

Resistencia antibiótica en *Vibrio* spp aislados de camarón blanco *Litopenaeus vannamei*. Alternativas de tratamiento con extractos de *Azadirachta indica* y *Origanum vulgare*

Antibiotic resistance in *Vibrio* spp isolated from shrimp *Litopenaeus vannamei*. Treatment alternatives with extracts of neem (*Azadirachta indica*) and oregano (*Origanum vulgare*)

Luis E. Aguirre Chanta¹, Héctor A. Sánchez-Suárez², Alberto Ordinola-Zapata^{3,4}

RESUMEN

El estudio tuvo como objetivo caracterizar la resistencia antibiótica en *Vibrio* spp aislados de *Litopenaeus vannamei* y ensayar extractos de orégano (*Origanum vulgare*) y neem (*Azadirachta indica*) para su inhibición. Se recolectaron camarones de cultivo en Santa Rosa (Ecuador) y se obtuvieron muestras de hepatopáncreas, hemolinfa y lesiones aislándose 14 cepas de *Vibrio* spp. También se obtuvo por donación otras 14 cepas de *Vibrio* spp aisladas de camarones de cultivo de Tumbes (Perú). Se evaluó la resistencia antibiótica de las cepas contra 10 antibióticos y la sensibilidad de cuatro de ellas (dos resistentes y dos multirresistentes a antibióticos) a extractos acuosos (EA), etanólicos (EE), así como purificados con soxhlet y rotaevaporador (EPSR) de neem y orégano. Las 28 cepas estudiadas fueron resistentes al menos a uno de los antibióticos, 64.3% fueron multirresistentes y 50% fueron resistentes a oxitetraciclina. Los EA y EE de neem y orégano no inhibieron a ninguna de las cuatro cepas, pero el EPSR de neem sin diluir inhibió a una de las cuatro cepas ensayadas, mostrando tener mayor efecto inhibitorio

¹ Universidad Nacional de Tumbes, Facultad de Ingeniería Pesquera y Ciencias del Mar, Tumbes, Perú

² Universidad Nacional de Tumbes, Facultad de Ciencias Agrarias, Tumbes, Perú

³ Universidad Nacional de Tumbes, Grupo de Biodiversidad Acuática Tropical (BioTrop), Tumbes, Perú

⁴ Email: aordinolaz@untumbes.edu.pe

Recibido: 1 de enero de 2021

Aceptado para publicación: 10 de julio de 2021

Publicado: 24 de agosto de 2021

©Los autores. Este artículo es publicado por la Rev Inv Vet Perú de la Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Este es un artículo de acceso abierto, distribuido bajo los términos de la licencia Creative Commons Atribución 4.0 Internacional (CC BY 4.0) [<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.es>] que permite el uso, distribución y reproducción en cualquier medio, siempre que la obra original sea debidamente citada de su fuente original

incluso que la oxitetraciclina. Asimismo, el EPSR de orégano sin diluir inhibió a las cuatro cepas ensayadas. Se concluye que existe alta resistencia antibiótica en *Vibrio* spp aislados de camarones de cultivo en Santa Rosa y Tumbes; que el EPSR de orégano es una interesante alternativa para inhibir a *Vibrio* spp resistentes a antibióticos; asimismo, el EPSR de neem podría ser usado para inhibir algunas cepas de *Vibrio* spp resistentes a oxitetraciclina.

Palabras clave: langostino, resistencia bacteriana, fitobiótico, neem, orégano

ABSTRACT

The study aimed to characterize the antibiotic resistance in *Vibrio* spp isolated from *Litopenaeus vannamei* and to test oregano (*Origanum vulgare*) and neem (*Azadirachta indica*) extracts for their inhibition. Farmed shrimp were collected in Santa Rosa (Ecuador) and samples of hepatopancreas, hemolymph and lesions were taken. Fourteen strains of *Vibrio* spp were isolated. Another 14 strains of *Vibrio* spp isolated from farmed shrimp from Tumbes (Peru) were obtained through a donation. The antibiotic resistance of the strains against 10 antibiotics and the sensitivity of four of them (two resistant and two multi-resistant to antibiotics) were evaluated using neem and oregano aqueous extracts (EA), ethanolic (EE), as well as purified with soxhlet and rota evaporator (EPSR). The 28 strains studied were resistant to at least one of the antibiotics, 64.3% were multi-resistant and 50% were resistant to oxytetracycline. Neem and oregano EA and EE did not inhibit any of the four strains, but the undiluted neem EPSR inhibited one of the four strains tested, showing a greater inhibitory effect even than oxytetracycline in it. Undiluted oregano EPSR inhibited all four strains tested. It is concluded that there is high antibiotic resistance in *Vibrio* spp isolated from farmed shrimp in Santa Rosa and Tumbes; that the EPSR of oregano is an interesting alternative to inhibit *Vibrio* spp resistant to antibiotics, as well as that the EPSR of neem could be used to inhibit some strains of *Vibrio* spp resistant to oxytetracycline.

Key words: shrimp, bacterial resistance, phytobiotic, neem, oregano

INTRODUCCIÓN

La vibriosis son enfermedades originadas por bacterias del género *Vibrio* (Ji *et al.*, 2020), y afectan al camarón *Litopenaeus vannamei* en cultivo. Ciertas cepas de *Vibrio* son responsables de una reciente y grave enfermedad llamada necrosis hepatopancreática aguda (AHPND) (Santos *et al.*, 2020), que surgió en Asia y pasó a Norte América, habiendo causado fuertes pérdidas en ambas regiones (Guía *et al.*, 2020; Santos *et al.*, 2020; de Souza y Wan, 2021). La AHPND se ha expandido a América del Sur

donde, sin embargo, no ha originado graves problemas (Saavedra-Olivos *et al.*, 2018; Aranguren *et al.*, 2020).

Ecuador y Perú ocupan el primer y tercer lugar, respectivamente, en producción de camarón en América del Sur; siendo el cultivo de camarón el que origina el mayor ingreso de divisas por exportaciones acuícolas en ambos países; sin embargo, dicho cultivo se ve afectado frecuentemente por vibriosis distintas a la AHPND que reducen su potencial productivo (FAO, 2018; Produce, 2018; Tarazona *et al.*, 2018; CNA, 2020).

El tratamiento de la vibriosis en camarón se realiza con antibióticos como oxitetraciclina, enrofloxacina, florfenicol y, en algunas ocasiones, norfloxacina (Bermúdez-Almada *et al.*, 2014; Varela-Mejías y Alfaro-Mora, 2018). No obstante, dichos antibióticos se aplican a menudo de manera inadecuada, sin hacer análisis de sensibilidad antibiótica, en dosis excesivas y, a veces, como preventivo, lo que propicia el desarrollo de resistencia bacteriana (Varela-Mejías y Alfaro-Mora, 2018; Sotomayor *et al.*, 2019; Varela y Choc-Martínez, 2020).

El surgimiento de resistencia para uno o varios antibióticos en las cepas de *Vibrio* spp es un asunto preocupante para el cultivo de *Litopenaeus vannamei* (Stalin y Srinivasan, 2016), habiéndose reportado múltiples casos en Brasil (Rebouças *et al.*, 2011; Albuquerque *et al.*, 2015), Malasia (Banerjee *et al.*, 2012), India (Stalin y Srinivasan, 2016), Ecuador (Sotomayor *et al.*, 2019) y Perú (Rosado, 2018). La resistencia antibiótica de estas cepas hace que la eficacia del tratamiento antibiótico sea cada vez menor; representando un riesgo para el ambiente y la salud humana, pues las cepas resistentes pueden llegar al público a través del consumo de camarones y transferir sus genes de resistencia a cepas patógenas para humanos (Jeyasanta *et al.*, 2017; Zhao *et al.*, 2018; Sotomayor *et al.*, 2019).

Se tiene una fuerte regulación que impide la utilización de nuevos antibióticos en acuicultura (Saxena *et al.*, 2018; Khan y Lively, 2020), por lo que al no contarse con más alternativas antibióticas, se están ensayando otras opciones terapéuticas, como son los fitobióticos (extractos y aceites esenciales de plantas) (Sotomayor *et al.*, 2019). El neem *Azadirachta* y el orégano *Origanum vulgare* son plantas utilizadas comúnmente en la medicina alternativa, habiéndose ensayado también en el tratamiento de enfermedades en acuicultura (Banerjee *et al.*, 2012; Thanigaivel *et al.*, 2015; Morales-Covarrubias *et al.*, 2016; Domínguez-Borbor *et al.*, 2020),

por lo que son una alternativa a evaluarse para el tratamiento de vibriosis en el cultivo de camarones. En esta investigación, se determinó la resistencia, frente a 10 antibióticos, de cepas de *Vibrio* spp aisladas de camarones de cultivo en Santa Rosa (Ecuador) y Tumbes (Perú), y su sensibilidad frente a extractos de neem y orégano.

MATERIALES Y MÉTODOS

Lugar del Estudio y Camarones

El estudio se realizó en los laboratorios de Acuicultura II y Biología Molecular de la Facultad de Ingeniería Pesquera y Ciencias del Mar de la Universidad Nacional de Tumbes, ubicada en la localidad de Puerto Pizarro, Región Tumbes, Perú.

Se obtuvieron 14 camarones de tres estanques de una empresa camaronera en el cantón Santa Rosa en la provincia de El Oro (Ecuador). Se seleccionaron estanques de cultivo semi-intensivo que tuvieron problemas periódicos de mortalidad atribuida a vibriosis. Los camarones fueron transportados vivos, en bolsas plásticas con agua de sus estanques, hasta el Laboratorio de Acuicultura II, ubicado a 1 h 30 min del lugar de colecta.

Aislamiento de Cepas de *Vibrio* spp

Los camarones fueron sacrificados siguiendo las directivas de la *Royal Society for the Prevention of Cruelty to Animals* (RSPCA, 2016). De estos se tomaron 46 muestras del hepatopáncreas, intestino, hemolinfa y de heridas de la superficie corporal. Se aislaron, purificaron e identificaron las cepas de *Vibrio* siguiendo el método de Jeyasanta *et al.* (2017) con modificaciones. En breve, las muestras de tejidos (a excepción de la hemolinfa) fueron trituradas en solución de NaCl al 0.85%; se realizaron diluciones de 10^0 a 10^{-4} de los tejidos triturados, totalizando 174 diluciones de todas las muestras, las que fueron sembradas por el

método de agotamiento en placas petri con agar tiosulfato citrato bilis sacarosa (TCBS) ajustado a 2.5% de NaCl. Las placas se incubaron a 37 °C por 24 a 48 h.

Las colonias de *Vibrio* spp crecidas en el agar TCBS (medio selectivo para *Vibrio*), mostraron coloración verde o amarilla, con formas circulares; tamaños de 1-5 mm, con bordes enteros y elevación ligeramente convexa, que son características típicas *Vibrio* (Sabir *et al.*, 2013). Dichas colonias fueron sub cultivadas en placas petri con agar tripticasa soya (TSA) ajustado a 2.5% de NaCl, hasta que en cada placa solo se observó un tipo de colonia. Se realizó tinción de Gram, prueba de catalasa y oxidasa y crecimiento de las cepas en soluciones de NaCl, según el método de Rosado (2018).

Se aislaron 14 cepas de *Vibrio* spp. De otro lado, se utilizaron 14 cepas adicionales de *Vibrio* spp que fueron aisladas de *Litopenaeus vannamei* de cultivo en Tumbes (Perú), en un estudio previo. En el caso de éstas últimas, se realizó el mismo procedimiento para verificar que correspondieran a *Vibrio* spp (crecimiento en TCBS y TSA, tinción de Gram, pruebas de catalasa y oxidasa, y crecimiento en soluciones de NaCl).

Extractos de Neem y Orégano

Se obtuvo hojas maduras de un árbol de neem de aproximadamente 6 m de altura que se encontraba en las instalaciones de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Tumbes, el distrito de La Cruz, Tumbes (Perú). También se colectaron hojas maduras de plantas de orégano de 30-50 cm de altura de un huerto doméstico en el mismo distrito.

Se preparó un extracto etílico (EE), uno acuoso (EA) y un extracto procesado con soxhlet y rotaevaporador (EPSR) de cada una de las plantas. Para el EE se tomó 5 g de

hojas secadas a la sombra, las cuales fueron pulverizadas y mezcladas con 50 ml de alcohol etílico al 96%, el extracto se dejó reposar por 24 h. Para la preparación del extracto acuoso (EA) se colocaron hojas secas pulverizadas en cantidad de 5 g/200 ml en agua destilada hirviendo, dejando reposar el extracto por 24 h.

El sobrenadante de los extractos fue separado por filtración. El extracto procesado con soxhlet y rotaevaporador (EPSR) se preparó colocando 5 g del polvo de hojas y 100 ml de alcohol etílico de 96% en un equipo soxhlet y concentrando el extracto con un rotaevaporador.

Ensayo de Resistencia de Cepas de *Vibrio* spp

El ensayo de resistencia antibiótica fue realizado por el método de difusión en agar (método de Kirby-Bauer). Se realizó un ensayo por cada cepa. Las cepas fueron cultivadas en caldo tripticasa soya (TSB) por 24 h, y luego se estandarizó sus densidades a 1.5×10^8 UFC/ml, comparándolas con un patrón 0.5 de McFarland. Las cepas se sembraron en placas petri con agar Mueller Hinton (MH), y se les colocó discos comerciales de 10 antibióticos (representativos de seis familias antibióticas): familia aminoglucósidos: gentamicina (10 µg); familia fosfonatos: fosfomicina (50 µg); familia fenicoles: cloranfenicol (30 µg) y florfenicol (25 µg); familia penicilinas: ampicilina (10 µg); familia quinolonas: ácido nalidixico (30 µg), enrofloxacin (5 µg) y norfloxacin (10 µg); familia tetraciclinas: oxitetraciclina (30 µg) y tetraciclina (30 µg).

La selección de tales antibióticos se basó, en el caso de la oxitetraciclina, enrofloxacin, florfenicol y norfloxacin, en que son los antibióticos más usados en el tratamiento de vibriosis en camarones (Bermúdez-Almada *et al.*, 2014; Varela-Mejías y Alfaro-Mora, 2018), y en el de los restantes, debido

Cuadro 1. Puntos de corte para la evaluación de la resistencia antibiótica de *Vibrio* spp

Antibiótico	Dosis (µg)	Punto de corte (diámetro del halo, mm)			Fuente
		Resistente	Intermedio	Sensible	
Ácido nalidíxico	30	≤13	14-18	≥19	CLSI (2019)
Ampicilina	10	≤13	14-16	≥17	NCCLS (1999); Cayul (2003)
Cloranfenicol	30	≤12	13-17	≥18	Gómez-Gil (2005)
Enrofloxacin	5	≤15	16-20	≥21	NCCLS (1999); Cayul (2003)
Florfenicol	30	≤12	13-17	≥18	NCCLS (1999); Cayul (2003)
Fosfomicina	50	≤16	17-19	≥20	Seguel (2009)
Gentamicina	10	≤12	13-14	≥15	NCCLS (1999); Cayul (2003)
Norfloxacin	10	≤12	13-16	≥17	CLSI (2019)
Oxitetraciclina	30	≤14	15-18	≥19	NCCLS (1999); Cayul (2003)
Tetraciclina	30	≤14	15-18	≥19	CLSI (2019)

a que fueron incluidos en otros estudios (Albuquerque *et al.*, 2008; Rebouças *et al.*, 2011; Jeyasanta *et al.*, 2017), donde se determinó que cepas de *Vibrio* spp aislados de camarones fueron resistentes a dichos antibióticos.

Luego de 24 h de incubación a 37 °C, se midieron los diámetros de los halos de inhibición y se determinó su resistencia a los antibióticos comparando con los puntos de corte establecidos en el Cuadro 1. Se calculó para cada cepa el índice de resistencia múltiple a antibióticos (IRMA), dividiendo el número de antibióticos al que es resistente la

cepa, entre el número total de antibióticos ensayados. También se determinó la multiresistencia, definida por Magiorakos *et al.* (2012) como la resistencia de una cepa a cuando menos un producto en tres o más familias de antibióticos.

Ensayo de Sensibilidad de las Cepas Resistentes a los Extractos de Neem y Orégano

El ensayo siguió el diseño completamente al azar, teniendo como tratamientos experimentales los extractos (EE, EA y EPSR) de neem y orégano en sus distintas dilucio-

nes. Como control positivo se tuvo discos de oxitetraciclina (30 µg), seleccionado por ser el antibiótico más utilizado en el tratamiento de vibriosis en Tumbes y Ecuador; y como control negativo el solvente utilizado para preparar el extracto (agua destilada o alcohol de 96%). Se prepararon discos esterilizados de papel filtro de 6 mm de diámetro, a los que se les aplicó 20 µl de los EA, EE y EPSR de neem y orégano (en concentraciones de 100, 50 y 25%, cada una de ellas con diluciones sucesivas de 10^0 hasta 10^{-3}).

Se sembraron cepas de *Vibrio* spp a una densidad de 1.5×10^8 UFC/ml en placas petri con agar MH (cinco repeticiones por tratamiento) y se colocaron los discos impregnados con los extractos así como los controles positivo y negativo. Las placas petri se incubaron por 24 h, para luego determinar el diámetro de los halos de inhibición formados. Los datos obtenidos fueron procesados con análisis de varianza y prueba de Duncan, ambas con 0.05 de nivel de significancia.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Sensibilidad de Cepas de *Vibrio* spp a Antibióticos

Todas las cepas de *Vibrio* spp aisladas tanto en Santa Rosa como en Tumbes fueron resistentes a uno o más de los antibióticos utilizados (cuadros 2 y 3), superando los niveles de resistencia antibiótica de 61% reportado para camarones en cultivo en Brasil (Rebouças *et al.*, 2011) y de 75% indicado por Albuquerque *et al.* (2015), aunque similares a los niveles indicados por Banerjee *et al.* (2012), lo cual demuestra la variabilidad respecto a la resistencia a antibióticos en diferentes regiones; sin embargo la resistencia de *Vibrio* spp a múltiples antibióticos, incluso a cefalosporinas de tercera generación, es común habiendo sido detectada en camarones y otros organismos acuáticos (Lee *et al.*, 2018; Letchumanan *et al.*, 2019; Das *et al.*, 2020; Hossain *et al.*, 2020).

Las cepas mostraron índices de resistencia múltiple antibiótica (IRMA) entre 0.1 a 0.8. De estas, la cepa CD09 fue la que mostró resistencia al mayor número de antibióticos (Figura 1), siendo resistente a 8 de 10, con un IRMA de 0.8 (cuadros 2 y 3).

Las cepas aisladas de Santa Rosa fueron mayormente resistentes a fosfomicina (78.6%) y gentamicina (64.3%), pero sensibles a tetraciclina (71.4%), norfloxacin (71.4%) y florfenicol (71.4%). Las cepas procedentes de Tumbes fueron mayormente resistentes a ampicilina (78.6%), fosfomicina (71.4%) y oxitetraciclina (71.4%), pero sensibles a cloranfenicol y (92.9%) y florfenicol (92.9%). Al considerar las cepas de ambas zonas en conjunto, estas fueron más resistentes a fosfomicina (75.0%), gentamicina (64.3%) y ampicilina (57.1%) (Cuadros 4 y 5).

El 57.1% de las cepas fueron resistentes a ampicilina, lo cual es una resistencia bastante común en *Vibrio* de ambientes marinos (Oh *et al.*, 2011), tal y como lo confirman los hallazgos de Albuquerque *et al.* (2008), Mendoza *et al.* (2016), Rosado (2018) y Letchumanan *et al.* (2019), quienes hallaron 50-75, 65, 57 y 85%, respectivamente, de cepas resistentes a este antibiótico. Esta resistencia se explica por la presencia de un gen de β-lactamasa que se encuentra en el ADN cromosómico de *Vibrio* (Hossain *et al.*, 2020).

La oxitetraciclina es el antibiótico más usado en Perú y Ecuador para tratar la vibriosis en camarones. El 28.6% de las cepas de Santa Rosa y 71.4% de las cepas de Tumbes fueron resistentes a este antibiótico. Rebouças *et al.* (2011) en Brasil y Kim *et al.* (2003) en Japón encontraron 25.8 y 54.3% de cepas de *Vibrio* spp resistentes a oxitetraciclina. La menor resistencia observada en Brasil, según Rebouças *et al.* (2011) se debe a que este antibiótico no está aprobado para uso en la acuicultura en dicho país.

Cuadro 2. Sensibilidad antibiótica de las cepas de *Vibrio* spp aisladas de camarones cultivados en Santa Rosa (Ecuador)

Cepa	Amino-glucósidos	Fosforatos	Fenicoles		Penicilinas	Quinolonas			Tetraciclinas		N° antibióticos a los que muestra resistencia	Índice de resistencia múltiple a antibióticos
	Gentamicina (10 µg)	Fosfomicina (50 µg)	Cloranfenicol (30 µg)	Florfenicol (30 µg)	Ampicilina (10 µg)	Ácido nalidixico (30 µg)	Enrofloxacin (5 µg)	Norfloxacin (10 µg)	Oxitetraciclina (30 µg)	Tetraciclina (30 µg)		
HP6-V	R*	R	R	S	R	S	I	S	I	S	4	0.4
HP2-V	R	R	R	I	R	S	R	S	I	S	5	0.5
HP4-V1	I	R	R	R	R	R	I	S	R	S	6	0.6
HP4-V4	S	R	S	R	S	R	R	R	I	S	5	0.5
HP3-V1	R	R	S	S	S	S	S	S	R	I	3	0.3
L4-A1	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	2	0.2
L4-A2	R	S	R	R	S	---	---	---	R	---	4	0.4
L4-V3	R	I	S	S	S	I	S	S	S	S	1	0.1
HP4-V1A	R	S	R	S	R	S	I	S	I	S	3	0.3
HP4-A2	S	R	S	S	S	S	I	S	S	S	1	0.1
HP4-A3	R	R	S	S	R	---	---	---	R	---	4	0.4
HP2-A	S	R	S	S	S	---	---	---	I	---	1	0.1
HP5-V1	S	R	S	S	I	I	S	S	S	S	1	0.1
HP5-V2	R	R	S	S	S	I	I	S	S	S	2	0.2

*R = Resistente, I = Intermedio, S = Sensible, --- = no se pudo determinar la sensibilidad

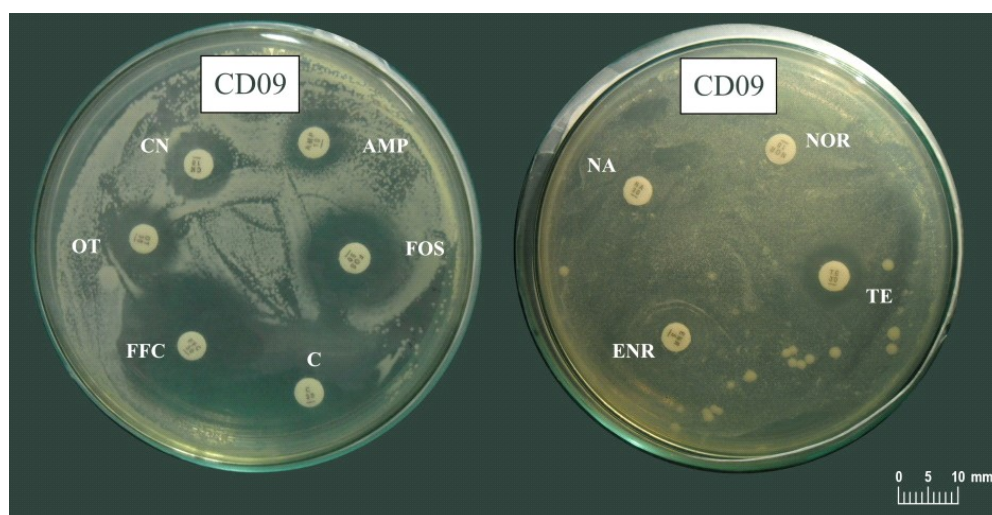


Figura 1. Placas petri mostrando el resultado del antibiograma de una de las cepas de *Vibrio* spp (Cepa CD09). CN= gentamicina, AMP = ampicilina, FOS = fosfomicina, C = cloranfenicol, FFC = florfenicol, OT = oxitetraciclina, NA = ácido nalidixico, NOR = norfloxacin, TE = tetraciclina, ENR = enrofloxacin

Cuadro 3. Sensibilidad antibiótica de las cepas de *Vibrio* spp. aisladas de camarones cultivados en Tumbes (Perú)

Cepa	Amino-glucósidos	Fosforatos	Fenicolos		Penicilinas	Quinolonas			Tetraciclinas		N° antibióticos a los que muestra resistencia	Índice de resistencia múltiple a antibióticos
	Gentamicina (10 µg)	Fosfomicina (50 µg)	Cloranfenicol (30 µg)	Florfenicol (30 µg)	Ampicilina (10 µg)	Ácido nalidíxico (30 µg)	Enrofloxacina (5 µg)	Norfloxacina (10 µg)	Oxitetraciclina (30 µg)	Tetraciclina (30 µg)		
CD01	R*	R	R	R	S	R	R	R	I	I	7	0.7
CD02	S	R	S	S	I	S	S	S	S	S	1	0.1
CD03	R	R	S	S	R	---	---	---	R	---	4	0.4
CD04	R	R	S	S	R	---	S	S	R	I	4	0.4
CD05	R	I	S	S	R	---	---	---	R	---	3	0.3
CD06	R	R	S	S	R	---	---	---	R	---	4	0.4
CD07	R	R	S	S	R	---	---	---	R	---	4	0.4
CD08	S	S	S	S	R	---	---	---	R	---	2	0.2
CD09	R	R	S	S	R	R	R	R	R	R	8	0.8
CD10	I	R	S	S	R	R	I	S	S	S	3	0.3
CD11	R	R	S	S	R	S	R	S	R	R	6	0.6
CD12	R	R	S	S	R	---	---	---	R	---	4	0.4
CD13	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	2	0.2
CD14	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	1	0.1

*R = Resistente, I = Intermedio, S = Sensible, --- = no se pudo determinar la sensibilidad

Cuadro 4. Cantidad de cepas de *Vibrio* spp resistentes a los antibióticos ensayados

Antibiótico	Santa Rosa (Ecuador)		Tumbes (Perú)		Total	
	n	%	n	%	n	%
Ácido nalidíxico	2	14.3	3	21.4	5	17.9
Ampicilina	5	35.7	11	78.6	16	57.1
Cloranfenicol	5	35.7	1	7.1	6	21.4
Enrofloxacina	2	14.3	3	21.4	5	17.9
Florfenicol	3	21.4	1	7.1	4	14.3
Fosfomicina	11	78.6	10	71.4	21	75.0
Gentamicina	9	64.3	9	64.3	18	64.3
Norfloxacina	1	7.1	2	14.3	3	10.7
Oxitetraciclina	4	28.6	10	71.4	14	50.0
Tetraciclina	0	0.0	3	21.4	3	10.7

Cuadro 5. Cantidad de cepas de *Vibrio* spp sensibles a los antibióticos ensayados

Antibiótico	Santa Rosa (Ecuador)		Tumbes (Perú)		Total	
	n	%	n	%	n	%
Ácido nalidíxico	6	42.9	4	28.6	10	35.7
Ampicilina	8	57.1	2	14.3	10	35.7
Cloranfenicol	9	64.3	13	92.9	22	78.6
Enrofloxacina	4	28.6	4	28.6	8	28.6
Florfenicol	10	71.4	13	92.9	23	82.1
Fosfomicina	2	14.3	3	21.4	5	17.9
Gentamicina	4	28.6	4	28.6	8	28.6
Norfloxacina	10	71.4	6	42.9	16	57.1
Oxitetraciclina	5	35.7	3	21.4	8	28.6
Tetraciclina	10	71.4	3	21.4	13	46.4

Cuadro 6. Diámetro del halo de inhibición (promedio \pm desviación estándar, mm) de los EPSR de neem y orégano en cepas de *Vibrio* spp

Concentración	HP2-V	HP4-V1	CD13	CD14
Neem (conc. 100%)	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	12.4 \pm 1.7	0.0 \pm 0.0
Testigo (oxitetraciclina 30 μ g)	16.6 \pm 3.8	20.6 \pm 3.8	5.0 \pm 0.0	15.4 \pm 3.8
Orégano (conc. de 100%)	10.0 \pm 3.2	9.6 \pm 2.6	14.0 \pm 3.2	8.4 \pm 2.6
Testigo (oxitetraciclina 30 μ g)	15.8 \pm 2.3	18.6 \pm 2.6	5.4 \pm 0.9	19.0 \pm 3.2

En el presente estudio el antibiótico que mostró más efectividad fue el florfenicol, pues 82.1% de las cepas fueron sensibles a este antibiótico; resultado que concuerda con el 100% de cepas sensibles hallado por Rebouças *et al.* (2011), toda vez que este antibiótico no es muy utilizado en el tratamiento de vibriosis, lo que explica su menor nivel de resistencia.

Las cepas de *Vibrio* spp mostraron resistencia contra 1 a 5 de las familias de antibióticos. Por otro lado, 8 de las 14 cepas evaluadas en Santa Rosa mostraron ser multirresistentes (57.1%) y 10 de las 14 cepas de Tumbes, también fueron multirresistentes (71.4%). Cuatro cepas, dos de Santa Rosa (HP2-V y HP4-V1) y dos de Tumbes (CD09 y CD11), que representaron el 14.3%

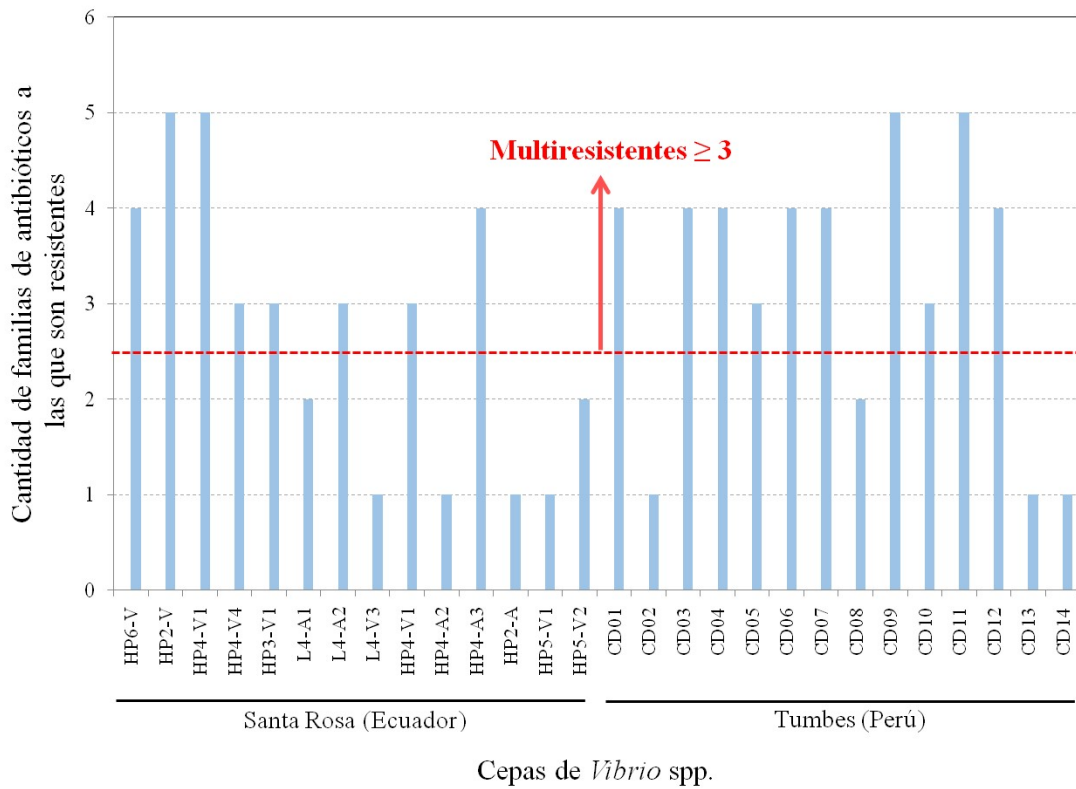


Figura 2. Resistencia de cepas de *Vibrio* spp a seis familias de antibióticos del estudio. Las cepas cuyas barras superan la línea roja horizontal, son multirresistentes

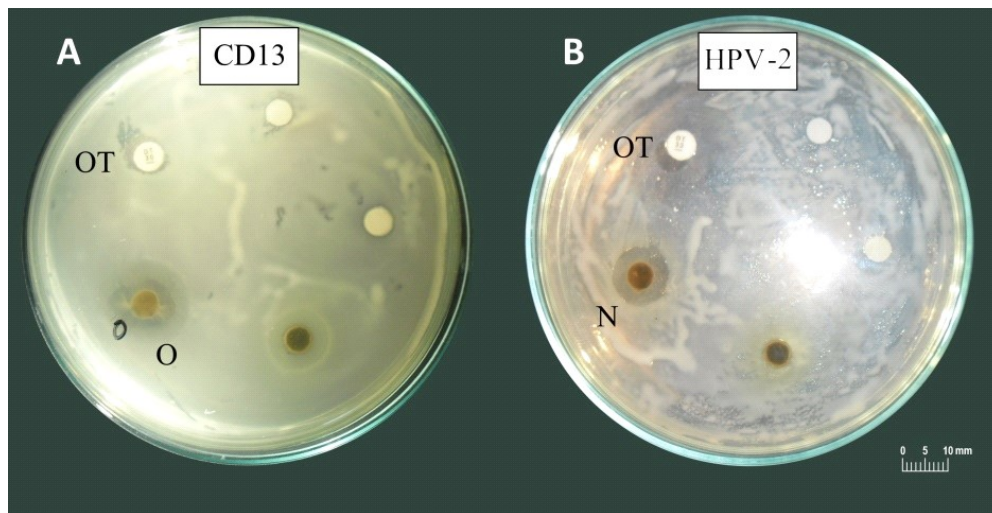


Figura 3. Análisis de sensibilidad de las cepas de *Vibrio* spp al EPSR de neem y orégano. A) Cepa CD13 (resistente a oxitetraciclina), pero sensible al EPSR de orégano sin diluir. B) Cepa HPV-2 (multirresistente, sensible a oxitetraciclina) que fue sensible al EPSR de neem sin diluir. OT = oxitetraciclina, O = EPSR de orégano sin diluir, N= EPSR de neem sin diluir

de las cepas, mostraron la máxima multi-resistencia, siendo resistentes a 5 de las 6 familias de antibióticos (Figura 2), aunque varias de ellas no son utilizadas comúnmente en acuicultura. Esta resistencia, por lo tanto, pudo haber sido generada por otros factores antropogénicos como son la descarga de aguas residuales en el manglar o ríos que desembocan en este (Mendoza *et al.*, 2016; Zhao *et al.*, 2019).

Existe un riesgo de que la resistencia y multiresistencia a antibióticos que poseen las cepas de *Vibrio* spp de las zonas en estudio pueda ser transferida a bacterias de otros géneros, incluyendo a cepas patógenas para humanos, originando problemas ambientales y de salud pública, opinión que es compartida por Rortana *et al.* (2018).

Sensibilidad de *Vibrio* spp a los Extractos

Se encontró que las cuatro cepas de *Vibrio* spp ensayadas (dos multiresistentes, HP2-V y HP4-V1 y dos resistentes, CD13 y CD14), no fueron sensibles a los EA y EE de neem ni de orégano. Sin embargo, el EPSR de neem sin diluir pudo inhibir a una de las cuatro cepas (cepa CD13) ($p < 0.05$) (Cuadro 6 y Figura 3), que fue una cepa resistente a la oxitetraciclina. Esto indica que el extracto EPSR de neem, que es más concentrado que el EA y EE respectivo, puede ser una alternativa para el tratamiento de ciertas cepas de *Vibrio* resistentes a oxitetraciclina. En este sentido, Banerjee *et al.* (2013), encontraron que el EA de hoja de neem no mostró efecto inhibitorio en *V. parahaemolyticus* y *V. alginolyticus* aislados de *L. vannamei* en Malasia, pero observaron inhibición cuando emplearon el jugo de las hojas de neem; es decir un producto más concentrado.

Morales-Covarrubias *et al.* (2016) evaluaron el efecto de la infusión de hojas de neem en cepas de *Vibrio* spp aisladas de camarón, observando un efecto inhibitorio pero solo cuando se aplicó sin diluir, obteniendo halos con diámetros promedio entre 9.5 y 17

mm, mientras que en este estudio los diámetros de los halos de inhibición de EPSR de neem contra la cepa CD13 fueron de 12.4 ± 1.7 mm (Figura 3), los cuales se encuentran dentro del rango obtenido por dichos autores.

El EPSR de orégano sin diluir inhibió a las cuatro cepas de *Vibrio* spp ensayadas ($p < 0.05$), tanto a las multiresistentes como a las resistentes, produciendo halos de inhibición entre 8.4 ± 2.6 mm y 14.0 ± 3.2 mm, respectivamente. En estas mismas cepas, el antibiótico de referencia (oxitetraciclina) produjo halos con diámetros entre 5.4 ± 0.8 mm y 19.0 ± 3.2 mm, respectivamente. En el caso de la cepa CD13 que se mostró resistente a oxitetraciclina, el EPSR sin dilución obtuvo halos de inhibición de 14.0 ± 3.2 mm frente a los 5.4 ± 0.8 mm del disco de oxitetraciclina, un halo casi tres veces mayor al producido por la oxitetraciclina.

Morales-Covarrubias *et al.* (2016) ensayaron infusiones de hoja de orégano en *Vibrio* spp encontrando inhibición de las cepas, produciendo halos con diámetros entre 9.2 y 18.8 mm, que son parecidos a los hallados en la presente investigación (8.4 ± 2.6 mm a 14.0 ± 3.2 mm). Ante lo encontrado, se verifica que los EPSR de orégano son una alternativa interesante para el tratamiento de cepas de *Vibrio* spp, tanto para cepas sensibles como multiresistentes a antibióticos; mientras que el EPSR de neem podría ser utilizado como fitobiótico, pero dirigido a ciertas cepas de *Vibrio* spp.

CONCLUSIONES

- Las 28 cepas de *Vibrio* spp aisladas de *Litopenaeus vannamei* mostraron resistencia al menos a uno de los antibióticos utilizados. De estos 50% fueron resistentes a oxitetraciclina y 64.3% fueron multiresistentes.
- La cepa CD09 fue la que tuvo resistencia al mayor número de antibióticos con un IRMA de 0.8.

- Los extractos acuosos y etanólicos de hoja de neem y de orégano no inhibieron el crecimiento de *Vibrio* spp.
- Los extractos etanólicos de hoja de orégano, procesados con soxhlet y rotaevaporador, pudieron inhibir el crecimiento de todas las cepas de *Vibrio* spp, incluyendo a aquellas multirresistentes a antibióticos. Asimismo, el extracto preparado con hojas de neem inhibió solo a una de las cepas de *Vibrio* spp, pero con un poder inhibitor casi tres veces mayor a la de la oxitetraciclina.

Agradecimiento

A la Universidad Nacional de Tumbes, por ayudar a financiar parte de esta investigación con los proyectos: 1) Proyecto de Investigación con fondos de Canon y Sobrecanon Petrolero: Efecto de la aplicación de compuestos bioactivos de dos plantas locales: *Azadirachta indica* (neem) y *Nerium oleander* (laurel rosa) en el control de patógenos en *Litopenaeus vannamei* (langostino) y *Sus scrofa domesticus* (cerdo) y en el control de plagas en los cultivos de *Musa* sp. (plátano) y *Vitis vitifolia* (uva), autorizado mediante Resolución 0180-2016/UNTUMBES-R-I. y 2) Proyecto de Investigación Avanzada: Desarrollo de alternativas terapéuticas para tratamiento de *Vibrio* spp. resistente a antibióticos en *Litopenaeus vannamei*, autorizado mediante Resolución 0904-2018/UNTUMBES-CU.

LITERATURA CITADA

1. **Albuquerque R, Araújo RL, Souza OV, Vieira RHS dos F. 2015.** Antibiotic-resistant *Vibrios* in farmed shrimp. *Biom Res Int* 2015; 505914. doi: 10.1155/2015/505914
2. **Albuquerque R, Vieira GHF, Silva GC, Vieira RHSE, Sampaio S. 2008.** Susceptibilidad «*in vitro*» a antimicrobianos de estirpes de *Vibrio* spp aisladas de camarões (*Litopenaeus vannamei*) e de água de criação destes animais provenientes de uma fazenda de camarões no Ceará Nota prévia. *Braz J Vet Res Anim Sci* 6: 458-462.
3. **Aranguren LF, Mai HN, Noble B, Dhar AK. 2020.** Acute hepatopancreatic necrosis disease (VPAHPND), a chronic disease in shrimp (*Penaeus vannamei*) population raised in Latin America. *J Invertebr Pathol* 174: 107424. doi: 10.1016/j.jip.2020.107424
4. **Arunkumar M, Lewis F, Thajuddin N, Pugazhendhi A, Nithya C. 2020.** *In vitro* and *in vivo* biofilm forming *Vibrio* spp: a significant threat in aquaculture. *Process Biochem* 94: 213-223. doi: 10.1016/j.procbio.2020.04.029
5. **Banerjee S, Mei L, Shariff M, Khatoon H, Md. Yusoff F. 2013.** Antibacterial activity of neem (*Azadirachta indica*) leaves on *Vibrio* spp isolated from cultured shrimp. *Asian J Anim Vet Adv* 2: 355-361. doi: 10.3923/ajava.2013.-355.361
6. **Banerjee S, Ooi MC, Shariff M, Khatoon H. 2012.** Antibiotic resistant *Salmonella* and *Vibrio* associated with farmed *Litopenaeus vannamei*. *Sci World J* 2012: 130136. doi: 10.1100/2012/130136
7. **Bermúdez-Almada MDC, Espinosa-Plascencia A, Santiago-Hernández ML, Barajas-Borgo CJ, Acedo-Félix E. 2014.** Comportamiento de oxitetraciclina en camarón de cultivo *Litopenaeus vannamei* y la sensibilidad a tres antibióticos de bacterias de *Vibrio* aisladas de los organismos. *Biotecnia* 16: 29. doi: 10.18633/bt.v16i3.138
8. **Cayul AA. 2003.** Estudio de resistencia a antimicrobianos de uso frecuente en medicina veterinaria, de patógenos bacterianos aislados de metritis bovina en rebaños lecheros de la décima región. Tesis de Médico Veterinario. Valdivia, Chile: Univ. Austral de Chile. 95 p.
9. **[CLSI] Clinical and Laboratory Standards Institute. 2019.** Performance standards for antimicrobial susceptibi-

- lity testing. CLSI supplement M100. 29th ed. Wayne: CLSI. 282 p.
10. **[CNA] Cámara Nacional de Acuicultura. 2020.** Cámara Nacional de Acuicultura. Estadísticas. Guayaquil, Ecuador: CNA. [Internet]. Disponible en: <https://www.cna-ecuador.com/estadisticas/>
 11. **Das B, Verma J, Kumar P, Ghosh A, Ramamurthy T. 2020.** Antibiotic resistance in *Vibrio cholerae*: understanding the ecology of resistance genes and mechanisms. *Vaccine* 38: A83-A92. doi: 10.1016/j.vaccine.2019.06.031
 12. **de Souza C, Wan AHL. 2021.** *Vibrio* and major commercially important vibriosis diseases in decapod crustaceans. *J Invertebr Pathol* 181: 107527. doi: 10.1016/j.jip.2020.107527
 13. **Domínguez-Borbor C, Sánchez-Rodríguez A, Sonnenholzner S, Rodríguez J. 2020.** Essential oils mediated antivirulence therapy against vibriosis in *Penaeus vannamei*. *Aquaculture* 529: 735639. doi: 10.1016/j.aquaculture.-2020.735639
 14. **[FAO] Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2018.** Fishery statistical collections. Global production. Rome: FAO. [Internet]. Available in: <http://www.fao.org/fishery/statistics/global-production/en>
 15. **Gómez-Gil B. 2005.** Bacteriología de camarones. Guayaquil, Ecuador: IndustriaAcuícola.com. [Internet]. Disponible en: <http://www.industriaacuicola.com/biblioteca/Camaron/Bacteriologia-%20de%20camarones.pdf>.
 16. **Guia A, Samson J, Uy M. 2020.** In silico analysis of PirA- and PirB-like toxin genes of *Vibrio* spp, present in Asia and Costa Rica. *J Adv Vet Anim Res* 7: 320-323. doi: 10.5455/javar.2020.g424
 17. **Hossain S, Wickramanayake MVKS, Dahanayake PS, Heo G-J. 2020.** Occurrence of virulence and extended-spectrum β -lactamase determinants in *Vibrio* spp isolated from marketed hard-shelled mussel (*Mytilus coruscus*). *Microb Drug Resist* 4: 391-401. doi: 10.1089/mdr.2019.0131
 18. **Jeyasanta KI, Lilly T, Patterson J. 2017.** Prevalence of *Vibrio* species in the cultured shrimp and their antibiotic resistants. *AJAST* 8: 100-111.
 19. **Ji Q, Wang S, Ma J, Liu Q. 2020.** A review: progress in the development of fish *Vibrio* spp. vaccines. *Immunol Lett* 226: 46-54. doi: 10.1016/j.imlet.2020.-07.002
 20. **Khan M, Lively JA. 2020.** Determination of sulfite and antimicrobial residue in imported shrimp to the USA. *Aquaculture Reports* 18: 100529. doi: 10.1016/j.aqrep.2020.100529
 21. **Kim S-R, Nonaka L, Oh M-J, Lavilla-Pitogo CR, Suzuki S. 2003.** Distribution of an oxytetracycline resistance determinant tet (34) among marine bacterial isolates of a *Vibrio* species. *Microbes Environ* 2: 74-81. doi: 10.1264/jisme.2.18.74
 22. **Lee L-H, Ab Mutalib N-S, Law JW-F, Wong SH, Letchumanan V. 2018.** Discovery on antibiotic resistance patterns of *Vibrio parahaemolyticus* in Selangor reveals carbapenemase producing *Vibrio parahaemolyticus* in marine and freshwater fish. *Front Microbiol* 9: 2513. doi: 10.3389/fmicb.2018.02513
 23. **Letchumanan V, Ab Mutalib N-S, Wong SH, Chan K-G, Lee L-H. 2019.** Determination of antibiotic resistance patterns of *Vibrio parahaemolyticus* from shrimp and shellfish in Selangor, Malaysia. *Prog Microbes Mol Biol* 1: a0000019.
 24. **Magiorakos A-P, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, Harbarth S, et al. 2012.** Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infec* 3: 268-281. doi: 10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x
 25. **Mendoza S, Tinoco O, Nieto K. 2016.** Evaluación de la carga bacteriana y resistencia a antibióticos de bacterias aisladas en zonas marinas de alta influencia de producción larvaria en Ecuador.

- Rev Inst Inv Fac Minas Metal Cienc Geogr 38: 137-146. doi: 0.15381/iigeo.v19i38.13580
26. **Morales-Covarrubias M, García-Aguilar N, Bolan-Mejía M, Puello-Cruz A. 2016.** Evaluation of medicinal plants and colloidal silver efficiency against *Vibrio parahaemolyticus* infection in *Litopenaeus vannamei* cultured at low salinity. Dis Aquat Org 1:57-65. doi:10.3354/dao03060
 27. **NCCLS. 1999.** Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically. Approved Standard. NCCLS Document M7-A3. 3rd ed. Wayne: NCCLS. 422 p.
 28. **Oh E-G, Son K-T, Yu H, Lee T-S, Lee H-J, Shin S, Kwon J-Y, et al. 2011.** Antimicrobial resistance of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio alginolyticus* strains isolated from farmed fish in Korea from 2005 through 2007. J Food Protect 3: 380-386. doi: 10.4315/0362-028X.JFP-10-307
 29. **Produce. 2018.** Anuario estadístico pesquero y acuícola 2017. Lima, Perú: Produce. 205 p. [Internet]. Disponible en: http://ogeiee.produce.gob.pe/images/Anuario/Pesca_2017.pdf
 30. **Rebouças RH, de Sousa OV, Sousa A, Vasconcelos FR, Barroso P, Silva RH. 2011.** Antimicrobial resistance profile of *Vibrio* species isolated from marine shrimp farming environments (*Litopenaeus vannamei*) at Ceará, Brazil. Environ Res 111: 21-24. doi: 10.1016/j.envres.2010.09.012
 31. **Rortana C, Wajjwalku W, Boonyawiwat V, Hrianpreecha C, Thongratsakul S, Amavisit P. 2018.** Antimicrobial resistance and pirAB-like profiles of *Vibrio parahaemolyticus* in pacific white shrimp. Agric Nat Resour 4: 377-381. doi: 10.1016/j.anres.2018.10.010
 32. **Rosado AA. 2018.** Resistencia antimicrobiana de bacterias del género *Vibrio* en langostino blanco (*Litopenaeus vannamei*) en centros de cultivo de la región Tumbes. Tesis de Médico Veterinario. Lima, Perú: Univ. Ricardo Palma. 91 p.
 33. **[RSPCA] Royal Society for the Prevention of Cruelty to Animals. 2016.** Humane killing and processing of crustaceans for human consumption. Melbourne: RSPCA. [Internet]. Disponible en: <http://kb.rspca.org.au/afile/625/138/>
 34. **Saavedra-Olivos KY, Peralta-Ortiz T, Ordinola-Zapata A, Sandoval-Ramayoni JE, Vieyra-Peña EG, Zapata-Cruz MA, Hidalgo-Mogollón A, et al. 2018.** Detección de una proteína asociada a la enfermedad de la necrosis hepatopancreática aguda (AHPND) en *Litopenaeus vannamei* bajo cultivo semi-intensivo en Ecuador. Rev Inv Vet Perú 29: 328-338. doi: 10.15381/rivep.v29i1.14194
 35. **Sabir M, Ennaji MM, Cohen N. 2013.** *Vibrio alginolyticus*: an emerging pathogen of foodborne diseases. Int J Sci Technol 4: 302-309.
 36. **Santos HM, Tsai CY, Maquiling KRA, Tayo LL, Mariatulqabtiyah AR, Lee CW, Chuang KP. 2020.** Diagnosis and potential treatments for acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND): a review. Aquac Int 28: 169-185. doi: 10.1007/s10499-019-00451-w
 37. **Saxena SK, Rangasamy R, Krishnan AA, Singh DP, Uke SP, Malekadi PK, Sengar AS, et al. 2018.** Simultaneous determination of multi-residue and multi-class antibiotics in aquaculture shrimps by UPLC-MS/MS. Food Chem 260: 336-343. doi: 10.1016/j.foodchem.2018.04.018
 38. **Seguel VA. 2009.** Evaluación de la susceptibilidad y determinación de la concentración inhibitoria mínima de cuatro antibióticos blindados en agentes bacterianos asociados a enfermedades de salmonídeos. Tesis de Médico Veterinario. Valdivia, Chile: Univ. Austral de Chile. 33 p.

39. **Sotomayor MA, Reyes JK, Restrepo L, Domínguez-Borbor C, Maldonado M, Bayot B. 2019.** Efficacy assessment of commercially available natural products and antibiotics, commonly used for mitigation of pathogenic *Vibrio* outbreaks in Ecuadorian *Penaeus* (*Litopenaeus*) *vannamei* hatcheries. Plos One 14: e0210478. doi: 10.1371/journal.pone.0210478
40. **Stalin N, Srinivasan P. 2016.** Molecular characterization of antibiotic resistant *Vibrio harveyi* isolated from shrimp aquaculture environment in the south east coast of India. Microb Pathogenesis 97:110-118. doi: 10.1016/j.micpath.-2016.05.021
41. **Tarazona JU, León QJ, Galindo CN, Vallejo M, Marguet E. 2018.** Caracterización de actinomicetos de sedimento marino y su actividad antagonista frente a *Vibrio* sp aislados de «langostino blanco» *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931). Rev Inv Vet Perú 29: 676-691. doi: 10.15381/rivep.v29i2.14999
42. **Thanigaivel S, Vijayakumar S, Gopinath S, Mukherjee A, Chandrasekaran N, Thomas J. 2015.** *In vivo* and *in vitro* antimicrobial activity of *Azadirachta indica* (Lin) against *Citrobacter freundii* isolated from naturally infected tilapia (*Oreochromis mossambicus*). Aquaculture 437: 252-255. doi: 10.1016/j.aquaculture.2014.-12.008
43. **Varela A, Choc-Martínez LF. 2020.** Técnicas diagnósticas para enfermedades bacterianas en camarones. Rev Inv Vet Perú 3: e18165. doi: 10.15381/rivep.v31i3.18165
44. **Varela-Mejías A, Alfaro-Mora R. 2018.** Revisión sobre aspectos farmacológicos a considerar para el uso de antibióticos en la camaronicultura. Rev Inv Vet Perú 29: 01-14. doi: 10.15381/rivep.v29i1.14186
45. **Zhao H, Yan B, Mo X, Li P, Li B, Li Q, Li N, et al. 2019.** Prevalence and proliferation of antibiotic resistance genes in the subtropical mangrove wetland ecosystem of South China Sea. Microbiol Open 2019: e871. doi: 10.1002/mbo3.871
46. **Zhao Y, Zhang X, Zhao Z, Duan C, Chen H, Wang M, Ren H, et al. 2018.** Metagenomic analysis revealed the prevalence of antibiotic resistance genes in the gut and living environment of freshwater shrimp. J Hazard Mater 350: 10-18. doi: 10.1016/j.jhazmat.2018.02.004