



UNIVERSIDAD PERUANA  
**CAYETANO HEREDIA**

CARACTERIZACIÓN DE LA  
VARIABILIDAD GENOTÍPICA DE CEPAS  
PATÓGENAS DE *YERSINIA RUCKERI*  
AISLADAS DE CENTROS DE CRIANZA  
DE TRUCHA ARCOÍRIS  
(*ONCORHYNCHUS MYKISS*)  
PROCEDENTES DE LA SIERRA  
CENTRAL DEL PERÚ MEDIANTE LA  
TÉCNICA DE TIPIFICACIÓN DE  
SECUENCIAS MULTILOCUS (MLST).

TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE  
MAESTRA EN SANIDAD ACUÍCOLA

ANNIE DANIELA CASTAÑEDA CASTILLO

LIMA – PERÚ

2023



**ASESOR DE TESIS**

Dr. Mg. MV. Marcos Enrique Serrano Martínez

**Co ASESOR**

Dr. MV. Luis Antonio Llanco Albornoz

**JURADO DE TESIS**

Dr. CARLOS MARTIN SHIVA RAMAYONI  
PRESIDENTE

Dr. JEFFERSON YUNIS AGUINAGA  
VOCAL

Mg. LUIS MIGUEL JARA SALAZAR  
SECRETARIO

## **DEDICATORIA**

A mis padres y hermanos  
Y a ustedes, Pompóm y Jackie...

## AGRADECIMIENTOS

A mis asesores el **Dr. Enrique Serrano Martínez** y **Dr. Luis Llanco**, por las facilidades y asesoría en la elaboración de la tesis, sus consejos, su apoyo y sobre todo por tenerme paciencia.

Al **Mg. MV. Fernando Mesías**, por facilitar las cepas para la realización de esta tesis.

A los **Mg. MV. Armando Rosado**, **Mg. MV. Adhemir Valera**, **MVZ. Milagros Virhuez**, **MV. Gustavo Blancas**, **Blgo. Mario Cueva** y **Blgo. Rony Cotaquispe** por su amistad, su asesoramiento externo en la parte microbiológica, molecular, secuenciamiento y bioinformática.

A mis compañeros del **Laboratorio veterinario Lasser** por su apoyo incondicional.

Y un más sincero agradecimiento a la **Dra. Segolene Calvez** y **Dra. Viviane Nakano**, por facilitarme las secuencias de cepas de referencia, por su orientación, asesoramiento y brindarme parte de su valioso tiempo.

Y a algunos de mis colegas y amigos de la maestría...

## **FUENTE DE FINANCIAMIENTO**

La realización de esta tesis para optar el grado de Magister en Sanidad Acuícola ha sido posible gracias al apoyo financiero brindado al Programa de Maestría en Sanidad Acuícola de la UPCH subvencionado por FONDECYT del CONCYTEC (Convenio de Gestión N° 230-2015- FONDECYT-DE-PROMOCION 3).

# CARACTERIZACIÓN DE LA VARIABILIDAD GENOTÍPICA DE CEPAS PATÓGENAS DE YERSINIA RUCKERI AISLADAS DE CENTROS DE CRIANZA DE TRUCHA ARCOÍRIS (ONCORHYNCHUS MYKISS) PROCEDENTES DE LA SIERRA CENTRAL DEL PERÚ

## INFORME DE ORIGINALIDAD



## FUENTES PRIMARIAS

1	Submitted to Universidad Peruana Cayetano Heredia Trabajo del estudiante	5%
2	minerva.usc.es Fuente de Internet	2%
3	veterinaryresearch.biomedcentral.com Fuente de Internet	1%
4	www.ros.hw.ac.uk Fuente de Internet	1%
5	vdocument.in Fuente de Internet	1%
6	www.deepdyve.com Fuente de Internet	1%
7	link.springer.com Fuente de Internet	<1%

## TABLA DE CONTENIDOS

RESUMEN	
ABSTRACT	
LISTA DE CUADROS	
LISTA DE FIGURAS	
I. INTRODUCCIÓN	1
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	3
III. MARCO TEÓRICO	4
Acuicultura en el Perú	4
<i>Yersinia ruckeri</i>	8
Características generales	8
Serotipos, biotipos y proteínas de membrana	8
Taxonomía	12
Distribución y hospederos	13
Transmisión y signos clínicos	15
Diagnóstico	17
Medidas de prevención	19
Métodos de caracterización molecular	20
Técnicas de genotipificación	20
Multilocus Sequence Typing (MLST)	21
IV. JUSTIFICACIÓN	28
V. OBJETIVOS	30
<i>Objetivo general</i>	30
<i>Objetivos específicos</i>	30
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	31
1. Lugar de Estudio	31
2. Tamaño de muestra	31
3. Recolección y procesamiento de muestras	31

3.1 Reactivación de cepas	31
3.2 Determinación del biotipo	32
3.3 Tipificación molecular de cepas de <i>Yersinia ruckeri</i>	32
3.3.1 Extracción de ADN	32
3.3.2 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	33
3.3.3 Amplificación de los genes de mantenimiento	34
3.3.4 Secuenciación	35
4. Plan de análisis de datos	36
4.1 Análisis bioinformático	36
4.2 Genotipificación por MLST	36
4.3. Asignación de los complejos clonales	36
4.4 Medición de la clonalidad	37
4.5 Análisis de las secuencias	37
4.6 Análisis filogenético	37
5. Consideraciones éticas	38
VII. RESULTADOS	39
1. Reactivación de cepas	39
2. Biotipos de <i>Yersinia ruckeri</i>	39
3. Tipificación molecular de cepas	41
4. Amplificación de los genes de mantenimiento por PCR	41
5. Genotipificación por MLST	41
7. Asignación de los complejos clonales (CC)	43
6. Análisis de las secuencias	46
7. Medición de la clonalidad	46
8. Análisis filogenético	47
VIII. DISCUSIÓN	49
IX. CONCLUSIONES	62
X. RECOMENDACIONES	63
XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64
XII. ANEXOS	

## LISTA DE CUADROS

**Cuadro 1.** Producción acuícola según origen a través de los años 2009 – 2018.

**Cuadro 2.** Extracción de trucha, según su utilización y departamento, 2012-2016

**Cuadro 3.** Esquema de serotipificación a través del tiempo para *Y. ruckeri*

**Cuadro 4.** Características bioquímicas diferenciales entre el biotipo 1 y biotipo 2 de *Y. ruckeri*.

**Cuadro 5.** Clasificación taxonómica de *Y. ruckeri*.

**Cuadro 6.** Medios de cultivo para aislamiento de *Y. ruckeri*.

**Cuadro 7.** Características de las cepas de *Y. ruckeri* utilizadas en este estudio, según su procedencia, especie, órgano y año de aislamiento, perfil fenotípico de susceptibilidad antibiótica y genes de resistencia antibiótica.

**Cuadro 8.** Secuencias de primers del gen 16s ARNr y de los genes de mantenimiento para *Y. ruckeri* que se utilizaron en este estudio.

**Cuadro 9.** Cepas de referencia y de la base de datos del PubMLST usadas en este estudio.

**Cuadro 10.** Determinación de biotipos de cepas de *Y. ruckeri* en base a los medios SIM y agar base Tween.

**Cuadro 11.** Secuencias tipo (ST) encontradas utilizando MLST, biotipos y complejos clonales en cepas de *Y. ruckeri* usadas en este estudio.

**Cuadro 12.** Características de los genes de mantenimiento evaluados y los alelos analizados.

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** Resumen de la realización de la técnica MLST.

**Figura 2.** A: Colonias de *Y. ruckeri* en Agar TSA, B: bacilos cortos Gram negativos, C: Pruebas bioquímicas. Resultados comparados con Buller, 2004.

**Figura 3.** Medio SIM inoculado con *Y. ruckeri*. C-: Control negativo, medio SIM sin inocular, H<sub>2</sub>S: Sulfuro de hidrógeno, M-: Muestra negativa, M+: Muestra positiva, +: Positivo, -: Negativo.

**Figura 4.** Presencia y ausencia de precipitación de halo de cepa de *Y. ruckeri* en el agar base Tween 80. C+: Control positivo: Cepa de *Aeromonas salmonicida*, M-: Muestra negativa, M+: Muestra positiva.

**Figura 5.** Presencia y ausencia de precipitación de halo de *Y. ruckeri* en el agar base Tween 20. C+: Control positivo: Cepa de *Aeromonas salmonicida*, M-: Muestra negativa, M+: Muestra positiva.

**Figura 6.** Confirmación molecular por PCR convencional del gen 16s ARNr. Pocillo 1 y 6: Marcador de peso molecular (MPM) 1 KB; pocillo 2-4: cepas (M1-M3); Pocillo 5: Control positivo (CP); Pocillo 6: control negativo (CN).

**Figura 7.** Blast de la secuencia 16s ARNr de una de las cepas de *Y. ruckeri* frente a una cepa de la base de datos.

**Figura 8.** Confirmación molecular por PCR convencional de 6 genes de mantenimiento de *Yersinia ruckeri* ATCC 29473. Pocillos: 1. recA (560 bp), 2. thrA (693 bp), 3. gnlA (530 bp), 4. Y-HSP60 (565 bp), 5. dnaJ (1024 bp), 6. gyrB (545 bp); Pocillo 7: control negativo (CN); Pocillo 8: Marcador de peso molecular (MPM) 1 KB.

**Figura 9.** Porcentaje de Secuencias Tipo (ST) encontrados en 15 cepas de *Y. ruckeri* usadas en este estudio.

**Figura 10.** Análisis BURST de los STs encontrados para este estudio.

**Figura 11.** Árbol filogenético obtenido mediante el programa START2 v. 1.0.5 siguiendo el método de UPGMA, se muestra el Clado A, cepa no agrupada con sus respectivos códigos, STs, origen, país y año de aislamiento.

**Figura 12.** Frecuencia alélica y de perfil alélico de los 6 genes de mantenimiento usados mediante el software START2.

**Figura 13.** Número de sitios polimórficos encontrados en uno de los genes de mantenimiento mediante el software START2.

**Figura 14.** Índice de asociación ( $I_A$ ) obtenido mediante el software START2.

## RESUMEN

*Yersinia ruckeri* es reconocido como un patógeno bacteriano que afecta principalmente a la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) generando pérdidas económicas en el sector. Es considerado como la especie más genéticamente distante dentro de su género y por poseer variables serotipos, fenotipos, biotipos y diferencias con otros miembros de las Yersiniaceae; además, se evidencia la escases de información sobre las relaciones filogenéticas entre aislados de diferentes regiones del país. El objetivo de este estudio fue caracterizar genotípicamente 15 cepas patógenas de *Y. ruckeri*, aisladas de truchas arcoíris procedentes de Junín, Lima y Ancash mediante Tipificación Multilocus de Secuencias (MLST), dichas cepas fueron identificadas por medio de pruebas de biotipaje; se amplificaron, purificaron y secuenciaron seis genes de mantenimiento y se obtuvo el perfil alélico y tipo de secuencias (ST) al comparar los resultados obtenidos con la base de datos del PubMLST para cada cepa. Se identificó 2 STs y el algoritmo BURST confirmó que la población de *Y. ruckeri* es de tipo clonal. El análisis filogenético determinó relación entre los STs encontrados. Estudios como el presente, permitirá entender la diversidad genética, dinámica poblacional, identificar el probable origen de este patógeno y adoptar mejores medidas en la prevención de epizootias.

**Palabras claves:** Acuicultura, PubMLST, BURST

## **ABSTRACT**

*Yersinia ruckeri* is recognized as a bacterial pathogen that mainly affects rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), generating economic losses in the sector. It is considered the most genetically distant species within its genus and for having variable serotypes, phenotypes, biotypes, and differences with other members of the Yersiniaceae; In addition, the scarcity of information on the phylogenetic relationships between isolates from different regions of the country is evident. The objective of this study was to genotypically characterize 15 pathogenic strains of *Y. ruckeri*, isolated from rainbow trout from Junín, Lima and Ancash by Multilocus Sequence Typing (MLST). These strains were identified by means of biotyping tests; six housekeeping genes were amplified, purified, and sequenced, and the allelic profile and type of sequences (ST) were obtained by comparing the results obtained with the PubMLST database for each strain. Two STs were identified and the BURST algorithm confirmed that the *Y. ruckeri* population is clonal. The phylogenetic analysis determined a relationship between the STs found. Studies such as this one will allow us to understand genetic diversity, population dynamics, identify the probable origin of this pathogen and adopt better measures to prevent epizootics.

**Key words:** Aquaculture, PubMLST, BURST

## I. INTRODUCCIÓN

La producción y consumo de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) viene aumentando en nuestro país con el paso de los años y pese a ser una especie introducida, esta ha ido ganado popularidad debido a sus bondades y a su utilización como ingrediente principal en nuestra alimentación, además de ser un producto de exportación principalmente a Japón, Estados Unidos y Canadá en sus diferentes presentaciones (PRODUCE, 2022).

Tras el aumento e intensificación de sistemas de cultivo de esta especie, es habitual que durante el proceso de crianza se vea afectada por diversos agentes patógenos, principalmente bacterias como *Yersinia ruckeri*, causante de la enfermedad entérica de la boca roja (Enteric redmouth disease - ERM) o yersiniosis en salmónidos, la cual es responsable de considerables pérdidas económicas en el sector acuícola. Se han determinado serotipos y biotipos para esta bacteria a nivel nacional, sin embargo, existe poca información sobre las variantes genéticas de este agente en nuestro país, así mismo, aún no se cuenta con una vacuna de manera comercial contra este agente en nuestro país, probablemente debido a la falta de información sobre esta (Mamani, 2016; Fernández-Espinel *et al.*, 2023).

Con el desarrollo de técnicas de tipaje molecular se puede discriminar claramente entre cepas de una misma especie e inclusive determinar sus relaciones de ancestralidad, destacándose por su poder de discriminación la Tipificación de Secuencias Multilocus (MLST) que se basa en el análisis de las secuencias parciales de una serie de genes

conservados y esenciales para la homeostasis bacteriana (Maiden *et al.*, 1998; De las Rivas, 2007).

Los orígenes de *Y. ruckeri* son inciertos ya que algunos estudios previos (Ewing *et al.*, 1978; Austin y Austin, 2007; Tinsley, 2010), la consideran como la especie más genéticamente distante dentro del género *Yersinia* por poseer una gran variabilidad de fenotipos, serotipos, y biotipos, además, los resultados de varios estudios más las diferencias con otros miembros de las *Enterobacteriaceae*, muestran que *Y. ruckeri* posiblemente podría pertenecer a un género independiente.

En base a la necesidad de obtener más información sobre la variabilidad genotípica de esta bacteria, este estudio tiene el propósito de caracterizar genéticamente cepas patógenas de *Y. ruckeri*, aisladas de centros de cultivo de truchas arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) procedentes de la Sierra Central del Perú utilizando la técnica MLST; dichas cepas patógenas fueron caracterizadas previamente por resistencia a antimicrobianos, genes de resistencia y tipaje por ERIC-PCR y RAPD-PCR (Mesías *et al.*, 2019).

La determinación de la diversidad genética de esta bacteria, que afecta seriamente la producción truchícola en nuestro, nos permitirá tener un mejor entendimiento de la dinámica poblacional de este agente, identificar su probable origen, además de mejorar en la prevención de futuras epizootias causadas por esta con la elaboración de una vacuna eficaz.

## II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se conoce que *Yersinia ruckeri* es un patógeno muy particular y este es distinguible de otros miembros de su género, desde su primer reporte en nuestro país en el año 2004 hasta la actualidad, se han realizado diversos estudios acerca de su comportamiento clínico, es importante conocer las características fenotípicas y genotípicas de esta bacteria, puesto que están involucradas en la patogenicidad que esta puede provocar y que estas características podrían variar entre las diferentes regiones del país donde se desarrolla la producción de trucha (Mesías *et al.*, 2019).

Pese a que ya se han desarrollado técnicas de diagnóstico molecular, estas no son muy usadas en la acuicultura peruana probablemente por desconocimiento, no ser accesibles o por limitaciones, sin embargo, la valiosa información que estas generan nos permitiría la identificación de grupos de microorganismos con idénticos (clones) o altamente relacionados (líneas clonales) y poder establecer sus relaciones (Vásquez y Berrón, 2004).

A pesar de su importancia, aún es escasa la información que muestre la relación filogenética entre aislados de *Y. ruckeri* de diferentes regiones del Perú, sin contar con esta información, no se podría elaborar programas efectivos de sanidad que permitan producir una vacuna eficaz conformada por cepas endémicas de nuestro país.

### III. MARCO TEÓRICO

#### Acuicultura en el Perú

La acuicultura es de las actividades productivas de mayor crecimiento, volviéndose responsable por buena parte del suministro de pescado para el consumo humano. El Estado peruano impulsó la actividad acuícola mediante el Decreto Legislativo N° 1195 – Ley General de Acuicultura, declarándose de interés nacional la promoción de la acuicultura sostenible, que, por ser una actividad económica sostenible, ha favorecido la producción de diferentes especies, siendo la trucha arcoíris, langostino, concha de abanico, tilapia, entre otras que incluyen especies amazónicas, como las principales especies cosechadas en nuestro país (Anuario estadístico pesquero y acuícola, 2017; PROMPERÚ, 2019), destacando entre estos recursos la producción de la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), que en la última década ha tenido un crecimiento sostenido y constante donde se incrementó la extracción en un 348,3% (Cuadro 1) (PRODUCE, 2015; PRODUCE, 2017; Anuario estadístico pesquero y acuícola, 2017).

**Cuadro 1.** Producción acuícola según origen a través de los años 2009 – 2018.

Origen	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018
<b>Total</b>	<b>44.317,0</b>	<b>89.021,0</b>	<b>92.200,8</b>	<b>72.293,4</b>	<b>125.699,0</b>	<b>115.269,4</b>	<b>90.976,4</b>	<b>93.444,8</b>	<b>100.211,7</b>	<b>103.598,1</b>
<b>Continental</b>	<b>14.837,0</b>	<b>17.320,0</b>	<b>23.608,6</b>	<b>29.563,7</b>	<b>40.068,2</b>	<b>38.683,0</b>	<b>45.758,0</b>	<b>54.925,6</b>	<b>60.298,6</b>	<b>61.398,1</b>
Trucha	12.817,0	14.250,0	19.962,3	24.762,0	34.992,5	32.923,4	40.946,5	48.594,3	54.424,5	55.030,2
Tilapia	1.261,0	2.013,0	2.422,8	3.174,0	3.839,8	4.610,4	3.250,2	2.913,1	2.657,5	3.074,6
Paiche	3,0	48,0	422,2	637,2	94,4	54,6	135,1	400,9	217,8	230,6
Gamitana	564,0	680,0	521,9	452,6	530,5	504,3	298,5	1.144,2	1.046,6	1.109,1
Otros	192,0	329,0	279,3	537,9	610,9	590,3	1.127,6	1.873,2	1.952,3	1.953,7
<b>Marítimo</b>	<b>29.480,0</b>	<b>71.701,0</b>	<b>68.592,2</b>	<b>42.729,7</b>	<b>85.624,7</b>	<b>76.586,3</b>	<b>45.218,5</b>	<b>38.519,2</b>	<b>39.913,1</b>	<b>42.200,0</b>
Concha de Abanico	16.047,0	58.101,0	52.212,8	24.781,7	67.694,4	55.096,2	23.028,6	18.501,5	13.136,6	12.477,0
Langostinos	13.425,0	13.598,0	16.379,4	17.801,0	17.883,0	21.483,7	22.183,3	20.013,3	26.768,5	29.716,9
Otros	8,0	2,0	0,0	147,0	47,3	6,5	6,6	4,4	8,1	6,0

Fuente: PRODUCE, 2019  
Elaboración: Departamento de Productos Pesqueros

La trucha arcoíris fue introducida en el año 1928 con fines deportivos y, pese a no ser nativa de nuestro país, es usada en la actividad culinaria debido a su sabor y elevado valor nutricional (FAO, 2009). Además, puede ser alimentada a base a pellets o peces pequeños, convirtiendo eficientemente estos alimentos, se reproduce con facilidad en cautiverio, posee un alto valor proteico y se ha desarrollado con relativo éxito en las zonas altoandinas, especialmente en el departamento de Puno, que se ha convertido en el principal productor de esta especie con una producción de más 40, 000 toneladas, que representa más del 80% de la producción nacional, seguido por Junín, Huancavelica, Cusco, Ayacucho y Lima, demostrando así que es una especie adaptable a diferentes ambientes (AECI/PADESPA – FONDEPES, 2004; PRODUCE, 2017) (Cuadro 2).

**Cuadro 2.** Extracción de trucha, según su utilización y departamento, 2012-2016

(Toneladas métricas brutas)

Utilización / Departamento	2012	2013	2014	2015	2016 P/
<b>Total</b>	<b>25 077,00</b>	<b>35 431,61</b>	<b>33 251,74</b>	<b>41 237,37</b>	<b>52 088,08</b>
<b>Fresco</b>	<b>22 577,00</b>	<b>33 646,00</b>	<b>31 401,11</b>	<b>37 367,43</b>	<b>46 738,26</b>
Amazonas	61,00	41,11	35,55	89,37	291,41
Áncash	136,00	659,00	81,77	78,56	85,70
Apurímac	54,00	74,86	90,48	103,77	97,68
Arequipa	140,00	141,62	166,37	105,39	18,81
Ayacucho	240,00	264,86	304,40	482,65	543,98
Cajamarca	329,00	328,43	175,13	75,49	139,31
Cusco	621,00	881,71	316,81	699,14	950,00
Huancavelica	352,00	455,53	721,45	446,88	488,73
Huánuco	148,00	197,70	269,10	258,99	247,00
Junín	2 415,00	1 747,16	1 614,74	1 177,55	2 262,96
La Libertad	9,00	9,56	49,23	122,08	120,31
Lima	128,00	197,39	219,61	253,15	61,96
Moquegua	6,00	10,66	8,44	8,44	8,08
Pasco	90,00	88,25	89,27	127,76	234,11
Puno	17 800,00	28 509,85	27 183,37	33 277,50	41 155,52
San Martín	1,00	1,20	7,77	9,19	-
Tacna	47,00	37,12	67,62	51,52	32,70
<b>Congelado</b>	<b>2 454,00</b>	<b>1 785,60</b>	<b>1 850,63</b>	<b>3 869,68</b>	<b>5 349,82</b>
Junín	997,00	379,82	-	-	-
Huancavelica	792,00	766,47	722,50	2 939,96	3215,32
Puno 1/	665,00	639,31	1 128,13	929,72	2 134,50
<b>Otro</b>	<b>46,00</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>0,26</b>	<b>-</b>
Junín	1,00	-	-	-	-
Puno	45,00	-	-	0,26	-

Fuente: Compendio estadístico INEI 2017

Esta especie es un producto de exportación, que tiene como principal destino a Estados Unidos, Canadá, Rusia entre otros, existiendo diversas formas de comercialización de esta especie, que van desde la importación de ovas, ahumada, entera, fileteada, entre otras y donde el 93.9% es destinada al consumo estado fresco (FAO, 2009; PRODUCE, 2010a; Anuario estadístico pesquero y acuícola, 2017).

En el mercado internacional, el consumo per cápita anual de la trucha es de 2 kg/persona mientras que, en nuestro país el consumo per cápita anual en el departamento de Puno es de 0.32 kg por persona, en otros departamentos es mucho menor llegando en promedio a 0.19 kg. por persona (Huamaní y Mantilla, 2017).

Es sabido que durante la producción de trucha arcoíris, estas pueden ser afectadas por diferentes microorganismos patógenos incluyendo virus, bacterias, hongos y parásitos internos o externos (FAO, 2014), ejemplo de ello, en el departamento de Puno, se evidenció *Flavobacterium psychrophilum* (Gonzales, 2009), *Weissella ceti* (Medina *et al.*, 2020), *Y. ruckeri* (Fernández-Espinel *et al.*, 2022) y lesiones compatibles con el virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPN) (Castro *et al.*, 2014) y en Junín se han detectado enfermedades causadas por bacterias como *Y. ruckeri*, *F. psychrophilum*, *Aeromonas* sp. y *Pseudomonas* sp. (Bravo y Kojagura, 2004; León *et al.*, 2009; Bastardo *et al.*, 2011; Sirvas *et al.*, 2011; Sierralta *et al.*, 2013.), *Carnobacterium maltaromaticum* (Chiroque, 2014), *Renibacterium salmoninarum* (Talavera, 2008) y hongos como *Ichthyophonus hoferi* y el virus de la necrosis hematopoyética infecciosa (IHN) (Castro *et al.*, 2014), resaltando estos departamentos ya que son los primeros productores de trucha en nuestro país.

## *Yersinia ruckeri*

### Características generales

Dentro de los agentes etiológicos que generan importantes pérdidas económicas considerables en la truchicultura y en salmónidos, destaca *Yersinia ruckeri*, siendo la trucha arcoíris, la especie más susceptible a la enfermedad (Gokhlesh *et al.*, 2015). *Y. ruckeri*, es causante de la yersiniosis o enfermedad entérica de la boca roja (ERM), esta bacteria es un bacilo corto Gram negativo perteneciente a la familia Yersiniaceae (Adelou *et al.*, 2016), no formadora de esporas y que no siempre presenta flagelos, lo que le confiere una motilidad variable (Ross *et al.*, 1966; Tobback *et al.*, 2007).

### Serotipos, biotipos y proteínas de membrana

Diferentes cepas de *Y. ruckeri* han sido reportadas y categorizadas en base a su serotipo, biotipo, proteínas de membrana externa (Outer membrane proteins - OMP) (Kumar *et al.*, 2015). Esta bacteria ha pasado por diferentes clasificaciones con respecto a su serotipo a lo largo del tiempo, donde la serotipificación se basa en la reacción serológica de los antígenos enfrentada a anticuerpos, así se pudo agrupar inicialmente en 6 serovares: I, II, III, IV, V, VI (Stevenson y Airdrie, 1984). Sin embargo; De Grandis *et al.*, (1988) por hibridación de ADN demostraron que las cepas incluidas como serotipo IV no pertenecían al género *Yersinia*. Davies (1990), propuso 5 serotipos en base a antígenos O: O1, O2, O5, O6 y O7, que son estables al calor y demostró que la cepa australiana, previamente descrita como serotipo III, fue incorrectamente serotipificada, debido a que mostró reacción cruzada con el antisuero del serotipo I, siendo ambas similares y pertenecientes al serotipo O1. Finalmente, Romalde *et al.*,

(1993) propusieron un nuevo esquema de serotipificación, considerando la hipótesis de De Grandis *et al.*, (1988), clasificándola en cuatro serotipos: serotipo O1 se divide en dos subgrupos, O1 a (anteriormente llamado serotipo I) y el subgrupo O1 b (serotipo III). El serotipo O2 (serotipo II) dividido en tres subgrupos: O2 a, O2 b y O2 c. Los demás serotipos fueron designados como O3 (serotipo V) y O4 (serotipo VI) (Cuadro 3).

Aunque el serotipo O1a es el responsable por la mayoría de brotes en la producción de trucha arcoíris (Austin y Austin, 2007), también se han reportado epizootias en el salmón atlántico vacunado (*Salmo salar*) de Chile causado por cepas de serotipo O1b/biotipo 1 (Bastardo *et al.*, 2011a); asimismo, en este país se han descrito brotes confirmados mediante PCR, como pertenecientes al serotipo O2b (Bastardo *et al.*, 2012), responsable de mortalidad de alevines de salmón Coho (Avendaño-Herrera *et al.*, 2017).

**Cuadro 3.** Esquema de serotipificación a través del tiempo para *Y. ruckeri*.

<b>Autor (es)</b>	<b>Serotipificación</b>
<b>Stevenson y Airdrie, (1984)</b>	I, II, III, IV, V, VI
<b>Davies, (1990)</b>	O1, O2, O5, O6, O7
<b>Romalde <i>et al.</i>, (1993)</b>	O1 (O1a y O1b) O2 (O2a, O2b, O2c) O3 O4

*Y. ruckeri* se puede clasificar según el biotipo en biotipo 1 y 2 (BT1 y BT2), aún no se cuenta con un procedimiento definitivo para su diferenciación más que los basados en su capacidad de hidrolizar el Tween 20 y 80 y en su motilidad (Davies y Frerichs,

1989). Las cepas pertenecientes al biotipo 1 (BT1) son positivas para la motilidad y la secreción de lipasa, mientras que las cepas del biotipo 2 (BT2) son negativas para ambas pruebas (Kumar *et al.*, 2015) (Cuadro 4).

**Cuadro 4.** Características bioquímicas diferenciales entre el biotipo 1 y biotipo 2 de *Yersinia ruckeri*.

<u>Prueba bioquímica</u>	<u>Biotipo 1</u>	<u>Biotipo 2</u>
Motilidad	+	-
Reacción Voges-Proskauer	v	+
Prueba de rojo metilo	v	v
Producción de ácido a partir de sorbitol	v	v
Actividad de la lipasa	+	-
Presencia de gelatinasa	v	v
Crecimiento a 22°C	+	+

+: positivo; -: negativo; v: variable

Fuente: Tinsley, 2010

Durante mucho tiempo *Y. ruckeri* fue considerado fenotípicamente homogéneo ya que solo se había observado que el BT1 causaba la mayoría de epizootias y mortalidad por yersiniosis y era el aislado con mayor frecuencia (Ewing *et al.*, 1978, Arias *et al.*, 2007); sin embargo; con el desarrollo de la acuicultura en todo el mundo y la aparición del BT2, ahora se acepta que existe una variabilidad fenotípica basada principalmente en la presencia o ausencia de flagelos y, por lo tanto, en la motilidad (Davies y Frerichs, 1989).

Desde 1989, se ha descrito la aparición y propagación del BT2 en las pesquerías (Davies y Frerichs 1989, Austin *et al.*, 2003) y se ha correlacionado con la recurrencia de casos clínicos vacunados previamente con cepas del BT1 en varios países diferentes: Inglaterra (Austin *et al.*, 2003), España (Fouz *et al.*, 2006), EE. UU. (Arias *et al.*, 2007) y Finlandia (Ström-Bestor *et al.*, 2010). El BT2 ha sido cada vez más frecuentemente aislado y asociado a casos clínicos, su aparición parece tener múltiples orígenes, el patrón varía considerablemente según el área geográfica y la fecha del análisis (Wheeler *et al.*, 2009, Welch *et al.*, 2011).

Concha, (1998), logró caracterizar cepas de *Y. ruckeri* del Salmón del atlántico en Chile, encontrando la presencia de BT1 y BT2 y menciona que este último, es un grupo muy definido dentro de los aislados de Inglaterra, Noruega y Alemania, además es importante mencionar que en Australia se considera a al BT2 como enzoótico para ese país a diferencia del BT1 que raras veces es encontrado (Carson y Wilson, 2009).

En nuestro país, aún es limitada la información sobre los biotipos o serotipos en campo, se han aislado distintas cepas de uno o ambos biotipos de *Y. ruckeri* en departamentos como Junín, Huancavelica, Áncash, Lima, Puno y Cachapoyas (Bravo y Kojagura, 2004; Sirvas *et al.*, 2011; Flores, 2013; Sierralta *et al.*, 2013; Mesías *et al.*, 2019; Fernández-Espinel *et al.*, 2022). Fernández-Espinel *et al.*, (2022) caracterizó 29 aislamientos de *Y. ruckeri* de siete granjas criadas en jaulas en Puno de peces con signología compatible con yersiniosis y evidenciaron la presencia de ambos biotipos siendo BT1 (9 aislados) y BT2 (20 aislados) y pertenecían al serotipo O1a.

El análisis de la proteína de la membrana externa (OMP), mediante la técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida de dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE), se ha utilizado para estudiar la variación de la cepa y la relación en numerosas especies bacterianas, incluidas muchas bacterias patógenas que le sirvió a Davies (1991b) para identificar 5 tipos de proteínas de membrana externa (OMP 1- OMP 5) entre más de 100 muestras.

Los aislados de *Y. ruckeri* pueden ser divididos en grupos clonales según el biotipo, serotipo y proteínas de membrana externa, y dichos grupos podrían estar relacionados con la virulencia de la bacteria, además que la combinación de estas características es útil para discriminar entre cepas de *Y. ruckeri* y fue llevada a cabo por Davies (1991a) con el fin de demostrar la relación entre aislamientos y clasificarlos.

#### Taxonomía

Los orígenes de *Y. ruckeri* son inciertos y su posición taxonómica ha sido objeto de debate desde su primera clasificación en el género *Yersinia* por Ewing *et al.*, (1978). Esta investigación demostró que los aislamientos de esta bacteria tenían una proporción de G + C de 47.5 a 48.5% incluyéndola en el género *Yersinia* (46-50% G+C), mientras que diferentes estudios de hibridación de ADN mostraron un 30% homología de *Y. ruckeri* con especies del género *Serratia* y *Yersinia*. Sin embargo, por sus reacciones bioquímicas y serológicas se considera que incluirla en ese género no es pertinente ya que *Y. ruckeri* es típicamente distinguible de otros miembros de *Yersinia* por la capacidad de producir lisina descarboxilasa (Tobback, 2009; Tinsley, 2010).

Otros investigadores encontraron que las características bioquímicas de *Y. ruckeri* tenían similitudes con *Serratia* y *Salmonella* (Llewellyn, 1980; Austin y Austin, 2007), además, Kotetishvili *et al.*, (2005), al utilizar la técnica MLST consideraron que *Y. ruckeri* era la especie más genéticamente distante dentro del género *Yersinia*. De los resultados de varios estudios y las similitudes con muchos otros miembros de las Enterobacteriaceae, *Y. ruckeri* posiblemente podría formar su propio género separado (Tinsley, 2010). Adelou *et al.*, (2016), hace una propuesta para el orden Enterobacterales haciendo un análisis taxonómico completo a escala del genoma del orden 'Enterobacteriales', la familia Yersiniaceae contiene el género *Yersinia*, *Chania*, *Ewingella*, *Rahnella*, *Rouxiella*, *Samsonia* y *Serratia* (Cuadro 5).

**Cuadro 5.** Clasificación taxonómica de *Y. ruckeri*

<b><u>CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA</u></b>	
<b>Dominio</b>	Bacteria
<b>Phylum</b>	Pseudomonadota
<b>Clase</b>	Gammaproteobacteria
<b>Orden</b>	Enterobacteriales
<b>Familia</b>	Yersiniaceae
<b>Género</b>	<i>Yersinia</i>
<b>Especie</b>	<i>Yersinia ruckeri</i>

Fuente: List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN)

#### Distribución y hospederos

El primer reporte de esta bacteria data del año 1950 en USA (Rucker, 1966) siendo comúnmente aislada en países productores de truchas (Austin y Austin, 2007). Desde su primer aislamiento, este patógeno ha sido detectado en diferentes países del mundo

como Norte América, Australia, Sudáfrica y Europa (Bragg y Henton, 1986, Tobback *et al.*, 2007) y en Latinoamérica, Chile (Avendaño *et al.*, 2017) y Venezuela (Álvarez, 1992).

En el Perú, *Y. ruckeri* fue aislada de 34 piscifactorías del departamento de Junín, identificándola por procedimientos bioquímicos estándares (Bravo y Kojagura, 2004) y se ha venido estudiando su desarrollo en diferentes departamentos de nuestro país donde se han presentado otros casos de yersiniosis (Sirvas-Cornejo *et al.*, 2011; Sierralta *et al.*, 2013; Castro *et al.*, 2017; Fernández-Espinel *et al.*, 2022).

La bacteria ha sido aislada de numerosas especies de peces salmónidos y no salmónidos criados en aguas dulces y marinas y otras fuentes ocasionales (Romalde *et al.*, 1993), este patógeno se ha encontrado en otros animales, que podrían funcionar como vectores, como la rata almizclera, gaviotas, halcones, tortugas, lombrices de tierra y en humanos como una infección accidental (Tobback *et al.*, 2007; Kumar *et al.*, 2015) siendo las truchas arcoíris, en todas las etapas de cultivo, las más susceptibles (Roberts, 2012), en nuestro país se ha demostrado su patogenicidad en los departamentos de Puno y Ancash (Estrella, 2019; Mesías *et al.*, 2019).

De todo lo anterior se puede afirmar que *Y. ruckeri* tiene un amplio rango de hospederos y diversas áreas geográficas donde puede ser encontrada y que ello se debe, en parte, al incremento de la vigilancia y la mejora de los métodos para su detección, a la vez que puede estar relacionado con el incremento de nuevas instalaciones acuícolas en

todo el mundo; sin embargo, puede seguir causando nuevas epizootias (Tobback, 2007; Kumar *et al.*, 2015).

#### Transmisión y signos clínicos

Esta es principalmente horizontal, esto quiere decir que las infecciones por este agente se propagan entre los peces por contacto directo con animales infectados o portadores, diseminándose por el agua, así como por peces portadores asintomáticos (Rucker *et al.*, 1966).

*Y. ruckeri* inicialmente infecta las láminas branquiales secundarias, luego se propaga al sistema sanguíneo a través de las células del pavimento branquial, tan rápido como 1 minuto después de la infección (min post infection – mpi) inclusive se la ha podido detectar en la luz del intestino a 30 mpi, en el riñón a los 3 días post infección (dpi), y en el hígado, bazo, cerebro y corazón a 7 dpi. *Y. ruckeri* ya no era detectable en el hígado, el bazo, el cerebro y el corazón a los 21 dpi (Ohtani *et al.*, 2014). Busch y Lingg, (1975), verificaron que hasta el 25% de una población de truchas arcoíris podría portar *Y. ruckeri* en el intestino inferior y las bacterias pueden entonces liberarse cuando los peces portadores se estresan.

La capacidad que posee *Y. ruckeri* de formar biopelículas en superficies y sedimentos representa también una fuente de infección común en las piscigranjas, probablemente ya que esta bacteria es capaz de sobrevivir y permanecer en el medio ambiente debido a las alteraciones en la permeabilidad de la membrana externa y su capacidad de formar biofilm, siendo este un potencial de infección por tiempos prolongados (Coquet *et al.*,

2002; Bystritskaya *et al.*, 2016), además se ha demostrado que es una bacteria resistente al ácido oxolínico, un antibiótico de uso frecuente en el tratamiento de yersiniosis (Coquet *et al.*, 2002).

Aún no se ha podido demostrar si existe transmisión vertical de madre a descendencia; sin embargo, se recuperó *Y. ruckeri* de huevos desinfectados no fertilizados de salmón chinook (*Oncorhynchus tshawytscha*), además, se logró detectar ADN de *Y. ruckeri* en óvulos no fertilizados y líquido ovárico de salmón Chinook sugiere que el patógeno podría transmitirse verticalmente, sin embargo, este estudio no pudo verificar la presencia de células bacterianas dentro del corion del huevo (Glenn *et al.*, 2014).

Los signos clínicos externos que muestran los peces infectados son exoftalmia unilateral o bilateral, abdomen distendido, ano ligeramente inflamado, hemorragias alrededor de la boca, oscurecimiento de la piel, además de nado errático y cercano a la superficie, movimientos letárgicos y pérdida del apetito. Entre los signos clínicos internos más frecuentes se observa esplenomegalia, hepatomegalia y una septicemia hemorrágica generalizada, los cuales han sido documentados en truchas por Bravo y Kojagura, (2004); Austin y Austin, (2007); Tinsley, (2010); Sirvas, (2012) y Sierralta *et al.*, (2013).

Un gran número de bacterias son diseminadas por las heces de peces portadores o enfermos, lo que sería la principal fuente de infección (Busch y Lingg, 1975), que, sumado a la crianza intensiva en las piscigranjas, expondría a los peces a condiciones

de estrés (Austin y Austin, 2007) viéndose vulnerables a una infección provocada por esta bacteria, sin embargo, la sintomatología y lesiones que ocasiona ella son similar a las producidas por *Aeromonas liquefasciens* y *A. salmonicida*. (Sierralta *et al.*, 2011). Por lo tanto, no es fácil establecer un diagnóstico definitivo del posible agente patógeno apenas en base a la sintomatología (Gibello *et al.*, 2001) siendo necesario aislar *Y. ruckeri* de órganos internos como bazo, riñón e hígado (Dulin *et al.*, 1976).

#### Diagnóstico

Se utilizan diferentes métodos para hacer el diagnóstico de la enfermedad causada por esta bacteria como microbiológicos, serología, perfil bioquímico, histopatología y técnicas de biología molecular (PCR) (Bastardo *et al.*, 2012; Kumar *et al.*, 2015). El análisis de lesiones histopatológicas sirve de apoyo respecto a la falta de signos específicos provocados por esta bacteria (Zorriehzahra, 2017).

Para el aislamiento microbiológico de *Y. ruckeri* se utilizan técnicas clásicas de cultivo en agar tripticasa soja, agar sangre y agar MacConkey, entre otros, incubándolos a 20-25°C durante 24 a 48 horas (Cuadro 6) más la ayuda de pruebas bioquímicas, también esta bacteria puede ser identificada con el uso de kits comerciales como el sistema API 20E (Bastardo *et al.*, 2012).

**Cuadro 6.** Medios de cultivo para aislamiento de *Y. ruckeri*

<b>Medio de cultivo</b>	<b>Referencia</b>
<b>Agar tripticasa soya (TSA)</b>	Stevenson y Daley, (1982)
<b>Agar nutritivo</b>	Secades y Guijarro, (2007)
<b>Agar cerebro-corazón (BHI)</b>	Arias <i>et al.</i> , (2007)
<b>Agar sangre Columbia</b>	Gibello <i>et al.</i> , (2004)
<b>Agar MacConkey</b>	Gibello <i>et al.</i> , (1999)

Fuente: Tinsley, 2010

Bioquímicamente esta bacteria es positiva a la prueba de la catalasa, fermentar glucosa, manitol, reducir nitrato, rojo de metilo, ornitina y lisina descarboxilasa, entre otras y es negativa para citocromo oxidasa, producción de hidrogeno sulfurado, producción de indol, entre otros (Ewing *et al.*, 1978; Tobback *et al.*, 2007).

Las técnicas moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Gibello *et al.*, 1999) y el análisis de polimorfismos en la longitud de fragmentos de restricción (RFLP) (García *et al.*, 1998) son las técnicas más usadas para complementar el diagnóstico basados en la amplificación selectiva del gen 16S rRNA. La amplificación isotérmica mediada por bucle LAMP (“Loop-mediated isothermal amplification”) basada en estos mismos genes también se ha usado para su detección en tejidos de peces infectados (Saleh *et al.*, 2008).

A pesar del incremento y desarrollo de la acuicultura, nuestro país aún muestra la precariedad de métodos confiables para una rápida detección, aplicados como diagnóstico rutinario. Pese a que la ERM se encuentran incluida en el Programa de

Vigilancia y Control de enfermedades en animales acuáticos del SANIPES, esta no se encuentra como una enfermedad enlistada en la OIE, esto hace más notable la escasez de información sobre la prevalencia e incidencia de esta bacteria a nivel nacional ya que no es de importancia para la salud pública (SANIPES, 2016).

#### Medidas de prevención

En la acuicultura, para tratar enfermedades infecciosas se adicionan antibióticos en el alimento o se administran directamente en el agua (Monteiro *et al.*, 2015), que luego son excretados al medio ambiente en la orina o heces, además, el alimento medicado no consumido se mantiene en el agua o permanece en el fondo del estanque de cultivo (Barattini, 2012) y por el tipo de crianza de truchas en jaulas, ubicadas en ambientes continentales, donde se realiza la pesca artesanal de mariscos y peces silvestres destinadas al consumo humano, se espera que estas especies consuman el alimento no ingerido por los peces cultivados, así, diferentes especies de peces silvestres podrían estar siendo expuestos a antibióticos (Fortt *et al.*, 2007), afectando negativamente el ambiente acuático.

Como suele ser el caso con los patógenos bacterianos en peces, el tratamiento posterior a la infección se basa principalmente en el uso de antibióticos para su control, no obstante, la mala práctica de estos, generan a largo plazo la disminución de la eficacia de estos y por ende resistencia bacteriana (Kumar *et al.*, 2015). Para controlar a *Y. ruckeri* se pueden usar antibióticos vía oral o intraperitoneal como la oxitetraciclina y sulfametazina, individualmente o en combinación, sin embargo, se han documentado

casos en que la yersiniosis no mostró reacción positiva ante este tipo de tratamiento, indicando resistencia antibiótica (Wiens *et al.*, 2006; Wiens y Vallejo, 2010). Se ha demostrado que esta bacteria tiene sensibilidad al florfenicol, amoxicilina, ácido oxolínico, sulfadiazina en combinación con trimetoprim (Kumar *et al.*, 2015). En nuestro país no se ha detectado la presencia de genes de resistencia antimicrobiana (Mesías, 2019a).

Se ha estudiado que el uso de probióticos, como *Bacillus subtilis*, *B. licheniformis*, *Carnobacterium maltaromaticum* y *C. divergens*, otorga una mejor resistencia a la yersiniosis (Raida *et al.*, 2003; Kim y Austin, 2006). Adicionalmente se han desarrollado vacunas, como una manera de prevención frente a esta bacteria que, por lo general, son suspensiones de bacterias inactivadas con formol pertenecientes al serotipo 1, administradas por vía oral o por baños de inmersión (Raida y Buchmann, 2008; Tinsley, 2010; Kumar *et al.*, 2015). En nuestro país no se ha desarrollado una vacuna comercial probablemente se deba ello, a la falta de información sobre este microorganismo (Fernández-Espinel *et al.*, 2022).

#### Métodos de caracterización molecular

##### *Técnicas de genotipificación*

La biología molecular ha ganado mayor terreno en la actualidad y el desarrollo de métodos de tipificación basados en PCR y el secuenciamiento han permitido aumentar la precisión de los estudios de variabilidad genética microbianos (Calvez *et al.*, 2015). Dichos métodos de tipificación molecular tienen como objeto comparar la composición

de los ácidos nucleicos de dos o más microorganismos, así se puede reconocer la relación entre aislamientos vinculados epidemiológicamente y derivados recientes de un precursor común, al mismo tiempo que son capaces de diferenciar aislamientos no relacionados (Borraz, 2006).

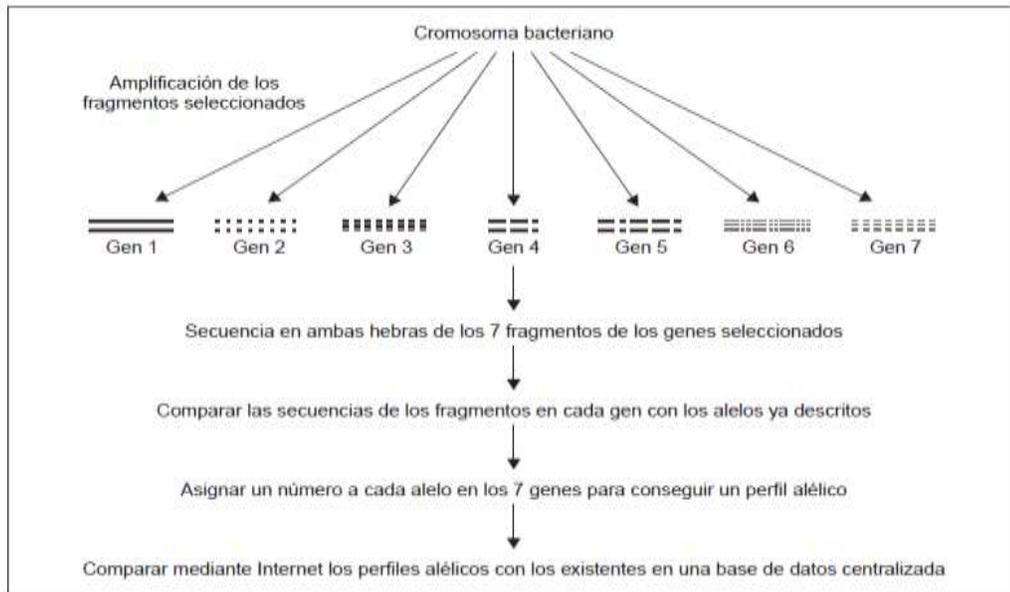
Entre estos métodos de tipificación molecular se destacan el Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP), Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus (ERIC-PCR), Repetitive Extragenic Palindromic elements (REP-PCR), Extragenic Repeating Elements PCR (BOX-PCR) también el análisis electroforético de múltiples locus enzimáticos (MLEE), el polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados (AFLP), electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) y la Tipificación de Secuencias Multilocus (MLST) (Bueno *et al.*, 2012; Nakano *et al.*, 2017). La mayoría de las técnicas mencionadas están basadas en patrones de bandas en gel de agarosa y su posterior comparación en formato de imagen haciendo un proceso complejo de la estandarización del método y la implantación idéntica de la metodología para el análisis e intercambio de imágenes (Canhos *et al.*, 2004; Swaminathan *et al.*, 2001).

#### *Multilocus Sequence Typing (MLST)*

Esta técnica fue desarrollada por Maiden *et al.*, (1998) para caracterizar las infecciones meningocócicas y tras el paso de los años, ha sido adoptada para estudiar muchos otros patógenos bacterianos. Es considerada como la técnica Gold-standard para evaluar la diversidad genética de bacterias ya que es precisa, reproducible y confiable, además de

establecer relaciones filogenéticas entre miembros de una misma especie (Maiden *et al.*, 1998; Bastardo *et al.*, 2012).

La ejecución de esta técnica requiere la amplificación de fragmentos de ADN, genes housekeeping (genes de mantenimiento), por Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) seguida del secuenciamiento de estos (Maiden *et al.*, 1998) donde las diferencias en las secuencias de ADN definen el perfil alélico para cada aislado, conocido como el tipo de secuencia o sequence type (ST) aunque tiene como desventaja ser una técnica costosa, laboriosa y que el proceso de selección de los genes de mantenimiento debe ser realizado para cada especie bacteriana de forma individual, los datos que genera de las secuencias, se almacenan y pueden ser comparadas con una base de datos central a través de internet, en contraste con la mayoría de los procedimientos de tipificación que implican la comparación de tamaños de los fragmentos de ADN en geles de agarosa (Vásquez y Berrón, 2004, Nakano *et al.*, 2017) (Figura 1).



Perfil alélico								
Cepa 1	1	5	3	7	2	8	4	◆ ST 34
Cepa 2	11	15	30	12	22	11	20	♣ ST 2
Cepa 3	6	15	9	1	22	11	20	⊗ ST21
Cepa 4	9	10	1	19	12	18	14	⊖ ST11
Cepa 5	11	15	30	12	22	11	20	♣ ST 2
Cepa 6	1	5	3	7	2	8	4	◆ ST 34
Cepa 7	20	11	29	9	21	13	11	▼ ST 6
Cepa 8	9	15	13	27	22	18	14	♣ ST 66
Cepa 9	20	11	29	9	21	13	11	▼ ST 6
Cepa 10	11	15	30	12	22	11	20	♣ ST 2
	gen1	gen2	gen3	gen4	gen5	gen6	gen7	

Fuente: Vásquez y Berrón, 2004

**Figura 1.** Resumen de la realización de la técnica MLST.

Para la realización del MLST en *Y. ruckeri*, se ha estandarizado el análisis de seis genes de mantenimiento: glutamina sintetasa (*glnA*), ADN girasa subunidad B (*gyrB*), proteína de shock térmico 60 (*Y-HSP60*), Proteína de reparación y recombinación de ADN (*recA*), proteína de shock térmico 40 (*dnaJ*) y deshidrogenasa aspartoquinasa-homoserina (*thrA*), que fueron seleccionados a partir de estudios publicados previamente de data de MLST para otras especies de *Yersinia* (Kotetishvili *et al.*, 2005; Tinsley *et al.*, 2009; Hurst *et al.*, 2011). Estos genes codifican proteínas que realizan funciones básicas para el mantenimiento de la viabilidad celular por lo que en ellos la tasa de mutación es muy baja y representan unos indicadores estables en el tiempo (De las Rivas, 2007) proporcionando información sobre el grado de diversidad genética y la estructura poblacional de esta bacteria (Calvez *et al.*, 2015).

Se ha comprobado la efectividad de esta técnica cuando fue utilizada para la identificación de diferentes microorganismos como bacterias aerobias (Ahmed *et al.*, 2006; De las Rivas *et al.*, 2007), anaerobias (Nakano *et al.*, 2017; Szaluś-Jordanow *et*

*al.*, 2018), en la caracterización molecular de parásitos (Díaz-Sánchez *et al.*, 2018) y en microorganismos de ambientes intrahospitalarios (Borraz, 2006). En acuicultura, en China, se utilizó eficientemente para dilucidar la resistencia antimicrobiana y virulencia de *Vibrio parahaemolyticus* y las relaciones genéticas y evolutivas entre los aislamientos de este patógeno transmitido por alimentos (Jianga *et al.*, 2019). También, ha sido aplicada en la comparación de genomas de *Flavobacterium psychrophilum* relacionando sus orígenes y perfiles MLST (Duchaud *et al.*, 2018).

Bastardo *et al.*, (2012) identificaron treinta tipos de secuencia (ST) diferentes, 21 de los cuales estuvieron representados por un solo aislado, evidenciando una alta diversidad genética, esta información nos brinda datos sobre la estructura de la población de *Y. ruckeri* y sobre los mecanismos genéticos detrás de la aparición de linajes clonales que se propagan con éxito a nivel mundial, además, sugieren que la estructura de la población de *Y. ruckeri* sigue un modelo epidémico de expansión clonal, con clones bien adaptados que pueden distribuirse ampliamente.

Calvez *et al.*, (2015) usando PFGE en asociación con MLST demostraron un enfoque interesante para evaluar la diversidad de la población bacteriana, donde los pulsotipos y los ST parecen estar asociados con una especie de pez huésped. Esta asociación indicaría una especialización adaptativa y algunos autores han sugerido que el desarrollo alternativo de nichos ha jugado una mayor importancia en la difusión y evolución de *Y. ruckeri* que en las rutas normales de transmisión. El hecho de que la mayoría de los aislados de diferentes orígenes geográficos tengan el mismo pulsotipo

refleja la importancia de los movimientos de peces cultivados entre regiones más que una evolución que depende del área geográfica, parece que diferentes presiones de selección, nichos ecológicos específicos, movimientos de peces de cultivo y orígenes geográficos, desempeñan un papel en la difusión y evolución de *Y. ruckeri*.

Para un análisis más completo de los posibles patrones de descenso evolutivo, se propusieron e implementaron algoritmos que permiten la agrupación de STs en complejos clonales (CC), definiendo estos como aislados independientes que comparten alelos idénticos al menos en seis o más loci, donde los CC toman el nombre de acuerdo al ST fundador (Jolley y Maiden, 2014).

Uno de estos algoritmos es el Based Upon Related Sequence Types (BURST), diseñado para su uso en datos MLST microbianos que examina las relaciones dentro de los complejos clonales donde los aislamientos se agrupan en función del número de diferencias de locus dentro de sus perfiles, un genotipo fundador putativo puede identificarse en función de su número de variantes de locus único (single locus variant SLV) y doble (double locus variant DLV). Si se identifica un tipo ancestral para un grupo, se muestra una vista de resumen, donde una serie de círculos concéntricos rodearán el tipo ancestral, cuyo número de ST tendrá un asterisco junto a él. El círculo central contiene ST que varían en un solo locus (SLV) y el exterior contiene ST que varían en dos locus (DLV). Fuera de este círculo hay ST satélites que varían en más de dos loci del tipo central, denominados Singleton. Los ST pueden estar vinculados por líneas que muestran si son SLV o DLV de otros ST. Los enlaces DLV no se muestran

entre dos SLV del tipo ancestral, ya que todos serán DLV (u ocasionalmente SLV) entre sí (Jolley *et al.*, 2001; Feil *et al.*, 2004).

Feil *et al.*, (2004) generaron una nueva implementación del programa BURST, llamado eBURST y por medio de esta actualización, se han descrito hasta tres complejos clonales (CC) para *Y. ruckeri* siendo los CC1, CC2 y CC3, el CC1 se ha relacionado con brotes en el cultivo de salmónidos en el mundo desde 1970, mientras que el CC2 se ha restringido geográfica y temporalmente a USA, Dinamarca y Canadá de 1980 a 1987 (Bastardo *et al.*, 2012) y el CC3 fue descrito por primera por Calvez *et al.*, (2015), este complejo incluía dos STs, ST 32 y ST 34 que haciendo una variación en los criterios del software, se vincularon los ST con cuatro perfiles alélicos y se observaron conexiones entre los complejos clonales uno, dos y tres y también entre los dos singletons hallados en su estudio; sin embargo aún no se ha esclarecido algún tipo de relación a este complejo.

Con la creciente disponibilidad de datos MLST que proporciona esta técnica disponible en la web, el software Sequence type analysis and recombinational tests (START) permite describir y analizar estos conjuntos de datos y usa múltiples técnicas analíticas en una interfaz intuitiva y fácil de usar para los sistemas operativos de Windows (Jolley *et al.*, 2001).

START incluye una serie de pruebas que se pueden utilizar para investigar el alcance y la importancia de la recombinación, como el Índice de Asociación (IA), el cual

reporta el desequilibrio del ligamiento entre alelos y por extensión da una indicación de los eventos de recombinación. Si  $IA = 0$ , no refleja ninguna asociación entre los loci de genes (equilibrio de enlace), con una asociación aleatoria de alelos, por lo que los eventos de recombinación son responsables de la diversidad de la estructura de la población (= población panmítica). Por el contrario, si  $IA \neq 0$ , los loci muestran un desequilibrio de ligamiento con una asociación preferencial de alelos, por lo que los eventos de recombinación están ausentes o son raros y la evolución clonal es responsable de la estructura de la población (= población clonal) (Smith *et al.*, 1993).

A su vez, cuenta con funciones de resumen de datos, las frecuencias de alelos y perfiles muestran la abundancia relativa de cada secuencia de alelo o ST dentro del conjunto de datos; frecuencia de polimorfismo, produce una secuencia de genes y una tabla que muestra las posiciones de todos los sitios polimórficos dentro del conjunto de datos y cuando estos son únicos, resaltan el nombre aislado y/o el número de alelo correspondiente, finalmente, las funciones de uso de codones y contenido de GC producen tablas de frecuencia apropiadas desglosadas por locus (Jolley *et al.*, 2001).

Contar con la información generado por el MLST es de utilidad para futuros trabajos que estudien las relaciones evolutivas y epidemiológicas entre cepas y para una comparación inequívoca de datos generados por laboratorios de todo el mundo (Bastardo *et al.*, 2012).

#### IV. JUSTIFICACIÓN

El apogeo de la producción de trucha en nuestro país se debe a las condiciones medioambientales de las zonas altoandinas, topográficas adecuadas y los recursos hídricos en óptimas condiciones, además, las características propias de esta especie han favorecido dicho crecimiento, concentrándose esta actividad en los departamentos de Puno, Junín, Huancavelica, Pasco y Lima, representando los dos primeros departamentos alrededor del 87% de la producción nacional (PRODUCE, 2010b).

Sin embargo, debido a su incremento en la producción existe una mayor probabilidad de entrada de diferentes microorganismos que pueden mermar dicha producción. En nuestro país, uno de los agentes causales más importante es *Yersinia ruckeri*, bacteria responsable de pérdidas económicas desde su primer aislamiento en nuestro país, teniendo diferentes grados de mortalidad, entre el 10-15% de esta en la población de peces (Sierralta *et al.*, 2013), además, por su efectividad, disponibilidad y bajo costo, el control frente a esta bacteria se realiza mediante el uso indiscriminado de antibióticos, propiciando así futuros casos de resistencia antimicrobiana (Cabello, 2006).

En la actualidad, existen diversas técnicas de tipificación, cada una con propiedades diferentes, destacándose el MLST, ya que posee una alta reproducibilidad, combina la secuenciación y bioinformática y es de fácil estandarización, permitiendo realizar comparaciones entre aislados de diferentes orígenes y determinar sus relaciones

filogenéticas; también está diseñada para el seguimiento e identificación de clones y/o líneas clonales y es un buen marcador molecular epidemiológico a largo plazo, los datos que se obtienen por medio de esta técnica son depositados en una base de datos pública en Internet que pueden ser usados y actualizados por productores, investigadores y autoridades competentes (Vázquez y Verrón, 2004; Fandiño, 2017)

Con ayuda de las técnicas de tipificación molecular, se podrá determinar con mayor precisión la identidad, origen y distribución de *Y. ruckeri*, ya que estudios previos han sugerido una influencia de origen geográfico, donde parece que diferentes presiones de selección, nichos ecológicos específicos y movimientos de peces de cultivos, juegan un papel en la difusión y evolución de *Y. ruckeri* (Calvez *et al.*, 2015), valiéndonos de esta información, se podrá elaborar programas efectivos de sanidad, identificar cepas endémicas de las principales zonas de producción de Perú y profundizar en estudios epidemiológicos que puedan ser aplicados en la elaboración de una vacuna eficaz. Finalmente, su implementación en centros de control sanitario permitirá una mejor toma de decisiones en la prevención de la diseminación de esta y otras enfermedades bacterianas.

Por lo tanto, estudio tiene el propósito de describir la variabilidad genética de cepas patógenas de *Y. ruckeri*, a las cuales previamente se ha determinado su perfil de resistencia antimicrobiana y genes de resistencia, dichas cepas serán identificadas fenotípicamente por medio de pruebas bioquímicas de biotipaje y molecularmente mediante la técnica MLST.

## V. OBJETIVOS

### *Objetivo general*

- Caracterizar genéticamente cepas patógenas de *Yersinia ruckeri* aisladas de centros de crianza de truchas arcoíris procedentes de la Sierra Central del Perú utilizando la técnica de Tipificación Multilocus de Secuencias (MLST).

### *Objetivos específicos*

- Determinar el biotipo de cepas patógenas de *Y. ruckeri*.
- Determinar la variabilidad genética mediante el secuenciamiento de genes de mantenimiento *glnA*, *gyrB*, *recA*, *dnaJ*, *thrA* e Y-HSP60 de cepas patógenas de *Y. ruckeri* provenientes de centros de crianza de truchas arcoíris de la Sierra Central del Perú.
- Establecer relaciones genéticas entre cepas patógenas de *Y. ruckeri* provenientes de Perú y de otros países mediante comparación con la base de datos del PubMLST.

## VI. MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. Lugar de Estudio

La reactivación, identificación bioquímica y molecular de cepas de *Y. ruckeri*, se realizó en el Laboratorio de Parasitología Animal de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima - Perú.

### 2. Tamaño de muestra

Se trabajaron con 16 cepas provenientes de diferentes piscigranjas de los departamentos de Lima (4), Junín (9) y Ancash (3) del Perú que forman parte del cepario del Laboratorio de Parasitología Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, dichas cepas de *Y. ruckeri* han sido aisladas de truchas arcoíris con signos clínicos de yersiniosis (melanosis, nado errático, exoftalmia, hemorragias en boca, ojos y piel, entre otros). Como parte de un estudio previo, dichas cepas fueron tipificadas molecularmente mediante las técnicas de RAPD-PCR y ERIC-PCR, determinándose así la existencia de apenas un solo genotipo (Mesías *et al.*, 2019), también se cuenta con datos de resistencia a antimicrobianos, estudios de genes de resistencia, además de proceder de centros de crianza representativos de la producción truchícola (ANEXO I Cuadro 7).

### 3. Recolección y procesamiento de muestras

#### 3.1 Reactivación de cepas

Se realizó la reactivación de las 16 cepas patógenas, las cuales fueron conservadas a -80°C, luego de descongelarlas pasaron a caldo de tripticasa de soya (TSB) e incubadas a 25°C por 48 horas, luego con un asa de siembra se inocularon en placas de TSA y

fueron incubadas a las mismas condiciones, luego se realizó la identificación por tinción Gram y pruebas bioquímicas, posteriormente se realizó la extracción de ADN para la confirmación molecular de dichas cepas (Davies y Frerichs, 1989 y Bueno, 2012) (ANEXO I.I).

### 3.2 Determinación del biotipo

Tras la identificación por pruebas bioquímicas y moleculares, se procedió a realizar la determinación del biotipo de cada una de estas. Para ello, se evaluó la motilidad y su capacidad de hidrólisis del Tween 20 y Tween 80.

Para determinar la motilidad de las cepas se utilizó el medio SIM (Sulfuro Indol Movilidad) haciendo una punción profunda y recta en el centro del tubo, incubándose a una temperatura de 25°C por 24 – 48 horas, además se reconfirmó la motilidad por medio de observación directa al microscopio. Para la hidrólisis del Tween 20 y del Tween 80, se preparó el medio Agar base para Tween, luego cada cepa fue sembrada por estriado en este medio para ver la formación de un halo de precipitación de cristales calcio en ambos sustratos, teniendo como un control positivo una cepa *de Aeromonas salmonicida*, posteriormente se llevaron a incubación a 22°C por 24 – 72 horas, transcurrido este tiempo se procedió con la lectura de los resultados (Sierra,1957, López, 2012) (ANEXO I.II).

### 3.3 Tipificación molecular de cepas de *Yersinia ruckeri*

#### 3.3.1 Extracción de ADN

Se realizó la extracción de ADN a las 16 cepas mediante el kit innuPREP bacterial DNAkit, Analytik Jena (Alemania), según las indicaciones del fabricante (ANEXO I.III). El ADN obtenido fue cuantificado en equipo nanodrop (Thermo Fisher, USA) a

260/280 nm para determinar su concentración y pureza, luego se conservaron a una temperatura de - 20°C hasta la realización del PCR.

Tras tener problemas en la estandarización de dos genes de mantenimiento, se decidió descartar posible contaminación entre las cepas estudiadas, por ello se realizó la confirmación de *Y. ruckeri* mediante el gen 16s ARNr.

### 3.3.2 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Se realizó la confirmación del gen 16s ARNr mediante PCR convencional a cada una de las cepas, según el protocolo Seong *et al.*, (2010). Brevemente, en un volumen final de 25 µL, utilizando GoTaq Green Master mix 2X (Promega, USA), 0.4 µM por cada primer y 1 µL de ADN molde (50 ng) fueron colocados en el termociclador (Thermo MiniAmp, USA) siguiendo las condiciones: desnaturalización inicial a 95°C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos de 94°C por 30 seg., 58 °C por 30 seg, 72°C por 40 seg. y una extensión final a 72°C por 10 minutos. Los productos se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1% en buffer TAE 1X, sometidos a campo eléctrico de 70 V/cm durante 80 minutos y se utilizó 1KB DNA Ladder RTU (GeneDireX, USA) como marcador de peso molecular, luego el gel fue teñido con 0.5 µg/mL de bromuro de etidio por 15 minutos. Al término de la electroforesis se visualizaron y compararon los amplificados en un transiluminador (DNR Bio-Imaging Systems, USA). La presencia de una banda clara de 1505 bp confirmó el resultado, se utilizó como control negativo agua ultra pura libre de DNAsas (AppliChem, Alemania) y como control positivo a *Y. ruckeri* ATCC 29473. Confirmado el resultado, estos se enviaron a purificación y secuenciamiento a Macrogen Inc., (Korea).

### 3.3.3 Amplificación de los genes de mantenimiento

16 cepas fueron procesadas según el protocolo de la técnica de MLST descrito por Bastardo *et al.*, (2012) con algunas modificaciones. Brevemente, seis genes de mantenimiento referenciados en el sitio web de MLST (<https://pubmlst.org/yruckeri/>): *glnA*, *gyrB*, *recA*, *dnaJ*, *thrA* e Y-HSP60 fueron amplificados. La reacción de PCR se realizó en 25  $\mu$ L de volumen final, utilizando GoTaq Green Master mix 2X (Promega, USA), 0.4  $\mu$ M por cada primer, 1  $\mu$ L de ADN molde (50 ng), la amplificación por PCR convencional se llevó a cabo en el termociclador (Thermo MiniAmp, USA) con primers descritos previamente por Kotetishvili *et al.*, 2005, Tinsley *et al.*, 2009 y Hurst *et al.*, 2010 (Cuadro 8), excepto para el gen *thrA*, cuyos primers fueron tomados de Calvez *et al.*, 2015. Las condiciones del PCR fueron 94 °C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos a 94 °C por 45 segundos, 51 °C por 45 segundos y 72 °C por 1 minuto y la elongación final de 72 °C por 5 minutos, excepto que la temperatura del annealing para el gen *gyrB* fue de 65 °C.

Los productos del PCR se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1% en buffer TAE 1X, corridas a 70 V/cm durante 80 minutos, luego el gel fue teñido con 0.5  $\mu$ g/mL de bromuro de etidio por 15 minutos. Los productos fueron visualizados bajo luz ultravioleta en un transiluminador (DNR Bio-Imaging Systems, USA) y se utilizó como referencia de tamaño el marcador de peso molecular 1 KB DNA Ladder (Thermo Scientific, USA), como control negativo se empleó agua libre de nucleasas (AppliChem, Alemania) y como control positivo a *Y. ruckeri* ATCC 29473.

**Cuadro 8.** Secuencias de primers del gen 16s ARNr y de los genes de mantenimiento para *Y. ruckeri* que se utilizaron en este estudio.

Gen	Primers	Amplicón	Temperatura de alineamiento	Referencia
16S-rDNA	27F: AGRGTTTGATCMTGGCTCAG 1492R: GGYTACCTTGTTACGACTT	1 505 bp	55°C	Seong <i>et al.</i> , (2010)
<i>glnA</i>	F: CGATTGGTGGCTGGAAAGGC R: TTGGTCATRGTRTTGAAGCG	530 bp	51 °C	Kotetishvili <i>et al.</i> , (2005)
<i>gyrB</i>	F: CGGCGGTTTGCA YGGY GTRGG R: CAGSGTRCGRGTCATYGCCG	545 bp	65°C	Kotetishvili <i>et al.</i> , (2005)
<i>recA</i>	F: GGGCCAAATTGAAAARCARTTCGG R: CGCCRATYTTTCATRCGRATYTTGGT	560 bp	51°C	Kotetishvili <i>et al.</i> , (2005)
<i>dnaJ</i>	F: ATGGCGAAGAGAGACTATTAC R: AAGCTTTTAGAGCGTGGGTGT	1024 bp	51°C	Hurst <i>et al.</i> , (2010)
<i>thrA</i>	F: TGCTCCCATCCACAGTGC R: GTCATCACAAATCCTGCC	693 bp	51°C	Calvez <i>et al.</i> , (2015)
Y-HSP60	F: GACGTNGTAGAAGGTATGYAG R: CGCCGCCAGCCAGTTTAGC	565 bp	51°C	Kotetishvili <i>et al.</i> , (2005)

F: Forward, R: Reverse

#### 3.3.4 Secuenciación

Los productos de amplificación del gen 16s ARNr y de los 6 genes de mantenimiento se enviaron a MacroGen Inc. (Korea) para su purificación y posterior secuenciamiento por el método de Sanger, se adjuntaron los primers en ambas direcciones.

#### 4. Plan de análisis de datos

##### 4.1 Análisis bioinformático

Realizado el secuenciamiento, se obtuvieron los cromatogramas del gen 16S ARNr y de cada gen de mantenimiento, se evaluó la calidad de estos mediante su visualización con el software Chromas v. 2.6.6, evaluando la altura y ancho de la curva del nucleótido en toda la secuencia. Se realizó la edición, depurando el ruido y multialineación de las secuencias obtenidas con el software MEGA v. 10.6.2. dichas secuencias obtenidas fueron comparadas individualmente con los de la base de datos GenBank usando el software BLAST del National Center for Biotechnology Information – NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) con el fin de verificar la similitud del hallado.

##### 4.2 Genotipificación por MLST

Las secuencias editadas se compararon con la base de datos en el sitio PubMLST (<https://pubmlst.org/yruckeri/>) de la Universidad de Oxford para asignar el número de alelo de cada gen, con esto, obtener un perfil alélico de los 6 genes de mantenimiento, finalmente con el perfil, obtener las secuencias tipo (ST) que corresponde. Además, fueron incluidos los perfiles y sus correspondientes STs de 8 cepas de referencia y 9 cepas de la base de datos del PubMLST para la validación de este método (Bastardo, *et al.*, 2012; Calvez, *et al.*, 2015) (ANEXO II cuadro 9).

##### 4.3. Asignación de los complejos clonales

Se utilizó el software BURST, algoritmo de agrupamiento diseñado para su uso en datos MLST microbianos que permitió ver la relación entre los ST, pudiendo hacer su agrupamiento en complejos clonales (CC). El análisis se realizó con la configuración

predeterminada donde STs que difieren en solo uno de los siete loci MLST, se denominan variantes de locus único (SLV) y los que difieren en dos de los siete loci serán denominados variantes de doble locus (DLV), un CC este compuesto por al menos dos ST con SLV, en el que cada ST comparte al menos 5 de los seis loci en común con al menos otro miembro del complejo, un singleton es un ST no incluido en un CC. (Jolley *et al.*, 2001, Feil *et al.*, 2004).

#### 4.4 Medición de la clonalidad

Se midió el nivel de recombinación entre las secuencias calculando el índice de asociación ( $I_A$ ) mediante el software Sequence type analysis and recombinational test START2 v.1.0.5. Si el índice es significativamente diferente de cero, se produce más recombinación en la población. Se compara la información de las secuencias para cada ST de la base de datos del PubMLST con la obtenida en el secuenciamiento de los 6 genes de mantenimiento (Jolley *et al.*, 2001).

#### 4.5 Análisis de las secuencias

Los siguientes análisis se realizaron en todos los aislamientos y todos los loci usando el software START2 v.1.0.5: Porcentaje contenido de G + C, frecuencia alélica y número de sitios polimórficos.

#### 4.6 Análisis filogenético

Se empleó el software START2 v.1.0.5 para construir un árbol filogenético a partir de las secuencias concatenadas de los perfiles alélicos de las 15 cepas usadas en este estudio, 8 cepas de referencia y 9 cepas de la base de datos pubMLST siguiendo el modelo UPGMA (unweighted-pair group method using average linkages) con 1000

réplicas (bootstrap) el cual se basa en el agrupamiento de parejas más similares y calcula el promedio de las distancias entre ellas y el resto de las secuencias para la construcción del árbol (Bastardo *et al.*, 2012).

Finalmente, los datos obtenidos fueron presentados y analizados a través de estadística descriptiva mediante tablas de distribución, histograma y dendograma.

#### 5. Consideraciones éticas

El estudio fue exonerado por el Comité Institucional de Ética en Humanos o en Animales de la Universidad Peruana Cayetano Heredia – UPCH con código CAREG-ORVEI-029-20.

## VII. RESULTADOS

### 1. Reactivación de cepas

Se observaron colonias semejantes a las reportadas para *Y. ruckeri*, con características de color blanco cremoso, redondas con diámetros de 1 a 2  $\mu\text{m}$ , lisas, bordes completos y ligeramente convexas, que, a la tinción Gram se observaron bacilos cortos Gram negativos y en su identificación bioquímica fueron oxidasa negativos, catalasa positivos, TSI: K/A, citrato positivo, caldo urea negativo, SIM (sulfuro negativo, indol negativo y motilidad variable) y LIA positivo (ANEXO III Figura 2).

### 2. Biotipos de *Yersinia ruckeri*

Se procedió a determinar si las 16 cepas pertenecían al BT1 o BT2 (ANEXO III Figura 3, 4 y 5). Se determinó que 6 del total de 16 cepas (37.5%) identificadas como *Y. ruckeri*, hidrolizaron Tween 20 y Tween 80 ya que se apreciaba la formación del halo de precipitación de cristales de calcio en ambos medios, presentaban motilidad en el medio SIM y al examen directo, además de ausencia de producción de indol y  $\text{H}_2\text{S}$ , permitiendo agruparlas dentro del BT1, el resto de las cepas (10, 62.5%) no evidenciaron un halo de precipitación ni evidenciaron motilidad, pudiendo agruparlas dentro del BT2 (Cuadro 10) (ANEXO III cuadro 10). Teniendo así, que ambos biotipos esta presentes en los departamentos de Lima (Canta), Ancash (Huaraz) y Junín (Jauja, Concepción y Huancayo). Solo en el departamento de Junín, se hace evidente la presencia únicamente del BT1 en la provincia de Jauja y la presencia única del BT2 en Concepción y Huancayo.

En este estudio solo pudo evaluarse los biotipos de *Y. ruckeri* para 16 cepas provenientes del cepario, mas se utilizaron cepas representativas de los serotipos O1, O1a, O2, O2b, O3 y los dos biotipos existentes (Bastardo *et al.*, 2012; Calvez *et al.*, 2015), siendo el BT1/serotipo O1 el predominante; el BT2 estaba presente solo en las cepas del serotipo O1.

**Cuadro 10.** Determinación de biotipos de cepas de *Y. ruckeri* en base a los medios SIM y agar base Tween.

Cepa	Departamento	Provincia	Determinación del biotipo
1	Junín	Concepción	2
2	Lima	Canta	1
3	Lima	Canta	1
4	Junín	Jauja	1
5	Junín	Jauja	1
6	Junín	Jauja	1
7	Áncash	Huaraz	2
8	Áncash	Huaraz	2
9	Junín	Concepción	2
10	Junín	Huancayo	2
11	Junín	Huancayo	2
12	Lima	Canta	2
13	Lima	Canta	2
14	Junín	Huancayo	2
15	Ancash	Huaraz	1
16	Junín	Concepción	2

+: Positivo, -: Negativo

### 3. Tipificación molecular de cepas

Finalizada la extracción de ADN de las 16 cepas, se realizó la amplificación por PCR convencional para la confirmación del gen 16S ARNr a cada una de ellas usando primers universales, obteniendo un fragmento esperado de 1505 bases pares en cada cepa (ANEXO III Figura 6).

Los cromatogramas obtenidos de la secuenciación del gen 16S ARNr de las 16 cepas fueron depurados y alineados mediante el software MEGA v.11.0.8. Luego, se compararon con la base de datos del GenBank mediante el programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), donde las 16 cepas obtuvieron la mayor similitud 99% con *Y. ruckeri* y un E - value de 0.0, considerando así que el alineamiento y las amplificaciones fueron exitosas (ANEXO III Figura 7).

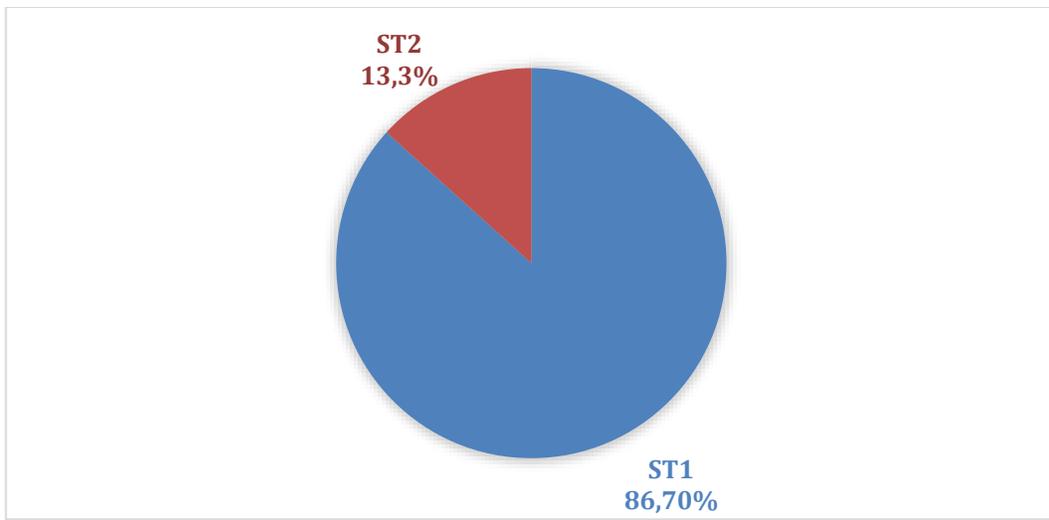
### 4. Amplificación de los genes de mantenimiento por PCR

El estudio de MLST se desarrolló a partir de la amplificación de 6 genes de mantenimiento para *Y. ruckeri* (*glnA*, *gyrB*, *recA*, *dnaJ*, *thrA* e *Y-HSP60*) según lo descrito por Bastardo *et al.*, (2012) (ANEXO III Figura 8), posteriormente, los amplicones fueron enviados a purificación y secuenciación.

### 5. Genotipificación por MLST

Los resultados se indican en el Cuadro 11, donde se obtuvo las secuencias tipo (ST), solo se consideraron 15 cepas en el estudio debido a un error en el secuenciamiento de una de las cepas tras una posible contaminación. El número de alelo, el perfil alélico de los seis genes de mantenimiento y sus correspondientes STs, se observa en el ANEXO III Cuadro 11.

Se incluyó información de cepas de referencia y de la base de datos del pubMLST siendo n=32. En total se identificaron 8 diferentes STs entre las 32 cepas usadas, el ST más frecuente es el ST1 agrupando 20 cepas (62,50%) que pertenecen a UK, USA, Portugal y Perú (cepas utilizadas en este estudio), seguido del ST4 con 3 cepas (9,38%) provenientes de Dinamarca, USA y de origen desconocido, el resto de cepas pertenecen a ST2 (n=2, 6,25%), ST5 (n=2, 6,25%), ST6 (n=2, 6,25%), ST3 (n=1, 3,13%), ST7 (n=1, 3,13%) y ST8 (n=1, 3,13%) pertenecen a Perú, Dinamarca, Finlandia y USA (Cuadro 11) (ANEXO. Solo se identificaron 2 STs diferentes entre las 15 cepas estudiadas (ST1 y ST2), 3 STs diferentes entre las 8 cepas de referencia (ST6, ST7 y ST8); 3 STs diferentes en las cepas de la base de datos (ST3, ST4 y ST5) (Figura 9 y ANEXO III Figura 12).



Fuente: Elaboración propia

**Figura 9.** Porcentaje de Secuencias Tipo (ST) encontradas en 15 cepas de *Y. ruckeri* usadas en este estudio.

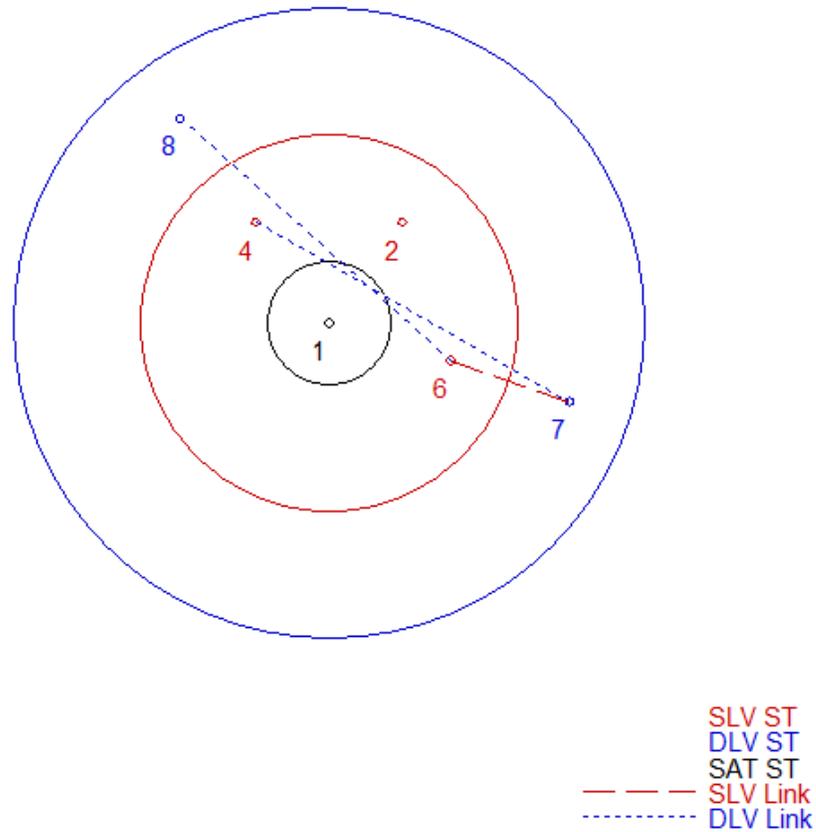
Se evidencio relación entre los STs encontrados y los biotipos entre las cepas usadas en este estudio, el ST2 agrupó cepas pertenecientes solo al BT1; el ST1 agrupó a las

cepas pertenecientes a ambos biotipos. Entre las cepas de referencia y las cepas de la base de datos también se evidencio diferentes STs que en su mayoría pertenecían al BT1.

A su vez, se evidencio relación entre los STs y el área geográfica de aislamiento de las cepas utilizadas, en Ancash se halló la presencia del ST, en Lima y Junín se halló la presencia de ambos STs, ST1 y ST2.

#### 7. Asignación de los complejos clonales (CC)

Los 8 STs identificados mediante el análisis del BURST utilizando los criterios estrictos predeterminados (5/6 alelos compartidos), en total se generó un solo CC, el CC-ST1 está compuesto por ST1, ST2, ST4, ST6, ST7, ST8 (Figura 10) que representan 29 aislamientos y se definió al ST1 como el fundador, el cual posee 3 SLV y 2 DLV; los STs que no formaron parte de un CC (singleton) fueron: ST3 y ST5.



8: ST8, 7: ST7, 6: ST6, 4: ST4, 2: ST2, 1: ST1, SLV: Single locus variants, DLV: Double locus variants, SAT: Satellite ST

**Figura 10.** Análisis BURST de los STs encontrados para este estudio.

**Cuadro 11.** Secuencias tipo (ST) encontradas utilizando MLST, biotipos y complejos clonales en cepas de *Y. ruckeri* usadas en este estudio.

<b>Código</b>	<b>ST*</b>	<b>BT**</b>	<b>CC***</b>	<b>Origen</b>	<b>Año</b>	<b>País</b>	<b>Referencia</b>
1	1	2	1	<i>O. mykiss</i>	2018	Perú	Mesías <i>et al.</i> , 2019
2	2	1	1	<i>O. mykiss</i>	2018	Perú	Mesías <i>et al.</i> , 2019
3	1	1	1	<i>O. mykiss</i>	2018	Perú	Mesías <i>et al.</i> , 2019
4	1	1	1	<i>O. mykiss</i>	2018	Perú	Mesías <i>et al.</i> , 2019
5	1	1	1	<i>O. mykiss</i>	2018	Perú	Mesías <i>et al.</i> , 2019
6	2	1	1	<i>O. mykiss</i>	2018	Perú	Mesías <i>et al.</i> , 2019
7	1	2	1	<i>O. mykiss</i>	2018	Perú	Mesías <i>et al.</i> , 2019
8	1	2	1	<i>O. mykiss</i>	2018	Perú	Mesías <i>et al.</i> , 2019
9	1	2	1	<i>O. mykiss</i>	2018	Perú	Mesías <i>et al.</i> , 2019
10	1	2	1	<i>O. mykiss</i>	2018	Perú	Mesías <i>et al.</i> , 2019
11	1	2	1	<i>O. mykiss</i>	2018	Perú	Mesías <i>et al.</i> , 2019
12	1	2	1	<i>O. mykiss</i>	2018	Perú	Mesías <i>et al.</i> , 2019
13	1	2	1	<i>O. mykiss</i>	2018	Perú	Mesías <i>et al.</i> , 2019
14	1	2	1	<i>O. mykiss</i>	2018	Perú	Mesías <i>et al.</i> , 2019
16	1	2	1	<i>O. mykiss</i>	2018	Perú	Mesías <i>et al.</i> , 2019
37	1	1	1	<i>O. mykiss</i>	2005	Escocia	Bastardo <i>et al.</i> , 2012
B9-28	3	1	-	Agua	1994	Portugal	Bastardo <i>et al.</i> , 2012
C12-54	1	1	1	Sedimento	1994	Portugal	Bastardo <i>et al.</i> , 2012
B14-102	1	1	1	Sedimento	1994	Portugal	Bastardo <i>et al.</i> , 2012
YR1	1	2	1	<i>O. mykiss</i>	2001	UK	Bastardo <i>et al.</i> , 2012
YR9	1	2	1	<i>O. mykiss</i>	1995	UK	Bastardo <i>et al.</i> , 2012
830118	4	1	1	<i>O. mykiss</i>	1983	Dinamarca	Bastardo <i>et al.</i> , 2012
850812	5	1	-	<i>Anguilla anguilla</i>	1987	Dinamarca	Bastardo <i>et al.</i> , 2012
860821	5	1	-	<i>Salmo salar</i>	1985	Finlandia	Bastardo <i>et al.</i> , 2012
NCTC 12266	1	1	1	<i>O. mykiss</i>	1978	USA	Ewing <i>et al.</i> , 1978
NCTC 12267	6	1	1	<i>Chinook salmon</i>	1978	USA	Ewing <i>et al.</i> , 1978
NCTC 12269	7	1	1		1989	USA	Bastardo <i>et al.</i> , 2012
NCTC 12270	8	1	1	Anguila	1978	Dinamarca	Ewing <i>et al.</i> , 1978
TUTI EX5	1	2	1	<i>O. mykiss</i>	1978	UK	Ewing <i>et al.</i> , 1978
CETC 956	6	1	1	<i>Chinook salmon</i>	1978	USA	Ewing <i>et al.</i> , 1978
CAE 431	4	1	1	Esturión	2007	Other	Calvez <i>et al.</i> , 2015
ATCC 29473 Calvez	4	1	1	<i>O. mykiss</i>	1965	USA	Calvez <i>et al.</i> , 2015

\*ST: Secuencia tipo \*\*BT: Biotipo \*\*\*CC: Complejo clonal

## 6. Análisis de las secuencias

La longitud de las secuencias génicas utilizadas para MLST varió de 216 bp (*thrA*) a 570 bp (*dnaJ*). El contenido de G+C encontrado fue de 42,59% (*gyrB*) a 53,86% (*dnaJ*). Se identificaron un total de 17 alelos diferentes entre los 6 genes de mantenimiento, *recA* presentó 2 alelos (4 y 5), el gen *thrA* presentó 2 alelos (3 y 4), el gen *hsp60* presentó 1 único alelo (4), el gen *gyrB* presentó 3 alelos (1,5 y 6), el gen *glnA* con 4 alelos (1, 5, 7 y 8) y el gen *dnaJ* que es el que más diversidad alélica presentó (2, 4, 5, 6 y 7), siendo los loci más polimórficos los genes *glnA* y *dnaJ* con 4 y 5 alelos diferentes respectivamente y se observaron 179 sitios polimórficos entre los genes *glnA* y *gyrB* entre las 32 cepas estudiadas (Cuadro 12) (ANEXO III Figura 12 y 13).

**Cuadro 12.** Características de los genes de mantenimiento evaluados y los alelos analizados.

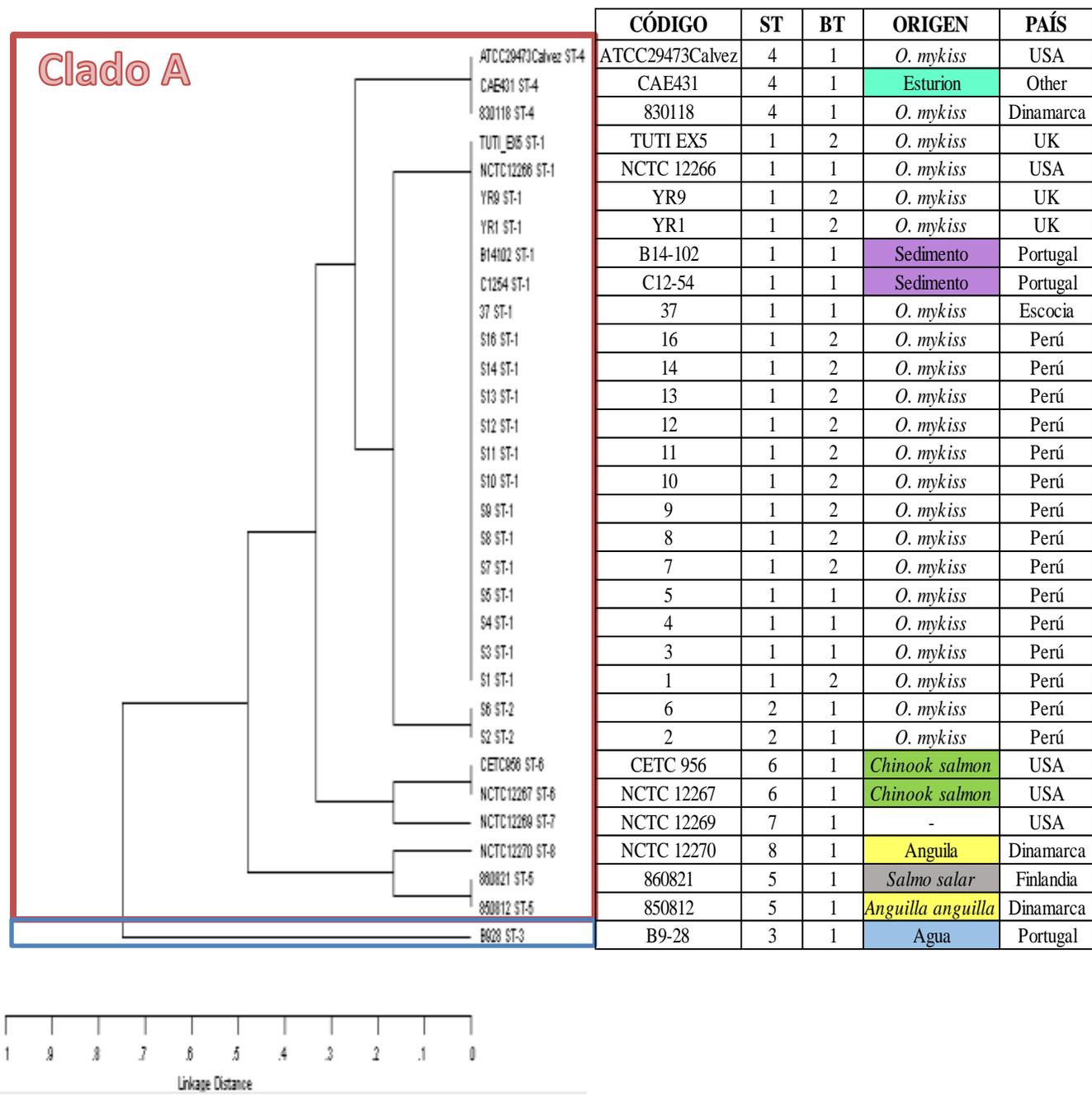
Gen	Tamaño (bp)	%G+C	Número de alelos	Número de sitios polimórficos
<i>glnA</i>	416	50,25	4	1
<i>gyrB</i>	243	42,59	3	178
<i>recA</i>	293	49,15	2	0
<i>dnaJ</i>	570	53,86	5	0
<i>thrA</i>	216	46,76	2	0
<i>HSP60</i>	355	48,17	1	0
<b>TOTAL</b>			<b>17</b>	<b>179</b>

## 7. Medición de la clonalidad

Mediante el programa START2 v. 1.0.5 se obtuvo como valor del índice de asociación ( $I_A$ ) = 0.999 (n=32) sugiriendo este resultado un desequilibrio de ligamiento significativo que indica estructuras de población clonal, ya que el valor debe diferir significativamente de cero para indicar que la población es clonal (ANEXO III Figura 14).

## 8. Análisis filogenético

Se utilizó el método de UPGMA con 1000 réplicas (bootstrap) para el análisis filogenético de las 32 cepas utilizadas, dicho método mostró un gran grupo principalmente, el denominado Clado A, conformado por 96,87% (31/32) de cepas (15 cepas de este estudio, 8 cepas de la base de datos y 8 cepas de referencia), con STs diferentes, siendo el de mayor predominancia el ST1 aislados de trucha arcoíris de Perú y este principal clado contenía al ancestro en común, mientras que una cepa no fue agrupada en ningún clado (3,13%) perteneciendo esta a la base de datos del PubMLST (Figura 11). Solo uno de los STs no agrupados en el árbol UPGMA fueron concordantes con los singletons asignados por BURST.



**Figura 11.** Árbol filogenético obtenido mediante el programa START2 v. 1.0.5 siguiendo el método de UPGMA, se muestra el Clado A, cepa no agrupada con sus respectivos códigos, STs, origen, país y año de aislamiento.

## VIII. DISCUSIÓN

*Y. ruckeri* es uno de los patógenos que causa infecciones con mayor frecuencia en salmónidos, viéndose afectado principalmente, la trucha arcoíris en sus diferentes etapas de cultivo y ocasiona considerables pérdidas económicas (Kumar *et al.*, 2015).

Se conoce que *Y. ruckeri* es una especie altamente clonal, serológicamente variable e incluye 2 biotipos, sin embargo, aún es limitada la información que se tiene en nuestro país en cuanto a estos. En este estudio se determinó la presencia de ambos biotipos circulando en los departamentos de Lima, Junín y Ancash, información que concuerda con lo reportado con Bastardo *et al.*, (2011), Bueno, (2012), López, (2012) y Flores, (2013), donde también evidenciaron la presencia de uno o ambos biotipos y mencionan que las cepas procedentes de Ancash son las que mayor variabilidad fenotípica presentan entre las cepas aisladas de Ancash, Junín y Huancavelica.

Las cepas aisladas de las provincias del departamento de Junín usadas en este estudio, presentaron diferentes biotipos. Bueno, (2012) en Huancayo, logro identificar solo cepas BT1, sin embargo, en este estudio ya se hace evidente la presencia del BT2 en esta misma provincia. López, (2012) en Jauja, logro identificar cepas BT1, resultado semejante a lo encontrado en este estudio, lo que demostraría la persistencia de este biotipo en esta provincia; y en Concepción, logró identificar ambos biotipos, si bien es cierto que en el presente estudio, solo se identificaron cepas BT2 en esta provincia, no se descarta la presencia del BT1 debido a los antecedentes de su presencia, además que, el tamaño de muestra en esta investigación es uno de los factores limitantes,

recomendando incluir mayor cantidad de muestras. Bastardo *et al.*, (2011) logró identificar ambos biotipos en los Andes centrales de nuestro país y Flores, (2013) logro identificar en el departamento de Junín cepas BT1 y por primera vez se reportó en Ancash cepas BT2, mas se desconoce la provincia en la que fueron aisladas las cepas en ambos estudios, confirmando la persistencia de ambos biotipos con la presente investigación tras la identificación de los mismos.

Se evidenció relación entre los la hidrolisis del Tween 20 y Tween 80 con respecto a la motilidad, hallazgo similar con Bueno, (2012), López, (2012) y Flores, (2013), sin embargo, esta última evidencio que el Tween 20 y 80 puede variar independientemente de la motilidad de la cepa, información que ya había sido reportada anteriormente por Busch, (1982) y Davies y Frerichs, (1989) donde ya evidenciaban esta especie de no relación, aunque para aquellos años, estos autores no pudieron dilucidar a que se debía ello, sugiriendo que dichas cepas se identifiquen como *Y. ruckeri* BT2. Tinsley *et al.*, (2011) evidenció un grupo de aislamientos no motiles y positivos para la lipasa (BT2) y que pueden ser motivo de preocupación para la acuicultura de salmónidos, puesto que anteriormente, la producción de enzimas lipasas se asociaba con la motilidad, mencionan que esta característica de sus aislamientos, se asociaron con otras especies de salmónidos, específicamente el salmón del Atlántico (*Salmo salar* L.), trucha alpina (*Salvelinus alpinus* L.) y bacalao (*Gadus morhua* L.) donde estos peces podrían ser susceptibles a los factores de virulencia que poseen los aislados bacterianos, sin embargo hasta la fecha, no se ha podido confirmar ello.

Wheeler *et al.*, (2009) lograron identificar cuatro mutaciones naturales específicas e independientes que causan la pérdida tanto de la motilidad como de la actividad de la lipasa secretada en cepas BT2 en los países de USA, Reino Unido, Dinamarca, Finlandia y España, donde estas mutaciones codifican genes esenciales del aparato de secreción flagelar y varían según el origen geográfico de los aislados, además, que poseer dichas mutaciones lo hacen responsable de tener este fenotipo y demostraron también que las cepas BT2 del Reino Unido tienen el mismo alelo mutante que se encuentra en las cepas BT2 de USA, lo que sugiere un origen común de este linaje BT2.

Moreau *et al.*, (2019) usaron secuencias de 28 genes involucrados en la motilidad y la actividad de la lipasa en 128 cepas de *Y. ruckeri* de trucha arcoíris en Francia y concluyeron que una gran diversidad de mutaciones es responsable de la aparición de cepas de *Y. ruckeri* BT2.

Se conocía que la mayoría de brotes han sido ocasionados por cepas de *Y. ruckeri* pertenecientes al BT1 (Arias *et al.*, 2007), no obstante, desde 1989 en Reino Unido, se ha descrito la aparición y propagación del BT2 (Davies y Frerichs, 1989, Austin *et al.*, 2003) y se ha correlacionado con la recurrencia de informes clínicos y especialmente con el uso y fracaso de vacunas comerciales basada en BT1 en diferentes países como Inglaterra (Austin *et al.*, 2003), España (Fouz *et al.*, 2006), USA (Arias *et al.*, 2007) y Finlandia (Ström-Bestor *et al.*, 2010). Si bien es cierto que en nuestro país no se comercializa una vacuna contra *Y. ruckeri*, se hace cada vez más evidente la presencia del BT2, información que concuerda con lo hallado en este estudio, puesto que el mayor

número de cepas evaluadas fueron no móviles y no hidrolizaban ambos Tween, entonces, su aparición podría tener múltiples orígenes y se sugiere la hipótesis que probablemente el BT2 haya sido introducido en nuestro país (Flores, 2013).

Usualmente, los reportes del aislamiento de este patógeno proceden de animales con signología con yersiniosis y se ha logrado identificar cepas de *Y. ruckeri* en ambientes acuáticos como agua y sedimento (Romalde *et al.*, 1994; Coquet *et al.*, 2002), en nuestro país, en el departamento de Junín se ha logrado su aislamiento de estas fuentes (Luyo, 2020), sin embargo aún no se cuentan con datos referentes a los biotipos, serotipos o STs de dichos aislados, siendo importante conocer la variabilidad fenotípica y genotípica de dichas cepas para desarrollar estrategias de control frente a la yersiniosis.

*Y. ruckeri* ha sido descrita como una especie altamente homogénea debido a sus características fenotípicas y bioquímicas (Sierralta *et al.*, 2013; Calvez *et al.*, 2014), sin embargo, por medio de diferentes métodos de tipificación molecular se ha permitido profundizar los conocimientos sobre su variabilidad genética.

Bastardo *et al.*, (2012) identificaron en su estudio dos STs predominantes, siendo estos el ST1 y ST2, los cuales fueron denominados como sub-fundadores, que comprendían la mayoría de los ST reconocidos y mencionan que la persistencia de estos durante períodos prolongados (por ejemplo, ST1 en numerosos países de 1965 a 2008 y ST2 de 1979 a 2009) es indicativo de una estructura poblacional clonal. Se logró identificar estos mismos STs (ST1 y ST2) anteriormente reportados por Bastardo *et al.*, (2012)

entre las cepas estudiadas y su persistencia hasta el 2018, año en que fueron aisladas estas cepas, apoyaría la hipótesis que *Y. ruckeri* sigue esta estructura. Por el contrario, no se obtuvieron STs en común con nuestro estudio con Calvez *et al.*, (2015) siendo los de mayor predominancia, los ST31 y ST36, probablemente debido a las diferencias en las secuencias de los genes *thrA*, *dnaJ*, *HSP60* y *gyrB* entre los diferentes lotes de cepas utilizadas entre los dos estudios, podría explicarse esto, a la rápida adaptación de las bacterias a las condiciones *in vitro* (Fux *et al.*, 2005).

A su vez, Bastardo *et al.*, (2012) mostraron relación entre el genotipo de las cepas, hospederos y área geográfica para algunos STs, donde los ST1 y ST2 agruparon la mayoría de las cepas aisladas de salmónidos, el ST1 se encontró asociado exclusivamente a *O. mykiss* y *S. salar* en Perú, USA, Reino Unido, Dinamarca de 1979 a 2009 y el ST2 comprendía exclusivamente cepas de *Y. ruckeri* aisladas de *O. mykiss* y *S. trutta* en Perú, España, Reino Unido, Portugal, Finlandia y USA durante 1979–2009. En Francia también se observó relación entre el hospedero y área geográfica, donde los ST31 y ST36, pertenecen netamente a cepas aisladas de criaderos de trucha arcoíris (Calvez *et al.*, 2015). Ambos hallazgos son similares a los encontrados en esta investigación puesto que estos STs también fueron aisladas de trucha arcoíris, lo cual podría reflejar una especialización de nicho adaptativo que respalda las hipótesis de que la amplificación y diseminación de *Y. ruckeri* ocurrió cuando este patógeno encontró un nicho alternativo (cultivo intensivo de trucha arcoíris) más que por rutas preferenciales de transmisión (Welch *et al.*, 2011).

Curiosamente, estos dos STs encontrados tienen una fuerte asociación a la mayoría de los brotes de yersiniosis en cultivos de salmónidos, afirmación que concuerda con este estudio, ya que, a nivel de biotipos, cepas BT1 y BT2, se incluyeron en el ST1 y cepas BT1 en el ST2, lo que podría indicar que el fenotipo del BT2 pudo haber evolucionado a partir de un fenotipo móvil relacionado (Bastardo *et al.*, 2012). Wheeler *et al.*, (2009), mediante PFGE establecieron que cepas BT2 en Dinamarca y España están más estrechamente relacionadas con cepas BT1 presente en estos países que las cepas BT2 del Reino Unido, aunque la coexistencia de cepas BT2 de USA, Reino Unido, Europa continental y América del Sur dentro del ST2 puede sugerir evidencias para la diseminación transfronteriza de cepas BT2 de *Y. ruckeri*, la presencia del ST16 en USA, ST1 en el Reino Unido y ST9, ST11, ST12 en Perú, indicaría la emergencia independiente del BT2 en estas áreas. Welch *et al.*, (2011), reportaron que las cepas del BT2 en USA poseen un alelo mutante fliR que también se encuentra en cepas del Reino Unido, mientras que se detectaron otras mutaciones del BT2 en cepas de Europa continental. Estos autores sugirieron que no es claro aún el mecanismo de diseminación entre continentes y que la distribución de cepas inmóviles de *Y. ruckeri* en Europa no es simplemente el resultado de la expansión de un solo grupo clonal de BT2 altamente exitoso.

Los STs que prevalecieron en este estudio ya cuentan con reportes internacionales, Bastardo *et al.*, (2012) mencionan que aunque están surgiendo nuevas variantes (sub-fundadores ST1 y ST2), estos aún no se han establecido bien para reemplazar a su ancestro, siendo este el ST14, por ello mencionan que el modelo epidémico también es

consistente con la epidemiología de *Y. ruckeri*, lo que sugieren que la yersiniosis comenzó como una enfermedad geográficamente aislada que con relativa rapidez se difundió ampliamente (Austin y Austin, 2007). Con la información obtenida en este estudio, probablemente estos STs, específicamente el ST1 ya se haya podido establecer con el paso de los años al menos en Perú, siendo recomendable seguir generando más información usando esta técnica.

El algoritmo BURST, ayudo a concluir que *Y. ruckeri* forma una población clonal, el cual es consistente en estudios realizados por Bastardo *et al.*, (2012) y Calvez *et al.*, (2015), donde el único complejo clonal (CC-ST1) hallado pertenece en su gran mayoría a cepas aisladas de trucha arcoíris y se conoce que el CC1 se ha relacionado casi exclusivamente con brotes asociados con el cultivo de salmónidos en el mundo desde 1970. Este hallazgo indica la naturaleza homogénea del complejo clonal pandémico (CC1), independientemente del sitio geográfico de aislamiento. En nuestro estudio no se identificó un CC2, probablemente ya que este se ha restringido a un área geográfica específica y temporalmente restringida a USA, Dinamarca y Canadá hasta 1987. Así se puede inferir que las cepas usadas en este estudio se encuentran genéticamente relacionadas, presentando un menor número de variaciones en el cromosoma.

En el CC-ST1 se encontraron cepas pertenecientes a ambos biotipos, dicha información es similar a la de Bastardo *et al.*, (2012), ya que, de las 103 cepas usadas en su estudio, 28 son peruanas y las encontramos en el CC1 conformado por los ST1 (BT1 y BT2), ST2 (BT1), ST9 (BT2), ST10 (BT1), ST11 (BT2), ST12 (BT2) y ST28 (BT1).

Múltiples serotipos fueron observados en el único complejo clonal que involucraba las cepas estudiadas, cepas de referencia y de la base de datos (Bastardo *et al.*, 2012 y Calvez *et al.*, 2015) donde estas últimas pertenecían en su mayoría al serotipo O1/Biotipo 1, el serotipo no se asoció estrictamente con los ST en este estudio MLST, ya que se reconocieron varios ST para cada serotipo; la serotipificación no fue evaluada a las cepas utilizadas en nuestro estudio.

El índice de asociación (IA) en este estudio, arrojó un resultado diferente de cero, indicando estructuras de población clonal. Este valor coincide con los resultados obtenidos con Bastardo *et al.*, (2012) donde las frecuencias cuádruples por alelo y séptuples por sitio de eventos de recombinación relativos a las mutaciones encontradas en ese estudio no son característicos de una población altamente clonal, sus resultados aparentemente contradictorios para la clonalidad de *Y. ruckeri* son consistentes con los reportados para *Vibrio parahaemolyticus* (González-Escalona *et al.*, 2008) y *Staphylococcus epidermidis* (Miragaia *et al.*, 2007), para los cuales se ha encontrado una estructura poblacional epidémica, además, mencionan que la presencia de otro complejo clonal (CC2) y tres ST únicos entre las cepas analizadas, constituye la primera demostración definitiva de un complejo clonal de *Y. ruckeri* distinto del complejo clonal pandémico (CC1) y respalda aún más el modo epidémico, como se describe para otros patógenos como *Flavobacterium psychrophilum* (Nicolas *et al.*, 2008) y *Pseudomonas aeruginosa* (Maatallah *et al.*, 2011).

En el presente estudio se obtuvieron diferencias en la longitud de los genes de mantenimiento en comparación con Bastardo *et al.*, (2012) y Calvez *et al.*, (2015), no se descarta una posible contaminación o baja calidad de las secuencias utilizadas, considerar que la metodología de esta técnica es exigente y requiere experiencia en el análisis bioinformático, considerando esto como otro factor limitante en el estudio.

El contenido de G+C obtenido de los genes de mantenimiento en este estudio varió entre 42,59% (*gyrB*) a 53,86% (*dnaJ*), valores similares a lo reportado por Bastardo *et al.*, (2012) y Calvez *et al.*, (2015). Estos valores se encuentran cercanos a los establecidos para especies de *Yersinia*, puesto que se ha informado que el contenido de G+C de *Y. ruckeri* ronda el 47,5 % - 48.5% (Ewing *et al.*, 1978), por lo que el contenido de G+C de los alelos *dnaJ* fue al menos un 6,36% más alto que la otra secuencia génica parcial.

Bastardo *et al.*, (2012) y Calvez *et al.*, (2015), lograron identificar 34 y 13 números de alelos respectivamente, siendo los genes *dnaJ* y *gnlA* los que tuvieron mayor diversidad alélica entre los genes de mantenimiento de acuerdo con lo obtenido con el software START2, hallazgo similar a lo encontrado en el presente estudio. La cantidad de sitios polimórficos varía de acuerdo al tipo de gen de mantenimiento usado y ello sucedió entre los genes de mantenimiento de las secuencias parciales de los genes *gnlA* y *gyrB*, probablemente debido a que el gen *gyrB* presenta mayor variabilidad debido la cantidad de SNPs que posee; probablemente no se obtuvieron cantidades similares de números de alelos o sitios polimórficos con estos autores, debido a la longitud o diferencias en las secuencias génicas utilizadas.

Siguiendo el modelo UPGMA para explorar las relaciones entre las 32 cepas de *Y. ruckeri*, se encontró que el dendrograma estaba dominado por un gran grupo, donde la escala representa la distancia evolutiva y que proceden de un ancestro en común y que este gran grupo contenía al CC-ST1. Pese a tener dos grupos de cepas provenientes de diferentes partes del mundo y del Perú en este estudio, se demuestra que existe relación entre ellas ya que tampoco están muy distanciados un grupo del otro.

La combinación de métodos de tipificación sería de utilidad para evaluar la diversidad de la población de esta bacteria. Bastardo *et al.*, (2011) encontraron mediante el uso de REP-PCR y ERIC-PCR, un solo clúster al analizar 30 aislados de *Y. ruckeri* procedentes de Junín y en Chile, 11 aislados de *Y. ruckeri* procedentes del salmón del atlántico (*Salmo salar* (L.)) obteniendo, dos y tres genogrupos mediante las mismas técnicas; encontrando homogeneidad mayor del 85% en estos grupos clonales, estos análisis indicaron claramente la diversidad genética intraespecífica entre cepas chilenas de *Y. ruckeri*. Calvez *et al.*, (2015), usando PFGE en combinación con MLST para describir una población de aislamientos de brotes en piscifactorías francesas, encontraron homogeneidad de la población del brote con una similitud > 80,0 % y una estructura epidémica de la población francesa de *Y. ruckeri* y una evolución preferentemente clonal para los aislados de trucha arcoíris con la técnica MLST. Fernández-Espinel *et al.*, (2022) tras caracterizar 29 aislamientos de *Y. ruckeri* en Puno, identifico que estos compartían perfiles ERIC-PCR y REP-PCR idénticos y pertenecían al serotipo O1a y que mostraban semejanza con la cepa de referencia CECT 955 (serotipo O1a).

Este estudio confirma los resultados hallados por Mesías *et al.*, (2020) donde se analizaron las mismas cepas de *Y. ruckeri* mediante RAPD-PCR y el dendograma de diversidad genética agrupó a todos los aislados en un solo clúster, además de estar relacionadas con la cepa control ATCC 29473 *Y. ruckeri* con un 96% de similitud, ello nos confirma que los aislados son genéticamente idénticos (clones).

También, Mesías, 2019a, al someter a pruebas de sensibilidad *in vitro* a estas mismas cepas usadas en el presente estudio, evidenció que el perfil de resistencia antibiótica es completamente susceptible o de tipo salvaje (WT) y no fueron detectados genes de resistencia (floR, tetA, tetC, blaTEM, sul1, sul3, dfrA1), al respecto, esta información no se pudo asociar estrictamente con los STs, así mismo, hace evidente la presencia de un solo genotipo mediante la técnica de RAPD-PCR y se sugiere que este, probablemente sea el responsable de los brotes ocasionados por *Y. ruckeri* en las piscigranjas de estas regiones, pudiendo ver la relación genética de los aislados de *Y. ruckeri* con los perfiles genotípicos y fenotípicos de resistencia antimicrobiana.

Se conoce que *Y. ruckeri* es sensible a múltiples antibióticos (Tobback *et al.*, 2007) y pese a no haberse detectado genes de resistencia (Mesías, 2019a), no se descarta que estos aislados puedan albergar otros genes de resistencia para otros fármacos, teniendo así, que es de suma importancia continuar generando información respecto a genotipos no solo para *Y. ruckeri*, también para otras bacterias de interés acuícola puesto que un inadecuado uso de antibióticos podrían producir un impacto negativo en el ambiente acuático, provocando la aparición de cepas resistentes.

Bastardo *et al.*, (2012) proporcionó información acerca de la estructura de la población de *Y. ruckeri* y de los mecanismos genéticos para la aparición de linajes clonales que se propagan con éxito a nivel mundial y propone que *Y. ruckeri* sigue un modelo epidémico de expansión clonal con clones bien adaptados y se distribuyen ampliamente (Feil *et al.*, 2000; Smith *et al.*, 2000). Por otro lado, Calvez *et al.*, (2015), confirma la hipótesis de Bastardo y pese a tener un área geográfica limitada en Francia, llegó a la misma conclusión; así mismo, en base a la información obtenida en este estudio, se apoyaría la hipótesis generada por Bastardo *et al.*, (2012).

Los resultados obtenidos en este estudio contribuyen en conocer mejor las características fenotípicas de los aislados de *Y. ruckeri* provenientes de truchas arcoíris con sinología compatible con yersiniosis en tres regiones productoras de trucha en nuestro país según PRODUCE (2016) y nos brinda herramientas para mejorar el control sanitario en dichas regiones.

Así mismo, esta técnica ha demostrado ser útil para obtener un esquema MLST para *Y. ruckeri* realizado en nuestro país, el cual nos permite visualizar el grado de proximidad entre los aislados al observar el número de alelos compartidos entre diferentes perfiles, así como detectar clones o líneas clonales, incluso en presencia de bajos niveles de variabilidad en el genoma, dicho esquema servirá de ayuda para futuros trabajos que estudien la estructura de la población y epidemiología de este patógeno y que puedan comparar los datos generados con laboratorios en diferentes partes del mundo. Conocer el parentesco entre cepas endémicas con cepas de otros países y contar con datos de ancestralidad, nos beneficiaría en crear estrategias de inmunización como una vacuna

que controle la yersiniosis, además que dicha técnica también pueda ser usada en otros patógenos que afecten la truchicultura.

Pese a tener como factores limitantes en este estudio, un tamaño de muestras reducido, que la realización de esta técnica requiere una fuente de financiamiento y es exigente en cuanto a la metodología, cabe resaltar que estas cepas pertenecen a tres departamentos de crianza representativa de producción truchícola y que han sido caracterizadas por RAPD – PCR (Mesías *et al.*, 2020), se conoce el perfil fenotípico de susceptibilidad antibiótica y genes de resistencia antibiótica de cada una de las cepas utilizadas (Mesías, 2019a), sin embargo, para tener un mejor entendimiento de la variabilidad de *Y. ruckeri* se sugiere seguir utilizando la técnica del MLST e incluir mayor cantidad de cepas, aisladas en diferentes tiempos y que provengan de zonas representativas de crianza de trucha arcoíris e inclusive muestras de otro origen.

## **IX. CONCLUSIONES**

- Se determinó que las cepas de *Y. ruckeri* provenientes del cepario pertenecen a los biotipos 1 y 2.
- Mediante la técnica del MLST se identificó 2 STs diferentes sin ningún alelo nuevo entre las cepas estudiadas.
- Las secuencias tipo (ST) encontradas, ST1 y ST2, son características de las reportadas en salmónidos.
- Esta técnica permitió acceder, usar y comparar secuencias de la base de datos central a través de internet con las cepas estudiadas.

## **X. RECOMENDACIONES**

- Se recomienda continuar el análisis de aislados de *Y. ruckeri* en otras regiones del Perú empleando la técnica MLST ya que aún es limitada la información que muestra un esquema MLST para esta bacteria.
- Se recomienda incluir muestras de otras especies de salmónidos, otras especies y de otro origen como muestras de agua y sedimento donde se haya aislado *Y. ruckeri* en Perú.

## XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Adeolu M, Alnajar S, Naushad S, Gupta R. 2016. Genome-based phylogeny and taxonomy of the 'Enterobacteriales': Proposal for Enterobacterales ord. nov. divided into the families Enterobacteriaceae, Erwiniaceae fam. nov., Pectobacteriaceae fam. nov., Yersiniaceae fam. nov., Hafniaceae fam. nov., Morganellaceae fam. nov., and Budviciaceae fam. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 66: 5575–5599.
2. Ahmed N, Devi M, Valverde M, Vijavachari P, Machang'u R, Ellis W, Hartskeerl R. 2006. Multilocus sequence typing method for identification and genotypic classification of pathogenic *Leptospira* species. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 5: 28.
3. Akhter N, Wu B, Memon AM, Mohsin M. 2015. Probiotics and prebiotics associated with aquaculture: A review. *Fish Shellfish Immunol.* 45(2):733-41.
4. Austin DA, Robertson PAW, Austin B. 2003. Recovery of a new biogroup of *Yersinia ruckeri* from diseased rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). *Syst Appl Microbiol* 26: 127–131.
5. Austin B, Austin DA. 2007. Bacterial Fish Pathogens. Diseases of farmed and wild fish. 4<sup>th</sup> ed. Chichester, UK: Praxis Publishing. 32, 111-112, 135, 271p.

6. Avci H, Birincioğlu S. 2005. Pathological findings in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum 1792) experimentally infected with *Yersinia ruckeri*. Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences 29: 1321-1328.
7. Arias C, Olivares-Fuster O, Hayden K, Shoemaker C, Grizzle JM, Klesius PH. 2007. First report of *Yersinia ruckeri* biotype 2 in the U.S.A. J Aquat Anim Health 19:35–40.
8. Avendaño-Herrera R, Tapia-Cammas D, Aedo A, Saldivia P, Ortega C, Irgang R. 2017. Disease caused by *Yersinia ruckeri* serotype O2b found in Chilean-farmed coho salmon, *Oncorhynchus kisutch* (Walbaum, 1792). J Fish Dis. 40(2):279-285.
9. Barattini P. Instituto de Investigaciones agropecuaria. Resultados preliminares sobre el uso de lodos de pisciculturas sobre los suelos agropecuarios de origen volcánico de la Patagonia occidental (AYSÉN). Ed. Hepp C. 5-9 p.
10. Bastardo A, Bohle H, Ravelo C, Toranzo A, Romalde, J. 2011. Serological and molecular heterogeneity among *Yersinia ruckeri* strains isolated from farmed Atlantic salmon *Salmo salar* in Chile. Dis Aquat Organ 93: 207–214.
11. Bastardo A, Ravelo C, Romalde J. 2012. Multilocus sequence typing reveals high genetic diversity and epidemic population structure for the fish pathogen *Yersinia ruckeri*. Environ Microbiol. 14(8):1888-97.

12. Bravo S, Kojagura V. 2004. First isolation of *Yersinia ruckeri* from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Peru. Bull. Eur. Ass. Fish Pathol. 24: 104-108.
13. Borraz C. Epidemiología de la resistencia a metilina en cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas en hospitales españoles. [Tesis doctoral]. 2006. España: Universidad de Barcelona.
14. Bueno H. Caracterización Fenotípica y Molecular de Cepas de *Yersinia Ruckeri* aisladas de *Oncorhynchus mykiss*, del Centro Piscícola “El Ingenio” – Huancayo. [Tesis Biólogo Microbiólogo y Parasitólogo]. 2012. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
15. Busch R, Ling A. 1975. Establishment of an asymptomatic carrier state infection of enteric redmouth disease in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). J. Fish. Res. Board Can. 32: 2429-2432.
16. Busch R. 1982. Enteric redmouth disease (*Yersinia ruckeri*). In Antigenes of Fish Pathogens. Symposium Internacional de Talloires., 201 - 223.
17. Bystritskaya E, Stenkova A, Chistuylin D, Chernysheva N, Khomenko V, Anastyuk S, Novikova O, Rakin A, Isaeva M. 2016. Adaptive responses of outer membrane porin balance of *Yersinia ruckeri* under different incubation temperature, osmolarity, and oxygen availability. Microbiology Open 5(4): 597–603.

18. Cabello F. 2006. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. *Environ Microbiol.* 8(7):1137-44.
19. Calvez S, Gantelet H, Blanc G, Douet DG, Daniel P. 2014. *Yersinia ruckeri* Biotypes 1 and 2 in France: presence and antibiotic susceptibility *Dis Aquat Org* 109: 117–126.
20. Calvez S, Fournel C, Douet DG, Daniel P. 2015. Pulsed-field gel electrophoresis and multi locus sequence typing for characterizing genotype variability of *Yersinia ruckeri* isolated from farmed fish in France. *Vet Res.* 46(1):73.
21. Canhos P, Souza S, Giovanni R, Canhos L. 2004. Global biodiversity informatics: setting the scene for a “new world” of ecological modeling. *Biodiv. Inform.* 1: 1-13.
22. Castro T, Peña C, Mateo E. 2014. First report of viral diseases in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Peru. *The Biologist.* 1: 67-75.
23. Coquet L, Cosette P, Quillet L, Petit F, Junter, G, Jouenne T. 2002. Occurrence and phenotypic characterization of *Yersinia ruckeri* strains with biofilm-forming capacity in a rainbow trout farm. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 470–475.

24. Cueva V. Inmunoprotección conferida por una vacuna contra *Yersinia ruckeri* en truchas arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*). [Tesis de Médico Veterinario]. 2015. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
25. Chacón O, Alfaro R, Espinosa M. 2004. Calidad de canal y carne de trucha arcoíris, *Oncorhynchus mykiss* Richardson, producida en el noroeste del Estado de Chihuahua. *Hidrobiológica*. 14(1): 19 – 26.
26. Davies R, Frerichs G. Morphological and biochemical differences among isolates of *Yersinia ruckeri* obtained from wide geographical areas. *Journal of Fish Diseases* 12, 357–365.
27. Davies R. 1991a. Clonal analysis of *Yersinia ruckeri* based on biotypes, serotypes and outer membrane protein-types. *Journal of Fish Diseases* 14, 221-228.
28. Davies R. 1991b. Outer membrane protein profiles of *Yersinia ruckeri*. *Veterinary Microbiology* 26, 125-140.
29. De las Rivas B, Marcobal A, Muñoz R. 2007. MLST (MULTILOCUS SEQUENCE TYPING): Un método molecular para la caracterización inequívoca de cepas de *Oenococcus oeni* y *Lactobacillus plantarum* Avances en Ciencias y Técnicas Enológicas. Transferencia de Tecnología de la Red GIENOL al Sector Vitivinícola: 34-35.

30. Díaz-Sánchez A, Martínez-Marrero S, Corona-González B. 2018. Tipificación multilocus de secuencias aplicada a la caracterización molecular de hemoparásitos en el ganado bovino. *Rev Salud Anim.* 40:(1): 1-11.
31. Duchaud E, Rochat T, Habib C, Barbier P, Loux V, Guérin C, Dalsgaard I, Madsen L, Nilsen H, Sundell K, Wiklund T, Strepparava N, Wahli T, Caburlotto G, Manfrin A, Gregory D, Fujiwara-Nagata E, Avendaño-Herrera R, Bernardet JF, Nicolas P. 2018. Genomic Diversity and Evolution of the Fish Pathogen *Flavobacterium psychrophilum*. *Front Microbiol.* 7; 9:138.
32. Dulin M, Hudleston T, Larson R, Klontz G. 1976. Enteric redmouth disease. *Bull. College of Forestry, Wildlife and Range Science.* (8):1-16.
33. Estrella M. Determinación de patogenicidad de una cepa de *Yersinia ruckeri* procedente de un brote de yersiniosis en truchas “arcoíris” (*Oncorhynchus mykiss*) de una piscifactoría ubicada en Charcas, Puno, Perú. [Tesis de Médico Veterinario]. 2019. Perú: Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
34. Ewing W, Ross A, Brenner D, Fanning G. 1978. *Yersinia ruckeri* sp. nov., the redmouth (RM) bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 28, 37 – 44.

35. Fandiño L. Uso de Multilocus Sequence Typing (MLST) en la tipificación molecular de *Salmonella spp.* aisladas de la cadena avícola en el Tolima. [Tesis de Magister]. 2017. Colombia: Universidad de Tolima.
36. FAO - Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. 2004. Uso de antimicrobianos en animales de consumo, Incidencia del desarrollo de resistencias en la salud pública. Roma: FAO.
37. FAO - Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, 2014. Manual Práctico para el cultivo de trucha arcoíris. Guatemala: FAO.
38. Feil E, Li B, Aanensen D, Hanage W, Spratt B. 2004. eBURST: Inferring Patterns of Evolutionary Descent among Clusters of Related Bacterial Genotypes from Multilocus Sequence Typing Data. *Journal of bacteriology*, 186, p. 1518–1530
39. Fernández C. Determinación de *Yersinia ruckeri* y sus características lesionales anatomo - histopatológicas en truchas Arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) en etapa pre comercial en una piscigranja de la región Junín. [Tesis de Médico Veterinario]. 2011. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
40. Fernández-Espinel C, Medina-Morillo M, Irgang R, Sotil G, Araya-León H, Flores-Dominick V, Romalde JL, Avendaño-Herrera R, Yunis-Aguinaga J. 2022. Co-existence of two *Yersinia ruckeri* biotypes and serotype O1a retrieved from

rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) farmed in Puno, Peru. *Journal of Fish Diseases*, 46, p. 157 – 163.

41. Flores K. Determinación de la diversidad fenotípica de *Yersinia ruckeri* en aislados de truchas Arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) de cultivo de las regiones de Junin, Ancash y Huancavelica. [Tesis de Médico Veterinario]. 2013. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

42. Fondo Nacional de Desarrollo Pesquero. 2004. Manual de Cultivo de Trucha Arcoíris en jaulas. Perú: FONDEPES. 27 – 30.

43. Fortt A, Cabello F, Buschmann A. 2007. Residuos de tetraciclina y quinolonas en peces silvestres en una zona costera donde se desarrolla la acuicultura del salmón en Chile. *Rev. Chil. Infectol.* 24(1).

44. Fouz B, Zarza C, Amaro C. 2006. First description of non-motile *Yersinia ruckeri* serovar I strains causing disease in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), cultured in Spain. *J. Fish Dis.* 29: 339–346.

45. Fux C, Shirtliff M, Stoodley P, Costerton JW. 2005. Can laboratory strains mirror “real world” pathogenesis? *Trends Microbiol* 13:58–63

46. Garcia J, Dominguez L, Larsen J, Pedersen K. 1998. Ribotyping and plasmid profiling of *Yersinia ruckeri*. *Journal of Applied Microbiology* 85(6): 949–955.
47. Garrity G, Brenner D, Krieng N, Staley J. 2005. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Volume two: The Proteobacteria (Part B). 2da ed. Springer US, 1106 p.
48. Gibello A, Blanco M, Moreno M, Dominguez L, Fernandez-Garayzabal J. 2001. Utilización de la PCR para el diagnóstico en Ictiopatología. *Revista AquaTic* 15: 1-16.
49. Glenn R, Taylor P, Pelton E, Gutenberger S, Ahrens M, Marchant L, Hanson K. 2014. Genetic evidence of vertical transmission and cycling of *Yersinia ruckeri* in hatchery-origin fall chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha*. *J Fish Wildl Manage* 5:197.
50. Gonzales J. 2009. Flavobacteriosis on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) from Lake Titicaca, Puno, Perú. *The Biologist*. 2: 205 - 215.
51. Gokhlesh K, Menanteau-Ledouble S, Saleh M, El-Matbouli M. 2015 *Yersinia ruckeri*, the causative agent of enteric redmouth disease in fish. *Vet Res*. 46(1): 103.
52. Huamaní M, Mantila S. Importación de ovas de trucha arcoíris y la sostenibilidad del centro piscícola El Ingenio del distrito de Ingenio – Junín. [Tesis de Licenciada]. 2017. Lima: Universidad de San Martín de Porres.

53. Hurst M, Becher S, Young S, Nelson TL, Glare TR. 2011. *Yersinia entomophaga* sp. nov., isolated from the New Zealand grass grub *Costelytra zealandica*. *Int J Syst Evol Microbiol.* 61: 844-849.
54. Instituto Nacional de Estadística e Informática - INEI
55. Jiang Y, Chu Y, Xie G, Li F, Wang L, Huang J, Zhai Y, Yao L. 2019. Antimicrobial resistance, virulence and genetic relationship of *Vibrio parahaemolyticus* in seafood from coasts of Bohai Sea and Yellow Sea, China. *International Journal of Food Microbiology.* 290: 116–124.
56. Jolley K, Feil E, Chan MS, Maiden M. 2001. Sequence type analysis and recombinational tests (START). *Bioinformatics.* 17:1230–31.
57. Jolley K, Maiden M. 2014. Using multilocus sequence typing to study bacterial variation: prospects in the genomic era. *Future Microbiol.* 9(5), 623–630.
58. Kim D, Austin B. 2006. Innate immune responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) induced by probiotics. *Fish Shell Immunol.* 21: 513–524.
59. Kotetishvili M, Kreger A, Wauters G, Morris J, Sulakvelidze A, Stine C. 2005. Multilocus Sequence typing for studying genetic relationships among *Yersinia* species. *J Clin Microbiol.* 43: 2674-2684.

60. Kumar G, Menanteau-Ledouble S, Saleh M, El-Matbouli M. 2015. *Yersinia ruckeri*, the causative agent of enteric redmouth disease in fish. *Veterinary Research*. 46 (1): 103.
61. López J, Identificación de biotipos de *Yersinia ruckeri* aisladas en truchas arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) en etapa juvenil procedentes de dos piscigranjas de la región Junín [Tesis de Médico Veterinario]. 2012. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
62. Llewellyn L. 1980. A bacterium with similarities to the redmouth bacterium and *Serratia liquefaciens* (Grimes and Hennerty) causing mortalities in hatchery reared salmonids in Australia. *Journal of Fish Diseases*. 3, 29 – 39.
63. Maiden M, Bygraves J, Feil E, Morelli G, Russell JE, Urwin R, Zhang Q, Zhou J, Zurth K, Caugant D, Feavers IM, Achtman M, Spratt B. 1998. Multilocus sequence typing: A portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95(6): 3140–3145.
64. Mamani D. Evidencia de *Piscirickettsia salmonis* y *Yersinia ruckeri* en truchas arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) en cultivo de balsa jaula en el Lago Titicaca en el distrito de Pomata departamento de Puno (Perú). [Tesis de Magister]. 2016. Chile: Universidad de Chile.

65. Mamani L. Contribución al análisis de la comercialización de la trucha en el mercado regional, extra-regional e internacional de la Asociación de Productores Brisas de Titicaca-Puno. [Tesis de Magíster]. 2011. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

66. Medina M, Fernandez-Espinell C, Sotil G, Yunis-Aguinaga J, Flores-Dominick V. 2020. First description of *Weissella ceti* associated with mortalities in farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Peru. *Aquaculture*. Volumen 529.

67. Mesías F, Rodríguez T, Hurtado C, Serrano-Martínez Enrique, Llanco L. (2018, octubre) Genotyping of *Yersinia ruckeri* from 6 provinces of Peru by ERIC-PCR. Artículo presentado Word Aquaculture Society - LACQUA 2018. Bogotá, Colombia.

68. Mesías F, Vargas M, Cueva A, Manchego A, Sandoval N. 2019. Patogenicidad de una cepa de *Yersinia ruckeri* de un brote de yersiniosis en truchas arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) de Huaraz, Perú. *Rev Inv Vet Perú*. 30(1): 387-403

69. Mesías F, Análisis genotípico y fenotípico de la resistencia antimicrobiana de *Yersinia ruckeri* procedente de truchas arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) de cultivo de cuatro departamentos de la Sierra del Perú. [Tesis de Magíster]. 2019a. Lima: Universidad Peruana Cayetano Heredia.

70. Mesías F, Serrano-Martinez E, Llanco L. 2020. Genotyping by RAPD-PCR of *Yersinia ruckeri* isolates from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) of the highlands of Perú. Rev Inv Vet Perú. 30(4):1743-1749.

71. Ministerio de la Producción del Perú - PRODUCE. 2010a. [Internet]. Exportación de productos hidrobiológicos procedentes de la actividad de acuicultura según especie y país de destino, enero - diciembre 2010. (Tabla estadística). Disponible en: <https://www.produce.gob.pe/documentos/estadisticas/anuarios/anuario-estadistico-pesca-2015.pdf>

72. Ministerio de la Producción del Perú – PRODUCE [Internet]. 2010b. Elaboración de estudio de mercado de la trucha en Arequipa, Cusco, Lima, Huancayo y Puno. Disponible en: <http://www2.produce.gob.pe/RepositorioAPS/3/jer/DGA-PUBLICACIONES/estudio-de-mercado-trucha.pdf>

73. Ministerio de la producción - PRODUCE [Internet]. 2016. Antecedentes y características de la actividad truchícola en el Perú. Disponible en: <http://genesperu.minam.gob.pe/wp-content/uploads/2016/09/04-Antecedentes.pdf>

74. Ministerio de la Producción – PRODUCE [Internet]. 2017. Cultivo de la trucha arcoíris en el Perú con énfasis en la importación de ovas embrionadas y la comercialización de la producción. Disponible en:

<http://rnia.produce.gob.pe/images/stories/archivos/pdf/publicaciones/2017/desenvolvimento-importaci%C3%B3n-ovas-trucha-2011-2016.pdf>

75. Ministerio de la Producción – PRODUCE. 2022. Manual para un cultivo de trucha sostenible Cultivo de trucha. Disponible en: <https://rnia.produce.gob.pe/wp-content/uploads/2022/09/Manual-de-Trucha-1.pdf>

76. Monteiro S, Francisco J, Campion T, Pimpinato R, Moura G, Garcia F, Tornisielo V. Multiresidue antimicrobial determination in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) cage farming by liquid chromatography tandem mass spectrometry. AQUA 2015.

77. Moreau E, Thomas T, Brevet M, Thorin C, Fournel C, Calvez S. 2019. Mutations involved in the emergence of *Yersinia ruckeri* biotype 2 in France. Transbound Emerg Dis 66(3):1387-1394.

78. Nakano V, Ignacio A, Llanco L, Bueris V, Sircili M, Ávila-Campos M. J. 2017. Multilocus sequence typing analyses of *Clostridium perfringens* type A strains harboring tpeL and netB genes. Anaerobe 44: 99- 105.

79. Nicolas P, Mondot S, Achaz G, Bouchenot C, Bernardet J.F, Duchaud E. 2008. Population structure of the fish-pathogenic bacterium *Flavobacterium psychrophilum*. Appl Environ Microbiol 74: 3702–3709.

80. Ohtani M, Villumsen KR, Strøm HK, Raida MK. 2014. 3D Visualization of the initial *Yersinia ruckeri* infection route in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by optical projection tomography. PLoS One 9:89672
81. Organismo Nacional de Sanidad Pesquera - SANIPES. 2016. Programa Oficial de Vigilancia y Control de enfermedades en animales acuáticos.
82. Parte A, Sardà Carbasse J, Meier-Kolthoff, J, Reimer L, Göker M. 2020. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN) moves to the DSMZ. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 70, 5607-5612.
83. Raida M, Larsen J, Nielsen M, Buchmann K. 2003. Enhanced resistance of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), against *Yersinia ruckeri* challenge following oral administration of *Bacillus subtilis* and *B. licheniformis* (BioPlus2B). Journal of Fish Diseases. 26: 495–498.
84. Raida M, Buchmann K. 2008. Bath vaccination of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) against *Yersinia ruckeri*: Effects of temperature on protection and gene expression. Vaccine 26: 1050—1062.

85. Romalde J, Margariños B, Barja J, Toranzo A. 1993. Antigenic and molecular characterization of *Yersinia ruckeri*. Proposal for a new intraspecies classification. *Systematic and Applied Microbiology* 16, 411–419.
86. Romalde J. L., Barja J, Magariños B, Toranzo A. 1994. Starvation-survival processes of the bacterial fish pathogen *Yersinia ruckeri*. *Syst. Appl. Microbiol.* 17:161–168.
87. Ross A, Rucker R, Ewing W. 1966. Description of a bacterium associated with redmouth disease of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Can J Microbiol.* 12: 763– 770.
88. Rucker R. 1966. Redmouth disease of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Bulletin de L'Office International des Epizooties.* 65: 825-830.
89. Saleh M, Soliman H, El-Matbouli M. 2008. Loop-mediated isothermal amplification as an emerging technology for detection of *Yersinia ruckeri* the causative agent of enteric red mouth disease in fish. *BMC Vet Res* 4: 31.
90. Seong J, Chang H, Min J, Min S, Hwan J, Jun H. 2010. Characterization of *Yersinia ruckeri* isolated from the farm-cultured eel *Anguilla japonica* in Korea. *Korean J Vet Res* (2010) 50(1): 29~35

91. Sierra G. A simple method for the detection of lipolytic activity of micro-organisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates. *Antonie van Leeuwenhoek*. 1957, vol. 23, n°1, p. 15-22.
92. Sierralta V. Estado situacional de *Yersinia ruckeri* causante de “la enfermedad entérica de la boca roja” en trucha arco iris *Oncorhynchus mykiss* en piscigranjas de la sierra central del Perú. [Tesis de maestría]. 2011. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
93. Sierralta V, León J, De Blas I, Bastardo A, Romalde L, Castro T, Mateo E. 2013. Patología e identificación de *Yersinia ruckeri* en trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) en piscigranjas de Junín, Perú. *AquaTIC*. 38: 28-45.
94. Sierra E. Tipificación de aislados clínicos de *Klebsiella pneumoniae* por la técnica de “Multilocus sequence Typing”. [Tesis químico]. 2016. Ciudad de México: Instituto Politécnico Nacional.
95. Smith J, Smith N, O’Rourke M, Spratt B. 1993. How clonal are bacteria? *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 90,4384–4388.
96. Sirvas-Cornejo S, Sánchez-Robinet C, Peña-Domínguez P. 2011. Diagnóstico e identificación rápidos por PCR de *Yersinia ruckeri* aislada de *Oncorhynchus mykiss* procedentes de Canta, Lima, Perú. *Rev. Peru. Biol.* 18(3): 349 – 353.

97. Stevenson W, Airdrie, D. 1984. Serological variation among *Yersinia ruckeri* strains. J Fish Dis. 7: 247– 254.
98. Stevenson R, Daly J. 1982. Biochemical and serological characteristics of Ontario isolates of *Yersinia ruckeri*. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 39: 871.
99. Ström-Bestor M, Mustamäki N, Heinikainen S, HirveläKoski V, Verner-Jeffreys D, Wiklund T. 2010. Introduction of *Yersinia ruckeri* biotype 2 into Finnish fish farms. Aquaculture 308: 1–5
100. Swaminathan B, Barrett T, Hunter SB, Tauxe R. CDC PulseNet Task Force. 2001. PulseNet: the molecular subtyping network for foodborne bacterial disease surveillance, United States. Emerg. Infect. Dis. 7: 382- 389
101. Szaluś-Jordanow O, Krysztopa-Grzybowska K, Czopowicz M, Moroz A, Mickiewicz M, Lutyńska A, Kaba J, Nalbert T, Frymus T. 2018. MLST and RAPD molecular analysis of *Staphylococcus aureus* subsp. *anaerobius* isolated from goats in Poland. Arch Microbiol. 200(9): 1407–1410.
102. Tinsley J. Studies on the pathogenicity of *Yersinia ruckeri* biotype 2 to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) [Thesis doctoral]. 2010. Edinburgh: Heriot-Watt University.

103. Tinsley J, Austin D, Lyndon A, Austin B. 2011. Novel non-motile phenotypes of *Yersinia ruckeri* suggest expansion of the current clonal complex theory. *Journal of Fish Diseases* 34, 311–317
104. Tobback E, Decostere A, Hermans K, Haesebrouck F, Chiers K. 2007. *Yersinia ruckeri* infections in salmonid fish. *Journal of Fish Diseases*. 30, 257–268.
105. Tobback, E. Early pathogenesis of *Yersinia ruckeri* infections in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). Faculty of Veterinary Medicine Department of Pathology, Bacteriology and Avian Diseases, 2009.
106. Uribe J. Determinación de *Yersinia ruckeri* aisladas de truchas arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) en una piscigranja de Chachapoyas – Amazonas [Tesis Médico Veterinario]. 2020. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
107. Vázquez J, Berrón S. 2004. Multilocus sequence typing: el marcador molecular de la era de internet. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*; 22: 113-120.
108. Welch T, Verner-Jeffreys D, Dalsgaard I, Wiklund T, Evenhuis J.P., Garcia J, Hinshaw J, Drennan J, LaPatra S. 2011. Independent emergence of *Yersinia ruckeri* biotype 2 in the United States and Europe. *Appl Environ Microbiol* 77: 3493–3499.

109. Wheeler R, Davies R, Dalsgaard I, Garcia J, Welch T, Wagley S, Bateman K, Verner-Jeffreys D. 2009. *Yersinia ruckeri* biotype 2 isolates from mainland Europe and the UK likely represent different clonal groups. *Dis Aquat Organ* 84: 25–33.

110. Zorriehzahra M, Adel M, Torabi Delshad S. 2017. Enteric redmouth disease: Past, present and future. *Iranian Journal of Fisheries Sciences* 16(4): 1135-1156.

## XII. ANEXOS

### ANEXO I. Materiales y métodos

**Cuadro 7.** Características de las cepas de *Y. ruckeri* utilizadas en este estudio, según su procedencia, especie, órgano y año de aislamiento, perfil fenotípico de susceptibilidad antibiótica y genes de resistencia antibiótica.

Código	Departamento	Provincia	Especie	Órgano de aislamiento	Año de aislamiento	Perfil fenotípico de susceptibilidad antibiótica (*)	Genes de resistencia antibiótica (**)
1	Junín	Concepción	<i>O. mykiss</i>	Riñón anterior	2018	Susceptible (WT)	No detectado
2	Lima	Canta	<i>O. mykiss</i>	Bazo	2018	Susceptible (WT)	No detectado
3	Lima	Canta	<i>O. mykiss</i>	Riñón anterior	2018	Susceptible (WT)	No detectado
4	Junín	Jauja	<i>O. mykiss</i>	Bazo	2018	Susceptible (WT)	No detectado
5	Junín	Jauja	<i>O. mykiss</i>	Riñón anterior	2018	Susceptible (WT)	No detectado
6	Junín	Jauja	<i>O. mykiss</i>	Bazo	2018	Susceptible (WT)	No detectado
7	Áncash	Huaraz	<i>O. mykiss</i>	Riñón anterior	2018	Susceptible (WT)	No detectado
8	Áncash	Huaraz	<i>O. mykiss</i>	Bazo	2018	Susceptible (WT)	No detectado
9	Junín	Concepción	<i>O. mykiss</i>	Riñón anterior	2018	Susceptible (WT)	No detectado
10	Junín	Huancayo	<i>O. mykiss</i>	Bazo	2018	Susceptible (WT)	No detectado
11	Junín	Huancayo	<i>O. mykiss</i>	Riñón anterior	2018	Susceptible (WT)	No detectado
12	Lima	Canta	<i>O. mykiss</i>	Riñón anterior	2018	Susceptible (WT)	No detectado
13	Lima	Canta	<i>O. mykiss</i>	Riñón anterior	2018	Susceptible (WT)	No detectado
14	Junín	Huancayo	<i>O. mykiss</i>	Riñón anterior	2018	Susceptible (WT)	No detectado
15	Áncash	Huaraz	<i>O. mykiss</i>	Bazo	2018	Susceptible (WT)	No detectado
16	Junín	Concepción	<i>O. mykiss</i>	Bazo	2018	Susceptible (WT)	No detectado

(\*) Cepas de *Y. ruckeri* fueron sometidas a pruebas de sensibilidad in vitro frente a 5 discos de antibióticos (Liofilchem, Italia); oxitetraciclina (30 µg), florfenicol (30 µg), ácido oxolínico (2 µg), sulfametoxazol/trimetoprim (25 µg) y amoxicilina (10 µg), siguiendo las recomendaciones de la guía VET03-A del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2006).

(\*\*) Identificación de genes de resistencia en cepas *Yersinia ruckeri*; 16S-rDNA, gyrA, floR, tetA, tetC, sul1, sul3, blaTEM y dfrA1.

## **ANEXO I.I. Materiales y métodos**

**Protocolo para reactivación, identificación de cepas de *Yersinia ruckeri* según Davies y Frerichs, (1989) y Bueno, (2012).**

### ***Procedimiento***

#### ***1er día:***

- Usar caldo de tripticasa de soya (TSB)
- Incubación a 25°C por 48 horas

#### ***2do día:***

- Siembra de cepas en Agar TSA, tratando de obtener cepas puras y aisladas.
- Incubar a 25°C por 24- 48h.

#### ***3er día***

- Observar colonias puras y aisladas en el agar.
- Realizar tinción Gram y pruebas de oxidasa y catalasa.

Realizar la siembra en las pruebas bioquímicas correspondientes:

- Siembra en medio de cultivo Lisina (LIA) picando hasta el fondo del tubo y estriando en el pico de flauta.
- Siembra en medio de cultivo Citrato, picando hasta el fondo del tubo y estriando en el pico de flauta.
- Siembra en medio de cultivo Triple sugar iron (TSI), picando hasta el fondo del tubo y estriando en el pico de flauta.
- Siembra en caldo de cultivo Urea usando un asa de siembra.
- Siembra en Medio de cultivo SIM haciendo punción profunda de forma vertical.
- Incubar a 22° por 24-48 horas.

#### ***4er día***

- Colocar el reactivo de Kovacs en el medio SIM.
- Interpretar los resultados de las pruebas bioquímicas.

## **ANEXO I. II. Materiales y métodos**

**Protocolo para la determinación de biotipo de *Yersinia ruckeri* según Sierra, (1957) y López, (2012).**

Preparación medio de cultivo Agar base Tween:

- Peptona: 10 g
- ClNa: 5 g
- Cl<sub>2</sub>Ca: 0,1 g
- Agar: 15 g
- Agua destilada: 1000 ml

**Reactivo:** El Tween 20 y 80 es esterilizado separadamente en autoclave (20 minutos a 120°C), adicionando luego al medio base para dar una concentración final del 1%.

Se distribuye en placas y se siembra por estría.

**Interpretación del resultado:** Las placas son observadas diariamente, el tiempo de incubación y temperatura, será la óptima de crecimiento para cada microorganismo. Detectar zonas opacas alrededor de la siembra que se deben a la formación de cristales de jabones de Calcio que pueden observarse bajo la lupa.

Confirmación motilidad:

Realizar examen directo al microscopio de cada cepa motil.

- Tomar una colonia y colocarla en una lámina porta objeto con una gota de agua destilada estéril.
- Observar la movilidad de la bacteria.

### **ANEXO I.III. Materiales y métodos**

#### **Protocolo de extracción mediante el uso de Innuprep bacterial DNAkit, Analytik Jena (Alemania).**

##### **Aislamiento de ADN de sedimentos de células bacterianas después del cultivo**

1. Agregue 200 ul de tampón TE al sedimento bacteriano y vuelva a suspender el sedimento por completo. Añadir 15 ul de Lysozym (solución madre 10 mg/ml en tampón TE). Mezclar mediante agitación vorticial pulsada durante 5 seg. Incubar a 37°C.
2. Agregue 200 ul de solución de lisis TLS y 25 ul de proteinasa K a la muestra, mezcle vigorosamente mediante agitación vorticial pulsada durante 5 segundos. Incubar a 50°C durante 15 minutos.
3. Si es necesario, centrifugue el tubo de 1,5 ml a 10 000 xg (12 000 rpm) durante 1 minuto para centrifugar el material sin lisar. Transferir el sobrenadante a otro tubo de 1,5 ml.
4. Añada 400 ul de solución de unión TBS a la muestra lisada, mezcle con vórtex o pipeteando hacia arriba y hacia abajo varias veces.
5. Aplique la muestra al filtro giratorio ubicado en un tubo receptor de 2,0 ml. Cierre la tapa y centrifugue a 10,00 x g (12,000 rpm) durante 2 minutos. Deseche el tubo receptor con el filtrado. Coloque el filtro giratorio en un nuevo tubo receptor de 2,0 ml.
6. Abrir el Spin Filter y agregar 500 ul de Solución de Lavado HS, cerrar la tapa y centrifugar a 10.000 x g (12.000 rpm) por 1 minuto. Deseche el tubo receptor con el filtrado. Coloque el filtro giratorio en un nuevo tubo receptor de 2,0 ml.
7. Abra el filtro giratorio y agregue 750 ul de solución de lavado MS, cierre la tapa y centrifugue a 10.000 x g (12.000 rpm) durante 1 minuto. Deseche el tubo receptor con el filtrado. Coloque el filtro giratorio en un tubo receptor nuevo de 2,0 ml.

8. Centrifugar a máx. velocidad durante 2 minutos para eliminar todos los restos de etanol. Deseche el tubo receptor de 2,0 ml.

9. Coloque el filtro giratorio en un tubo de elución de 1,5 ml. Abra con cuidado la tapa del Spin Filter y agregue 50-100 ul de tampón de elución. Incubar a temperatura ambiente durante 1 minuto. Centrifugar a 6.000 xg (8000 rpm) durante 1 minuto. Un segundo paso de elución aumentará los rendimientos de ADN extraído.

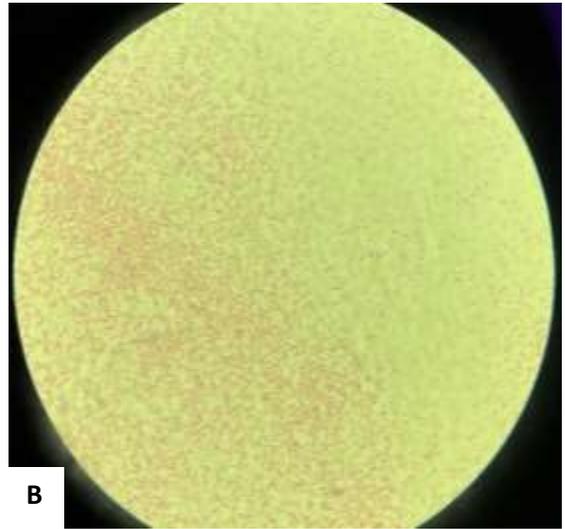
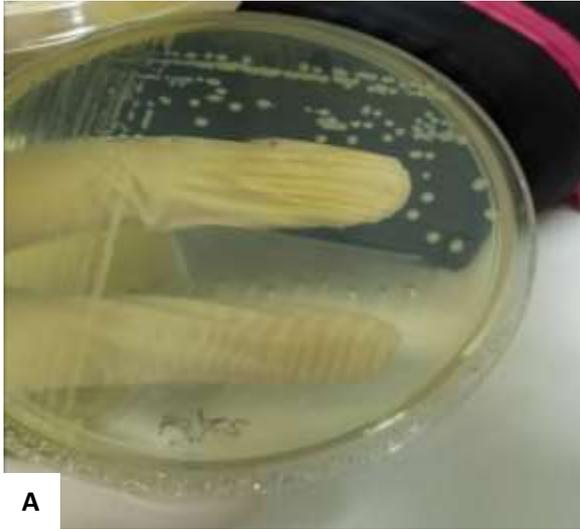
## **ANEXO II. Plan de análisis de datos**

**Cuadro 9.** Cepas de referencia y de la base de datos del PubMLST usadas en este estudio.

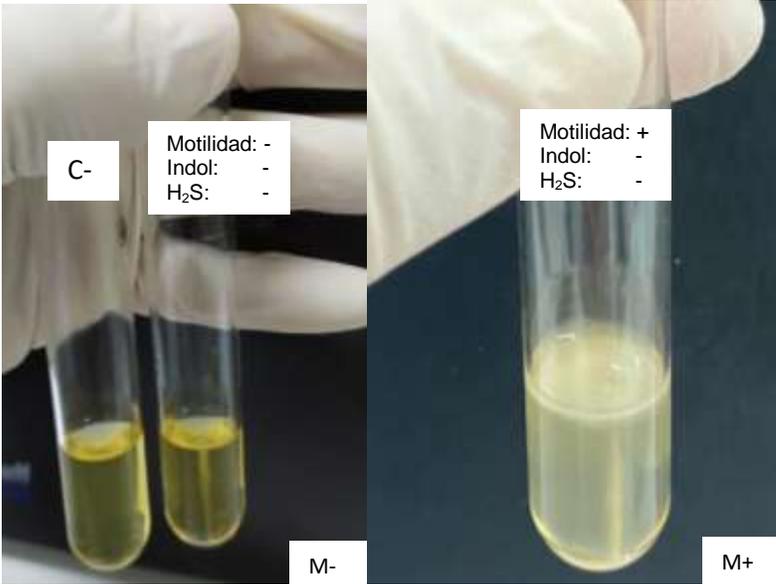
<b>CÓDIGO</b>	<b>ORIGEN</b>	<b>AÑO</b>	<b>REFERENCIA</b>
<b>Cepas de la base de datos</b>			
37	<i>O. mykiss</i>	2005	Bastardo <i>et al.</i> , 2012
YR1	<i>O. mykiss</i>	2001	Bastardo <i>et al.</i> , 2012
YR9	<i>O. mykiss</i>	1995	Bastardo <i>et al.</i> , 2012
B14-102	Sedimento	1994	Bastardo <i>et al.</i> , 2012
C12-54	Sedimento	1994	Bastardo <i>et al.</i> , 2012
860821	<i>Salmo salar</i>	1985	Bastardo <i>et al.</i> , 2012
850812	<i>Anguilla anguilla</i>	1987	Bastardo <i>et al.</i> , 2012
B9-28	Agua	1994	Bastardo <i>et al.</i> , 2012
830118	<i>O. mykiss</i>	1983	Bastardo <i>et al.</i> , 2012
<b>Cepas de referencia</b>			
ATCC29473Calvez	<i>O. mykiss</i>	1965	Calvez <i>et al.</i> , 2015
CAE431	<i>Esturion</i>	2007	Calvez <i>et al.</i> , 2015
TUTI EX5	<i>O. mykiss</i>	1978	Calvez <i>et al.</i> , 2015
NCTC 12266	<i>O. mykiss</i>	1978	Calvez <i>et al.</i> , 2015
NCTC 12267	<i>Chinook salmon</i>	1978	Calvez <i>et al.</i> , 2015
NCTC 12269	-	1989	Calvez <i>et al.</i> , 2015
NCTC 12270	Anguila	1978	Calvez <i>et al.</i> , 2015
CETC 956	<i>Chinook salmon</i>	1978	Calvez <i>et al.</i> , 2015

### ANEXO III. RESULTADOS

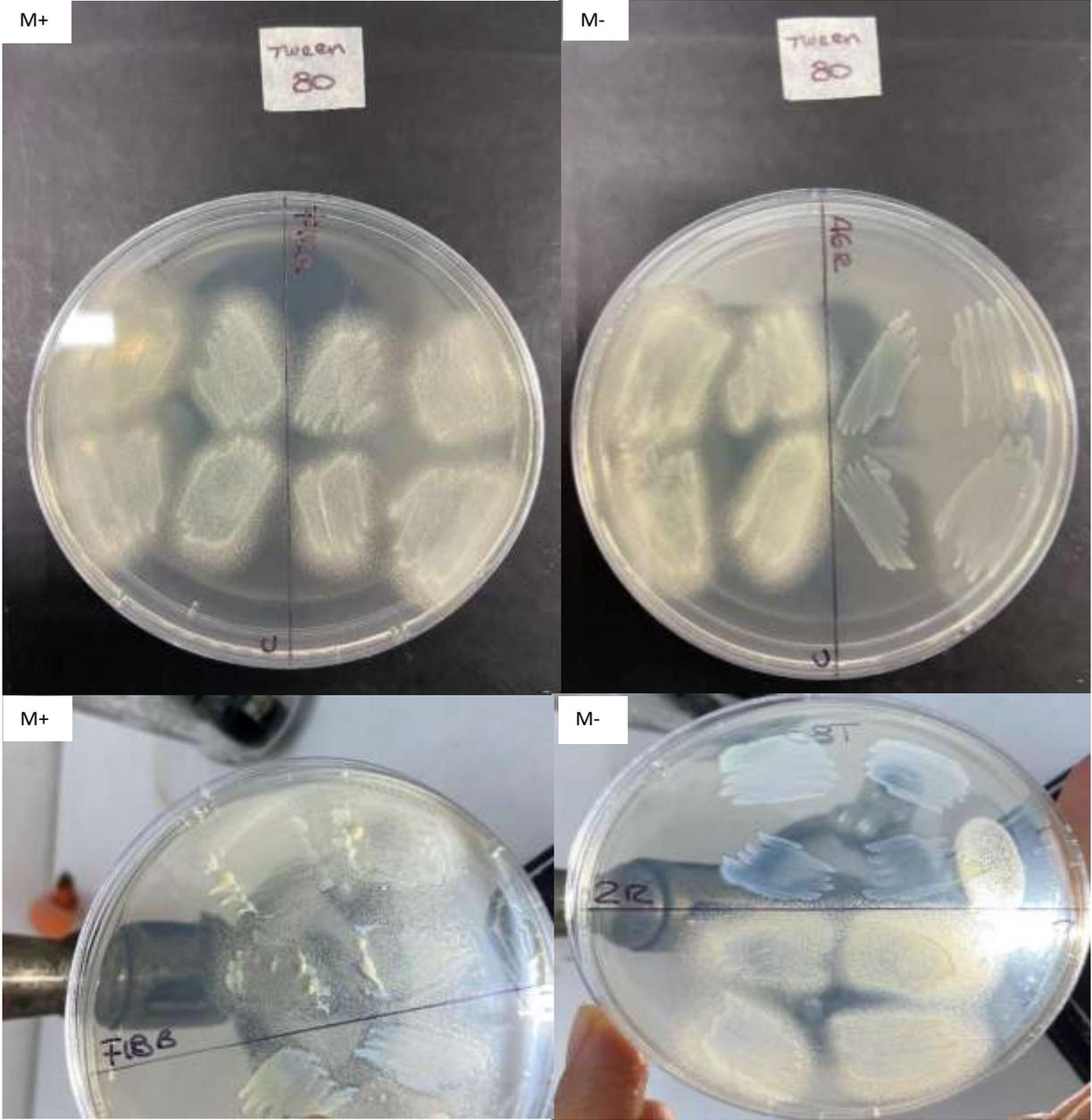
**Figura 2.** A: Colonias de *Y. ruckeri* en Agar TSA, B: bacilos cortos Gram negativos, C: Pruebas bioquímicas. Resultados comparados con Buller, 2004.



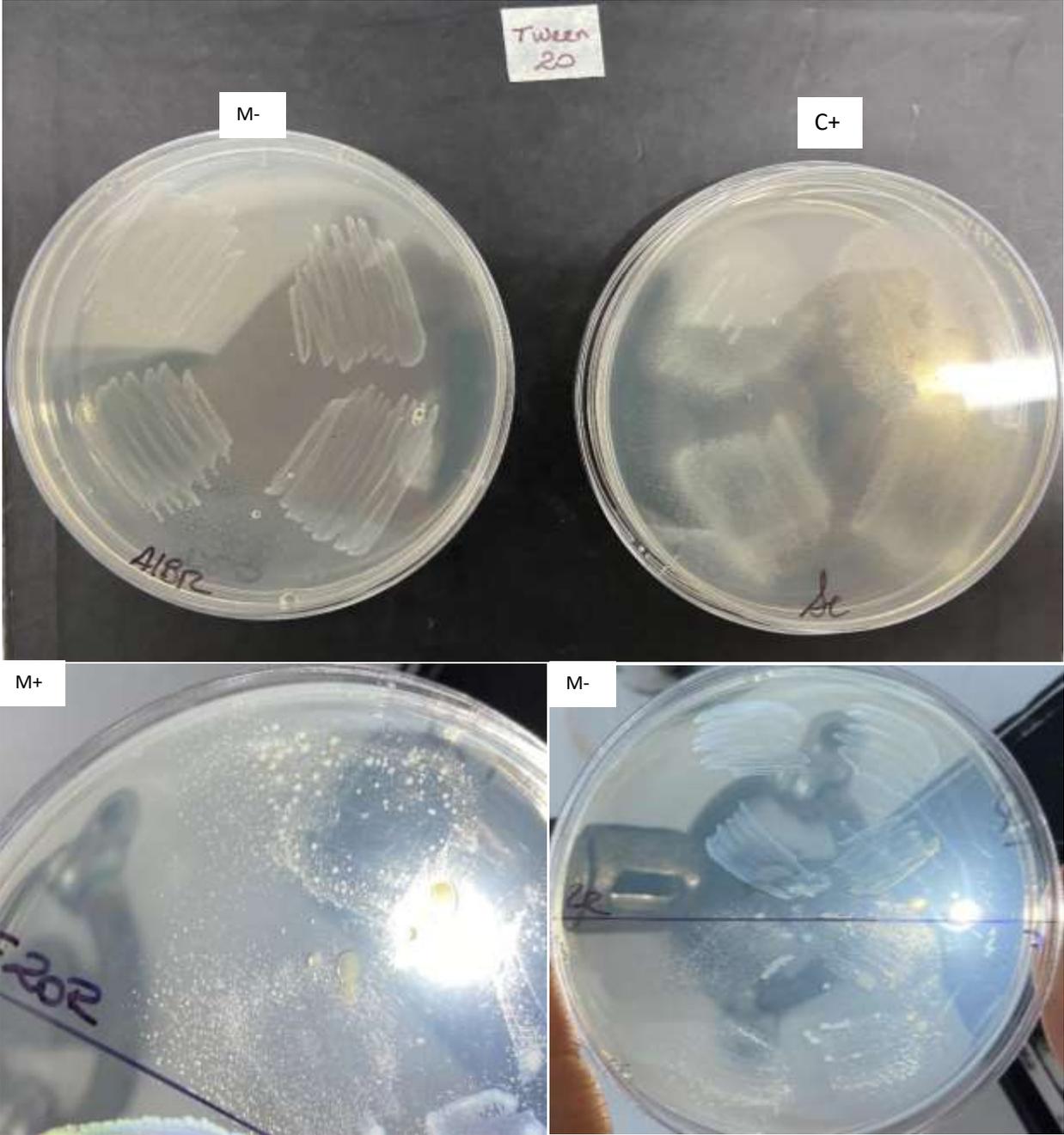
**Figura 3.** Medio SIM inoculado con *Y. ruckeri*. C-: Control negativo, medio SIM sin inocular, H<sub>2</sub>S: Sulfuro de hidrógeno, M-: Muestra negativa, M+: Muestra positiva, +: Positivo, -: Negativo.



**Figura 4.** Presencia y ausencia de halo de precipitación de cristales calcio en el agar base Tween 80. C+: Control positivo: Cepa de *Aeromonas salmonicida*, M-: Muestra negativa, M+: Muestra positiva.



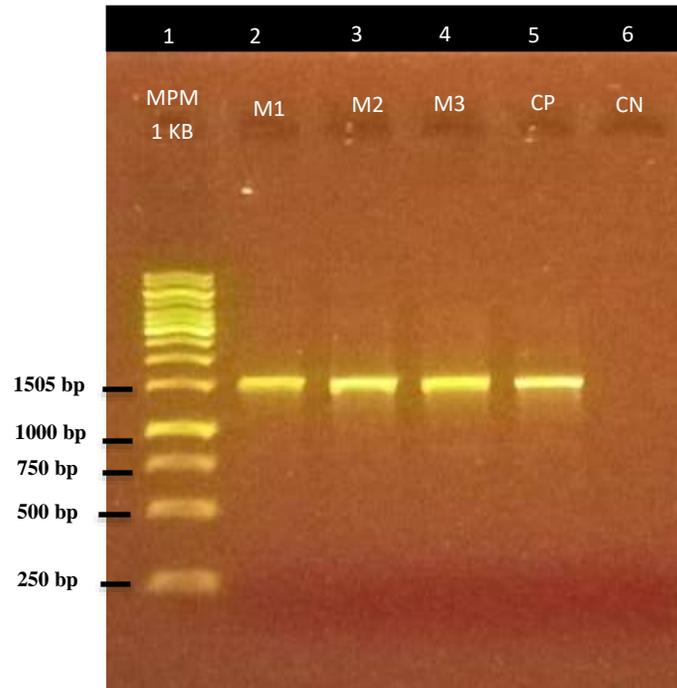
**Figura 5.** Presencia y ausencia de halo de precipitación de cristales calcio en el agar base Tween 20. C+: Control positivo: Cepa de *Aeromonas salmonicida*, M-: Muestra negativa, M+: Muestra positiva.



**Cuadro 10.** Determinación de biotipos de cepas de *Y. ruckeri* en base a los medios SIM y agar base Tween.

Cepa	Departamento	Provincia	SIM			Agar base Tween		Determinación del biotipo
			Motilidad	Sulfuro	Indol	Tween 20	Tween 80	
1	Junín	Concepción	-	-	-	-	-	2
2	Lima	Canta	+	-	-	+	+	1
3	Lima	Canta	+	-	-	+	+	1
4	Junín	Jauja	+	-	-	+	+	1
5	Junín	Jauja	+	-	-	+	+	1
6	Junín	Jauja	+	-	-	+	+	1
7	Áncash	Huaraz	-	-	-	-	-	2
8	Áncash	Huaraz	-	-	-	-	-	2
9	Junín	Concepción	-	-	-	-	-	2
10	Junín	Huancayo	-	-	-	-	-	2
11	Junín	Huancayo	-	-	-	-	-	2
12	Lima	Canta	-	-	-	-	-	2
13	Lima	Canta	-	-	-	-	-	2
14	Junín	Huancayo	-	-	-	-	-	2
15	Ancash	Huaraz	+	-	-	+	+	1
16	Junín	Concepción	-	-	-	-	-	2

**Figura 6.** Confirmación molecular por PCR convencional del gen 16s ARNr. Pocillo 1 y 6: Marcador de peso molecular (MPM) 1 KB; pocillo 2-4: cepas (M1-M3); Pocillo 5: Control positivo (CP); Pocillo 6: control negativo (CN).



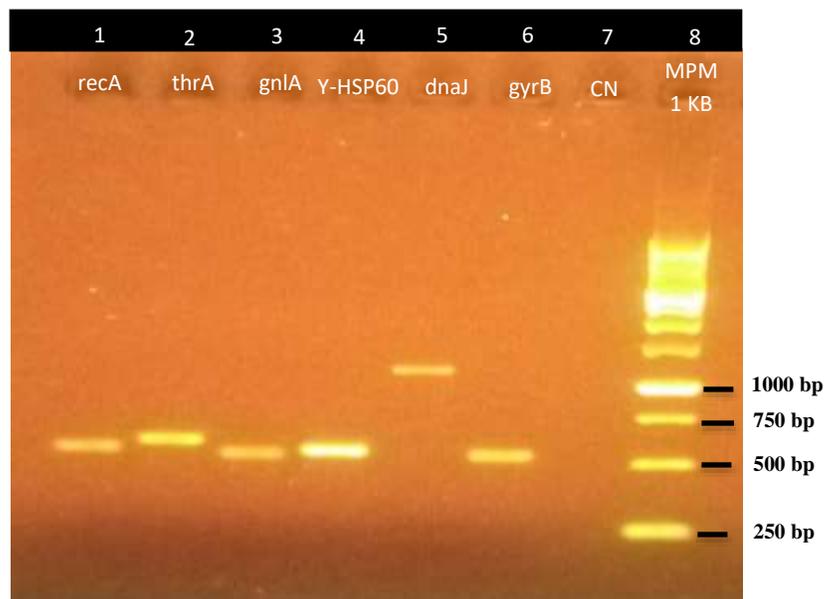
**Figura 7.** Blast de la secuencia 16s ARNr de una de las cepas de *Y. ruckeri* frente a una cepa de la base de datos.

**Yersinia ruckeri strain IMP-BG-B067 16S ribosomal RNA gene, partial sequence**  
Sequence ID: [MNS05173.1](#) Length: 1324 Number of Matches: 1

Range 1: 441 to 1212 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1426 bits(772)	0.0	772/772(100%)	0/772(0%)	Plus/Minus
Query 1	CCAATCCGGACTACGACAGACTTTATGTGGTCCGCTTGCTCTCGCGAGTTCCGTTCACTT	60		
Sbjct 1212	CCAATCCGGACTACGACAGACTTTATGTGGTCCGCTTGCTCTCGCGAGTTCCGTTCACTT	1153		
Query 61	TGTATCTGCCATTGTAGCACGTGTAGCCCTACTCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGT	120		
Sbjct 1152	TGTATCTGCCATTGTAGCACGTGTAGCCCTACTCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGT	1093		
Query 121	CATCCCCACCTTCTCCGGTTTGTACCGGACGTCCTCCCTTGAGTTCCACCATACGTG	180		
Sbjct 1092	CATCCCCACCTTCTCCGGTTTGTACCGGACGTCCTCCCTTGAGTTCCACCATACGTG	1033		
Query 181	CTGGCAACAAAGGATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATTTACAACAC	240		
Sbjct 1032	CTGGCAACAAAGGATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATTTACAACAC	973		
Query 241	GAGCTGACGACAGCCATGACGACCTGTCTCACAGTTCCGGAAGGCACCAAGGCATCTCT	300		
Sbjct 972	GAGCTGACGACAGCCATGACGACCTGTCTCACAGTTCCGGAAGGCACCAAGGCATCTCT	913		
Query 301	GCCAAGTTCGTGGATGTCAAGAGTAGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCGAATAAACCA	360		
Sbjct 912	GCCAAGTTCGTGGATGTCAAGAGTAGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCGAATAAACCA	853		
Query 361	CATGCTCCACCCTTGTGCGGGCCCCGTCAATTCATTTGAGTTTAACTTTCGCGCCGT	420		
Sbjct 852	CATGCTCCACCCTTGTGCGGGCCCCGTCAATTCATTTGAGTTTAACTTTCGCGCCGT	793		
Query 421	ACTCCCCAGGCGGTCGACTTAACGCGTTAGCTCCGGAAGCCACGCTCAAGGGCACAACC	480		
Sbjct 792	ACTCCCCAGGCGGTCGACTTAACGCGTTAGCTCCGGAAGCCACGCTCAAGGGCACAACC	733		
Query 481	TCCAAGTCGACATCGTTTACAGCGTGGACTACCAGGATATCTAATCTGTTTGCTCCCA	540		
Sbjct 732	TCCAAGTCGACATCGTTTACAGCGTGGACTACCAGGATATCTAATCTGTTTGCTCCCA	673		
Query 541	CGCTTTCGCACCTGAGCGTCAAGTCTTTGTCCAGGGGGCCGCTTCGCCACCGGATATTCCT	600		

**Figura 8.** Confirmación molecular por PCR convencional de 6 genes de mantenimiento de *Yersinia ruckeri* ATCC 29473. Pocillos: 1. recA (560 bp), 2. thrA (693 bp), 3. gnlA (530 bp), 4. Y-HSP60 (565 bp), 5. dnaJ (1024 bp), 6. gyrB (545 bp); Pocillo 7: control negativo (CN); Pocillo 8: Marcador de peso molecular (MPM) 1 KB.



**Cuadro 11.** Asignación de la secuencia tipo (ST) a partir de los perfiles alélicos de cepas utilizadas en este estudio, cepas de referencia y de la base de datos del PubMLST.

Código	Perfil alélico						ST*
	<i>gnlA</i>	<i>recA</i>	<i>thrA</i>	<i>dna J</i>	<i>Y-HSP60</i>	<i>gyr B</i>	
1	1	5	3	2	4	5	1
2	1	5	3	2	4	1	2
3	1	5	3	2	4	5	1
4	1	5	3	2	4	5	1
5	1	5	3	2	4	5	1
6	1	5	3	2	4	1	2
7	1	5	3	2	4	5	1
8	1	5	3	2	4	5	1
9	1	5	3	2	4	5	1
10	1	5	3	2	4	5	1
11	1	5	3	2	4	5	1
12	1	5	3	2	4	5	1
13	1	5	3	2	4	5	1
14	1	5	3	2	4	5	1
16	1	5	3	2	4	5	1
37	1	5	3	2	4	5	1
B9-28	8	4	3	5	4	6	3
C12-54	1	5	3	2	4	5	1
B14-102	1	5	3	2	4	5	1
YR1	1	5	3	2	4	5	1
YR9	1	5	3	2	4	5	1
830118	1	5	3	6	4	5	4
850812	7	5	4	4	4	5	5
860821	7	5	4	4	4	5	5
NCTC 12266	1	5	3	2	4	5	1
NCTC 12267	5	5	3	2	4	5	6
NCTC 12269	5	5	3	7	4	5	7
NCTC 12270	7	5	4	2	4	5	8
TUTI EX5	1	5	3	2	4	5	1
CETC 956	5	5	3	2	4	5	6
CAE 431	1	5	3	6	4	5	4
ATCC 29473 Calvez	1	5	3	6	4	5	4

**Figura 12.** Frecuencia alélica y de perfil alélico de los 6 genes de mantenimiento usados mediante el software START2.

### Allele Frequencies

32/32 strains selected

Allele	<i>recA</i>	<i>dnaJ</i>	<i>thrA</i>	<i>hsp60</i>	<i>gryB</i>	<i>glnA</i>
1	-	-	-	-	2	25
2	-	25	-	-	-	-
3	-	-	29	-	-	-
4	1	2	3	32	-	-
5	31	1	-	-	29	3
6	-	3	-	-	1	-
7	-	1	-	-	-	3
8	-	-	-	-	-	1
<b>Total</b>	<b>2</b>	<b>5</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>3</b>	<b>4</b>

### Allelic profile frequencies

32/32 strains selected

8 different profile(s) in dataset (displayed in descending order of frequency)

ST	Profile ( <i>recA</i> , <i>dnaJ</i> , <i>thrA</i> , <i>hsp60</i> , <i>gryB</i> , <i>glnA</i> )	Frequency	% of dataset
1	5, 2, 3, 4, 5, 1	20	62,50
4	5, 6, 3, 4, 5, 1	3	9,38
2	5, 2, 3, 4, 1, 1	2	6,25
5	5, 4, 4, 4, 5, 7	2	6,25
6	5, 2, 3, 4, 5, 5	2	6,25
3	4, 5, 3, 4, 6, 8	1	3,13
7	5, 7, 3, 4, 5, 5	1	3,13
8	5, 2, 4, 4, 5, 7	1	3,13

**Figura 13.** Número de sitios polimórficos encontrados en uno de los genes de mantenimiento mediante el software START2.

```

glnA
4 alleles, 1 polymorphic sites
1      10      20      30      40      50
ATGATATTGATGCCAGATGCCAGCACTGCAGTGATGGATCCATTCTTCGC
C

51      60      70      80      90      100
AGATTCTACCCTGATTATCCGTTGTGACATTCTGGAACCCGGCACCATGC

101     110     120     130     140     150
AGGGTTATGACCGTGACCCACGTTCTATCTCCAAACGTGCAGAAGACTTC

151     160     170     180     190     200
CTGAAATCTTCAGGTATCGCAGATACCGTGCTGTTCTGGACCAGAACCTGA

201     210     220     230     240     250
ATTCTTCTTGTTTGACGATATTCGCTTTGGCAGCAGCATCCGTGGCTCCC

251     260     270     280     290     300
ACGTTGCTATCGATGATATCGAAGGGCGCATGGAACCTCCAGCACCAAATAC

301     310     320     330     340     350
GAAGGTGGTAACAAAGGCCATCGTCCCAGTAAAAGGCGGTTACTTCCC

351     360     370     380     390     400
GGTCCCCCAGTTGATTCCGCGCAAGATCTGCGTTCTGCCATGTGTTTAA

401     410     |
CCATGGAAGATATGGG
  
```

**Figura 14.** Índice de asociación ( $I_A$ ) obtenido mediante el software START2.

**Index of Association**

32/32 strains selected

$V_e$  is the expected variance if the alleles present at different loci in an individual are independent, ie. if there is no linkage disequilibrium.

Observed variance,  $V_o = 1,648$

Expected variance,  $V_e = 0,824$

**Index of Association,  $I_A = (V_o/V_e) - 1 = 0,999$**