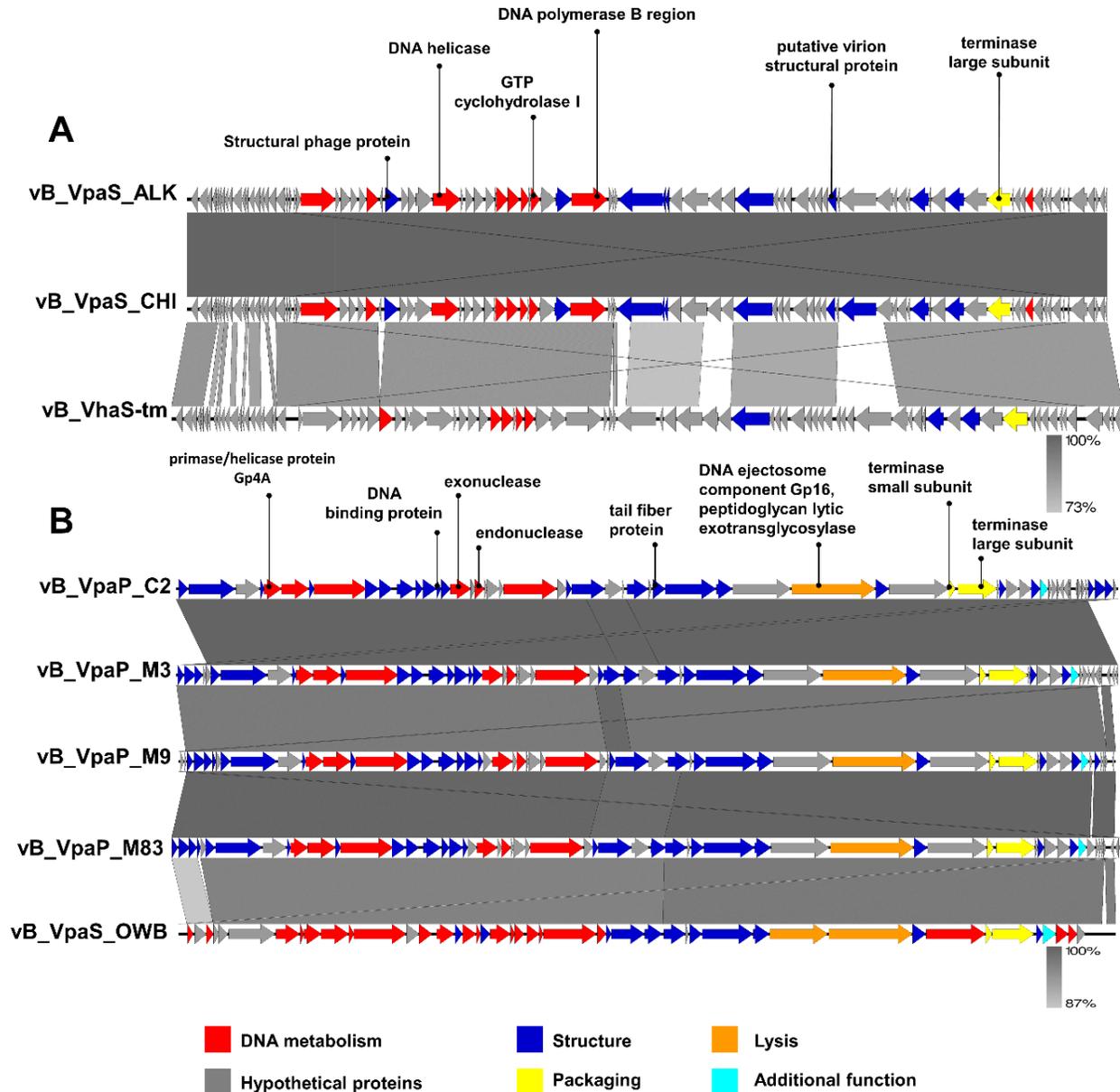


Fig. 18: Comparación del genoma usando Easyfig: (A) vB_VpaS_CHI, vB_VpaS_ALK y vB_VhaS-tm. (B) vB_VpaP_M3, vB_VpaP_C2, vB_VpaP_M9, vB_VpaP_M83 y vB_VpaS_OWb. Las flechas de diferentes colores representan marcos de lectura abiertos predichos con diferentes funciones.

Por otro lado, la alineación de la secuencia de nucleótidos basada en blastn reveló que 14 fagos tenían una cobertura de secuencia de nucleótidos superior al 95% con vB_VpaP_M3, vB_VpaP_C2, vB_VpaP_M9 y vB_VpaP_M83, mientras que las identidades también superaban el 90%, incluido OWB (MN974282.1, 97,55% de identidad y 97% de cobertura), vB_VpaS_OWb (NC_048167.1, 97,55% de identidad y 97% de cobertura), vB_VpaP_KF1 (NC_048035.1, 90,73%

de identidad y 98% de cobertura), vB_VpP_DE17 (MW250641.1, 90,71% de identidad y 98% de cobertura), vB_VpP_DE18 (MZ182247.1, 90,59% de identidad y 99% de cobertura), vB_VpP_FE11 (MT178448.1, 90,13% de identidad y 98% de cobertura), vB_Vc_SrVc2 (MW331544.1, 91,45% de identidad y 96% de cobertura) y vB_VpaP_KF2 (NC_048036.1, 90,63% de identidad y 99% de cobertura). Para examinar más a fondo la relación entre M3, C2, M9 y M83 con otros 24 vibriofagos de cola corta, también se calcularon las similitudes intergenómicas entre los genomas virales a través de VIRIDIC con valores predeterminados de blastn. Además, en cuanto a los valores de identidad, los valores de ANI entre M3, C2, M9 y M83 para otros fagos también estaban por encima del 95% (Fig. 19B). Además, como se muestra en el árbol filogenético (Fig. 19D), M3, C2, M9 y M83 estaban más estrechamente relacionados con los trece fagos enumerados anteriormente. Está claro que M3, C2, M9 y M83 están estrechamente relacionados con estos fagos enumerados anteriormente, y ambos pertenecen al género *Maculvirus* en la familia *Autographiviridae*. En resumen, todos los resultados de nuestro estudio demostraron que los fagos M3, C2, M9 y M83 eran miembros de una nueva especie en *Maculvirus*.

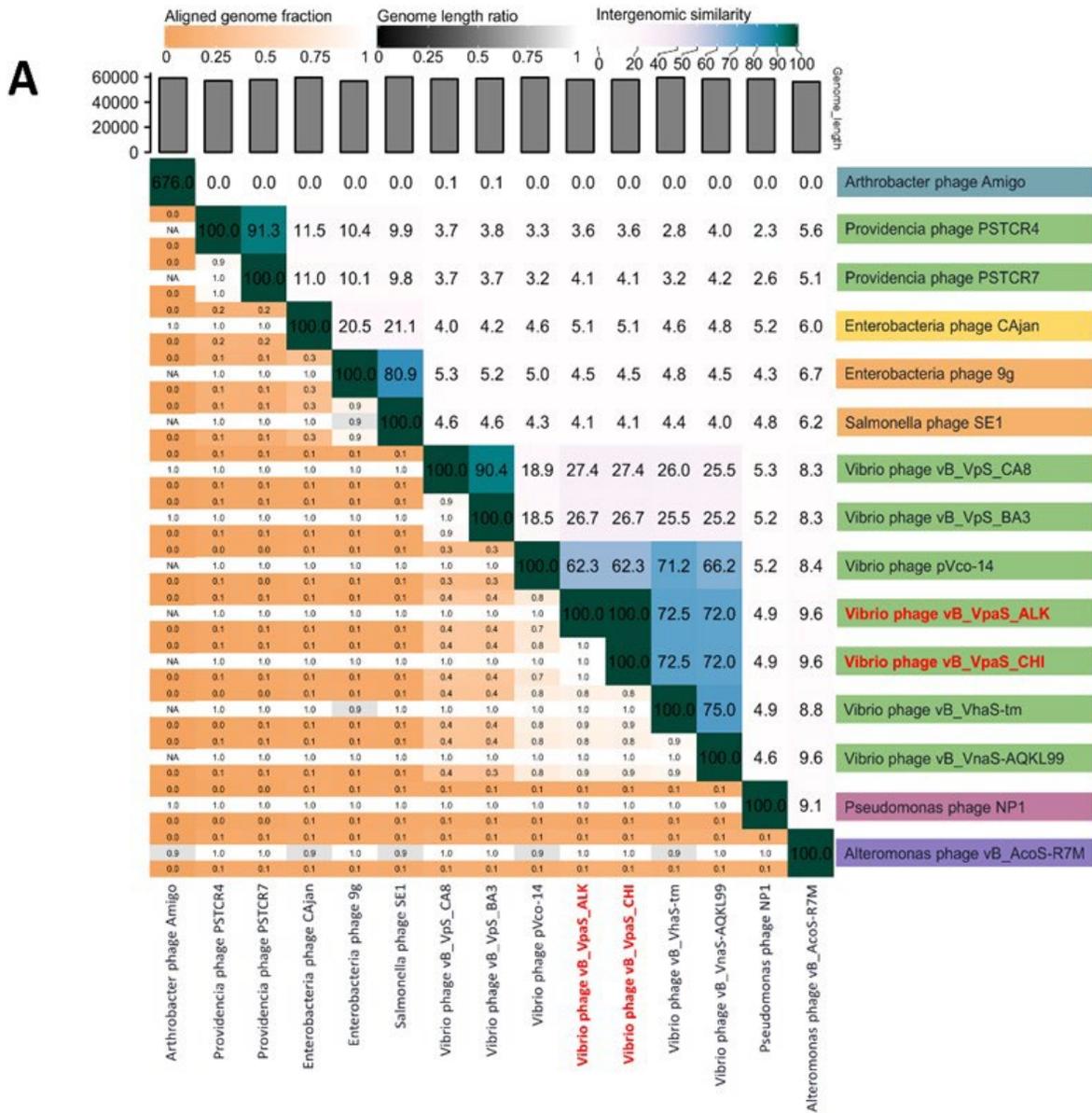


Fig. 19A: Heatmap de VIRIDIC: (A) CHI y ALK. Los valores del porcentaje de identidad oscilan entre 0 (0 %, blanco) y 1 (100 %, verde).

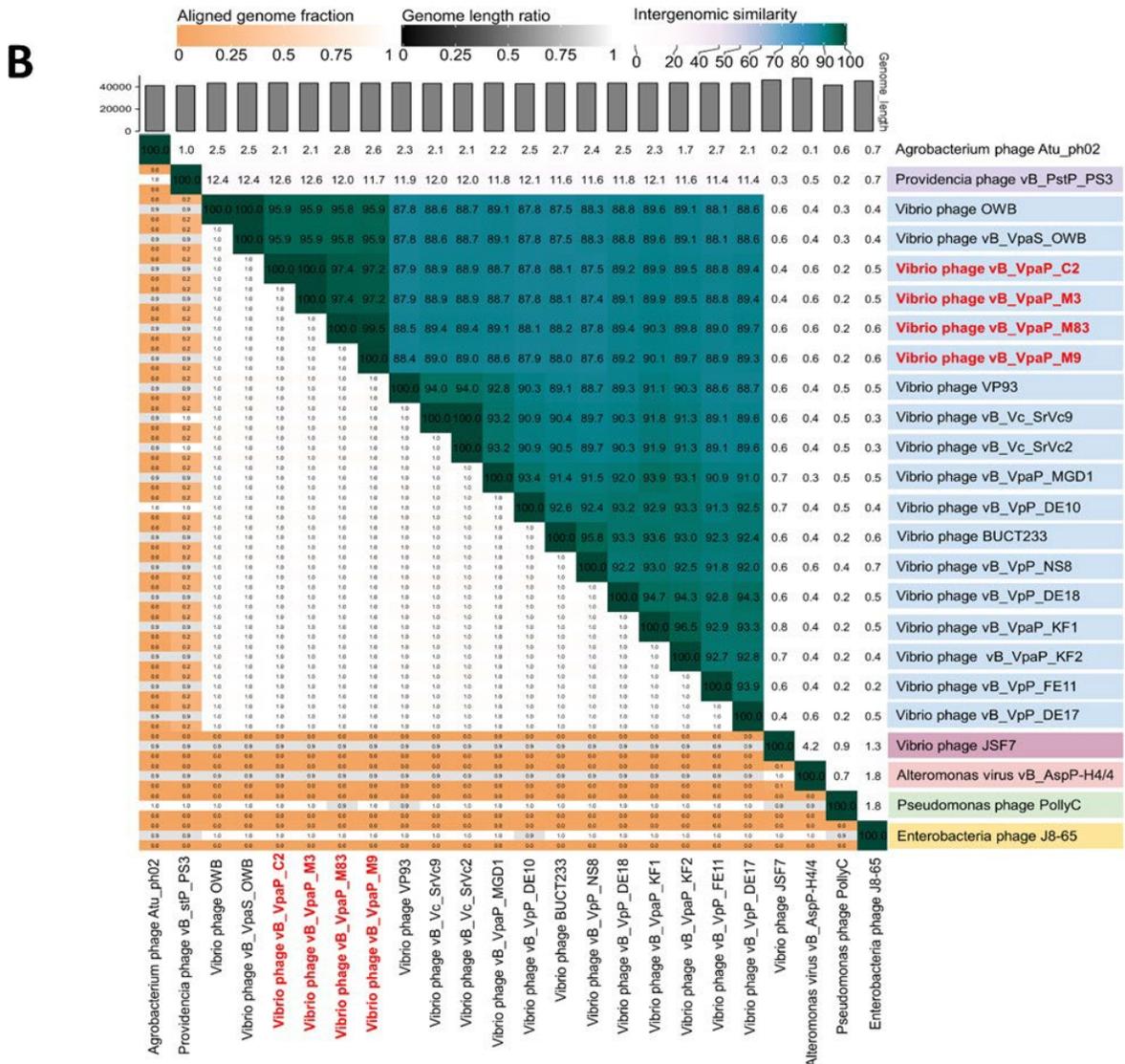


Fig. 20B: Heatmap de VIRIDIC: (B) M3, C2, M83 y M9. Los valores del porcentaje de identidad oscilan entre 0 (0 %, blanco) y 1 (100 %, verde).

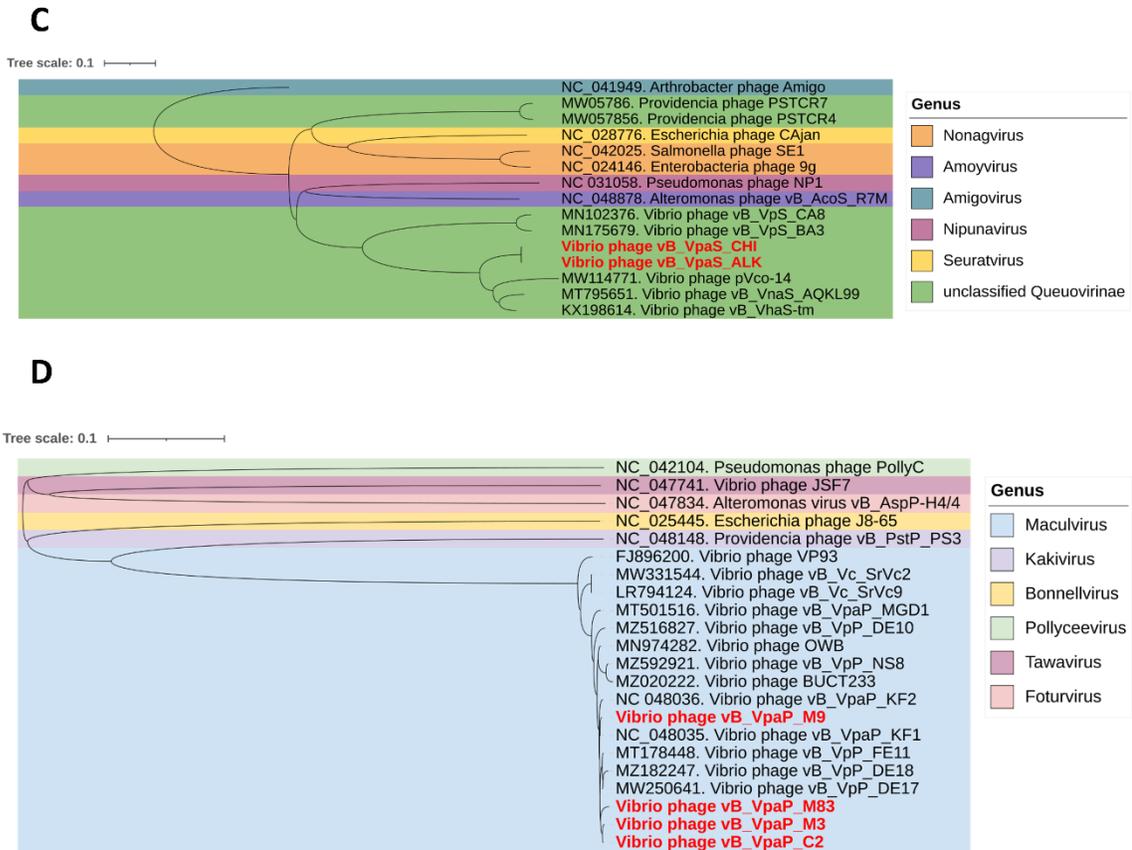


Fig. 21: Árbol filogenético basado en Genome-BLAST Distance Phylogeny (GBDP) de (C) CHI y ALK de M3, C2, M83 y M9 de la familia *Siphoviridae*. (D) M3, C2, M83 y M9 de la familia *Autographiviridae*.

7.2.11. Análisis estadístico

7.2.11.1. Diseño completamente al azar (un factor) para ensayo de reducción bacteriana. En resumen, las gráficas de residuos para todos los fagos mostraron que los supuestos de normalidad, varianza constante e independencia eran adecuados para el ANOVA.

De acuerdo con los resultados del ANOVA, el valor p fue menor que el nivel de significancia $\alpha=0.05$, la contribución del tiempo a diferencia del MOI a la variabilidad total es alta. Por tanto, se rechazó la hipótesis nula y se concluye que no todas las medias de población son iguales, hay diferencias significativas. En cuanto al ajuste de los modelos, estos explican porcentajes que van desde los 80% al 90% de la variabilidad total en cada uno de los fagos estudiados. De manera que,

se puede concluir que el ajuste del mismo a los datos es muy bueno.

Las diferencias entre las medias que comparten una letra no son estadísticamente significativas. Se pueden comparar las diferencias de la prueba de Tukey para la comparación múltiple de parejas de medias y la prueba Dunnett en comparación con un control (véase anexos Tabla S1 y Tabla S2).

7.2.11.2. Diseño completamente al azar (dos factores) para estabilidad a temperatura. Los resultados del ANOVA indicaron que, aunque el valor p fue menor que el nivel de significancia $\alpha=0.05$, se rechazó la hipótesis nula y se concluye que no todas las medias de población son iguales, por lo que hay diferencias significativas.

Los modelos explican porcentajes que van desde los 80% al 90% de la variabilidad total en cada uno de los fagos estudiados. De manera que, se puede concluir que el ajuste del mismo a los datos es muy bueno.

7.2.11.3. Diseño completamente al azar (dos factores) para estabilidad a pH. De igual forma, para el estudio de la estabilidad de estos fagos a diferentes rangos de pH, los resultados del ANOVA indicaron que, aunque el valor p fue menor que el nivel de significancia $\alpha=0.05$, se rechazó la hipótesis nula y se concluye que no todas las medias de población son iguales, por lo que hay diferencias significativas.

Los modelos explican porcentajes que van desde los 80% al 90% de la variabilidad total en cada uno de los fagos estudiados. De manera que, se puede concluir que el ajuste del mismo a los datos es muy bueno.

8. DISCUSIONES

Se deben aprovechar todas las oportunidades disponibles para contrarrestar el avance de la resistencia a los antimicrobianos. En la mayoría de los casos, todavía existen compuestos efectivos para eliminar las infecciones bacterianas. Sin embargo, el uso de bacteriófagos (terapia de fagos) debe estar listo a medida que se vuelve más apremiante la resistencia a los antimicrobianos. La coincidencia de fagos con las cepas específicas que causan la infección se lograría mediante una detección de fagos en placas de cultivo bacteriano. En este caso, muchos estudios se están centrando en el aislamiento y la caracterización de bacteriófagos a partir de fuentes ambientales como sedimentos, granjas avícolas, agua de mar, aguas residuales, aguas estuarinas y muestras de mariscos (Lomeli-Ortega y Martínez-Díaz, 2014; Jun *et al.*, 2016; Yu *et al.*, 2013; Wong *et al.*, 2019; Matamp y Bhat, 2020). Aun así, debe ser necesario seguir trabajando para establecer una biblioteca de fagos grande, específica y confiable, que pueda proporcionar fagos específicos contra cepas de *V. parahaemolyticus* asociadas con AHPND. En este estudio, seis fagos de *V. parahaemolyticus* que presentan actividad lítica contra cepas mexicanas de *V. parahaemolyticus* causantes de AHPND se aislaron de muestras de marisco y agua de playa y estuario, y se examinaron mediante caracterización biológica y análisis de secuenciación del genoma completo. El rango de huéspedes es uno de los criterios más importantes para seleccionar fagos líticos. Así, cada fago tiene su propia gama de huéspedes, es decir, la gama de bacterias que puede infectar, mientras que algunos fagos solo pueden infectar una o unas pocas cepas bacterianas, otros fagos pueden infectar muchas especies o incluso bacterias de diferentes géneros (Kutter, 2009). En este estudio, se evaluó el espectro de huéspedes de los fagos CHI, ALK, M3, C2, M9, M83 utilizando 10 cepas mexicanas de *V. parahaemolyticus* causantes de AHPND. Los resultados mostraron que CHI, ALK, M3, C2 M9 y M83 podían infectar el 50,0 % (5/10) de *V. parahaemolyticus*. La tasa de infección de otros fagos de *V. parahaemolyticus* pVp-1 (Jun *et al.*, 2018) y vB_VpP_DE17 (Yang *et al.*, 2022) fueron infectados 90,9% (20/22) y 33% (44/133) de las cepas de *V. parahaemolyticus*- AHPND que se probaron, respectivamente. Sin embargo, pensamos que existen dificultades para describir el rango de huéspedes de cada fago. Diferentes métodos para determinar el rango de hospedantes pueden dar resultados diferentes debido a las variaciones de hospedantes. Otra dificultad que notamos es el uso inconsistente de las palabras "estrecho" y especialmente

"amplio" al describir la amplitud del rango de hospedantes, porque es más probable que produzca fagos de rango de hospederos estrecho en lugar de amplio (Ross *et al.*, 2016).

Las fases del proceso de infección por fagos, como el período de latencia y el tamaño de explosión de los fagos, se investigaron con una curva de crecimiento de un paso (Yu *et al.*, 2013). En este estudio, los fagos tenían algunas características sobresalientes, incluidos tiempos de latencia cortos y tamaños de explosión grandes, lo que los hacía atractivos para aplicaciones en el tratamiento de infecciones por *V. parahaemolyticus* en sistemas acuícolas. Según Amarillas *et al.* (2017), un tamaño de explosión grande puede representar una ventaja selectiva como agente antibacteriano, ya que los fagos con un tamaño de explosión grande pueden aumentar la dosis inicial de fagos varias 100 veces en períodos cortos. Por ejemplo, Cao *et al.* (2021) también informaron que el tamaño de ráfaga del fago vB_VpaP_MGD2 fue de 244 UFP/célula, que fue considerablemente más alto que el observado para la mayoría de los fagos de *V. parahaemolyticus*, incluidos OMN, pVp-1, VhKM4, VP06 y VpKK5, produciendo aproximadamente 18,67, 47, 52, 60 y 180 UFP/célula, respectivamente. Aunque estos fagos de *V. parahaemolyticus* tenían tamaños de explosión más grandes, el tamaño de explosión de los fagos CHI, ALK, M3, C2, M9 y M83 también fue relativamente grande, produciendo 43, 168, 35, 37, 34 y 35 UFP/célula, respectivamente. Por lo tanto, el gran tamaño de explosión de estos seis fagos puede ser una ventaja definitiva para su aplicación como agentes de control biológico contra las cepas de *V. parahaemolyticus* que causan AHPND.

Al mismo tiempo, como otro requisito previo para su uso como agentes de control biológico, las condiciones de supervivencia de los bacteriófagos a diferentes pH y temperaturas juegan un papel importante en la unión, penetración y reproducción de los fagos (Hu *et al.*, 2021). Asimismo, los fagos CHI, ALK, M3, C2, M9 y M83 mostraron una estabilidad térmica y de pH relativamente amplia en comparación con otros vibriofagos, como PG07 (<60 °C, pH 3-11) (Ding *et al.*, 2020). Por lo tanto, existe la posibilidad de que CHI, ALK, M3, C2, M9 y M83 se puedan mantener a temperatura ambiente y en condiciones de congelación. Además, estos seis fagos exhibieron una mayor tolerancia a los valores de pH extremos (Rong *et al.*, 2014), lo que sugiere una posible aplicación en un entorno hostil.

Para comprender mejor las características generales del genoma de estos fagos, coincidimos con Yang *et al.*, (2020) en su estudio de los fagos vB_VpS_BA3 y vB_VpS_CA8, en que el análisis blastn de nuestros fagos CHI, ALK, M3, C2, M9 y M83 mostraron de igual forma que las

diferencias en la secuencia del genoma entre estos seis fagos y otros fagos con los cuales los comparamos eran más del 5%. Por lo tanto, se pudo lograr identificar que nuestros fagos presentan una alta similitud con la secuencia de los otros fagos reportados en las bases de datos de NCBI. Asimismo, concordamos con Turner *et al.*, (2021) en que la demarcación de género de estos seis fagos coincide en que la longitud de los genomas de estos se establece con una identidad de nucleótidos superior al 70%, y en su caso la demarcación de especies también se establece con una identidad de nucleótidos superior al 95% en toda la longitud de los genomas. De manera que, en base a los resultados anteriormente reportados, el genoma de los fagos vB_VpaS_CHI y vB_VpaS_ALK comparte >85% de identidad de secuencia de nucleótidos con vB_VnaS-AQKL99 y vB_VhaS-tm, ambos fagos con actividad lítica sobre *V. natriegens* y *V. harveyi*, respectivamente, que pertenecen a la familia *Siphoviridae*. Por tanto, lo anterior nos permite aclarar que existe una alta probabilidad que los fagos CHI y ALK poseen una estructura icosaédrica y una cola larga no contráctil típica de la familia *Siphoviridae*. Por otro lado, el análisis bioinformático para los fagos vB_VpaP_M3, vB_VpaP_C2, vB_VpaP_M9 y vB_VpaP_M83 reveló que también tenían identidades superiores al 90% con OWB vB_VpaS_OW, vB_VpaP_KF1, vB_VpP_DE17, por nombrar algunos de los catorce fagos con los que se compararon y que presentan actividad lítica contra *V. parahaemolyticus*, que pertenecen a la familia *Autographiviridae*. De tal forma que, en este caso se demuestra también que existe una alta probabilidad de que los fagos M3, C2, M9 y M83 poseen una cabeza icosaédrica y una cola corta típica de esta familia, tal como se mencionó en sus resultados de microscopía electrónica de transmisión. Por su parte, en cuanto al análisis de la relación entre CHI y ALK con los otros 15 vibriofagos de cola larga no contráctil y, por otro lado, M3, C2, M9 y M83 con otros 24 vibriofagos de cola corta, se observó que las similitudes intergenómicas calculadas entre los genomas virales a través de la plataforma VIRIDIC con blastn defaults ayudo a sustentar de igual forma la relación de los fagos aislados en Sinaloa, México con esos otros fagos con los cuales se estableció las respectivas comparaciones y reconocer propiamente su clasificación taxonómica. Como se mostró en las Fig. 19A y 19B, queda claro que la sensibilidad de los mapas de calor dada por blastn permitió capturar las relaciones entre virus que tienen en común e incluso con regiones genómicas cortas, puesto que en algunos casos nos indicó hasta similitudes tan bajas como el 60-65%.

El análisis filogenético reveló que CHI y ALK se agruparon con vB_VnaS-AQKL99 y vB_VhaS-tm. Y M3, C2, M9 y M83 se agruparon con OW, vB_VpaS_OW, vB_VpaP_KF1,

vB_VpP_DE17, vB_VpP_DE18, vB_VpP_FE11, vB_Vc_SrVc2, vB_Vc_SrVc9, vB_VpP_DE10, vB_VpaP_MGDpa y vB2V. Por lo tanto, con los árboles filogenéticos y los mapas de calor de similitud intergenómica, podríamos predecir que se trata de nuevos fagos de la familia *Siphoviridae* dentro de un nuevo género y nuevos miembros del género *Maculvirus* dentro de la familia *Autographiviridae*, respectivamente. Además, no se encontraron genes que codifican tRNA en los genomas CHI, ALK, M3, C2 y M83, lo que indica que estos fagos dependen del tRNA del huésped para su síntesis de proteínas. Dado que los fagos sin genes de ARNt son viables, los ARNt no son esenciales para el desarrollo de fagos (Ding *et al.*, 2020; Caos *et al.*, 2021). Asimismo, aunque en nuestro estudio no se encontraron genes de resistencia a los antibióticos, virulencia o lisogénicos en ninguno de los genomas indicando que estos son unos candidatos potenciales para su uso como control biológico contra *V. parahaemolyticus*, coincidimos con AL-Ishaq *et al.*, (2021) en que se requieren más estudios clínicos y procesos regulatorios para evaluar su seguridad y eficacia como control biológico en la terapia de fagos.

Por lo tanto, también es necesario realizar un análisis extenso del genoma de cada fago involucrado en la terapia con fagos para identificar rasgos indeseables (González-Gómez *et al.*, 2022). Además de la división de los seis módulos funcionales mencionados anteriormente, no se muestran diferencias en la disposición de los módulos funcionales entre los fagos CHI, ALK con el fago vB_VhaS-tm. Del mismo modo, se observó para el caso de M3, C2, M9, M83 y OWB. Sin embargo, como González-Gómez *et al.* (2022) informaron que solo dos estudios han descrito los fagos pertenecientes al nuevo género dentro de la subfamilia *Queuovirinae* (Hu *et al.*, 2021; Yang *et al.*, 2020); consideramos necesario que se elaboré y presenté la propuesta de nuevo género al ICTV, para que se aislen más los nuevos miembros del género y reportar con concordancia sus genomas.

Como se mencionó anteriormente en los resultados, las pruebas antibacterianas *in vitro* mostraron que los fagos CHI, ALK, M3, C2, M9 y M83 pueden inhibir eficazmente el crecimiento de las cepas mexicanas M0904 y M2413, sin embargo, se considera que aun así estas pruebas aún pueden ser mejorables porque a pesar de obtener resultados positivos *in vitro*, estamos conscientes que sigue siendo necesario determinar la cinética de los fagos en modelos animales, ya que se requiere conocer la tasa de eliminación de los fagos para poder diseñar estrategias de prevención adecuadas ya en su uso en fagoterapia y que sean propiamente fagos eficaces (Chang *et al.*, 2018). Por su parte, al observar que los valores de DO_{600nm} del cultivo que contenía tanto el fago específico como

la cepa de *V. parahaemolyticus* en diferentes MOI aumentaron gradualmente durante las primeras horas y luego disminuyeron notablemente en comparación con el respectivo control positivo, indicando la lisis de *V. parahaemolyticus* por los fagos CHI, ALK, M3, C2, M9 y M83, podemos predecir que la actividad bacteriolítica de estos fagos aumentó con el aumento de las MOI, tal como se ha observado en estudios previos (Yang *et al.*, 2020; Cao *et al.*, 2021; Hu *et al.*, 2021). En nuestro caso, nuestros resultados de las pruebas antibacterianas *in vitro* muestran que los fagos ALK, M3, C2, M9 y M83 tenían un efecto bactericida eficaz que se observó notablemente después de incubar durante 1 a 3 h con MOI de 1, 0.1 o 0.01, en este caso valores de multiplicidad de infección más bajos a los reportados comúnmente de 1 a 1000. Además, los valores de DO₆₀₀ fueron significativamente más bajos que los de los grupos tratados a 80 min en el estudio de Hu *et al.*, (2021). De acuerdo con Ding *et al.* (2020) coincidimos en que el crecimiento que se observa en las curvas, puede asociarse a que las bacterias podrían resistir la infección por fagos a través de varios mecanismos: incluida la mutación espontánea, el sistema de restricción-modificación y la inmunidad adaptativa a través del sistema CRISPR-Cas. En este caso, las mutaciones espontáneas pueden conferir resistencia a los fagos al modificar la estructura de los componentes de la superficie bacteriana que actúan como receptores de fagos y también determinan la especificidad de los fagos. A manera que, la lisis inicial inducida por fagos de una población bacteriana es seguida por un nuevo crecimiento bacteriano, debido a la selección de subpoblaciones resistentes a los fagos. En resumen, los fagos CHI, ALK, M3, C2, M9 y M83 mostraron un rango de huéspedes estrecho, un período de latencia corto y una estabilidad adecuada a las temperaturas y valores de pH extremos mayores a los probados en estudios previamente reportados, por lo que resultan ser candidatos viables, no obstante basado con las investigaciones recientes es necesario realizar mayores estudios basados en modelos que incluyan experimentos tanto *in vivo* como *in vitro* para reportar los parámetros clave que nos indiquen que estos sean eficaces para su uso en terapia (Delattre *et al.*, 2022). Además, estamos conscientes que el análisis de la secuencia del genoma de los fagos reveló información valiosa sobre su biología que ayudará a fundamentar su uso como control biológico en estudios futuros basados también en ensayos *in vivo*. Y, junto con la ausencia de genes asociados con la resistencia y la virulencia, estas características muestran por el momento que los fagos CHI, ALK, M3, C2, M9 y M83 son una alternativa adecuada y prometedora a los agentes terapéuticos para tratar las cepas de *V. parahaemolyticus* que causan AHPND en camarones.

9. CONCLUSIONES

La caracterización y el análisis del genoma de los bacteriófagos en este estudio facilita una mejor comprensión de las características fisiológicas y biológicas de los bacteriófagos CHI, ALK, M3, C2, M9 y M83. En base a todas estas características y los resultados de la actividad lítica *in vitro*, estos nuevos fagos virulentos son un candidato adecuado y prometedor como agente de biocontrol para el control de *V. parahaemolyticus*. En resumen, los fagos CHI, ALK, M3, C2, M9 y M83 mostraron un rango de huéspedes estrecho, un período de latencia corto y una estabilidad adecuada a las temperaturas y valores de pH probados. Además, el análisis de la secuencia del genoma de los fagos reveló que no se encontraron genes de ARN de transferencia (ARNt), virulencia o resistencia en ninguno de los genomas y el ciclo de vida de estos fagos fue clasificado como virulento por la plataforma PhageAI. Los análisis filogenéticos y de genómica comparativa asignaron a los fagos M3, C2, M9 y M83 como nuevos miembros del género *Maculvirus*, familia *Autographiviridae*. Mientras que los fagos ALK y CHI fueron asignados como nuevos miembros de la subfamilia *Queuovirinae*, familia *Siphoviridae*. De manera que, los resultados obtenidos hasta el momento revelan que la caracterización y el análisis genómico mejorarán aún más nuestra comprensión de la biología y la diversidad de los fagos con el objetivo de aliviar los obstáculos para el uso completo de los fagos.

10. RECOMENDACIONES

Antes de continuar con la aplicación de la terapia de fagos en los sistemas de cultivo de camarón, debe ser necesario seguir trabajando para establecer una biblioteca de fagos grande, específica y confiable, que pueda proporcionar fagos específicos contra cepas de *V. parahaemolyticus* asociadas con AHPND, de manera que se pueda contar con fagos específicos de manera rápida al momento de ser necesarios contra las cepas bacterianas de *V. parahaemolyticus*-AHPND que generan los brotes en el sistemas de cultivo de camarón.

En este sentido, se recomienda que antes de la aplicación, en primer lugar, en todo trabajo de caracterización de fagos debe ser mínimo necesario evaluar la seguridad del fago a nivel genético, por ejemplo, si el genoma del fago contenía factores de virulencia o genes de resistencia a los antibióticos. Luego, deben quedar claras las características básicas del fago, tales como su rango de hospedero, estabilidad y tamaño de explosión. A manera de asegurar si el fago es adecuado para su uso como control biológico.

En resumen, se plantea que los estudios futuros deben centrarse en la aplicación de cepas expuestas en estanques de camarones para evaluar su efecto sobre la supervivencia de los camarones y los cambios en la composición de la microbiota del estanque, a fin de que en un futuro próximo pueda formularse un producto que pueda estarse aplicando cuando sea necesario en los sistemas de cultivo de camarón.

11. BIBLIOGRAFÍA

- Ackerman H.W. (2009). Phage Classification and Characterization. *Methods Mol Biol.* 501:127-140.
- ACSA-UAB (2019). Mapa de peligros alimentarios de *Vibrio parahaemolyticus*. [En línea]. Recuperado el 30 de enero de 2021, de: https://mapaperills.uab.cat/pdf/perills/1116_Biobac-V%20parahaemolyticus_ES.pdf
- Adriaenssens, E., Brister, J.R., 2017. How to name and classify your phage: an informal guide. *Viruses* 9 (4), 70. <https://doi.org/10.3390/v9040070>.
- Aguilar-Rendón K.G. (2018). La enfermedad en camarones causante de pérdidas millonarias. CIAD, [En línea]. Recuperado el 11 de febrero de 2021, de: <https://www.ciad.mx/notas/item/1900-la-enfermedad-en-camarones-causante-de-perdidas-millonarias>
- Alagappan K., Karuppiyah V., Deivasigamani B. (2016). Protective effect of phages on experimental *V. parahaemolyticus* infection and immune response in shrimp (Fabricius, 1798). *Aquaculture* 453: 86–92.
- AL-Ishaq, R.K.; Skariah, S.; Büsselberg, D. (2021). Bacteriophage Treatment: Critical Evaluation of Its Application on World Health Organization Priority Pathogens. *Viruses*, 13, 51. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01355>.
- Amarillas L, Rubí-Rangel L, Chaidez C, González-Robles A, Lightbourn-Rojas L and León-Félix J, (2017). Isolation and Characterization of phiLLS, a Novel Phage with Potential Biocontrol Agent against Multidrug-Resistant *Escherichia coli*. *Front. Microbiol.* 8:1355. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01355>.
- Anaya-Rosas, R.E. (2005). Cultivo de camarón blanco, *Litopenaeus vannamei*, Boone (1931), en sistema cerrado a alta densidad. Tesis para obtener el grado maestro en ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada.
- Anderson J.L., Valderrama D. and Jory D.E. (2019). Revisión y pronóstico de la producción mundial de camarón: crecimiento constante por delante. *Global Aquaculture Advocate*.
- Anderson J.L., Valderrama D. and Jory D.E. (2020). GOAL 2019: Revisión de la producción mundial de camarones. *Global Aquaculture Advocate*.
- Aranguren-Caro L.F., Mai H.N., Noble B. and Dhar A.K. (2020). AHPND es una enfermedad crónica del camarón blanco del Pacífico de América Latina. *Global Aquaculture Advocate*.
- Bankevich, A., Nurk, S., Antipov, D., Gurevich, A.A., Dvorkin, M., Kulikov, A.S., Lesin, V. M., Nikolenko, S.I., Pham, S., Prjibelski, A.D., Pyshkin, A.V., Sirotkin, A.V., Vyahhi, N., Tesler, G., Alekseyev, M.A., Pevzner, P.A. (2012). SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J. Comput. Biol.* 19 (5), 455–477. <https://doi.org/10.1089/cmb.2012.0021>.
- Barriosnuevo-Pérez K.A. (2020). Bacteriófagos como alternativa antimicrobiana y su aplicación en la medicina veterinaria y zootecnia. Monografía. Universidad de Córdoba.

- Bastías R., Higuera G., Sierralta W. and Espejo R.T. (2010). A new group of cosmopolitan bacteriophages induce a carrier state in the pandemic strain of *Vibrio parahaemolyticus*. *Environmental Microbiology* 12(4), 990–1000.
- Baticados, M.C.L. and Paclibare, J.O. (1992). The use of chemotherapeutic agents in aquaculture in the Philippines. In M. Shariff, R.P. Subasinghe & J.R. Arthur, eds. *Diseases in Asian Aquaculture I*. pp. 531–546. Manila, Fish Health Section, Asian Fisheries Society. <http://hdl.handle.net/10862/350>.
- Biomín (s/a). *Vibrio* en la acuicultura del camarón, [En línea]. Recuperado el 22 de marzo de 2021, de: <https://www.biomín.net/mx/especies/acuicultura/vibriosis/>
- Brives C. and Pourraz J. (2020). Phage therapy as a potential solution in the fight against AMR: obstacles and possible futures. *Palgrave communications* 6:100.
- Campbell A. (2013). The future of bacteriophage biology. *Nature reviews | Genetics* Vol. 3: 472–474.
- Cao, Y., Zhang, Y., Lan, W., Sun, X. (2021). Characterization of vB_VpaP_MGD2, a newly isolated bacteriophage with biocontrol potential against multidrug-resistant *Vibrio parahaemolyticus*. *Arch. Virol.* 166 (2), 413–426. <https://doi.org/10.1007/s00705-020-04887-x>.
- Carver, T. J., Rutherford, K. M., Berriman, M., Rajandream, M. A., Barrell, B. G., and Parkhill, J. (2005). Act: the artemis comparison tool. *Bioinformatics* 21, 3422–3423. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bti553>.
- Chang R.Y.K., Wallin, M., Sharon Y.L., Leunga, S.S.L., Wang, H., Morales, S., and Chan, H.K. (2018). Phage therapy for respiratory infections. *Adv Drug Deliv Rev.* 133:76–86. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2018.08.001>.
- Chen, S., Zhou, Y., Chen, Y., Gu, J., (2018). fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. *Bioinformatics* 34 (17), i884–i890. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty560>.
- CONAPESCA (Comisión Nacional de Acuicultura y Pesca). (2019). Anuario Estadístico de Acuicultura y Pesca. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA).
- Cuéllar-Anjel A. J. (2015). Vibriosis. *The Center for Food Security & Public Health*, pp. 1–5.
- Dabanch J., Herrero C., Pavéz C., Veas P., Braun J. and Porte T. (2009). Bacteriemia por *Vibrio parahaemolyticus*: Reporte de caso y revisión de la literatura. *Rev Chil Infect*; 26 (4): 360–362.
- de la Peña L.D., Cabillon N.A.R., Catedral D.D., Amar E.C., Usero R.C., Monotilla W.D., Calpe A.T., Fernandez D.D. and Saloma C.P. (2015). Acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) outbreaks in *Penaeus vannamei* and *P. monodon* cultured in the Philippines. *Dis Aquat Org* 116(3):251–254.
- del Valle-Herrera M. (2016). Evaluación del proceso de colonización de *Vibrio parahaemolyticus* causante de la Enfermedad de Necrosis Aguda del Hepatopáncreas en *Litopenaeus vannamei*. Tesis para obtener el grado de maestría. Centro de Investigación en Alimentos y Desarrollo, S.A.
- Depts.washington, (s/a). Phage PEG precipitation/purification. Baker Laboratory, [En línea].

Recuperado el 27 de noviembre de 2021, de:
http://depts.washington.edu/bakerpg/protocols/phage_precipitation.html

- Dhar A.K., Piamsomboon P., Aranguren-Caro L.F., Kanrar S., Adami R. and Ya-Sheng J. (2019). First report of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) occurring in the USA. *Dis Aquat Org* Vol. 132: 241–247.
- Delattre, R., Seurat, J., Haddad, F., Nguyen, T., Gaborieau, B., Kane, R., Dufour, N., Ricard, J.D., Guedj, J. and Debarbieux, L. (2022). Combination of *in vivo* phage therapy data with *in silico* model highlights key parameters for pneumonia treatment efficacy. *Cell Reports* 39, 110825. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.110825>.
- Ding, T., Sun, H., Pan, Q., Zhao, F., Zhang, Z., Ren, H. (2020). Isolation and characterization of *Vibrio parahaemolyticus* bacteriophage vB_VpaS_PG07. *Virus Res.* 286, 198080. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2020.198080>.
- Domínguez-Navarrete N. (2020). Bacteriophages. *Rev. Fac. Med. Hum.* 20(1):164-165.
- Dong X., Chen J., Song J., Wang H., Wang W., Ren Y., Guo C., Wang X., Tang K.F.J. and Huang J. (2019a). Evidence of the horizontal transfer of pVA1-type plasmid from AHPND-causing *V. campbellii* to non-AHPND *V. owensii*. *Aquaculture*, 503: 396-402.
- Dong X., Song J., Chen J., Bi D., Wang W., Ren Y., Wang H., Wang G., Tang K.F.J., Wang X. and Huang J. (2019b). Conjugative transfer of the pVA1-type plasmid carrying the pirABvp genes results in the formation of new AHPND-causing *Vibrio*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 9: 195–205.
- FAO (2020). Shrimp acute hepatopancreatic necrosis disease strategy manual. *FAO Fisheries and Aquaculture Circular* N° 1190, Rome.
- FAO (2008). Global study of shrimp fisheries. Rome.
- FAO (2013). Report of the FAO/MARD Technical Workshop on Early Mortality Syndrome (EMS) or Acute Hepatopancreatic Necrosis Syndrome (AHPNS) of Cultured Shrimp (under TCP/VIE/3304), Hanoi, Viet Nam, 25–27 June 2013. FAO Fisheries and Aquaculture Report No. 1053. Rome. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
- FAO (2020). Shrimp acute hepatopancreatic necrosis disease strategy manual. Rome.
- Fernández-Espinel C., Flores-Dominick V. y Medina-Morillo M. (2017). Aislamiento y caracterización del bacteriófago Va1 específico a *Vibrio alginolyticus*. *Revista peruana de biología* 24(1): 093 – 100. <https://dx.doi.org/10.15381/rpb.v24i1.13103>
- Fu S., Tian H., Wei D., Zhang X. and Liu Y. (2017). Delineating the origins of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from outbreaks of acute hepatopancreatic necrosis disease in Asia by the use of whole genome sequencing. *Front Microbiol* 8:2354
- García, F. (2020). Producción de camarón crece para alimentar a México. *Revista de Divulgación Acuicola*, [En línea]. Recuperado el 05 de abril de 2021, de: <http://divulgacionacuicola.com.mx/blog/2020/12/15/produccion-de-camaron-crece-para-alimentar-a-mexico/>
- García, P., Rodríguez, L., Rodríguez, A. and Martínez, B. (2010). Food biopreservation: promising strategies using bacteriocins, bacteriophages and endolysins. *Trends in Food Science & Technology* 21 (2010) 373e382.

- García-Bermejo, I.M. (s/a). Diagnóstico de las infecciones humanas causadas por especies halófilas del género *Vibrio*. Servicio de Microbiología, Hospital de Getafe [En línea]. Recuperado el 23 de junio de 2022, de: <https://www.seimc.org/contenidos/ccs/revisionestematicas/bacteriologia/vibrio.pdf>
- Gomez-Gil, B., Soto-Rodríguez, S., Lozano, R., Betancourt-Lozano, M. (2014). Draft genome sequence of *Vibrio parahaemolyticus* strain M0605, which causes severe mortalities of shrimps in Mexico. *Genome Announc* 2 (2). <https://doi.org/10.1128/genomeA.00055-14e00055-00014>.
- Gomez-Jimenez S., Noriega-Orozco L., Sotelo-Mundo R.R., Cantu-Robles V.A., Cobian-Guemes A.G., Cota-Verdugo R.G., Gamez-Alejo L.A., del Pozo-Yauner L., Guevara-Hernandez E., Garcia-Orozco K.D., Lopez-Zavala A.A. and Ochoa-Leyva A. (2014). High-quality draft genomes of two *Vibrio parahaemolyticus* strains aid in understanding acute hepatopancreatic necrosis disease of cultured shrimps in Mexico. *Genome Announ* 2(4):e00800–00801.
- González-Gómez, J.P., López-Cuevas, O., Castro-Del Campo, N., González-López, I., Martínez-Rodríguez, C.I., Bruno Gomez-Gil b, Chaidez, C., Gomez-Gil, B. (2020). Genomic and biological characterization of the novel phages vB_VpaP_AL-1 and vB_VpaS_AL-2 infecting *Vibrio parahaemolyticus* associated with acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND). *Virus Research* 312, 198719. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2022.198719>.
- González-Gómez, J.P., Soto-Rodríguez, S., López-Cuevas, O., Castro-Del Campo, N., Chaidez, C., Gomez-Gil, B. (2020). Phylogenomic analysis supports two possible origins for latin American strains of *Vibrio parahaemolyticus* associated with acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND). *Curr. Microbiol.* 77 (12), 3851–3860. <https://doi.org/10.1007/s00284-020-02214-w>.
- Granados-Pérez R. y Villaverde-Peris M.A. (2003). Microbiología. Tomo I. Bacteriología, características y clasificación bacteriana. Virología, características y técnicas bioquímicas. 1º edición. Ed. Ediciones Paraninfo, S.A. Madrid, España. p.p. 265-267.
- Han J.E., Tang F.J. and Corbin A. (2018). Posibles aplicaciones de bacteriófagos para el control de AHPND. *Global Aquaculture Advocate*, [En línea]. Recuperado el 22 de marzo de 2021, de: <https://www.aquaculturealliance.org/advocate/posibles-aplicaciones-de-bacteriofagos-para-el-control-de-ahpnd/?headlessPrint=AAAAPIA9c8r7gs>
- Han J.E., Tang K.F.J, Pantoja C.R., White B.L. and Lightner D.V. (2015b). qPCR assay for detecting and quantifying a virulence plasmid in acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) due to pathogenic *Vibrio parahaemolyticus*. *Aquaculture* 442:12–15.
- Han J.E., Tang K.F.J., Tran L.H. and Lightner D.V. (2015a). *Photorhabdus* insect related (Pir) toxins-like genes in a plasmid of *Vibrio parahaemolyticus*, the causative agent of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) of shrimp. *Dis. Aquat. Org.*, 113: 33–40.
- Han J.E., Tang K.F.J., Tran L.H. (2016). *Photorhabdus* insect-related (Pir) toxin-like genes in a plasmid of *Vibrio parahaemolyticus*, the causative agent of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) of shrimp. *Dis Aquat Organ* 21:4062–72.
- Han, J.E., Choi, S.K., Hand, S.H., Lee, S.C., Jeon, H.J., Lee, C., Kim, K.Y., Lee, Y.S., Parka, S.C. Rhee, G., Park, S.Y., Kim, J.S., Park, S., Kimf, J.H., Leeh, K.J. (2020). Genomic and histopathological characteristics of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from an acute

hepatopancreatic necrosis disease outbreak in Pacific white shrimp (*Penaeus vannamei*) cultured in Korea. *Aquaculture* 524, 735284. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735284>.

- Hernández C., Ulloa J., Vergara J.A., Espejo R. and Cabello F. (2005). Infecciones por *Vibrio parahaemolyticus* e intoxicaciones por algas: problemas emergentes de salud pública en Chile. *Rev Méd*; 133: 1081-1088.
- Hong X., Lu L. and Xu D. (2016). Progress in research on acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND). *Aquacult Int* 24(2):577–593.
- Hong, X., Lu, L., Xu, D., (2016). Progress in research on acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND). *Aquac. Int.* 24 (2), 577–593. <https://doi.org/10.1007/s10499-015-9948-x>.
- Hu, Z., Chen, X., Chen, W., Li, P., Bao, C., Zhu, L., Zhang, H., Dong, C., Zhang, W. (2021). *Siphoviridae* phage PH669 capable of lysing some strains of O3 and O4 serotypes in *Vibrio parahaemolyticus*. *Aquaculture* 545. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.737192>.
- Huan, Q., Xuling, X., Wenbin, F., Jie, H., Hai, C., Yilin, H., Yu, C. (2019). Isolation, identification and biological characteristics of three AHPND pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* virulent phages. *Journal of Fisheries of China* 43 (5), <https://doi.org/10.11964/jfc.20180711345>.
- Jun, J.W., Han, J.E., Tang, K.F.J., Lightner, D.V., Kim, J., Seo, S.W., Park, S.C. (2016). Potential application of bacteriophage pVp-1: agent combating *Vibrio parahaemolyticus* strains associated with acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in shrimp. *Aquaculture* 457, 100–103. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.02.018>.
- Kanrar S. and Dhar A.K. (2018). Complete genome sequence of a novel mutant strain of *Vibrio parahaemolyticus* from Pacific white shrimp (*Penaeus vannamei*). *Genome Announc* 6:e00497-18
- Karunasagar I. and Karunasagar I. (2018). Ecology, Virulence Factors and Global Spread of *Vibrio parahaemolyticus*. *Asian Fisheries Science* 31S: 15–28
- Karunasagar, I. and Karunasahgar, I. (2018). Ecology, Virulence Factors and Global Spread of *Vibrio parahaemolyticus*. *Asian Fisheries Science* 31S: 15–28. <https://doi.org/10.33997/j.afs.2018.31.S1.002>.
- Koga T., Toyoshima S., and Kawata T. (1982). Morphological Varieties and Host Ranges of *Vibrio parahaemolyticus* Bacteriophages Isolated from Seawater. *Applied and environmental microbiology*, Vol. 44 N° 2: 466-470.
- Kropinski, A.M., Clokie, M., Kropinski, A., Lavigne, R. (2018). Practical advice on the one-step growth curve. In: *Bacteriophages. Methods in Molecular Biology*, 1681. Humana Press, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7343-9_3.
- Kumar R., Chang C.C., Ng T.H., Ding J.Y., Tseng T.C., Lo C.F. and Wang H.C. (2018). Draft genome sequence of *Vibrio parahaemolyticus* strain M1–1, which causes acute hepatopancreatic necrosis disease in shrimp in Vietnam. *Genome Announc* 6(3):e01468–e1417
- Kumar R., Hann T. and Wang H. (2020). Acute hepatopancreatic necrosis disease in penaeid shrimp. *Reviews in Aquaculture* 12, 1867–1880.
- Kutter, E., Clokie, M.R., Kropinski, A.M. (2009). Phage host range and efficiency of plating. In:

- Bacteriophages. *Methods in Molecular Biology*, 501. Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-164-6_14.
- Lai H.C., Ng T.H., Ando M. (2015). Pathogenesis of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in shrimp. *Fish Shellfish Immunol*; 47:1006–14.
- Lee C.T., I-Tung C., Yang Y.T. (2015). The opportunistic marine pathogen *Vibrio parahaemolyticus* becomes virulent by acquiring a plasmid that expresses a deadly toxin. *Proc Natl Acad Sci*; 112:10798–803.
- Lightner D.V. (2012). Early Mortality Syndrome Affects Shrimp In Asia. *Global aquaculture advocate*.
- Lightner, D. and Redman, R. (1998). Shrimp Diseases and Current Diagnostic Methods. *Aquaculture*, 164, 201-220. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(98\)00187-2](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(98)00187-2).
- Lomelí-Ortega, C.O., Martínez-Díaz, S.F. (2014). Phage therapy against *Vibrio parahaemolyticus* infection in the whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) larvae. *Aquaculture* 434, 208–211. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.08.018>.
- Lucero-Oleacha A.L. (2020). Genómica comparativa de bacterias patógenas hemofílicas aisladas de granjas acuícolas de Baja California Sur. Tesis para obtener el grado de maestría. Centro de Investigación Biológicas del Noroeste, S.C.
- Makarov R. (2011). Vibriofagos en el cultivo larvario del camarón y su relación con la incidencia y virulencia de *vibrio*. Tesis para obtener el grado de maestría. Instituto Politécnico Nacional.
- Makarov, R., Lomelí-Ortega, C.O., Zermeño-Cervantes, L.A., García-Álvarez, E., Gutiérrez-Rivera, J.N., Cardona-Félix, C.S., Martínez-Díaz, S.F. (2019). Evaluation of a cocktail of phages for the control of presumptive *Vibrio parahaemolyticus* strains associated to acute hepatopancreatic necrosis disease. *Aquac. Res.* 00, 1–10. <https://doi.org/10.1111/are.14258>.
- Maldonado-Muñiz M. (2020). Biosíntesis de nanopartículas con extractos de macroalgas, caracterización y evaluación contra *Vibrio parahaemolyticus* causante de la enfermedad de necrosis hepatopancreática aguda (AHPND/ EMS) en camarón blanco *Litopenaeus vannamei*. Tesis para obtener el grado de doctorado. Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Martínez-Córdova, L.R., Martínez-Porchas, M. y Cortés-Jacinto, E. (2009). Camaronicultura mexicana y mundial: ¿Actividad sustentable o industria contaminante? *Rev. Int. Contam. Ambient.* 25 (3) 181-196. <http://www.scielo.org.mx/pdf/rica/v25n3/v25n3a6.pdf>.
- Matamp, N., and Bhat, S. G. (2020). Genome characterisation of novel lytic *Myoviridae* bacteriophage FVP-1 enhances its applicability against MDRbiofilm-forming *Vibrio parahaemolyticus*. *Arch. Virol.* 165, 387–396. <https://doi.org/10.1007/s00705-019-04493-6>.
- Mateus, L., Costa, L., Silva, Y.J., Pereira, C., Cunha, A., Almeida, A. (2014). Efficiency of phage cocktails in the inactivation of *Vibrio* in aquaculture. *Aquaculture* 424-425, 167–173. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.01.001>.
- Meier-Kolthoff, J.P., Goker, M. (2017). VICTOR: genome-based phylogeny and classification of prokaryotic viruses. *Bioinformatics* 33 (21), 3396–3404. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx440>.
- Mendoza-Escamilla V. (2018). Así es como México siembra y cosecha camarones en Sinaloa. *Revista Forbes*, [En línea]. Recuperado el 11 de febrero de 2021, de:

<https://www.forbes.com.mx/camarones-de-granja-vencen-captura-tradicional/>

- Millares de la Peña M. (2020). Bacteriófagos, una herramienta prometedora contra las bacterias multirresistentes. Tesis para grado de licenciatura. Universidad de la Laguna.
- Moraru, C., Varsani, A., Kropinski, A.M. (2020). VIRIDIC-a novel tool to calculate the intergenomic similarities of prokaryote-infecting viruses. *Viruses* 12 (11). <https://doi.org/10.3390/v12111268>.
- Negroni M. y González M.I. (2017). Virus: generalidades, [En línea]. Recuperado el 20 de febrero de 2021, de: <https://www.berri.es/pdf/>
- Nunan L., Lightner D., Pantoja C. and Gomez-Jimenez S. (2014). Detection of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in Mexico. *Dis Aquat Org* Vol. 111: 81–86.
- OIE. *Aquatic animal health code* (2019). Paris, World Organisation for Animal Health, [En línea]. Recuperado el 04 de abril de 2021, de: <http://www.oie.int/standard-setting/aquatic-code/access-online/>
- Otero-Carrera J. (2019). Biodistribución de bacteriófagos en mamíferos tras terapia fágica oral y emergencia de resistencia bacteriana a los fagos. Tesis para obtener el grado de doctorado. Univeritat Autònoma de Barcelona.
- Peña-Osorio L.J. y Cuéllar-Anjel J. (2019). Vibriosis en camarón blanco del pacífico *Penaeus vannamei* reporte de caso. Universidad de Ciencias Básicas y Aplicadas.
- Pizarro-Cerdá J., and Cossart P. (2006). Bacterial Adhesion and Entry into Host Cells. *Cell*, 124(4), 715–727.
- Pumarola A., Rodríguez-Torres A., García-Rodríguez J.A., y Piedrola-Angulo G. (1997). Microbiología y Parasitología Médica. 2º edición. Ed. Salvat Editores, S.A. Madrid, España. p.p. 466-472.
- Quiroz-Guzmán E., Peña-Rodrigueza A. and Vázquez-Juárez R. (2018). Bacteriophage cocktails as an environmentally-friendly approach to prevent *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio harveyi* infections in brine shrimp (*Artemia franciscana*) production. *Aquaculture* 492 (2018) 273–279.
- Rendón L. y Balcázar J.L. (2003). Inmunología de camarones: Conceptos básicos y recientes avances. *Revista AquaTIC*, N° 19, pp. 27-33.
- Restrepo L., Bayot B., Betancourt I. and Pinzón A. (2016). Draft genome sequence of pathogenic bacteria *Vibrio parahaemolyticus* strain Ba94C2, associated with acute hepatopancreatic necrosis disease isolate from South America. *Genomics Data* 9:143–144.
- Ríos-Sandoval M. (2019). Caracterización genómica, morfológica y replicativa del bacteriófago ΦXaF18 DE *Xanthomonas vesicatoria*. Tesis para obtener el grado maestra en ciencias. Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A. C.
- Rodríguez-Castro A.M. (2012). Origen, distribución y caracterización de vibrios patógenos en humanos en el medio ambiente en Galicia. Tesis para obtener el grado doctoral. Universidad de Santiago de Compostela.
- Ronda C., Vázquez M. and López R. (2003). Los bacteriófagos como herramienta para combatir infecciones en Acuicultura. *Revista AquaTIC*, N° 18, pp. 3-10.

- Rong, R., Lin, H., Wang, J., Khan, M. N., and Li, M. (2014). Reductions of *Vibrio parahaemolyticus* in oysters after bacteriophage application during depuration. *Aquaculture* 418-419, 171–176. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.09.028>.
- Ross A, Ward S and Hyman P (2016) More Is Better: Selecting for Broad Host Range Bacteriophages. *Front. Microbiol.* 7:1352. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01352>.
- Sambrook J. and Russell W. (2001). Extraction of bacteriophage λ DNA from large-scale cultures using proteinase K and SDS. En Irwin N. (ed.) *Molecular cloning: a laboratory manual* 3rd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 256-258.
- Sánchez-Díaz, R (2018). Evaluación de bacterias marinas y su potencial uso como aditivo en alimento y/o agente probiótico contra *Vibrio parahaemolyticus*, agente causal de la enfermedad de la necrosis hepatopancreática aguda (AHPND) en camarón blanco *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931). Tesis para obtener el grado de doctorado. Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Seas C. (2010). *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 y sus variantes pandémicas en Perú y *Vibrio cholerae* O1 El Tor en Haití: ¿Dos amenazas para la región? *Rev Med Hered* 21 (4),173.
- Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, Programa Nacional de Medio Ambiente, SEMARNAT, México, (2019).
- SMATTCOM (2019). Camarón mexicano: exportación, retos y posicionamiento en E.U., [En línea]. Recuperado el 31 de marzo de 2021, de: <https://smattcom.com/blog/camaron-mexicano-exportacion-retos-posicionamiento-en-EU>
- Soto-Rodríguez S., Armenta M. and Gómez-Gil B. (2006). Effects of enrofloxacin and florfenicol on survival and bacterial population in an experimental infection with luminescent *Vibrio campbellii* in shrimp larvae of *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture* 255 (2006) 48–54.
- Soto-Rodríguez S.A., del Río-Rodríguez R.E., Pech D., Gómez-Solano M.A. and Sosa-Lopez A. (2013). A ten-month diseases survey on wild *Litopenaeus setiferus* (Decapoda: Penaeidae) from Southern Gulf of Mexico. *Rev. biol. trop* Vol.61 N°3, 0034-7744.
- Soto-Rodríguez, S.A., Gomez-Gil, B., Lozano-Olvera, R., Betancourt-Lozano, M., 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. *Appl. Environ. Microbiol.* 81 (5), 1689–1699. <https://doi.org/10.1128/AEM.03610-14>.
- Stalin, N., Srinivasan, P. (2017). Efficacy of potential phage cocktails against *Vibrio harveyi* and closely related *Vibrio* species isolated from shrimp aquaculture environment in the south east coast of India. *Vet. Microbiol.* 207, 83–96. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.06.006> [published Online First: Epub Date]].
- Sullivan, M. J., Petty, N. K., and Beatson, S. A. (2011). Easyfig: a genome comparison visualizer. *Bioinformatics* 27, 1009–1010. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr039>.
- Summer W.C. (2001). Bacteriophage therapy. *Annu. Rev. Microbiol.* 55:437–51.
- Tan, C.W., Rukayadi1, Y., Hasan, H., Abdul-Mutalib, N.A., Jambari, N.N., Hara, H., Thung, T.Y., Lee, E. and Radu, S. (2021). Isolation and Characterization of Six *Vibrio parahaemolyticus* Lytic Bacteriophages From Seafood Samples. *Frontiers in Microbiology* 12:616548.

- Tan, C.W., Rukayadi, Y., Hasan, H., Abdul-Mutalib, N-A, Jambari, N.N., Hara, H., Thung, T.Y., Lee, E. and Radu, S. (2021.) Isolation and Characterization of Six *Vibrio parahaemolyticus* Lytic Bacteriophages From Seafood Samples. *Front. Microbiol.* 12:616548. [https://doi:10.3389/fmicb.2021.616548](https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.616548).
- Thammatinna K., MacKennon E. E., Htut-Htoo H., Khanna K., Sugie J., Nideffer J.F., Villa E., Tassanakajon A., Pogliano J., Nonejuie P. and Chaikerasitak V. (2020). A novel vibriophage exhibits inhibitory activity against host protein synthesis machinery. *Scientific Reports* 10:2347. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-59396-3>.
- Thitamadee S., Prachumwat A., Srisala J., Jaroenlak P., Salachan P.V., Sritunyalucksana K., Flegel W.F. and Itsathitphaisarn O. (2015). Review of current disease threats for cultivated penaeid shrimp in Asia. *Aquaculture* 452 (2016) 69–87.
- Toledo, M. (2021). En riesgo exportación de camarón mexicano, [En línea]. Recuperado el 02 de abril de 2021, de: <https://www.elsoldemazatlan.com.mx/finanzas/en-riesgo-exportacion-de-camaron-mexicano-6532606.html>
- Tran L., Nunan L., Redman R.N., Mohny L.L., Pantoja C.R., Fitzsimmons K. and Lightner D.V. (2013). Determination of the infectious nature of the agent of acute hepatopancreatic necrosis syndrome affecting penaeid shrimp. *Dis Aquat Org* 105(1):45–55.
- Turner, D., Kropinski, A.M., Adriaenssens, E.M. (2021). A roadmap for genome-based phage taxonomy. *Viruses* 13 (3), 506. <https://doi.org/10.3390/v13030506>.
- Valera-Mejías A. y Peña-Navarro N. (2014). Síndrome de la Mortalidad Temprana (EMS/AHPNS) en camarones cultivados: Una revisión. *Repertorio Científico*. ISSN 1021-6294. Vol. 17, N° 1: 25-30
- Vispo N.S., Camacho F., Pupo-Antúnez M., Toledo R. and Sánchez-Ramos O. (2016). Display technology on filamentous phage in the search for anti-infective biological agents. *Revista Bionatura* 1(1).
- Wick, R., (2021). Guide to bacterial genome assembly. <https://github.com/rrwick/Tracycler/wiki/Guide-to-bacterial-genome-assembly> (accessed 12 April 2022).
- Wong, H.C., Wang, T.Y., Yang, C.W., Tang, C.T., Ying, C., Wang, C.H., Chang, W.H. (2019). Characterization of a lytic vibriophage VP06 of *Vibrio parahaemolyticus*. *Research in Microbiology* 170, 13-23. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2018.07.003>.
- Xiao, J., Liu, L., Ke, Y., Li, X., Liu, Y., Pan, Y., Yan, S., Wang, Y. (2017). Shrimp AHPND-causing plasmids encoding the PirAB toxins as mediated by pirAB-Tn903 are prevalent in various *Vibrio* species. *Sci Rep* 7:42177. <https://doi.org/10.1038/srep42177>.
- Yan C.Z., Austin C.M., Ayub Q., Rahman S., and Ming-Gan H. (2019). Genomic characterization of *Vibrio parahaemolyticus* from Pacific white shrimp and rearing water in Malaysia reveals novel sequence types and structural variation in genomic regions containing the *Photorhabdus* insect-related (Pir) toxin-like genes. *FEMS Microbiology Letters*, 366.
- Yang C., Pei X., Wu Y., Yan L., Yan Y., Song Y., Coyle N.M., Martinez-Urtaza J., Quince C., Hu Q., Jiang M., Feil E., Yang D., Song Y., Zhou D., Yang R., Falush D. and Cui Y. (2019). Recent mixing of *Vibrio parahaemolyticus* populations. *ISME J* 13(10):2578–2588

- Yang, M., Chen, H., Guo, S., Tan, S., Xie, Z., Zhang, J., Wu, Q., Tan, Z. (2022). Characterization and genome analysis of a novel *Vibrio parahaemolyticus* phage vB_VpP_DE17. *Virus Res.* 307, 198580 <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2021.198580>.
- Yang, M., Liang, Y., Huang, S., Zhang, J., Wang, J., Chen, H., Ye, Y., Gao, X., Wu, Q., Tan, Z., (2020). Isolation and characterization of the novel phages vB_VpS_BA3 and vB_VpS_CA8 for lysing *vibrio parahaemolyticus*. *Front. Microbiol.* 11, 259. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00259>.
- You, H.J., Lee, J.H., Oh, M., Hong, S.Y., Kim, D., Noh, J., Kim, M., Kim, B.S. (2021). Tackling *Vibrio parahaemolyticus* in ready-to-eat raw fish flesh slices using lytic phage VPT02 isolated from market oyster. *Food Research International* 150, 110779. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110779>.
- Yu, Y.P., Gong, T., Jost, G., Liu, W.H., Ye, D.Z., Luo, Z.H. (2013). Isolation and characterization of five lytic bacteriophages infecting a *Vibrio* strain closely related to *Vibrio owensii*. *FEMS Microbiol Lett* 348, 112–119. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12277>.
- Zamora-Pantoja D.R., Quiróz-Santiago C. y Quiñónez-Ramírez E.I. (2005). Un enemigo marino silencioso *Vibrio parahaemolyticus*. *Revista Digital Universitaria* Vol. 6 N° 4, 1067-6079.

12. ANEXOS

Cuadro S1. Agrupación de información usando el método de Tukey 95% de confianza para el factor de temperatura

Cepa fago ID	Temperatura	N	Media	Grupo
CHI	-80	3	7.3169	A
CHI	4	3	7.172	AB
CHI	25	3	7.2036	AB
CHI	30	3	7.0867	B
CHI	40	3	7.1795	AB
CHI	50	3	7.1718	AB
CHI	60	3	7.144	AB
CHI	70	3	0	C
ALK	-80	3	7.069	c
ALK	4	3	7.0281	c
ALK	25	3	7.1841	bc
ALK	30	3	7.476	ab
ALK	40	3	7.437	b
ALK	50	3	7.4381	b
ALK	60	3	7.7894	a
ALK	70	3	0	d
M3	-80	3	6.8198	J
M3	4	3	7.535	GHI
M3	25	3	7.6761	FGH
M3	30	3	7.7103	EFG
M3	40	3	7.9267	EF
M3	50	3	8.0536	E
M3	60	3	7.333	HI
M3	70	3	7.2018	I
C2	-80	3	6.8592	f
C2	4	3	6.884	f
C2	25	3	7.0518	ef

C2	30	3	7.2703	ef
C2	40	3	7.346	e
C2	50	3	7.395	e
C2	60	3	7.4908	e
C2	70	3	6.8592	f
M9	-80	3	7.5462	KL
M9	4	3	7.579	KL
M9	25	3	7.1903	LM
M9	30	3	7.4814	KLM
M9	40	3	7.7195	K
M9	50	3	7.491	KLM
M9	60	3	7.343	KLM
M9	70	3	7.0666	M
M83	-80	3	6.9792	m
M83	4	3	7.6034	k
M83	25	3	7.1625	lm
M83	30	3	7.461	kl
M83	40	3	7.5547	k
M83	50	3	7.2535	klm
M83	60	3	7.1992	lm
M83	70	3	7.0428	m

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Cuadro S2. Agrupación de información usando el método de Tukey 95% de confianza para el factor de pH

Cepa fago ID	pH	N	Media	Grupo
CHI	2	3	6.678	B
CHI	3	3	6.615	B
CHI	5	3	7.3542	A
CHI	7	3	7.1554	A
CHI	9	3	6.702	B
CHI	11	3	6.5415	B
CHI	12	3	6.3597	B

ALK	2	3	6.502	b
ALK	3	3	6.7418	ab
ALK	5	3	6.8744	ab
ALK	7	3	6.848	ab
ALK	9	3	6.8955	ab
ALK	11	3	7.247	a
ALK	12	3	6.36	b
M3	2	3	7.60912	D
M3	3	3	8.553	C
M3	5	3	7.7813	E
M3	7	3	8.2149	D
M3	9	3	8.1202	D
M3	11	3	8.2422	D
M3	12	3	7.7929	E
C2	2	3	7.0634	c
C2	3	3	7.2764	c
C2	5	3	7.0335	c
C2	7	3	6.8815	c
C2	9	3	7.327	c
C2	11	3	6.8105	c
C2	12	3	7.053	c
M9	2	3	7.1669	G
M9	3	3	7.1082	G
M9	5	3	7.0709	G
M9	7	3	7.1167	G
M9	9	3	7.1992	G
M9	11	3	7.305	G
M9	12	3	7.2771	G
M83	2	3	6.9492	i
M83	3	3	7.3851	gh
M83	5	3	7.458	g
M83	7	3	7.1015	hi
M83	9	3	7.2693	gh

M83	11	3	7.2913	gh
M83	12	3	6.9595	i

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Cuadro S3. Clasificación funcional de 95 ORF en el genoma vB_VpaS_CHI

Label	Strand	Start	Stop	Length nt/aa	Function protein	Organism	Accession	Query Cover	E value	Identity (%)
vB_VpaS_C HI ORF155	-	2981 6	2701 2	2805 934	hypothetical protein	Phytophthora cactorum	KAF1795296.1	68%	18	76.47 %
vB_VpaS_C HI ORF154	-	3020 3	2998 8	216 71	hypothetical protein	Paenibacillus flagellatus	WP_14625026 6.1	82%	0.73	58.62 %
vB_VpaS_C HI ORF153	-	3266 6	3102 0	1647 548	hypothetical protein	Vibrio phage vB_VhaS-tm	ANO57534.1	100 %	0	97.81 %
vB_VpaS_C HI ORF152	-	3434 3	3352 8	816 271	hypothetical protein	Edhazardia aedis USNM 41457	EJW04853.1	34%	56	90.00 %
vB_VpaS_C HI ORF252	-	5640	5128	513 170	hypothetical protein	-	-	-	-	-
vB_VpaS_C HI ORF150	-	3855 2	3837 3	180 59	hypothetical protein	Perca fluviatilis	KAF1373361.1	62%	7.6	65.00 %
vB_VpaS_C HI ORF7	+	1431 7	1536 6	1050 349	hypothetical protein	Morchella conica CCBAS932	RPB11477.1	60%	0.039	63.16 %
vB_VpaS_C HI ORF8	+	1537 9	1710 0	1722 573	primase	-	-	-	-	-
vB_VpaS_C HI ORF9	+	7150	9525	2376 791	hypothetical protein	Vibrio phage vB_VhaS-tm	ANO57534.1	100 %	0	95.07 %
vB_VpaS_C HI ORF10	+	2152 6	2209 5	570 189	hypothetical protein	Vibrio phage vB_VhaS-tm	ANO57534.1	100 %	4.00E- 180	98.78 %
vB_VpaS_C HI ORF11	+	1074 1	1118 1	441 146	hypothetical protein	Vibrio phage PH669	QQK88584.1	46%	2.00E- 51	62.59 %
vB_VpaS_C HI ORF12	+	2250 1	2267 7	177 58	hypothetical protein	Vibrio phage vB_VnaS- AQKL99	QMV29716.1	98%	2.00E- 100	86.16 %
vB_VpaS_C HI ORF13	+	2285 8	2304 6	189 62	hypothetical protein	-	-	-	-	-
vB_VpaS_C HI ORF14	+	2408 8	2634 9	2262 753	Phage protein (ACLAME 618)	Vibrio phage vB_VnaS- AQKL99	QMV29716.1	100 %	8.00E- 127	92.42 %
vB_VpaS_C HI ORF15	+	1431 7	1536 6	1050 349	hypothetical protein					
vB_VpaS_C HI ORF18	+	3338 8	3357 6	189 62	hypothetical protein	Vibrio phage vB_VhaS-tm	ANO57534.1	100 %	0	94.50 %
vB_VpaS_C HI ORF19	+	4243 9	4261 8	180 59	hypothetical protein					
vB_VpaS_C HI ORF21	+	4978 6	5002 5	240 79	DNA helicase, phage associated; Type III restriction enzyme	-	-	-	-	-
vB_VpaS_C HI ORF23	+	5462 8	5479 2	165 54	hypothetical protein	Vibrio phage vB_VnaS- AQKL99	QMV29716.1	100 %	7.00E- 91	93.06 %
vB_VpaS_C	+	2408	2634	2262	hypothetical	Vibrio phage	QMV29716.1	84%	2.00E-	94.34

HI ORF24		8	9	753	protein	vB_VnaS-AQKL99			91	%
vB_VpaS_C HI ORF25	+	5559 7	5576 1	165 54	hypothetical protein	Vibrio phage vB_VhaS-tm	ANO57534.1	46%	8.00E- 50	92.31 %
vB_VpaS_C HI ORF27	+	5706 1	5728 2	222 73	hypothetical protein	Vibrio phage vB_VhaS-tm	ANO57534.1	95%	7.00E- 31	94.83 %
vB_VpaS_C HI ORF28	+	2920 6	2932 2	117 38	7-carboxy-7- deazaguanine synthase (EC 4.3.99.3)	-	-	-	-	-
vB_VpaS_C HI ORF29	+	1058	1297	240 79	7-cyano-7- deazaguanine synthase (EC 6.3.4.20)	-	-	-	-	-
vB_VpaS_C HI ORF31	+	3153 1	3160 8	78 25	6-carboxy- 5,6,7,8- tetrahydropter- in synthase (EC 4.1.2.50)	Vibrio phage vB_VhaS-tm	ANO57534.1	76%	3.00E- 47	91.67 %
vB_VpaS_C HI ORF19	+	4243 9	4261 8	180 59	GTP cyclohydrolase I (EC 3.5.4.16) type 1	-	-	-	-	-
vB_VpaS_C HI ORF32	+	3235 3	3261 9	267 88	hypothetical protein	-	-	-	-	-
vB_VpaS_C HI ORF34	+	3338 8	3357 6	189 62	hypothetical protein	Vibrio phage vB_VhaS-tm	ANO57534.1	87%	4.00E- 71	86.07 %
vB_VpaS_C HI ORF38	+	2878 0	2895 3	174 57	Phage protein	Vibrio phage vB_VpS BA3	QEQ95113.1	100 %	5.00E- 161	78.28 %
vB_VpaS_C HI ORF39	+	2908 0	2912 1	42 13	tRNA ribosyltransfer ase [Vibrio phage vB_VnaS- AQKL99]	Vibrio phage vB_VnaS- AQKL99	QMV29716.1	100 %	3.00E- 58	53.11 %
vB_VpaS_C HI ORF41	+	2946 1	2949 3	33 10	hypothetical protein	Vibrio phage pVco-14	QQM14126.1	70%	1.00E- 22	69.86 %
vB_VpaS_C HI ORF42	+	3077 8	3084 3	66 21	hypothetical protein	Caldilinea aerophila DSM 145	BAL99815.1	52%	27	90.91 %
vB_VpaS_C HI ORF134	+	1383 5	1432 0	486 161	tail assembly protein	Staphylotrichum	KAG7290765. 1	83%	5.8	59.26 %
vB_VpaS_C HI ORF132	-	4230	3910	321 106	tail assembly protein	Vibrio phage vB_VhaS-tm	ANO57534.1	100 %	0	94.50 %
vB_VpaS_C HI ORF130	-	5640	5128	513 170	Phage protein	-	-	-	-	-
vB_VpaS_C HI ORF129	-	1220 1	1204 3	159 52	hypothetical protein	-	-	-	-	-
vB_VpaS_C HI ORF128	-	1140 3	1124 5	159 52	hypothetical protein	-	-	-	-	-
vB_VpaS_C HI ORF281	-	3434 3	3352 8	816 271	hypothetical protein	Vibrio phage vB_VnaS- AQKL99	QMV29716.1	99%	3.00E- 33	33.45 %
vB_VpaS_C HI ORF175	-	3664 3	3434 3	2301 766	tail length tape-measure protein 1	Vibrio phage vB_VhaS-tm	ANO57534.1	100 %	0	86.81 %
vB_VpaS_C HI ORF280	-	3705 8	3675 6	303 100	hypothetical protein	-	-	-	-	-
vB_VpaS_C HI ORF173	-	3744 1	3708 2	360 119	hypothetical protein	Halobacteriovorac eae bacterium	MAX66020.1	90%	25	88.89 %
vB_VpaS_C	-	3789	3745	438	hypothetical	-	-	-	-	-

HI ORF172		1	4	145	protein					
vB_VpaS_C HI ORF225	-	3897 0	3803 8	933 310	hypothetical protein	Vibrio phage pVco-14	QQM14126.1	100 %	0	90.65 %
vB_VpaS_C HI ORF224	-	3939 9	3898 3	417 138	hypothetical protein	-	-	-	-	-
vB_VpaS_C HI ORF276	-	3980 0	3939 6	405 134	hypothetical protein	-	-	-	-	-
vB_VpaS_C HI ORF170	-	4021 9	3979 7	423 140	hypothetical protein	-	-	-	-	-
vB_VpaS_C HI ORF275	-	4069 7	4016 7	531 176	putative virion structural protein [Vibrio phage pVco- 14]	Vibrio phage pVco-14	QQM14126.1	100 %	2.00E- 108	84.09 %
vB_VpaS_C HI ORF167	-	4092 7	4075 4	174 57	hypothetical protein	-	-	-	-	-
vB_VpaS_C HI ORF223	-	4328 7	4101 4	2274 757	hypothetical protein	Vibrio phage SHOU24	YP_009006419 .1	99%	0	49.04 %
vB_VpaS_C HI ORF222	-	4432 8	4329 1	1038 345	hypothetical protein	Vibrio phage pVco-14	QQM14126.1	97%	4.00E- 135	60.18 %
vB_VpaS_C HI ORF272	-	4520 9	4462 8	582 193	hypothetical protein	Trichodelitschia	KAF2402602.1	83%	64	52.00 %
vB_VpaS_C HI ORF140	+	3202 4	3205 9	36 11	hypothetical protein	Anaerolineaceae bacterium	NMC85007.1	90%	31	76.92 %
vB_VpaS_C HI ORF220	-	4580 1	4549 3	309 102	Phage major capsid protein of Caudovirales	Salvia splendens	KAG6396615. 1	100 %	9.2	90.00 %
vB_VpaS_C HI ORF217	-	4761 9	4673 8	882 293	hypothetical protein	Vibrio phage vB_VhaS-tm	ANO57534.1	100 %	0	93.17 %
vB_VpaS_C HI ORF266	-	4879 4	4864 2	153 50	minor head protein-like protein	-	-	-	-	-
vB_VpaS_C HI ORF265	-	5023 1	4880 7	1425 474	hypothetical protein	Vibrio phage vB_VhaS-tm	ANO57534.1	100 %	0	91.98 %
vB_VpaS_C HI ORF160	-	5170 9	5024 3	1467 488	terminase large subunit	Vibrio phage vB_VhaS-tm	ANO57534.1	100 %	0	97.75 %
vB_VpaS_C HI ORF211	-	5235 0	5193 1	420 139	hypothetical protein	Vibrio phage vB_VhaS-tm	ANO57534.1	46%	8.00E- 50	92.31 %
vB_VpaS_C HI ORF43	+	5251 6	5261 4	99 32	hypothetical protein	Vibrio phage pVco-14	QQM14126.1	100 %	1.00E- 69	80.58 %
vB_VpaS_C HI ORF263	-	5314 1	5264 7	495 164	N- acetylmuramoy l-L-alanine amidase	Vibrio phage vB_VhaS-tm	ANO57534.1	99%	4.00E- 104	86.50 %
vB_VpaS_C HI ORF158	-	5369 2	5314 7	546 181	hypothetical protein	Vibrio phage vB_VhaS-tm	ANO57534.1	100 %	6.00E- 126	95.03 %
vB_VpaS_C HI ORF157	-	5405 8	5380 7	252 83	hypothetical protein	Vibrio phage vB_VhaS-tm	ANO57534.1	89%	5.00E- 39	82.43 %
vB_VpaS_C HI ORF206	-	5429 4	5402 8	267 88	hypothetical protein	Vibrio phage pVco-14	QQM14126.1	98%	1.00E- 36	70.11 %
vB_VpaS_C HI ORF261	-	5490 2	5430 6	597 198	hypothetical protein	-	-	-	-	-
vB_VpaS_C HI ORF149	+	5496 3	5512 7	165 54	hypothetical protein	-	-	-	-	-
vB_VpaS_C HI ORF153	-	3266 6	3102 0	1647 548	hypothetical protein	Vibrio phage vB_VhaS-tm	ANO57534.1	100 %	0	97.81 %
vB_VpaS_C HI ORF260	-	5698 7	5652 9	459 152	hypothetical protein	Vibrio phage vB_VhaS-tm	ANO57534.1	100 %	2.00E- 83	90.79 %
vB_VpaS_C HI ORF203	-	5722 8	5704 3	186 61	hypothetical protein	Vibrio phage vB_VhaS-tm	ANO57534.1	100 %	6.00E- 34	90.16 %

vB_VpaS_C HI_ORF259	-	5763 5	5730 6	330 109	hypothetical protein	Vibrio phage vB_VnaS- AQKL99	QMV29716.1	100 %	3.00E- 70	97.25 %
------------------------	---	-----------	-----------	--------------	-------------------------	------------------------------------	------------	----------	--------------	------------

Cuadro S4. Clasificación funcional de 94 ORF en el genoma vB_VpaS_ALK

Label	Strand	Start	Stop	Length nt aa	Function protein	Organism	Accession	Query Cover	E value	Identity (%)
vB_VpaS_A LK_ORF260	+	4401 3	44057	45 14	hypothetical protein	<i>Vibrio</i> phage vB_VhaS-tm	ANO575 34.1	100%	9.00 E-61	81.13 %
vB_VpaS_A LK_ORF309	-	4003 0	39995	36 11	hypothetical protein	<i>Bulinus truncatus</i>	KAH951 4266.1	90%	30	90.00 %
vB_VpaS_A LK_ORF259	+	4385 7	43895	39 12	hypothetical protein	<i>Planctomycetes bacterium</i>	MBS020 2587.1	100%	13	83.33 %
vB_VpaS_A LK_ORF199	+	3663	3764	102 33	hypothetical protein	-	-	-	-	-
vB_VpaS_A LK_ORF258	+	4377 9	43832	54 17	hypothetical protein	<i>Anaerolineaceae bacterium</i>	MBI128 0530.1	82%	5.7	71.43 %
vB_VpaS_A LK_ORF198	+	3339	3455	117 38	hypothetical protein	-	-	-	-	-
vB_VpaS_A LK_ORF60	+	6875	7147	273 90	hypothetical protein	-	-	-	-	-
vB_VpaS_A LK_ORF9	+	7150	9363	2214 737	primase	<i>Vibrio</i> phage vB_VhaS-tm	ANO575 34.1	100%	0	94.72 %
vB_VpaS_A LK_ORF113	+	1740 5	17974	570 189	hypothetical protein	<i>Vibrio</i> phage vB_VnaS-AQKL99	QMV29 716.1	84%	2.00 E-91	94.34 %
vB_VpaS_A LK_ORF114	-	4880 7	47644	1164 387	hypothetical protein	-	-	-	-	-
vB_VpaS_A LK_ORF62	+	4978 6	50025	240 79	hypothetical protein	-	-	-	-	-
vB_VpaS_A LK_ORF115	-	4761 9	46738	882 293	hypothetical protein	<i>Vibrio</i> phage vB_VhaS-tm	ANO575 34.1	46%	8.00 E-50	92.31 %
vB_VpaS_A LK_ORF13	+	7150	9363	2214 737	ATPase	<i>Vibrio</i> phage vB_VhaS-tm	ANO575 34.1	100%	0	94.72 %
vB_VpaS_A LK_ORF116	-	4632 9	46177	153 50	hypothetical protein	<i>Chloroflexi bacterium</i>	MCE964 6809.1	78%	1.2	90.91 %
vB_VpaS_A LK_ORF16	+	1002 7	10110	84 27	Phage protein (ACLAME 618)	<i>Lactarius sanguis</i>	KAH916 4212.1	59%	2.9	58.33 %
vB_VpaS_A LK_ORF118	-	4542 6	45226	201 66	hypothetical protein	<i>Catenaria anguillulae</i> PL171	ORZ392 87.1	86%	78	65.00 %
vB_VpaS_A LK_ORF119	+	1439 4	15443	1050 349	hypothetical protein	<i>Vibrio</i> phage vB_VnaS-AQKL99	QMV29 716.1	100%	0	94.27 %
vB_VpaS_A LK_ORF120	+	1545 6	17177	1722 573	hypothetical protein	<i>Vibrio</i> phage vB_VhaS-tm	ANO575 34.1	100%	0	95.29 %
vB_VpaS_A LK_ORF23	+	5318 8	53364	177 58	DNA helicase, phage associated; Type III restriction enzyme	<i>Vibrio</i> phage vB_VnaS-AQKL99	QMV29 716.1	98%	2.00 E- 100	86.16 %
vB_VpaS_A LK_ORF121	+	2152 1	21559	39 12	hypothetical protein	-	-	-	-	-
vB_VpaS_A LK_ORF24	+	1477 9	14871	93 30	hypothetical protein	<i>Brevundimonas</i> sp.	HCW49 610.1	91%	4.6	90.91 %
vB_VpaS_A LK_ORF68	+	2257 8	22754	177 58	hypothetical protein	<i>Sphingomonas</i>	MBB488 1513.1	60%	2.9	73.68 %
vB_VpaS_A LK_ORF25	+	5533 0	55482	153 50	hypothetical protein	-	-	-	-	-

vB_VpaS_A LK ORF69	+	2293 5	23123	189 62	7-carboxy-7-deazaguanine synthase (EC 4.3.99.3)	<i>Vibrio</i> phage vB_VnaS-AQKL99	QMV29 716.1	95%	0	95.97 %
vB_VpaS_A LK ORF122	-	4029 6	39874	423 140	7-cyano-7-deazaguanine synthase (EC 6.3.4.20)	<i>Vibrio</i> phage vB_VhaS-tm	ANO575 34.1	95%	7.00 E-31	94.83 %
vB_VpaS_A LK ORF247	-	2116 2	21043	120 39	6-carboxy-5,6,7,8-tetrahydropterin synthase (EC 4.1.2.50)	-	-	-	-	-
vB_VpaS_A LK ORF123	+	2148 0	21602	123 40	GTP cyclohydrolase I (EC 3.5.4.16) type 1	-	-	-	-	-
vB_VpaS_A LK ORF124	-	3796 8	37531	438 145	hypothetical protein	<i>Vibrio</i> phage pVco-14	QQM14 126.1	100%	2.00 E-128	92.06 %
vB_VpaS_A LK ORF70	+	2416 5	26426	2262 753	hypothetical protein	<i>Vibrio</i> phage vB_VhaS-tm	ANO575 34.1	100%	0	94.23 %
vB_VpaS_A LK ORF28	+	2318 5	24168	984 327	Phage protein	<i>Vibrio</i> phage vB_VhaS-tm	ANO575 34.1	100%	0	94.50 %
vB_VpaS_A LK ORF128	+	2674 1	26860	120 39	tRNA ribosyltransferase [Vibrio phage vB_VnaS-AQKL99]	<i>Vibrio</i> phage vB_VhaS-tm	ANO575 34.1	100%	0	94.42 %
vB_VpaS_A LK ORF129	-	2834 1	28138	204 67	hypothetical protein	<i>Vibrio</i> phage VP06	AVI051 39.1	100%	9.00 E-34	32.04 %
vB_VpaS_A LK ORF74	+	3346 5	33653	189 62	hypothetical protein	<i>Vibrio</i> phage vB_VhaS-tm	ANO575 34.1	95%	6.00 E-25	62.20 %
vB_VpaS_A LK ORF178	-	2989 3	27089	2805 934	tail assembly protein	<i>Vibrio</i> phage vB_VnaS-AQKL99	QMV29 716.1	85%	0	80.25 %
vB_VpaS_A LK ORF78	+	5463 9	54872	234 77	tail assembly protein	-	-	-	-	-
vB_VpaS_A LK ORF177	-	3028 0	30065	216 71	Phage protein	<i>Vibrio</i> phage vB_VnaS-AQKL99	QMV29 716.1	100%	2.00 E-34	94.37 %
vB_VpaS_A LK ORF238	-	3109 5	30292	804 267	hypothetical protein	<i>Vibrio</i> phage vB_VhaS-tm	ANO575 34.1	100%	1.00 E-34	85.71 %
vB_VpaS_A LK ORF287	-	3360 5	32736	870 289	hypothetical protein	-	-	-	-	-
vB_VpaS_A LK ORF174	-	3442 0	33605	816 271	hypothetical protein	<i>Thaumasiovibrio occultus</i>	WP_086 937497.1	99%	3.00 E-38	34.77 %
vB_VpaS_A LK ORF81	-	5458 0	54398	183 60	tail length tape-measure protein 1	-	-	-	-	-
vB_VpaS_A LK ORF173	-	3713 5	36833	303 100	hypothetical protein	<i>Vibrio</i> phage pVco-14	QQM14 126.1	100%	2.00 E-58	87.00 %
vB_VpaS_A LK ORF273	-	4819 7	48114	84 27	hypothetical protein	<i>Desulfobacula</i> sp.	MCF624 8740.1	44%	2.20 E+0	78.57 %
vB_VpaS_A LK ORF232	-	3796 8	37531	438 145	hypothetical protein	<i>Vibrio</i> phage pVco-14	QQM14 126.1	97%	6.00 E-48	61.27 %
vB_VpaS_A LK ORF282	+	5684 7	56912	66 21	hypothetical protein	<i>Vibrio</i> phage pVco-14	QQM14 126.1	100%	0	90.65 %
vB_VpaS_A LK ORF281	+	5625 6	56387	132 43	hypothetical protein	<i>Vibrio</i> phage vB_VnaS-AQKL99	QMV29 716.1	100%	2.00 E-82	86.96 %
vB_VpaS_A LK ORF169	-	3987 7	39473	261 86	hypothetical protein	<i>Vibrio</i> phage vB_VhaS-tm	ANO575 34.1	100%	4.00 E-80	85.07 %
vB_VpaS_A LK ORF230		4029 6	39874	423 140	hypothetical protein	<i>Vibrio</i> phage vB_VhaS-tm	ANO575 34.1	87%	4.00 E-71	86.07 %

vB_VpaS_A LK ORF168	-	4077 4	40244	531 176	putative virion structural protein	<i>Vibrio</i> phage pVco- 14	QQM14 126.1	100%	2.00 E- 108	84.09 %
vB_VpaS_A LK ORF227		4100 4	40831	174 57	hypothetical protein	<i>Vibrio</i> phage pVco- 14	QQM14 126.1	84%	9.00 E-19	79.17 %
vB_VpaS_A LK ORF226		4328 7	41014	2274 757	hypothetical protein	<i>Vibrio</i> phage SHOU24	YP_009 006419.1	99%	0	49.04 %
vB_VpaS_A LK ORF225	-	4432 8	43291	1038 345	hypothetical protein	<i>Vibrio</i> phage vB_VnaS-AQKL99	QMV29 716.1	96%	8.00 E- 138	60.60 %
vB_VpaS_A LK ORF278		4520 9	44628	582 193	hypothetical protein	<i>Vibrio</i> phage vB_VhaS-tm	ANO575 34.1	100%	1.00 E-82	73.10 %
vB_VpaS_A LK ORF141	-	5314 1	52647	495 164	hypothetical protein	<i>Ignelater</i> <i>luminosus</i>	KAF288 3916.1	100%	61	69.23 %
vB_VpaS_A LK ORF165	-	4350 5	43537	33 10	Phage major capsid protein of Caudovirales	<i>Kiritimatiellae</i> <i>bacterium</i>	MBQ63 27425.1	80%	143	100.0 0%
vB_VpaS_A LK ORF220	+	2079 9	20870	72 23	hypothetical protein	<i>Vibrio</i> phage vB_VhaS-tm	ANO575 34.1	100%	0	93.17 %
vB_VpaS_A LK ORF219	+	2044 2	20516	75 24	minor head protein-like protein	<i>Neolentinus</i> <i>lepideus</i> HHB14362 ss-1	KZT255 46.1	91%	0.38	51.52 %
vB_VpaS_A LK ORF271	-	5023 1	48807	1425 474	hypothetical protein	<i>Vibrio</i> phage vB_VhaS-tm	ANO575 34.1	100%	0	91.98 %
vB_VpaS_A LK ORF251	+	3579 9	35831	33 10	terminase large subunit	<i>Cyanobacteria</i> <i>bacterium</i> J055	RMG05 825.1	90%	13	88.89 %
vB_VpaS_A LK ORF270	+	5301 0	53087	78 25	hypothetical protein	<i>Hyalomma</i> <i>asiaticum</i>	KAH692 6663.1	56%	4.7	78.57 %
vB_VpaS_A LK ORF214	+	1346 7	13952	486 161	hypothetical protein	<i>Vibrio</i> phage vB_VhaS-tm	ANO575 34.1	100%	2.00 E- 108	97.52 %
vB_VpaS_A LK ORF160	-	4196 0	41998	39 12	hypothetical protein	<i>Massilia</i> <i>umbonata</i>	WP_137 315416.1	83%	106	90.91 %
vB_VpaS_A LK ORF269	+	5239 2	52580	189 62	N-acetylmuramoyl- L-alanine amidase	-	-	-	-	-
vB_VpaS_A LK ORF159	-	1227 8	12120	159 52	hypothetical protein	-	-	-	-	-
vB_VpaS_A LK ORF158	-	1539 5	15006	390 129	hypothetical protein	-	-	-	-	-
vB_VpaS_A LK ORF209	+	4839	4573	267 88	hypothetical protein	<i>Vibrio</i> phage vB_VhaS-tm	ANO575 34.1	100%	5.00 E-39	72.73 %
vB_VpaS_A LK ORF267	+	5068 8	50819	132 43	hypothetical protein	-	-	-	-	-
vB_VpaS_A LK ORF150	-	3563 9	35298	342 113	hypothetical protein	-	-	-	-	-
vB_VpaS_A LK ORF154	+	3720 2	37429	228 75	hypothetical protein	-	-	-	-	-
vB_VpaS_A LK ORF266	+	5020 8	50246	39 12	hypothetical protein	<i>Vibrio</i> phage vB_VnaS-AQKL99	QMV29 716.1	100%	2.00 E-83	90.79 %
vB_VpaS_A LK ORF206	+	8970	9074	105 34	hypothetical protein	-	-	-	-	-
vB_VpaS_A LK ORF265	+	4764 0	47678	39 12	hypothetical protein	<i>Vibrio</i> phage vB_VnaS-AQKL99	QMV29 716.1	100%	3.00 E-70	97.25 %

Cuadro S5. Clasificación funcional de 57 ORF en el genoma vB_VpaP_M83

Label	Strand	Start	Stop	Length nt/aa	Function protein	Organism	Accession	Query Cover	E value	Identity (%)
vB_VpaP_M83 ORF73	+	30	293	264 87	Phage protein	<i>Vibrio</i> phage vB_VpaP_KF1	YP_009808040.1	100%	2.00E-49	86.21%
vB_VpaP_M83 ORF1	+	343	876	534 177	Phage protein	<i>Vibrio</i> phage vB_VpaS_OWB	YP_009948710.1	100%	5.00E-127	100.00%
vB_VpaP_M83 ORF74	-	30725	30231	495 164	Phage protein	<i>Cyanotheca</i> sp.	NET30419.1	73%	11	81.82%
vB_VpaP_M83 ORF36	+	1199	1348	150 49	Phage protein	<i>Mangifera indica</i>	XP_044511269.1	80%	6.3	100.00%
vB_VpaP_M83 ORF75	+	1350	1607	258 85	hypothetical protein	<i>Vibrio</i> phage vB_VpaS_OWB	YP_009948710.1	100%	2.00E-55	100.00%
vB_VpaP_M83 ORF35	+	809	1189	381 126	Phage protein	<i>Vibrio</i> phage vB_VpaS_OWB	YP_009948710.1	100%	2.00E-134	100.00%
vB_VpaP_M83 ORF76	+	2040	4175	2136 711	Phage protein	-	-	-	-	-
vB_VpaP_M83 ORF8	+	4216	5319	1104 367	hypothetical protein	<i>Vibrio</i> phage vB_VpaS_OWB	YP_009948710.1	100%	0	100.00%
vB_VpaP_M83 ORF9	+	5344	5508	165 54	Phage protein	<i>Vibrio</i> phage vB_Vc_SrVc2	QQM14916.1	99%	1.00E-135	96.89%
vB_VpaP_M83 ORF77	+	5505	6320	816 271	Phage primase/helicase protein Gp4A	-	-	-	-	-
vB_VpaP_M83 ORF41	+	6302	7582	1281 426	Phage DNA helicase	<i>Vibrio</i> phage vB_VpaP_KF1	YP_009808040.1	100%	8.00E-50	98.99%
vB_VpaP_M83 ORF43	+	7808	10234	2427 808	Phage protein	<i>Vibrio</i> phage vB_VpaS_OWB	YP_009948710.1	100%	2.00E-81	98.54%
vB_VpaP_M83 ORF86	+	10170	10823	654 217	Phage DNA-directed DNA polymerase (EC 2.7.7.7)	-	-	-	-	-
vB_VpaP_M83 ORF44	+	10832	11428	597 198	Phage protein	<i>Vibrio</i> phage VP93	YP_002875667.1	30%	0.006	68.42%
vB_VpaP_M83 ORF45	+	11630	12442	813 270	Phage protein	<i>Vibrio</i> phage vB_VpaP_KF1	YP_009808040.1	100%	2.00E-49	86.21%
vB_VpaP_M83 ORF17	+	40285	40899	615 204	Phage protein p21	<i>Vibrio</i> phage vB_VpaP_KF2	YP_009808068.1	100%	1.00E-140	98.04%
vB_VpaP_M83 ORF90	+	12831	13460	630 209	Phage protein	<i>Vibrio</i> phage vB_VpaS_OWB	YP_009948710.1	100%	2.00E-55	100.00%
vB_VpaP_M83 ORF46	+	13460	13663	204 67	Phage DNA binding protein	-	-	-	-	-
vB_VpaP_M83 ORF47	+	13673	14098	426 141	Phage protein	<i>Vibrio</i> phage vB_VpaS_OWB	YP_009948710.1	100%	0	96.77%
vB_VpaP_M83 ORF19	+	809	1189	381 126	hypothetical protein	<i>Vibrio</i> phage VP93	YP_002875667.1	81%	3.00E-66	95.15%

vB_VpaP_M83 ORF49	+	1503 8	1524 4	207 68	hypothetical protein	-	-	-	-	-
vB_VpaP_M83 ORF93	+	1523 1	1567 1	441 146	Phage exonuclease (EC 3.1.11.3)	-	-	-	-	-
vB_VpaP_M83 ORF50	+	1567 1	1579 0	120 39	hypothetical protein	-	-	-	-	-
vB_VpaP_M83 ORF20	+	1578 7	1637 1	585 194	hypothetical protein	-	-	-	-	-
vB_VpaP_M83 ORF94	+	1633 8	1654 4	207 68	hypothetical protein	-	-	-	-	-
vB_VpaP_M83 ORF95	+	1656 0	1901 0	2451 816	Phage DNA-directed RNA polymerase (EC 2.7.7.6)	-	-	-	-	-
vB_VpaP_M83 ORF24	+	1919 8	1946 1	264 87	hypothetical protein	<i>Vibrio</i> phage vB_Vc_SrVc 2	QQM14901.1	100 %	0	98.83 %
vB_VpaP_M83 ORF52	+	1944 8	1969 3	246 81	Phage protein	<i>Vibrio</i> phage vB_VpaS_O WB	YP_00994871 0.1	100 %	8.00E-124	100.00 %
vB_VpaP_M83 ORF25	+	1970 2	2123 4	1533 510	Phage collar, head-to-tail connector protein Gp8	-	-	-	-	-
vB_VpaP_M83 ORF97	+	2123 4	2205 2	819 272	hypothetical protein	-	-	-	-	-
vB_VpaP_M83 ORF57	+	2211 8	2281 9	702 233	Phage major capsid protein Gp10A	<i>Vibrio</i> phage vB_VpP_DE 17	QPP19730.1	100 %	2.00E-157	93.38 %
vB_VpaP_M83 ORF28	+	2278 9	2379 3	1005 334	Phage major capsid protein Gp10A	<i>Vibrio</i> phage vB_VpaS_O WB	YP_00994871 0.1	84%	5.00E-159	99.56 %
vB_VpaP_M83 ORF99	-	4000 2	3983 8	165 54	hypothetical protein	-	-	-	-	-
vB_VpaP_M83 ORF58	+	2746 5	2762 0	156 51	Phage tail fiber protein	-	-	-	-	-
vB_VpaP_M83 ORF59	+	2456 9	2691 1	2343 780	hypothetical protein	-	-	-	-	-
vB_VpaP_M83 ORF60	+	2692 1	2766 7	747 248	Phage protein	<i>Vibrio</i> phage vB_VpaS_O WB	YP_00994871 0.1	100 %	5.00E-145	98.52 %
vB_VpaP_M83 ORF61	+	2767 7	3035 5	2679 892	hypothetical protein	-	-	-	-	-
vB_VpaP_M83 ORF29	+	3040 6	3426 0	3855 1284	Phage DNA ejectosome component Gp16, peptidoglycan lytic exotransglycosylase	<i>Vibrio</i> phage vB_VpaS_O WB	YP_00994871 0.1	100 %	6.00E-41	98.51 %
vB_VpaP_M83 ORF107	+	3428 1	3489 2	612 203	Phage tail fiber protein	-	-	-	-	-
vB_VpaP_M83 ORF65	+	3490 1	3763 3	2733 910	hypothetical protein	<i>Vibrio</i> phage VP93	YP_00287566 7.1	94%	3.00E-22	72.06 %
vB_VpaP_M83 ORF66	-	4187 9	4171 5	165 54	Phage terminase small subunit Gp18, DNA packaging	-	-	-	-	-
vB_VpaP_M83	-	3817	3799	186	Phage terminase	-	-	-	-	-

ORF123		7	2	61	large subunit Gp19, DNA packaging"					
vB_VpaP_M83 ORF68	+	3997 7	4027 6	300 99	hypothetical protein	-	-	-	-	-
vB_VpaP_M83 ORF32	+	4028 5	4089 9	615 204	Phage protein	<i>Vibrio</i> phage vB_VpaP_KF2	YP_00980806 8.1	100 %	1.00E- 140	98.04 %
vB_VpaP_M83 ORF114	+	4089 9	4145 3	555 184	hypothetical protein	-	-	-	-	-
vB_VpaP_M83 ORF70	+	4146 2	4187 5	414 137	Phage protein	<i>Vibrio</i> phage vB_VpaS_OWB	YP_00994871 0.1	100 %	2.00E- 81	98.54 %
vB_VpaP_M83 ORF116	-	5982	5803	180 59	gene 66 protein	<i>Vibrio</i> phage vB_VpP_DE10	QXV72189.1	100 %	3.00E- 80	99.15 %
vB_VpaP_M83 ORF117	+	4233 3	4255 1	219 72	hypothetical protein	<i>Vibrio</i> phage VP93	YP_00287566 7.1	94%	3.00E- 22	72.06 %

Cuadro S6. Clasificación funcional de 57 ORF en el genoma vB_VpaP_M9

Label	Strand	Start	Stop	Length nt aa	Function protein	Organism	Accession	Query Cover	E value	Identity (%)
vB_VpaP_M9 ORF35	+	169 49	193 99	2451 816	hypothetical protein	<i>Vibrio</i> phage vB_VpaP_KF1	YP_009808 040.1	100 %	2.00E- 49	86.21 %
vB_VpaP_M9 ORF81	-	405 70	402 53	318 105	hypothetical protein	<i>Vibrio</i> phage vB_VpaS_OWB	YP_009948 710.1	100 %	5.00E- 127	
vB_VpaP_M9 ORF36	+	201 68	217 00	1533 510	hypothetical protein	<i>Vibrio</i> phage vB_VpaS_OWB	YP_009948 710.1	100 %	0	99.41 %
vB_VpaP_M9 ORF2	+	220 6	241 8	213 70	hypothetical protein	<i>Vibrio</i> phage VP93	YP_002875 667.1	100 %	3.00E- 25	100.0 0%
vB_VpaP_M9 ORF37	+	223 46	225 91	246 81	hypothetical protein	-	-	-	-	
vB_VpaP_M9 ORF83	-	370 09	367 55	255 84	hypothetical protein	-	-	-	-	
vB_VpaP_M9 ORF38	+	272 60	274 15	156 51	hypothetical protein	-	-	-	-	
vB_VpaP_M9 ORF88	-	305 20	300 26	495 164	hypothetical protein	-	-	-	-	
vB_VpaP_M9 ORF89	-	243 52	241 85	168 55	hypothetical protein	-	-	-	-	
vB_VpaP_M9 ORF39	+	284 09	285 64	156 51	hypothetical protein	-	-	-	-	
vB_VpaP_M9 ORF7	+	802 6	819 3	168 55	hypothetical protein	-	-	-	-	
vB_VpaP_M9 ORF9	+	112 21	118 17	597 198	hypothetical protein	<i>Vibrio</i> phage vB_VpaS_OWB	YP_009948 710.1	100 %	6.00E- 131	97.47 %
vB_VpaP_M9 ORF48	+	460 5	570 8	1104 367	hypothetical protein	<i>Vibrio</i> phage vB_VpaS_OWB	YP_009948 710.1	100 %	0	96.73 %
vB_VpaP_M9 ORF10	+	120 19	128 31	813 270	hypothetical protein	<i>Vibrio</i> phage vB_VpaS_OWB	YP_009948 710.1	84 %	5.00E- 159	99.56 %
vB_VpaP_M9 ORF11	+	138 49	140 52	204 67	hypothetical protein	<i>Vibrio</i> phage vB_VpaS_OWB	YP_009948 710.1	100 %	6.00E- 41	98.51 %
vB_VpaP_M9 ORF97	+	128 76	132 08	333 110	hypothetical protein	-	-	-	-	

vB_VpaP_M9 ORF52	+	144 90	154 40	951 316	hypothetical protein	<i>Vibrio</i> phage vB_VpaS_OWB	YP_009948 710.1	100 %	0	100.0 0%
vB_VpaP_M9 ORF12	+	138 49	140 52	204 67	hypothetical protein	<i>Vibrio</i> phage VP93	YP_002875 667.1	100 %	2.00E- 67	99.29 %
vB_VpaP_M9 ORF13	+	140 62	144 87	426 141	hypothetical protein	<i>Vibrio</i> phage vB_VpaS_OWB	YP_009948 710.1	100 %	4.00E- 42	100.0 0%
vB_VpaP_M9 ORF99	-	391 08	388 30	279 92	hypothetical protein	-	-	-	-	-
vB_VpaP_M9 ORF15	+	237 94	243 54	561 186	hypothetical protein	<i>Vibrio</i> phage vB_VpaS_OWB	YP_009948 710.1	100 %	2.00E- 134	100.0 0%
vB_VpaP_M9 ORF55	+	195 87	197 69	183 60	hypothetical protein	<i>Vibrio</i> phage vB_VpP_DE17	QPP19730.1	98 %	1.00E- 34	100.0 0%
vB_VpaP_M9 ORF16	+	243 64	267 06	2343 780	holin	<i>Vibrio</i> phage vB_VpaS_OWB	YP_009948 710.1	100 %	0	99.74 %
vB_VpaP_M9 ORF100	-	360 27	358 06	222 73	hypothetical protein	-	-	-	-	-
vB_VpaP_M9 ORF56	+	199 14	201 59	246 81	hypothetical protein	<i>Vibrio</i> phage vB_VpaP_KF2	YP_009808 068.1	100 %	6.00E- 33	83.82 %
vB_VpaP_M9 ORF57	+	206 34	208 10	177 58	hypothetical protein	-	-	-	-	-
vB_VpaP_M9 ORF58	+	225 84	235 88	1005 334	hypothetical protein	<i>Vibrio</i> phage vB_VpP_FE11	QIW87194. 1	100 %	1.00E- 19	100.0 0%
vB_VpaP_M9 ORF106	+	199 14	201 59	246 81	hypothetical protein	<i>Vibrio</i> phage vB_Vc_SrVc2	QQM14929. 1	100 %	0	99.22 %
vB_VpaP_M9 ORF59	+	302 01	340 55	3855 1284	hypothetical protein	<i>Vibrio</i> phage vB_VpaS_OWB	YP_009948 710.1	100 %	0	98.79 %
vB_VpaP_M9 ORF19	+	346 96	374 28	2733 910	hypothetical protein	-	-	-	-	-
vB_VpaP_M9 ORF111	-	112 32	109 69	264 87	hypothetical protein	-	-	-	-	-
vB_VpaP_M9 ORF62	+	422 94	425 57	264 87	hypothetical protein	<i>Vibrio</i> phage vB_VpaS_OWB	YP_009948 710.1	83 %	9.00E- 49	100.0 0%
vB_VpaP_M9 ORF20	+	374 38	377 37	300 99	u-spanin	<i>Vibrio</i> phage vB_VpP_DE18	QWY13587. 1	86 %	5.00E- 14	47.86 %
vB_VpaP_M9 ORF21	+	397 72	400 71	300 99	endolysin	<i>Vibrio</i> phage vB_VpaP_KF1	YP_009808 040.1	100 %	8.00E- 50	98.99 %
vB_VpaP_M9 ORF22	+	401 53	403 80	228 75	holin	-	-	-	-	-
vB_VpaP_M9 ORF23	+	412 57	416 70	414 137	hypothetical protein	<i>Vibrio</i> phage vB_VpaS_OWB	YP_009948 710.1	100 %	2.00E- 81	98.54 %
vB_VpaP_M9 ORF112	-	354 0	333 7	204 67	hypothetical protein	-	-	-	-	-
vB_VpaP_M9 ORF70	-	255 20	252 81	240 79	putative phosphoesterase	-	-	-	-	-
vB_VpaP_M9 ORF27	+	589 4	670 9	816 271	hypothetical protein	<i>Vibrio</i> phage vB_VpaS_OWB	YP_009948 710.1	99 %	0	97.41 %
vB_VpaP_M9 ORF28	+	374 38	377 37	300 99	hypothetical protein	-	-	-	-	-
vB_VpaP_M9 ORF76	-	975 2	949 2	261 86	hypothetical protein	-	-	-	-	-
vB_VpaP_M9 ORF30	+	105 59	112 12	654 217	hypothetical protein	<i>Vibrio</i> phage vB_Vc_SrVc2	QQM14929. 1	88 %	1.00E- 137	97.38 %
vB_VpaP_M9 ORF115	+	400 80	406 94	615 204	hypothetical protein	<i>Vibrio</i> phage vB_VpaP_KF2	YP_009808 068.1	100 %	1.00E- 140	98.04 %
vB_VpaP_M9 ORF77	-	945 2	918 9	264 87	hypothetical protein	-	-	-	-	-
vB_VpaP_M9 ORF32	+	140 90	142 51	162 53	DNA helicase	-	-	-	-	-
vB_VpaP_M9 ORF69	-	283 82	281 64	219 72	hypothetical protein	-	-	-	-	-

Cuadro S7. Clasificación funcional de 58 ORF en el genoma vB_VpaP_M3

Label	Strand	Start	Stop	Length nt/aa	Function protein	Organism	Accession	Query Cover	E value	Identity (%)
vB_VpaP_M3 ORF38	+	74	337	264 87	hypothetical protein	<i>Vibrio</i> phage vB_VpaS_OWB	YP_009948710.1	100%	0	99.88%
vB_VpaP_M3 ORF1	+	373	906	534 177	hypothetical protein	<i>Vibrio</i> phage vB_VpaS_OWB	YP_009948710.1	100%	5.00E-127	100.00%
vB_VpaP_M3 ORF90	+	918	1022	105 34	hypothetical protein	-	-	-	-	-
vB_VpaP_M3 ORF2	+	1228	1365	138 45	hypothetical protein	-	-	-	-	-
vB_VpaP_M3 ORF41	+	1367	1624	258 85	hypothetical protein	-	-	-	-	-
vB_VpaP_M3 ORF92	+	1596	2027	432 143	hypothetical protein	-	-	-	-	-
vB_VpaP_M3 ORF42	+	2057	4195	2139 712	hypothetical protein	-	-	-	-	-
vB_VpaP_M3 ORF99	+	4236	5339	1104 367	hypothetical protein	-	-	-	-	-
vB_VpaP_M3 ORF100	+	5364	5528	165 54	hypothetical protein	-	-	-	-	-
vB_VpaP_M3 ORF43	+	5525	6340	816 271	hypothetical protein	-	-	-	-	-
vB_VpaP_M3 ORF7	+	6322	7602	1281 426	hypothetical protein	-	-	-	-	-
vB_VpaP_M3 ORF103	+	7602	7835	234 77	hypothetical protein	-	-	-	-	-
vB_VpaP_M3 ORF268	-	8455	8291	165 54	hypothetical protein	-	-	-	-	-
vB_VpaP_M3 ORF52	+	10190	10843	654 217	hypothetical protein	<i>Vibrio</i> phage vB_VpaS_OWB	YP_009948710.1	84%	9.00E-158	98.69%
vB_VpaP_M3 ORF10	+	10852	11448	597 198	hypothetical protein	<i>Vibrio</i> phage vB_VpaS_OWB	YP_009948710.1	100%	3.00E-89	100.00%
vB_VpaP_M3 ORF11	+	11650	12462	813 270	hypothetical protein	<i>Vibrio</i> phage vB_VpaP_KF1	YP_009808040.1	100%	2.00E-42	97.10%
vB_VpaP_M3 ORF108	+	12507	12839	333 110	hypothetical protein	-	-	-	-	-
vB_VpaP_M3 ORF55	+	12851	13480	630 209	hypothetical protein	<i>Vibrio</i> phage vB_VpP_FE11	QIW87194.1	100%	3.00E-31	100.00%
vB_VpaP_M3 ORF12	+	13480	13689	210 69	hypothetical protein	<i>Vibrio</i> phage vB_VpaP_MGD1	QKK83123.1	100%	5.00E-91	94.33%
vB_VpaP_M3 ORF13	+	13699	14124	426 141	hypothetical protein	<i>Vibrio</i> phage vB_VpaS	YP_009948710.1	100%	4.00E-42	100.00%

						OWB				
vB_VpaP_M3 ORF109	+	14127	15077	951316	hypothetical protein	-	-	-	-	-
vB_VpaP_M3 ORF15	+	15064	15270	20768	hypothetical protein	-	-	-	-	-
vB_VpaP_M3 ORF59	+	15257	15697	441146	hypothetical protein	<i>Vibrio</i> phage vB_VpaS_OWb	YP_009948710.1	99%	3.00E-137	98.45%
vB_VpaP_M3 ORF16	+	15697	15816	12039	holin	<i>Vibrio</i> phage vB_VpP_DE17	QPP19730.1	100%	8.00E-159	94.12%
vB_VpaP_M3 ORF110	+	15813	16397	585194	hypothetical protein	-	-	-	-	-
vB_VpaP_M3 ORF60	+	33397	33447	5116	hypothetical protein	-	-	-	-	-
vB_VpaP_M3 ORF61	+	16586	19036	2451816	hypothetical protein	<i>Vibrio</i> phage vB_VpP_DE17	QPP19730.1	100%	2.00E-57	100.00%
vB_VpaP_M3 ORF201	-	19748	19326	423140	hypothetical protein	<i>Vibrio</i> phage vB_VpaP_KF1	YP_009808040.1	35%	1.00E-11	93.88%
vB_VpaP_M3 ORF18	+	19474	19719	24681	hypothetical protein	<i>Vibrio</i> phage vB_VpaP_KF1	YP_009808040.1	100%	1.00E-48	100.00%
vB_VpaP_M3 ORF114	+	19728	20537	810269	hypothetical protein	<i>Vibrio</i> phage vB_VpaS_OWb	YP_009948710.1	89%	9.00E-164	99.58%
vB_VpaP_M3 ORF275	-	4414	3695	720239	hypothetical protein	-	-	-	-	-
vB_VpaP_M3 ORF22	+	21337	22155	819272	hypothetical protein	<i>Vibrio</i> phage vB_VpP_DE17	QPP19730.1	100%	8.00E-159	94.12%
vB_VpaP_M3 ORF117	+	22221	23219	999332	hypothetical protein	<i>Vibrio</i> phage vB_VpP_DE17	QPP19730.1	100%	0	98.80%
vB_VpaP_M3 ORF66	+	23231	23359	12942	hypothetical protein	<i>Vibrio</i> phage vB_VpaS_OWb	YP_009948710.1	100%	1.00E-19	97.62%
vB_VpaP_M3 ORF23	+	23425	23985	561186	u-spanin	<i>Vibrio</i> phage vB_VpaS_OWb	YP_009948710.1	100%	2.00E-134	100.00%
vB_VpaP_M3 ORF24	+	23995	26337	2343780	endolysin	<i>Vibrio</i> phage vB_VpaS_OWb	YP_009948710.1	100%	0	99.49%
vB_VpaP_M3 ORF257	-	20752	20606	14748	holin	-	-	-	-	-
vB_VpaP_M3 ORF26	+	27103	29781	2679892	hypothetical protein	<i>Vibrio</i> phage vB_VpaS_OWb	YP_009948710.1	100%	0	99.78%

vB_VpaP_M3 ORF118	+	29832	336 86	3855 1284	hypothetical protein	<i>Vibrio</i> phage vB_VpaS_OWB	YP_009948710.1	100%	0	99.53%
vB_VpaP_M3 ORF80	+	33707	343 18	612 203	putative phosphoesterase	<i>Vibrio</i> phage vB_VpaS_OWB	YP_009948710.1	100%	8.00E-146	99.01%
vB_VpaP_M3 ORF30	+	34327	370 59	2733 910	hypothetical protein	<i>Vibrio</i> phage vB_VpaS_OWB	YP_009948710.1	100%	0	98.68%
vB_VpaP_M3 ORF31	+	37069	373 68	300 99	hypothetical protein	<i>Vibrio</i> phage vB_VpaS_OWB	YP_009948710.1	83%	9.00E-49	100.00%
vB_VpaP_M3 ORF34	+	39784	400 11	228 75	hypothetical protein	-	-	-	-	-
vB_VpaP_M3 ORF33	+	39403	397 02	300 99	hypothetical protein	<i>Vibrio</i> phage vB_VpaP_MGD1	QKK83123.1	100%	1.00E-49	98.99%
vB_VpaP_M3 ORF120	+	39711	403 25	615 204	hypothetical protein	<i>Vibrio</i> phage vB_VpaS_OWB	YP_009948710.1	100%	8.00E-141	98.53%
vB_VpaP_M3 ORF85	+	40325	408 79	555 184	hypothetical protein	<i>Vibrio</i> phage vB_VpaS_OWB	YP_009948710.1	100%	5.00E-129	96.74%
vB_VpaP_M3 ORF35	+	40888	413 01	414 137	DNA helicase	<i>Vibrio</i> phage vB_VpaS_OWB	YP_009948710.1	100%	2.00E-81	98.54%
vB_VpaP_M3 ORF87	+	41294	416 50	357 118	hypothetical protein	<i>Vibrio</i> phage vB_VpP_DE10	QXV72189.1	100%	3.00E-80	99.15%

Cuadro S8. Clasificación funcional de 58 ORF en el genoma vB_VpaP_C2

Label	Strand	Start	Stop	Length nt/aa	Function protein	Organism	Accession	Query Cover	E value	Identity (%)
vB_VpaP_C2 ORF1	+	145	576	432 143	hypothetical protein	<i>Vibrio</i> phage vB_VpaS_OWB	YP_009948710.1	100%	3.00E-89	100.00%
vB_VpaP_C2 ORF3	+	169 3	178 8	96 31	hypothetical protein	<i>Vibrio</i> phage vB_VpaS_OWB	YP_009948710.1	100%	0	96.73%
vB_VpaP_C2 ORF5	+	240 7	252 3	117 38	hypothetical protein	<i>Vibrio</i> phage vB_VpaS_OWB	YP_009948710.1	100%	9.00E-51	100.00%

vB_VpaP_C2 ORF8	+	278 5	388 8	1104 367	hypotheti cal protein	<i>Vibrio</i> phage vB_VpaS OWB	YP_0099 48710.1	99%	3.00E -137	98.45%
vB_VpaP_C2 ORF9	+	391 3	407 7	165 54	hypotheti cal protein	-	-	-	-	-
vB_VpaP_C2 ORF11	+	472 0	481 5	96 31	hypotheti cal protein	<i>Vibrio</i> phage vB_VpaS OWB	YP_0099 48710.1	100%	0	99.41%
vB_VpaP_C2 ORF13	+	693 1	701 1	81 26	hypotheti cal protein	<i>Vibrio</i> phage vB_VpP_ DE17	QPP1973 0.1	100%	0	98.80%
vB_VpaP_C2 ORF15	+	919 9	930 3	105 34	hypotheti cal protein	<i>Vibrio</i> phage vB_VpaS OWB	YP_0099 48710.1	100%	8.00E -141	98.53%
vB_VpaP_C2 ORF17	+	110 56	113 88	333 110	hypotheti cal protein	-	-	-	-	-
vB_VpaP_C2 ORF18	+	126 76	136 26	951 316	hypotheti cal protein	-	-	-	-	-
vB_VpaP_C2 ORF19	+	143 62	149 46	585 194	hypotheti cal protein	<i>Vibrio</i> phage VP93	YP_0028 75667.1	100%	1.00E -19	84.75%
vB_VpaP_C2 ORF20	+	161 38	163 59	222 73	hypotheti cal protein	<i>Vibrio</i> phage vB_VpP_ DE18	QWY135 49.1	100%	2.00E -57	83.96%
vB_VpaP_C2 ORF21	+	173 98	174 93	96 31	hypotheti cal protein	<i>Vibrio</i> phage vB_Vc_Sr Vc2	QQM149 01.1	100%	0	98.83%
vB_VpaP_C2 ORF22	+	177 73	180 36	264 87	hypotheti cal protein	-	-	-	-	-
vB_VpaP_C2 ORF23	+	182 77	198 09	1533 510	hypotheti cal protein	<i>Vibrio</i> phage vB_VpaS OWB	YP_0099 48710.1	100%	0	98.51%
vB_VpaP_C2 ORF25	+	204 55	207 00	246 81	hypotheti cal protein	<i>Vibrio</i> phage vB_VpaS OWB	YP_0099 48710.1	84%	9.00E -158	98.69%
vB_VpaP_C2 ORF26	+	208 18	218 16	999 332	hypotheti cal protein	<i>Vibrio</i> phage vB_VpaP MGD1	QKK831 23.1	100%	5.00E -91	94.33%
vB_VpaP_C2 ORF27	+	284 29	322 83	3855 1284	hypotheti cal protein	<i>Vibrio</i> phage vB_Vc_Sr Vc2	QQM149 01.1	88%	1.00E -137	97.38%

vB_VpaP_C2 ORF45	+	142 46	143 65	120 39	holin	<i>Vibrio</i> phage vB_VpaS OWB	YP_0099 48710.1	100%	4.00E -42	100.00%
vB_VpaP_C2 ORF28	+	136 13	138 19	207 68	hypotheti cal protein	<i>Vibrio</i> phage vB_VpaS OWB	YP_0099 48710.1	100%	4.00E -42	100.00%
vB_VpaP_C2 ORF29	+	383 08	389 22	615 204	hypotheti cal protein	<i>Vibrio</i> phage vB_VpaP KF1	YP_0098 08040.1	100%	1.00E -48	100.00%
vB_VpaP_C2 ORF30	+	404 20	406 62	243 80	hypotheti cal protein	-	-	-	-	-
vB_VpaP_C2 ORF32	+	383	595	213 70	hypotheti cal protein	<i>Vibrio</i> phage vB_VpaS OWB	YP_0099 48710.1	100%	0	99.49%
vB_VpaP_C2 ORF47	+	180 23	182 68	246 81	hypotheti cal protein	-	-	-	-	-
vB_VpaP_C2 ORF34	+	368 0	385 9	180 59	hypotheti cal protein	<i>Vibrio</i> phage vB_VpaS OWB	YP_0099 48710.1	100%	0	99.78%
vB_VpaP_C2 ORF36	+	487 1	615 1	1281 426	hypotheti cal protein	<i>Vibrio</i> phage vB_VpaS OWB	YP_0099 48710.1	83%	9.00E -49	100.00%
vB_VpaP_C2 ORF38	+	637 7	880 3	2427 808	hypotheti cal protein	-	-	-	-	-
vB_VpaP_C2 ORF92	+	218 28	219 56	129 42	hypotheti cal protein	-	-	-	-	-
vB_VpaP_C2 ORF39	+	940 1	999 7	597 198	hypotheti cal protein	<i>Vibrio</i> phage vB_VpaS OWB	YP_0099 48710.1	100%	2.00E -81	98.54%
vB_VpaP_C2 ORF40	+	101 99	110 11	813 270	endolysin	<i>Vibrio</i> phage vB_VpaS OWB	YP_0099 48710.1	100%	5.00E -127	100.00%
vB_VpaP_C2 ORF42	+	122 48	126 73	426 141	holin	<i>Vibrio</i> phage vB_VpaS OWB	YP_0099 48710.1	99%	0	97.78%
vB_VpaP_C2 ORF56	+	257 00	283 78	2679 892	hypotheti cal protein	-	-	-	-	-
vB_VpaP_C2 ORF48	+	183 53	184 75	123 40	hypotheti cal protein	<i>Vibrio</i> phage vB_VpaS OWB	YP_0099 48710.1	81%	3.00E -82	99.16%

vB_VpaP_C2 ORF49	+	187 43	189 19	177 58	putative phosphoe sterase	<i>Vibrio</i> phage vB_VpaP KF2	YP_0098 08068.1	100%	3.00E -33	85.29%
vB_VpaP_C2 ORF50	+	191 69	192 61	93 30	hypotheti cal protein	<i>Vibrio</i> phage vB_VpaS OWB	YP_0099 48710.1	100%	0	99.88%
vB_VpaP_C2 ORF52	+	206 93	207 79	87 28	hypotheti cal protein	-	-	-	-	-
vB_VpaP_C2 ORF53	+	220 22	225 82	561 186	hypotheti cal protein	-	-	-	-	-
vB_VpaP_C2 ORF54	+	225 92	249 34	2343 780	hypotheti cal protein	-	-	-	-	-
vB_VpaP_C2 ORF55	+	249 44	256 90	747 248	hypotheti cal protein	-	-	-	-	-
vB_VpaP_C2 ORF57	+	296 69	298 00	132 43	hypotheti cal protein	<i>Vibrio</i> phage vB_VpaS OWB	YP_0099 48710.1	100%	8.00E -146	99.01%
vB_VpaP_C2 ORF58	+	300 65	301 72	108 35	DNA helicase	-	-	-	-	-
vB_VpaP_C2 ORF59	+	303 35	304 42	108 35	hypotheti cal protein	<i>Vibrio</i> phage BUCT233	QWE497 83.1	100%	0	99.00%
vB_VpaP_C2 ORF62	+	378 92	379 84	93 30	hypotheti cal protein	<i>Vibrio</i> phage VP93	YP_0028 75667.1	100%	1.00E -07	47.27%
vB_VpaP_C2 ORF63	+	380 00	382 99	300 99	hypotheti cal protein	<i>Vibrio</i> phage vB_VpaP KF1	YP_0098 08040.1	100%	3.00E -50	87.36%
vB_VpaP_C2 ORF64	+	383 81	386 08	228 75	hypotheti cal protein	<i>Vibrio</i> phage VP93	YP_0028 75667.1	81%	4.00E -66	95.15%
vB_VpaP_C2 ORF69	+	432 71	434 08	138 45	hypotheti cal protein	-	-	-	-	-

Table S1. Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence for Temperature factor

Phage strain ID	MOI	N	Mean	Grouping
CHI	0.00	9	1.27704	A
CHI	1.00	9	1.15989	A
CHI	0.01	9	1.14667	A
CHI	0.10	9	0.95659	A

Means that do not share a letter are significantly different.

Table S2. Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence for Temperature factor

Phage strain ID	MOI	N	Mean	Grouping
ALK	0.00	9	1.14159	c
ALK	1.00	9	0.89474	c
ALK	0.01	9	0.85652	C
ALK	0.10	9	0.72937	c

Means that do not share a letter are significantly different.

Table S3. Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence for Temperature factor

Phage strain ID	MOI	N	Mean	Grouping
C2	0.00	9	1.14159	f
C2	1.00	9	0.92289	ef
C2	0.01	9	0.90370	ef
C2	0.10	9	0.60996	g

Means that do not share a letter are significantly different.

Table S4. Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence for Temperature factor

Phage strain ID	MOI	N	Mean	Grouping
M3	0.00	9	1.14159	E
M3	1.00	9	0.92696	EF
M3	0.01	9	0.87007	EF
M3	0.10	9	0.73981	F

Means that do not share a letter are significantly different.

Table S5. Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence for Temperature factor

Phage strain ID	MOI	N	Mean	Grouping
M9	0.00	9	1.14159	G
M9	1.00	9	1.02759	G
M9	0.01	9	0.92689	G
M9	0.10	9	0.90452	G

Means that do not share a letter are significantly different.

Table S6. Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence for Temperature factor

Phage strain ID	MOI	N	Mean	Grouping
M83	0.00	9	1.14159	g
M83	1.00	9	0.94730	h
M83	0.01	9	0.91085	h
M83	0.10	9	0.88304	h

Means that do not share a letter are significantly different.

Fig. 22: Agrupación de información usando el método de Tukey 95% de confianza para el factor de MOI